

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Químicas.



TESIS DOCTORAL

**Los metales y el mecanismo enzimático de la 2-oxo-ácido
carboxi-liasa**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Luisa Begué Cantón

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Serie A - n.º 114

SECCION DE QUIMICAS



**LOS METALES Y EL
MECANISMO ENZIMATICO DE
LA 2-OXO-ACIDO CARBOXI-LIASA**

X-53-044212-3

TESIS DOCTORAL

por

MARIA LUISA BEGUÉ CANTON



**Publicaciones de la Facultad de Ciencias
MADRID 1970**

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Español de Fisiología y Bioquímica (C.S.I.C.), dirigido por el Prof. Dr. A. Santos Ruiz.

A él agradecemos el interés puesto en esta investigación, así como a la Dra. G. de la Fuente sus orientaciones en la iniciación del mismo.

Igualmente queremos expresar nuestro agradecimiento al Prof. Dr. A. Martín Municio por su amabilidad al hacerse cargo de la ponencia de esta tesis.

Madrid, abril 1.968

INDICE

pág.

INTRODUCCION	1
--------------------	---

I. PARTE TEORICA

1. IONES METAL: características	3
11. Formación de complejos. Estabilidad de los quelatos	4
12. Parámetros básicos del ión metal	7
13. Formación de complejos ión metal en solución acuosa	9
Factores que determinan su efectividad	9
131. Estabilidad del complejo; factores que deter- minan el grado de estabilidad	12
132. Velocidad de sustitución de las moléculas de H ₂ O por los ligandos	26
133. Velocidad de disociación del complejo	29
134. Acidez del metal	31
14. Grupos de interacción con el ión-metal	34
141. Factores que definen la especificidad de las proteínas en relación con los metales	43
142. Interacciones metal-proteína y estado del en- zima	47
15. Naturaleza de los enlaces	50
2. METALOEENZIMAS: nomenclatura y clasificación	59

	pág.
21. Enzimas con ión metal dissociable	61
211. PIRUVICO DESCARBOXILASA: generalidades	64
Componentes de la pirúvico descarboxilasa	71
2111. Apodescarboxilasa: generalidades	73
Grupos de la proteína con probable participación en la actividad catalítica; papel de los grupos -SH en el mecanismo enzimático de la pirúvico descarboxilasa	75
2112. Co-descarboxilasa: generalidades	79
21121. Mecanismo de acción	82
Teoría del doble centro	91
21122. Unión con el apo-enzima: papel del radical fosfórico	98
Importancia de los sustituyentes en diferentes posiciones del anillo pirimidínico	104
21123. Existencia de formas S-S en la pirúvico descarboxilasa	106
2113. Otros requisitos: ión divalente	107
Objetivo de la tesis	111

II. P A R T E E X P E R I M E N T A L

1. MATERIAL	pág.
11. Aparatos	114
12. Productos	114
2. METODO	
21. Determinación manométrica de la actividad des- carboxilásica. Fundamento	119
22. Determinación de la K_v	120
23. Termobarómetro	121
24. Condiciones de la determinación manométrica	121
25. Determinación de la velocidad inicial de des- carboxilación	122
3. RESULTADOS	
31. Pirúvico descarboxilasa: Purificación	123
311. Características de la pirúvico descarboxi- lasa purificada.	
3111. pH óptimo de descarboxilación	129
3112. Actividad de la pirúvico descarboxi- lasa purificada	132
3113. Actividad máxima de la pirúvico des- carboxilasa purificada	132
3114. pH óptimo de recombinación	135
3115. Efecto del EDTA sobre la actividad de la PDC purificada	136
3116. Conclusiones	140

	pág.
32. Apo-pirúvico descarboxilasa	142
321. Esquema general de preparación	143
3211. Actividad residual de la apo-descarboxilasa; condiciones de valoración manométrica .	152
32111. Efecto del pH y del tiempo de incubación	153
32112. Efecto del pH y del tiempo de incubación, en presencia de PO_4HNa_2 0.25M	154
32113. Efecto del pH y del tiempo de incubación, en presencia de EDTA 0.1M	155
32114. Comparación de valores	157
3212. Actividad máxima del enzima recombinado; condiciones de valoración manométrica	159
32121. Efecto del pH y del tiempo de incubación	160
32122. Efecto del pH y del tiempo de incubación, en presencia de PO_4HNa_2 0.25M	161
32123. Efecto del pH y del tiempo de incubación, en presencia de EDTA 0.1M	162
32124. Comparación de valores	164
3213. Conclusiones	167
3214. Método propuesto de preparación de apo-descarboxilasa	169

	pág.
33. Iones metal	170
331. Particularidades del ión Mg (pH de recombinación, K_m , $V_{m\acute{a}x.}$)	172
332. Particularidades del ión Mn (pH de recombinación, K_m , $V_{m\acute{a}x.}$)	181
333. Particularidades del ión Be (carácter de la inhibición, K_i)	191
334. Particularidades del ión Cd (actividad o inhibición en función de la concentración del ión metal; carácter de la inhibición)	199
335. Particularidades del ión Co (actividad o inhibición en función de la concentración del ión metal; carácter de la inhibición)	209
336. Particularidades del ión Ni (actividad o inhibición en función de la concentración del ión metal; carácter de la inhibición)	217
III. D I S C U S I O N	227
IV. C O N C L U S I O N E S	247
V. B I B L I O G R A F I A	251

"Il fallait désormais tenir compte dans l'étude de ferments solubles, non seulement de cette substance organique très altérable à laquelle nous attachons jusque-là l'idée de ferment soluble mais encore de celles qu'on pourrait appeller co-ferments (ici minérales, là peut-être organiques) qui ferment avec la première le système véritablement actif".

Gabriel BERTRAND (1894)

Bastantes años han sido necesarios -desde que Gabriel Bertrand subrayó por vez primera la participación de los metales en sistemas enzimáticos- para que se generalizase esta noción de enzima, aceptada actualmente como la única explicación racional de los profundos efectos biológicos producidos por trazas de dichas sustancias.

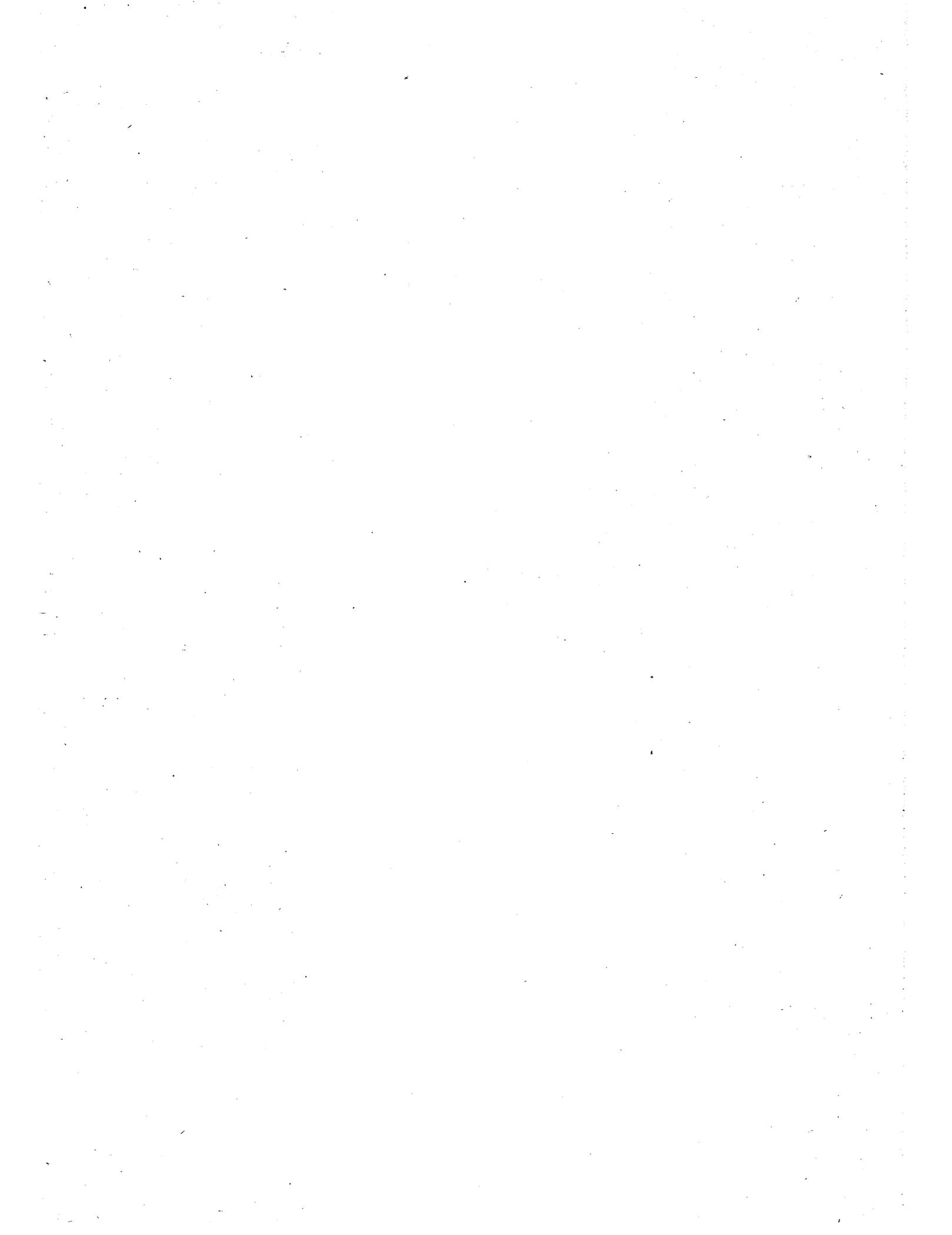
No obstante, la nomenclatura de "oligoelementos", "elementos traza", "microelementos", "elementos raros", "micronutrientes" y "elementos menores", con que frecuentemente se ha designado a los metales relacionados con la generalidad de los sistemas biológicos, reflejaba la característica principal de estos elementos, esto es, su capacidad para funcionar en pequeñas cantidades, lo que ciertamente apuntaba a su probable actuación como catalizadores, ya como partes constituyentes ya como activadores de los mismos. El múltiple papel del metal se puso posteriormente de manifiesto en los trabajos preliminares sobre enzimas relacionados con la presencia de metales, debido a la acusada especificidad de metal en algunos casos y, en

otros, a la falta de la misma, si bien se apreciaban diferencias en cuanto a la eficiencia con que los iones metálicos actuaban como coenzimas.

Estos resultados iniciales, a pesar de su complejidad que dio base a múltiples y confusos esquemas de reacción, destacaron fundamentalmente no sólo la participación de los metales en los procesos enzimáticos sino también la importancia de estos estudios para la interpretación del mecanismo de acción de enzimas, y al mismo tiempo, y debido a su misma complejidad, pusieron de manifiesto la necesidad de una sólida base experimental, señalada por Malmström como "a much more urgent need in this field than fancy speculation".

Nuestro objetivo, en el presente trabajo, ha sido contribuir al conocimiento del mecanismo de acción de la pirúvico descarboxilasa -ya objeto de previos estudios en este laboratorio- desde el nuevo punto de vista del papel de los metales. A la dificultad experimental de este estudio, que requería no sólo un perfecto control de las condiciones del complejo medio reaccionante sino también una gran pureza de los componentes del sistema enzimático, se unía la falta de un estudio básico teórico. Hemos creído, pues, de interés presentar en primer lugar un análisis general de las características de los iones metal en relación con los enzimas (parámetros, grupos de interacción, función, etc.). También hemos incluido una amplia revisión bibliográfica de la función de la co-descarboxilasa, concretada en la presentación del esquema más plausible actualmente sobre la acción enzimática de la 2-oxo-ácido carboxi-liasa o pirúvico descarboxilasa (E.C.4111).

I. PARTE TEORICA



1. IONES METAL

1. IONES METAL: características.

Los metales constituyen aproximadamente el 75% de los elementos conocidos y, entre ellos, unos diez (Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Co, Mo) han demostrado ser necesarios para el mantenimiento de la vida animal.

De acuerdo con la cantidad de metal presente en el organismo, pudiera establecerse una primera distinción entre los mismos

Cantidad aproximada de metales en el organismo de los seres humanos adultos (1)

<u>Metal</u>	<u>Gramos</u>	<u>Milimoles</u>
Ca	1050	26,500
K	245	6,300
Na	105	4,600
Mg	35	1,400
Fe	3	54
Mn	0.2	3.6
Cu	0.1	1.6
Zn,Co,Mo	0.1	1

siendo interesante destacar que los metales que, como el Ca, K, Na y Mg, se hallan en mayor proporción, no son elementos de transición -elementos en los que las órbitas electrónicas internas se llenan con preferencia a las órbitas externas formando iones complejos resistentes, mediante enlaces covalentes- sino elementos que adquieren la configuración electrónica estable del gas noble próximo y de aquí que generalmente reaccionen con grupos funcionales, en virtud de atracciones puramente electrostáticas. La vida, tal como la conocemos, sería imposible si alguno de los elementos de transición -fuertemente bloqueadores-

estuviera presente en cantidades comparables a las de dichos metales.

Desde hace años se ha dado por supuesto en Bioquímica que el papel de estos elementos en la fisiología de la célula llegaría a explicarse teniendo en cuenta su participación, como grupos activos, en varios importantes enzimas (2). Este punto de vista se ha visto confirmado en los hallazgos de los últimos 30 años, hallazgos que han permitido demostrar que muchos de los metales estudiados eran requeridos en la acción de uno u otro sistema enzimático o al menos influían sobre la actividad de los mismos, dando así base, al mismo tiempo, para abordar el problema de la especificidad a través del análisis de sus características.

Sin embargo, el significado fisiológico de estas observaciones no está totalmente aclarado; en ningún caso la observación del efecto activante por un metal "in vitro" define necesariamente una función fisiológica del metal en cuestión(3)

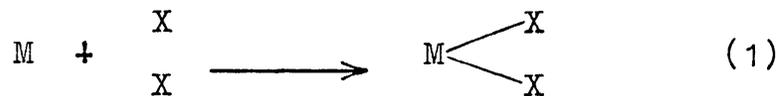
11. Formación de complejos. Estabilidad de los quelatos.

Al examinar la naturaleza de las sustancias con función de catalizadores en las transformaciones biológicas destaca, en primer lugar, la implicación de los metales, y de un examen más detallado ha podido deducirse que en aquellos casos en los que se ha determinado la naturaleza de la combinación del metal, ésta ha resultado ser un compuesto complejo de alguna clase (4).

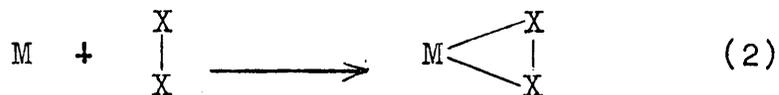
Un ión metal puede coordinar con un número variado de moléculas de una sustancia -indicando el número de coordinación el número de ligandos suficientes para satisfacer al catión metal- dando lugar a configuraciones espaciales definidas: planar y tetraédrica, entre los metales de coordinación 4, y octaédrica, entre los metales de coordinación 6, aunque también se conocen configuraciones "forzadas". La coordinación puede tener lugar con dos grupos susceptibles, de la misma molécula, para formar entonces un complejo quelato bidentato, o, más raramente, con moléculas que contienen tres o cuatro grupos situados apropiadamente, para formar complejos quelato tridentatos y tetradentatos. En la formación de compuestos quelato solamente toman parte las configuraciones que corresponden a anillos relativamente libres de tensión, siendo los más estables los anillos de cinco o seis miembros (5).

Los investigadores clásicos en la química de preparación de complejos, reconocieron que los complejos quelato eran generalmente más estables que los complejos con ligandos simples (6). Cuando un ligando bifuncional tiene una estructura geométrica tal que sus dos grupos activos pueden ocupar posiciones en la esfera de coordinación del mismo ión metal, ocurre con frecuencia que la relación de ión metal libre a ión enlazado, en solución, es más pequeña que si las unidades funcionales estuvieran presentes en la misma concentración pero independientemente. Orgel (7) y Schwarzenbach (6) consideran que la explicación cualitativa de esta extra-estabilidad de

les compuestos quelato puede ser atribuida a efectos entrópicos, aunque en algunos casos puedan existir razones especiales por las que los calores de formación sean también mayores para los quelatos. Comparando los procesos



y



donde X-X representa un ligando bifuncional, puede verse fácilmente por qué los cambios de entropía favorecen la formación de quelatos. En el proceso 1, tres partículas independientes se combinan para formar una partícula única, perdiéndose la entropía traslacional. En el proceso 2, por otra parte, se pierde la entropía traslacional de una molécula solamente, puesto que los grupos funcionales están ya ligados. Esto significa, además, que durante la formación de los complejos quelato aumenta el número de moléculas que se mueven libremente en solución, mientras que el número de partículas permanece constante durante la formación de complejos con ligandos simples. (Es bien conocido que los cationes metal se encuentran como complejos hidratados en solución acuosa. Cada ligando simple reemplaza una molécula de agua, por lo que se liberan tantas moléculas de agua como ligandos desaparecen de la solución durante la formación del complejo. Por el contrario, un compuesto polifuncional reemplaza varias moléculas de agua de la cubierta de hidratación, de modo que el número de partí-

culas libres aumenta durante la reacción). La formación de un quelato lleva, pues, a un aumento de entropía, comparado con la asociación de ligandos simples. Como el cambio en contenido de calor debe ser prácticamente idéntico, ya que la naturaleza de los enlaces que son rotos y formados nuevamente es la misma, se deduce de la siguiente ecuación

$$\Delta F = -RT \ln K = \Delta H - T \Delta S$$

que la constante de equilibrio, para la formación del quelato, debe aumentar.

12. Parámetros básicos del ión metal.

Lehninger (3) abordó el problema de la especificidad del ión metal en sistemas enzimáticos así como los fenómenos de selectividad y antagonismo desde un punto de vista físico, considerando algunos de los parámetros que definen la estructura y propiedades del ión, esto es: masa, carga iónica, radio iónico (a partir de datos cristalográficos), cambio reversible de valencia y potencial electrodo, velocidad de difusión, movilidad en el campo eléctrico, configuración y estabilidad de los hidratos de los iones metálicos en solución, y configuración y estabilidad de los complejos de coordinación de los iones metálicos con sustancias distintas del agua. Es de advertir que estos factores son en su mayor parte interdependientes y algunos de ellos no pueden predecirse fácilmente a partir de medidas sencillas de propiedades físicas; especialmente, los referentes a configuración y estabilidad no pudieron ser de-

terminados con certeza, dadas las deficiencias existentes en este campo de conocimiento. Como consecuencia, los resultados del análisis de la especificidad ión-metal basados en el conocimiento de los factores enumerados, fueron entonces bastante confusos, llevando a Lehninger (8) a calificarla de "rather peculiar metal ion specificity".

En algunos sistemas el análisis parece, no obstante, razonablemente satisfactorio, puesto que los metales activantes presentan ciertas similitudes de tamaño, aún cuando difieran algo en cuanto a configuración electrónica (arginasa). Sin embargo, de todos son conocidos enzimas que requieren Mn para su actividad sin que ningún otro metal, próximo en la serie de transición, sea capaz de activar la reacción que, a su vez, es activada por Mg, del que se encuentra completamente separado en la tabla periódica (leucin-aminopeptidasa). Conocidos son, también, los enzimas activados por Mn y no por Mg ni ningún otro metal de transición. La diferencia entre Mn y Mg (con respecto a masa, radio iónico, potencial iónico, movilidad y velocidad de difusión) es, por lo general, considerablemente mayor que entre Mn y otros metales de transición (en forma divalente). Incluso en la formación de compuestos de coordinación, la existencia en el Mn de orbitales electrónicos 3d sin ocupar, marca una nueva diferenciación, al hacer posible la formación de enlaces covalentes así como de complejos esencialmente iónicos. Este análisis no parece, pues, ofrecer una explicación obvia a la especificidad enzimática, por ejem-

plo, del Mn y Mg, y a la inactividad de otros metales, especificidad enzimática que no es un caso aislado, ya que la intercambiabilidad Mg-Mn es evidente en un gran número de enzimas.

Tampoco es explicable que los pares de iones antagonistas se encuentren fundamentalmente en un mismo grupo vertical, cuando cabría esperar que difiriesen grandemente en su capacidad para intercambiarse, ya que las variaciones en masa, radio iónico y potencial iónico (que determinan en alguna medida la capacidad para formar complejos de coordinación) son grandes, especialmente en los extremos de los grupos.

Es pues probable, concluye Lehninger (3), que no sea posible proporcionar una explicación razonable a la especificidad y antagonismo, sobre la base de las propiedades del ión metal como ha sido considerado hasta aquí. Pero, dado que los iones metálicos, en solución en un medio fisiológico, están rodeados por una atmósfera de otras moléculas, tales como moléculas de agua débilmente enlazadas o sustancias orgánicas e inorgánicas de naturaleza polar, más fuertemente enlazadas, cabe pensar que el concepto isótero pueda aplicarse más adecuadamente a la estructura del complejo ión metal global que al ión desprovisto de cubierta exterior.

13. Formación de complejos ión metal en solución acuosa (7).

Factores que determinan su efectividad.

La química más sencilla de los iones metal en solución se describe en función de los grupos ligandos en la pri-

mera esfera de coordinación del metal, por lo que parece razonable discutir los sistemas biológicos en el mismo sentido.

Cualquiera que sea la función de un ión metal en un sistema enzimático resulta, pues, indicado, para comprender su especificidad, conocer primero cómo están distribuidos los diferentes iones en una solución que contenga proteína, partiendo, por supuesto, de que los iones metal están en equilibrio con el medio.

Ahora bien, los iones metal en solución acuosa son considerados de por sí como iones complejos (9), basándose en las posibilidades de enlace con los pares de electrones, no compartidos, de los átomos de oxígeno en las moléculas de agua; por tanto la formación de complejos en solución acuosa se formulará mejor como el desplazamiento de las moléculas de agua coordinadas, por el ligando en cuestión. (En otros solventes que el agua, los átomos de oxígeno también se coordinan con los iones metal si bien Bjerrum y Jorgensen (10) han puesto de manifiesto que la fuerza de enlace de las moléculas de agua parece ser unas diez veces mayor que en el caso del metanol y el etanol).

Como veremos, la formación de complejos en solución acuosa implica realmente la formación de uniones ión-ión, seguida del reemplazamiento de las moléculas de agua de la primera esfera de coordinación por otros grupos. Existen pruebas evidentes de que, en soluciones acuosas diluidas de los iones Mn, Fe, Co y Zn, los iones metal son coordinados por una se-

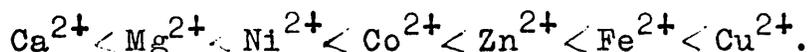
rie de seis moléculas de H_2O en los vértices de un octaedro aproximadamente regular. En el caso de los iones Cu y Ni, el ión metal es rodeado estrechamente por un cuadrado de cuatro moléculas de agua en un plano, y probablemente hay otras dos, más distantes, para completar el octaedro distorsionado. La situación es menos definida para los restantes iones de importancia biológica, pero parece muy probable que el Mg sea coordinado octaédricamente, y bastante probable que lo mismo ocurra con el Ca. Todos pueden actuar como puentes entre pequeñas moléculas y proteínas, por lo que parece que el tipo de coordinación preferido por el metal no puede considerarse como un factor primario al tratar de determinar su capacidad para actuar como mediadores (7).

Eigen et al. (11), por su parte, señalan los siguientes factores como determinantes de la especificidad metal:

1. La estabilidad de los complejos enzima-sustrato-metal que, por depender del ión metal, variará considerablemente. La estabilidad del complejo sigue generalmente el orden (12): $Ca^{2+} < Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$, siendo un fenómeno puramente de equilibrio.
2. La velocidad de formación del complejo que puede ser limitante de la velocidad, en cuyo caso la efectividad de los iones metal sigue el orden (11): $Ni^{2+} < Mg^{2+} < Co^{2+} < Fe^{2+} < Mn^{2+} < Zn^{2+} < Ca^{2+} \approx Cu^{2+}$.
3. La velocidad de disociación del complejo enzima-metal-sustrato que puede, también, ser limitante de la velocidad.

En este caso, se manifestará una acusada especificidad, ya que esta velocidad varía en un intervalo de varios órdenes de magnitud para los diferentes metales y puede llegar a ser bastante lenta para los complejos estables.

4. Finalmente, si la función primaria del metal es polarizar el enlace del sustrato que ha de ser roto, la efectividad del metal será paralela a la velocidad a la cual los metales son capaces de disociar un protón de su cubierta de hidratación. Dado que la reacción protolítica inversa es controlada por difusión (13) y por tanto semejante para todos los metales divalentes, la eficacia catalítica del metal será paralela a la acidez del ión metal, esto es (14):



(El pK del Mn no es conocido con seguridad, pero puede presumirse que será similar al del Mg).

Las velocidades de disociación del complejo enzima-sustrato-metal y la acidez del metal parecen revestir la mayor importancia entre todos estos factores que, a continuación, consideraremos con más detalle.

131. Estabilidad del complejo; factores que determinan el grado de estabilidad.

Se ha sostenido durante mucho tiempo que la especificidad química, en las interacciones biológicas que implican iones metales, es fundamentalmente un reflejo de la estabilidad relativa de los complejos formados por los iones metal

con los grupos funcionales de los constituyentes fisiológicos (1). En este sentido, las interacciones biológicas con los metales deberían caracterizarse por la falta de especificidad absoluta, concluyéndose necesariamente que:

1. Todos los metales podrán, en diferentes grados, intercambiarse en el organismo.
2. En todos los sistemas biológicos, la interacción ión metal vendrá regida por las concentraciones relativas de, al menos, dos iones metales.
3. El mismo ión metal, de acuerdo con su concentración absoluta, podrá actuar como inhibidor o activador de la reacción enzimática.

Se conocen interesantes ejemplos de los puntos citados anteriormente. La acción tóxica del exceso de Na en algunas células se revierte, probablemente por intercambio de ión, por pequeñas concentraciones de iones tales como Cd, Pb y Ni (15). También se conocen muchos casos de antagonismo o intercambiabilidad, relacionados con Mg y Ca así como K y Na. Un ejemplo particularmente interesante lo constituyen ciertas plantas que tratadas con exceso de Mn desarrollan signos de deficiencia de Fe; cuando estas plantas crecen, sin embargo, en suelos con exceso de Fe, desarrollan deficiencias de Mn (16). Existen también casos en los que, aparentemente, sólo un metal es capaz de actuar como coenzima, suponiéndose entonces que los metal quelatos formados son de una estabilidad extraordinaria en relación con los de otros metales; tal es el caso del enlace del Fe en la ferrihemoglobina. (En prin-

cipio el Fe en la ferrihemoglobina es desplazable por otros metales, pero requeriría para ello cantidades no fisiológicas o tóxicas del ión metal competidor).

No obstante, dado que la estabilidad no siempre justifica la especificidad observada, como veremos más adelante, ni se manifiesta en un orden invariable, en una serie amplia de metales, con relación a diferentes ligandos (17,18), resulta conveniente considerar algunos de los numerosos e interrelacionados factores que contribuyen al grado de estabilidad.

Si se parte del supuesto básico de que los complejos se forman como resultado de las interacciones electrostáticas entre los cationes y las cargas negativas de los ligandos, el orden de estabilidad de los complejos, para un determinado ligando, debería ser entonces el orden inverso del radio del catión (19). Tal es el caso de los elementos de la primera serie de transición en la secuencia de Irving-Williams (véase en la siguiente tabla (18)). (Estos elementos junto con los del grupo II son los que fundamentalmente nos interesan y a los que nos referiremos más concretamente)

	Mg	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Ca
radio, A	0.66	0.78	0.76	0.74	0.73	0.72	0.72	0.96	0.99
E ₂ , kcal.	525.7	534.7	558.6	585	599	648.6	635.5	599.9	417.5
H, Kcal.	464.0	444.7	467.9	497	507	507.2	491.5	436.5	381.9

(E₂ se refiere al poder de ionización total, a 25 °C, para el proceso $M(\text{gas}) \rightarrow M^{++}(\text{gas}) + 2e$. Los calores de hidratación de los iones gaseosos, a 25 °C, corresponden a la ecuación $M^{++}(\text{gas}) + \text{aq.} \rightarrow M(\text{aq.})^{++}$).

Pero, si la secuencia se extiende a otros iones divalentes, el orden de disminución del radio iónico no coincide necesariamente con el orden de incremento de estabilidad del complejo. Por ejemplo, los iones Mg y Ca de los metales alcalino-térreos tienen radios más pequeños y mayores, respectivamente, que cualquiera de los de la primera serie de transición del Mn al Cu y, no obstante, sus complejos con cualquier ligando son invariablemente menos estables (en especial para el Mg) que los formados por los iones metal de transición divalentes (18). Por su parte, los complejos de los metales de transición resultaron ser más estables de lo esperado, según Davies (20), considerando fuerzas de atracción puramente electrostáticas, si bien no resulta sorprendente que la sustitución del agua por un ligando más polarizable origine un incremento en la estabilidad.

Pero el que los incrementos de la estabilidad aumenten monotónicamente a lo largo de la serie de Irving-Williams (y no necesariamente a lo largo de una serie que incluya otros iones divalentes, aún cuando estén distribuidos en orden de radios decrecientes) puede solamente significar que está actuando algún otro factor estabilizante adicional, el cual aumenta a lo largo de la serie. Es de observar que, aún siguiéndose el orden de Irving-Williams para todos los ligandos, el incremento de estabilidad de metal a metal es mayor para los ligandos de tipo nitrógeno (p.e., etilendiamina), menor para los ligandos tipo N-O (p.e., glicina) y todavía menor para los ligandos tipo O (p.e., aldehído sali-

cílico y ác. oxálico). Cuanto más electropositivo es el átomo coordinante del ligando, mayor es el incremento de estabilidad de metal a metal; esto hace destacar la significación del enlace covalente en la determinación de la estabilidad de los complejos (18). Así Walsh (21,22) relaciona la fuerza del enlace coordinado (entre otros factores) con el producto de las electronegatividades efectivas del metal y del ligando, respectivamente (χ_L, χ_M) .

Como una medida de la afinidad electrónica del catión aceptor, se adopta el potencial de segunda ionización correspondiente al proceso $M(\text{gas}) \rightarrow M^{++}(\text{gas}) + 2e$, introduciendo así un elemento cuantitativo ausente en la teoría de Pauling (neutralidad esencial de los átomos por reducción de su carga formal (23)). Como puede verse en la tabla anterior, el potencial de segunda ionización asciende a lo largo de la serie de transición, hasta un máximo en el Cu (aunque desciende de nuevo en el Zn), paralelamente con el orden decreciente de sus radios iónicos, mientras que los elementos del grupo II, aún presentando esta correlación, quedan fuera de la citada secuencia

La correlación de la citada secuencia con la estabilidad de los complejos metal en la serie de transición aludida fue puesta de relieve primeramente por Irving-Williams en 1948 (24) y también ha sido señalada por Schwarzenbach et al. (25) así como por Calvin y Melchior (26). Irving y Williams (18) sugieren que dicha correlación es fundamentalmente una consecuencia del hecho de que los parámetros que respectivamente sirven de guía a la magnitud de las interacciones electrostáticas y

covalentes, esto es el recíproco del radio iónico y el potencial de segunda ionización, aumentan monotónicamente a través de la serie del Mn al Cu. (Así, si el agua es reemplazada por un ligando con mayor poder de donación de electrones, el incremento en estabilidad aumentará con el potencial de segunda ionización del metal en cuestión. Si el agua es reemplazada por un ligando con una carga negativa formal, el incremento de estabilidad a través de fuerzas puramente electrostáticas aumentará con la disminución del radio en cuestión, en el mismo orden. En cualquier caso, habrá una ganancia en estabilidad al pasar a lo largo de la serie del Mn al Cu, con independencia de que sean uno o ambos los factores que pueden actuar). Por la misma razón, el orden de estabilidad $Cu > Zn$ debe cumplirse, de acuerdo con la experiencia.

Ahora bien, cualquier inclusión en la serie de Irving Williams de otros iones que perturben la secuencia monotónica del radio iónico y el potencial de ionización, haría fracasar todo intento de observar una clara correlación de la serie con la estabilidad del complejo, en función de los diferentes ligandos. Por ejemplo, es de observar en el Cd un radio iónico mayor que el del Ni, si bien los potenciales de ionización son casi idénticos, por lo que las estabilidades relativas de los complejos de Cd y Ni dependerán de la naturaleza del ligando y no podrá esperarse un orden invariable. (Considerando, por ejemplo, los complejos OH^- , veremos que con este ligando se introducirá un aumento tanto en la carga formal como en el poder donador de electrones, en relación con el agua, de modo que el

orden será $Ni > Cd$. Cuando el agua es reemplazada por el I^- , si embargo, se produce un ligero aumento en el poder donador de electrones, pero, como el ión I^- es mucho mayor que una molécula de agua, la disminución de la interacción electrostática debida a la mayor separación de cargas será más significativa con el ión más pequeño, Ni, y, dado que el incremento en energía de interacción covalente es aproximadamente el mismo (potenciales de ionización semejantes del Ni y Cd), el orden de estabilidad será $Cd > Ni$). Generalizando este argumento, Irving y Williams (18) concluyen que todos los iones divalentes de gran radio y alto potencial de ionización, p.e., Pb, Hg, Pt y S tenderán a formar fuertes complejos con iones tales como el I Br^- y Cl^- , mientras que los iones con gran radio iónico pero bajo potencial de ionización, p.e., Ba, Sr, Ca, no. Con los iones de radio iónico moderado y potencial de ionización moderadamente alto, los cambios de ligando originan cambios en la significación relativa de los dos factores (interacción electrostática y covalente) y no puede establecerse ninguna predicción segura acerca del orden de estabilidad, salvo en el caso favorable -representado por los iones divalentes de la primera serie de transición del Mn al Cu- en que los dos factores cooperan invariablemente.

Irving y Williams (18) señalan también, en el caso de una solución de un ión metal hidratado y varias moléculas de ligando, los siguientes factores como decisivos en la formación del compuesto de coordinación más estable:

1. Tendencia a agrupar el mayor número de ligandos posibles al

rededor del átomo central, con el fin de obtener el máximo de interacción a través del mayor número de interacciones individuales. Esta tendencia está limitada por las interferencias de volumen de las moléculas de ligando comparado con las de las moléculas de agua que deben desplazarse de los alrededores del ión metal (factor estérico)

2. Tendencia de los electrones atómicos a permanecer en su estado inicial más estable.
3. Tendencia (oponiéndose a la anterior) a las interacciones individuales lo más fuerte posibles a través del uso de los orbitales de enlaces híbridos (estabilización orbital).

En ausencia de este último factor, tanto el número como la clase de orbitales híbridos adecuados para el enlace se determinarán, en una gran medida, con independencia de la naturaleza del ligando. Esto implica que el número máximo de coordinación y la estequiometría sean normalmente independientes de la naturaleza del ligando. En este caso, la correlación observada con el potencial de segunda ionización puede ser tomada como un indicio de que la coordinación no altera el estado inicial electrónico de los iones metales o que las modificaciones son de importancia secundaria (18). En algunos casos, como el de ciertos iones ferrosos, la estabilización orbital da lugar a complejos con una estabilidad anormalmente alta, y, como los efectos de ésta no se dejan sentir en sus vecinos Mn o Co, ni aún en el Ni y Cu, aparece una alteración del orden "natural" de estabilidad.

Irving y Williams (18) suponen asimismo que la for-

mación de complejos -esto es, la sustitución de las moléculas de agua por ligandos- procederá estadísticamente (como sugirió Bjerrum) siempre que:

- a) la interferencia debida al volumen del ligando no difiera grandemente de la de las moléculas de agua,
- b) la repulsión electrostática entre los nuevos ligandos no difiera de la de las moléculas de agua,
- c) no haya cambio de configuración orbital a ningún estado durante la formación del complejo.

La interferencia estérica entre los ligandos surge fundamentalmente de la mutua repulsión, aparte de los aspectos especiales derivados de la geometría del ligando, y será, por consiguiente, tanto mayor cuanto mayor sea el tamaño del ligando y menor el radio del catión. Entre los metales de transición, los radios de los iones divalentes son aproximadamente lo mismo (0.78-0.71 Å) y por tanto es de importancia predominante la variable geometría del ligando. No ocurrirá lo mismo con los iones de tamaño muy diferente, p.e., entre los metales alcalino-térreos (17). Los valores relativamente bajos de las energías de red de algunas sales proceden de las fuerzas de repulsión crecientes entre los aniones junto con la disminución de tamaño del catión. Esto es particularmente importante en el caso del Mg, porque el tamaño de este ión es tal que los aniones entran en "contacto" unos con otros antes que con el ión central (27); este efecto parece ser la causa de la baja estabilidad del Mg en algunos complejos, explicándose así la más alta solubilidad de algunas sales de este me-

tal con relación a la de otros alcalino-térreos.

En consecuencia, los efectos estéricos que impiden la fácil agrupación de los ligandos alrededor del ión central serán especialmente sensibles a:

- a) modificaciones estructurales en el ligando,
- b) el tamaño del ión central,
- c) los orbitales disponibles, puesto que ellos impondrán o tenderán a imponer una determinada distribución geométrica de los ligandos. En casos excepcionales, tales factores estéricos, y probablemente la estabilización orbital a través de distribuciones electrónicas, pueden impedir que la estabilidad de los complejos metal ligandos siga el orden normal.

Irving y Williams (18) destacaron, posteriormente, el diferente comportamiento de los ligandos -por ejemplo, el ión hidroxonio- caracterizados por ser bases conjugadas de ácidos débiles (para los que las uniones con el protón son más estables que las uniones protón-agua, presentando una estabilidad similar en sus complejos con los metales) con relación a los ligandos tales como I^- , Br^- , Cl^- , $H_2PO_4^-$, PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , ClO_4^- , BrO_3^- y IO_3^- , que son bases conjugadas de ácidos fuertes y que interaccionan con los protones menos fuertemente que con el agua, siendo sus interacciones con los metales también débiles.

A este respecto es interesante examinar los cambios de energía libre, ΔG , (17,18) que tienen lugar en la formación de un complejo por la reacción:

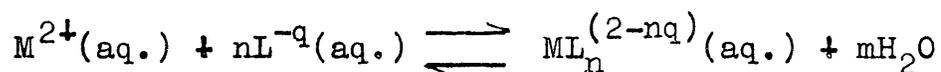


ΔG es la suma de los cambios de calor y de entropía en esta

reacción, expresándose

$$\Delta G = -RT \ln k_M = \Delta H - T \Delta S.$$

Se ha supuesto tácitamente que el cambio de energía libre que mide la estabilidad de los complejos metal es dominado por el término calor, ΔH , del proceso correspondiente, suposición que equivaldría a establecer que el término entrópico, $T \Delta S$, es despreciable en comparación con ΔH . Esta sencilla suposición concuerda con los datos existentes sobre ligandos sin carga, en los que la influencia del término entrópico es insuficiente para alterar el orden "natural" de estabilidad de los complejos metal (transición). Sin embargo, con reacciones como

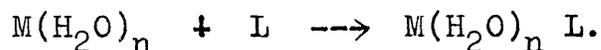


habrá un aumento de entropía, que puede ser de significación preponderante. Pero el factor aislado más importante, en el cambio de entropía de tal reacción, esto es la entropía de hidratación de M^{2+} , aumenta cuando el radio de los iones de transición disminuye monotónicamente a lo largo de la serie del Mn al Cu (28), de modo que la influencia estabilizante del cambio de entropía en la reacción seguirá también el orden de Irving-Williams. Esto no ocurrirá si otros elementos que rompen la secuencia monotónica del radio iónico son incluidos en el orden de estabilidad de los elementos de transición.

Para una serie de complejos de los metales alcalino-térreos, por ejemplo, con un ligando dado, el aumento de entropía derivado de la pérdida parcial de hidratación en la formación del complejo debería ser proporcional a la entropía de hidratación de los complejos, es decir, debería seguir el or-

den $Mg > Ca > Sr > Ba$ (17). Los cambios de calor de estas reacciones, ΔH , pueden ser, sin embargo, positivos o negativos(28), por lo que la suma de los ΔH e ΔS es ahora la que controla los valores individuales de las k_M y, en consecuencia, el orden de estabildades. Como se espera que el ΔS siga el orden fijado de los potenciales iónicos de los cationes, los cambios de calor han de ser la causa de los diferentes órdenes observados. En el caso concreto de los complejos con aniones de ácidos fuertes, los calores de reacción deben disminuir cuando el potencial iónico del catión aumenta, es decir, la energía de interacción $M-H_2O$ debe crecer tanto más en relación con la $M-L$ cuanto más pequeño sea el catión. (Tales ligandos no forman tampoco complejos fuertes con los metales de transición, debido a que el valor de formación del enlace metal-ligando es comparable y en muchos casos menor que el calor de formación del enlace metal-agua). Pero, en virtud de la carga negativa, habrá una neutralización parcial o total de la carga positiva del catión en la coordinación, de modo que la ganancia en entropía compensará, en mayor o menor medida, la pérdida de energía de interacción que tiene lugar cuando el agua es reemplazada por tal ligando (18). Así pues, en algunos casos la secuencia de estabilidad puede ser afectada por las influencias opuestas de los términos calor de reacción y entropía.

Nos referiremos ahora a las posibles peculiaridades derivadas de la formación de uniones ión-ión:

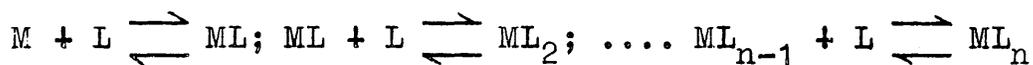


Si todos los cationes estuvieran igualmente hidratados, la estabilidad esperada de tales uniones ión-ión seguiría la misma secuencia que la estabilidad de los complejos M-L, debido a que el tamaño de los iones hidratados seguiría entonces el mismo orden del de los iones sin cubierta de hidratación. Sin embargo, es muy probable que la hidratación de los cationes del grupo II_a disminuya a medida que su tamaño aumente, y así las constantes de estabilidad determinadas experimentalmente podrán referirse a diferentes grados de hidratación de los diferentes cationes (17). Esta diferencia en la naturaleza de los complejos podría llevar a un orden de estabilidades opuesto al orden de los potenciales iónicos, en cuanto que, p.e., el ión Ba sin cubierta de hidratación es más pequeño que el ión Mg hidratado, $Mg(H_2O)_6^{2+}$; pero esto es sólo otra expresión del hecho de que el ligando puede no ser capaz de desplazar el agua de hidratación de los cationes más pequeños con tanta facilidad como la de los grandes, y, si las estabilidades experimentales se refieren a la formación de uniones ión-ión, $M(H_2O)-L$, de los cationes más pequeños, sus complejos, M-L, deben ser aún menos estables de lo que parece observarse.

(También se ha mencionado el número de moléculas de agua de cristalización como una prueba evidente de la incapacidad del ligando para reemplazar el agua alrededor del catión. En las sales de ácidos fuertes, tales como sulfatos, nitratos y haluros, las sales de Mg y Ca son invariablemente más hidratadas que las de Sr y Ba. En las sales de los ácidos débiles, fluoruros, hidróxidos, oxalatos y carbonatos, no se da

esta diferencia).

Finalmente, destacaremos (29) que la estabilidad de los complejos en solución homogénea resulta complicada, en el sentido de que la formación de cualquier complejo ML_n de un metal M y un ligando L debe tener lugar, paso por paso, a través de los sucesivos estadios de

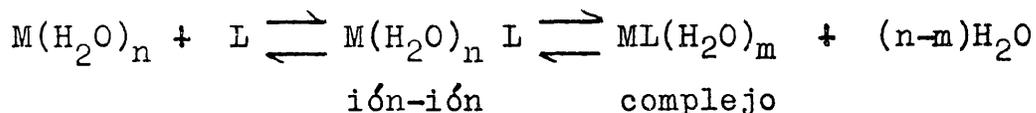


y, como todas las especies ML_n (siendo n el número máximo de coordinación) están en mutuo equilibrio, la descripción total de tales sistemas exige un conocimiento de n constantes de equilibrio

$$K_n = \frac{(ML_n)}{(ML_{n-1})(L)}$$

donde L puede ser un ligando mono- o polidentado y se supone, por otra parte, que la solución no contiene complejos polinucleares o complejos con ligandos de más de un tipo (excluyendo el agua).

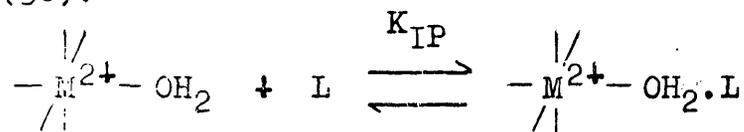
Además, el proceso de formación de complejos se describe, como hemos visto, en dos etapas (17)



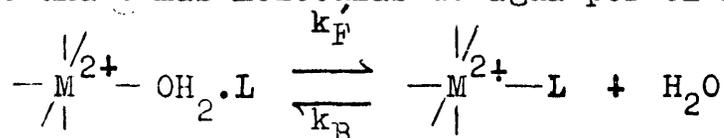
discutiéndose las constantes de estabilidad en términos de reacciones globales, aún cuando, en algunos sistemas, las constantes de estabilidad se refieran a diferentes estadios de la reacción anterior.

132. Velocidad de sustitución de las moléculas de agua por los ligandos.

Según acabamos de indicar, la mayoría de los metales divalentes forman sus complejos en solución acuosa en dos etapas. El ión metal hidratado M y el ligando L se difunden juntos rápidamente para formar un complejo en la esfera externa (30).

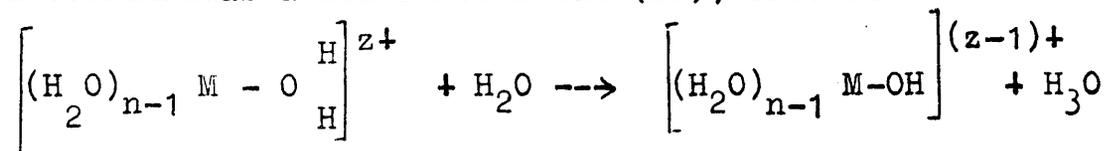


El paso limitante de la velocidad es así la siguiente sustitución de una o más moléculas de agua por el ligando



en la que k_F es semejante para todos los complejos de un metal dado (31).

Conviene indicar aquí que el estudio de las interacciones de los iones metal con pequeñas moléculas y con proteínas presenta una complicación -a la que aludiremos posteriormente- y es la posible hidrólisis de los iones metal, debida a la tendencia de los protones a separarse de las moléculas de agua coordinadas a los iones metal (20), esto es



donde (no considerando las moléculas de agua) puede expresarse el equilibrio como

$$k_{a1} = \frac{(M-OH^{(z-1)+}) (H^+)}{(M^{z+})}$$

Estos valores de los pK_{a1} son útiles para demostrar la acidez relativa de los iones hidratados, si bien son de poca utilidad para predecir el grado de hidrólisis en función del pH, dado que muchos de los hidróxidos metálicos son insolubles. Con todo, el valor de los pK_{a1} permite clasificar a los metales en tres grupos (29):

El grupo 1 comprende aquellos metales con pK_{a1} superior a 11 (Ba, Sr, Ca y Mg, entre otros) para los que la precipitación de los hidróxidos comienza a pH igual o superior a 9. Por tanto, no será preciso tener en cuenta la hidrólisis de estos metales excepto a pH más altos normalmente estudiados en la química de las proteínas.

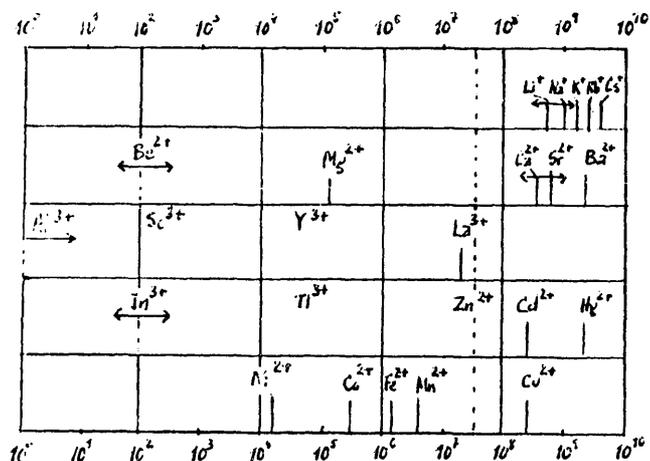
En el grupo 2 se incluyen aquellos metales cuyos iones hidratados son precipitados como hidróxidos en el intervalo de pH comprendido entre 6 y 9 (Mn, Co, Ni, Cd, Zn, Cu, Pb, Fe etc.). Los pK_{a1} oscilan entre 8 y 11. Los iones de este grupo sólo pueden ser estudiados, en la forma no hidrolizada, dentro de un intervalo de pH muy restringido; a pH superior a los indicados, según el metal, debe tenerse en cuenta la hidrólisis.

Con los metales del grupo 3 (Be^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} etc.) la hidrólisis tiene lugar por debajo de pH 7 y los cationes libres pueden ser estudiados solamente a muy bajo pH, donde muchas proteínas son inestables. Es de observar que, de existir en los sistemas vivos, los metales de este grupo lo hacen como hidróxidos o como complejos quelatos de muy alta estabili-

dad o en medios anormalmente ácidos.

Cuando los complejos contienen menos ligandos que el número de coordinación característico, Z , las moléculas de agua permanecen enlazadas al ión metal y se pueden hidrolizar para formar complejos mixtos.

Volviendo a la sustitución de las moléculas de agua en la formación de complejos metal, en la siguiente figura, Eigen et al. (11) han resumido las velocidades características de dicha sustitución, poniendo de manifiesto este nuevo factor determinante de la especificidad metal:



Velocidades características de sustitución [sec.⁻¹]

Si las constantes de velocidad de sustitución son mayores que 10^7 sec^{-1} , hay interferencia con el proceso de formación de la unión ión-ión, pudiendo apreciarse incluso alguna especificidad de ligando cuando la sustitución de las moléculas de agua no es la limitante de la velocidad. Todos los alcalinos y algunos alcalino-térreos (p.e., Ca, Sr, Ba) pertenecen a esta categoría).

Para constantes de velocidad de sustitución del agua menores que 10^7 sec., esta constante de velocidad es independiente del ligando siempre que la sustitución sea más rápida que la hidrólisis. El paso limitante de la velocidad es, entonces, característico del ión metal solamente. (El Mg, la mayoría de los metales de transición y algunos metales térreos pertenecen a esta categoría).

Si las velocidades de sustitución se hacen muy lentas, la hidrólisis tiene lugar más deprisa que la disociación del agua. Generalmente, entonces, se observa especificidad de ligando. Ejemplos de ello son el Be^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , y otros metales trivalentes fuertemente hidrolizantes.

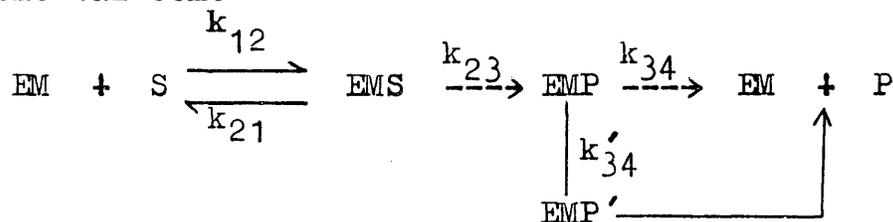
Estas velocidades se refieren a la adición del primer ligando. La velocidad de adición de un segundo ligando puede ser más alta si están implicados grupos cargados (32). Este efecto puede ser de importancia en la formación de complejos ternarios entre enzima, metal y sustrato.

133. Velocidad de disociación del complejo.

Dado que las constantes de formación del complejo en la esfera exterior, K_{IP} , varían relativamente poco, la constante de velocidad de formación total $k_F = K_{IP} \cdot k'_F$ es relativamente independiente del ligando y, por tanto, la gran variación en las constantes de estabilidad, $K_S = k_F/k_B$, observada en complejos del mismo metal con diferentes ligandos, puede atribuirse fundamentalmente a la gran variación en la constan-

te de velocidad de disociación, k_p (31). Del mismo modo, deberá atribuirse a los diferentes valores de esta constante de disociación, el diferente comportamiento (en relación con la especificidad) de algunos metales, cuyos complejos presentan K_s semejantes. De aquí puede deducirse la insuficiencia de los datos de estabilidad para el estudio de la eficacia de los iones metal en algunos sistemas enzimáticos.

Un caso particularmente interesante, a este respecto, lo constituye el diferente comportamiento del Ca y el Mg en algunos enzimas. Ocurre que, aunque los complejos de estos metales tienen aproximadamente las mismas constantes de estabilidad, la constante de formación para el Ca^{2+} , p.e., es $\sim 10^3$ veces mayor que la del Mg^{2+} y por consiguiente un complejo de Ca^{2+} se disociará 10^3 veces más rápidamente que el correspondiente complejo de Mg^{2+} . Si consideramos, p.e., un mecanismo tal como

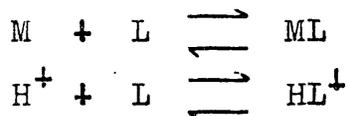


en el que puede o no tener lugar una reorganización interna de EMP a EMP' antes de que el complejo se disocie, cuando tal reorganización interna "no" sea necesaria se formará el producto más rápidamente con el metal Ca que con el Mg, y el Ca será un coenzima más eficaz que el Mg. Si la reorganización a EMP' "es" necesaria, esto es, si la proteína debe cambiar su conformación, ello será solamente posible cuando el tiem-

po necesario para la reorganización sea más breve que la vida media del complejo. Esta circunstancia no se cumple cuando el metal es Ca, dado el valor de k_{34} ($10^5-10^6 \text{ sec}^{-1}$), pero se ha sugerido que pudiera darse cuando el metal es Mg ya que, entonces, la constante de velocidad de disociación para el complejo ternario viene a ser menor que $10^2-10^3 \text{ sec}^{-1}$, siendo el número de intercambio para los enzimas frecuentemente de ese orden.

134. Acidez del metal.

Por último, hemos de destacar que casi todos los grupos coordinados, biológicamente importantes, presentan afinidades relativamente fuertes por los protones (con excepción del CO, O₂, tioéteres), y así los iones metal deben competir con los protones por los ligandos. Orgel (7) considera los siguientes equilibrios para el enlace de un grupo ligando



de modo que

$$\frac{[ML]}{[M][L]} = k_1$$

y

$$\frac{[H^+][L]}{[HL^+]} = k_a$$

donde k_a es la constante de disociación ácida de HL. De aquí se sigue que

$$\frac{[ML][H^+]}{[M][HL^+]} = k_1 \cdot k_a$$

o

$$\log. \frac{[ML]}{[M]} = \log. k_1 + \log. k_a + \log. [HL^+] - \log. [H^+].$$

Así la fracción de metal enlazado, $[ML]/[M]$, depende de k_a y del pH.

Los factores que tienden a enlazar un ión-metal a un grupo ácido son, pues, similares a los implicados en el enlace de un protón. Schubert (1) señala que la fuerza ácida de un grupo funcional es un parámetro sumamente importante para la determinación de la afinidad ión metal. Generalmente, la fracción de un ión metal enlazado por un grupo cualquiera en una molécula orgánica aumenta con el pH, alcanza un máximo y en ocasiones disminuye. La existencia de un máximo refleja la presencia de una fracción mayor del anión A^- en función del pH. Una subsiguiente disminución del ión enlazado, a pH más alto, es debida al aumento del grado de hidrólisis del metal, que puede dar lugar a la precipitación de un hidróxido insoluble o a la formación de un anión. En el caso de estar presentes varios grupos funcionales o quelantes con diferentes afinidades protónicas, la variación del ión metal enlazado en función del pH puede tener varios máximos o "mesetas", dependiendo las respectivas alturas de las afinidades intrínsecas hacia el metal y el protón, respectivamente.

La competición entre los iones metal e hidrógeno determina a menudo qué ligando enlazará preferentemente con un ión metal, a un pH dado (29). Los iones amonio e imidazol constituyen un buen ejemplo de un par de ligandos con afinidad comparable para un ión metal, pero que difieren amplia-

mente en la zona de pH en que dejan de actuar por reacción con los iones hidrógeno. En una solución de amonio, ajustada a pH 7, menos del 1% del ligando está en la forma de NH_3 , que es la que puede reaccionar con los iones metal; mientras que aproximadamente la mitad del imidazol, en una solución de pH 7, no está combinado con un protón y, por tanto, queda libre para reaccionar. De aquí que, a pesar de ser semejantes los valores de las constantes de asociación, el imidazol reaccione con los iones metal a pH 7 en mayor grado que lo hace el amonio. En otras palabras, los iones hidrógeno compiten mucho más eficazmente con los iones metal en el caso del amonio que en el caso del imidazol. A pHs superiores a 11, ambos ligandos pueden combinarse plenamente con los iones metálicos, si bien a pH tan alto tiene lugar la hidrólisis.

Un caso semejante se presenta entre el imidazol y un grupo guanidínico de una proteína. Aún siendo superior la constante de enlace de este último, por un ión metal, sin embargo, a pH 7, la concentración del ión guanidínico es tan pequeña que no se verifica el enlace. Este tendrá lugar a pH 13, donde el grupo guanidínico está disociado y es capaz de ejercer una acción complejante; sin embargo, a este pH la hidrólisis de la mayoría de los metales es tal que la capacidad de enlace inherente al grupo guanidínico no puede manifestarse.

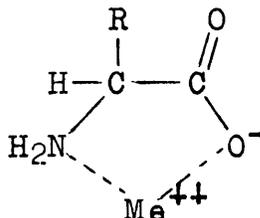
En algunos casos, no obstante, la capacidad de enlace puede ser tan grande que la formación de complejo tiene lugar aunque la ionización del grupo funcional sea extremadamente pequeña. Tal caso puede ser característico de grupos dotados de una gran especificidad.

14. Grupos de interacción con el ión-metal.

En la mayoría de las interacciones biológicas de los metales, cuando se trata de acciones complejantes o quelantes, los átomos N, O, S o P actúan como donadores de electrones. Dentro de la serie de grupos que pueden interaccionar para formar anillos quelatos, Schubert (1) ha destacado los siguientes grupos funcionales como importantes en las interacciones metal que tienen lugar en biología:

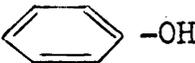
-COOH	(carboxilo)
-OH	(hidroxilo alcohólico y fenólico)
=O	(carbonilo)
-NH ₂	(amino primario)
$\begin{array}{l} R \\ \diagdown \\ NH \end{array}$	(amino secundario)
$\begin{array}{l} \diagup \\ N- \end{array}$	(amino terciario)
$\begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \\ N \end{array}$	(amino terciario cíclico)
-SH	(sulfhidrilo)
-S-	(tioéter)
-SO ₃ H	(sulfonato)
-PO ₂ (OH)	(fosfonato)

Ejemplos de estos grupos pueden encontrarse fundamentalmente en las proteínas. Los mismos aminoácidos forman complejos con una variedad de metales, por coordinación, a través de los grupos carboxilo y amino.



Dentro de la molécula de proteína, sin embargo, el grupo R es el de importancia primaria, puesto que la mayoría de los grupos carboxilo y amino de los aminoácidos están ligados mediante enlaces peptídicos.

Klotz (33) señala como posibles ligandos en las proteínas, las siguientes cadenas laterales polares, R,

		pK aproximado
fosfórico	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	2.7
carboxilo	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C} \\ \diagdown \\ \text{OH} \end{array}$	4
imidazol	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C}-\text{N}^+ \\ \quad \diagdown \\ \text{HC}-\text{N} \quad \text{CH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	6
-amonio	$-\text{NH}_3^+$	6 - 8
-amonio	$-\text{NM}_3$	10
fenólico		10
sulfhidrílico	$-\text{SH}$	10
guanidínico	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{N}-\text{C} \\ \parallel \quad \diagdown \\ \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	12
alcohólico	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	14
amida	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C} \\ \diagdown \\ \text{NH}_2 \end{array}$	14

que enlazarían los cationes metal con la ayuda de los átomos, ya mencionados, localizados en la periferia de la molécula proteica.

En la interacción de los iones metal con las proteínas deben tenerse en cuenta las siguientes propiedades generales (29):

1. Los grupos de las cadenas laterales tales como carboxilo, imidazol o sulfhidrilo tienen generalmente mayor importancia en el enlace de iones metal que los grupos carboxilo y amino terminales.
2. El número de iones metal enlazados a un grupo dado depende de la afinidad intrínseca del grupo ligando por el ión metal y del número de tales grupos en condiciones de reacción. (Por este motivo debe seguirse un tratamiento estadístico para describir el equilibrio).
3. En una molécula proteica con mayor número de grupos ligados que iones metal, cada ión metal puede combinarse solamente con un grupo ligando, dada la falta de libertad de los grupos ligados para moverse y rodear el ión metal en comparación con los ligandos pequeños.
4. La molécula proteica encierra normalmente un considerable número de cargas positivas y negativas cuyo campo potencial neto favorece o impide el acercamiento del ión metal, por lo que las constantes de afinidad aparentes son función del número de iones enlazados. .
5. En ciertas proteínas algunos grupos ligados están orientados de modo que favorecen estéricamente la quelación de iones metal particulares. Esta orientación puede corresponder a una ordenación de la proteína, seleccionada entre una serie

de configuraciones posibles, o a una asociación determinada de subunidades; esto es, puede esperarse que los efectos quelato específicos estén íntimamente relacionados con la estructura y las transformaciones de estructura de las proteínas.

Entre los aminoácidos que constituyen los residuos laterales de las proteínas, Gurd (29) señala a la histidina y a la cisteína como los que más fuertemente se combinan con los iones metal, interviniendo también en este tipo de complejos la arginina, asparraguina y glutamina, tirosina, serina y treonina, y metionina y cistina.

La histidina puede combinarse con un ión metal a través de

- a) un anillo de 5 miembros en el que intervienen los grupos carboxilo y α -amino.
- b) un anillo de 6 miembros con los grupos α -amino e imidazol.
- c) un anillo de 7 miembros con los grupos carboxilo e imidazol.
- d) una estructura en la que intervengan los tres grupos donadores.

Ninguna de estas estructuras puede descartarse "a priori", aunque la estructura c) probablemente sea despreciable salvo, quizás, en condiciones relativamente ácidas, en las que el grupo α -amino no esté libre para reaccionar; por otra parte, el mayor tamaño del anillo supone una desventaja (6). La estructura b) puede resultar favorecida por aquellos metales

que demuestren preferencia por los átomos nitrógeno.

Los grupos imidazol, por su parte, no parecen sitios primarios de enlace (34). Parecen combinarse con muchos iones metal, particularmente con los de la segunda serie de transición.

En cuanto al nitrógeno de los grupos amino, si se consideran las relaciones entre la basicidad hacia un protón y la basicidad hacia un metal catión, pueden sacarse conclusiones en cuanto a la tendencia de varios grupos amino alifáticos o aromáticos para formar complejos (35). Sidgwick (36) ha señalado que generalmente, como consecuencia de la sustitución de las aminas, la estabilidad de los complejos disminuye en el orden $\text{NH}_3 > \text{NH}_2\text{R} > \text{NHR}_2 > \text{NR}_3$. También indicó que la piridina se comporta más como una amina primaria que como una amina terciaria; lo mismo ocurre con el imidazol.

En su afinidad por el ión hidrógeno, los grupos α -amino difieren de los grupos imidazol en sólo una o dos potencias de 10, por lo que es bastante probable que los iones metal de la segunda serie de transición se combinen con estos grupos a pH 7. Sin embargo, sería difícil diferenciar con certeza, entre los enlaces a los grupos α -amino e imidazol. Por otra parte, debido a que muchos iones metal forman hidróxidos insolubles a pHs superiores a 6 ó 7, es difícil interpretar los estudios en la región de pH donde cabría esperar un enlace apreciable de los grupos ε -amino. Ahora bien, estos grupos poco eficaces como sitios simples son grupos importantes

de enlace si actúan formando parte de un sitio quelante.

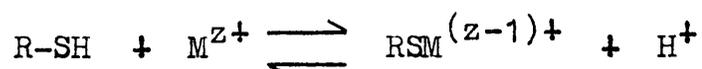
Otros grupos que pueden contribuir con un átomo de nitrógeno, como átomo donador potencial, son el grupo guanidino del residuo de arginina, y el grupo amido, bien la amida primaria de los residuos de asparraguina y glutamina, bien el nitrógeno de la amida secundaria del enlace peptídico. (Del comportamiento del átomo de nitrógeno en el enlace peptídico poco se sabe, aunque parece ser que la tendencia de este nitrógeno a asociarse con cationes metal es pequeña).

Los grupos amido son, asimismo, contribuidores potenciales de oxígeno, como átomo donador.

Entre los grupos que pueden contribuir con oxígeno como átomo donador, el más importante puede ser el grupo fenolato de un residuo de tirosina. Los átomos de oxígeno de grupos hidroxilo alifático provienen fundamentalmente de residuos de serina y treonina. Estos grupos hidroxilo, fenólicos y alifáticos, tienen una gran tendencia a la coordinación, especialmente en solución alcalina. Generalmente sólo uno de los pares solitarios de electrones en el oxígeno interviene en enlaces coordinados. Metales como el Mn, Fe y Co generalmente forman enlaces más fuertes con el oxígeno que con el nitrógeno (36); lo contrario suele ocurrir con el Ni, Cd, Zn y Cu, entre otros. Entre los metales alcalino térreos, el oxígeno en grupos hidroxilo alifático o en éteres se combinará preferentemente con los metales más pesados tales como el Ba; el oxígeno fenólico, más iónico y muy básico, prefiere, sin embargo, formar complejos

con el Mg (6). Williams ha destacado la particular afinidad de los fenoles por el Cu.

La cisteína se combina con los iones metal más fácilmente que ningún otro aminoácido. La fácil oxidación de la cisteína a cistina complica, sin embargo, el estudio de estos complejos metálicos. Los grupos sulfhidrilo presentan, ciertamente, altas afinidades por los metales (34); los grupos sulfhidrilo ionizados enlazan con ellos más fuertemente, pero incluso el S de los enlaces tioéter o disulfuro conserva una cierta tendencia a enlazar cationes metal. Pocos datos cuantitativos se poseen acerca de la tendencia a la coordinación de los mencionados grupos; no obstante, parece que aquellos cationes metal que forman sulfuros insolubles pueden enlazar también átomos S en los compuestos orgánicos y que tales complejos son particularmente estables (6,33). Sobre esta base, Klotz (33) ha distribuido algunos iones metal en el siguiente orden decreciente, teniendo en cuenta su afinidad por el ión sulfuro: Pb > Cd > Zn > Ca > Mg. Cuando un compuesto sulfhidrílico forma un complejo metálico, es el átomo de azufre negativo el que debería ser considerado como donador; el ión metal compite con el hidrógeno



Por su parte, los residuos de metionina y cistina contribuyen a esta formación de quelatos con los grupos azufre tioéter y disulfuro, respectivamente.

Salvo para los grupos guanidínico, hidroxil alifático y amida, existen, en realidad, pruebas evidentes de que cada una de las citadas cadenas laterales interviene en la formación de complejos con algunos metales (33). La exclusión de los tres grupos mencionados pone de relieve uno de los más importantes factores en la formación de estos complejos: la competición con los iones hidrógeno. La forma disociada de cada uno de estos grupos es una base tan fuerte que los protones no pueden ser desplazados de la forma ácida por los iones metal excepto, quizás, en soluciones de muy alto pH.

Aunque en realidad no se ha hecho una minuciosa comparación cuantitativa de las afinidades de una proteína por una serie de metales, Klotz (33) sugiere que pueden tenerse en cuenta ciertas conclusiones generales: así, en una cierta medida, las proteínas se comportan hacia los metales de transición de una manera no específica, en la que un gran número de cadenas laterales actúan como si fueran independientes en la macromolécula. El orden de afinidad es paralelo al observado para muchos sistemas simples de complejos metálicos con pequeñas moléculas, incluyendo aminoácidos (37,38,39).

Los metales alcalino térreos siguen al grupo de transición en su afinidad por las proteínas. Estas interacciones implican fundamentalmente simples iones fosfato (40), así como cadenas laterales carboxílicas.

Numerosos estudios realizados con iones alcalinos no han suministrado pruebas de su combinación con proteínas, ex-

cepto, probablemente, a pHs muy altos. Es de interés hacer notar que estos iones no forman prácticamente complejos con pequeños iones o moléculas orgánicas o inorgánicas. Por otra parte, el Na y el K son inmovilizados por muchos electrolitos poliméricos aniónicos, naturales o sintéticos (41). Parece posible, por tanto, que en las condiciones en las que la proteína adquiriera grandes cargas negativas, éstas sean capaces de enlazar iones metal alcalinos. De aquí puede deducirse que los iones metal alcalinos puedan influir profundamente en la forma y el tamaño de las proteínas altamente aniónicas. Probablemente a través de un mecanismo de este tipo estos pequeños iones serán capaces de influir en la función biológica de ciertas proteínas.

Finalmente, es de advertir que será necesario estudiar mucho más detenidamente las diferencias específicas entre proteínas en sus interacciones con cationes, ya que la mayoría de los estudios cuantitativos de enlaces de cationes han estado referidos a las sero albúminas, caracterizadas especialmente por su estabilidad y su mayor resistencia a los cambios irreversibles originados por la adición (42) o separación (43) de los iones hidrógeno, en comparación con muchas otras proteínas.

141. Factores que definen la especificidad de las proteínas en relación con los metales.

Williams (44) sugirió que, dada la existencia de un exceso de moléculas ligando sobre las concentraciones del metal, a un determinado pH ciertos iones metal aparecerían en muy pocos tipos de complejos. En los sistemas biológicos se han encontrado solamente cuatro tipos importantes de quelación (45):

- 1) nitrógeno alifático solamente
- 2) nitrógeno alifático y nitrógeno carboxílico
- 3) átomos de oxígeno solamente: carboxilo, carbonilo e hidroxilo
- 4) nitrógeno aromático en derivados piridínicos

(El Cu^{2+} aparecerá fundamentalmente en enlaces del tipo 1; el Co^{2+} , Ni^{2+} y Mn^{2+} en el tipo 2; el Mg^{2+} y Ca^{2+} competirán por el tipo 3, y el Fe^{2+} será hallado en el tipo 4).

La siguiente tabla (7) trata de suministrar alguna información acerca de la distribución de iones metal en soluciones que contienen proteínas y moléculas de sustrato, así como de ilustrar algunos de los factores que pueden determinar la distribución diferencial de los iones metal, partiendo de la especificidad de absorción de los cationes por las proteínas y de la especificidad de la ulterior combinación con el sustrato:

Preferencia de ligandos y estereoquímica de los complejos de coordinación de algunos iones

<u>Metal</u>	<u>Grupos ligando de la proteína</u>	<u>Grupos del sustrato</u>	<u>Estereoquímica</u>
Mg ²⁺	Carboxilo	Oxi-aniones tales como R.CO ₂ , fosfatos, etc.	Octaédrica en la mayoría de los casos.
Ca ²⁺	Los mismos que para el Mg, pero con menos afinidad aún por los grupos NH ₂ y la histidina.	Los mismos que para el Mg.	"
Mn ²⁺	Los mismos que para el Mg, pero con afinidad mayor por los grupos histidina, NH ₂ y SH.	Los mismos que para el Mg, pero con afinidad adicional por el NH ₂ y la histidina.	Casi siempre octaédrica.
Fe ²⁺	Afinidad creciente por el SH y NH ₂ , en comparación con el grupo carboxilo.		Octaédrica en la mayoría de los sistemas biológicos.
Cu ²⁺	Coordina fuertemente aminas y grupos carboxilo. Probablemente oxida la tirosina y los grupos SH, de no estar protegidos.		Planar, con dos grupos extra débilmente coordinados.
Co ²⁺	Afinidad bastante acusada por los grupos amino y SH.		Tetraédrica o planar.
Zn ²⁺	Grupos carboxilo, tirosina, aminas.	Iones haluro en algunos casos.	Octaédrica o tetraédrica.
Fe ³⁺	Cisteína. (Histidina).	Grupos ligeramente polarizables como F ⁻ y oxianiones.	Octaédrica en los sistemas biológicos.
Cu ⁺		CO, dobles y triples enlaces C-C, iones halógeno.	Muy variable con C.N < 4

Schwarzenbach (6), por su parte, destaca la importancia de los siguientes puntos en relación con la especificidad de las reacciones proteicas con respecto a los iones metal:

1) Requisitos espaciales.

Los átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre de la molécula proteica tienen una configuración cuya ordenación estérica puede encajar bien en la esfera de coordinación de un determinado catión metal. Una ordenación rígida de ligandos es conveniente en cuanto que puede ir acompañada de una marcada especificidad para un catión metal específico. Incluso átomos que normalmente son complejantes débiles pueden ser de importancia en tales ordenaciones.

2) Naturaleza de los átomos ligandos.

No sólo las ordenaciones estéricas sino también la naturaleza de los átomos ligandos influirá sobre la especificidad de los grupos de enlace. Así, existe una preferencia del nitrógeno amínico básico por el Cu y el Ni. Por otra parte, el oxígeno carboxílico enlazará un mayor número de metales, incluidos los alcalino térreos, y el azufre sulfhidrónico preferirá todos los pesados que forman sulfuros insolubles.

Es importante destacar que la naturaleza de un átomo ligando -por ejemplo, el N o el O- puede cambiar de acuerdo con el modo de estar acoplado a la parte orgánica de la molécula. Los hidróxidos alifáticos o el oxígeno éter preferirán complejar los metales alcalino térreos pesados; el oxígeno del ión fenolato preferirá complejar el magnesio.

3) Efecto de los cationes metal coordinados sobre los procesos

enzimáticos.

Los cationes metal han sido designados como ácidos de Lewis y comparados en su actividad con los protones. La catálisis por cationes metal viene a ser así una clase de catálisis ácida. Pero, según Schwarzenbach, un catión metálico puede tener también el efecto de una base. Sabido es que en el caso de la catálisis por bases, el catalizador priva al sustrato de un protón para iniciar la cadena de reacción, lo que ocurre a menudo durante el enlace de un catión metálico. El ión hidrógeno es desplazado por el catión metal, y el enlace X-H es convertido en el enlace de coordinación X-M. (X designa un átomo del sustrato que sirve como ligando al metal). Sin embargo, la propiedad electrofílica de la mayoría de los cationes metal es significativamente más pequeña que la del protón, esto es, el enlace X-M es iónico, mientras que el X-H es, en gran medida, no polar. El átomo X en X-M está, por tanto, en un estado similar al X^- iónico, especialmente si el metal asociado, M, es sólo ligeramente electrofílico y no presenta mucha tendencia a la formación de complejos (por ejemplo, los iones de los metales alcalino térreos o el Mn). La asociación del catión metal influirá entonces en las siguientes reacciones del sustrato, cuyo efecto será similar al de privar al sustrato de un protón por una base tal como OH^- o NH_3 . El hecho de que el Mg y el Mn, que tienen propiedades electrofílicas muy débiles, jueguen un importante papel como catalizadores en las reacciones enzimáticas demuestra que puede corresponder al metal la función de separar un protón.

142. Interacciones metal-proteína y estado del enzima.

A la luz de las propiedades de los complejos metal-proteína ya descritos, es interesante considerar algunas de las formas a través de las cuales pueden influir tales interacciones en la actividad enzimática. Estas formas han sido agrupadas por Klotz (33) en tres categorías, teniendo en cuenta el componente al que se atribuye el mayor efecto:

- A) efecto primario sobre las propiedades del metal;
- B) efecto primario sobre las características de la proteína enzimática;
- C) participación conjunta del metal y la proteína.

<u>Efecto sobre el metal</u>	<u>Efecto sobre la prot.</u>	<u>Efectos cooperativos</u>
1. Solubilización 2. Estabilización del estado de valencia.	1. Alteración de la carga. a. Afecta al enlace del sustrato. b. Modifica el pH de ionización de los sitios activos. c. $2E \rightleftharpoons E_2$ 2. Cambio de configuración 3. Separación de inhibidor	1. Puente quelato 2. Estabilización del complejo activado.

- A) Efectos sobre el metal: Ejemplos de este primer grupo se encuentran en gran medida entre los metaloenzimas.
- B) Efectos sobre la proteína: Cuando un metal se combina con una molécula de proteína, es obvio que la carga neta del complejo difiere de la carga característica de la proteína en su estado inicial. Esta modificación de la carga puede influir directamente en la afinidad del enzima por el sus-

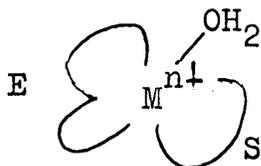
trato sobre una base puramente electrostática. El efecto electrostático puede operar también de una manera indirecta (curvas pH vs. actividad, equilibrio monómero-dímero, etc.). Un metal puede también afectar a la configuración de la proteína por otras razones que la modificación de la carga; como ya se ha indicado, una variedad de metales forma mercáptidos con los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Como es de esperar, habrá inhibición si los grupos tiol están implicados directamente en la acción enzimática o si participan en el mantenimiento de una determinada configuración de la molécula proteica. Finalmente, se incluye en el esquema anterior otro mecanismo indirecto por medio del cual un metal puede activar un enzima, esto es, la separación de un inhibidor.

- C) Efectos cooperativos: Una de las funciones de los metales es la de actuar como puentes en la formación de complejos entre las proteínas y pequeñas moléculas. A este respecto ha llamado la atención una serie de hechos (3,46) relacionados con la formación de quelatos en las reacciones enzimáticas activadas por metal: 1) Los activadores más comunes son el Mn y el Mg, que presentan la más baja capacidad quelante (39); 2) los productos de reacción son, por lo general, agentes quelantes más fuertes que los reactivos iniciales (47); y 3) la formación de un quelato estabiliza el estado inicial del complejo sustrato-metal-enzima, cuando sería más satisfactorio un mecanismo que estabilizara un estado activado.

Klotz (33) destaca que las observaciones basadas en

La experiencia sobre la formación de puentes han puesto de manifiesto que los metales con mayor capacidad quelante no funcionan necesariamente de un modo más eficaz como puentes para la proteína. Su fuerte capacidad complejante favorece las reacciones de tipo competitivo. Por el contrario, metales considerados entre los más débiles coordinadores, tales como el Mg y el Mn, son activadores corrientes. Parece ser que estos metales tienen todavía enlaces de coordinación libres y, como consecuencia de ello, se encuentran en condiciones que les permiten estabilizar estados estacionarios.

Un modelo sugerido para varios de los sistemas de enzimas con ión metal dissociable, representa al metal como puente o enlace (48,49) entre el enzima y el sustrato. El enzima y el sustrato o coenzima son generalmente ligandos multidentados, y el intermediario EMS es representado como un complejo doblemente quelato



(En la mayoría de los casos, los grupos esenciales para la reacción no ocupan el total de las posiciones de coordinación existentes alrededor del metal, siendo entonces ocupadas las restantes posiciones por moléculas de agua "no-esenciales", o aniones del medio (31)).

15. Naturaleza de los enlaces.

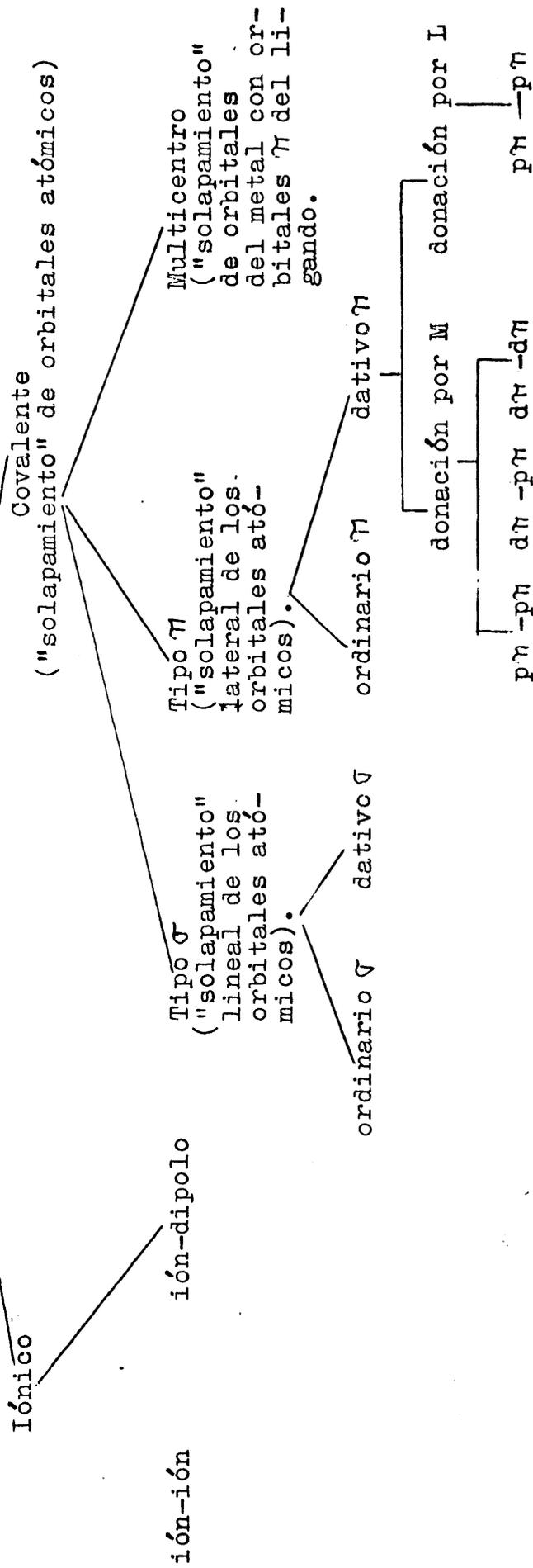
Cualquier discusión acerca del papel de los átomos metal, ya sea de importancia biológica o no, lleva inmediatamente a la necesidad de valorar la naturaleza del enlace entre el átomo metal y los grupos unidos (ligandos), naturaleza que, por su parte, está en estrecha conexión con el número de coordinación y la estereoquímica. Es, pues, fundamental el conocimiento de todos estos aspectos, así como el de su relación con otras propiedades, en la interpretación de la estructura y reactividad de los complejos metal.

Craig y Nyholm (50) han basado la discusión de estos enlaces metal-ligando en las propiedades atómicas fundamentales de las configuraciones electrónicas de los metales, en la naturaleza de los orbitales implicados, en sus potenciales de ionización y en sus posibilidades de "solapamiento", resumiendo en el siguiente esquema los tipos de enlaces encontrados en los compuestos complejos.

En general, dos son los tipos de enlaces considerados en las reacciones de iones metal con moléculas orgánicas: iónico y covalente (3,50,51). El enlace "ión-ión", que resulta de la atracción electrostática entre dos iones con cargas opuestas, se manifiesta normalmente en la estructura de cristal, si bien podría concebirse en ciertos complejos enzimáticos cuya ordenación física depende de la presencia de ciertos iones. Un segundo tipo de enlace electrostático, más generalizado, es el enlace "ión-dipolo" (27), que resulta de la atrac-

Tipos de enlace en los compuestos complejos

Enlace metal-ligando



ción electrostática entre el ión metal cargado positivamente y una molécula dipolar, permanente o inducida. Se conocen muchos complejos ión-dipolo que implican iones metal, desde simples complejos del tipo $\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ o $\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_4^{2+}$ a formas muy complejas como la del Fe en la hemoglobina. La capacidad de los iones metálicos para formar tales complejos iónicos aumenta, por lo general, con el llamado potencial iónico.

El enlace covalente procede de un "solapamiento" de los orbitales atómicos del átomo central (M) y los átomos ligandos (L), subdividiéndose en tres clases. Si el "solapamiento" tiene lugar en la línea de los centros, se forma un enlace de tipo " σ ", en el que la densidad electrónica es mayor a lo largo del eje internuclear verificándose el "solapamiento" en muchos casos entre el orbital de un par solitario del ligando y un orbital híbrido, dsp, del metal. Resulta así que, dado un ión metal M^{n+} y un ligando L con uno o más pares solitarios utilizables en la formación del enlace, la atracción del metal por los pares solitarios da lugar a varios tipos de enlace σ con más o menos participación del enlace iónico o del covalente. (El enlace iónico, en realidad, puede ser considerado como un caso extremo, altamente polar, del tipo σ). Pero, si la formación del enlace es el resultado de "solapamientos" laterales (orbitales del tipo π), se forma un enlace " π ". Ambos, a su vez, serán "ordinarios" o "dativos", según que los electrones procedan de ambos átomos o de uno sólo. También es de considerar el enlace que implica el "solapamiento" de un orbital vacante σ del átomo metal con un orbital π

lleno, del ligando. (Este tipo de enlace es probablemente más frecuente de lo que se supone, especialmente en enlaces del tipo metal-carboxilo).

Por su parte, los enlaces π "dativos" pueden ser de dos tipos. Un primer tipo cuando los ligandos tienen pares de electrones solitarios utilizables, en cuyo caso enlazarán con metales que tengan orbitales vacantes (los elementos de transición forman enlaces con tales ligandos), y un segundo tipo que implica la donación de un par de electrones por el átomo metal al ligando, lo que requiere un orbital vacío "d" o "p" del mismo. (La formación de enlaces $d_{\pi} \rightarrow p_{\pi}$ o $d_{\pi} \rightarrow d_{\pi}$ requiere el uso de orbitales d del metal adecuadamente llenos. Estos orbitales "d" pueden dividirse en 2 tipos: primeramente los llamados " d_{ξ} " (d_{xy} , d_{xz} , d_{yz}) en los planos de los ejes XY, XZ, YZ, entre las direcciones de los ligandos, y en segundo lugar los " d_{γ} " (d_{x^2} , $d_{x^2-y^2}$) a lo largo del eje Z en un caso y del eje X e Y en el otro. Los d son los utilizados en la formación de los enlaces $d_{\pi} \rightarrow p_{\pi}$ o $d_{\pi} \rightarrow d_{\pi}$ en los complejos octaédricos).

En el caso de que sean los ligandos quienes tengan pares de electrones solitarios utilizables, los metales pueden ser divididos, a su vez, según que la cubierta de valencia que se llena por los electrones del ligando sea un orbital "p", "d" o "f". Los "p" pueden, por su parte, subdividirse según que haya o no un orbital "d" vacío utilizable en la misma cubierta de valencia que los electrones "p"; la diferencia entre ambos casos estriba en que mientras en el segun-

do no se puede sobrepasar el número de coordinación de 4, utilizando en cambio los orbitales "d" puede alcanzarse un número de coordinación de 6. Los "d" (metales de transición) pueden presentar también dos tipos de complejos metálicos, según que para la formación del enlace utilicen orbitales "internos" (3d) o "externos" (4s y 4p ó 4s, 4p y 4d).

Se considera fundamentalmente al número de coordinación como un reflejo del principio de electroneutralidad (basado en la tendencia a la neutralidad eléctrica de la carga total), y por tanto dicho principio resulta muy útil para indicar el número y naturaleza de los enlaces entre el metal y los ligandos. Sabido es que los iones pueden ser termodinámicamente estables en presencia de electrones ionizables de los ligandos vecinos, bien por captación total de los electrones del ligando (oxidación) o bien por polarización de un mayor o menor número de ligandos según su polarizabilidad, con la consiguiente mayor o menor adquisición de carga negativa de cada uno de ellos.

Craig y Nyholm (50) señalan los siguientes factores como determinantes del número de coordinación:

- a) número de oxidación del átomo metal,
- b) electronegatividad o carga efectiva nuclear del átomo metal
- c) naturaleza de los orbitales de enlace utilizables,

resumiendo, al mismo tiempo, en las siguientes generalizaciones los números de coordinación preferidos por un metal:

- 1) Los números de coordinación más altos van generalmente asociados a los complejos catiónicos, y los más bajos a los uniiónicos.

- 2) Los números de coordinación más altos derivan de los mayores números de oxidación.
- 3) Los números de coordinación disminuyen al aumentar la polarizabilidad del ligando.
- 4) Los números de coordinación disminuyen al aumentar el poder de polarización del átomo metal, variando entre 4, para los elementos del primer período, 6, para el período segundo, y 8, en los últimos períodos. Hasta hace poco no se habían reconocido números de coordinación superiores a 6 en el primer período largo. (Probablemente sea interesante destacar que todos ellos proceden de quelatos o ligandos de campo débil). El número límite de 4 para el primer período se puede explicar desde el punto de vista del tamaño del ión metal (solamente 4 pares de electrones de enlace pueden aproximarse a estos elementos sin repulsiones interelectrónicas entre los pares de enlace σ) o teniendo en cuenta los orbitales utilizables (los 4 orbitales $2s 2p^3$ de estos elementos forman un tetraedro).

A este respecto, es interesante señalar la relación entre la tendencia a formar enlaces covalentes y la tendencia a formar orbitales de enlace híbridos (29). Son varias las posibilidades de que un ión metal forme tales enlaces híbridos equivalentes, según las diferentes categorías de orbital que se combinen; así la hibridación de un orbital s y 3 orbitales p da 4 enlaces sp^3 de la misma naturaleza. Para nuestros fines, el aspecto más importante de la hibridación de enlaces es la dependencia de la estabilidad del enlace del ángulo que forma.

P.e., los 4 enlaces sp^3 equivalentes se dirigen a los vértices de un tetraedro formando ángulos de $109,47^\circ$. También un orbital s, dos p y uno d dan lugar a 4 enlaces equivalentes (dsp^2), algo más fuertes que los enlaces sp^3 , y, dirigidos a los vértices de un cuadrado formando ángulos de 90° en un mismo plano. Otra hibridación común en los enlaces de los metales implica dos orbitales d, uno s y tres p; los 6 enlaces así formados (d^2sp^3) se dirigen a los vértices de un octaedro.

En consecuencia y según hemos visto, de acuerdo con el tipo de hibridación de enlaces al que un metal está predispuesto el ión metal tenderá a combinarse con un número máximo de simples ligandos. Algunos iones son también capaces de experimentar un cambio de una forma a otra, dando lugar a diferentes complejos en los que parte de los ligandos están unidos más fuertemente que otros. Bjerrum (35) definió así el término "número de coordinación característico", Z, como el número de los primeros ligandos enlazados más firme y uniformemente.

Finalmente y en relación con la estereoquímica de la molécula, los electrones en la cubierta de valencia pueden ser clasificados en 4 tipos (51): a) "Electrones enlazantes" que forman enlaces σ . b) "Electrones no-enlazantes" (pares solitarios) que pueden ser considerados como hibridizados con los anteriores. c) "Electrones enlazantes" que forman enlaces π . d) "Electrones no-enlazantes" que no están hibridizados con los de a) pero que pueden afectar indirectamente a la estereoquímica

En la siguiente Tabla se recoge una serie de características de los iones metal, de acuerdo con los aspectos anteriormente considerados (50):

Clasificación de los metales en función de su afinidad por los ligandos (clases A y B)

Metales ligeros, Li^+ , Be^{2+} , B^{3+} .

"Núcleo no-enlazante": $1s^2$.

Número de coordinación ≤ 4

Gran afinidad por iones fuertemente electronegativos, de baja polarizabilidad.

Tendencia a utilizar los 4 orbitales $2s^2 2p^3$ para completar el octeto, incluso con formación de enlaces π con pares solitarios del ligando, o enlaces multicentro.

Metales pre-transición, p.e., Na^+ , Ca^{++} , Sc.

"Núcleo no-enlazante": $ns^2 np^6$.

Mayor tendencia a enlaces dobles y multicentros.

Número de coordinación > 4 (usando orbitales d), aumentando con la carga del átomo y la polarizabilidad del ligando.

Metales lantánidos ($n=4$) y actínidos ($n=5$)

"Núcleo no-enlazante": $(n-1)(f^1 - f^13)ns^2 np^6$

Poco efecto sobre la coordinación de ligandos, debido a la pantalla que los $s^2 p^6$ ejercen sobre los f sin llenar.

Disminución de tamaño (contracción lantánida) al llenarse los f, siendo sus efectos sobre la formación de complejos menos acusados que en los de transición.

Gran semejanza de propiedades en el estado tri-valente.

Valores mínimos de R' , lo que se refleja en una gran afinidad por ligandos de baja polarizabilidad. Así forman complejos estables con oxiligan-dos, ión F^- y polidentatos con oxígeno y nitrógeno como donadores.

Metales de transición

"Núcleo no-enlazante": $(n-1)d^1 \rightarrow (n-1)d^9$,

siendo pequeño, en este caso, el número de electrones "no-enlazantes" d.

-Valores pequeños de R' y, por tanto, tipo de enlace esencialmente iónico.

Clase A

Características generales:

Pequeños valores del potencial de ionización.

Gran afinidad por los iones menos polarizables, lo que sugiere que los enlaces formados son electrostáticos del tipo ión-ión.

Coordinación con los ligandos más electronegativos, debido a los valores crecientes del cambio de energía libre.

Existencia de "núcleos no-enlazantes" con alto poder de pantalla ($s^2, s^2 p^6$, o solamente pocos electrones "no-enlazantes" d), lo que supone valores bajos en su campo eléctrico y en su poder polarizante.

Pequeños valores de R' (< 15), que resulta igual a R/n , siendo R el índice que mide la relación entre la tendencia del ión a formar un enlace covalente (en términos del P.I.) y la tendencia a formar un enlace electrostático (en términos de $ne^2/r_i + r_X^-$).

Metales de transición

"Núcleo no-enlazante": $(n-1)d^1 \rightarrow (n-1)d^9$.

Aumento del potencial de ionización como un reflejo de la disminución del poder de pantalla a medida que incrementan los electrones d , con el consiguiente incremento de las interacciones entre los electrones "no-enlazantes" del metal.

Mayor poder de polarización de los pares solitarios de los electrones de los ligandos, según se pasa de $d^1 \rightarrow d^9$, dada la mayor carga efectiva nuclear del ión metal.

Valores crecientes de R' .

Aumento del carácter covalente con el estado de oxidación (que hace aumentar la polarización del ligando), y para el mismo estado de oxidación con el número de electrones d .

Metales post-transición, p.e.: Cu^+ , Zn^{2+} , Ga^{3+} .

"Núcleo no-enlazante": $(n-1)d^{10}$.

Alto poder polarizante, debido a la existencia de orbitales d^{10} llenos.

Gran afinidad electrónica asociada a su gran poder polarizante y a la mayor separación $s-p$, que lleva a una disminución en el número de coordinación (C.N. ≈ 2). Algunos de estos iones monovalentes pueden tener C.N. = 2, como resultado de la mezcla del orbital $6s^1$ con el $5d_{z^2}$.

Metales con pares inertes, p.e.: Tl^+ , Pb^{2+} .

"Núcleo no-enlazante": $(n-1)d^{10} ns^2$.

Gran adaptabilidad a las circunstancias químicas. Potenciales de ionización intermedios entre los de pre-transición y post-transición.

Carácter iónico monovalente; sin embargo, con un ligando polarizable, el par solitario adquiere cierto carácter p y forma fuertes enlaces divalentes.

Clase B

Características generales:

Grandes valores del potencial de ionización.

Gran afinidad por los iones más polarizables. Mayores campos eléctricos y mayor poder de polarización, lo que sugiere la formación de enlaces electrostáticos ión-dipolo inducidos o divalentes.

Poco poder de pantalla, debido a la existencia de orbitales d llenos o casi llenos.

Altos valores de $R' (> 19)$.

2. METALOENZIMAS

2. METALOEENZIMAS: nomenclatura y clasificación.

Puede considerarse que el vocablo metaloenzima encierra una definición puramente operacional, en el sentido de Bridgman (52). Esta definición agrupa a aquellos enzimas asociados con metales que pueden ser objeto de ciertos estudios experimentales comunes, sin presuponer diferencias en cuanto a la función, composición o estructura, entre los verdaderos metaloenzimas y el grupo de los llamados complejos metal-enzimas.

Dado el carácter polar de las cadenas laterales de las proteínas, es lógico que los iones metales produzcan efectos destacados sobre la actividad catalítica de las mismas. Sin embargo, sus interacciones pueden oscilar desde efectos de débil fuerza iónica (formando complejos metalo-proteínas, que incrementan la estabilidad del enzima) hasta asociaciones altamente específicas, en las que el ión metal participa de un modo esencial en el mecanismo de catálisis. Esta diferente fuerza de unión entre el metal y el enzima es la base de la división operacional que origina los dos grupos de metaloenzimas aludidos, cuyas características expondremos brevemente:

- (A) Enzimas con los metales enlazados fuertemente, que no requieren la adición de iones metales al medio de ensayo, no influyendo, por otra parte, dicha adición en la actividad (salvo posibles inhibiciones o activaciones no-específicas).
- (B) Enzimas con los iones metal dissociables, siendo la actividad función explícita de la concentración de iones metal libres en solución.

Los enzimas que pertenecen al primer grupo pueden ais-

larse con el metal totalmente ligado a la proteína, y un criterio riguroso para definir la función metaloenzima se obtiene observando el contenido del metal en relación con la actividad y pureza de la proteína, en los sucesivos pasos del proceso de preparación. En los enzimas del segundo grupo, por otra parte, el metal se disocia más fácilmente; esto lleva a una pérdida de actividad, y la significación biológica de los metales se deduce tradicionalmente, en estos casos, de las medidas de la activación catalítica por los iones metal, o de su inhibición por agentes secuestradores de los mismos.

Es de notar que esta terminología de Malmström y Rosenberg (49) difiere de la de Vallee (53), quien no incluye el segundo grupo entre los metaloenzimas. La posición de Vallee presupone diferencias en el papel del metal en los dos grupos, diferencias que tal vez existan pero que no deberán ser discutidas hasta que se tenga un conocimiento más exacto del mecanismo de acción de los metales (54).

Las revisiones realizadas en los últimos años sobre las diferentes funciones de los metales en la catálisis enzimática (3,11,49,53,55,60) se refieren fundamentalmente a los enzimas que contienen el metal enlazado fuertemente, ya que los datos experimentales de este grupo se consideran más definitivos. Es más escasa la información sobre los enzimas con ión-metal disociable; la falta de datos obtenidos en condiciones rigurosamente controladas dificulta esa información.

No obstante, los progresos realizados en la purificación de proteínas, en el estudio de sus complejos con metales, y en la cinética de los enzimas han influido sobre este campo de investigación, iniciándose una nueva revisión de los primeros trabajos a la luz de los criterios válidos en el presente.

21. Enzimas con ión-metal dissociable.

Habitualmente se denomina a estos enzimas "enzimas activados por ión metal", aunque este término se preste a confusiones. El ión metal, en estos casos, no debe ser considerado como un activador sino como un coenzima, de acuerdo con la definición original de coenzima dada por Duclaux: "una sustancia dializable necesaria para la actividad del enzima".

Como ha señalado Malmström y Rosenberg (49), un enzima no podrá ser clasificado entre los activados por ión metal tan sólo porque su actividad aumente con la adición de iones metal al medio de ensayo. Este criterio es necesario pero no suficiente, ya que, como antes hemos apuntado, el ión metal puede influir en la velocidad de la reacción sin jugar un papel esencial en el mecanismo de la misma; en general, debe hacerse un estudio completo de la cinética de la reacción y de la estabilidad de los complejos postulados, para poder demostrar que los efectos representan activaciones verdaderas.

De los diversos tipos de activaciones no-específicas, la fuerza iónica o los efectos electrostáticos son, por lo general, fáciles de excluir, dado que siguen leyes cinéticas diferentes de las que rigen las verdaderas activaciones. Sin embargo, hay otros efectos que se prestan más fácilmente a confusión, a saber: la separación de un inhibidor y la estabilización de la proteína, en soluciones diluidas, por los iones metal, inconvenientes que pueden evitarse utilizando concentraciones elevadas de enzimas purificados, siempre que

las técnicas rápidas requeridas por dicho motivo sean asequibles.

Malmström y Rosenberg (49) han subrayado también que en el estudio de los enzimas activados por ión metal no se exige que la velocidad de la reacción sea igual a cero en ausencia del metal. De hecho, muchas reacciones bioquímicas tienen lugar a velocidades medibles aún en ausencia de catalizadores; la misión de un enzima, después de todo, no es iniciar la reacción sino actuar sobre el mecanismo de la misma. En consecuencia, la actividad residual en ausencia de metal no impide a un enzima ser un metaloenzima. Ahora bien, si en algunos casos la actividad de esta clase de enzimas no desaparece necesariamente con la separación completa del ión metal, debe, sin embargo, ser posible en la mayoría de los casos obtener una actividad igual a cero o menor que la sensibilidad del método de medida. (Esto no implica contradicción con la definición de catalizador, ya que la mayoría de las reacciones bioquímicas termodinámicamente posibles son, por razones de cinética, extremadamente lentas en ausencia de catalizador).

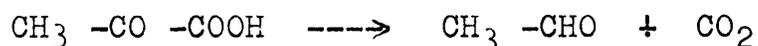
La discusión precedente indica la gran precaución que debe observarse antes de definir a una proteína dada como un enzima activado por ión metal. Sólo cuando se cumpla una serie de criterios rigurosos puede atribuirse a un ión metal la función de coenzima. Sin embargo, en los casos en que la velocidad de reacción aumenta considerablemente con la adición de ión metal, es una hipótesis de trabajo razonable suponer que el ión metal actúa como coenzima, aún cuando la discusión

final deba supeditarse a una investigación más completa del tipo indicado (49).

Dentro del grupo de enzimas con ión-metal disociable o activados por ión metal y para un estudio de especificidad de metales e interpretación de la probable participación de los mismos en el mecanismo de acción enzimática, hemos seleccionado a la 2-oxoácido carboxi-liasa o pirúvico descarboxilasa (PDC), que ya había sido objeto de previas investigaciones en este Departamento. Su interés, por otra parte, es obvio, dado que actúa sobre el ácido pirúvico, metabolito fundamental de los glúcidos y centro de concurrencia de estos principios inmediatos, con los lípidos y próticos, en las reacciones anabólicas y catabólicas.

211. PIRUVICO DESCARBOXILASA: generalidades.

La pirúvico descarboxilasa fue descubierta en 1910. Neubauer y Fromherz(61) observaron que la levadura podía convertir el ác. p-hidroxifenilpirúvico en p-hidroxifeniletanol, indicando que, de análoga manera, a partir del ác. pirúvico se formaría etanol y que el primer paso de dicha conversión sería la descarboxilación del ác. pirúvico a acetaldehído y CO₂. Simultáneamente Neuberg et al. (62-66) iniciaron una serie de estudios en torno a la acción de la levadura sobre distintos compuestos orgánicos, y observaron que muchas sustancias que no podían ser clasificadas como hidratos de carbono eran, no obstante, utilizadas por la levadura con producción de anhídrido carbónico. En vista de estos resultados, Neuberg y Karczag (67) prosiguieron las experiencias en este sentido y en 1911 publicaron un trabajo titulado "Carboxilase, ein neues Enzyme der Hefe", en el que indicaban que el ác. pirúvico es transformado por la levadura en acetaldehído y CO₂



y denominaron "carboxilasa" al enzima responsable de esta reacción.

Los términos de la ecuación fueron comprobados por Krebs y Roughton (68), quienes estudiaron la cinética de la descarboxilasa en ausencia y en presencia de la anhidrasa carbónica, y llegaron a la conclusión de que el CO₂ es el producto primario de la descarboxilación enzimática del piruvato, y no el HCO₃⁻ ni el CO₃H₂, como sugirieran Conway y MacDonall(69).

En 1932 Auhagen (70-72) encontró que la descarboxilasa requiere, para ser activa, dos factores: un metal, Mg, y un compuesto termostable de naturaleza orgánica, al que denominó "codescarboxilasa", y cuya estructura de pirofosfato de tiamina fue posteriormente establecida por Lohmann y Schuster (73,74).

La pirúvico descarboxilasa se encuentra ampliamente distribuida; hallada en la levadura simultáneamente por Neubauer y Fromherz (61) y por Neuberger et al. (62-67), posteriores investigaciones han demostrado su existencia tanto en hongos como en bacterias y plantas superiores. Así Anderson (75) encontró esta actividad en semillas de guisante; Zeijlemaker (76) en avena; Bunting y James (77) en cebada; Dickens y Weilmalherbe (78) y Cohen (79) en habichuela; Horowitz y Heegaard (80) en guisante; Mee (81) en soja; Guzmán-Barrón y colaboradores (82) en patata; Sakaguchi et al. (83) en *Rhizopus*; Tytell y Gould (84) en *Fusaria*, y Cohen y Cohen-Bazire (85), Clifton (86), Kobel y Neuberger (87) y King y Cheldelin (88) en bacterias. Guzmán-Barrón y colaboradores (89) han estudiado la distribución de la descarboxilasa en el interior de las células de levadura, señalando que el enzima debe estar situado en la región central, alejado de la membrana celular.

Como fuente de preparación de la pirúvico descarboxilasa suele tomarse, bien la levadura de cerveza, bien la de panadería. Frecuentemente se han utilizado preparaciones crudas obtenidas por extracción de la levadura con tampón fosfa-

to, incluso en determinaciones cuantitativas de ácido pirúvico. Estas preparaciones ofrecen, no obstante, el inconveniente de la presencia de fosfatasas y fosforilasas, entre otros enzimas interferentes, presencia que venía siendo inhibida, en general, mediante la adición de tiamina y yodoacetato, los cuales, por sus efectos activadores e inhibidores sobre la misma descarboxilasa, dificultaban la reproducción de los resultados. Numerosos investigadores han conseguido purificar el enzima, destacándose por el grado de purificación obtenido las preparaciones de Kubowitz y Lüttgens (90), y Green et al. (91), y, posteriormente, las de Holzer et al. (92), quienes lograron por primera vez la cristalización del enzima. De la Fuente (93) ha introducido modificaciones en el método de Green -uno de los más generalizados- incrementando el rendimiento en actividad enzimática mediante secado lento (autólisis); la rotura mecánica de las membranas no es procedimiento aconsejable. Kay y Murfitt (94) consiguieron romper las células en un desecador de vacío sobre ác. sulfúrico concentrado.

El aislamiento, a partir de la levadura, de la co-descarboxilasa en forma altamente purificada permitió demostrar en 1941 (90,91) que la pirúvico descarboxilasa era un compuesto proteína-difosfotiamina-magnesio. La descarboxilasa más pura obtenida por Green, Herbert y Subrahmanyam (91) dio un contenido de 0.46% de pirofosfato de tiamina y 0.13% de Mg (correspondiente a 5 átomos de Mg por molécula de co-descarboxilasa). Si se supone que cada molécula de enzima sólo contie-

ne una de pirofosfato de tiamina, se obtiene un peso molecular de 92.000. Un peso molecular de 75.000 fue publicado simultáneamente por Kubowitz y Lüttgens (90), quienes, sin embargo, encontraron 1 átomo-gramo de Mg por mol de pirofosfato de tiamina. Dado, no obstante, el entonces escaso conocimiento de la fracción proteica, no debe darse mucha validez a estos valores. Cálculos basados en datos obtenidos por ultracentrifugación permitieron a Melnick y Stern (95) obtener un peso molecular de 141.000, utilizando carbonil-hemoglobina como standard interno, y posteriormente a Koike et al. (96) el valor, aún superior, de 183.000, aproximadamente de acuerdo con el de 175.000, y un contenido de 3 ó probablemente 4 pirofosfatos de tiamina por mol de enzima, publicado recientemente por Ullrich, Wittorf y Gubler (97) y deducido de los datos obtenidos por sedimentación en la ultracentrífuga analítica y por centrifugación en la preparativa. (Como referencias internas standard se utilizaron gradientes de densidad de sucrosa y catalasa y glucosa oxidasa, proteínas de peso molecular bien conocido). El tratamiento con urea (97) no dio lugar a la disociación de la pirúvico descarboxilasa en subunidades, si bien incluso pequeñas concentraciones de urea provocaron una desnaturalización casi irreversible del enzima con liberación parcial del pirofosfato de tiamina.

Melnick y Stern (95) han estudiado el comportamiento de la descarboxilasa a distintos pHs, obteniendo por este método una curva de estabilidad del enzima con el máximo a pH 6.

La máxima actividad descarboxilásica corresponde a un pH 6.0-6.2, coincidiendo con el de estabilidad máxima. Estos mismos autores han señalado en pH 5.1 el punto isoeléctrico de la descarboxilasa parcialmente purificada. Melnick y Stern señalaron, asimismo, que en extractos de levadura la descarboxilasa sedimenta al ser sometida a un campo de 40.000 g, y que en ensayos electroforéticos a pH 7.2 el enzima acompaña a la fracción de movilidad media. Aldous y Stewart (98) han investigado el efecto de los rayos Röntgen sobre la descarboxilasa, encontrando que, según las condiciones, es inactivada en un 30-45%. Neuberg y Rosenthal (99) señalan que temperaturas superiores a 50° inactivan también el enzima.

Dada la intervención decisiva de la pirúvico descarboxilasa en el metabolismo celular, se ha estudiado extensamente el problema de la inhibición, habiéndose encontrado un gran número de inhibidores de este enzima, distintos en su estructura y en el mecanismo de acción, que por sus efectos pueden dividirse en: a) competidores con el coenzima (pirofosfato sódico (100), pirofosfato de tiazol (101), algunas sulfonamidas (73,102,103), pirofosfato de oxitiamina (104-107), trifosfato de oxitiamina (106-108) y pirofosfato de neopiritiamina (109)); b) competidores con el sustrato (acetaldehído (73,91,110), formaldehído (110,111) y butiraldehído (110)); c) reactivos de grupos -SH (Ag, Cu, Hg, Sb, Pb, Be, Au (91,95, 111,112), derivados de naftoquinonas (113, 114), arsenicales trivalentes (115), ác. yodoacético (116,117) y p-cloromercuri-

benzoato (117); y d) otras formas de inhibición (cloroformo (118), cianuro potásico (119), bisulfito (120), salicilatos (121,122), dinitrofenoles (123), colorantes azoicos cancerígenos (113,124), antibióticos (125), etc., etc.).

En cuanto a los activadores, Green et al. (91) y muy recientemente Schellenberger et al. (126,127) han encontrado que una serie de metales activan al enzima. Kossel(112) señala, sin embargo, que, cuando la acción de los cationes se estudia sobre descarboxilasa no purificada, se observan efectos secundarios, debidos a la activación de inhibidores o a la protección del enzima contra ellos. Ochoa y Peters (128) observaron que la tiamina era activador de la descarboxilación en extractos sin purificar. Lipton y Elvhjem (129) indicaron, a este respecto, que esta activación se manifestaba en la levadura de pan pero no en la de cerveza. Westenbrink et al. (130,131) sugirieron que la tiamina activa indirectamente la descarboxilasa, al inhibir una fosfatasa de la levadura que desfosforila la difosfotiamina.

Aunque el ác. pirúvico es el sustrato natural de la descarboxilasa, el enzima actúa igualmente sobre una amplia variedad de α -cetoácidos. Neubauer et al. (62,63,64,67) indicaron que tan sólo aquellos cetoácidos capaces de formar enoles eran descarboxilados por el enzima. Posteriormente, sin embargo, Neubauer y Minard (132) hallaron que el ác. α -quinoleinpirúvico enolizable no era descarboxilado, no siendo suficiente, por tanto, esta condición para la fermentabilidad.

Long y Peters (133) sugieren que la capacidad de los α -ceto-ácidos como sustratos del enzima disminuye al aumentar la cadena de carbonos, siendo no obstante sustratos, además del piruvato, numerosos α -cetoácidos β -monoalkil y dialkylados (incluyendo el ác. ciclo-hexil-glioxílico y fenil glioxílico (134)). La afinidad y la velocidad de reacción son influenciadas en direcciones opuestas por el efecto inductivo del grupo en posición β . Los trabajos de Kobayasi (135), con los extractos crudos de levadura, y los de Green et al. (91), con la descarboxilasa purificada, confirman la hipótesis de Long y Peters. Uno de los pocos α -cetoácidos que no actúa como sustrato es el ác. glioxílico (136). El ác. glioxílico, en realidad, es descarboxilado pero no hay separación del aldehído, de manera que el coenzima queda bloqueado. La explicación radica en la gran estabilidad del enlace C-C que ha de romperse ($K_d = 5.0 \cdot 10^{-4}$). Por su parte Gale (137), analizando una serie de análogos estructurales del ác. pirúvico concluye que el carácter inhibitor del análogo requiere la existencia del fragmento básico de 3 carbonos del ác. pirúvico, con el grupo α -ceto-carboxílico inalterado. Así, las sustituciones en el átomo β (β -cloropiruvato, fenilpiruvato, o-nitrofenilpiruvato, p-hidroxifenilpiruvato, cetomalonato y glioxalato, con la excepción del α -cetoglutarato, ác. oxanílico y butandiona) dan lugar a los inhibidores más potentes, mientras que las sustituciones en el oxígeno cetónico (propionato, α -Cl- o Br-propionato y fenilalanina) o en el carbono carboxílico (acetamida y oxamato)

dan lugar a compuestos sin actividad inhibidora. Los resultados parecen indicar que el inhibidor se combina con el sitio activo del enzima, sugiriéndose que el verdadero inhibidor pueda ser el aldehído correspondiente a cada análogo.

Componentes de la pirúvico descarboxilasa.

Como ya hemos visto, se ha demostrado que la pirúvico descarboxilasa, aislada de la levadura y en forma altamente purificada, es un complejo proteína-magnesio-difosfotiamina. La descarboxilasa más pura obtenida por Green, Herbert y Subrahmanyam (91) contiene 0.46% de pirofosfato de tiamina y 0.13% de Mg, correspondiente a 5 átomos de Mg por molécula de co-descarboxilasa, para un peso molecular de 92.000. Kubowitz y Lüttgens (90) han encontrado un átomo gramo de Mg y un mol de pirofosfato de tiamina en 75.000 gramos de descarboxilasa, y recientemente Ullrich, Wittorf y Gubler (97) registran un peso molecular de 175.000 y un contenido de 3 ó probablemente 4 pirofosfatos de tiamina por mol de enzima.

Dichos componentes están firmemente ligados a pH 6. Kubowitz y Lüttgens (90) hallaron que podía dializarse el enzima a 0°, contra etanol al 18% en agua, sin disociación o pérdida de actividad. Sin embargo, a pHs superiores a 8 el enzima se escinde, más o menos totalmente, sin que la proteína se desnaturalice, de tal modo que, si se precipita con sulfato amónico, puede ser separada del Mg y de la co-descarboxila-

sa que quedan en solución. Si una vez disociado el enzima, a dicho pH, se lleva la solución a pH 6, sin separar ninguna de las partes, la mezcla resultante es inactiva; sin embargo, es posible obtener un 85% de la actividad inicial si se agrega un gran exceso de ambos componentes termostables (138).

Esta disociación y posterior recombinación del enzima, a partir de la proteína enzimática liberada del enzima natural, sugiere la posibilidad de realizar estudios que incluyan, por una parte, valoraciones exactas de co-descarboxilasa tanto en mezclas sintéticas de esteres fosfóricos como en extractos de origen biológico y, por otra, estudios sobre la naturaleza de la descarboxilación basados en la interpretación del papel del metal en el sistema enzimático. Muchos han sido los trabajos realizados sobre la valoración enzimática de la co-descarboxilasa; esta insistencia en el problema refleja claramente la insatisfacción ante los resultados obtenidos en los sucesivos trabajos, debido ello a no haber sido posible utilizar en ninguno de los casos una proteína totalmente pura y, sobre todo, de actividad reproducible.

Es evidente, pues, que tanto en la valoración enzimática de la co-descarboxilasa como en los estudios de recombinación, ha de aplicarse el máximo cuidado a la preparación de una apo-descarboxilasa pura, de gran sensibilidad y actividad constante.

2111. Apo-descarboxilasa: generalidades.

Se extrae, en general, de la levadura de cerveza, que es el material más rico y más fácilmente asequible (139,140).

La mayor parte de los autores ha utilizado, como apofermento, la levadura lavada en medio alcalino, eliminando el cofermento mediante repetidos lavados del polvo de levadura de cerveza con tampón fosfato alcalino (141,142). Para suprimir el "efecto Ochoa", Westenbrink y colaboradores proponen añadir a la preparación enzimática un gran exceso de tiamina; en estas condiciones la co-descarboxilasa preformada muestra su actividad máxima y no es activada por la tiamina contenida en las soluciones en las que se quiere valorar la co-descarboxilasa. La preparación del apofermento, según el método de Westenbrink et al., no da, sin embargo, resultados satisfactorios.

Weil-Malherbe (143), basándose en los datos de Axmacher y Bergestermann (111), ha preparado, a partir de polvo de levadura, una fracción proteica que contiene la descarboxilasa, empleando el método de Warburg y Christian (144) para eliminar el cofermento. La obtención del apofermento, según la modalidad de Weil-Malherbe, proporciona ciertamente un método más sensible, pero la fracción proteica puede fosforilar la tiamina en presencia de ATP. Como las soluciones a valorar contienen todavía ATP y tiamina, puede producirse una síntesis de co-descarboxilasa que falsee los resultados. En algunos casos se evita la fosforilación de la tiamina con iodoacetato, pero, dado que actualmente se reconoce a la descarboxilasa como un

enzima sulfhidrílico, inhibido por iodoacetato, parece razonable excluir a éste de los sistemas de ensayo de la difosfotiamina. Leuthardt y Nielsen (141) consiguieron eliminar completamente el enzima fosforilante por fraccionamiento con sulfato amónico; por este procedimiento se obtiene una solución enzimática de la que ha sido eliminada la transfosforilasa, pudiendo trabajarse incluso en presencia de 10 γ de tiamina y 2 mg. de ATP sin más formación de co-descarboxilasa que la comprendida en los límites de error del método.

Kuhowitz y Lüttgens (90), y Green et al. (91), partiendo de una descarboxilasa de gran pureza, aportaron también un método de preparación de apo-descarboxilasa, y posteriormente se han multiplicado los intentos de separación de esta proteína enzimática en condiciones satisfactorias (94, 146, 147, 148). Boffi, Lucarelli y Bucci, en una serie de trabajos (149-151) relacionados con la determinación enzimática de co-descarboxilasa, han tratado de obtener una preparación de apo-descarboxilasa de actividad constante, siguiendo en la preparación un método análogo al de Green et al. La mayor pureza del apo-enzima les ha llevado a determinar las condiciones óptimas de valoración y la influencia de varios factores sobre la actividad de la descarboxilasa reconstruida; sin embargo, en su último trabajo (151) afirman que el problema de la determinación de co-descarboxilasa en líquidos biológicos no está completamente solucionado, entre otros motivos, por no ser posible la preparación de una apo-descarboxilasa de alta pureza y actividad constante.

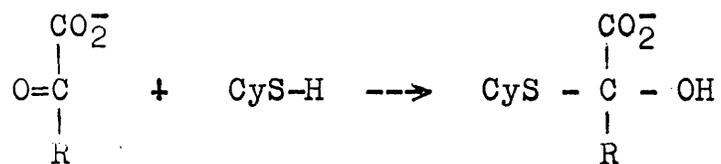
Por nuestra parte, en la realización del presente trabajo hemos conseguido poner a punto un método propio de preparación de apo-descarboxilasa totalmente pura, cuya eficacia hemos podido confirmar plenamente, como consecuencia del detallado estudio realizado acerca de las condiciones óptimas de preparación del citado apoenzima. En la actualidad podemos obtener fácilmente, en 1 hora, aproximadamente, preparaciones de esta proteína no sólo de gran pureza sino también altamente sensibles y de actividad reproducible.

Grupos de la proteína con probable participación en la actividad catalítica; papel de los grupos -SH en el mecanismo enzimático de la pirúvico descarboxilasa.

De entre los grupos polares de las moléculas de proteínas, los grupos -SH han demostrado jugar un papel especialmente importante en numerosas reacciones biológicas. La pirúvico descarboxilasa, como la mayoría de los enzimas del metabolismo del ácido pirúvico (152), se considera incluida en el grupo de los tiol-enzimas, si bien varios trabajos preliminares (91,153-157), algunos de ellos contradictorios, señalaron la preferencia de este enzima hacia un determinado tipo de reactivo, parcialidad que hacía que no pudiera considerarse definitiva la prueba para determinar la presencia de dichos grupos. Sin embargo, después del análisis sistemático del efecto de los diferentes tipos de detectores de tioles (agentes formadores de mercáptidos, agentes alquilantes o agentes

oxidantes) sobre la descarboxilasa de levadura altamente purificada, realizado por Stoppani et al. (158), quedó demostrado el carácter tiol del enzima, con la participación de dicho grupo en la catálisis de la descarboxilación del piruvato. Stoppani (158), asimismo, destacó el efecto protector de este último -posteriormente confirmado por Kanopkaite (159) y muy recientemente por Schellenberger et al. (160)-, sugiriendo que la interferencia del piruvato y de los reactivos -SH puede ser explicada, bien por reacción del sustrato e inhibidor con el mismo grupo del enzima, bien con dos grupos colocados suficientemente cerca, de modo que la combinación del piruvato con uno de ellos haga al otro inaccesible al inhibidor y viceversa. Este último mecanismo resulta improbable, en cuanto que el o-iodosobencato no forma compuestos estables con el grupo -SH y, por tanto, en la pirúvico descarboxilasa oxidada por este agente no existiría ningún impedimento espacial para que la reacción con el piruvato no tenga lugar. Debe entonces concluirse que un grupo -SH es esencial para la formación del complejo piruvato-descarboxilasa, perteneciendo dicho grupo al tipo "lento" descrito por Barrón (152), ya que es mucho más sensible a los metales que a los agentes oxidantes y alquilantes. La existencia de este grupo proporciona una importante base para la interpretación de la descarboxilación enzimática y, en este sentido, debe indicarse que el piruvato reacciona con tioles para formar mercaptales (161) fácilmente descarboxilables por metales pesados (162). Schellenberger et al.(160)

han demostrado recientemente la formación de un hemiacetal entre la cisteína y el piruvato (R = CH₃)



mientras que, por razones estéricas -según los modelos de Stuart-, el trimetil piruvato (R = C(CH₃)₃) no puede formar-
lo. Esto explicaría el hecho de que dicho compuesto no sea
descarboxilado ni actúe como inhibidor competitivo de la pi-
rúvico descarboxilasa (212). Los resultados de Schellenber-
ger et al. (160) sugieren también que los sitios de enlace
para el coenzima y Mg²⁺ en el apoenzima están inicialmente li-
bres y distantes de los del sustrato (de acuerdo con lo que se
había supuesto partiendo de medidas cinéticas (236), y sola-
mente después de la recombinación para formar el holoenzima
experimenta el apoenzima una reestructuración que sitúa a la
cisteína en el centro activo.

Meyer (154) había apuntado que la función del -SH
en la descarboxilasa era enlazar el apo- y el coenzima, ba-
sándose en la protección de la apo-descarboxilasa (preparada
por lavado alcalino de la levadura) mediante co-descarboxila-
sa frente a los reactivos de los grupos -SH. Los resultados
de Stoppani (158) ni confirman ni desaprueban esta tesis, da-
do que, a pH 6.0, la pirúvico descarboxilasa purificada pare-
ce ser un compuesto no-disociable (90,91), pero, en cualquier
caso, si la co-descarboxilasa, Mg y proteína estuvieran unidos

por un enlace sulfuro, este -SH potencial no habría de ser importante para las propiedades catalíticas de la descarboxilasa en su medio fisiológico, que es aproximadamente pH 6.0-6.3 (163). En desacuerdo con Meyer están, por otra parte, los trabajos de Kanopkaite (159) sobre la protección de la apodescarboxilasa contra el efecto inhibitor de los reactivos del grupo tiol, mediante co-descarboxilasa; dichas experiencias fracasaron, concluyendo sus autores que la co-descarboxilasa y el inhibidor se conjugan con diferentes grupos de la proteína enzimática y, en consecuencia, que los grupos -SH que intervienen en la descarboxilación del ácido pirúvico por descarboxilasa de levadura, pertenecen exclusivamente a la parte proteica (apoenzima) de la molécula enzimática.

Como nuestro objetivo no requiere una exposición completa del coenzima, desde el punto de vista de su naturaleza, distribución, síntesis, valoración, función fisiológica, etc., nos referiremos brevemente a ello, remitiéndonos a las revisiones existentes (165,166) y centrando simplemente nuestro interés en la presentación de la línea evolutiva que han seguido los estudios sobre la participación de este coenzima en los procesos de descarboxilación de los α -cetoácidos, concretamente sobre su participación en el mecanismo de acción de la 2-oxoácido carboxi-liasa o pirúvico descarboxilasa.

Según ya hemos dicho, fue en 1932, con los trabajos de Auhagen (70,71,72) -que demostraron la desaparición de la actividad descarboxilásica de la levadura por lavado alcalino y la recuperación de dicha actividad por adición de los líquidos de lavado o de un extracto de levadura hervida- cuando surgió el interés por el conocimiento de la co-descarboxilasa. Dos eran los factores activos en los extractos añadidos: uno inorgánico y otro orgánico, de naturaleza termostable, que se encontraba tanto en la levadura como en tejidos animales. Este factor orgánico recibió el nombre de "cocarboxilasa" y el primer indicio sobre su composición lo dio Simola (167) al demostrar que las preparaciones de la co-descarboxilasa de Auhagen tenían actividad de vitamina B₁ y que los tejidos de animales alimentados con una dieta carencial de esta vitamina contenían menos co-descarboxilasa que los de aquellos cuya dieta les suministraba un aporte vitamínico adecuado. En 1937, Lohmann y Schuster (73,74) consiguieron aislar la co-descarboxilasa de la

levadura en forma de clorhidrato cristalino y demostraron que era un ester pirofosfórico de la vitamina B₁. Este descubrimiento fue de singular importancia, ya que el trabajo de Peters y colaboradores (168,169) en Oxford había demostrado que la tiamina estaba relacionada con el metabolismo del ác. pirúvico en los tejidos animales. Posteriormente se demostró que el derivado difosforilado era la forma activa de la tiamina, actuando como grupo prostético de los enzimas relacionados con la descarboxilación de α -cetoácidos (170,171,172).

Como hemos visto también, el aislamiento, a partir de la levadura, de la co-descarboxilasa en forma altamente purificada permitió demostrar en 1941 (90,91) que la descarboxilasa pirúvica era un compuesto proteína-difosfotiamina-Mg. La descarboxilasa más pura obtenida por Green, Herbert y Subrahmanyam (91) dio un contenido de 0.46% de pirofosfato de tiamina y 0.13% de Mg (correspondiente a 5 átomos de Mg por molécula de co-descarboxilasa para un peso molecular de 92.000). Kubowitz y Lüttgens (90), sin embargo, hallaron 1 átomo-gramo de Mg por mol de pirofosfato de tiamina para 75.000 de peso molecular. Y recientemente Ullrich, Wittorf y Gubler (97) han publicado un contenido de 3 ó probablemente 4 pirofosfatos de tiamina por mol de enzima (peso molecular = 175.000). Dado el escaso conocimiento que de la fracción proteica existía hace unos años, no debe concederse mucha validez a los valores iniciales sobre el contenido de los componentes de la pirúvico descarboxilasa; los datos obtenidos recientemente por ultracentrifugación ofrecen una mayor garantía.

21121. Mecanismo de acción.

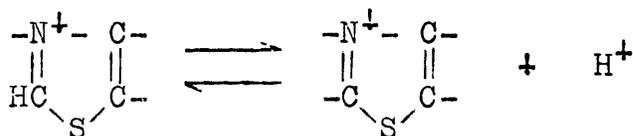
Se ha expuesto un gran número de teorías para explicar el papel catalítico de la tiamina. Suponen, en general, estas teorías que distintos fragmentos de su compleja molécula representan el lugar activo de estas reacciones, habiéndose desplazado el interés de los investigadores desde la fracción pirimidínica del compuesto a la tiazólica con un interés transitorio por el puente de unión metilénico. Son representantes de estas etapas a que acabamos de aludir:

- 1º. Langenbeck (173), con su teoría basada en la formación, descarboxilación e hidrólisis de las bases de Schiff resultantes de la condensación inicial del grupo $-NH_2$ de la pirimidina con el ácido pirúvico. El origen de esta teoría se encuentra en las experiencias realizadas sobre descarboxilación no-enzimática, con modelos amínicos en medios no acuosos, que llevaron a Langenbeck a predecir la naturaleza amínica de la co-descarboxilasa incluso antes de que se reconociese su naturaleza química. Posteriormente, sin embargo, no se ha otorgado validez absoluta a esta teoría, ya que ni la situación electrónica del grupo amino de la pirimidina -de carácter marcadamente inerte debido, sin duda, a fenómenos de resonancia-, ni la estabilidad del α -iminoácido la hacen posible (174,175). Conviene destacar, no obstante, el importante servicio prestado por Langenbeck al demostrar por vez primera la existencia de enlaces atómicos entre el catalizador y el sustrato.

- 2º. Breslow (176), al postular que la reacción de activación podía ser resultado de la ionización del puente metilénico que une los dos fragmentos conjugados de la molécula, y de la condensación posterior del ac. pirúvico con este grupo ionizado. Los estudios de descarboxilación catalizados por tiamina, realizados por Ingrahan y Westheimer(177), (178), con la ayuda de isótopos y que demostraron la ausencia de ionización del puente metilénico, así como los recientes de Schellenberger et al. (179) realizados con análogos, han descartado plenamente esta hipótesis.
- 3º. Karrer (180), Lipmann (181,182), Mizuhara et al. (183,184) y Breslow (185,186,187), con una serie de diferentes teorías que sitúan en el anillo tiazólico el probable centro de la actividad catalítica de la tiamina.

Así, Karrer (180) ha sugerido que la tiamina podía actuar a través del grupo sulfhidrílico libre de su forma abierta, dado que se conocen reacciones de anillo abierto de la tiamina, mientras que Lipmann (181,182), basándose en la observación de que el anillo tiazólico de la co-descarboxilasa podía ser reducido por hidrosulfito, ha admitido la posibilidad de que la difosfotiamina pueda jugar un papel en los procesos de oxido-reducción funcionando como un transportador de electrones. El significado fisiológico de esta reacción no está, sin embargo, completamente claro. Por su parte, Mizuhara et al. (183,184), así como Koffler y Krampitz (188), sugieren un mecanismo basado en la formación de una pseudo-base de tiamina sobre el C₂

de su anillo tiazólico. Confirmaron con sistemas no-enzimáticos, que el acetaldehído no es un intermediario, sino que existe más bien como un aducto con el TPP. Yatco-Manzo et al. (189) han confirmado también estos resultados. Sin embargo, la naturaleza de este aducto no fue conocida, a pesar de los intentos de muchos investigadores por definirla, hasta que Breslow (186), basándose en estudios de intercambio de deuterio, sugirió un nuevo y convincente mecanismo de acción que implicaba la ionización del anillo tiazólico, a través de la pérdida de un protón del C₂, con la consecutiva formación de un "zwitterion"



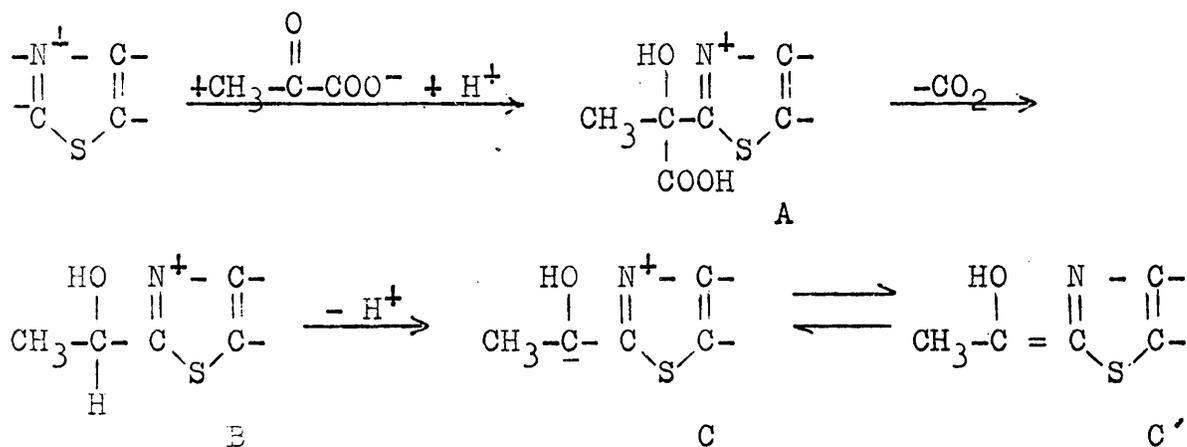
Este "zwitterion" representa la especie catalítica, siendo su posición ionizada el centro reactivo en las interacciones con las moléculas que han de ser transformadas.

Las teorías de Wiesner y Valenta (190) y de Weilmalherbe (191) pueden considerarse basadas en una combinación de los mecanismos de Langenbeck y Breslow, y Langenbeck y Lipmann, respectivamente.

Actualmente parece que el mecanismo propuesto por Breslow y confirmado posteriormente por De Tar y Weistheimer (192) es el más plausible entre los diferentes mecanismos sugeridos. Los argumentos en su favor, dados por el mismo Breslow (186,187), así como por Metzler et al. (189,193,194), y Sykes et al. (195,196), radican, por una parte, en la demos-

tración de la labilidad del hidrógeno del C₂ del anillo tiazólico -por medio de datos de resonancia magnética nuclear e infrarroja y de reacciones de intercambio con D₂O- y, por otra, en el estudio de reacciones apropiadas con compuestos modelos. Asimismo Pullman (197,198), a través del estudio de los niveles de energía y de la distribución electrónica en la tiamina y en un número de compuestos modelos relacionados, considera dicho mecanismo como el más probable. Sus resultados ponen de manifiesto la existencia, incluso en la molécula no-ionizada, de una alta densidad electrónica en el C₂ similar a la de un C acetilénico, situación originada por la fuerte deslocalización del "par solitario" de electrones del átomo de S, a pesar de la proximidad del C₂ al N cuaternario. Este exceso de electrones sobre el C₂ juega un papel importante en la fácil desprotonización de las sales de tiazolio. Pullman et al. (198) concluyen que la alta densidad electrónica sobre el C₂ es una condición esencial para la actividad catalítica de la tiamina, y contrastan su teoría con el examen de la influencia de las modificaciones estructurales de la molécula de tiamina sobre la carga electrónica del fragmento tiazólico y sobre la actividad de la misma. La disminución de la carga electrónica en el C₂ del fragmento tiazólico por fusión de un anillo bencénico al enlace C₄-C₅, la hidrogenación del anillo tiazólico, la sustitución del átomo de S por un átomo de O₂ (cuya mayor electronegatividad hace que el par de electrones solitario participe menos en la configuración del conjunto de electrones π que en el caso del S), o la sustitución del átomo de

S por el doble enlace C-C (que, sin alterar el número de electrones móviles del sistema, produce una modificación de la distribución electrónica, haciendo desaparecer el centro de alta densidad del C₂), dan lugar a una serie de compuestos, los correspondientes derivados de los iones benzotiazol, 2,3-dihidrotiazol, oxazol y de la piritiamina que, a su vez, habían sido confirmados como inhibidores. Por otra parte, la sustitución del hidrógeno en C₂ por otros grupos conduce a la pérdida completa de actividad, excepto para el grupo CH₃-CHOH (precursor inmediato del "acetaldehído activo", HETDP) que presenta una actividad semejante a la de la tiamina (187,199,200). Posteriores investigaciones sobre la detección de los intermediarios reactivos y el análisis de su estructura electrónica, han confirmado una vez más el mecanismo de Breslow. El siguiente esquema representa los aspectos principales del citado mecanismo:



El primer producto de interacción (compuesto A) corresponde al aducto del ácido pirúvico con el TPP, seguido de la descarboxilación a HET (compuesto B). Holzer y Beaucamp (201), uti-

lizando piruvato $1-C^{14}$, pretendieron haber aislado pequeñas cantidades de un derivado de difosfato de tiamina que contenía C^{14} y que consideraban como el aducto del ácido pirúvico en posición 2 del anillo tiazólico del TPP. Sin embargo, Krampitz et al. (202) han intentado su preparación e identificación por varios procedimientos suaves, dada la extrema labilidad del citado aducto, y no han logrado sino resultados negativos. Posteriormente, en el citado esquema, la liberación de un protón del C aldehídico extracíclico del compuesto B da lugar a la formación del "intermediario activo" (compuesto C) estabilizado por resonancia con la estructura canónica C'. La liberación del protón, acompañada de un aumento de energía de resonancia, crea un único sistema conjugado que se extiende sobre toda la periferia molecular. El "intermediario activo" posee entonces, en su C aldehídico, un átomo de extremada reactividad (198). En consecuencia, se combinará con facilidad con un centro deficiente en electrones que dependerá del tipo de reacción catalizada por la tiamina (198). Por su parte, Krampitz et al. (199), así como Carlson y Brown (203) y Holzer et al. (204, 205-207), han confirmado la existencia de una α -hidroxietil sustitución en posición 2, como intermediario activo, tanto en la conversión del piruvato a acetaldehído y CO_2 (por la descarboxilasa del germen de trigo) como en la formación de acetoina del piruvato (por un complejo enzimático del A. aerogens) y en la formación de acetato y CO_2 del piruvato (por una oxidasa pirúvica). Incluso se ha demostrado una α , β -hidroxietil sustitución en las reacciones catalizadas por

transcetolasas. La ruptura de este aducto lleva a la regeneración de la sal de tiazolio, liberando la molécula correspondiente. Krampitz et al. (202) han hecho notar que, en ausencia del enzima, la cantidad de C^{14} -acetaldehído espontáneamente formado del C^{14} -HETDP era despreciable, lo cual indica que el último compuesto es significativamente estable en las condiciones del experimento. Existe, además, una proporcionalidad directa entre la cantidad de descarboxilasa presente y la cantidad de C^{14} -acetaldehído formado del C^{14} -HETDP. Los datos apoyan el punto de vista de que el intercambio del HETDP es extremadamente lento y que la rápida formación inicial de acetaldehído resulta de la asociación del HEDTP con cantidades sustrato del enzima que ha sido separado del TPP.

El problema que se plantea Pullman (198) es cómo el acetaldehído puede ser el producto final de las reacciones de la pirúvico descarboxilasa cuando con otros enzimas pirúvicos el acetaldehído libre no puede ser detectado. Parece poder explicarse esta situación considerando que el grupo hidroxietil en la posición 2 del anillo tiazólico del TPP debe ser un aceptor del piruvato o acetaldehído en el caso de la formación de acetoína, o ser oxidado en el caso de la piruvato oxidasa. En el caso de la pirúvico descarboxilasa, existen pruebas evidentes (202) de que un grupo funcional del enzima se condensa con el grupo hidroxietil, formando un complejo lábil que espontáneamente se descompone en acetaldehído, regenerando el TPP y el grupo funcional del enzima. De acuerdo con este concepto, el mecanismo de acción de la descarboxilasa sería si-

milar al de otros enzimas que requieren TPP como coenzima.

Ahora bien, aunque todos estos resultados confirman la hipótesis de Breslow acerca del papel del anillo tiazólico como centro fundamental de la actividad catalítica, los trabajos de Pullman et al. (198) dejan abierto el siguiente interrogante: ¿por qué las sales de N-bencil tiazolio parecen más activas que las N-metílicas y que las N-fenílicas que han resultado ser prácticamente inactivas, lo mismo que la oxi-tiamina?. Pullman et al. (198) sugieren que, incluso aceptando el mecanismo de Breslow, debe concederse alguna importancia al anillo pirimidínico y al agrupamiento metilénico que lo une al anillo tiazólico. Así, dichos autores han analizado la influencia de las modificaciones introducidas en la fracción pirimidínica de la tiamina sobre la actividad catalítica de esta molécula. La actividad catalítica de la tiamina, aunque está relacionada en primer lugar con su anillo tiazólico, es, sin embargo, realzada por la presencia de la mitad pirimidínica y depende, en gran medida, de las modificaciones que puedan tener lugar en esta parte de la molécula. Sin embargo, los cálculos realizados por Pullman et al. en este sentido no son muy satisfactorios, ya que no les ha sido posible encontrar variaciones en la distribución electrónica de la tiamina con relación a los N-bencil, N-fenil y N-metil derivados, mientras que experimentalmente hay una disminución de la actividad catalítica al pasar de la primera a la última de estas tres moléculas. Breslow (186,187) atribuye estas diferencias de actividad, y especialmente la mayor actividad de los N-bencil

derivados sobre los N-metil, al mayor efecto inductivo del anillo bencílico sobre el grupo metilo. El efecto indudablemente existe y probablemente, como Metzler ha indicado (193, 194), es todavía más pronunciado en la tiamina que en los citados análogos. Sin embargo, la falta de actividad de los N-fenil derivados pone en duda la explicación sugerida. En estos compuestos, en los que no existen carbonos saturados interpuestos entre los dos fragmentos conjugados del sistema, las interacciones electrónicas entre los dos anillos son lo suficientemente fuertes para producir las apreciables modificaciones de carga ya evidentes en los cálculos. Así, en estos compuestos actúan los dos efectos, inductivo y de resonancia, originando una disminución de la carga electrónica del nitrógeno cuaternario y, simultáneamente, un aumento de la carga electrónica del C₂ (con respecto a la tiamina). En estas circunstancias debería esperarse que esta molécula fuera muy activa, lo que está en desacuerdo con los resultados experimentales. Pullman (198) sugirió, como explicación razonable para esta ausencia de actividad, el impedimento estérico experimentado en la posición del C₂ por la proximidad del anillo fenílico, impedimento estérico cuyo importante papel parece evidente después de los estudios de Biggs y Sykes (196). De hecho, no sólo parece muy probable que la mitad pirimidínica ejerza su influencia sobre la actividad catalítica de la tiamina y sus análogos a través de su influencia sobre las propiedades del anillo tiazólico (en virtud de los efectos inductivo y estérico), sino que parece igualmente probable que

este anillo pueda tener una función más independiente y no menos esencial.

Teoría del doble centro.

Como acabamos de exponer, el peso fundamental de las investigaciones sobre el mecanismo de la acción co-des-carboxilásica ha recaído, en los últimos años, sobre la porción tiazólica, ya que, según las investigaciones de Breslow (186,187), la función del sistema de pirimidina venía a concretarse en una influencia inductiva de la actividad (acidez precisa) del enlace C-H fijado en la posición 2; el par de electrones del grupo amino había de desempeñar simplemente el papel de un aceptor de protones y, mediante la formación de un puente de hidrógeno, favorecería la capacidad de separación del protón fijado en 2.

Schellenberger (208,209) destaca, sin embargo, que la teoría sostenida por Breslow no explica el que cualquier modificación de la molécula de tiamina en posición 4' -ya sea en la forma de metilación ($\text{NH}(\text{CH}_3)$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), sustitución por grupos electrónicos afines (OH , SH) o eliminación (H) del grupo amino- lleve siempre consigo una total supresión de la actividad catalítica (a pesar de su carácter fuertemente básico en comparación con la tiamina), junto con una considerable actividad inhibitoria sobre el holofermento natural. Más bien, el hecho de que los derivados de la deamino-tiamina investigados ejerzan todos, en parte, una acción inhibitoria extraordinaria-

mente alta sobre la descarboxilasa hace sospechar que el grupo amino participe directamente en la reacción enzimática. (Schellenberger (209) no acepta la explicación de Metzler(164), según la cual este efecto se basa en un entorpecimiento estérico de la posición 2 del anillo de tiazol).

(Desde este punto de vista cobran de nuevo importancia los trabajos realizados hace más de 30 años por Langenbeck (173) (refutados posteriormente por Stern y Melnick (174)), en los cuales su autor, basándose en ensayos con modelos, postulaba un efecto recíproco del grupo amino con el grupo carbonilo del oxo-ácido. Recientemente, el mismo autor (210), como consecuencia de los estudios sobre el carácter antagonista de los análogos del TPP modificados en 4' citados anteriormente, descartó la posibilidad de que el grupo amino estuviese implicado en la unión del coenzima al apoenzima y sugirió de nuevo el probable papel fundamental que el grupo amino juega en la actividad co-descarboxilásica).

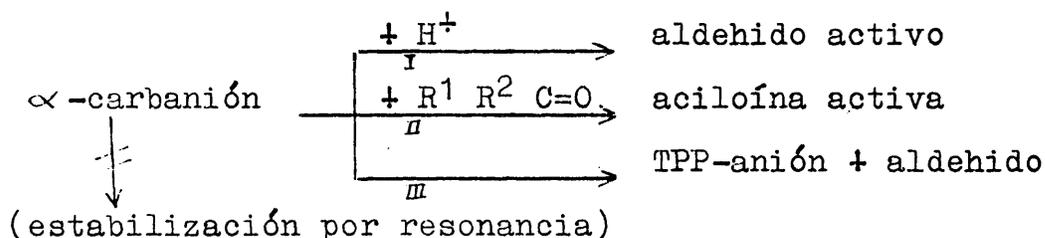
Por otra parte, las investigaciones de Holzer (201, 211) con acetaldehído activo han demostrado que cuando éste se coloca en lugar del TPP disminuye fuertemente la actividad enzimática, y también las de Juni (212) han dado por resultado que el acetaldehído es un fuerte y activo inhibidor pero no un inhibidor competitivo de la reacción de descarboxilación.

Todos estos hechos llevan a formular el mecanismo enzimático sobre la base de la existencia de un doble centro que envuelve tanto el enlace C-H en el carbono 2 del anillo

tiazólico, para la fijación y la descarboxilación del sustrato, como el grupo amino fijado en el carbono 4' de la porción pirimidínica de la molécula de co-descarboxilasa, que actúa como aceptor irreversible del aldehído formado para cederlo después al medio.

Según esto, Schellenberger (213) abordó de nuevo el problema, centrándolo sobre los siguientes aspectos: 1) Estabilidad del enlace activo en el intermediario, y 2) naturaleza de las asociaciones que permiten separar, del enlace activo, la molécula de aldehído ligada.

Respecto a la estabilidad del enlace activo, ha podido comprobarse que es relativamente alta (189,211). Además, al disminuir el pH, aumenta la estabilidad de modo que, en las condiciones óptimas del proceso enzimático (pH=6.2), apenas puede contarse con una descomposición espontánea (213). Según Schellenberger et al. (136), una vez descarboxilado el piruvato, el par de ϵ remanente lleva a un incremento de la estabilidad del enlace activo, oponiéndose así a la subsiguiente liberación del aldehído. Las posibilidades para la estabilización del carbanión son:

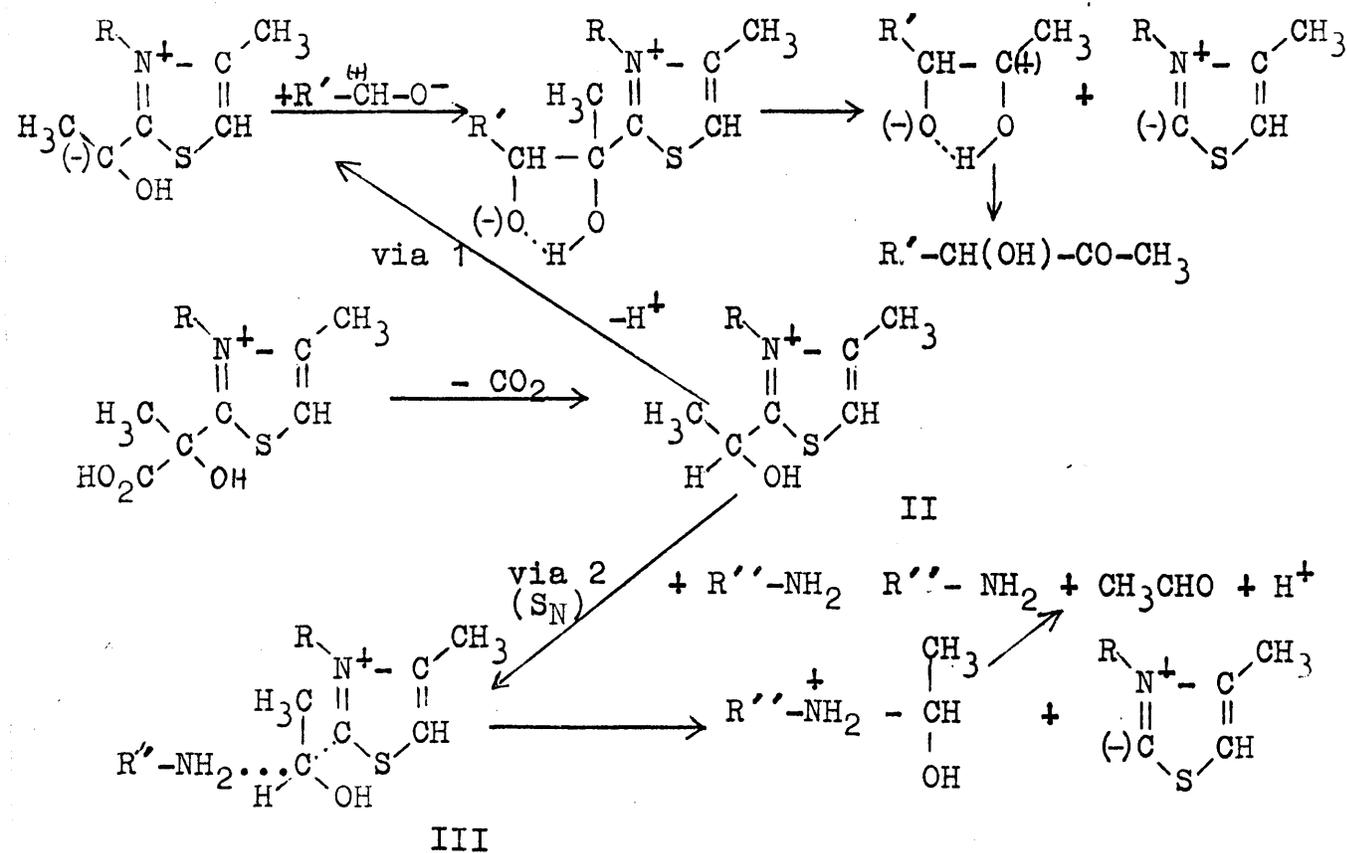


Ahora bien, la estabilización por resonancia, que puede ser considerada como una explicación razonable del bajo rendimien-

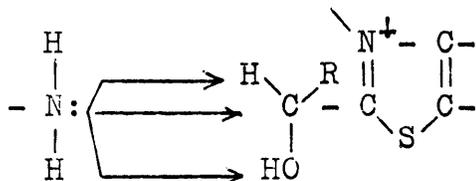
to obtenido con las sales de tiazolio, puede tener lugar tan sólo si los dos residuos (R, OH) que existen sobre el átomo α -C se mantienen en el mismo plano que el anillo de tiazolio. El modelo de Stuart demuestra que, debido a la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo -NH_2 y el hidroxilo, los dos residuos sobre el átomo α -C son prácticamente perpendiculares al plano del anillo tiazólico. Esto limita grandemente la interacción del par de ϵ libre con los electrones π del anillo, y el subsiguiente aumento de estabilidad del enlace activo.

Por otra parte, el enlace α -CH del acetaldehído activo manifiesta un intercambio muy pequeño H-D por debajo de pH 8. Esto sugiere la existencia de una alta basicidad del α -carbanión, que permite suponer que la inmediata reacción sea una protonación con formación del 2-(1-hidroxietil)-TPP, mientras que la condensación con compuestos carbonilos, suplidos por el medio, para dar aciloinas debería ser una reacción lateral insignificante. La ruptura directa del α -carbanión con formación de TPP-anión y aldehído sería concebible sólo si la reacción de protonación se retardase por la existencia de una zona libre de protones (incluso libre de NH, OH etc., dada la alta basicidad del α -carbanión) en el centro activo. Aún así, sería difícil explicar la inhibición por aldehído (que requiere un equilibrio que puede ser influenciado después de la descarboxilación irreversible) y el bloqueo de la liberación de aldehído cuando se emplea como coenzima hidroxil-TPP o cuando el ác. glioxílico es utilizado como sustrato.

Debe, pues, destacarse que mientras que la incorporación del ác. pirúvico en el anillo tiazólico y la subsiguiente descarboxilación tiene lugar con relativa facilidad, la reacción de separación transcurre con mucha lentitud. El mecanismo de eliminación del aldehído pudiera basarse en la fuerte acidificación del enlace "activo" a través del anillo tiazólico, como ya formulara Breslow (vía 1 del esquema (213) que exponemos a continuación). Sin embargo, puede demostrarse que no sólo los compuestos carbonílicos son adecuados para la separación del enlace C-C "activo". También los alcoholes y, fundamentalmente, las aminas (213) pueden, como aceptores, llevar a cabo la escisión del enlace "activo" a través de un mecanismo de separación completamente diferente (vía 2 del mismo esquema (213)).

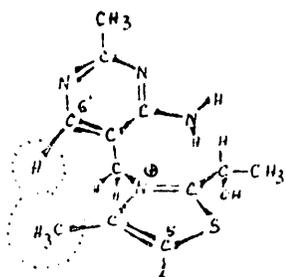


La participación del grupo -NH_2 en la ruptura del enlace del aldehído queda confirmada por el hecho de que ningún análogo modificado en 4' tenga actividad coenzimática. La ruptura del enlace del aldehído activo sólo puede realizarse, sin embargo, - de acuerdo con Schellenberger (136)- si el grupo 4'- NH_2 y el aldehído están en contacto directo. De las tres posibilidades



la interacción del par de ϵ libre del grupo NH_2 con el enlace α - CH muy estable (no existe apenas intercambio H-D a $\text{pH} < 8$) no es probable. También queda descartada, según el modelo de Stuart, la sustitución nucleófila intramolecular (mecanismo S_N), es decir, el contacto directo del par de ϵ con el átomo α - C que lleva una carga parcial positiva, debido a la acción del grupo OH y del anillo tiazólico. El modelo de Stuart demuestra que no es posible una distribución colineal del orbital libre del grupo amino con el enlace activo, como la requerida para reacciones S_N . El ángulo con respecto al eje del enlace activo es $\simeq 80^\circ$. Por otra parte, existen condiciones favorables para una catálisis base intramolecular (contacto directo del par de ϵ con el protón hidroxilo). Si el átomo 6'-H en el modelo atómico es puesto en contacto con el grupo 4'-metil, el grupo 4'- NH_2 y el protón α -hidroxi se aproximan lo suficiente para que pueda tener fácilmente lugar la formación de un enlace hidrógeno.

Plantéase ahora la cuestión de por qué la agrupación 4'-amino pirimidina, inserta en la molécula de tiamina, es insuficiente para promover una ruptura del enlace activo. Schellenberger (213) confirmó que tal proceso sólo puede realizarse con una velocidad medible si la opuesta posición de los dos centros activos permite la transferencia del resto de aldehído del tiazol al resto de pirimidina. El mecanismo de transferencia requiere

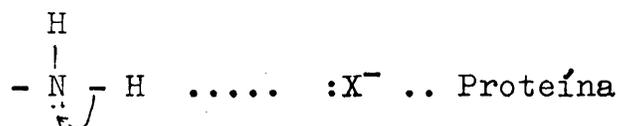


así una extrema aproximación del resto fijado en 2 al grupo 4' amino. Estas condiciones estéricas no se dan de modo manifiesto en la molécula libre de tiamina, pero, sin embargo, pueden establecerse con la oportuna fijación

de los dos planos del anillo orientados por medio del apoenzima, como puede verse en el esquema dado. La dificultad de conseguir esta oportuna fijación mediante la introducción de grupos metilo en posición 6', p.e., con pérdida paralela de la actividad enzimática completa, es una confirmación de ello (214).

Asimismo, del carácter inactivo como coenzima y no inhibidor del 2-metil-tiamin-pirofosfato debe deducirse que también el grupo metilo fijado en posición 2 perturba la adquisición de la conformación requerida entre los dos sistemas de anillos. Estos resultados concuerdan con los de Holzer (201) y Juni (212) mencionados previamente y con los de Schellenberger (213), sobre la falta de actividad enzimática y acción inhibidora, al usar acetaldehído activo como coenzima. Del mismo modo, los factores estéricos juegan un papel decisivo en el caso del N-metil TPP, que debería ejercer al menos la misma

acción que el TPP y que, a su vez, permanece débilmente enlazado al apo-enzima. Esto ha sido considerado por Schellenberger et al. (136) como una prueba del estrecho contacto del grupo NH_2 con la superficie del apo-enzima, lo que parece ser esencial para realizar plenamente la función catálisis-base. Para este tipo de catálisis intramolecular existe, no obstante, una objeción en relación con la basicidad del grupo 4'- NH_2 , grandemente reducida por el anillo pirimidínico. Todo ello sugiere un nuevo punto de vista basado en la existencia de una región adecuada, estérica y químicamente, en el centro de enlace del apo-enzima que forma un enlace de hidrógeno con uno de los H_2 relativamente ácidos del grupo NH_2 , apartando así a este grupo de su posición de resonancia original y haciendo posible el contacto con el protón hidroxilo



Como consecuencia de esta interacción con el apo-enzima, aumenta la basicidad del átomo nitrógeno del grupo 4'- NH_2 y de aquí su actividad catalítica. Al mismo tiempo se aclara el motivo por el que este grupo se hace inactivo si se metila.

21122. Unión con el apoenzima: papel del radical fosfórico.

A pesar de haber sido conocidas, durante muchos años, las interacciones entre fosfatos condensados y proteínas, poco se ha investigado acerca de la naturaleza de dichas interacciones. Es conocido, no obstante, que el ortofosfato inter-

acciona menos fuertemente con la proteína que lo hacen otros iones (Cl^- y NO_3^-), en contraste con la fuerte interacción registrada para los fosfatos condensados, entre los cuales el sistema pirofosfato muestra siempre un fuerte efecto (215).

En el caso de la pirúvico descarboxilasa, esta enzima presenta una especificidad bien definida en relación con la longitud del ligando fosfórico de la molécula de coenzima. Una primera serie de investigaciones (216-220) sobre la actividad co-descarboxilásica de los ésteres fosfóricos de la tiamina dio como resultado que el TPT era también activo como coenzima de la descarboxilasa de levadura. Las investigaciones de De la Fuente (170) y posteriormente las de Rossi-Fanelli et al. (172) y Kiessling (171), con preparaciones de apo-descarboxilasa exentas de fosfatasa, no confirmaron los primeros resultados. (Evidentemente, trabajando con levadura no purificada y en consecuencia rica en fosfatasa, el TPT había de desfosforilarse a co-descarboxilasa y como tal presentar actividad). En ningún caso, el MPT presentó actividad co-descarboxilásica.

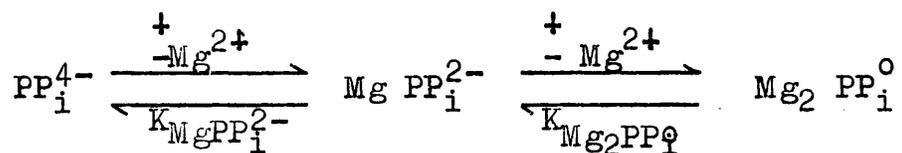
La exigencia de iones metal divalentes en estos sistemas enzimáticos que contienen fosfato, y los resultados cinéticos de algunas de estas reacciones favorables a la existencia de complejos con los iones metálicos sugieren que, probablemente, la influencia de los iones en estos sistemas pudiera tener lugar a través de la formación de complejos entre los derivados fosfóricos y los iones metálicos (221). Por su parte, los iones metal añadidos a una mezcla de reacción, interaccionando

con los componentes de la mezcla, pueden influir sobre la velocidad de la reacción enzimática de muy diversos modos (222). Así por ejemplo, en lo que respecta al papel de los iones metal divalentes esenciales en las reacciones catalizadas por quinasa, -objeto de varios estudios mediante EPR y PRR (223, 224)- se ha concluido que, al menos, pueden aplicarse dos mecanismos, según que los ligandos implicados en los complejos metálicos provengan del derivado fosfórico (creatin quinasa) o, más bien, del propio enzima (piruvato quinasa). Se ha sugerido, también, que la influencia de los iones metal, en sistemas que envuelven grupos fosfato, pudiera tener lugar a través de un cambio de la configuración de las cadenas polifosfato (dependiente de n) que en ciertas reacciones parece estar relacionado, bien con la ruptura de enlaces a través de una inducción electrónica con separación de electrones del núcleo del P, dejándolo más susceptible al ataque nucleofílico por el oxígeno del agua u otros reactivos (225), bien con su participación en la configuración de determinadas estructuras, en las que el complejo metal tenga una conformación que encaje mejor en el sitio activo del enzima (226).

Las desviaciones químicas del espectro de NMR del fósforo en presencia de metales han proporcionado, por su parte, una prueba directa de la naturaleza del complejo formado, permitiendo diferenciar los grupos fosfato específicos que están implicados en los complejos de los metal nucleótidos (227). De las desviaciones químicas de los picos del P se deduce que metales como Mg, Ca y Zn, en concentraciones equi-

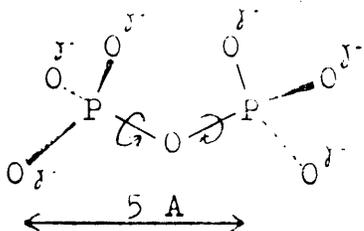
moleculares, forman un complejo predominantemente con los grupos β - y γ - del ATP y con los α - y β - del ADP (lo que explicaría la diferencia en las constantes de estabilidad). Ciertos experimentos parecen indicar la existencia de grupos especializados dentro del centro activo implicado en la interacción del difosfato y el trifosfato de adenina. Partiendo de esta base, el pirofosfato ha sido desde hace largo tiempo considerado como un análogo del ATP, y parece probable que el lugar del enlace del pirofosfato sea idéntico al sitio de interacción con la cadena fosfato del nucleótido (228).

En una solución que contenga Mg y PP_i , Josse (229), por su parte, destaca la existencia de más de una especie iónica compleja, cuyas distribuciones dependen de la relación Mg/ PP_i presente. A elevados pHs, pueden tener lugar las siguientes interacciones (la ionización al estado de PP_i^{4-} es superior al 95% a pH 8.5):

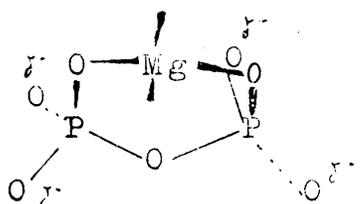


A bajos pHs, los estudios se complican por la presencia adicional de especies protonadas del PP_i (por ejemplo: $H \ PP_i^{3-}$ y $Mg \ H \ PP_i^-$). (En general, los complejos diprotonados del tipo $M \ H_2 \ ATP$ son insignificantes a pHs superiores a 3; los complejos monoprotonados son los más importantes a $pH \ 3.8 \pm 0.5$. En soluciones neutras y alcalinas el complejo $M \ ATP^{2-}$ está presente en cantidades significativas).

De acuerdo con los modelos de Stuart, pueden considerarse las siguientes estructuras específicas de los complejos Mg-PP_i :



El PP_i libre (PP_i^{4-}) posee una cierta libertad rotacional alrededor del enlace pirofosfato P-O-P , aunque sin duda existen conformaciones preferidas, como resultado de la repulsión de cargas y posibles enlaces $d\pi$.

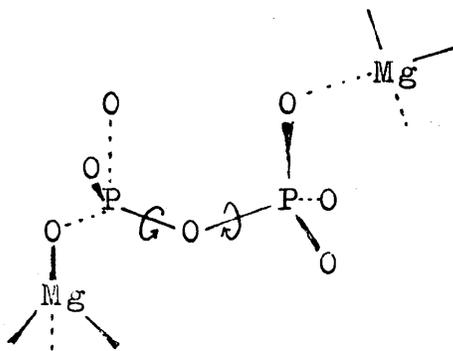


La estructura para el Mg-PP_i^{2-} coloca al ión Mg^{2+} tetraédrico en una posición central doblemente enlazada, cerrando con el PP_i un anillo de seis miembros.

Desgraciadamente, no se han realizado estudios cristalográficos del complejo Mg-PP_i y no hay pruebas de esta configuración; sin embargo, es aceptable teniendo en cuenta:

- a) la alta constante de asociación para el complejo Mg-PP_i^{2-} ($K_{\text{Mg-PP}_i^{2-}} = 10^{5.4}$), tres órdenes de magnitud mayor que la del Mg^{2+} sencillamente enlazado al P_i^{2-} ($K_{\text{Mg-P}_i^{2-}} \approx 10^2$),
- b) la oportunidad de formar un anillo estable. En esta estructura, debido al cierre del anillo, la rotación alrededor del enlace pirofosfato queda muy restringida.

Finalmente, esta estructura es sugerida para el Mg_2PP_i^0 , con desplazamiento del Mg^{2+} central por la llegada del segundo ión y la unión de las dos mitades de Mg^{2+} a fosfatos



opuestos a causa de la repulsión de cargas; es de destacar que el segundo Mg^{2+} se añade al complejo con una constante de asociación $K_{Mg PP_i^0} = 10^{2.3}$, similar a la del enlace univalente del Mg al P_i^{2-} . (El segundo Mg^{2+} no encajará en una posición central y no cerrará un segundo anillo sin introducir una considerable tensión).

De nuevo queda establecida la libertad de rotación alrededor del enlace P-O-P.

Es de observar que, en la interpretación cuantitativa de la formación de estos complejos, se requiere un conocimiento previo de las constantes de estabilidad de tales complejos; no obstante, los valores disponibles suelen ser inciertos, dada la existencia de más de un tipo de complejo en el intervalo de pH estudiado (221).

Por otra parte, Briggs (230) ha sugerido que, en general, los fosfatos condensados interaccionan con los sitios catiónicos de las proteínas, según la ley de acción de masas. Resultados muy recientes de Schellenberger et al. (136) parecen demostrar en este sentido, que el residuo pirofosfato es enlazado al apo-enzima en el equilibrio 1^{ario} sin la ayuda del Me^{2+} (interacción ácido-base), de acuerdo con la independencia de K_{Mg} y K_{TPP} . Esta suposición viene apoyada por el hecho de que la tiamina no fosforilada carece de efecto sobre el equilibrio 1^{ario} TPP-apoenzima, y por el orden de magnitud de $K_{TPP} (\approx 10^{-3})$.

Importancia de los sustituyentes en diferentes posiciones del anillo pirimidínico.

Con los recientes trabajos de Schellenberger sobre el mecanismo de dos centros, la participación del anillo pirimidínico (a través de su grupo -NH_2 en posición 4') de la molécula de co-descarboxilasa ha cobrado de nuevo la importancia señalada por Langenbeck (173,210) incluso antes de conocerse la estructura de este coenzima. (Derivados como el 4'-hidroxi-4'-desamino-TPP, 4'-mercapto-4'-desamino-TPP, N-metil-TPP y N.N.-dimetil-TPP fueron ensayados, poniéndose de manifiesto su capacidad inhibidora decreciente al ser mezclados, en la relación molar 1:1, con el apoenzima (231)). Asimismo, Schellenberger et al. (213,214), a través de derivados en las posiciones 6' y 4, como el 4-nor-TPP, 6'-metil-4-nor-TPP y 6'-metil-TPP, destacaron la importancia de la conformación de los dos planos de la molécula del coenzima, cuya manifiesta afinidad por el apofermento se ve perturbada, en el caso del último homólogo, hasta el extremo de que el mecanismo S_N no puede ya funcionar. La introducción de un metilo en 6' provoca un giro de la molécula alrededor del puente CH_2 , que lleva principalmente a la separación de los centros de reacción pero también a una desviación de los grupos de enlace del coenzima.

Por otra parte, los estudios con análogos permitieron aclarar la probable participación del anillo pirimidínico en la unión con el apoenzima. Verma y Dey (232), a

través de la descarboxilación del ác. pirúvico por levadura lavada previamente con álcali, estudiaron el efecto del reemplazamiento del grupo 2'-metil por otros grupos alquil y aril, sobre la acción activadora de la tiamina. La magnitud de la activación fue influenciada por la naturaleza del sustituyente en posición 2' del anillo de pirimidina. El 2'-etil y el 2'-propil-tiamina se comportaron de modo semejante, con clara acción de cofermentos; el derivado 2'-butil no demostró acción activante, sino, más bien, efectos inhibidores. Este diferente comportamiento de los grupos en posición 2' pudiera ser interpretado a través de la participación del anillo de pirimidina (mediante el enlace de los sustituyentes en posición 2' con la proteína) en la orientación estérica de los dos grupos básicos dentro del mecanismo de descarboxilación enzimática del ác. pirúvico.

Del mismo modo, el estudio de los análogos formados por sustitución del anillo de pirimidina del TPP por un anillo de piridina, ha destacado la importancia, como sitio de enlace, del N en posición 1' (233). El análogo N-1' presenta cierta actividad coenzimática, y, dado que las 4'-NH₂ pirimidinas son preferentemente protonadas en posición 1', puede suponerse que el enlace entre N-1' y el apo-enzima tiene lugar a través del Me²⁺ (136). El N en posición 3', por el contrario, no parece mostrar participación alguna en el mecanismo de acción del TPP (233), así como tampoco parecen ser de importancia las interacciones tautoméricas entre el grupo 4'-NH₂ y el átomo N-3' adyacente. Sin embargo, la estabilidad del enlace entre el co-E y el apo-E es reducida en ausencia del N-3' (136).

21123. Existencia de formas S-S en la pirúvico descarboxilasa.

Utsumi et al. (234) pusieron de manifiesto la existencia de interacciones de las proteínas con la tiamina y sus derivados, mediante la formación de complejos que parecían estar formados por enlaces químicos de los derivados de tiamina con los grupos -SH de la proteína en la forma de proteína-S-S-tiamina. El carácter inhibitorio de los reactivos detectores de los grupos -SH (91,95,111,112) sobre la actividad de la pirúvico descarboxilasa apuntaba también a la posible participación de dichos grupos como puentes de unión. Sin embargo, las evidencias anteriormente presentadas sobre el papel de los grupos -SH de la apo-descarboxilasa descartan la posibilidad de atribuir al -SH la función de puente con el coenzima.

Por su parte, Hamamoto y Yamanouchi (235), en un estudio polarográfico sobre derivados de tiamina en tampón $\text{COCl}_2\text{-NH}_3$, encontraron que dichos compuestos presentaban un comportamiento muy similar al de la cistina. La altura de sus ondas catalíticas era proporcional a la concentración, en un intervalo de 0.2 a $3.3 \cdot 10^{-4}\text{M}$, y aproximadamente el 0.01 del valor de la cistina, a la concentración correspondiente. Puesto que otros compuestos con estructura de pirimidina y tiazol no mostraban ondas similares, concluyeron la existencia de un tipo disulfuro de la vitamina B_1 , que resultó estar presente tanto en la vitamina B_1 natural y sintética como en la co-descarboxilasa, que permitiría pensar en una agrupación -a través de puentes S-S entre sus anillos tiazólicos- de las cuatro (?) moléculas de TPP por mol de proteína, señaladas por Ulrich (97).

2113. Otros requisitos: ión divalente.

En 1932, Auhagen (70-72) encontró por vez primera que la descarboxilasa precisaba, para ser activa, dos factores: un componente termostable de naturaleza orgánica, al que denominó "cocarboxilasa", y un ión metal, Mg. Posteriores investigaciones de Green et al. (91), con la pirúvico descarboxilasa en forma altamente purificada, han dado una proporción de 0.46% y 0.13% de pirofosfato de tiamina y Mg respectivamente, correspondiente a 5 átomos de Mg por molécula de co-descarboxilasa, para un peso molecular de 92.000, en desacuerdo con los resultados publicados simultáneamente por Kubowitz y Lüttgens (90), los cuales encontraron 1 átomo-gr. de Mg por mol de pirofosfato de tiamina para un peso molecular de 75.000. Los recientes resultados de Uirich et al. (97) indican, por su parte, un peso molecular de 175.000 y un contenido de 3 ó probablemente 4 pirofosfatos de tiamina y iones Mg por mol de enzima, según ya hemos expuesto.

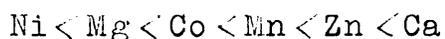
Green et al. (91) pusieron, además, de manifiesto que el ión Mg podía ser sustituido por la siguiente serie de metales, en orden decreciente de efectividad:

Mg, Mn, Co, Cd, Zn, Ca, Fe

El Mn produce, en ocasiones, una mayor reactivación que el Mg. Los cationes trivalentes, como el Al y el Fe, por el contrario, no ejercen prácticamente efecto alguno. (Es importante destacar, según ha observado Kossel (112), la posibilidad de que se produzcan efectos secundarios, debidos a la activación de in-

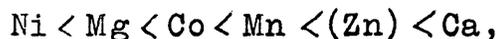
hibidores o a la protección del enzima contra ellos, cuando la acción de los cationes se estudia sobre descarboxilasa no purificada).

Recientemente, los estudios realizados por Schellenberger et al. (126,127) han puesto de manifiesto la falta de especificidad de metal de este enzima. En el estudio realizado por estos autores, acerca del influjo de los iones metálicos sobre el equilibrio de recombinación y la velocidad estacionaria de la descarboxilación pirúvica, a pH, T y concentración de metal determinados, se obtuvieron una serie de curvas que, en cada caso, se componen de dos segmentos característicos. En la primera fase de la transformación (fase de recombinación) aumenta continuamente la velocidad de reacción hasta que alcanza su valor final, que en la segunda fase (fase estacionaria) permanece constante. Mientras que la duración de la fase de recombinación depende de la clase de ión metálico introducido, el estado estacionario es independiente en gran medida de la clase de ión añadido. Estas velocidades de recombinación permiten establecer un paralelo con los resultados de Eigen (11), el cual halló que la velocidad de formación del complejo depende de la velocidad de sustitución de las moléculas de hidrato, agrupadas en torno al ión metálico, por los grupos donadores complejantes. Así, no depende, en considerable medida, de la estabilidad del complejo formado y crece, en general, en la serie:



Como la serie hallada por Schellenberger, teniendo en cuenta

la velocidad de recombinación,



es idéntica a la de Eigen, el valor de k_{+1} quedó fijado a través de la cinética de formación del complejo metálico. Por el contrario, la velocidad estacionaria de la reacción total es prácticamente independiente de la clase de ión metálico complejante y de la estabilidad del complejo formado. Así se observó que los iones metálicos como el Ca, Mg, Mn y Co, que tan fuertemente se diferencian en cuanto a poder de formación del complejo y electronegatividad, dan todos lugar, en estado de saturación, a la misma actividad enzimática. Una función esencial del ión metálico consistiría, pues, simplemente, en servir de mediador en la colocación, estéricamente muy definida, de la molécula del coenzima en el centro activo del apoenzima.

Muy recientemente Schellenberger et al. (236) han observado que la influencia del metal (Mg^{2+}) así como del TPP, en la reconstitución del enzima, tiene lugar a través de la formación rápida y reversible de un complejo binario con el apoenzima, siendo las correspondientes constantes de equilibrio independientes de la presencia de cualquier otro componente. El paso limitante de la velocidad es la formación irreversible del complejo ternario estable, que resulta favorecido por la presencia de piruvato; en este proceso el TPP y el Mg^{2+} , que estaban enlazados débilmente al apoenzima, se combinan cerrando un anillo, para dar lugar al holoenzima funcional, en el que la adecuada ordenación de los dos anillos de la molécula de coenzima viene determinada por la influen-

cia del apoenzima. Para la firme combinación del Mg^{2+} al apoenzima, así como para el enlace estable del apoenzima al coenzima, se requiere la presencia de TPP y Mg, respectivamente, si bien no ha podido detectarse ningún enlace coordinado estable entre TPP y Mg, por lo que el complejo holoenzima, termodinámicamente estable, puede ser formado únicamente por la participación simultánea de los 3 componentes. La "quasi irreversibilidad" de la formación del holoenzima puede así ser explicada como un equilibrio controlado cinéticamente entre el complejo "ciclizable" y el complejo holoenzima ciclizado, siendo los dos equilibrios primarios (K_{Mg} y K_{TPP}) los determinantes de la concentración del complejo ternario (136).

(En una breve comunicación anterior (126), estos mismos autores habían tratado de establecer como posible función de los iones metálicos, su influencia sobre el incremento de la acidez en el C_2 , señalada por Breslow, y, partiendo de algunos estudios sobre el influjo de los iones metálicos en la velocidad del intercambio D-H, llegaron a sugerir la participación directa del ión metálico en el mecanismo de descarboxilación. Ambas sugerencias no pudieron ser demostradas (213), no existiendo por tanto base alguna para atribuir al ión metálico otra participación en el mecanismo de fermentación fuera de su inespecífica función vinculante).

Objetivo de la tesis.

Una vez expuesto el esquema teórico sobre el que fundamentaremos nuestros resultados y, como preámbulo a la parte experimental, creemos conveniente resumir la línea de nuestra investigación.

Nuestro punto de partida arranca de ciertos ensayos previos en los que habíamos podido observar que no todos los metales se comportan de análoga manera en la acción de la 2-oxoácido carboxi-liasa o pirúvico descarboxilasa sobre el piruvato (en aparente desacuerdo con la inespecificidad de metal manifestada posteriormente por Schellenberger). En consecuencia, y como objetivo fundamental de nuestra tesis, decidimos abordar el estudio del efecto de una serie de diferentes metales (a través de variaciones en la concentración de los mismos y en los pHs de las mezclas de recombinación) sobre apo-descarboxilasa de gran pureza, sensibilidad y actividad reproducible, con el fin de investigar el paralelismo existente entre los parámetros que caracterizan fundamentalmente a los metales estudiados y la especificidad hacia los metales manifestada por la pirúvico descarboxilasa.

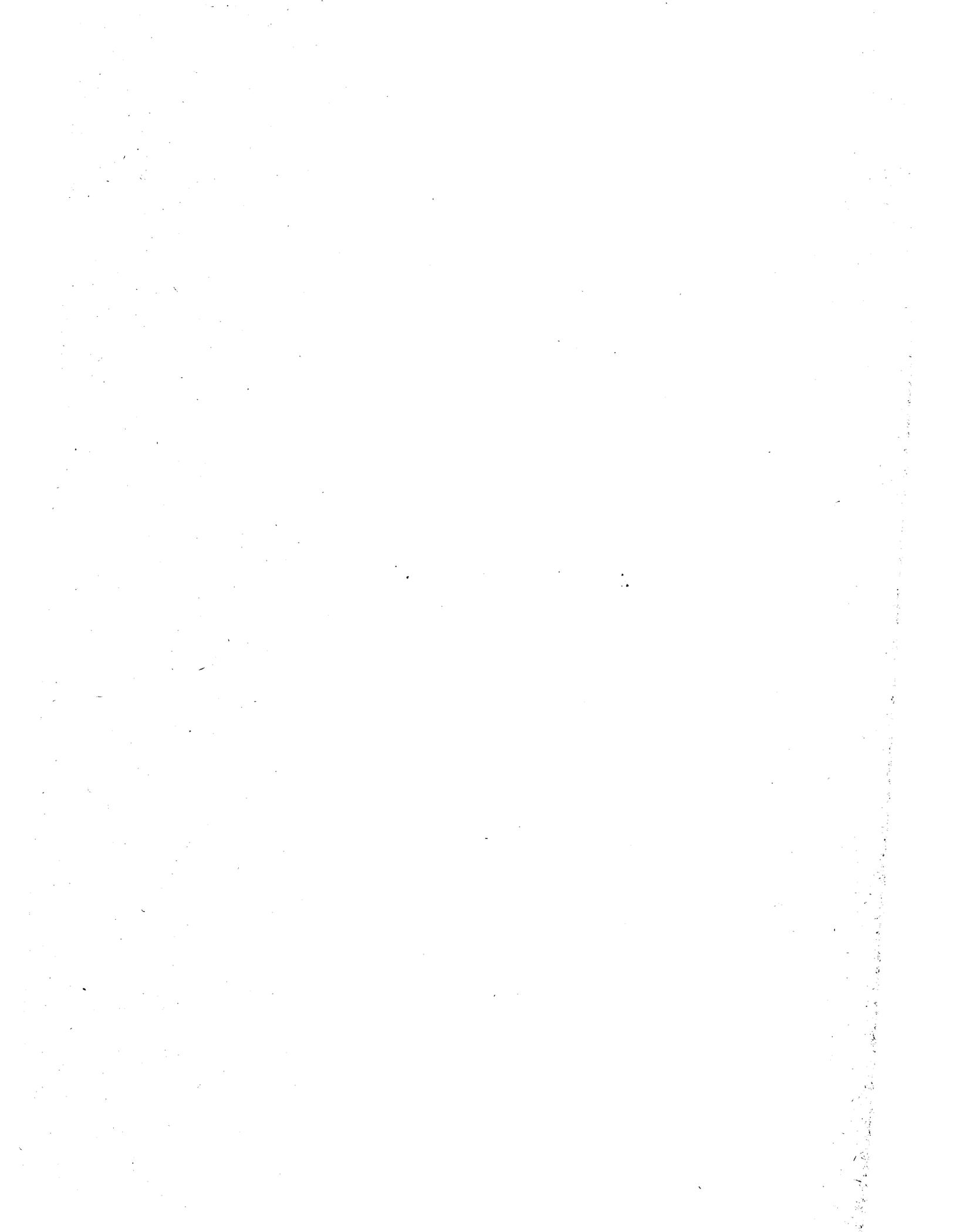
Este estudio presentaba, sin embargo, una gran dificultad experimental inicial, ya que requería no sólo un perfecto control de las condiciones del complejo medio reactivo, sino también una gran pureza de los componentes del sistema enzimático. Por ello, en primer lugar, la tesis recoge la puesta a punto de un método propio de preparación de apo-

descarboxilasa, cuya eficacia queda confirmada plenamente a través del detallado estudio realizado sobre las condiciones óptimas de preparación de dicha apo-descarboxilasa.

Por su parte, debido a las peculiaridades de la técnica por nosotros utilizada (técnica manométrica de Warburg), nuestro estudio -a nivel de desprendimiento de CO_2 - se centra sobre las tres primeras fases del esquema de descarboxilación de α -cetoácidos (considerando la recombinación en su fase estacionaria), concretamente en la fase de enlace del sustrato. En dicha fase, la posibilidad de manejar amplios intervalos de concentraciones del ión metal habría de permitirnos poner de manifiesto un nuevo aspecto de la interacción metal-proteína en la pirúvico descarboxilasa: el de bloqueador de grupos $-\text{SH}$, esenciales para la fijación del sustrato. (Como veremos en la discusión, nuestros resultados ponen de manifiesto una doble interacción metal-proteína. No se trata de un efecto primario sobre las propiedades del metal -por no tratarse de un metaloenzima verdadero- sino de una cooperación del metal y la proteína en la orientación correcta de los grupos catalíticos pertenecientes al coenzima, por una parte, y de un efecto primario sobre las características de la proteína enzimática al ser bloqueados grupos $-\text{SH}$ fundamentales, por otra. Se han fijado, como factores decisivos de la doble interacción, la velocidad de sustitución de las moléculas de H_2O de la cubierta de hidratación de los metales, por los ligandos, y la estabilidad de los compuestos con los grupos $-\text{SH}$, respectivamente).

Al mismo tiempo, al utilizar intervalos de concentración de metal que incluían fundamentalmente valores de concentración que resultaron superiores a los máximos posteriormente utilizados por Schellenberger en sus determinaciones espectrofotométricas, nuestro trabajo habría de proporcionar la base para explicar la aparente disparidad de resultados a que aludimos anteriormente, completando -a la vez que poniendo de manifiesto sus límites- el estudio del mencionado autor.

II. PARTE EXPERIMENTAL



1. MATERIAL

Se describen a continuación los principales aparatos y productos que fueron empleados en la realización del presente trabajo:

11. APARATOS:

Respirómetro de Warburg, modelo SL 65 de la firma Braum Melsungen.

pHmetro Radiometer, modelo 22.

Centrífuga Magnum MSE (velocidad máxima: 3,500 rev./min; capacidad máxima: 1,500 cc.) y MSE refrigerada (velocidad máxima: 13,000 rev./min.; capacidad máxima: 400 cc.).

Disgregador mecánico, accionado a mano, para la pulverización de la levadura.

Balanzas de precisión.

Fotocolorímetro Klett Summerson.

Baño María "Pearson".

Cámara fría (+2 -2 °C).

12. PRODUCTOS:

Levadura de cerveza de la fábrica "Mahou".

Tampón fosfato M/15 y M/2, pH 7.2 (tablas incluidas en "Methods in Enzymology", ed. por S.P.Colowick y N.O.Kaplan, tomo I, pag. 143), a partir de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (BDH), $P_m = 156,03$ y $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $P_m = 358,13$.

Tampón citrato 0.04M, pH 6 (tablas incluidas en "Methods in Enzymology", ed. por S.P.Colowick y N.O.Kaplan, tomo I, pag. 140)

a partir de ácido cítrico + H₂O (BDH), P_m = 210,15 y citrato sódico + 2 H₂O (BDH), P_m = 294,11.

Tampón maleato preparado a partir de las soluciones:

I. Maleato monosódico: 1.16 gs. de ácido maleico (Schuchardt) disueltos en 100 cc. de NaOH 0,1N.

II. Maleato disódico: 1.16 gs. de ácido maleico (Schuchardt) disueltos en 100 cc. de NaOH 0,2N.

(Normalmente se han utilizado estas soluciones a molaridad doble (d.m.)).

Los pHs de las diferentes mezclas de las dos soluciones constituyentes del tampón son recogidos en la tabla y figura siguientes:

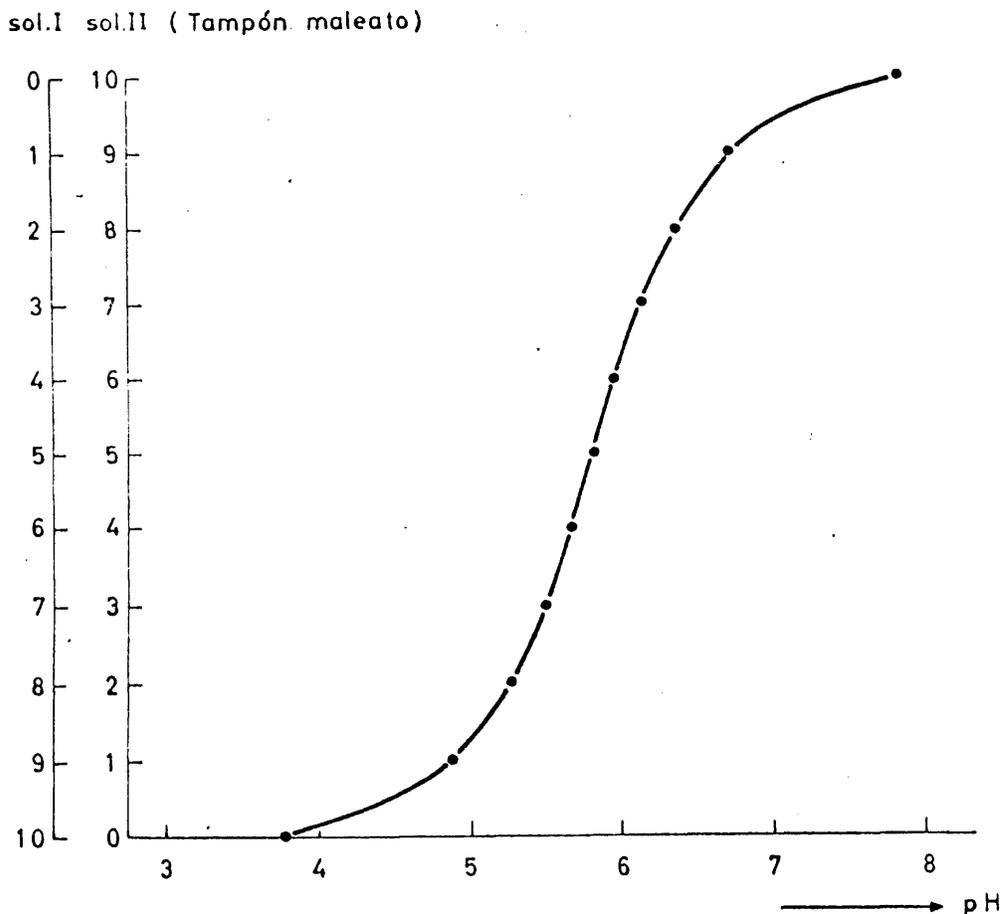
ml. de sol.I	ml. de sol.II	pM T.M. (normal)	pH T.M. (especial)
0,0	10,0	7,84	7,8
1,0	9,0	6,72	6,36
2,0	8,0	6,39	5,95
3,0	7,0	6,16	5,62
4,0	6,0	5,99	5,21
5,0	5,0	5,83	4,16
6,0	4,0	5,67	2,46
7,0	3,0	5,50	2,02
8,0	2,0	5,26	1,72
9,0	1,0	4,89	1,46
10,0	0,0	3,82	1,23

La solución I utilizada en este caso fue previamente ajustada a un pH = 1,2 (ó 1,7 en los experimentos de recombinación con el ión Mg).

Seleccionamos este tampón, en las investigaciones sobre la influencia de los iones metales, dadas sus características, estudiadas por Smits:

1. Capacidad tamponadora suficiente en el intervalo 5 a 7.

2. No formar precipitados con los iones divalentes: Mg, Mn, Co, Zn, Cu, etc.
3. No afectar a la tiamina y su ester difosfórico.
4. No influir en la actividad descarboxilásica de las preparaciones de levadura.



Solución de acetato cálcico M, a partir de acetato cálcico (Probus), $P_m = 158.16$.

Solución de fosfato sódico dibásico 0.5M, a partir de $PO_4HNa_2 \cdot 12 H_2O$ (Merck), $P_m = 358.13$.

Solución concentrada de NaOH (saturada a 0 °C), a partir de

NaOH (Merck): 40 gs. de NaOH más 100 cc. de H₂O destilada.

Solución de EDTA, a partir de Titriplex III (ácido etilén diamino tetracético, sal disódica) (Analema), P_m = 336,22. Se preparan disoluciones a distintas concentraciones, en diferentes soluciones alcalinas y en tampón maleato, a distintos pHs.

(Se detalla en su lugar oportuno).

Soluciones de iones metal, a partir de los sulfatos correspondientes (Merck), a distintas concentraciones y en tampón maleato de distintos pHs. (Se detalla en su lugar oportuno).

Solución de DPT (200 γ /cc.) en tampón maleato (d.m.) 0:10, a partir de cocarboxilasa Alter, P_m = 478,79 (pH=7,65).

Solución de piruvato sódico M, a partir de piruvato sódico (Merck), por disolución en tampón maleato, a distintos pHs.

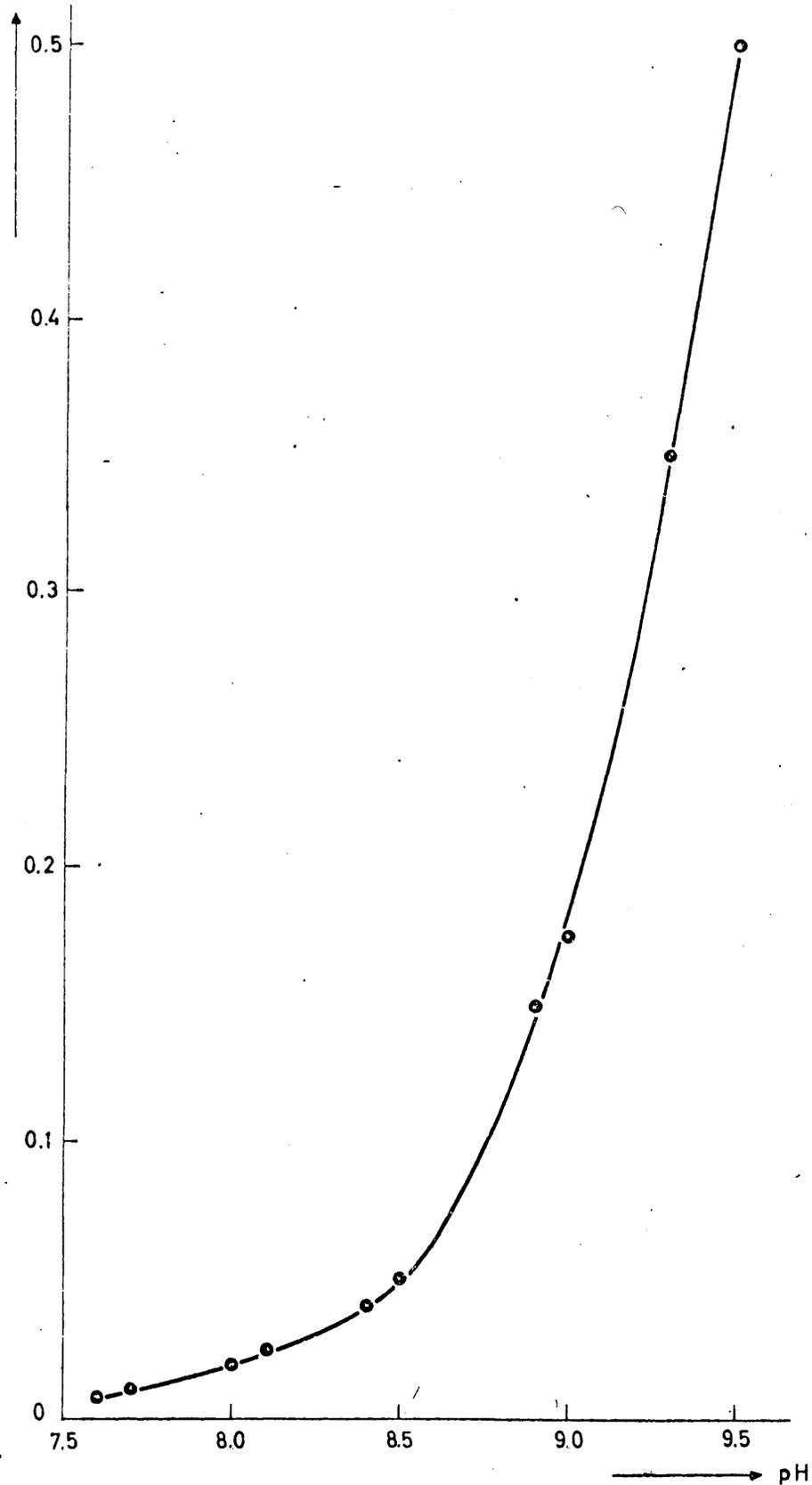
Solución saturada de sulfato amónico (tablas incluidas en "Methods in Enzymology", ed. por S.P.Colowick y N.O.Kaplan, tomo I, pag. 76). 767 gs. de s.a. y 1l. de H₂O destilada (pH=5,1).

Solución saturada de sulfato amónico a diferentes pHs :

pH	cc. de NaOH conc. añadidos a 2,3 cc. de sol.sat. de s.a.
9.5	0.5
9.3	0.35
9.0	0.175
8.9	0.15
8.5	0.05
8.4	0.04
8.1	0.025
8.0	0.02
7.7	0.01
7.6	0.075

Solución saturada de sulfato amónico a diferentes pH

c.c NaOH conc.



cc. de sol. conc. de NaOH, añadidos a 2.3 cc. de sol.sat. de s.a., en función del pH resultante.

2. METODO

21. Determinación manométrica de la actividad descarboxilásica.

Fundamento.

Una propiedad fundamental de los sistemas enzimáticos es que la velocidad de la reacción catalizada por ellos depende de las características físico-químicas del medio en que actúan, es decir: el pH, la temperatura, las concentraciones del sustrato y las del inhibidor, etc. Para estudiar la influencia de cada uno de estos factores sobre la reacción, será preciso fijar, lo más exactamente posible, las condiciones de los restantes.

El principio fundamental de la técnica manométrica, para la determinación de los cambios gaseosos producidos por reacciones químico-biológicas, estriba en que "si a temperatura constante se mantiene invariable el volumen que ocupa un gas, las modificaciones cuantitativas que experimenta el referido gas pueden ser medidas por los correspondientes cambios de presión".

Si representamos por X la cantidad de gas producido, por h las variaciones de las lecturas en la rama abierta del manómetro, y por K_v la constante del vaso, se verificará que

$$X = h \cdot K_v$$

La constante del vaso se define como el factor de calibración del sistema manométrico que, de los cambios de presión observados, permite deducir, en mm^3 o microlitros, $\mu\text{l.}$, la cantidad de gas consumido o desprendido, reducida a condiciones normales de presión y de temperatura (0 °C y 760 mm).

22. Determinación de la K_v .

Aplicando la ecuación general de los gases al gas desprendido o absorbido en el vaso de reacción, se deduce:

$$K_v = \frac{V_g \frac{273}{T} + V_l \cdot a'}{P_o}$$

V_g : vol. gaseoso del vaso de reacción y de los tubos de conexión hasta el punto cero (15cm.) en el manómetro cerrado.

V_l : vol. del líquido en el vaso.

a' : solubilidad del gas en ml./ml., a una atmósfera de presión parcial; su valor viene dado por la expresión

$$\frac{a'}{a} = [\text{antilog.}(\text{pH} - 6.343)] + 1$$

siendo $a = 0.665$, a 30 °C.

$$P_o = 760. \frac{13.56}{1.033} \quad \left\{ \begin{array}{l} \text{(densidad del mercurio)} \\ \text{(densidad del líquido manométrico)} \end{array} \right.$$

De los numerosos métodos existentes para la determinación del volumen exacto del vaso, nosotros hemos elegido el empleado por Krebs, que, en esencia, consiste en llenar el vaso y los tubos de conexión, hasta el punto cero, con mercurio puro, recoger todo este mercurio y pesarlo con precisión. Dividiendo el peso del Hg por su densidad, a la temperatura uniforme a que se opera, el cociente, disminuido en el volumen del líquido en el vaso (V_l), es el V_g . Substituyendo este valor en la fórmula anteriormente transcrita, cuyos restantes factores son conocidos, queda determinada la constante del vaso para el manómetro utilizado en su determinación.

23. Termobarómetro.

En el cálculo de la constante de vaso, K_v , se considera constante el valor de la presión atmosférica. Sin embargo, la presión en el recinto del laboratorio y la temperatura del baño sufren inevitablemente algunas variaciones, que dan lugar a alteraciones en las medidas manométricas no debidas a las reacciones enzimáticas, si bien dentro de límites restringidos por las condiciones en que se procura operar. Para observar y corregir estas alteraciones, se utiliza un manómetro unido a su correspondiente vaso (termobarómetro), que se somete a las mismas manipulaciones que los demás, sustituyendo el líquido reaccionante por un volumen igual de agua.

Para determinar las desviaciones verdaderas de los manómetros problemas, a las lecturas de éstos, expresadas en microlitros, se restarán o sumarán las disminuciones o aumentos que sufra el termobarómetro.

24. Condiciones de la determinación manométrica.

Temperatura del termostato: 30 °C.

Tiempo de equilibrio de la temperatura en el interior del vaso, una vez introducido en el termostato: 15 minutos.

Amplitud y frecuencia de oscilación durante el equilibrio de la temperatura: 2 y 100, respectivamente.

Amplitud y frecuencia de oscilación durante el desprendimiento del CO_2 : 3.5 y 1,500, respectivamente.

Lectura inicial (tiempo cero): a los tres minutos de añadido

el sustrato.

Lecturas durante 10 minutos, en un orden fijo, de modo que el intervalo de tiempo que media entre dos consecutivas en un mismo manómetro sea de dos minutos.

Volumen total de reacción: 3.5 ml.

25. Determinación de la velocidad inicial de descarboxilación.

La determinación de la velocidad inicial de descarboxilación se realiza del modo siguiente:

1º. A las lecturas manométricas, que son mm. de presión del líquido de Brodie, se les restan las lecturas iniciales (las hechas en el tiempo cero).

2º. Estas cantidades se llevan al eje de ordenadas de un sistema de coordenadas cartesianas, en cuyo eje de abscisas se representan los tiempos correspondientes a ellas.

3º. Se traza una recta ideal que, pasando por el origen, comprenda mejor a los tres o cuatro primeros puntos, y cuya pendiente representa la velocidad de reacción por unidad de tiempo en las concentraciones iniciales de las sustancias reaccionantes.

4º. La pendiente de la recta se transforma en mm. de presión del líquido de Brodie/hora y ml. Multiplicando este valor por la correspondiente constante de vaso y corrigiendo las variaciones sufridas por el termobarómetro (expresadas, también, en microlitros), se obtiene la velocidad en $\mu\text{l. de CO}_2/\text{hora}$ y ml.

3. RESULTADOS

31. Pirúvico descarboxilasa: Purificación.

La levadura de cerveza seca que se encuentra en el comercio no es, por lo general, apropiada como material de partida para la preparación de pirúvico descarboxilasa purificada. Temperaturas de secado superiores a 40 °C, o periodos de conservación demasiado largos, hacen que a menudo la proteína enzimática se muestre inactiva. Es recomendable, por tanto, el uso de levadura de cerveza fresca, que ha de ser sometida inmediatamente al procedimiento de purificación.

En este trabajo se ha utilizado levadura de cerveza de la fábrica "Mahou".

Esquemáticamente exponemos a continuación el método de preparación utilizado (método de Green modificado por De la Fuente) que subdividimos en tres partes, para que pueda seguirse con mayor claridad la marcha del proceso:

- A) Preparación de levadura en polvo
- B) Preparación del extracto de levadura
- C) Fraccionamiento proteico

A) Preparación de levadura en polvo

Fase I	Lavado	1 vol. de levadura de cerveza + 5 vol. de H ₂ O destilada	Mezclar bien	Filtrar en buchner a través de lienzo nuevo, no muy tupido y con suave succión.
Fase II	Autolisis	Extender la levadura lavada en capas de 1cm. de espesor.	Dejar secar lentamente (8-12 días) en corriente de aire y a temperatura ambiente, ya que entonces la levadura experimenta un proceso de autolisis que deteriora las membranas lo suficiente para permitir la salida del contenido celular soluble.	
Fase III	Conservación	Triturar la levadura seca hasta polvo fino.	Guardar en lugar fresco y seco y sin taponar herméticamente.	

B) Preparación del extracto de levadura

<p>Incubación</p>	<p>1 parte de levadura en polvo (150 gs.) + 3 partes de T. fosfato M/15 pH=7.2 (450cc.)</p>	<p>Incubar 1 hora a 37 °C</p>	
<p>Aumento del coeficiente de reparto en la distribución del contenido de las células, a favor de la solución acuosa.</p>	<p>Añadir 4 partes de H₂O destilada (600cc.)</p>	<p>Mezclar bien</p>	<p>Centrifugar 1/4 de hora, a 3,500 rev./min.</p>
<p>Clarificación del sobrenadante mediante adsorción, a través de gel de fosfato Ca, de las partículas en suspensión no separadas en la centrifugación anterior.</p>	<p>Añadir 4/5 partes de T. fosfato M/2 pH=7.2 (120cc.), y 2/5 partes de acetato cálcico M (60cc.)</p>	<p>Mezclar bien</p>	<p>Centrifugar 1/4 de hora, a 3,500 rev./min.</p>

Fase IV

Fase V

Fase VI

C) Fraccionamiento proteico

Fase VII	Separación, en el extracto, de las proteínas que precipitan en un medio de s.a. al 61% de saturación.	Añadir, poco a poco y agitando, 40 gs. de s.a. sólido por cada 100cc de líquido.	Llevar 1/2 hora al congelador	Centrifugar 1 hora a 3,500 rev/min y tirar el líquido.	Disolver el precipitado en 3 partes de T.citrato 0.04M pH=6 (450cc.)	Medir volumen (Vol.=485cc) Δ vol.=35cc saturación=5%.
Fase VIII	Reprecipitación al 62% de saturación de las proteínas separadas en la fase anterior.	Añadir, poco a poco y agitando, 38 gs. de s.a. por cada 100cc. de líquido.	Llevar 1/2 hora al congelador	Centrifugar 1 hora a 3,500 rev/min y tirar el líquido.	Disolver el precipitado en 7/5 partes de T.citrato 0.04M pH=6 (210 cc.)	Medir volumen (Vol.=240cc) Δ vol.=30cc saturación=9%.
Fase IX	Eliminación de las proteínas que precipitan en un medio de s.a. al 41% de saturación.	Añadir, poco a poco y agitando, 54cc. de sol.sat.de s.a por cada 100cc de líquido.	Llevar 1 hora al congelador	Centrifugar 1/2 hora a 4,000 rev/min y tirar el precipitado.		Medir volumen (Vol.=335cc)

.....

C) Fraccionamiento proteico (continuación)

Fase X	Separación de las proteínas que precipitan en un medio de s.a. al 56% de saturación.	Añadir, poco a poco y agitando, 35cc. de sol.sat. de s.a. por cada 100cc. de líquido.	Llevar 1 hora al congelador.	Centrifugar 1/2 hora a 4.000 rev/min y tirar el líquido.	Disolver el precipitado en 3/5 partes de T.citrato 0.04M pH=6 (90 cc.)	Medir volumen (Vol.=105cc) A vol.=15cc saturación=9%.
Fase XI	Eliminación de las proteínas que precipitan en un medio de s.a. al 46% de saturación.	Añadir, poco a poco y agitando, 68 cc. de sol.sat. de s.a. por cada 100cc. de líquido.	Llevar 1 hora al congelador.	Centrifugar 1/2 hora a 4.000 rev/min y tirar el precipitado.		Medir volumen (Vol.=164cc)
Fase XII	Separación de las proteínas que precipitan en un medio de s.a. al 52% de saturación.	Añadir, poco a poco y agitando, 13 cc. de sol.sat. de s.a. por cada 100cc. de líquido.	Llevar 1 hora al congelador.	Centrifugar 1/2 hora a 4.000 rev/min y tirar el líquido.	Suspender el precipitado en mezcla 50% de sol.	

Nota. Para determinar los % de saturación en que se separan las distintas fracciones proteicas, se han utilizado las tablas correspondientes incluidas en los "Methods in Enzymology" (tomo I, pag. 76, ed. por S.P. Colowick y N.O. Kaplan), teniendo, además, en cuenta que:

$$\text{cc. sol.sat. de s.a. a añadir} = \frac{V (S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

V = volumen inicial

S₂ = grado de saturación deseado

S₁ = grado de saturación preexistente

Por otra parte, se ha aceptado la hipótesis de que la solución resultante de la disolución de los precipitados proteicos contiene el sulfato amónico que corresponde a un volumen igual al incremento de volumen experimentado por la solución disolvente, en el % de saturación en que ha tenido lugar la precipitación.

Con fines de conservación, suspendemos inicialmente la preparación enzimática (fracción proteica separada entre el 46 y el 52% de saturación) en un volumen pequeño de solución semisaturada de sulfato amónico en tampón citrato 0.04M, pH=6, (relación 3:1), haciéndose todas las semanas diluciones (1cc. → 4cc.) con la misma solución semisaturada.

Hemos podido comprobar que, en estas condiciones, la actividad enzimática y su correspondiente actividad máxima no varían de modo apreciable con el tiempo (4 meses, duración normal de consumo de la preparación enzimática).

311. Características de la pirúvico descarboxilasa purificada.

3111. pH óptimo de descarboxilación.

Toda actividad enzimática es función del pH. Estudiando las variaciones de la actividad en función del pH se observa la existencia de dos pHs límites, más allá de los cuales la acción del enzima es nula. Entre ambos, la actividad presenta un máximo a un pH bien definido (pH óptimo) en condiciones determinadas (origen del enzima, temperatura, presencia de sales neutras, etc.).

La determinación del pH óptimo de descarboxilación de la pirúvico descarboxilasa purificada, ha sido realizada en las condiciones indicadas en la tabla I. Los resultados de la determinación quedan incluidos en la tabla II (Fig.1).

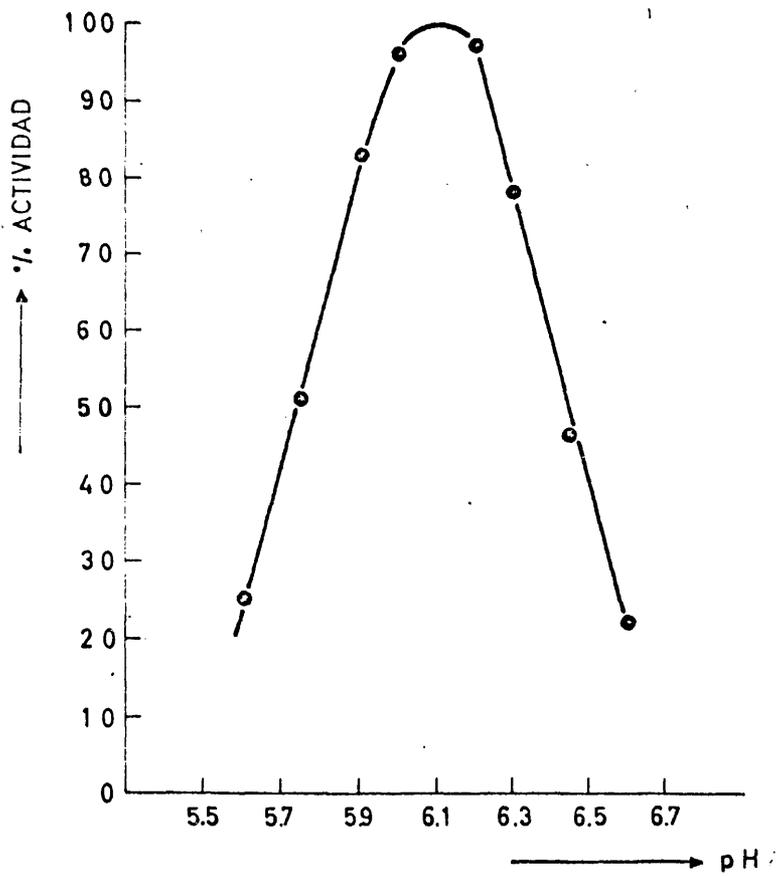
Tabla I. Actividad descarboxilásica en función del pH: Condiciones de valoración manométrica.

Pirúvico des- carboxilasa (Activ.máx.= 1.67 10 ² ulCO ₂ /0.1cc.E/10')	T.maleato (d.m.)		Piruvato Na 1M en T.M.(d.m.) 3:7(1.42 10 ⁻¹)	Mezcla total	
	vol. cc.	vol. cc.		sol.I sol.II	vol. cc.
0.1	2.9	6:4	0.5	3.5	5.6
"	"	5:5	"	"	5.75
"	"	4:6	"	"	5.9
"	"	3.5:6.5	"	"	6.0
"	"	2:8	"	"	6.2
"	"	1.5:8.5	"	"	6.3
"	"	1:9	"	"	6.45
"	"	0.5:9.5	"	"	6.6

Tabla II. Actividad descarboxilásica en función del pH.

pH	Actividad enzimática comparable	
	$\mu\text{lCO}_2/0.1\text{cc.E}/10'$	%
5.6	25	25
5.75	51	51
5.9	83	83
6.0	96	96
6.2	97	97
6.3	78	78
6.45	46	46
6.6	22	22

Figura 1. Actividad descarboxilásica en función del pH.



3112. Actividad de la pirúvico descarboxilasa purificada.

La actividad de la preparación enzimática determinada por la técnica manométrica de Warburg, en las condiciones óptimas de descarboxilación indicadas a continuación:

0.1cc. de purificado enzimático
2.9cc. de T.maleato (d.m.) 3:7
0.5cc. de piruvato Na 1M, en T.maleato (d.m.) 3:7 ($1.42 \cdot 10^{-1}M$)
Mezcla total: 3.5cc. (pH = 6.1)

ha resultado ser: $1 \cdot 10^2 \mu l. CO_2 / 0.1cc. E / 10 \text{ min.}$ (T = 30 °C).

3113. Actividad máxima de la pirúvico descarboxilasa.

A través del proceso de purificación, parte de la proteína enzimática pierde el cofermento y catión, permaneciendo inactiva frente al sustrato en la valoración manométrica. Por esta razón hemos desechado, en los estudios de cinética del enzima reconstruido, el término actividad en relación al contenido total de proteína (actividad específica), utilizando, en cambio, la actividad máxima de la preparación enzimática como reflejo del total contenido proteico capaz de descarboxilar el ácido pirúvico. (Tomamos como punto de referencia la actividad máxima, para hacer comparables no sólo los valores obtenidos en días sucesivos con la misma preparación enzimática, sino también los correspondientes a distintas preparaciones).

Las condiciones de determinación manométrica de la actividad máxima del purificado enzimático son las indicadas en la tabla III, siendo incluidos los resultados obtenidos en la tabla IV (Figura 2).

Tabla III. Actividad máxima de la pirúvico descarboxilasa.

Condiciones manométricas: contenido por vaso de Warburg

	vol. cc.	Molaridad de la solución	Concentración		T.M.(d.m.)
			moles/l	γ/vaso	<u>sol.I</u> <u>sol.II</u>
Pirúvico des- carboxilasa (Activ. enz.= 1.10 ² μl.CO ₂ / /0.1ccE/10min)	0.1				
Sol.de Mg ⁺⁺ en T.M.(d.m.)0:10 y posterior dilución en T.M.(d.m.) 0.25:9.75.	1.0	1.5(1) 1.0(2)	5.10 ⁻¹ 3.3 10 ⁻¹		
Sol. de DPT en T.M.(d.m.)0:10	0.5			100 50 25 10 -(3)	
T.maleato(d.m.)	1.4				(1)0.4:9.6 (2)0.7:9.3 (1,3)0.3:9.7 (2,3)0.5:9.5

Mezcla: 3cc. con un pH de recombinación de 6.7

Piruvato Na en T.M.(d.m.) 5.5:4.5	0.5	1.0	1.42 10 ⁻¹		
---	-----	-----	-----------------------	--	--

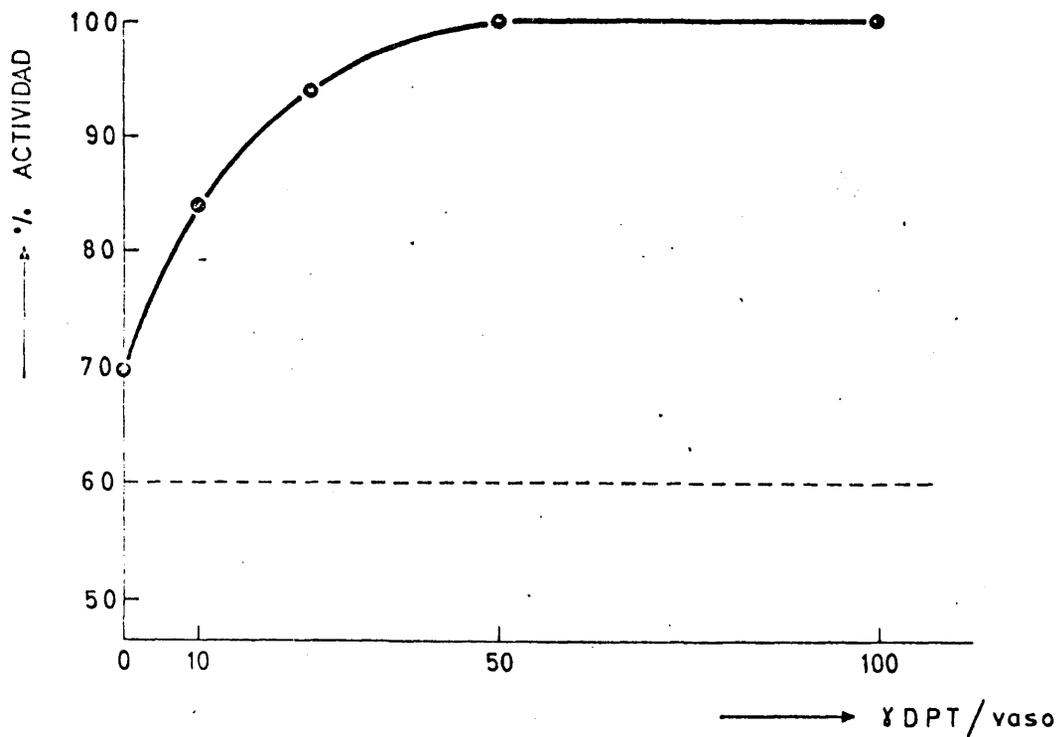
Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

Tabla IV. Actividad máxima de la pirúvico descarboxilasa.

DPT	Actividad enzimática Comparable(1)	
	$\mu\text{lCO}_2/0.1\text{cc.E}/10'$	%
100(3)	167	100
50	167	100
25	157	94
10	140	84
-	114	68
-(2)	100	60

- (1) Concentraciones de Mg^{++} de $5 \cdot 10^{-1}$ y $3.3 \cdot 10^{-1}$ dieron los mismos valores de actividad.
 (2) Sin adición de iones Mg.
 (3) Equivale a una conc. de DPT de $5.9 \cdot 10^{-5}$.

Figura 2. Actividad máxima de la pirúvico descarboxilasa purificada.



3114. pH Óptimo de recombinación.

La necesidad de conocer la actividad máxima de la pirúvico descarboxilasa purificada nos hizo plantear el problema de la determinación de las condiciones de recombinación ya en los primeros estudios sobre características del enzima natural. (La bibliografía, por otra parte, no era concordante a este respecto).

Es de hacer constar, en lo que se refiere a las con-

diciones de determinación manométrica, el problema que supuso poder salvar la dificultad de hacer compatible, en la misma determinación, la existencia de dos pHs: el pH de recombinación y el pH de descarboxilación, que lógicamente había de ser igual en todos los casos.

En el apartado 331, incluimos las condiciones y resultados de estas experiencias.

3115. Efecto del EDTA sobre la actividad de la pirúvico descarboxilasa purificada.

El carácter complejante del EDTA, por el que habíamos de intentar utilizarlo en la preparación de apo-descarboxilasa pura, nos llevó a ensayarlo sobre la pirúvico descarboxilasa purificada, con el fin de comprobar si, en las condiciones de determinación de actividad de la misma, el EDTA se limitaba a actuar como captador de metales pesados inhibidores, o si también se hacían sentir sus efectos sobre el metal fundamental.

Las condiciones y resultados se expresan en las tablas V y VI (Figura 3), respectivamente.

A concentraciones de EDTA comprendidas entre 10^{-3} y $10^{-1}M$, se observa un aumento de un 20% no sólo en la actividad del enzima (E), sino también en la actividad máxima (E_T). Esto hace suponer que el EDTA, en las condiciones de determinación utilizadas ejerce un efecto solamente positivo, liberando un 20% de proteína enzimática inutilizada por metales pesados inhibidores.

Tabla V. Efecto del EDTA sobre la actividad de la pirúvico descarboxilasa purificada:
Condiciones para la valoración manométrica.

	PDC (Acti.v.enz.= 1.10 ² μCO ₂ / /0.1ccE/16')	Sol.de Mg ⁺⁺ 1.5M en T.M. (d.m.) 0:10 (5.10 ⁻¹ M)		Sol.de DPT (200y/cc.en T.M.) (d.m.) 0:10 (100y/vaso)		T. maleato (d.m.)		Sol. EDTA (1.10 ⁻¹ M) en T.M. (d.m.) 0:10 y posteriores di- luciones (1y2.10 ⁻³ en T.M. (d.m.) 3:7		Mezcla		Piruvato Na 1M en T.M. (d.m.) (1.42 10 ⁻¹ M)	
		volumen cc.	volumen cc.	volumen cc.	volumen cc.	sol.I sol.II	vol. cc.	con- cc. moles/l	vol. cc.	vol. pH	sol.I sol.II	vol. cc.	sol.I sol.II
E	0.1	-	-	-	-	3:7	2.9	-	-	3	6.1	3:7	0.5
E+EDTA	"	-	-	-	-	-	-	2.9	0.96 10 ⁻¹	"	"	"	"
E+EDTA	"	-	-	-	-	-	-	"	0.96 10 ⁻³	"	"	"	"
E _T	"	1.0	0.5	0.5	0.5	0.4:9.6	1.4	-	-	"	6.7	5.5:4.5	"
E _T +EDTA	"	"	"	"	"	-	-	1.4	0.93 10 ⁻³	"	"	"	"

Mezcla total: 3.5cc. (pH descarboxilación = 6.1)

Tabla VI. Efecto del EDTA sobre la actividad de la pirúvico descarboxilasa purificada.

		Solución de EDTA	Actividad enzimática comparable	
		conc. Moles/l	$\mu\text{CO}_2/0.1\text{cc.E}/10'$	%
Activ. enzimática	E	-	100	60
	E + EDTA	$0.96 \cdot 10^{-1}$	120	72
	E + EDTA	$0.96 \cdot 10^{-3}$	120	72
Activ. máx.	E_{P}	-	167	100
	$E_{\text{P}} + \text{EDTA}$	$0.93 \cdot 10^{-3}$	200	120

Por tanto, desde un punto de vista comparativo, siempre que en la preparación de apo-descarboxilasa se utilice EDTA, los % de separación y recuperación habrán de referirse a la actividad máxima incrementada en un 20%.

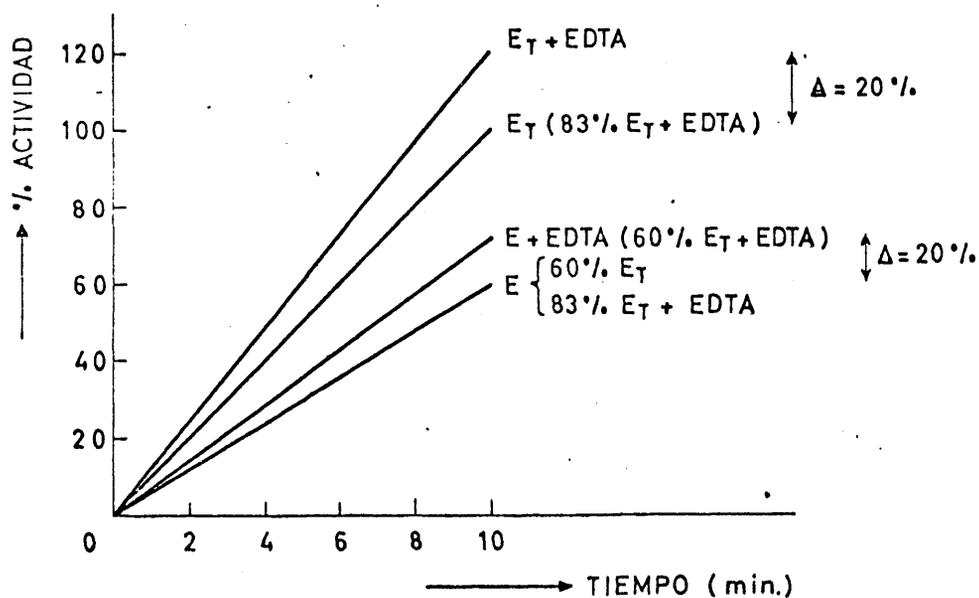


Figura 3. Efecto del EDTA sobre la actividad de la pirúvico descarboxilasa purificada.

3116. Conclusiones.

Reunimos en la tabla VII las características principales de la preparación enzimática.

- 1) La actividad de la preparación enzimática y su correspondiente actividad máxima no varían de modo apreciable con el tiempo (4 meses, duración normal de consumo de la preparación enzimática) si se conserva el enzima suspendido en un pequeño volumen de solución semisaturada de sulfato amónico en tampón citrato 0.04M, pH=6 (pH = 5.25), efectuándose todas las semanas diluciones a la concentración utilizada.
- 2) El pH óptimo de descarboxilación es 6.1.
- 3) Durante el proceso de purificación la pirúvico descarboxilasa pierde parte de su coenzima y catión (Mg). Su actividad es un 60% de la actividad máxima obtenida en presencia de exceso de los mismos.
- 4) Como en la recombinación interviene toda la proteína susceptible de recombinarse, se utiliza como unidad de comparación la actividad máxima y no la específica.
- 5) El pH de recombinación es 6.7.
- 6) La presencia de EDTA a concentraciones comprendidas entre 10^{-1} y 10^{-3} aumenta en un 20% la actividad máxima, probablemente por captar dicho complejante los metales pesados inhibidores que inutilizaban parte de la proteína capaz de descarboxilar el ácido pirúvico.

- 7) Resulta así que la actividad de la preparación enzimática es un 50% de la actividad máxima de dicha preparación en presencia de EDTA.
- 8) Se utiliza en todas las determinaciones un factor de corrección, para hacer comparables las distintas experiencias. Dicho factor se deduce al igualar las actividades máximas en las diferentes experiencias.

Tabla VII. Características de la preparación enzimática

Volumen de PDC purificada a partir de 150gs. de levadura	200 cc.	
pH óptimo de des-carboxilación	6.1	
pH óptimo de re-combinación (ión metal:Mg)	6.7	
Activ. de la PDC purificada a 30°C y pH=6.1	$1 \cdot 10^2 \mu\text{lCO}_2 / 0.1 \text{ccE} / 10'$	$6 \cdot 10^3 \mu\text{lCO}_2 / \text{cc} / \text{hr.}$
Activ. de la PDC en presencia de EDTA (10^{-1} - 10^{-3} M) a 30°C y pH=6.1	$1.2 \cdot 10^2 \mu\text{lCO}_2 / 0.1 \text{ccE} / 10'$	$7.2 \cdot 10^3 \mu\text{lCO}_2 / \text{cc} / \text{hr.}$
Activ.máx. de la PDC a 30 °C y pH=6.7	$1.67 \cdot 10^2 \mu\text{lCO}_2 / 0.1 \text{ccE} / 10'$	$1 \cdot 10^4 \mu\text{lCO}_2 / \text{cc} / \text{hr.}$
Activ.máx. de la PDC en presencia de EDTA (10^{-1} - 10^{-3}) a 30 °C y pH=6.7	$2 \cdot 10^2 \mu\text{lCO}_2 / 0.1 \text{ccE} / 10'$	$1.2 \cdot 10^4 \mu\text{lCO}_2 / \text{cc} / \text{hr.}$

32. Apo-pirúvico descarboxilasa.

Los primeros tanteos sobre cinética de recombinación nos pusieron de manifiesto la necesidad de disponer no sólo de una proteína libre (actividad residual cero) sino también de una proteína muy sensible (capaz de combinarse fácilmente, en exceso de co-descarboxilasa, con cantidades variables del metal presente) y además de actividad reproducible. Esto exige un conocimiento de las condiciones óptimas de preparación de la apo-descarboxilasa, con el fin de que pueda lograrse una separación 100% quedando, al mismo tiempo, la proteína lo menos alterada posible.

Es preciso hacer constar, en primer lugar, que la proteína enzimática libre de coenzima y metal es muy inestable, siendo necesario prepararla antes de cada experiencia por lo que ha de jugar un papel importante el tiempo de preparación, dada la frecuencia con que habrá de repetirse ésta.

Los factores considerados en este estudio han sido: pH, tiempo de incubación, presencia de fosfato sódico (utilizado generalmente como protector de enzimas), presencia de agentes quelantes, como el EDTA (que pudiera favorecer la separación en condiciones menos drásticas, al relajar el enlace por captación del metal), temperatura, etc. También, con el fin de poder tener la seguridad de trabajar en todo momento en condiciones óptimas de separación y recuperación, lo que garantizaría, a su vez, la validez y reproducibilidad de resultados, hemos hecho un estudio de la influencia de estos factores en

preparaciones recientes y al cabo de 4 meses (duración aproximada del volumen de preparación enzimática obtenido en cada fraccionamiento a partir de 150 gs. de levadura, que a su vez es la cantidad máxima utilizada en cada preparación por la limitación de la capacidad de las centrifugas).

Las condiciones en que el esquema general de preparación de apo-descarboxilasa fue desarrollado, así como las tablas y representaciones gráficas de los resultados obtenidos, se incluyen a continuación (Tablas VIII a XXI)(Figs. 4 a 16).

321. Esquema general de preparación.

Fase I	Relajación de la unión proteína-Mg-coenzima.	Mantener el enzima purificado a diferentes pHs y en presencia de fosfato disódico y EDTA, respectivamente.	Incubar a diferentes tiempos.
Fase II	Precipitación de la proteína.	Añadir a la mezcla sol.sat. de s.a. con el pH debidamente ajustado. (% de sat.: superior al 52%).	Dejar 1/2 hr. a 0 °C, para precipitación total.
Fase III	Separación de la proteína.	Centrifugar 1/2 hora, a 10.000 rev/min. y a 0 °C.	
Fase IV	Disolución de la proteína.	Disolver en T.M. (d.m.) 0:10 (activ.máx.) ó 3:7 (activ. residual) Vol.E/vol.apo-E= 1/10.	

Notas.

1. En la precipitación de la apo-descarboxilasa se utilizan volúmenes de sol. sat. de sulfato amónico que aseguran su precipitación total (2.3cc. de sol. sat. por cada cc. de mezcla corresponden aproximadamente a un 70% de saturación de sulfato amónico). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que el ajuste de pH de la sol. sat. de s.a. exige la adición de diferentes volúmenes de NaOH conc. o NaOH 1/10conc., que oscilan entre 0.04 y 0.5 cc., es decir, entre el 1 y el 22% aproximadamente del volumen de sol.sat. de s.a. utilizado. Dado que los % de saturación se calculan de la siguiente manera:

$$\text{cc. de sol.sat. de s.a. a añadir} = \frac{V (S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

S_2 : grado de saturación deseado

S_1 : grado de saturación preexistente

V : volumen inicial

en este caso concreto, V se ve incrementado por los valores de NaOH añadidos, variando los % de saturación, para la cantidad de sol. sat. utilizada, entre el 60 y 68%, en cualquier caso superior al intervalo 46-52% de saturación, en que se separa la apo-pirúvico descarboxilasa.

2. Como es sabido, la estabilidad de la proteína es máxima a pH 6.1 y, por tanto, a este pH (correspondiente a T.M. 3:7) convendría disolver la apo-descarboxilasa. Así lo hemos hecho en la determinación de la actividad residual. Razones de ajuste de pH, en la mezcla de recombinación, exi-

gen disolver la proteína en pH más alcalino (T.maleato (d.m.) 0:10; sin embargo, hemos podido comprobar que la capacidad de recombinación máxima no se altera por este motivo.

3. Puesto que los volúmenes de solución de enzima y de apoenzima utilizados en las valoraciones manométricas son de 0.1 y 1 cc., respectivamente, la relación de 1:10 en los volúmenes de disolución de la proteína en el enzima y apoenzima, respectivamente, permite hacer directamente comparables las actividades resultantes.
4. Convendría destacar que las mezclas de incubación, utilizadas en la preparación de apo-descarboxilasa, a diferentes pHs, son resultado de la combinación de diferentes soluciones, todas ellas standardizadas, y no de un ajuste del pH en el momento de la preparación.

Tabla VIII. Preparación de apo-pirúvico descarboxilasa

Características de la preparación } diferentes pHs
 { a: sin incubación
 b: 1/2 hora
 1er tiempo de incubación }
 precipitación de la proteína con sol.sat. de s.a.
 (pH ajustado previamente)

PDC (Activ.máx.= 1.10 ² μlCO ₂ / 0.1ccE/16')	H ₂ O		sol. de NaOH		Mezcla		1er tiempo de incubación		Sol.sat.de s.a. (2.3cc.) con el pH ajustado		Mezcla total			2o tiempo de incubac.
	vol. cc.	vol. cc.	OH conc. H ₂ O	vol. cc.	vol. cc.	pH	a hr.	b hr.	cc. conc.	cc. NaOH	vol. cc.	% sat.	pH	
0.25	0.375	0.375	0.04:9.96	0.375	1	7.6	0	1/2	-	0.09	3.39	68	7.6	1/2
"	"	"	0.1:9.9	"	"	8.0	"	"	-	0.25	3.55	65	8.0	"
"	"	"	0.3:9.7	"	"	8.5	"	"	0.05	-	3.55	69	8.5	"
"	"	"	0.8:9.2	"	"	9.0	"	"	0.175	-	3.475	66	9.0	"
"	"	"	1.5:8.5	"	"	9.5	"	"	0.5	-	3.8	60	9.5	"

A continuación, se centrifuga 1/2 hora a 12.000 rev/min. (T = -5 °C) y se disuelve el precipitado en 2.5cc. de T.M.(d.m.) 3:7 (activ. residual) ó 0:10 (activ. recombinado).

Figura 4. Relación de la solución de NaOH conc.:H₂O, a utilizar, en función del pH de la mezcla de relajación de enlaces, en la separación de la apocdescarboxilasa.

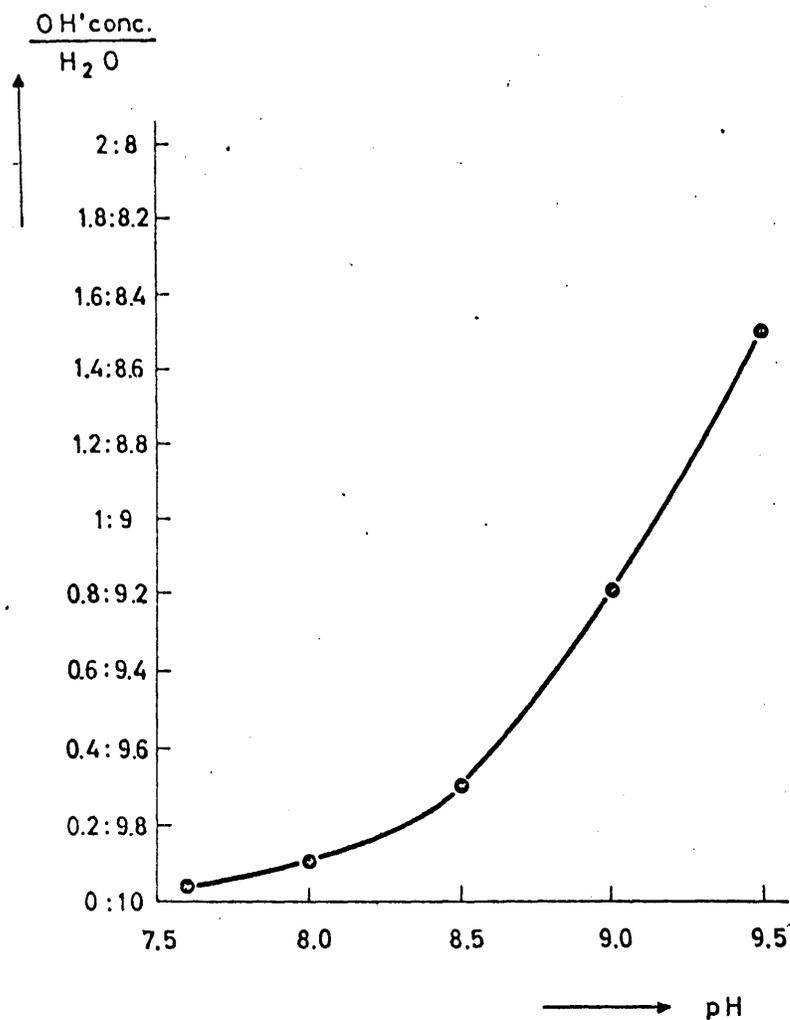


Tabla IX. Preparación de apo-piruvico descarboxilasa

diferentes pHs

solución de fosfato disódico: [0.25M]

a: sin incubación

b: 1/2 hora

Características de la preparación

1er tiempo de incubación {
 precipitación de la proteína con sol.sat. de s.a.
 (pH ajustado previamente)

PDC (Activ.máx.= 1.102 μ l CO ₂ / 0.1ccE/10')	PO ₄ HNa ₂ -12H ₂ O 0.5M		sol. de NaOH		Mezcla		1er tiempo de incubación		Sol.sat.de s.a. (2.3cc.) con el pH ajustado.		Mezcla total		2º tiempo de incubac. horas	
	vol. cc.	conc. moles/l	OH H ₂ O	conc. cc.	vol. cc.	pH	a	b	cc. NaOH conc.	1/10	vol. cc.	% sat.		pH
0.25	0.5	0.25	0:10	0.25	1	7.6	0	1/2	-	0.09	3.39	68	7.6	1/2
"	"	"	0.1:9.9	"	"	8.0	"	"	-	0.25	3.55	65	8.0	"
"	"	"	0.3:9.7	"	"	8.5	"	"	0.05	-	3.35	69	8.5	"
"	"	"	0.8:9.2	"	"	9.0	"	"	0.175	-	3.47	66	9.0	"
"	"	"	2.3:7.7	"	"	9.5	"	"	0.5	-	3.8	60	9.5	"

A continuación, se centrifuga 1/2 hora a 12.000 rev/min. (T = -5 °C) y se disuelve el precipitado en 2.5cc. de T.M.(d.m.) 3:7 (activ. residual) ó 0:10 (activ. recombinado).

Figura 5. Relación de la solución de NaOH conc.:H₂O, a utilizar en presencia de fosfato disódico [0.25M], en función del pH de la mezcla de relajación de enlaces, en la separación de la apo-descarboxilasa.

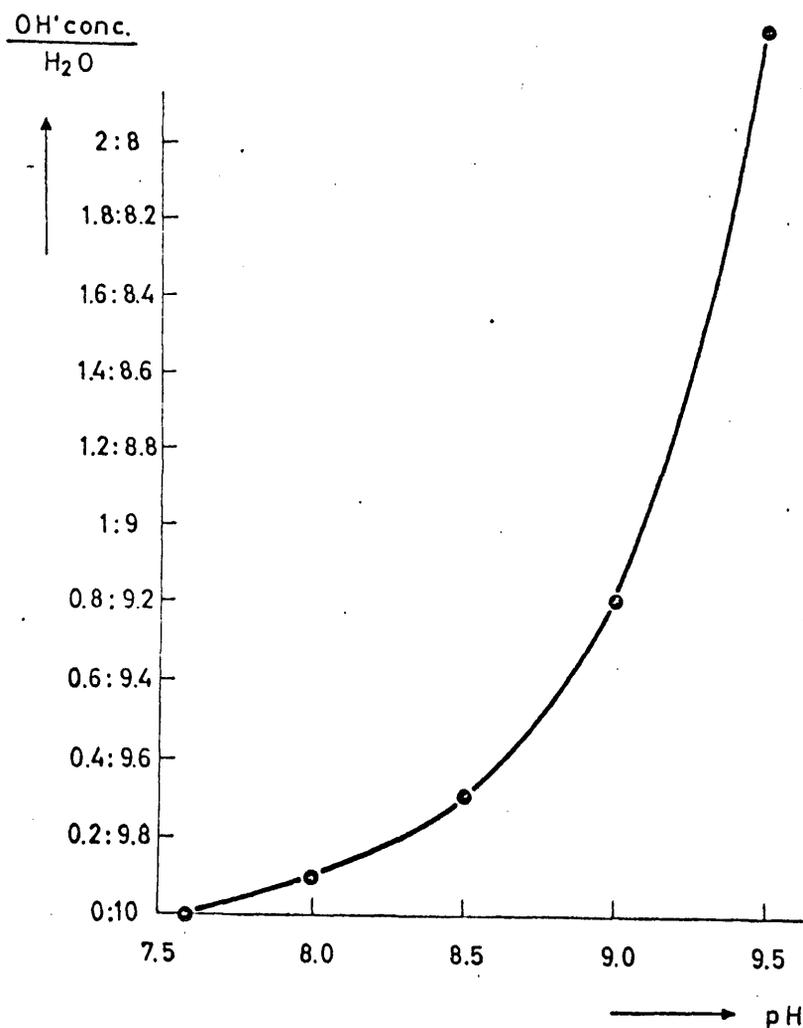


Tabla X. Preparación de apo-pirúvico descarboxilasa

diferentes pHs

solución de EDTA: [0.1M]

a: sin incubación

1^{er} tiempo de incubación { b: 1/2 hora

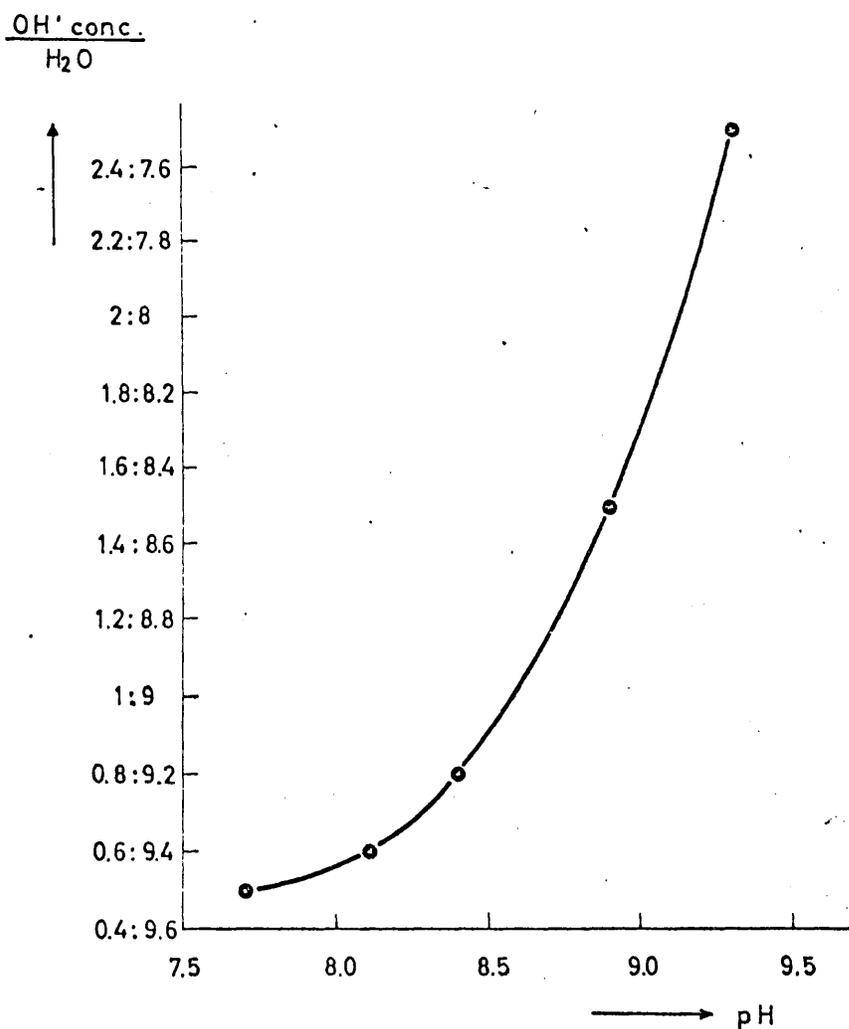
Características de la preparación

precipitación de la proteína con sol.sat. de s.a. (pH ajustado previamente)

PDC (Activ.máx.= 1.10 ² μlCO ₂ / 0.1ccE/10')	H ₂ O		Sol. de EDTA 0.4M en medio alcalino		Mezcla		1 ^{er} tiempo de incubación		Sol.sat.de s.a. (2.3cc.) con el pH ajustado.		Mezcla total		2 ^o tiempo de incubac.	
	vol. cc.	OH. H ₂ O	vol. cc.	conc. moles/l	vol. cc.	pH	a hr.	b hr.	cc. NaOH 1/10	vol. cc.	% sat.	pH		horas
0.25	0.5	0.5:9.5	0.25	0.1	1	7.7	0	1/2	-	0.1	3.4	68	7.7	1/2
"	"	0.6:9.4	"	"	"	8.1	"	"	-	0.25	3.55	65	8.1	"
"	"	0.8:9.2	"	"	"	8.4	"	"	0.04	-	3.34	69	8.4	"
"	"	1.5:8.5	"	"	"	8.9	"	"	0.15	-	3.45	67	8.9	"
"	"	2.5:7.5	"	"	"	9.3	"	"	0.35	-	3.65	68	9.3	"

A continuación, se centrifuga 1/2 hora a 12.000 rev/min. (T = -5 °C) y se disuelve el precipitado en 2,5cc. de T.M.(d.m.) 3:7 (activ. residual) ó 0:10 (activ. recombinado).

Figura 6. Relación de la solución de NaOH conc.:H₂O, a utilizar como disolvente del EDTA 0.4M, en función del pH de la mezcla de relajación de enlaces, en la separación de la apo-descarboxilasa.



3211. Actividad residual de la apo-descarboxilasa.

Tabla XI. Condiciones de valoración manométrica

	vol. cc.	conc. moles/l
Apo-pirúvico descarboxilasa (1) en T.M. (d.m.) 3:7	1.0	
T.maleato(d.m.) 3:7	2.0	
Mezcla: 3.0cc. (pH=6.1)		
Piruvato Na 1M en T.M. (d.m.) 3:7	0.5	$1.42 \cdot 10^{-1}$
Mezcla total: 3.5cc. (pH=6.1)		

(1) obtenida en las diferentes condiciones que acabamos de exponer en el esquema general de preparación.

32111. Efecto del pH y del tiempo de incubación en la separación de la apo-pirúvico descarboxilasa (Tabla XII).

pH	Activ. residual comparable de la apo-pirúvico descarboxilasa				Separación			
	μlCO ₂ /0.1 cc. E/10 min.				%			
	sin incub.		1/2hr. incub.		sin incub.		1/2hr. incub.	
	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄
7.6	41	28	3	1	59	72	97	99
8.0	12	5	1	1	88	95	99	99
8.5	2	0	0	0	98	100	100	100
9.0	0	0	0	0	100	100	100	100
9.5	0	0	0	0	100	100	100	100

32112. Efecto del pH y del tiempo de incubación en la separación de la apo-pirúvico descarboxilasa, en presencia de fosfato disódico [0.25M] (Tabla XIII).

pH	Activ. residual comparable de la apo-pirúvico descarboxilasa				Separación			
	ulCO ₂ /0.1 cc. E/10 min.				%			
	sin incub.		1/2hr. incub.		sin incub.		1/2hr. incub.	
	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄
7.6	70	69	49	49	30	31	51	51
8.0	59	51	19	16	41	49	81	84
8.5	25	15	4	4	75	85	96	96
9.0	2	0	0	0	98	100	100	100
9.5	0	0	0	0	100	100	100	100

32113. Efecto del pH y del tiempo de incubación en la separación de la apo-pirúvico descarboxilasa, en presencia de EDTA [0.1M] (Tabla XIV).

pH	Activ. residual comparable de la apo-pirúvico descarboxilasa						Separación			
	Ml CO ₂ /0.1 cc. E/10 min.						%			
	sin incub.		1/2hr. incub.		sin incub.		sin incub.		1/2hr. incub.	
E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	
7.7	61	52	17	14	49	57	86	88		
8.1	26	16	3	6	78	87	97	95		
8.4	11	3	0	2	91	97	100	98		
8.9	0	0	0	0	100	100	100	100		
9.3	0	0	0	0	100	100	100	100		

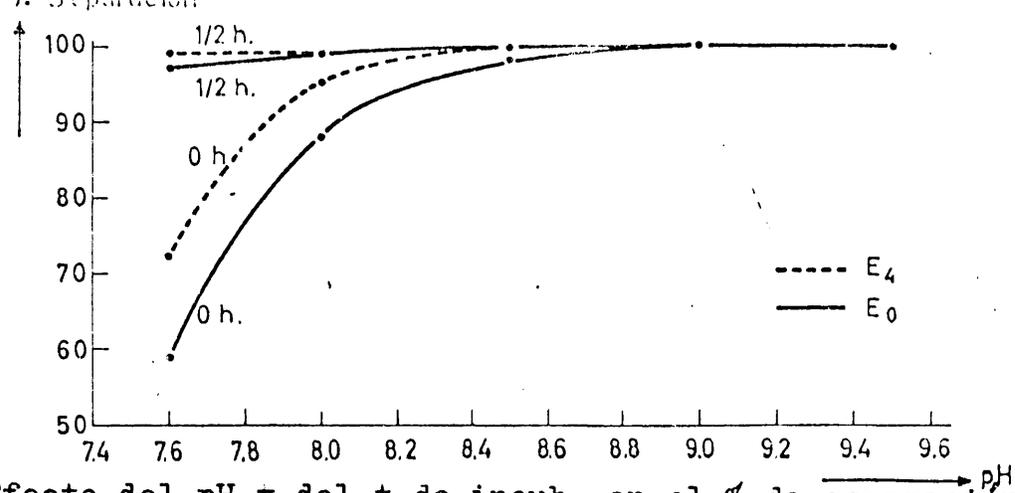


Fig. 7. Efecto del pH y del t. de incub. en el % de separación

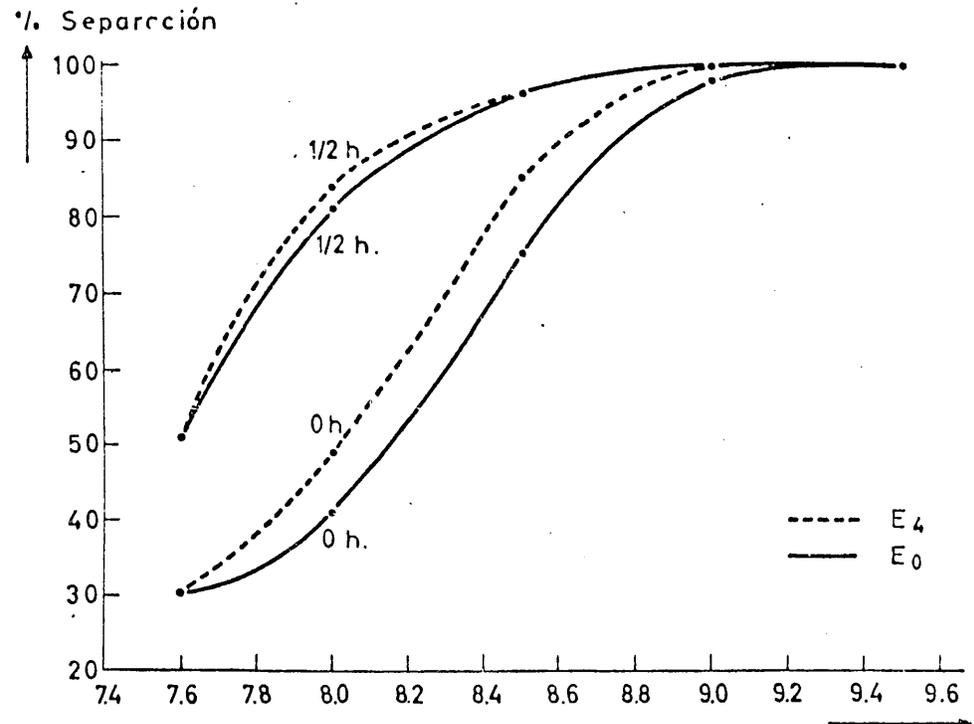


Fig. 8. Efecto del pH y del t. de incub., en presencia de PO_4HNa_2

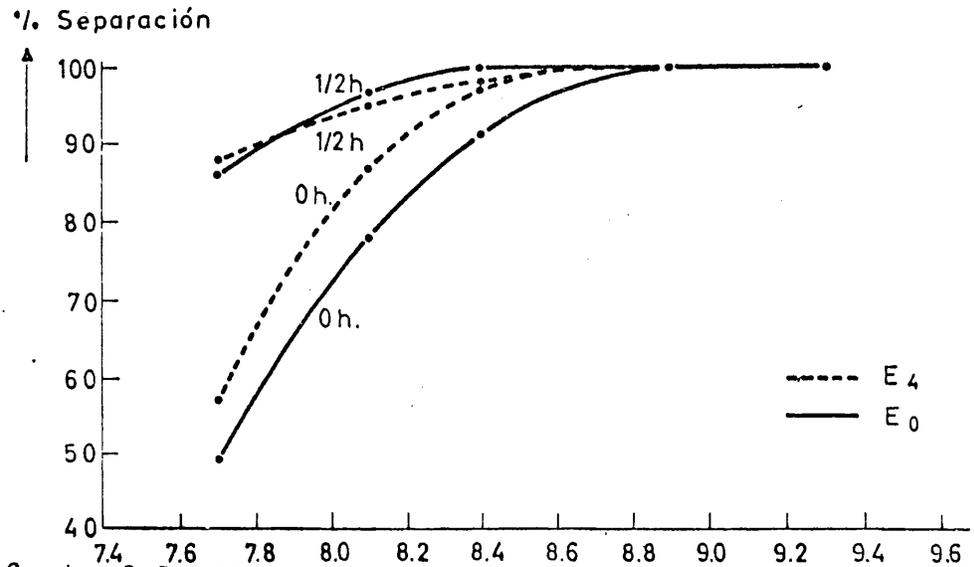


Fig. 9. Efecto del pH y del t. de incub., en presencia de EDTA

32114. Comparación de valores: % de separación de la apo-descarboxilasa en función del pH y de la presencia de fosfato disódico y EDTA en el medio de incubación (Tabla XV).

pH	Efecto del pH				Efecto del pH(PO_4HNa_2 [0.25M])				Efecto del pH(EDTA [0.1M])			
	sin incub.		1/2hr.incub.		sin incub.		1/2hr.incub.		sin incub.		1/2hr.incub.	
	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄
7.6	59	72	97	99	30	31	51	51				
7.7									49	57	86	88
8.0	88	95	99	99	41	49	81	84				
8.1									78	87	97	95
8.4									91	97	100	98
8.5	98	100	100	100	75	85	96	96				
8.9									100	100	100	100
9.0	100	100	100	100	98	100	100	100				
9.3									100	100	100	100
9.5	100	100	100	100	100	100	100	100				

% de separación

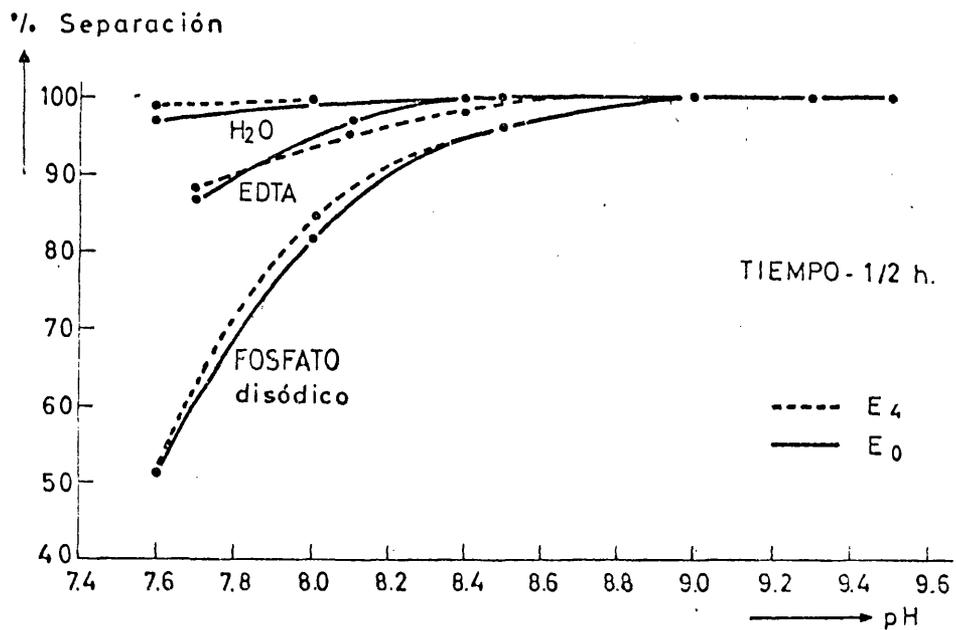


Figura 10. Comparación de los efectos de las soluciones de fosfato disódico y de EDTA sobre el % de separación debido al pH. (Tiempo de incubación: 1/2 hora).

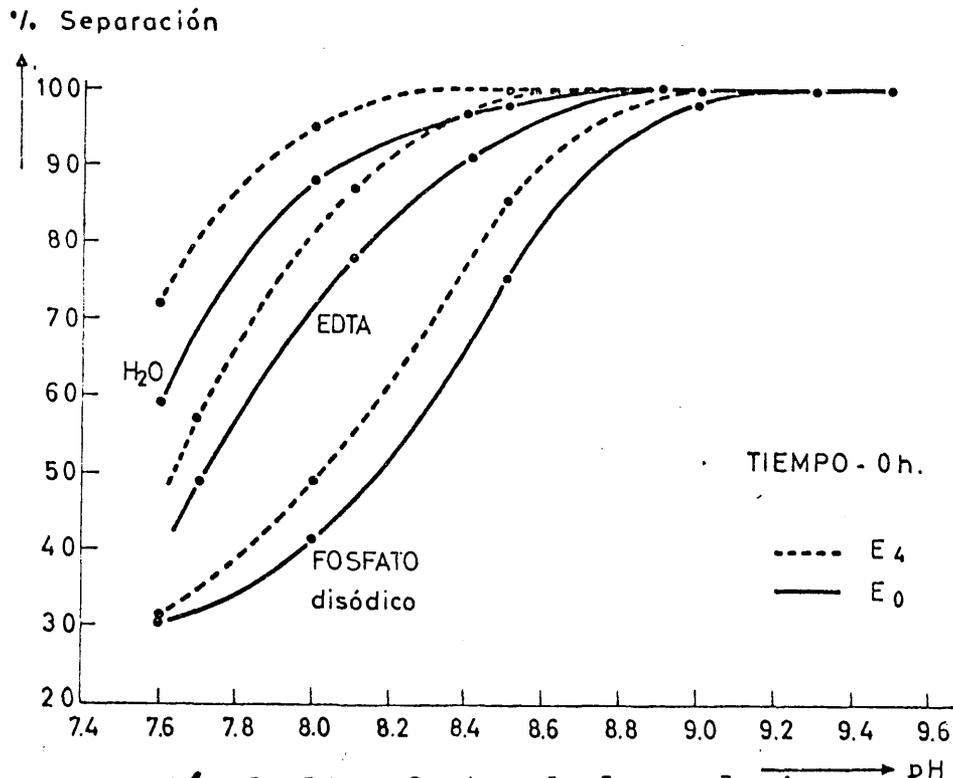


Figura 11. Comparación de los efectos de las soluciones de fosfato disódico y de EDTA sobre el % de separación debido al pH. (Sin incubación).

3212. Actividad máxima del enzima recombinado.

Tabla XVI. Condiciones de valoración manométrica

	vol.	Molaridad de la solución	Concentración		T.M.(d.m.) <u>sol.I</u> <u>sol.II</u>
	cc.		moles/l	γ/vaso	
Apo-pirúvico descarboxilasa (1) en T.M. (d.m.)0:10	1.0				
Sol.de Mg ⁺⁺ en T.M.(d.m.)0:10	1.0	1.5	5.10 ⁻¹		
Sol. de DPT (200γ/cc.) en T.M.(d.m.)0:10	0.5			100	
T.maleato(d.m.)	0.5				1.3:8.7

Mezcla: 3.0cc. con un pH de recombinación de 6.7

Piruvato Na en T.M. (d.m.) 5.5:4.5	0.5	1.0	1.42 10 ⁻¹		
--	-----	-----	-----------------------	--	--

Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

(1) obtenida en las diferentes condiciones expuestas en el es-
quema general de preparación.

32121. Efecto del pH y del tiempo de incubación en la capacidad de recombinación de la apo-pirúvico descarboxilasa (Tabla XVII).

pH	Activ. máxima comparable del enzima recombinado				Recuperación			
	μlCO ₂ /0.1cc. E/10 min.				%			
	sin incub.		1/2hr. incub.		sin incub.		1/2hr. incub.	
	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄
7.6	92	75	52	52	55	45	31	31
8.0	60	58	53	52	36	35	32	31
8.5	55	57	52	50	33	34	31	30
9.0	53	52	47	47	32	31	28	28
9.5	37	37	33	33	22	22	20	20

32122. Efecto del pH y del tiempo de incubación en la capacidad de recombinación de la apo-pirúvico descarboxilasa, en presencia de PO_4HNa_2 [0.25M] (Tabla XVIII).

pH	Activ. máxima comparable del enzima recombinado						Recuperación			
	$\mu l CO_2 / 0.1cc. E / 10 \text{ min.}$						%			
	sin incub.		1/2hr. incub.		1/2hr. incub.		sin incub.		1/2hr. incub.	
E_0	E_4	E_0	E_4	E_0	E_4	E_0	E_4	E_0	E_4	
7.6	98	90	89	80	59	54	53	48		
8.0	75	70	64	64	45	42	38	38		
8.5	66	62	58	58	39	37	35	35		
9.0	65	62	57	58	39	37	34	35		
9.5	57	52	50	47	34	31	30	28		

32123. Efecto del pH y del tiempo de incubación en la capacidad de recombinación de la apo-pirúvico carboxilasa, en presencia de BPA 10.00 (Tabla XIX).

pH	Activ. máxima comparable del enzima recombinado						Recuperación			
	$\mu\text{LCO}_2/0.1\text{cc. E}/10 \text{ min.}$						%			
	sin incub.		1/2hr. incub.		1/2hr. incub.		sin incub.		1/2hr. incub.	
E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	
7.7	119	112	94	88	60	56	47	44	44	
8.1	119	112	92	88	60	56	46	44	44	
8.4	119	111	94	86	60	56	47	43	43	
8.9	119	108	96	88	60	54	48	44	44	
9.3	116	108	94	86	58	54	47	43	43	

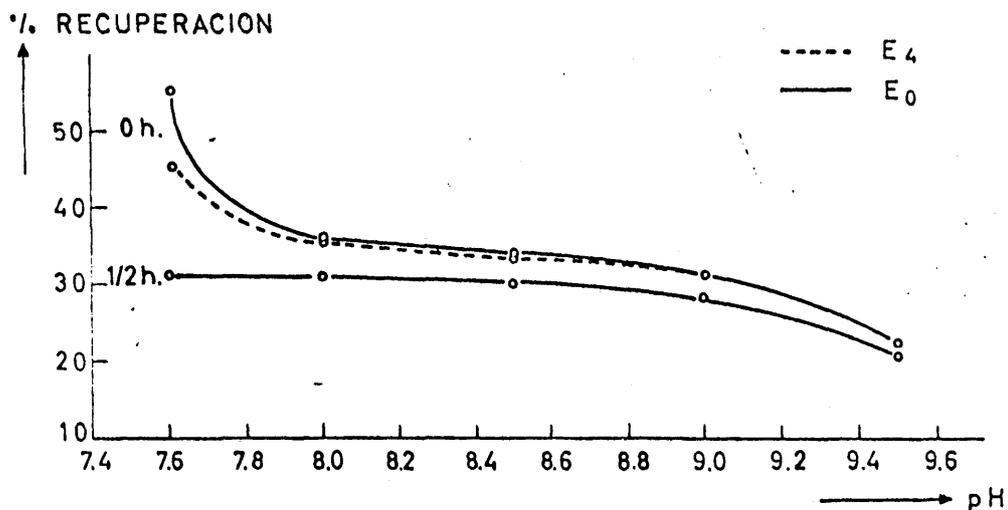


Fig. 12. Efecto del pH y del tiempo de incubación sobre la capacidad de recombinación de la apo-pirúvico descarboxilasa.

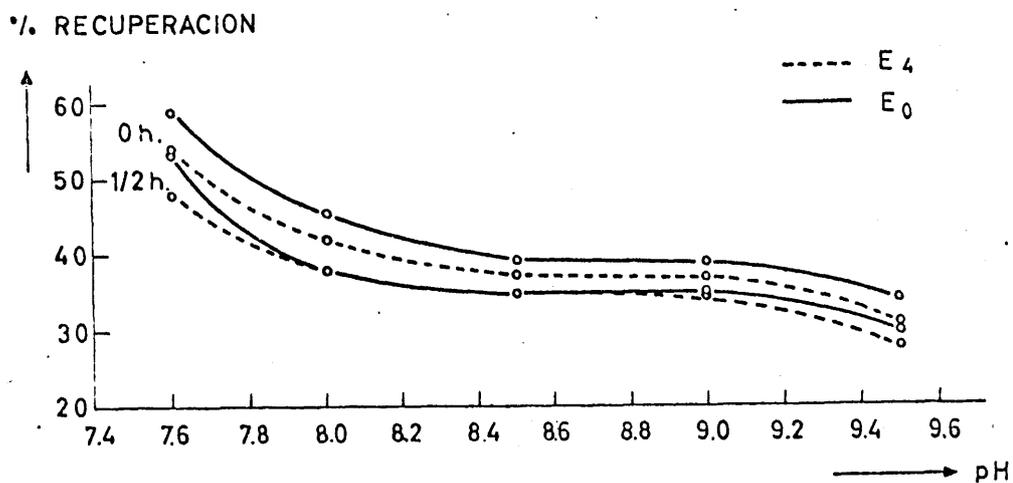


Fig. 13. Efecto del pH y del tiempo de incubación sobre la capacidad de recombinación de la apo-pirúvico descarboxilasa, en presencia de PO_4HNa_2 [0.25M].

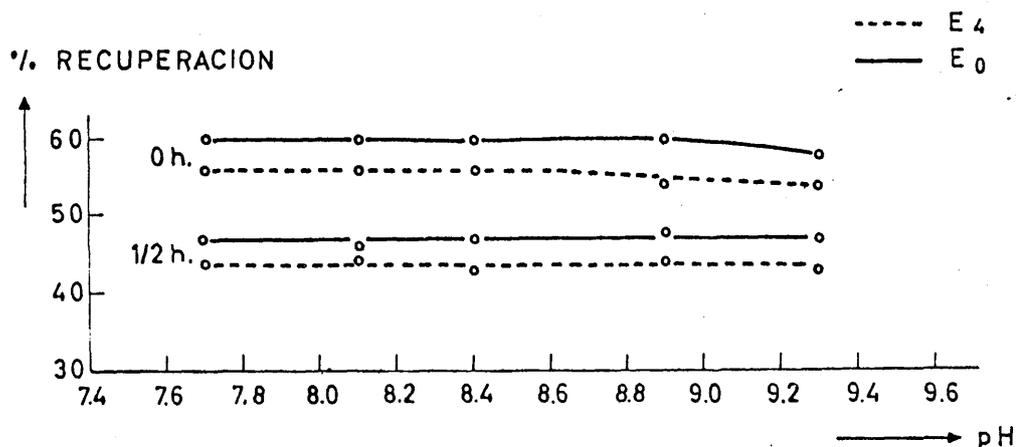


Fig. 14. Efecto del pH y del tiempo de incubación sobre la capacidad de recombinación de la apo-pirúvico des carboxilasa, en presencia de EDTA (0.1M).

32124. Comparación de valores: Capacidad de recombinación de la apo-descarboxilasa (compre-
sada en % de recuperación) en función del pH y de la presencia de fosfato disódico
y EDTA en el medio de incubación (Tabla XX).

pH	Efecto del pH				Efecto del pH(PO_4HNa_2 [0.25M])				Efecto del pH(EDTA [0.1M])			
	sin incub.		1/2hr.incub.		sin incub.		1/2hr.incub.		sin incub.		1/2hr.incub.	
	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄	E ₀	E ₄
7.6	55	45	31	31	59	54	53	48				
7.7									60	56	47	44
8.0	36	35	32	31	45	42	38	38				
8.1									60	56	46	44
8.4									60	56	47	43
8.5	33	34	31	30	39	37	35	35				
8.9									60	54	48	43
9.0	32	31	28	28	39	37	34	35				
9.3									58	54	47	43
9.5	22	22	20	20	34	31	30	28				

% recuperación (referido a la A_{máx.} del E)

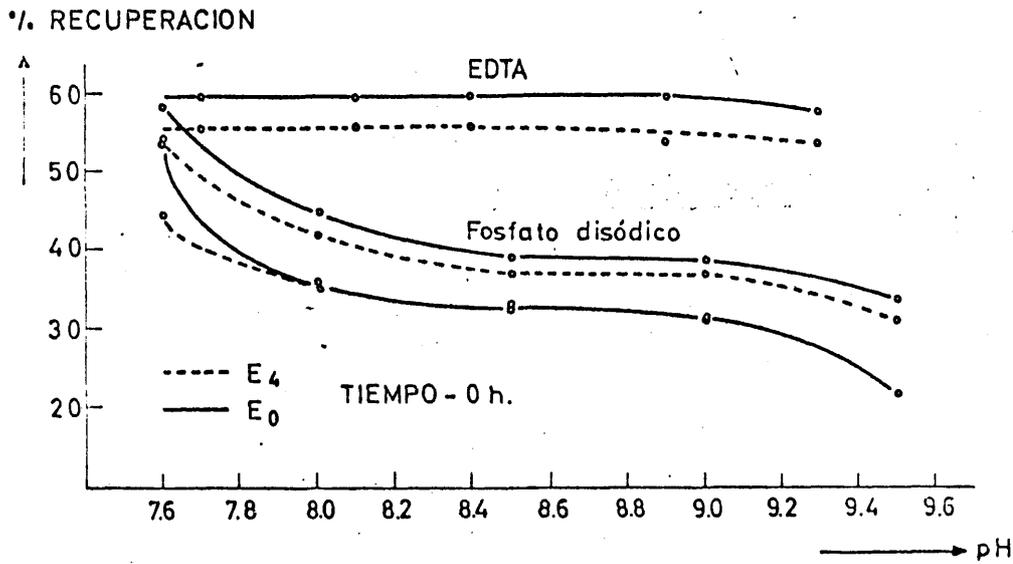


Fig. 15. Comparación de los efectos de las soluciones de PO_4HNa_2 y de EDTA sobre la influencia ejercida por el pH en relación a la capacidad de recombinación de la apo-pirúvico descarboxilasa. (Sin incubación).

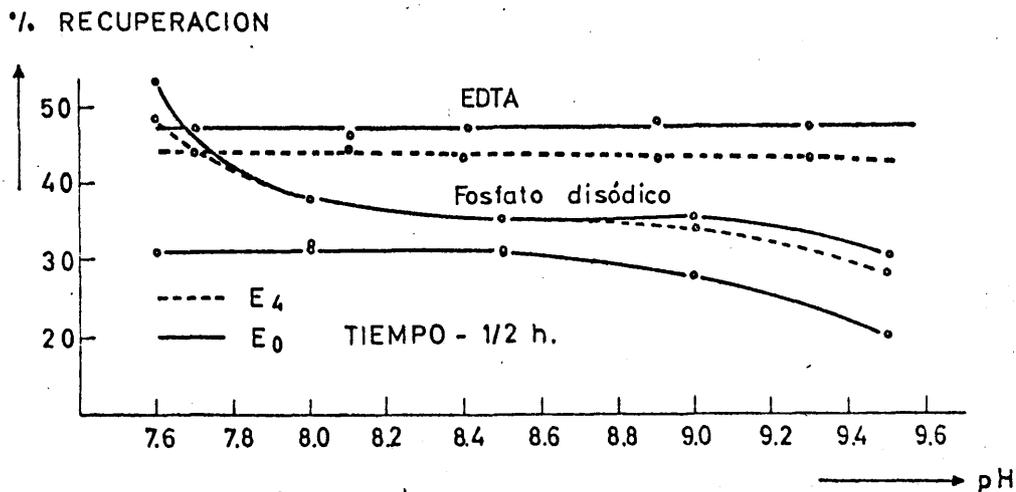


Fig. 16. Comparación de los efectos de las soluciones de PO_4HNa_2 y de EDTA sobre la influencia ejercida por el pH en relación a la capacidad de recombinación de la apo-pirúvico descarboxilasa. (Tiempo de incubación: 1/2 hora).

Tabla XXI. Comparación final.

		Sin incubación		1/2hr.de incubación	
		pH mínimo	% recup.	pH mínimo	% recup.
Separación 100%.	E ₄	8.5	35	8.3	30
	E ₀	9.0	35	8.3	30
Separación 100%(en pre- sencia de PO ₄ HNa ₂ [0.25M]	E ₄	9.0	37	9.0	35
	E ₀	9.3	37	9.0	35
Separación 100%(en pre- sencia de EDTA [0.1M].	E ₄	8.9	56	8.5	44
	E ₀	8.9	60	8.5	47

3213. Conclusiones.

- 1) La separación total de la apo-descarboxilasa depende esencialmente del pH.
- 2) Los % de separación, conseguidos a distintos pHs, aumentan considerablemente al aumentar el tiempo de incubación. Esta influencia es más notable a pHs inferiores a 8.5.
- 3) Cuando el tiempo de incubación es de 1/2 hr. no hay diferencia apreciable entre los % de separación, a diferentes pHs, en el enzima recién preparado (E_0) y al cabo de 4 meses (E_4).
- 4) En experiencias sin incubación los % de separación son inferiores en el enzima recién preparado.
- 5) El fosfato disódico, por su carácter protector de enzimas, dificulta la separación, sobre todo a pHs inferiores a 8.5.
- 6) El EDTA, al aumentar la estabilidad del enzima por captación de metales inhibidores, dificulta asimismo la separación.
- 7) Los pH mínimos de separación total varían en función del tiempo de incubación y de la presencia de fosfato disódico y de EDTA. Dichos valores, recogidos en la tabla XXI, quedan comprendidos entre pH 8.3 y 9.3.
- 8) La mayor o menor capacidad de recombinación de la apo-descarboxilasa depende fundamentalmente del tiempo que la proteína permanece en condiciones que la alteran, es decir, del tiempo de incubación, aumentando al disminuir este último. Dicho aumento es más acentuado a pHs inferiores a 8 en au-

sencia de fosfato disódico y EDTA; en estos casos el aumento permanece constante a cualquier pH.

- 9) La influencia del pH en la recombinación no es muy acusada en el intervalo de pH 8.3-9.3, en que tiene lugar la separación total.
- 10) Las diferencias en la capacidad de recombinación entre el enzima recién preparado y al cabo de 4 meses pueden considerarse despreciables en ese mismo intervalo de pH, con y sin incubación.
- 11) El fosfato disódico, por su carácter protector de enzimas, favorece la capacidad de recombinación, especialmente a pHs inferiores a 8.
- 12) El EDTA, al estabilizar el enzima por su carácter complejante de metales pesados inhibidores, aumenta la capacidad de recombinación, siendo constante el % de recuperación a lo largo del intervalo de pH estudiado (pH 7.7-9.3).
- 13) Del estudio realizado sobre preparación de apo-descarboxilasa, resumido en la tabla XXI, se deducen las siguientes condiciones óptimas:

pH de incubación: 8.9

tiempo de incubación: no es preciso

presencia de EDTA [0.1M], en el medio de incubación

En estas condiciones la preparación de apo-descarboxilasa reúne las siguientes características:

separación: 100%

recuperación: 60%

reproducibilidad: total

3214. Método propuesto de preparación de apo-descarboxilasa.

Fase I	Relajación de la unión proteína-Mg-coenzima.	Añadir a 1 vol. de enzima purificado 2 vol. de H ₂ O y 1 vol. de EDTA 0.4M en sol. alcalina (OH ⁻ conc./H ₂ O = 1.5:8.5). pH _{total} = 8.9	Sin incubación.
Fase II	Precipitación de la proteína.	Añadir a continuación una mezcla de 9.2 vol. de sol. sat. de s.a. y 0.6 vol. de NaOH conc. pH = 8.9 % de sat. de la mezcla total = 67	Dejar 1/2 hr. a 0°C para precipitación total.
Fase III	Separación de la proteína.	Centrifugar 1/2 hr. a 10.000 rev/min. y a 0 °C.	
Fase IV	Disolución de la proteína.	Disolver en T.M. (d.m.) 0:10 (activ. máx.) ó 3:7 (activ. residual) Vol. E/vol. apo-E = 1/10.	

33. Iones metal.

El planteamiento experimental de la especificidad de metales en la pirúvico descarboxilasa presenta una gran complejidad. A las dificultades que entraña la exigencia de una apodescarboxilasa pura, sensible y de actividad reproducible, hay que añadir aquí las que supone la introducción de un nuevo factor en el sistema de recombinación, el ión metal.

La fuerte hidrólisis de las sales metálicas, diferente para cada metal y variable además de acuerdo con la concentración del metal utilizado, ha exigido un estudio individual de cada uno de los sistemas de recombinación en función de las distintas concentraciones del metal y del pH, ya que las variaciones bruscas de pH acusadas en la preparación de las diferentes diluciones y en la mezcla con los otros componentes del sistema enzimático, no pudieron ser compensadas con la capacidad amortiguadora de ningún tampón. (Se utilizó tampón maleato, dadas sus características señaladas por Smits, a las que ya hemos aludido). No obstante, ha podido comprobarse que el pH, durante la determinación manométrica, se mantiene constante.

El manejo de las sales metálicas presenta, además, otra dificultad en relación con la falta de solubilidad y formación de hidróxidos insolubles, a determinados pHs, de algunos metales, particularidades éstas de los iones metal que han constituido uno de los factores tenidos en cuenta en la selección de los mismos.

Las condiciones en que fue estudiado el comportamien-

to de los distintos metales, así como las tablas y representaciones gráficas de los resultados, se incluyen a continuación (Tablas XXII a XLV) (Figuras 17 a 34).

De acuerdo con los diferentes metales, los parámetros determinados han sido: pH óptimo de recombinación, K_m , $V_{m\acute{a}x.}$, K_i , cuyos valores fueron deducidos de las representaciones gráficas de las ecuaciones de Lineweaver y Burk correspondientes:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V}$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{V} \text{ (inh. competitiva)}$$

y de la comparación entre ambas.

Todos los valores de actividad dados son comparables, debido a la introducción de un factor (en todos los casos muy próximo a la unidad) mediante el que se igualan los valores control de todas las experiencias realizadas. Como control se ha utilizado el valor de la actividad máxima de la pirúvico descarboxilasa recombinada con $[Mg^{++}] 5 \cdot 10^{-1}$, valor que se mantuvo igual a $120 \mu\text{CO}_2/0.1\text{cc. E}/10 \text{ min.}$

La solución de proteína (apo-descarboxilasa) utilizada en todas las experiencias es la correspondiente a 0.1cc. de enzima natural.

Las molaridades de las soluciones metálicas utilizadas son las adecuadas para conseguir la concentración a que se hace referencia, por adición del volumen indicado en un volumen total de recombinación de 3cc.

331. Particularidades del ión Mg.

Solución inicial de SO_4Mg : 1.5M en tampón maleato (d.m.) 0:10
(pH=6.6).

Diluciones (1/100 → 1/1.000): a partir de la solución inicial
en tampón maleato (d.m.) 0.7:9.3
(pH de las diluciones 6.9).

La característica del Mg, de ser ión metal activante natural de la pirúvico descarboxilasa, nos ha llevado a iniciar el estudio de la especificidad de metales con el de su cinética de recombinación -en un amplio margen de concentraciones- después de analizar la diferenciación de sus pHs de recombinación y descarboxilación.

La K_m fue determinada gráficamente, sobre la representación de las ecuaciones de Lineweaver y Burk correspondientes

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V}$$

Tabla XXII. Actividad de la PDC recombinada, en presencia de iones Mg, en función del pH.

Condiciones de valoración manométrica.

	vol.	Molaridad de la solución	Conc.	Conc.	T.M. (d.m.)									
	cc.		m ₀ les/l		γ/vaso	sol.I	sol.II	2:8	4:6	6:4	1:9	0.5:9.5	0:10	
Apo-PDC en T.M. (d.m.) 0:10	1.0													
Sol. de Mg ⁺⁺ en T.M. (d.m.) 0:10	1.0	1.5	5.10 ⁻¹											
Sol. de DPT (200γ/cc.) en T.M. (d.m.) 0:10	0.5		5.9 10 ⁻⁵	100										
T.M. (d.m.)	0.5				6:4	4:6	2:8	1:9	0.5:9.5	0:10				
Mezcla: 3cc. con un pH de recombinación														
Piruvato Na en T.M. (d.m.)	0.5	1.0	1.42 10 ⁻¹		6.0	6.2	6.5	6.8	7.0	7.3				
Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1														
	0.5				1:9	3:7	5:5	6:4	7:3	9:1				

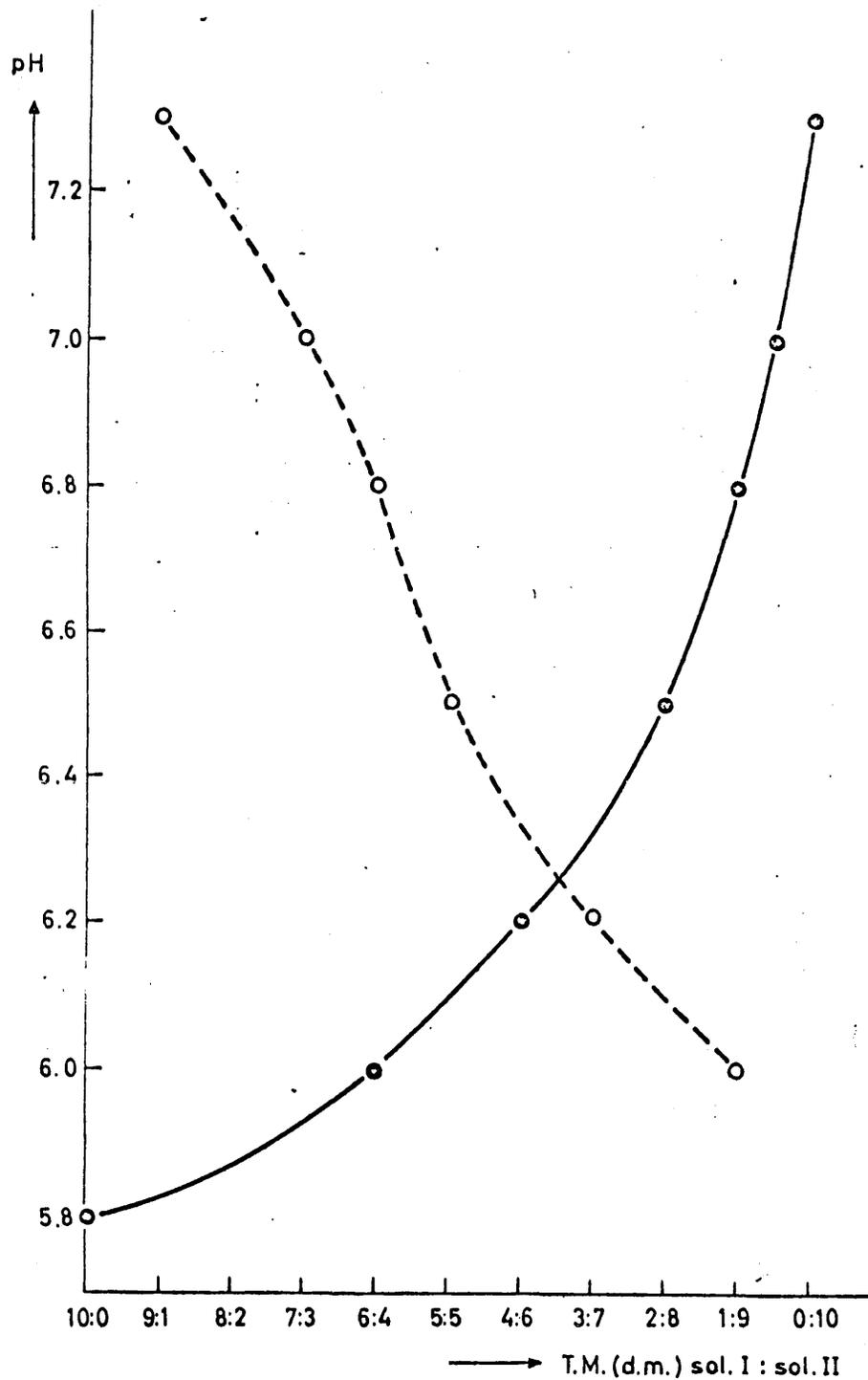


Fig.17. Curvas de pH de recombinación, para un mismo pH de descarboxilación, en función del tampón maleato utilizado.

— Relación sol.I:sol.II (T.M.(d.m.)), como tampón a utilizar en función del pH de la mezcla de recombinación.

--- Relación sol.I:sol.II (T.M.(d.m.)), como disolvente del piruvato sódico, en función de un único pH de la mezcla total (pH de descarboxilación = 6.1).

Tabla XXIII. Actividad de la PDC recombinada, en presencia de $[Mg^{++}] 5 \cdot 10^{-1}$, en función del pH.

pH	Actividad enzimática comparable		Activ.enz. con relación a la activ.máx. de la PDC natural
	$\mu l. CO_2 / 0.1 cc. E / 10'$	%	%
6.0	93	77	46
6.2	102	85	51
6.5	113	94	56
6.7	120	100	60
6.8	118	98	59
7.0	110	92	55
7.3	98	82	49

Figura 18. Actividad de la pirúvico descarboxilasa recombinada, en presencia de Mg^{++} , en función del pH.

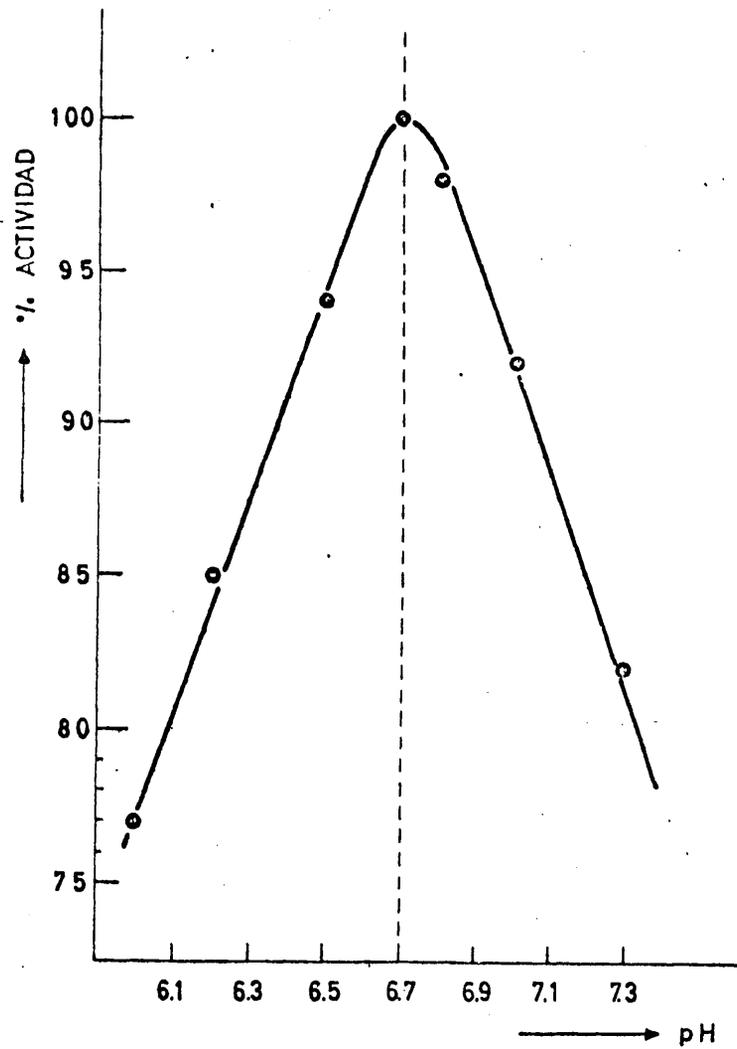


Tabla XXIV. Actividad de la pirúvico descarboxilasa recombinada en presencia de iones Mg.

Condiciones manométricas: contenido por vaso de Warburg

	vol.	Molaridad de la solución	Conc.	Conc.	T.M(d.m.)
	cc.		moles/l	γ/vaso	$\frac{\text{sol.I}}{\text{sol.II}}$
Apo-pirúvico descarboxilasa en T.M.(d.m.) 0:10	1.0				
Sol.de Mg ⁺⁺ (en las condiciones ya especificadas).	1.0	+1.5 0.015 0.075 0.003 0.0015	*5.10 ⁻¹ 5.10 ⁻³ 2.5 10 ⁻³ 1.10 ⁻³ 5.10 ⁻⁴		
Sol. de DPT (200γ/cc.) en T.M.(d.m.)0:10	0.5		5.9 10 ⁻⁵	100	
T. maleato (d.m.)	0.5				+1.3:8.7 5:5

Mezcla: 3cc. con un pH de recombinación de 6.7

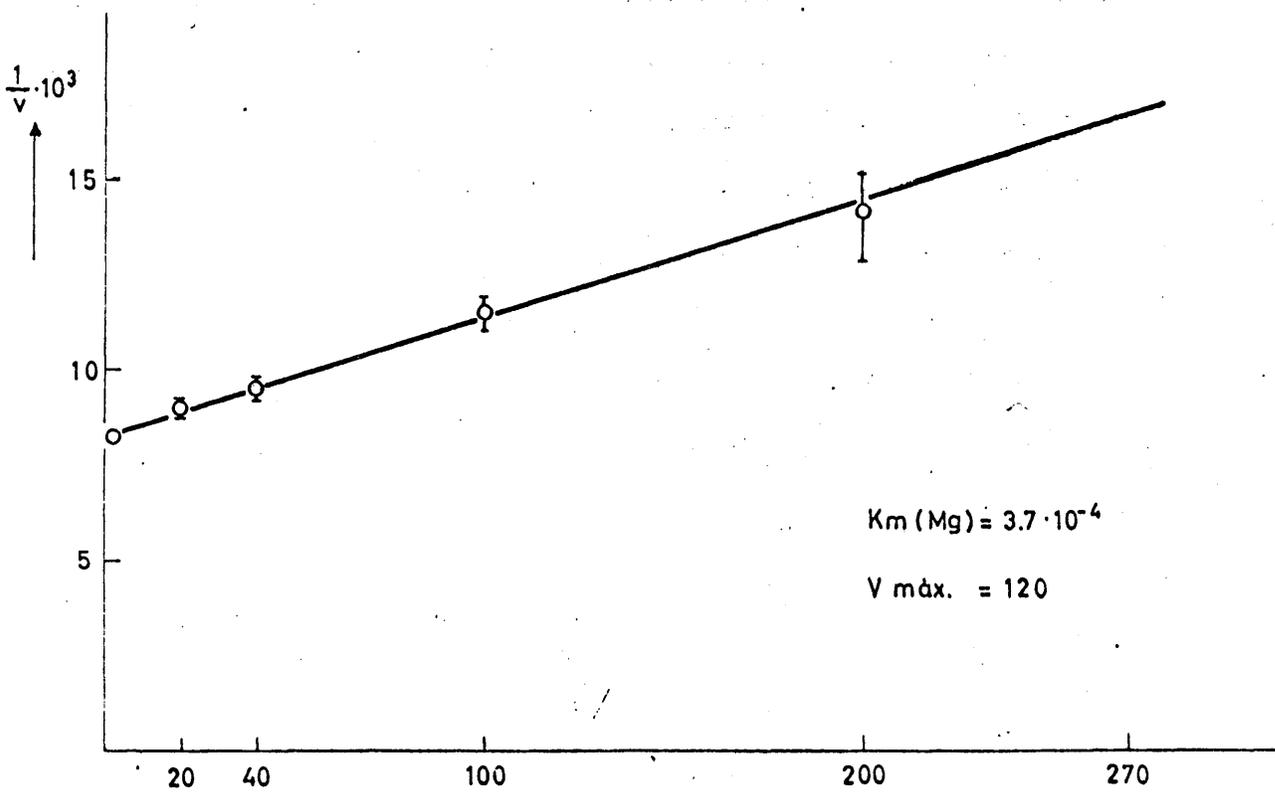
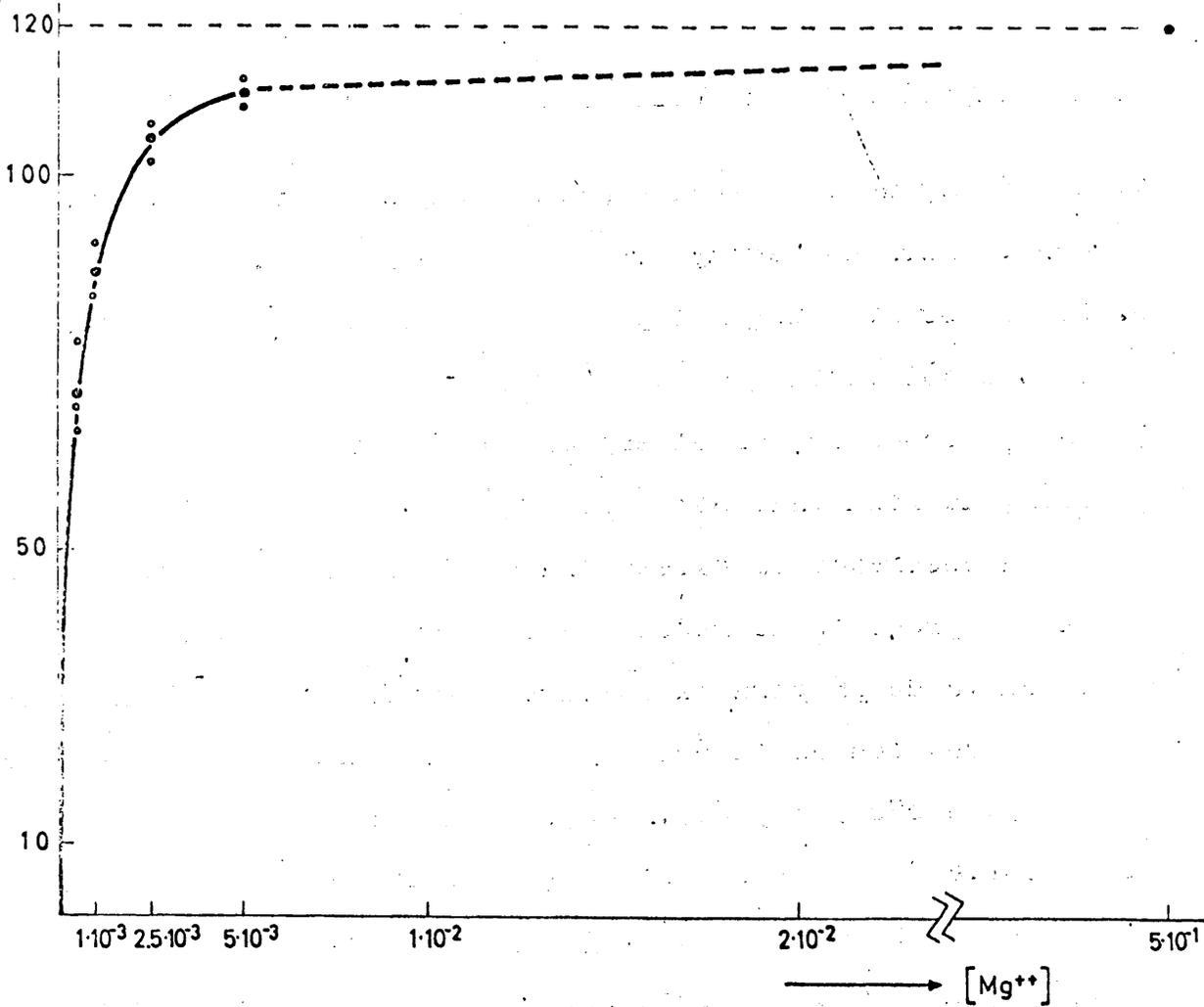
Piruvato Na en T.M.(d.m.)...	0.5	1.0	1.42 10 ⁻¹		*5.5:4.5 10:0(esp)
------------------------------	-----	-----	-----------------------	--	-----------------------

Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

Tabla XXV. Actividad de la pirúvico descarboxilada recombinada en presencia de iones Mg.

1/[Mg ⁺⁺]	2		20.10		40.10		100.10		200.10	
	v	1/v	v	1/v	v	1/v	v	1/v	v	1/v
[Mg ⁺⁺]	5.10 ⁻¹		5.10 ⁻³		2.5 10 ⁻³		1.10 ⁻³		5.10 ⁻⁴	
Exper.	v	1/v	v	1/v	v	1/v	v	1/v	v	1/v
1	120	8.3 10 ⁻³	113	8.8 10 ⁻³	107	9.3 10 ⁻³	91	11.0 10 ⁻³	78	12.8 10 ⁻³
2	120	8.3 10 ⁻³	111	9.0 10 ⁻³	102	9.8 10 ⁻³	84	11.9 10 ⁻³	66	15.1 10 ⁻³
3	120	8.3 10 ⁻³	109	9.2 10 ⁻³	106	9.4 10 ⁻³	87	11.5 10 ⁻³	69	14.5 10 ⁻³
Valor medio	120	8.3 10 ⁻³	111	9.0 10 ⁻³	105	9.5 10 ⁻³	87	11.5 10 ⁻³	71	14.1 10 ⁻³

($\mu\text{M CO}_2 / 0.1 \text{ cc E} / 10 \text{ min.}$)



g.19. Actividad de la PDC recombineda en presencia de iones Mg.

$\frac{1}{[\text{Mg}^{++}]} \cdot 10^{-1}$

De las experiencias anteriores concluimos:

1. El ión Mg actúa como ión metal activador en el intervalo de concentraciones ensayadas ($5 \cdot 10^{-1}$ - $5 \cdot 10^{-4}$).
2. No se observa ningún tipo de inhibición a altas concentraciones del metal.
3. La K_m obtenida, en el estudio de la cinética de recombinación, ha resultado ser $3.6 \cdot 10^{-4}$.
4. Se ha observado la existencia de diferentes pHs óptimos para los procesos de recombinación y descarboxilación.
5. La curva de pH para la descarboxilación es de campana, bien definida, con un pH óptimo de 6.1 y actividades inferiores al 25% a pHs 5.5 y 6.5, respectivamente.
6. La curva de recombinación, igualmente de campana, no es acusada. Presenta un máximo a pH 6.7, conservando, sin embargo, el 80% de la actividad a pHs 6.1 y 7.3. Estos resultados revelan la existencia de un lugar de enlace independiente de los centros catalíticos activos del mecanismo de descarboxilación, y, al mismo tiempo, esta afinidad casi constante en el intervalo de pH 6.1 y 7.3 pone de manifiesto que el enlace tiene lugar probablemente sobre grupos que no son afectados por los iones hidrógeno en este intervalo, tales como grupos carboxilo, hidroxilo o fenólico.

332. Particularidades del ión Mn.

Solución inicial de SO_4Mn : 1.5M en tampón maleato (d.m.) 0:10
(pH=).

Diluciones (1/50 \rightarrow 1/2,500): a partir de la solución inicial
en tampón maleato (d.m.) 0.7:9.3
(pH de las diluciones 6.9).

Como anteriormente hemos hecho con el ión Mg, se ha estudiado la cinética de recombinación en un amplio margen de concentraciones y se ha estudiado, asimismo, la diferenciación de los pHs óptimos de recombinación y descarboxilación.

La K_m fue igualmente determinada sobre la representación gráfica de las ecuaciones de Lineweaver y Burk correspondientes.

Las anomalías que pueden observarse en la representación de dobles recíprocos, en el sentido de velocidades anormalmente lentas a altas concentraciones de sustrato, pudieran explicarse -partiendo de la actuación como inhibidor del exceso del sustrato- bajo los siguientes supuestos:

1. La molécula inhibidora de sustrato puede unirse al enzima como cualquier otro inhibidor.
2. El segundo supuesto se refiere al caso en que el área activa del enzima esté constituida por varios grupos, de los que normalmente sólo uno fija una molécula de sustrato. A altas concentraciones de sustrato, diferentes moléculas del mismo pueden fijarse en estos grupos aceptores de tal manera que ninguna de las moléculas resultantes sea activa.

Tabla XXVI. Actividad de la PDC recombinada, en presencia de Mn^{++} , en función del pH.

Condiciones de valoración manométrica.

	vol. cc.	Molaridad de la solución	Conc. moles/l	Conc. γ/vaso	T.M. (d.M.)	
					SOL.I	SOL.II
Apo-pirúvico des- carboxilasa en T.M. (d.m.) 0:10.	1.0					
Sol. de Mn^{++} (en las condiciones ya especificadas	1.0	0.03	$1 \cdot 10^{-2}$			
Sol. de DPT (200 γ/cc) en T.M. (d.m.) 0:10	0.5		$5.9 \cdot 10^{-5}$	100		
T. maleato (d.m.)	0.5				6:4	4:6
						3:7
						2:8
						6.95
						6.85
						7.11
						8.5:1.5
						8.4:1.6
						9:1
						9:1
						0:10
						7.31
						9:1
						9:1

Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

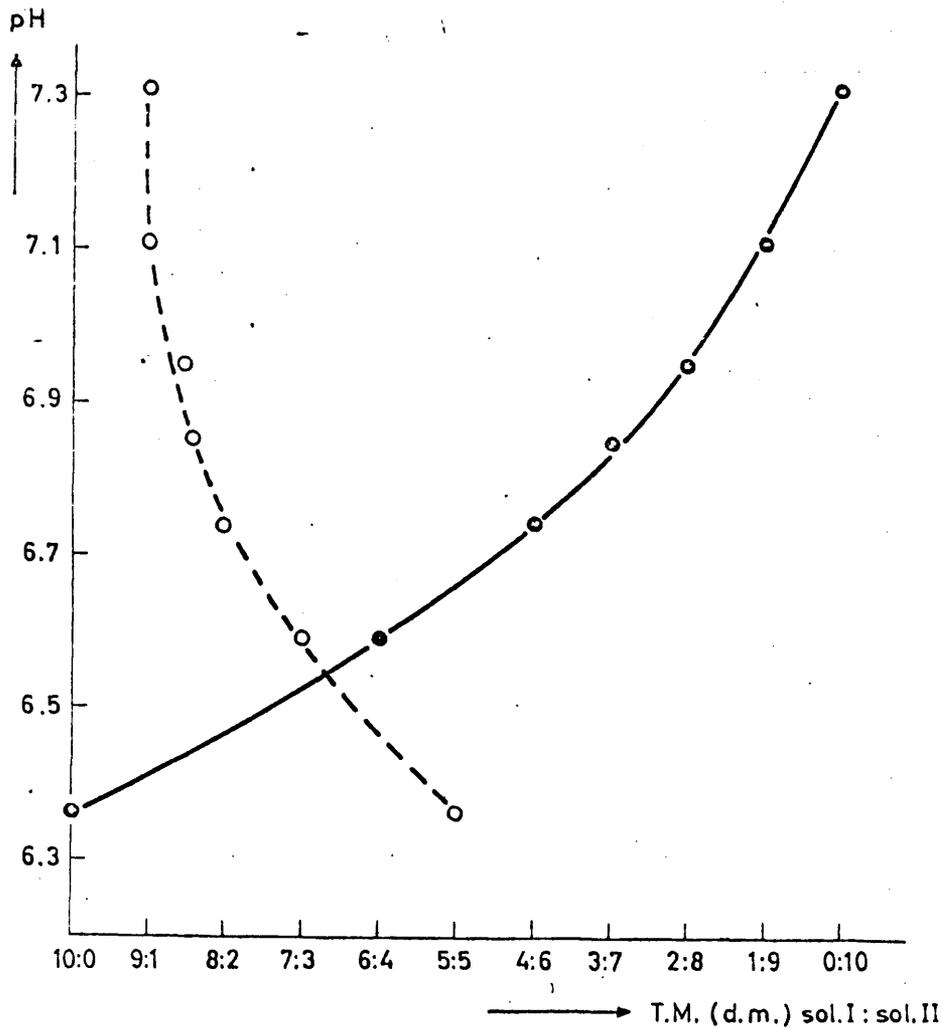


Fig.20. Curvas de pH de recombinación, para un mismo pH de descarboxilación, en función del tampón maleato utilizado.
 — Relación sol.I:sol.II (T.M.(d.m.)), como tampón a utilizar en función del pH de la mezcla de recombinación.
 --- Relación sol.I:sol.II (T.M.(d.m.)), como disolvente del piruvato sódico, en función de un único pH de la mezcla total (pH de descarboxilación = 6.1).

Tabla XXVII. Actividad de la PDC recombinada, en presencia de Mn^{++} ($1 \cdot 10^{-2}M$), en función del pH.

pH	Actividad enzimática comparable		Activ.enz. con relación a la activ.máx. de la PDC recombinada con $[Mg^{++}] 5 \cdot 10^{-1}$.
	$\mu l. CO_2 / 0.1 cc. E / 10'$	%	%
6.59	45	78	38
6.74	51	89	43
6.85	55	97	46
6.95	57	100	48
7.11	53	93	44
7.31	46	80	38

* Se hace notar que estos valores corresponden a una concentración de Mn^{++} , $1 \cdot 10^{-2}M$, a la que se acusa una fuerte inhibición por exceso de sustrato, según fue observado posteriormente.

Figura 21. Actividad de la pirúvico descarboxilasa recombina-
nada, en presencia de Mn^{++} , en función del pH.

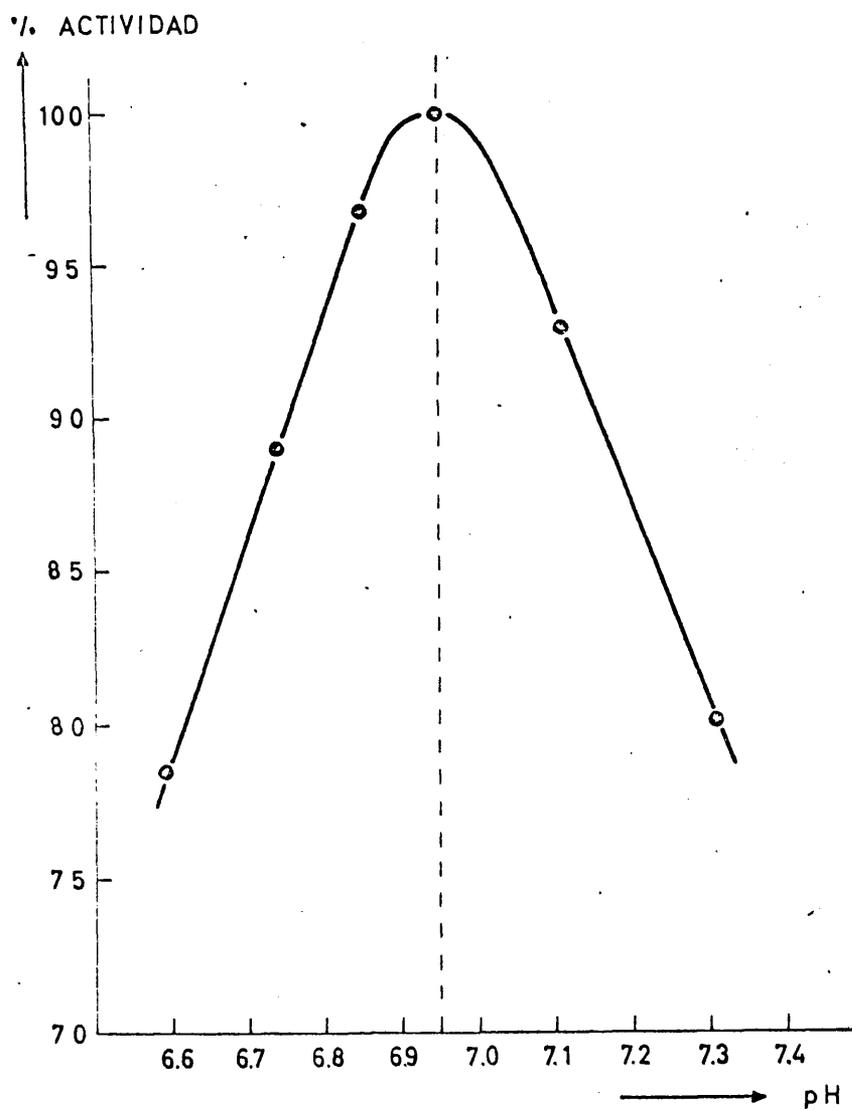


Tabla XXVIII. Actividad de la pirúvico descarboxilasa recombinada en presencia de iones Mn.

Condiciones manométricas: contenido por vaso de Warburg

	vol.	Molaridad de la solución	Conc.	Conc.	T.M(d.m.) <u>sol.I</u> <u>sol.II</u>
	cc.		moles/l	γ/vaso	
Apo-pirúvico descarboxilasa en T.M.(d.m.) 0:10	1.0				
Sol. de Mn ⁺⁺ (en las condiciones ya especificadas).	1.0	0.03	1.10 ⁻²		
		0.015	5.10 ⁻³		
		0.003	1.10 ⁻³		
		0.0009	3.10 ⁻⁴		
		0.00075	2.5 10 ⁻⁴		
		0.00060	2.10 ⁻⁴		
		0.00045	1.5 10 ⁻⁴		
0.00030	1.10 ⁻⁴				
Sol. de DPT (200γ/cc.) en T.M. (d.m.) 0:10	0.5		5.9 10 ⁻⁵	100	
Tampón maleato(d.m)	0.5				2:8

Mezcla: 3cc. con un pH de recombinación de 6.95

Piruvato Na en T.M. (d.m.)	0.5	1.0	1.42 10 ⁻¹		8.5±1.5
----------------------------	-----	-----	-----------------------	--	---------

Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

Tabla XXIX. Actividad de la pirúvico descarboxilasa recombinada, en presencia de Mn^{++} .

[Mn^{++}]	$1 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
Experimento	$\mu L \cdot CO_2 / 0.1 cc \cdot E / 10'$							
1		66	70		53	46		
2		61	61					13,17
3		58	61		47	41		
4			61		47			
5			61	59			42	
6			61	52,59	51	44	30	
7			61,60	60,58	53	41		
8	57	66	71	68				
9			63,71	58	51	45		
10	58	60	68,68	55	51	45		
Valor medio	57	62	64	59	50	44	36	15

Tabla XXX. Actividad de la pirúvico descarboxilasa recom-
binada, en presencia de iones Mn.

$[Mn^{++}]$	v	$1/[Mn^{++}]$	$1/v$
$1 \cdot 10^{-2}$	57	$1 \cdot 10^2$	$17.5 \cdot 10^{-3}$
$5 \cdot 10^{-3}$	62	$2 \cdot 10^2$	$16.1 \cdot 10^{-3}$
$1 \cdot 10^{-3}$	64	$10 \cdot 10^2$	$15.6 \cdot 10^{-3}$
$3 \cdot 10^{-4}$	59	$33.3 \cdot 10^2$	$16.9 \cdot 10^{-3}$
$2.5 \cdot 10^{-4}$	50	$40 \cdot 10^2$	$20.0 \cdot 10^{-3}$
$2 \cdot 10^{-4}$	44	$50 \cdot 10^2$	$22.7 \cdot 10^{-3}$
$1.5 \cdot 10^{-4}$	36	$66.6 \cdot 10^2$	$27.7 \cdot 10^{-3}$
$1 \cdot 10^{-4}$	15	$100 \cdot 10^2$	$66.6 \cdot 10^{-3}$

v ($\mu\text{l CO}_2 / 0.1 \text{ c.c. E} / 10 \text{ min.}$)

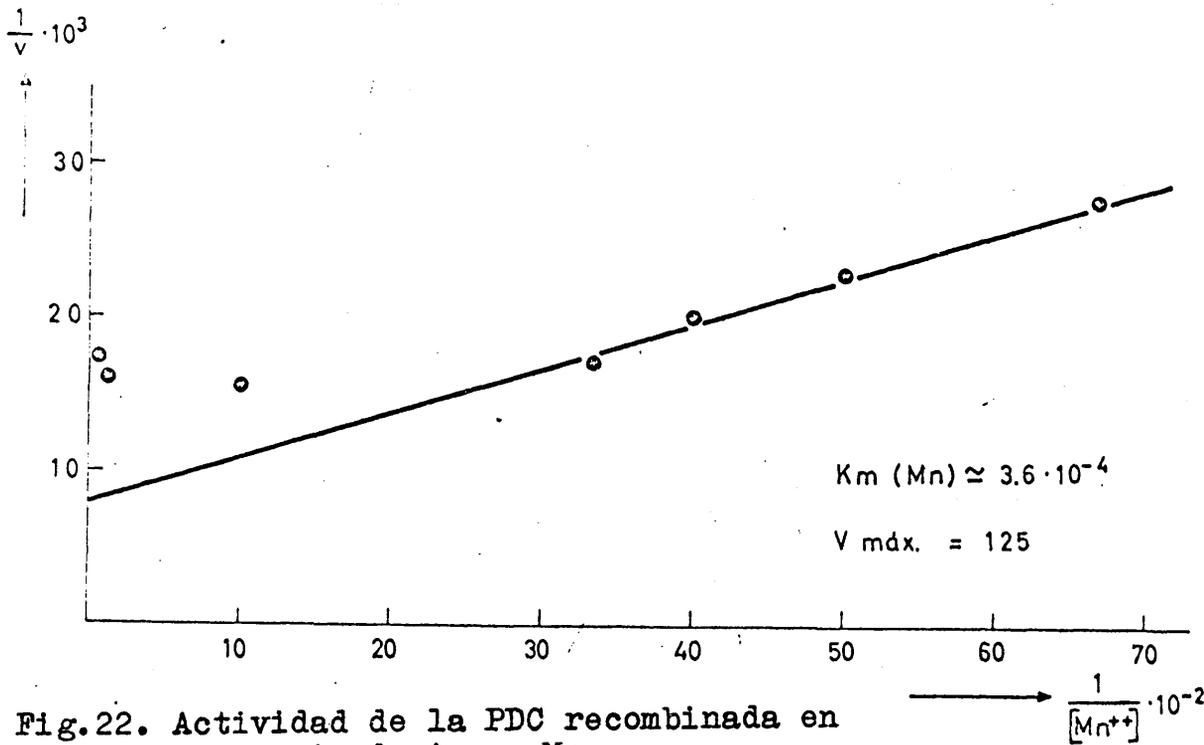
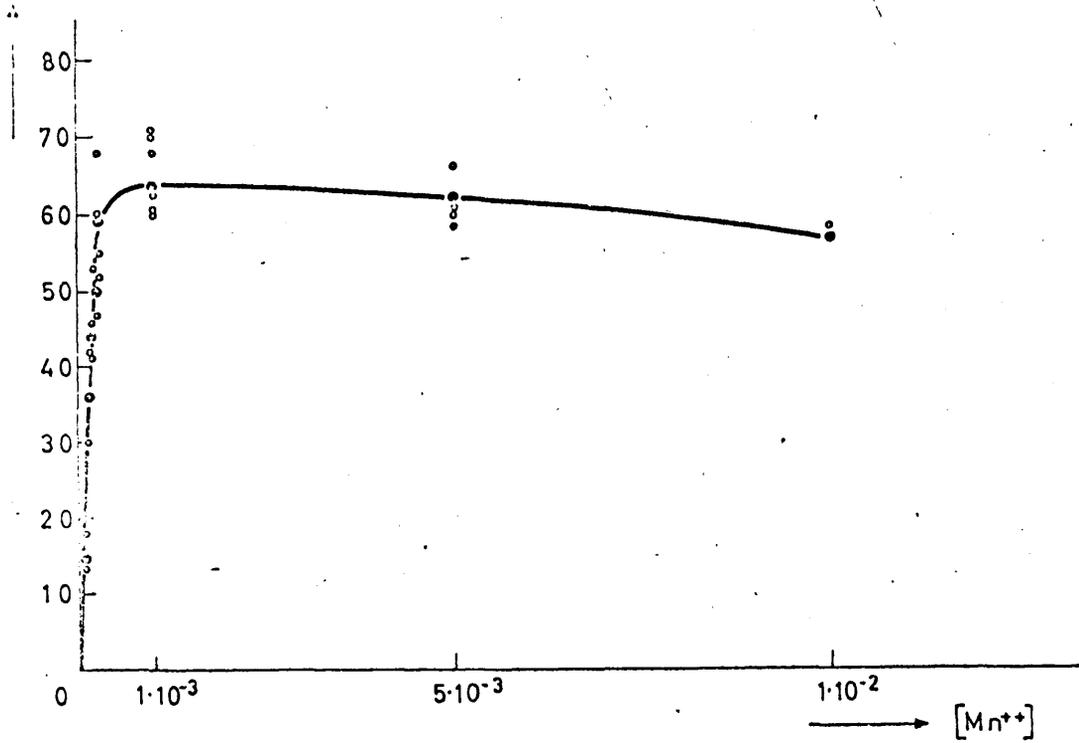


Fig.22. Actividad de la PDC recombinaada en presencia de iones Mn.

De las experiencias anteriores concluimos:

1. El ión Mn actúa como ión metal activador a concentraciones inferiores a $3 \cdot 10^{-4}$.
2. La K_m obtenida, en el estudio de la cinética de recombinación, ha resultado ser $3.6 \cdot 10^{-4}$, de análogo valor al obtenido en el caso del Mg.
3. Se observa inhibición en el intervalo de concentraciones ensayadas: $1 \cdot 10^{-2}$ - $1 \cdot 10^{-3}$. Este tipo de inhibición, en el que se presentan desviaciones en la linearidad a altas concentraciones de sustrato -disminuyendo la actividad con el aumento de concentración- parece indicar que, a determinadas concentraciones, este metal activador puede actuar como inhibidor. Uno de los posibles modos de tal inhibición puede ser la posibilidad del metal de unirse separadamente a dos lugares del enzima: activando en uno de los casos (en un comportamiento análogo al Mg), e inhibiendo en el otro. Esta inhibición pudiera ser: indirecta, modificando de algún modo la configuración o bien directa, bloqueando grupos (-SH, por ejemplo) fundamentales en la fijación del sustrato, sugerencia que se verá apoyada posteriormente.
4. También se ha observado la existencia de un pH de recombinación diferente al de descarboxilación.
5. La curva de recombinación, de campana, no es tampoco acusada. Presenta un máximo a un pH 6.95 conservando, sin embargo, el 80% de la actividad a pHs 6.6 y 7.3. Estos resultados nos llevan a las mismas conclusiones consideradas en el caso del Mg.

333. Particularidades del ión Be.

Solución inicial de SO_4Be : 1.5M en tampón maleato (d.m.) 0:10
+ sol. de NaOH conc. (pH=5.38).

Diluciones (1/25 \rightarrow 1/250,000): a partir de la solución inicial, en tampón maleato (d.m.) 2:8 (diluciones 1/25 \rightarrow 1/100) y t.maleato 1:9 (diluciones 1/100 \rightarrow 1/250,000). (pH: 6.62 -6.9, según las diluciones).

El carácter competitivo de la inhibición fue puesto de manifiesto mediante la representación de Hunter y Downs ($[\text{I}] \cdot v_i/v - v_i$ vs. $[\text{S}]$) correspondiente al valor de $\alpha = \infty$ (siendo α el factor que da una medida directa de la influencia del inhibidor en el coeficiente de disociación del complejo enzima-sustrato), y mediante la doble representación de recíprocos de Lineweaver y Burk, con una intersección común sobre el eje de ordenadas, indicando inhibición nula a concentración de sustrato infinita.

Las expresiones para el cálculo de la constante de inhibición, K_i , han sido

$$K_i = K_m \cdot \frac{[\text{I}]}{\left(\frac{v}{v_i} - 1\right)(K_m + [\text{S}])}$$

$$K_i = [\text{I}] \cdot \frac{v_i (V - v)}{V (v - v_i)}$$

deducidas de las ecuaciones generales.

Tabla XXXI. Influencia de la conc. de iones Be sobre la actividad de la PDC re combinada con diferentes concentraciones de Mg⁺⁺ (incubación conjunta de los iones metal).

Condiciones manométricas: contenido por vaso de Warburg

	vol.	Molaridad de la solución	Conc.	Conc.	T.M(d.m.) <u>sol.I</u> <u>sol.II</u>
	cc.		moles/l	γ/vaso	
Solución de Mg (a partir de Mg 1.5M en sol.II) en T.M. (d.m.) 0.7:9.3	0.5	0.03 0.015 0.003	5.10 ⁻³ 2.5 10 ⁻³ 5.10 ⁻⁴		
Sol. de Be (en las condiciones ya especificadas).	0.5	0.06 ↓ 0.000006	1.10 ⁻² ↓ 1.10 ⁻⁶		
Apo-pirúvico descarboxilasa en T.M. (d.m.) 0:10	1.0				
Sol. de DPT (200γ/cc.) en T.M. (d.m.) 0:10	0.5		5.9 10 ⁻⁵	100	
T. maleato(d.m.)	0.5				4:6

Mezcla: 3.0cc. con un pH de recombinación de 6.7

Piruvato Na en T.M (d.m.) esp. 8:2	0.5		1.42 10 ⁻¹		
------------------------------------	-----	--	-----------------------	--	--

Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

Tabla XXXII. Influencia de la conc. de iones Be sobre la actividad de la C recombinaada con concs. de Mg^{++} de $5 \cdot 10^{-4} M$ (incubación conjunta de los iones metal).

$[Mg^{++}]/[Be^{++}]$	0.05	0.2	0.5	1	5	10	50	100	500
$[Be^{++}]$	$1 \cdot 10^{-2}$	$2.5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-6}$
Experimento	% de inhibición								
1	81		32		5		(5)		
2						1	(6)	(6)	7
3					8	(10)	(11)	2	(1)
4	83	44			4				
5	75								
6	79	42		8	8				
7	76	42	24	16					
8			20	13	8	(6)	8		
9					6		0	(7)	(2)
10					5	(3)	5	5	
Valor medio	78	43	27	12	6	-	-	-	-

(Los valores entre paréntesis representan activaciones).

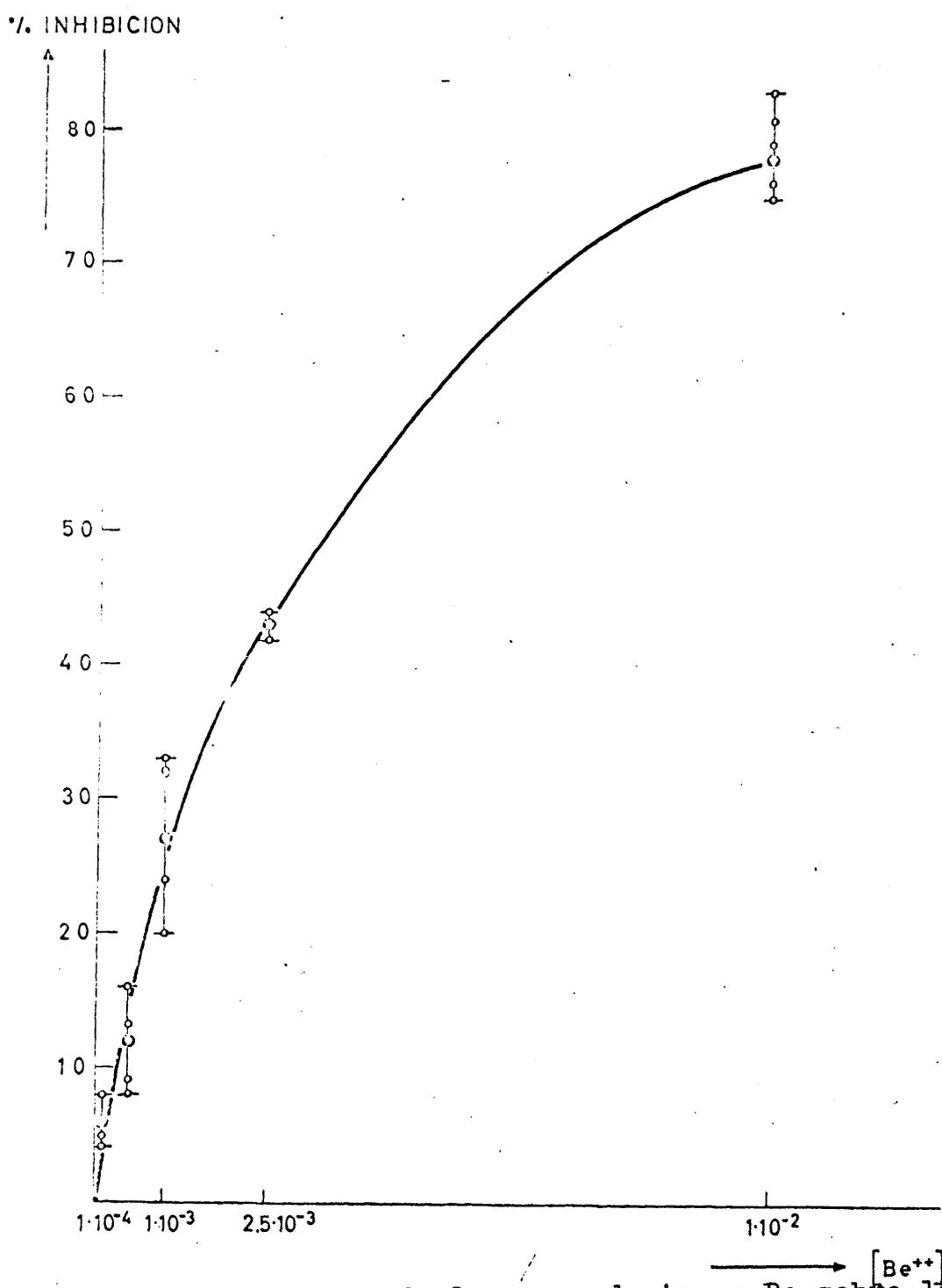


Fig.23. Influencia de la conc. de iones Be^{++} sobre la actividad de la PDC re combinada (Mg^{++} : $5 \cdot 10^{-4}$ M).

%. INHIBICION

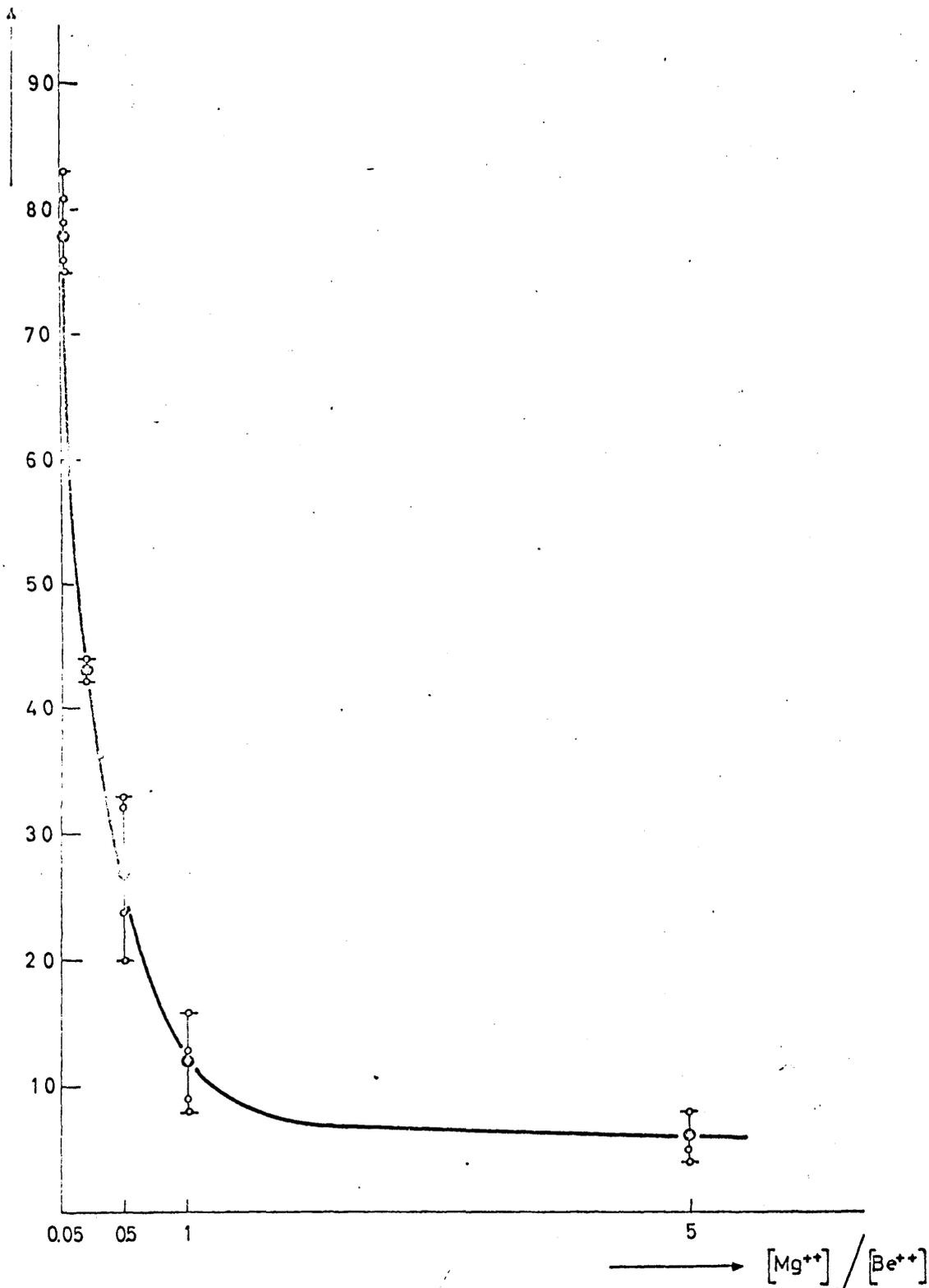


Fig.24. Actividad de la PDC re combinada ($[Mg^{++}]$: $5 \cdot 10^{-4}M$) en presencia de concentraciones variables de iones Be, en función de la relación $[Mg^{++}]/[Be^{++}]$.

Tabla XXXIII. Influencia de la conc. de iones Be ($2.5 \cdot 10^{-3}$) sobre la actividad de la PDC re-combinada con diferentes concentraciones de Ca^{++} : $5 \cdot 10^{-3}$, $2.5 \cdot 10^{-3}$ y $5 \cdot 10^{-4}$.

$1/[Mg^{++}]$	20.10						40.10						200.10					
$[Mg^{++}]$	$5 \cdot 10^{-3}$						$2.5 \cdot 10^{-3}$						$5 \cdot 10^{-4}$					
Exper.	v	v_i	%I	K_i	$1/v$ $1/v_i$	v	v_i	%I	K_i	$1/v$ $1/v_i$	v	v_i	%I	K_i	$1/v$ $1/v_i$			
1	120 111	106 81	8	$2.0 \cdot 10^{-3}$	$8.3 \cdot 10^{-3}$ $9.0 \cdot 10^{-3}$	106 81	24	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$9.4 \cdot 10^{-3}$ $12.3 \cdot 10^{-3}$	71	71			$14.0 \cdot 10^{-3}$				
2	111 102	100 85	8	$1.9 \cdot 10^{-3}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$ $9.8 \cdot 10^{-3}$	100 85	15	$1.8 \cdot 10^{-3}$	$10.0 \cdot 10^{-3}$ $11.7 \cdot 10^{-3}$	64 40	37	37	$1.7 \cdot 10^{-3}$	$15.6 \cdot 10^{-3}$ $25.0 \cdot 10^{-3}$				
3	111	106 92			$9.0 \cdot 10^{-3}$	106 92	14	$2.1 \cdot 10^{-3}$	$9.4 \cdot 10^{-3}$ $10.8 \cdot 10^{-3}$	71 37	48	48	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$14.0 \cdot 10^{-3}$ $27.0 \cdot 10^{-3}$				
4	101	108 89			$9.9 \cdot 10^{-3}$	108 89	18	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$9.2 \cdot 10^{-3}$ $11.2 \cdot 10^{-3}$	71 37	48	48	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$14.0 \cdot 10^{-3}$ $27.0 \cdot 10^{-3}$				
5	111 100	105 89	10	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$ $10.0 \cdot 10^{-3}$	105 89	15	$1.7 \cdot 10^{-3}$	$9.5 \cdot 10^{-3}$ $11.2 \cdot 10^{-3}$	71 36	49	49	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$14.0 \cdot 10^{-3}$ $27.7 \cdot 10^{-3}$				
6	110 90	103 80	18	$0.8 \cdot 10^{-3}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$ $11.1 \cdot 10^{-3}$	103 80	23	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$9.7 \cdot 10^{-3}$ $12.5 \cdot 10^{-3}$	71 41	43	43	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$14.0 \cdot 10^{-3}$ $24.3 \cdot 10^{-3}$				
7	110 98	105 89	11	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$ $10.2 \cdot 10^{-3}$	105 89	15	$1.7 \cdot 10^{-3}$	$9.5 \cdot 10^{-3}$ $11.2 \cdot 10^{-3}$	71 41	43	43	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$14.0 \cdot 10^{-3}$ $24.3 \cdot 10^{-3}$				
Valor medio	111 100	105 86	11	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$9.0 \cdot 10^{-3}$ $10.0 \cdot 10^{-3}$	105 86	18	$1.6 \cdot 10^{-3}$	$9.5 \cdot 10^{-3}$ $11.6 \cdot 10^{-3}$	71 41	45	45	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$14.0 \cdot 10^{-3}$ $25.9 \cdot 10^{-3}$				

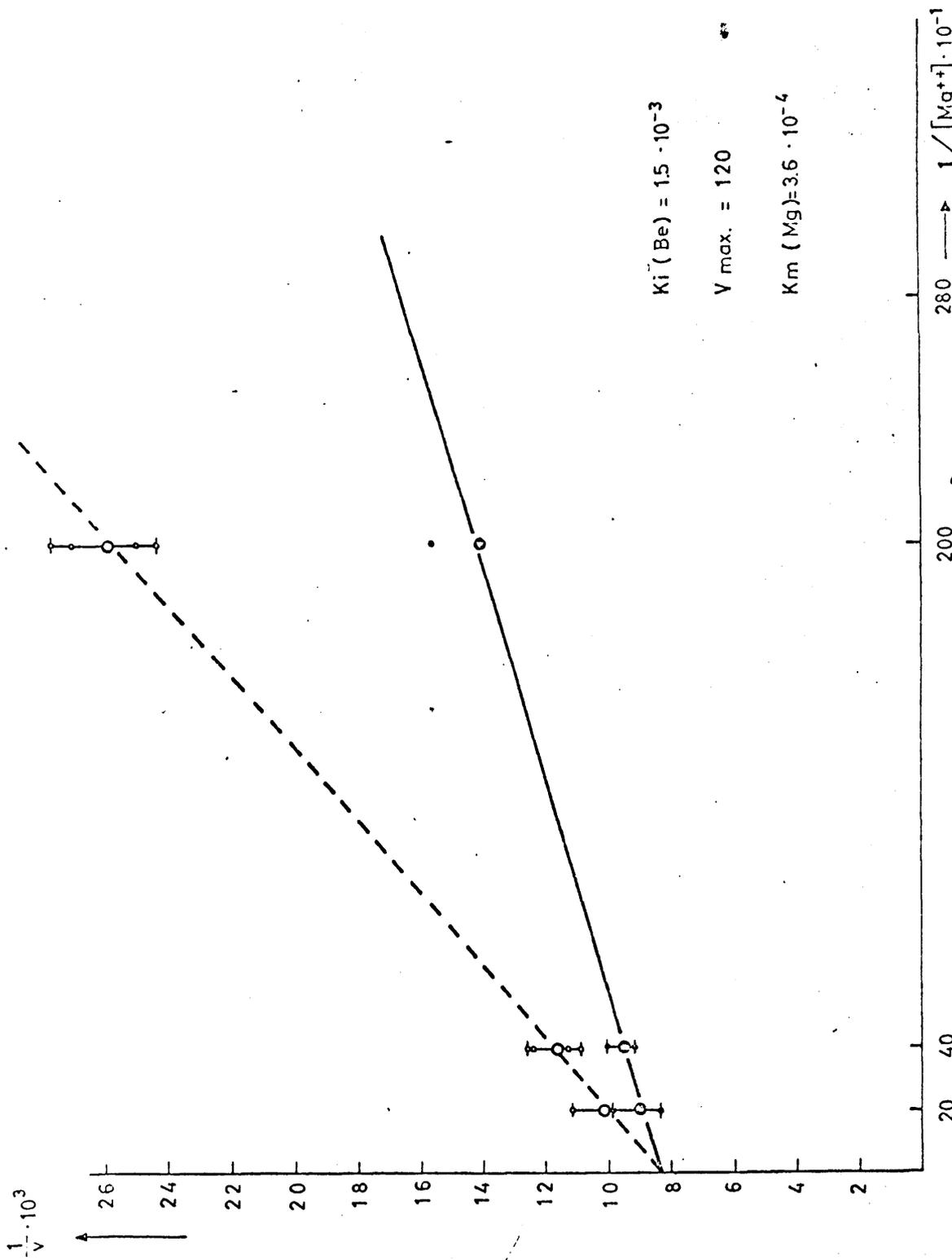


Fig.25. Influencia de la conc. de iones Be ($2.5 \cdot 10^{-3}$ M) sobre la actividad de la PDC combinada con diferentes concs. de Mg^{++} : $5 \cdot 10^{-3}$, $2.5 \cdot 10^{-3}$ y $5 \cdot 10^{-4}$.

De las experiencias anteriores concluimos:

1. El ión Be no actúa como ión metal activador a ninguna concentración ($1 \cdot 10^{-2}$ - $1 \cdot 10^{-6}$).
2. Para una concentración de iones Mg fija, el % de inhibición es función de la concentración del ión Be.
3. La inhibición, por la presencia de iones Be, de la pirúvico descarboxilasa recombinada con diferentes concentraciones de iones Mg, cuya dependencia de la concentración del ión Be ya hemos señalado, es asimismo dependiente de la concentración del ión Mg.
4. La inhibición, de la pirúvico descarboxilasa recombinada, por la presencia del ión Be, es de tipo competitivo, siendo la K_i igual a $1.5 \cdot 10^{-3}$.

334. Particularidades del ión Cd.

Solución inicial de SO_4Cd : 1.5M en tampón maleato (d.m.) 0:10
(pH=5.35).

Diluciones (1/25 \rightarrow 1/25,000): a partir de la solución inicial,
en tampón maleato (d.m.) 0.7:9.3 (di-
lución 1/25) y t. maleato (d.m.) 1:9
(diluciones 1/250 \rightarrow 1/25.000).
(pH de las diluciones 6.7).

Actividad de la PDC re combinada en presencia de concentracio- nes variables del ión metal.

Ensayos previos de inhibición de la actividad de la
pirúvico descarboxilasa re combinada, por la presencia de deter-
minados iones metal (Cd, Co, Ni), pusieron de manifiesto el ca-
rácter inhibidor de estos metales a conc. superior a $1 \cdot 10^{-4}$.

Extrapolando los valores de la actividad vs. $[\text{Mg}^{++}]$,
para concentraciones de este metal inferiores a $1 \cdot 10^{-4}$, se ob-
tienen los siguientes valores de actividad enzimática para la
pirúvico descarboxilasa re combinada

$[\text{Mg}^{++}]$	v	$1/[\text{Mg}^{++}]$	$1/v$
$5 \cdot 10^{-1}$	120	$0.002 \cdot 10^3$	$8.3 \cdot 10^{-3}$
$5 \cdot 10^{-3}$	111	$0.2 \cdot 10^3$	$9.0 \cdot 10^{-3}$
$2.5 \cdot 10^{-3}$	105	$0.4 \cdot 10^3$	$9.5 \cdot 10^{-3}$
$1 \cdot 10^{-3}$	87	$1 \cdot 10^3$	$11.5 \cdot 10^{-3}$
$5 \cdot 10^{-4}$	71	$2 \cdot 10^3$	$14.1 \cdot 10^{-3}$
$2 \cdot 10^{-4}$	43(extr.)	$5 \cdot 10^3$	$23.2 \cdot 10^{-3}$
$1 \cdot 10^{-4}$	27 "	$10 \cdot 10^3$	$37.5 \cdot 10^{-3}$
$2 \cdot 10^{-5}$	6 "	$50 \cdot 10^3$	$152.6 \cdot 10^{-3}$
$1 \cdot 10^{-5}$	3 "	$100 \cdot 10^3$	$299.6 \cdot 10^{-3}$

valores que no confieren muchas posibilidades (por falta de

sensibilidad en el método) a los estudios de recombinación, con la técnica de Warburg, a bajas concentraciones del ión metal. No obstante, fue estudiado el comportamiento del ión Ni cuyos resultados, apuntando a la capacidad activante de este metal a concentraciones inferiores a 1.10^{-4} , exponemos en su lugar. Resultados similares se encontraron con los iones Co y Cd, respectivamente.

Tabla XXXIV. Condiciones manométricas para la determinación del % de inhibición.

	vol.	Molaridad de la solución	Conc.	Conc.	T.M(d.M) <u>sol.I</u> <u>sol.II</u>
	cc.		moles/l	γ/vaso	
Solución de Mg (a partir de Mg 1.5M en sol.II) en T.M. (d.m.) 0.7:9.3	0.5	0.03 0.015 0.003	5.10^{-3} $2.5 10^{-3}$ 5.10^{-4}		
Sol. de Cd ⁺⁺ (en las condiciones ya especificadas).	0.5	0.06 ↓ 0.00006	1.10^{-2} ↓ 1.10^{-5}		
Apo-pirúvico des-carboxilasa en T.M.(d.m.) 0:10	1.0				
Sol. de DPT (200γ/cc.) en T.M.(d.m.) 0:10	0.5		$5.9 10^{-5}$	100	
T. maleato (d.m.)	0.5				5:5

Mezcla: 3.0cc. con un pH de recombinación de 6.7

Piruvato Na en T.M(d.m)esp. 8:2	0.5	1.0	$1.42 10^{-1}$		
---------------------------------	-----	-----	----------------	--	--

Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

Tabla XXXV. Influencia de la conc. del ión Cd sobre la actividad de la PDC recombinada con diferentes concentraciones de Mg^{++} : $5 \cdot 10^{-3}$ (rojo), $2.5 \cdot 10^{-3}$ (verde) y $5 \cdot 10^{-4}$ (negro).

[Cd^{++}]	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$1.6 \cdot 10^{-4}$	$5.6 \cdot 10^{-4}$	$1.52 \cdot 10^{-4}$	$1.44 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Exper.	% inhibición											
1	100	92									(4) 13,0 7	(8)
2			81 84 79								0 (4) 15	
3	98	95	91								6	
4				95,90				26,17	12		16,9	
5					91	87	89	62				
6							30,25	18,21	4,14		8,10	
7					22	13	17	18				
8					27	24		19				
9			95	27	27	49		11				
10			98	90	92	35,33		15			7	6
			94,94	90,89	65,79							

....

Tabla XXXV. Influencia de la conc. del ión Cd sobre la actividad de la PDC recombinada con diferentes concentraciones de Mg^{++} : $5 \cdot 10^{-3}$ (rojo), $2.5 \cdot 10^{-3}$ (verde) y $5 \cdot 10^{-4}$ (negro).

$[Cd^{++}]$ (1)	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$1.6 \cdot 10^{-4}$	$1.52 \cdot 10^{-4}$	$1.4 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$1.14 \cdot 10^{-4}$	$1.08 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$
Exper.	% inhibición									
I				100	97	97	89			0
II								78	2	
III								78	41	
IV								98	90	
V								22	12	(21)
VI	98	100	93							0
VII		100								18
VIII	96		100				98	97		17
IX							100			14
X										12
										9
										6

(1) diferente solución de iones Cd.

% INHIBICION

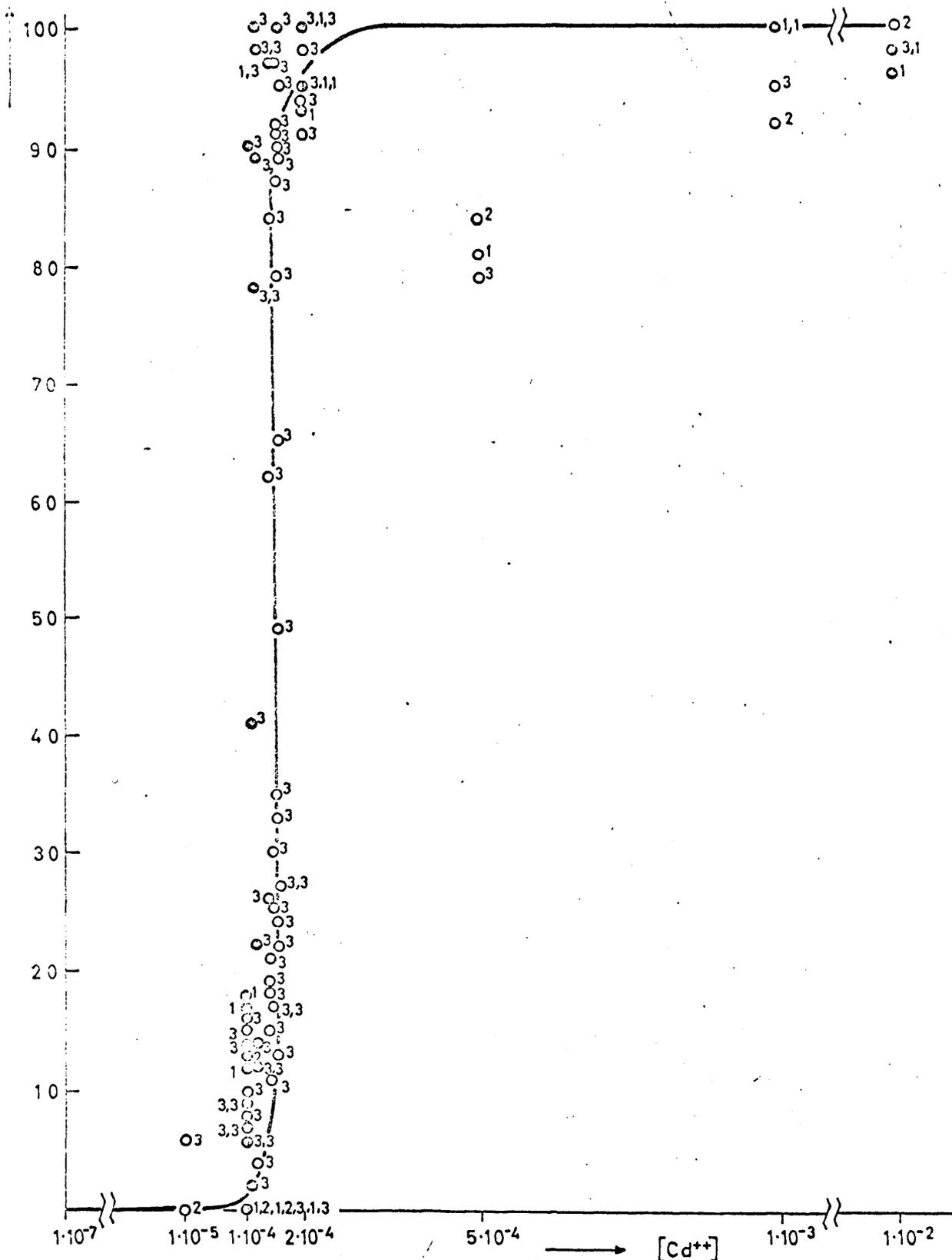


Fig.26. Influencia de la cono. del ión Cd sobre la activ. de la PDC recombineda con diferentes concs. de Mg^{++} . (1,2 y 3 corresponden a concentraciones de Mg^{++} de $5 \cdot 10^{-3}$, $2.5 \cdot 10^{-3}$ y $5 \cdot 10^{-4}$, respectivamente; o y e representan los resultados de cada una de las dos series de soluciones del ión metal preparadas).

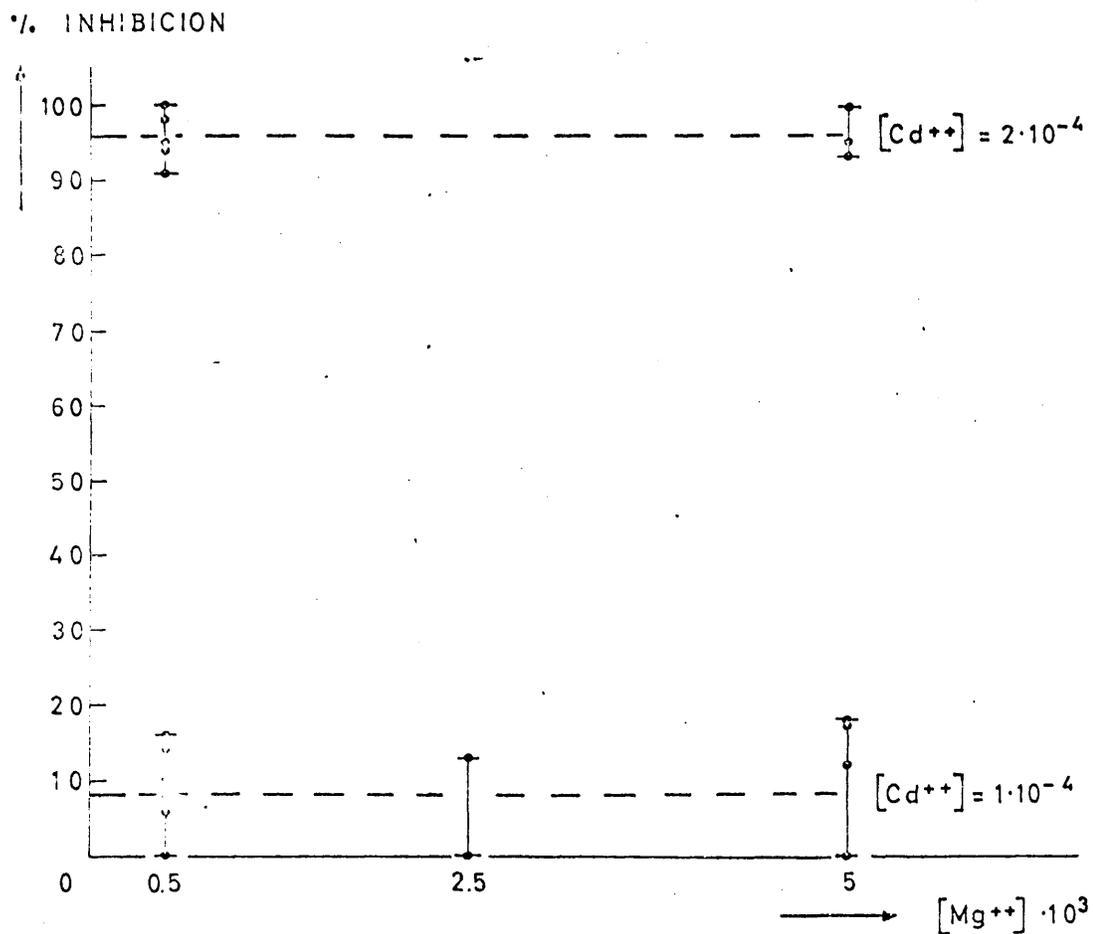


Fig.27. Actividad de la PDC recombinaada con diferentes concs. de Mg⁺⁺, en presencia de concentraciones variables de iones Cd.

Tabla XXXVI. Actividad de la PDC recombinada con diferentes concs. de Mg^{++} y en presencia de concentraciones variables del ión Cd, en función de la relación $[Mg^{++}]/[Cd^{++}]$.

$[Mg^{++}]/[Cd^{++}]$	% inhibición									
$0.05 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-2}}$	98									
$0.25 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-2}}$	100									
$0.5^+ = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-2}}$	98 96									
$0.5^+ = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-3}}$	95									
$1 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{5 \cdot 10^{-4}}$	79									
$\frac{5 \cdot 10^{-3}}{2 \cdot 10^{-3}}$	98									
$2.5 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-3}}$	92									
$\frac{5 \cdot 10^{-4}}{2 \cdot 10^{-4}}$	91	95	98	94	94	100	100			
$3.1 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.6 \cdot 10^{-4}}$	95	90	27	90	90	89	100			
$3.2 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.56 \cdot 10^{-4}}$	91	22	27	92	65	79				
$3.3 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.52 \cdot 10^{-4}}$	87	13	24	49	35	33	97			
$3.5 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.44 \cdot 10^{-4}}$	89	30	25	17						
$3.6 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.4 \cdot 10^{-4}}$	26	17	62	18	21	18	19	11	15	97
$4.2 = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{1.2 \cdot 10^{-3}}$	97									
$4.2 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.2 \cdot 10^{-4}}$	12	11	4	89	98	100				

....

%. INHIBICION

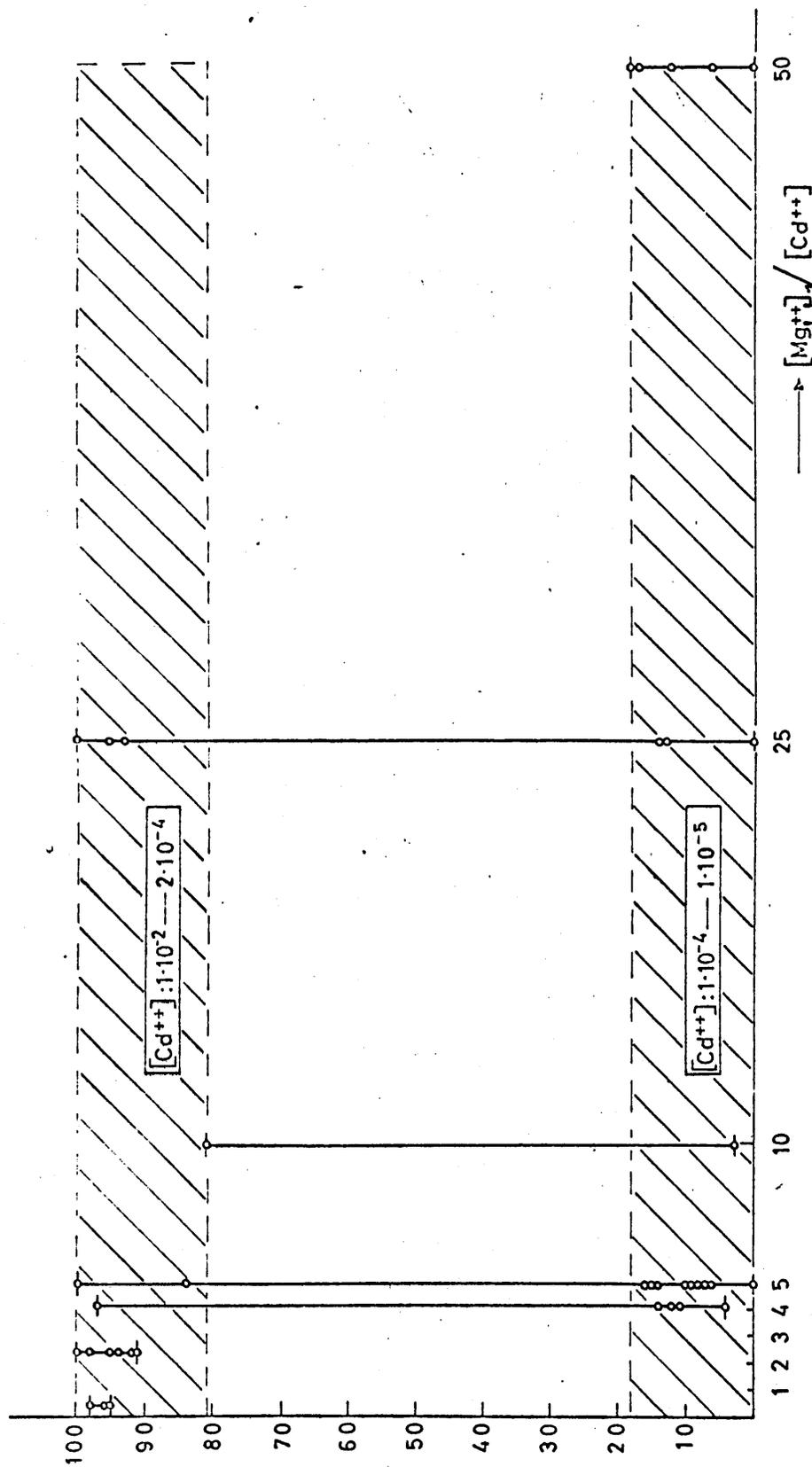


Fig.28. Actividad de la PDC recombinada con diferentes concs. de Mg⁺⁺ y en presencia de concentraciones variables del ión Cd, en función de la relación $\frac{[Mg^{++}]}{[Cd^{++}]}$

De las experiencias anteriores concluimos:

1. Mediante la técnica manométrica de Warburg, no es posible hacer estudios de recombinación con Cd como ión metal. El carácter inhibitorio de las concentraciones de Cd^{++} superiores a $1 \cdot 10^{-4}$ obligaría a utilizar concentraciones inferiores del metal, que se traducirían en actividades enzimáticas casi despreciables para la sensibilidad del método.
2. Para una concentración de Mg^{++} fija, el % de inhibición es función de la concentración del ión Cd.
3. La inhibición, por la presencia de Cd^{++} , de la pirúvico descarboxilasa recombinada con diferentes concentraciones de Mg^{++} , cuya dependencia de la conc. del Cd^{++} ya hemos señalado, es independiente de la concentración del Mg^{++} .
4. La actividad de la pirúvico descarboxilasa recombinada a cualquier conc. de Mg^{++} , experimenta, por la presencia del Cd^{++} , un cambio brusco, pasando de aproximadamente cero a 100% de inhibición para concs. de Cd^{++} de $1 \cdot 10^{-4}$ y $2 \cdot 10^{-4}$, respectivamente, en las condiciones ensayadas.
5. En la valoración del % de inhibición en función de las concentraciones relativas de los iones Mg y Cd, se observa una manifiesta discrepancia de comportamiento para una misma relación $[\text{Mg}^{++}]/[\text{Cd}^{++}]$ cuando en dicha relación las concs. del inhibidor no quedan incluidas en los mismos intervalos superiores o inferiores a $2 \cdot 10^{-4}$ y $1 \cdot 10^{-4}$; en cualquier otro caso hay concordancia. (Véase en la Tabla XXXVI las relaciones destacadas con uno, dos o tres asteriscos).

335. Particularidades del ión Co.

Solución inicial de SO_4Co : 1.5M en tampón maleato (d.m.) 0:10
(pH=6.0). Disolución lenta ($\approx 12hr.$)
aunque total.

Diluciones ($1/25 \rightarrow 1/25.000$): a partir de la solución inicial,
en tampón maleato (d.m.) 1:9.
(pH: 6.5-6.7 según las diluciones).

Tabla XXXVII. Condiciones manométricas para la determinación
del % de inhibición.

	vol. cc.	Molaridad de la solución	Conc. moles/l	Conc. γ /vaso	T.M(d.m.) $\frac{\text{sol.I}}{\text{sol.II}}$
Solución de Mg (a partir de Mg 1.5M en sol.II) en T.M. (d.m.) 0.7:9.3.	0.5	0.03 0.015 0.003	$5 \cdot 10^{-3}$ $2.5 \cdot 10^{-3}$ $5 \cdot 10^{-4}$		
Sol. de Co (en las condiciones ya es- pecificadas).	0.5	0.06 \downarrow 0.00006	$1 \cdot 10^{-2}$ \downarrow $1 \cdot 10^{-5}$		
Apo-pirúvico des- carboxilasa en T.M.(d.m.) 0:10	1.0				
Sol. de DPT (200 γ /cc.) en T.M.(d.m.) 0:10.	0.5		$5.9 \cdot 10^{-5}$	100	
T. maleato (d.m.)	0.5				5:5

Mezcla: 3.0cc. con un pH de recombinación de 6.7

Piruvato Na en T.M(d.m)esp. 8:2	0.5	1.0	$1.42 \cdot 10^{-1}$		
------------------------------------	-----	-----	----------------------	--	--

Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

Tabla XXXVIII. Influencia de la conc. del ión Co sobre la actividad de PDC recombinada con diferentes conc de Ca^{++} : $5 \cdot 10^{-3}$ (rojo), $2.5 \cdot 10^{-3}$ (verde) y $5 \cdot 10^{-4}$ (negro).

$[\text{Co}^{++}]$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$1.8 \cdot 10^{-4}$	$1.6 \cdot 10^{-4}$	$1.4 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Exper.	% inhibición										
1	100	97								0	(4)
2			100		80					0	(4)
3	100	91			81	50	0	0	0	0	0
4					74	45	0	0	0	0	
5						21,21					
						12,16					
						37,25					
6						27,29					
						30					
						57,66					
7					85	56,51				7	
					89	66,22				0,7	

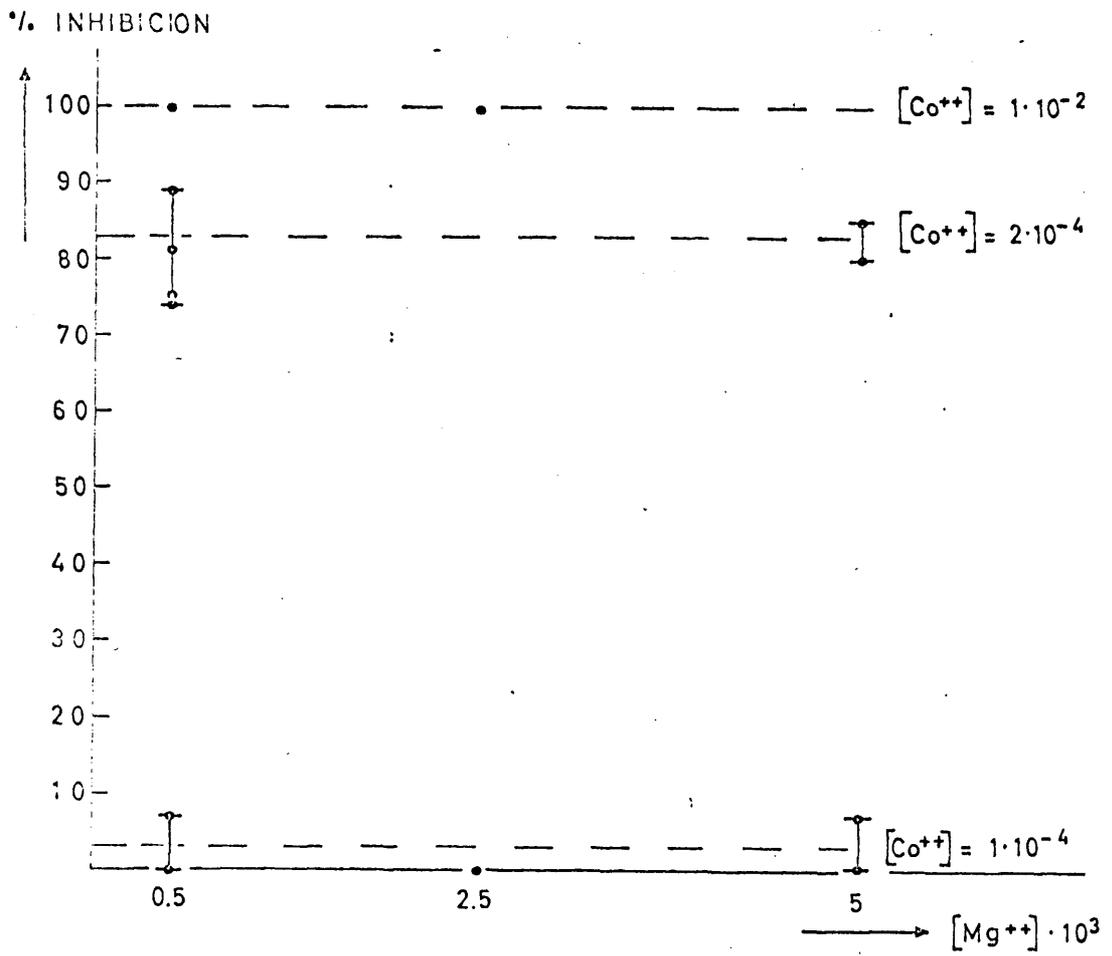


Fig.30. Actividad de la PDC recombineda con diferentes concs. de Mg^{++} , en presencia de concentraciones variables de iones Co.

Tabla XXXIX. Actividad de la PDC recombinada con diferentes concs. de Mg^{++} y en presencia de concentraciones variables del ión Co, en función de la relación $[Mg^{++}]/[Co^{++}]$.

$[Mg^{++}]/[Co^{++}]$	% inhibición							
$0.05 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-2}}$	100							
$0.25 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-2}}$	100							
$0.5 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-3}}$	91							
$2.5 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-3}}$	97							
$2.5 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{2 \cdot 10^{-4}}$	75	81	74	89				
$2.8 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.8 \cdot 10^{-4}}$	50	45	37	25	57	66	66	22
$3.1 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.6 \cdot 10^{-4}}$	0	0						
$3.6 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.4 \cdot 10^{-4}}$	0	0						
$4.2 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1.2 \cdot 10^{-4}}$	0	0						
$5 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-4}}$	0	0	7	0				
$8.5 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{3 \cdot 10^{-4}}$	100							
$14 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1.8 \cdot 10^{-4}}$	12	16	30					
$25 = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{2 \cdot 10^{-4}}$	80	85						
$25 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-4}}$	0	(4)						

....

Tabla XXXIX. Actividad de la PDC re combinada con diferentes concs. de Mg^{++} y en presencia de concentraciones variables del ión Co, en función de la relación $[Mg^{++}]/[Co^{++}]$.

$[Mg^{++}]/[Co^{++}]$	% inhibición					
28 = $\frac{5 \cdot 10^{-3}}{1.8 \cdot 10^{-4}}$	21	21	27	29	56	51
50 = $\frac{5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-4}}$	0	7				
250 = $\frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-5}}$	(4)					

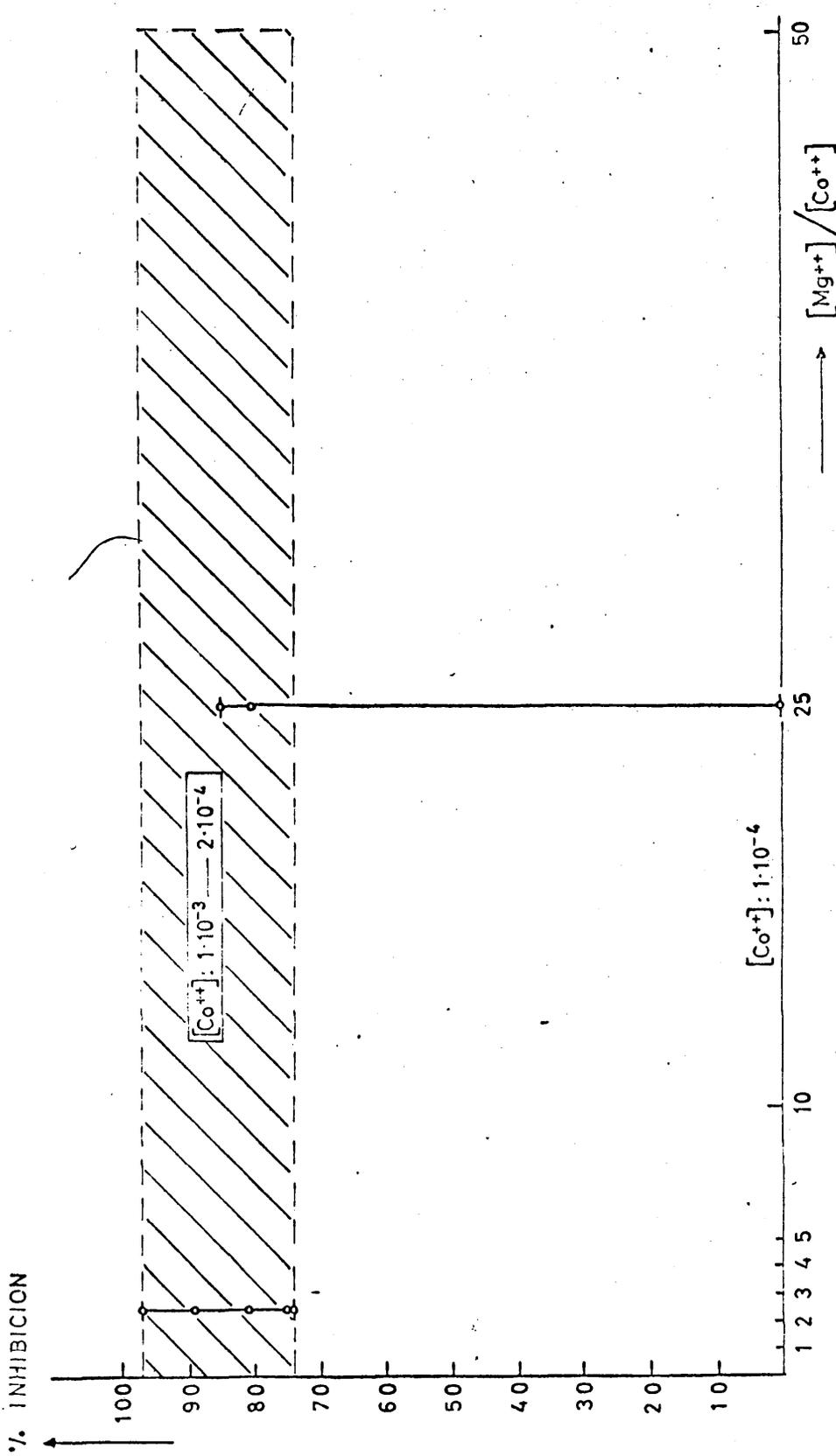


Fig.31. Actividad de la PDC recombinada con diferentes concs. de Mg^{++} y en presencia de concentraciones variables del ión Co, en función de la relación $[Mg^{++}]/[Co^{++}]$.

De las experiencias anteriores concluimos:

1. Mediante la técnica de Warburg no es posible hacer estudios de recombinación con Co como ión metal. El carácter inhibitor de las concentraciones de Co^{++} superiores a 1.10^{-4} obligaría a utilizar concentraciones inferiores del metal, que se traducirían en actividades enzimáticas casi despreciables para la sensibilidad del método.
2. Para una concentración de Mg^{++} fija, el % de inhibición es función de la concentración del ión Co.
3. La inhibición, por la presencia de Co^{++} , de la pirúvico descarboxilasa recombinada con diferentes concs. de Mg^{++} cuya dependencia de la concentración del Co^{++} ya hemos señalado, es independiente de la concentración del Mg^{++} .
4. La actividad de la pirúvico descarboxilasa recombinada a cualquier concentración de Mg^{++} experimenta, por la presencia del Co^{++} , un cambio brusco, pasando de aproximadamente cero a 100% de inhibición para concentraciones de Co^{++} de $1.6 \cdot 10^{-4}$ y $2 \cdot 10^{-4}$, respectivamente, en las condiciones ensayadas.
5. En la valoración del % de inhibición en función de las concentraciones relativas de los iones Mg y Co, se observa una manifiesta discrepancia de comportamiento para una misma relación $[\text{Mg}^{++}/\text{Co}^{++}]$ cuando en dicha relación las concentraciones del inhibidor no quedan incluidas en los mismos intervalos superiores o inferiores a $2 \cdot 10^{-4}$ y $1.6 \cdot 10^{-4}$; en cualquier otro caso hay concordancia. (Véase en la Tabla XXXIX las relaciones destacadas con uno y dos asteriscos).

336. Particularidades del ión Ni.

Solución inicial de SO_4Ni : 1.5M en tampón maleato (d.m.) 0:10
(pH=5.85).

Diluciones (1/25 \rightarrow 1/250.000): a partir de la solución inicial
en tampón maleato (d.m.) 0.7:9.3.
(pH: 6.75-6.9, según las diluciones).

Tabla XL. Condiciones manométricas para la determinación del %
de inhibición.

	vol. cc.	Molaridad de la solución	Conc. moles/l	Conc. γ/vaso	T.M(d.m.) $\frac{\text{sol.I}}{\text{sol.II}}$
Solución de Mg (a partir de Mg 1.5M en sol.II) en T.M. (d.m.) 0.7:9.3.	0.5	0.03 0.015 0.003	$5 \cdot 10^{-3}$ $2.5 \cdot 10^{-3}$ $5 \cdot 10^{-4}$		
Sol. de Ni (en las condiciones ya especificadas).	0.5	0.06 ↓ 0.000006	$1 \cdot 10^{-2}$ ↓ $1 \cdot 10^{-6}$		
Apo-pirúvico des-carboxilasa en T.M.(d.m.) 0:10	1.0				
Sol. de DPT (200γ/cc.) en T.M.(d.m.) 0:10.	0.5		$5.9 \cdot 10^{-5}$	100	
T.maleato (d.m.)	0.5				5:5

Mezcla: 3.0cc. con un pH de recombinación de 6.7

Piruvato Na en T.M(d.m)esp. 8:2	0.5	1.0	$1.42 \cdot 10^{-1}$		
---------------------------------	-----	-----	----------------------	--	--

Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

% INHIBICION

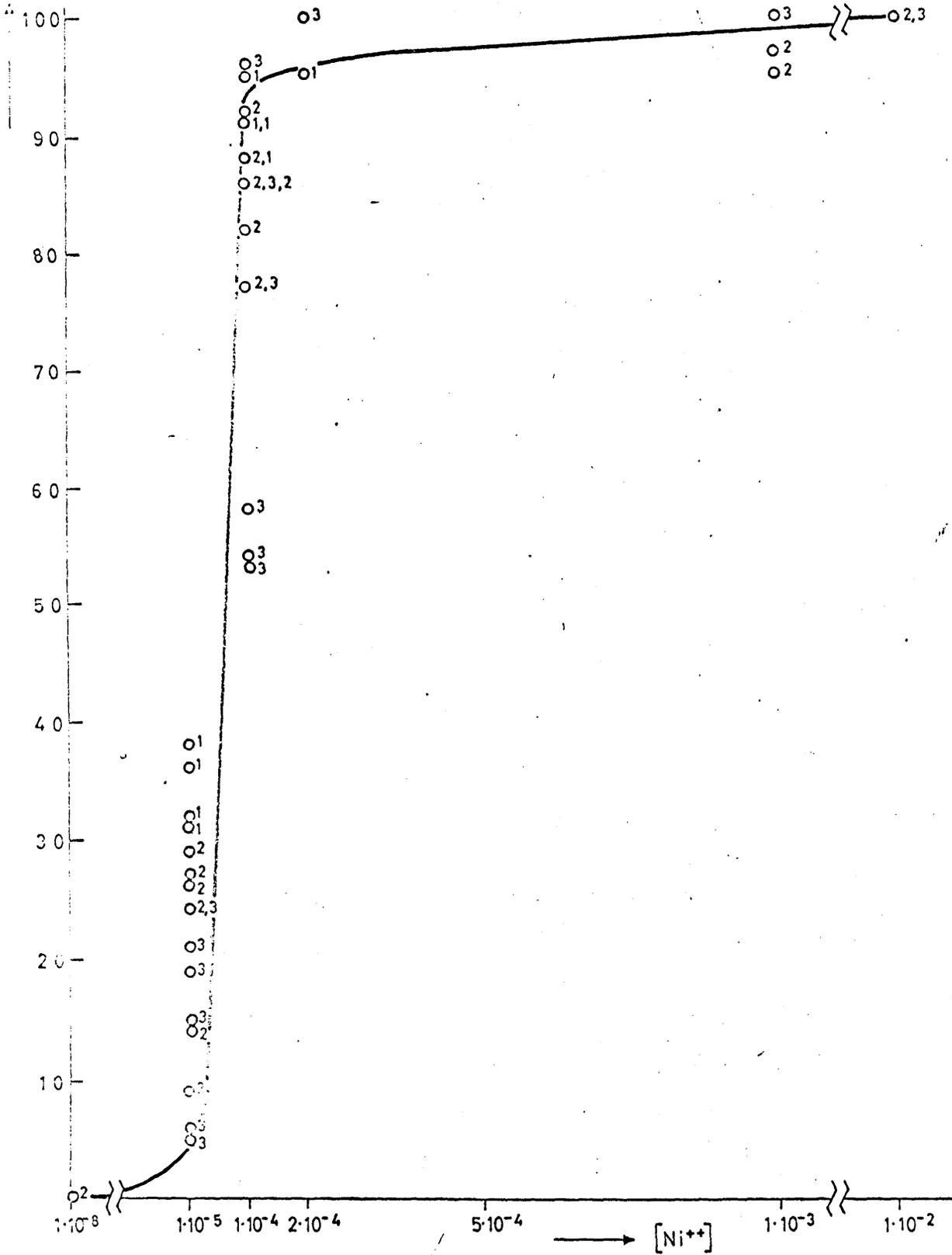


Fig.32. Influencia de la conc. del ión Ni sobre la activ. de la PDC recombinaada con diferentes concs. de Mg⁺⁺. (1,2 y 3 corresponden a concentraciones de Mg⁺⁺ de 5 · 10⁻³, 2.5 · 10⁻³ y 5 · 10⁻⁴, respectivamente).

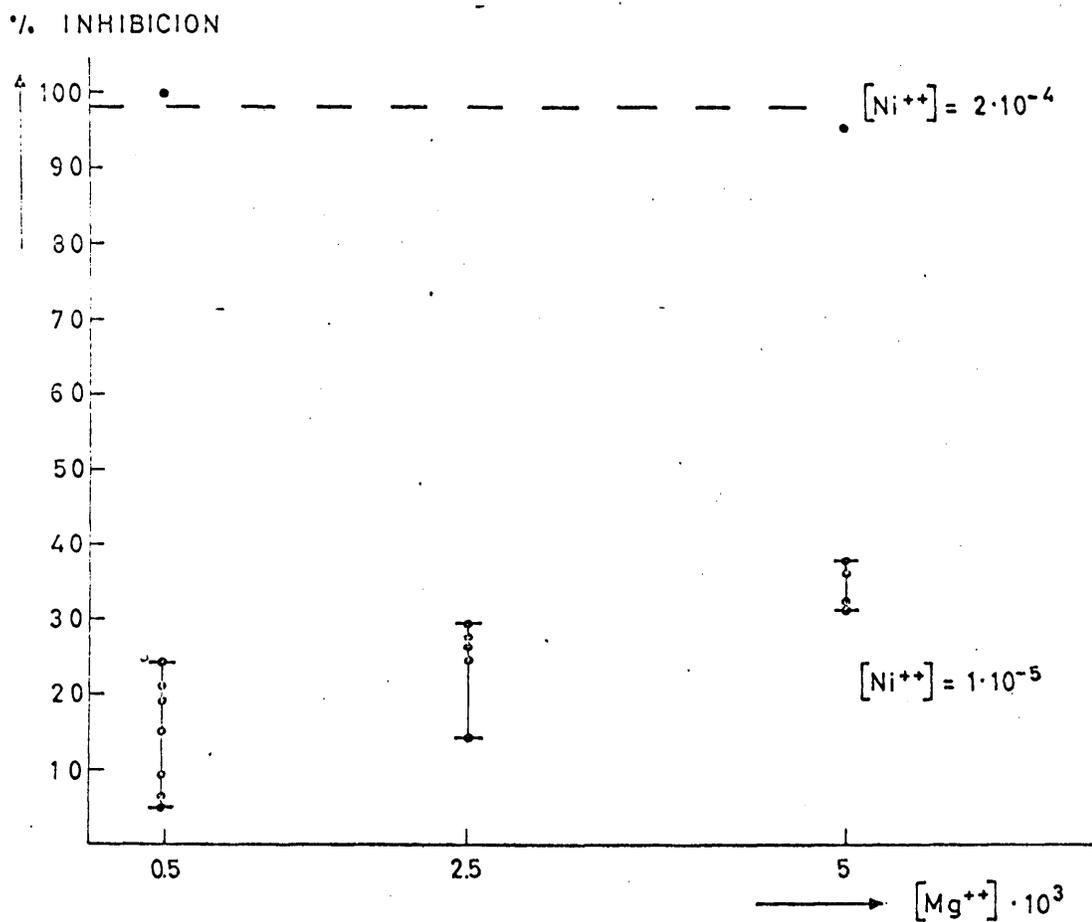


Fig.33. Actividad de la PDC re combinada con diferentes concs. de Mg^{++} , en presencia de concentraciones variables de iones Ni.

Tabla XLII. Actividad de la PDC recombinada con diferentes concentraciones de Mg^{++} y en presencia de concentraciones variables del ión Ni, en función de la relación $[Mg^{++}]/[Ni^{++}]$.

$[Mg^{++}]/[Ni^{++}]$	% inhibición						
$0.05 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-2}}$	100						
$0.25 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-2}}$	100	100					
$0.5 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-3}}$	100						
$2.5 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-3}}$	95	97					
$2.5 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{2 \cdot 10^{-4}}$	100						
$5 = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-4}}$	54	58	86	53	96	77	
$25^* = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{2 \cdot 10^{-4}}$	95						
$25^* = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-4}}$	77	82	88	86	86	92	
$50^{**} = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-4}}$	95	91	88	91			
$50^{**} = \frac{5 \cdot 10^{-4}}{1 \cdot 10^{-5}}$	9	6	24	21	5	19	15
$250 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-5}}$	14	27	26	29	24		
$500 = \frac{5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-5}}$	38	38	32	31	36		
$2.500 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-6}}$	8						
$250.000 = \frac{2.5 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-8}}$	2						

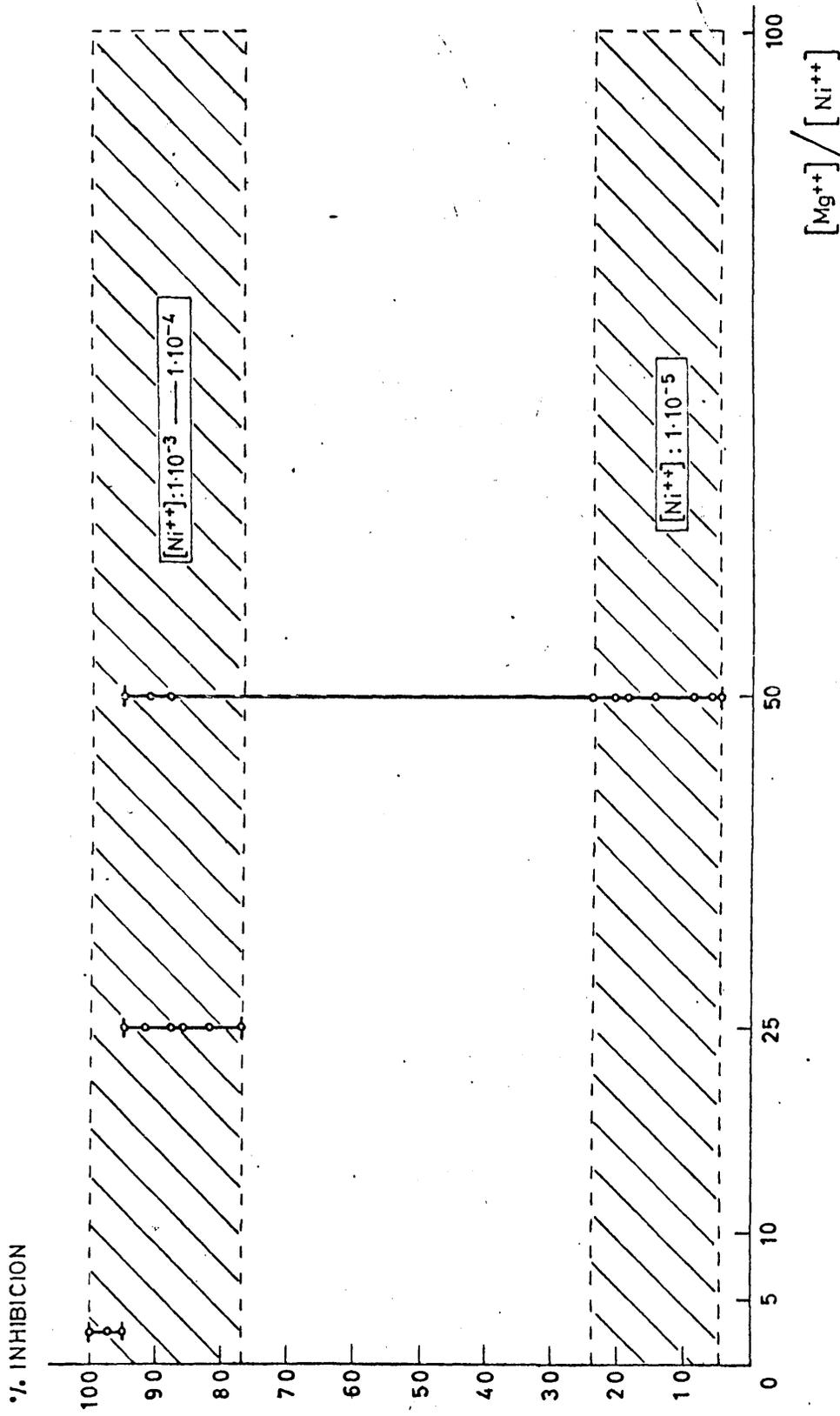


Fig.34. Actividad de la PDC recombinaada con diferentes concs. de Mg⁺⁺ y en presencia de concentraciones variables del i3n Ni, en funci3n de la relaci3n $\frac{[Mg^{++}]}{[Ni^{++}]}$

Tabla XLIII. Actividad de la PDC recombinada, en presencia de iones Ni, en función del pH. Condiciones para la valoración manométrica.

	vol.	Molaridad de la solución	Conc. moles/l	Conc.	T.M.(d.m.)													
	cc.				moles/l	Conc.	sol.I	sol.II	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9
Apo-PDC en T.M(d.m.)0:10	1.0																	
Sol. de Ni ⁺⁺ (en las condiciones ya especificadas)	1.0	0.03	1.10 ⁻²															
		0.00003	1.10 ⁻⁵															
Sol. de DPT (200γ/cc) en T.M(b.m)0:10	0.5		5.9 10 ⁻⁵	100														
T.M.(d.m.)	0.5				10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	0:10			
Mezcla: 3.0 con un pH de recombinación de					6.45	6.5	6.55	6.6	6.65	6.74	6.8	6.9	7.05	7.2	7.4			
Piruvato Na en T.M.(d.m.)esp..	0.5	1.0	1.42 10 ⁻¹		6:4	6:4	7:3	7:3	7:3	8:2	9:1	9:1	10:0	10:0	10:0			
Mezcla:3.5 con un pH de descarboxilación					6.1	6.13	6.1	6.13	6.15	6.19	6.1	6.13	6.1	6.12	6.15			

Tabla XLIV. Actividad de la PDC recombinada en presencia de iones Ni.

Condiciones manométricas: contenido por vaso de Warburg

	vol. cc.	Molaridad de la solución	Conc. moles/l	Conc. γ/vaso	T.M.(d.m.) $\frac{\text{sol.I}}{\text{sol.II}}$
Apo-pirúvico des- carboxilasa en T.M.(d.m.) 0:10	1.0				
Sol. de Ni ⁺⁺ (en las condiciones ya especificadas).	1.0	0.03 ↓ 0.00003	1.10 ⁻² ↓ 1.10 ⁻⁵		
Sol. de BPT (200γ/cc.) en T.M.(d.m.) 0:10	0.5		5.9 10 ⁻⁵	100	
T.maleato (d.m.)	0.5				2:8

Mezcla: 3.0cc. con un pH de recombinación de 7.05 (1)

Piruvato Na en T.M.(d.m) esp. 10:0	0.5	1.0	1.42 10 ⁻¹		
---------------------------------------	-----	-----	-----------------------	--	--

Mezcla total: 3.5cc. con un pH de descarboxilación de 6.1

(1) En ensayos previos, sobre el pH óptimo de recombinación, fue comprobado un ligero aumento de actividad a este pH.

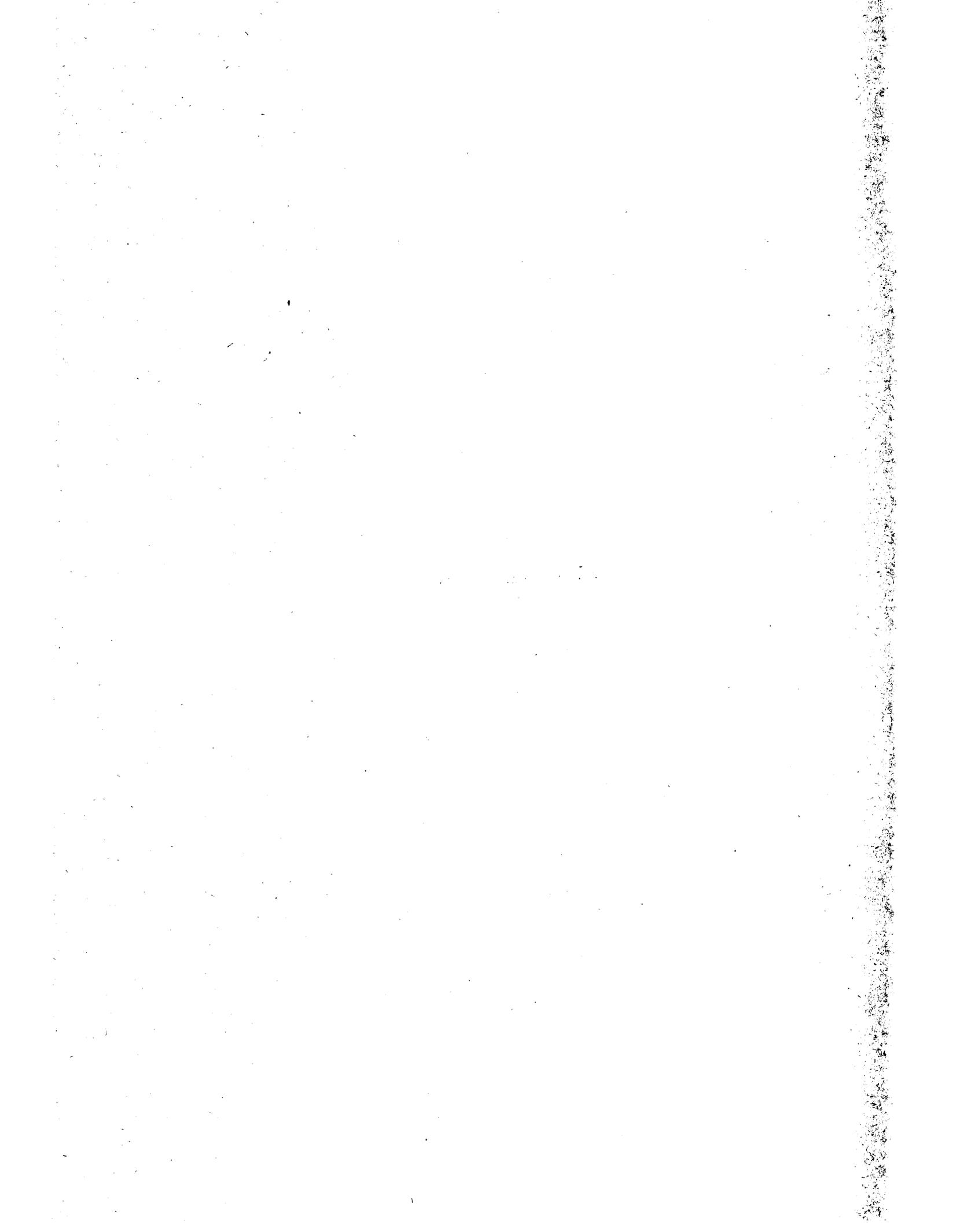
Tabla XLV. Actividad de la pirúvico descarboxilasa recombinada en presencia de iones Ni.

[Ni ⁺⁺]	1.10 ⁻²	5.10 ⁻³	1.10 ⁻³	5.10 ⁻⁴	1.10 ⁻⁴	8.10 ⁻⁵	6.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁵
Experimento	μlCO ₂ /0.1cc.E/10 min.								
1	3	1	6						
2	1,5		2,5	1,5	10				4
3					9	7	6	5	3
4					4	3,5	2,5	3	2
5					9	7	4	6	3

De las experiencias anteriores concluimos:

1. Mediante la técnica de Warburg no es posible hacer estudios de recombinación con Ni como ión metal. El carácter inhibitor de las concs. de Ni^{++} superiores a 1.10^{-4} obligaría a utilizar concs. inferiores del metal, que se traducirían en actividades despreciables para la sensibilidad del método.
2. Para una concentración de Mg^{++} fija, el % de inhibición es función de la concentración del ión Ni.
3. La inhibición, por la presencia de Ni^{++} , de la pirúvico descarboxilasa recombinada con diferentes concs. de Mg^{++} , cuya dependencia de la conc. del Ni^{++} ya hemos señalado, es prácticamente independiente de la $[\text{Mg}^{++}]$. Una ligera dependencia que puede observarse a concs. de Ni^{++} comprendidas entre los valores que producen inhib. total y no inhibición, pudiera explicarse teniendo en cuenta el mayor requerimiento de sustrato del E recombinado con altas concs. del metal activador.
4. La actividad de la PDC recombinada a cualquier conc. de Mg^{++} experimenta, por la presencia del Ni^{++} , un cambio brusco pasando de aproximadamente cero a 100% de inhib. para concs. de Ni^{++} de 1.10^{-5} y 1.10^{-4} , en las condiciones ensayadas.
5. En la valoración del % de inhib. en función de las concs. relativas de los iones Mg y Ni, se observa una manifiesta discrepancia de comportamiento para una misma relación $[\text{Mg}^{++}]/[\text{Ni}^{++}]$, cuando en dicha relación las concs. del inhibidor no quedan incluidas en los mismos intervalos superiores o inferiores a 1.10^{-4} y 1.10^{-5} ; en cualquier otro caso hay concordancia. (Véase en la Tabla XLII las relaciones destacadas con uno y dos asteriscos).

III. DISCUSSION

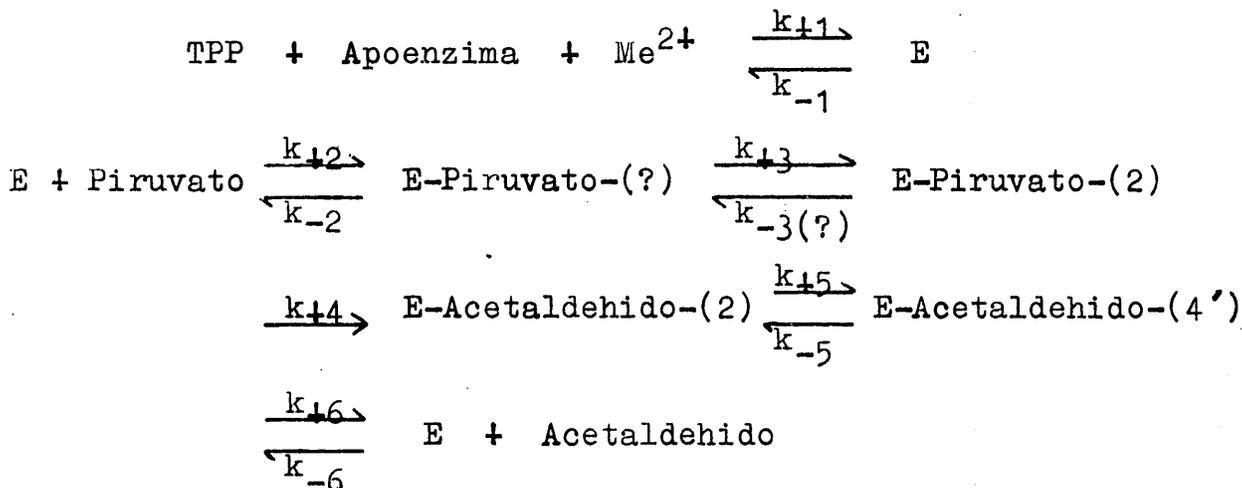


III. DISCUSION.

Poco se conoce, excepto en el caso de algunos metaloenzimas, acerca de la "atmósfera" que rodea al ión metal dentro de la molécula de la proteína o acerca de los efectos de los cationes sobre el estado y configuración de las macromoléculas (precisamente el problema de la influencia del metal en los enzimas ha permanecido largo tiempo en el terreno de la especulación). Resulta, pues, interesante plantear el estudio del mecanismo de acción del enzima que nos ocupa, 2-oxoácido carboxi-liasa o pirúvico descarboxilasa, a través del análisis del papel de los iones metal en este triple aspecto: 1) ¿qué factores determinan las afinidades en la formación de los complejos metal-proteína?; 2) ¿qué grupos de la proteína están implicados en la formación de los enlaces con los iones metálicos?; y 3) ¿qué modos de interacción entre los metales y la proteína pueden ser significativos en la función biológica, particularmente en la catálisis enzimática?.

Puesto que nos apoyaremos fundamentalmente en el esquema de Schellenberger, aludiremos en primer término al estado actual de la interpretación del mecanismo de acción de la pirúvico descarboxilasa tal como ha sido presentado recientemente por dicho autor, recogiendo experiencias anteriores, a las que ya nos hemos referido detalladamente en otro lugar de esta tesis.

La descarboxilación de α -oxoácidos a través de la pirúvico descarboxilasa -considerando la recombinación del enzima a partir de sus componentes (apoenzima, TPP y iones metálicos)- puede descomponerse en los siguientes pasos de acuerdo con el esquema de Schellenberger:



donde la velocidad del proceso de descarboxilación enzimática se determina mediante la posición del equilibrio de recombinación y mediante uno de los pasos de la reacción, 2 a 6. Todo ello, lógicamente, dependerá de las características de los componentes del sistema, jugando un papel decisivo la estructura del TPP por su naturaleza coenzimática, en la que se supone radica el epicentro de la actividad enzimática.

La teoría de los modelos, nacida del esfuerzo realizado para estudiar las complicadas reacciones enzimáticas por medio de sustancias en lo posible sencillas y bien caracterizadas química y físicamente, ha constituido un importante instrumento de la química de enzimas, proporcionando nuevos puntos de partida para las investigaciones experimentales y

ofreciendo con ellos, a menudo, la posibilidad de una investigación cinética y termodinámica precisa en la desconocida estructura global de los enzimas. Así, ensayando en lugar del TPP diferentes análogos, se ha observado que toda modificación de la molécula de tiamina va unida a una mayor o menor inactivación coenzimática; los resultados de estas experiencias han indicado que mediante la modificación de la molécula del coenzima se entorpece o bloquea uno de los pasos de la reacción, 1 a 6. Actualmente, se distinguen tres posibles etapas:

- a) Bloqueo a nivel de la recombinación de los componentes del enzima (k_{+1}),
- b) Bloqueo a nivel de la unión del sustrato (k_{+2} y k_{+3}), y
- c) Bloqueo a nivel de la transferencia del aldehído (k_{+5}).

- a) Bloqueo a nivel de la recombinación de los componentes del enzima (k_{+1}).

El bloqueo en el proceso de recombinación habrá de manifestarse en los casos en los que las modificaciones introducidas

- a₁) entorpezcan un sitio que es responsable de la fijación del apoenzima o que influye en la distancia de enlace entre el coenzima y el apoenzima.
- a₂) fuercen la posición opuesta de los dos planos del anillo a una situación de conformación no natural, que ya no permite ningún enlace en los puntos destacados de la topoquímica del apoenzima. (Ello se reflejará no sólo en

una pérdida de actividad o total inactividad, sino también en la falta de acción inhibidora por bloqueo de k_{+1}).

Como resultado de los ensayos efectuados con modelos, se han podido destacar, en la molécula del coenzima, cuatro fragmentos cuya influencia resulta fundamental en la recombinación:

- 1) El resto de pirofosfato. Basta alargar el grupo etilo, en el carbono 5 del anillo tiazólico, con un solo $-\text{CH}_2$, o variar la longitud de la cadena fosfórica, para conseguir productos coenzimáticamente inactivos. Sin embargo, como en la molécula subsisten todos los grupos vinculantes, es explicable su actividad inhibidora.
- 2) El carbono en 2' del anillo pirimidínico. La simple presencia de un grupo etilo en posición 2' demostró su influjo en el equilibrio de recombinación a través de una disminución de la velocidad de recombinación (36%) y de un aumento aproximadamente igual al doble de la concentración de semisaturación. Mientras que la afinidad del sustrato para el holoenzima, formado a partir del análogo, aparece prácticamente inalterada, la disminución de la actividad final en más del 50% se basa en el entorpecimiento adicional de uno de los pasos siguientes de la reacción. En estas circunstancias se hace preciso considerar el paso de transferencia del aldehído (k_{+5}), sobre todo en el caso de que el grupo etilo entre en colisión con la superficie del apoenzima y haya de influir en el mecanismo a través de la posición del anillo de pirimidina.

3) El N en posición 1' del anillo pirimidínico. El reemplazamiento del anillo de pirimidina del TPP por un anillo de piridina dio lugar a dos análogos, de los cuales sólo el correspondiente a la sustitución del N en posición 3' por un -CH= mostró actividad coenzimática y afinidad por el apoenzima. Por tanto, como en el caso anterior, debe suponerse que el N en posición 1' actúa como sitio de enlace, participando así en la orientación de los dos grupos básicos dentro del mecanismo de descarboxilación enzimática del ác. pirúvico.

4) El carbono en 4 del anillo tiazólico. En un principio se pensó en una cuarta posibilidad de enlace, a través de este grupo, dada la velocidad de recombinación fuertemente retardada y la concentración de saturación elevada en los análogos del TPP modificados en el C-4 (signo de entorpecimiento del proceso de recombinación) y, por otra parte, la baja velocidad estacionaria en el estado de saturación (32%) (correspondiente al mecanismo inhibido de la transferencia del aldehído). Sin embargo, el comportamiento de los análogos del TPP, como el 6'-metil-4-nor-TPP y el 6'-metil-TPP, parece indicar que la influencia de los sustituyentes en estas posiciones radica, fundamentalmente, en la mutua interferencia, que ocasiona una alteración en la conformación de los planos de los dos anillos

Parece insinuarse actualmente un nuevo punto de vista, basado en la existencia de una región adecuada, estérica y

químicamente, en el centro de enlace del apoenzima, que forma un enlace de hidrógeno con uno de los H₂ relativamente ácidos del grupo -NH₂, apartando así a este grupo de su posición de resonancia original y, en consecuencia, aumentando su basicidad y haciendo posible el contacto con el protón hidroxilo del aldehído activo.

Puede observarse, en los citados casos, que el paso de transferencia del aldehído, que tiene lugar en la forma de una catálisis base intramolecular, es estéricamente mucho más exigente que el paso de recombinación, determinado por la disposición de los grupos enlazantes en el centro activo del apoenzima.

b) Bloqueo a nivel de la unión del sustrato (k_{+2} y k_{+3}).

Si consideramos el bloqueo a nivel de unión con el sustrato, podría, en primer lugar, pensarse que habría de tener lugar en la posición 2 del anillo tiazólico, como consecuencia lógica de la incapacidad de unión con el sustrato ($k_{+3}=0$). Si esto fuera así, el compuesto tendría que mostrar acción inhibitoria; sin embargo, el 2-metil-TPP, aunque inactivo, no presenta acción inhibitoria, demostrando pertenecer a los análogos bloqueados para la recombinación. Los sustituyentes en posición 2 entorpecen, en general, más que el enlace del sustrato, el proceso de recombinación, con lo que se encuentra una explicación a la pequeña velocidad de transformación del "acetaldehído activo", (2-(1-hidroxi-etil)-TPP), descrita por Holzer.

Los trabajos de Schellenberger et al. no aportan en realidad datos concluyentes sobre el doble paso de reacción (k_{+2} y k_{+3}) del proceso de unión del sustrato (k_{+2} y k_{+3} fueron considerados como un paso global del enlace del sustrato). Estos autores apuntan, no obstante, que el piruvato antes de la fijación al anillo de tiazolio está ligado al apoenzima y de este modo experimenta un cierto aumento en relación con la activación en la proximidad del centro de reacción.

Los resultados, en este sentido, del presente trabajo confirman la existencia de este probable paso 2 del esquema de Schellenberger.

c) Bloqueo a nivel de la transferencia del aldehído (k_{+5}).

Análogos como el 4'-hidroxi-4'-desamino-TPP, desamino-TPP, 4'-mercapto-4'-desamino-TPP y, al menos en parte, también el N-metil- y el N.N-dimetil-TPP presentan el bloqueo típico del paso de transferencia del aldehído (k_{+5}). Así, impidiendo la separación del aldehído, el análogo es inactivo como coenzima y muestra, a la vez, igual afinidad para el apoenzima que el mismo coenzima, funcionando los pasos precedentes de la reacción, del 1 al 5, sin interrupción.

La considerable acción inhibitoria de los dos análogos N-alquilados muestra que el proceso de recombinación está entorpecido pero que aún es posible. La total inactividad de estos análogos a pesar del carácter básico del N-4' permite, por el contrario, reconocer un entorpecimiento pro-

bablemente estérico del estado de transición formado en la separación del aldehído. Parece, pues, que la especificidad estructural, extraordinariamente alta, de las distintas partes del TPP es una prueba de que las modificaciones que influyen de modo directo en la situación de conformación de los dos planos del anillo conducen a una total inactividad, en tanto que las sustituciones que tienen lugar en la "periferia" de la molécula y que, por tanto, sólo influyen de un modo indirecto sobre la situación estructural mediante la colisión con el apoenzima, van unidas a una disminución de la actividad. En resumen, las diferentes posibilidades de falseamiento de la conformación pueden caracterizarse así:

1. Modificaciones mínimas de la situación de conformación que afectan ligeramente a la recombinación y a la separación del aldehído.

Resultado: disminución de la actividad coenzimática, como consecuencia del perjuicio directo experimentado por el proceso de separación nucleófila. Ejemplos: 2'-etil-2'-nor- y 4-etil-4-nor-TPP.

2. Fuertes modificaciones de la situación de conformación que afectan ligeramente a la recombinación y fuertemente a la separación del aldehído.

Resultado: ninguna actividad coenzimática, y afinidad disminuida para el apoenzima. Ejemplo: N-metil-TPP.

3. Fuerte alteración de la situación de conformación que afecta fuertemente tanto a la recombinación como a la separa-

ción del aldehído.

Resultado: ninguna acción coenzimática y ninguna afinidad para el apoenzima. Ejemplos: 6'-metil- y 2-metil-TPP.

Volviendo al planteamiento inicial, los primeros intentos de encontrar una base física a la especificidad de los metales se centraron fundamentalmente, como ya hemos visto en la parte teórica, en los parámetros más elementales de la estructura y de las propiedades del ión. Estudios comparativos de la efectividad de los iones metal en relación con su masa, carga iónica, radio iónico etc. demostraron, sin embargo, la insuficiencia de estos parámetros para justificar la participación del ión metal. De todos son conocidos enzimas en los que las semejanzas y desemejanzas de los parámetros, de los iones, debidas a su proximidad o alejamiento en el sistema periódico no guardan relación con su efectividad en el sistema enzimático: la arginasa (activada por Mn y otros elementos de transición), la leucil-peptidasa (activada por Mn y Mg), otros enzimas activados por Mn exclusivamente, y la pirúvico descarboxilasa (activada por Mg, Mn y otros elementos de transición) son ejemplos de ello.

Esta peculiar especificidad hacia los iones metal hizo pensar que tal vez no fuera posible una explicación razonable para la especificidad y antagonismo sobre la base de las propiedades del ión metal sin cubierta de hidratación; pero, dado que los iones metálicos, en solución en un medio fisiológico, están rodeados por una atmósfera de otras molé-

culas, tales como moléculas de agua débilmente enlazadas, o sustancias orgánicas de naturaleza polar, más fuertemente enlazadas, se consideró que el concepto "isósteros" pudiera aplicarse más adecuadamente a la estructura del complejo global. Además, las características de los complejos de coordinación de los metales con el agua u otras moléculas polares, si bien reflejo de la configuración electrónica del ión metal y los grupos coordinados, podrían ser factores críticos para el fácil reemplazamiento de un grupo coordinado por alguna otra molécula, en virtud de las energías y entropías de formación de complejos.

La formación de complejos implica, pues, realmente la formación de uniones ión-ión, seguida del reemplazamiento de las moléculas de agua de la primera esfera de coordinación por otros grupos. La estabilidad, velocidad de formación del complejo y velocidad de disociación, además de la acidez del metal (todas ellas relacionadas con los parámetros fundamentales) son los factores primordiales para la determinación de la efectividad de los metales, y así las constantes K_{IP} , k'_F , k_B , k_F ($=K_{IP} \cdot k'_F$) y K_S ($=k_F/k_B$) han resultado ser decisivas en la interpretación de esta especificidad.

Concretándonos al caso de la pirúvico descarboxilasa, en primer lugar los estudios realizados por Schellenberger sobre el influjo de los iones metálicos Ca, Mn, Co, Mg y Zn a pH, temperatura y concentración de metal determinados, diferenciaron dos fases en el mecanismo de descarboxilación: fase de recombinación y fase estacionaria, dependiendo la pri-

mera fuertemente de la clase de ión metálico introducido, mientras que el estado estacionario es independiente, en considerable medida, de la clase de ión añadido.

El paralelismo existente entre las velocidades de recombinación y los resultados de Eigen sobre velocidades de sustitución de las moléculas de H_2O agrupadas en torno al ión metálico, llevó a considerar a dicho factor como el responsable de la fase de recombinación, quedando fijado el valor de k_{+1} a través de la cinética de la formación del complejo metálico. Según el esquema de Eigen, de los metales estudiados por nosotros (Mg, Mn, Be, Cd, Co y Ni), el Be -que no había sido considerado con anterioridad- presenta una velocidad de sustitución diferente y mucho menor (del orden de 10^2 sec^{-1} , frente a un valor de $10^5 - 10^8$ para los restantes), lo que justifica su excepcional papel de inhibidor competitivo del Mg (con el que, por otra parte, le unen grandes semejanzas), confirmando así el papel decisivo de la velocidad de sustitución en esta fase.

Es de advertir que, en general, esta fase de recombinación puede observarse directamente tan sólo a través de la técnica espectrofotométrica seguida por Schellenberger (basada en la reacción del acetaldehído libre con exceso de DPNH y alcohol deshidrogenasa), entre cuyas ventajas está la rapidez de manipulación y la posibilidad de trabajar con concentraciones pequeñas de metal, inferiores a $1 \cdot 10^{-4}$ (valor límite, al que determinados metales, como Cd, Co y Ni entre los estudiados por nosotros, presentan acción inhibidora).

Schellenberger et al. no hacen alusión a esta peculiaridad del carácter inhibitor de ciertos metales a concentraciones superiores a $1 \cdot 10^{-4}$, probablemente debido a la limitación impuesta por su técnica en cuanto a la solubilidad de las sales metálicas ($\approx 10^{-4}$) en la mezcla del medio de solución aplicado. La sensibilidad de la técnica de Warburg -utilizada por nosotros- no es, por el contrario, adecuada para concentraciones de metal aproximadamente inferiores a $1 \cdot 10^{-4}$, a las que corresponden pequeños valores de actividad; sin embargo, permite el estudio en un intervalo superior de concentraciones, donde se manifiesta la inhibición del proceso de descarboxilación por algunos de los metales estudiados.

Por otra parte, la duración de la fase de recombinación, como ya hemos indicado, depende fuertemente de la clase de ión metálico introducido, siendo el orden $\text{Ca} < \text{Mn} < \text{Co} < \text{Ag} < \text{Ni}$. Los tiempos requeridos en los experimentos de Schellenberger para alcanzar la fase estacionaria son inferiores a los invertidos en la técnica de Warburg en el momento de la medición de las velocidades de descarboxilación. Por tanto, todas nuestras medidas pueden considerarse realizadas en la fase estacionaria, como así lo demuestra la linealidad de las curvas de velocidad obtenidas.

La fase estacionaria, a diferencia de la de recombinación, es prácticamente independiente de la clase de ión metálico complejante y de la estabilidad del complejo formado, si bien el margen restringido de concentraciones utilizado por Schellenberger limita el valor de estas conclusiones.

En efecto, nuestros resultados sobre la especificidad del metal en un amplio margen de concentraciones, han destacado el hecho significativo del distinto comportamiento de los iones metal en función de las concentraciones de los mismos. Así, mientras todos los metales a concentraciones inferiores a $1 \cdot 10^{-4}$ son activadores (con excepción del Be), a concentraciones superiores muestran un comportamiento bien diferenciado. El Mg y el Mn son activadores a altas concentraciones (aunque se aprecia una cierta inhibición en el caso del Mn), el Be es inhibidor competitivo, y el Cd, Co y Ni son elementos que muestran un brusco cambio en su comportamiento cuando la concentración del catión alcanza un valor determinado ($\approx 1 \cdot 10^{-4}$), transformándose en potentes inhibidores. Es de destacar en la cinética de la fase estacionaria del Mg y Mn, por una parte, la analogía de las velocidades máximas correspondientes a la PDC recombinada con uno y otro metal (la cual indica que el mecanismo es el mismo en todos los pasos posteriores a la recombinación), y, por otra, la analogía entre las K_m aparentes, $\approx 3 \cdot 10^{-4}$, obtenidas por nosotros, (indicando que no hay entorpecimiento del estado de recombinación cuando se utiliza indistintamente uno y otro metal), mientras que la inhibición a altas concentraciones de Mn, así como el comportamiento de los metales Cd, Co y Ni a concentraciones superiores a $1 \cdot 10^{-4}$, apunta a una posible participación múltiple de estos iones metal.

No obstante, el que iones metálicos como el Ca, Mg, Mn y Co, que tan fuertemente se diferencian en poder de

formación de complejos y en electronegatividad, originen todos, en estado de saturación, la misma actividad enzimática, pone de manifiesto que una función esencial del ión metálico vendría a consistir, simplemente, en su participación en una colocación estéricamente muy diferenciada de la molécula del coenzima en el centro activo del apoenzima.

(En una breve comunicación, Schellenberger et al. trataron de fijar, como posible función de los iones metálicos, su influencia sobre el incremento de la acidez en C₂, señalada por Breslow, y, partiendo de los estudios sobre el influjo de los iones metálicos en la velocidad del intercambio D-H, llegaron a sugerir la participación directa del ión metálico en el mecanismo de descarboxilación. En su opinión, el punto de ataque de los iones metálicos debería ser, en primer lugar, los pares de electrones libres del átomo de S, pero también sería posible una retirada de electrones sobre el N. Ambas sugerencias no obtuvieron demostración posteriormente, no existiendo base alguna para atribuir al ión metálico otra participación en el mecanismo de descarboxilación fuera de su función vinculante, confirmada posteriormente con estudios basados en el paso del enzima a través de una columna de Sephadex).

En este sentido, parte de nuestros experimentos trataron de aclarar la naturaleza de los grupos implicados en esta función vinculante. Así, nuestras experiencias iniciales se basaron en el estudio del efecto del pH sobre la actividad y el enlace, con Mg como ión metal, obteniéndose curvas de

campana totalmente diferentes. La curva de actividad-pH acusó un brusco máximo a pH=6.1, con actividades inferiores al 25% a pH 5.5 y 6.5, respectivamente. La curva de recombinación, por el contrario, acusó un máximo a pH=6.7, conservando, sin embargo, el 80% de la actividad a pH 6.1 y 7.3. (Es de destacar aquí que los trabajos de Schellenberger fueron hechos a un único pH de 6.6). Nuestros resultados revelaron así la existencia de un lugar de enlace independiente de los centros catalíticos activos del mecanismo de descarboxilación, y, al mismo tiempo, la afinidad, casi constante en el intervalo de pH 6.1-7.3, puso de manifiesto que el enlace tiene lugar probablemente sobre grupos que no son afectados por iones hidrógeno en este intervalo, tales como grupos carboxilo, hidroxilo o fenólicos, posibilidad que se verá apoyada, más adelante, con nuevos argumentos.

Si volvemos a considerar el esquema de Schellenberger, la inhibición por nosotros hallada a altas concentraciones de metales (tales como Co, Cd, Ni y en cierto modo Mn), y a nivel de separación de CO₂ (debido a la técnica manométrica utilizada para la medición de la actividad enzimática), indica un posible bloqueo de los pasos 1, 2 ó 3.

Las conclusiones de Schellenberger sobre la independencia del estado estacionario respecto de la clase de ión, así como nuestros resultados confirmando la dependencia del enlace tan sólo de la velocidad de sustitución de las moléculas de H₂O por los ligandos, permiten descartar el bloqueo al nivel del paso 1. Tampoco hay base para poder pensar en

un bloqueo al nivel del paso 3, conocida la teoría de Breslow sobre el papel del C-2 del anillo tiazólico y la mayor acidez del Mg, que sugeriría un mayor bloqueo por este metal, en contra de los resultados obtenidos.

En cambio, es de señalar que el bloqueo al nivel del paso 2, impidiendo la fijación (probablemente sobre un grupo -SH, dada la especificidad de metal observada por nosotros) del piruvato sobre la proteína, con anterioridad a su fijación en el anillo tiazólico, encuentra apoyo en los siguientes hechos:

1º, la unión relativamente estable del piruvato marcado radioactivamente sobre el apoenzima, al ser pasadas ambas soluciones, a pH 6.6, sobre una columna de Sephadex, independientemente de los iones metálicos (Schellenberger), si bien nada se especifica en relación con la naturaleza de los grupos implicados en este paso.

2º, la protección de la apodascarboxilasa contra el efecto inhibidor de los reactivos del grupo tiol mediante piruvato (Stoppani, Kanopkaite y Schellenberger).

3º, el carácter que los metales Co, Ni y Cd presentan como potentes reactivos de grupos -SH, a diferencia de los iones Mg, Be y en cierto modo Mn, de acuerdo con el respectivo carácter, inhibidor y no-inhibidor, de estos metales, señalado por nosotros.

Todo ello sugiere la doble participación del ión metal como mediador en la configuración (como ya hemos visto)

y también como bloqueador de grupos fundamentales, probablemente grupos -SH, de fijación del piruvato.

En el primer aspecto, ya ha sido apuntada la velocidad de sustitución de las moléculas de agua como factor decisivo. En el segundo, parece serlo la estabilidad de los complejos metálicos de los grupos -SH.

La posibilidad, por otra parte, de que la inhibición no tenga lugar por reacción del piruvato y metal con el mismo grupo del enzima (-SH) sino con dos grupos colocados suficientemente cerca, de modo que la combinación con uno de ellos haga al otro inaccesible, ha sido descartada por el hecho de que compuestos como el o-iodosobenzoato, que no forma derivados estables con el grupo -SH y por tanto no introduce ningún impedimento espacial, presentan el mismo comportamiento.

Poco se conoce acerca de los enlaces por compuestos de S, aparte de su fuerte tendencia a asociarse con cationes metálicos. Parece, no obstante, que aquellos cationes metal que forman sulfuros insolubles pueden también enlazar S en los compuestos orgánicos y que tales complejos serán especialmente estables. Cabe entonces concluir que un grupo -SH es esencial para la formación del complejo piruvato-descarboxilasa, perteneciendo dicho grupo al tipo "lento" descrito por Barrón, ya que es mucho más sensible a los metales que a los agentes oxidantes y alquilantes. La existencia de este grupo proporciona un dato más en la interpretación de la des-

carboxilación enzimática y, en este sentido, viene en su apoyo el hecho de que el piruvato reaccione con tioles para formar mercaptales fácilmente descarboxilables por metales pesados.

En cuanto a la analogía del comportamiento del Mg y el Mn, podría ésta radicar en la gran semejanza que presentan en cuanto a sus preferencias por grupos ligandos de la proteína y de los sustratos: grupos carboxilo de las proteínas (si bien el Mn presenta además una afinidad mayor que el Mg por la histidina, el NH_2 y los grupos $-\text{SH}$, lo que explicaría su inhibición a altas concentraciones) y, en cuanto a los sustratos, oxianiones tales como $\text{R}-\text{CO}_2^-$, fosfatos etc. (y para el Mn asimismo una afinidad adicional por el NH_2 y la histidina), siendo, además, en ambos octaédrica la esteoquímica en la mayoría de los casos. Esto vendría a consolidar el concepto de la naturaleza del enlace apoenzima-coenzima como un puente metálico entre un grupo carboxilo, p.e., de la proteína y el radical pirofosfórico del coenzima. Se ha sugerido, no obstante, recientemente que la unión con el coenzima pudiera tener lugar a través del N-1', dado el carácter preferentemente protonado en N-1' de las 4'- NH_2 pirimidinas.

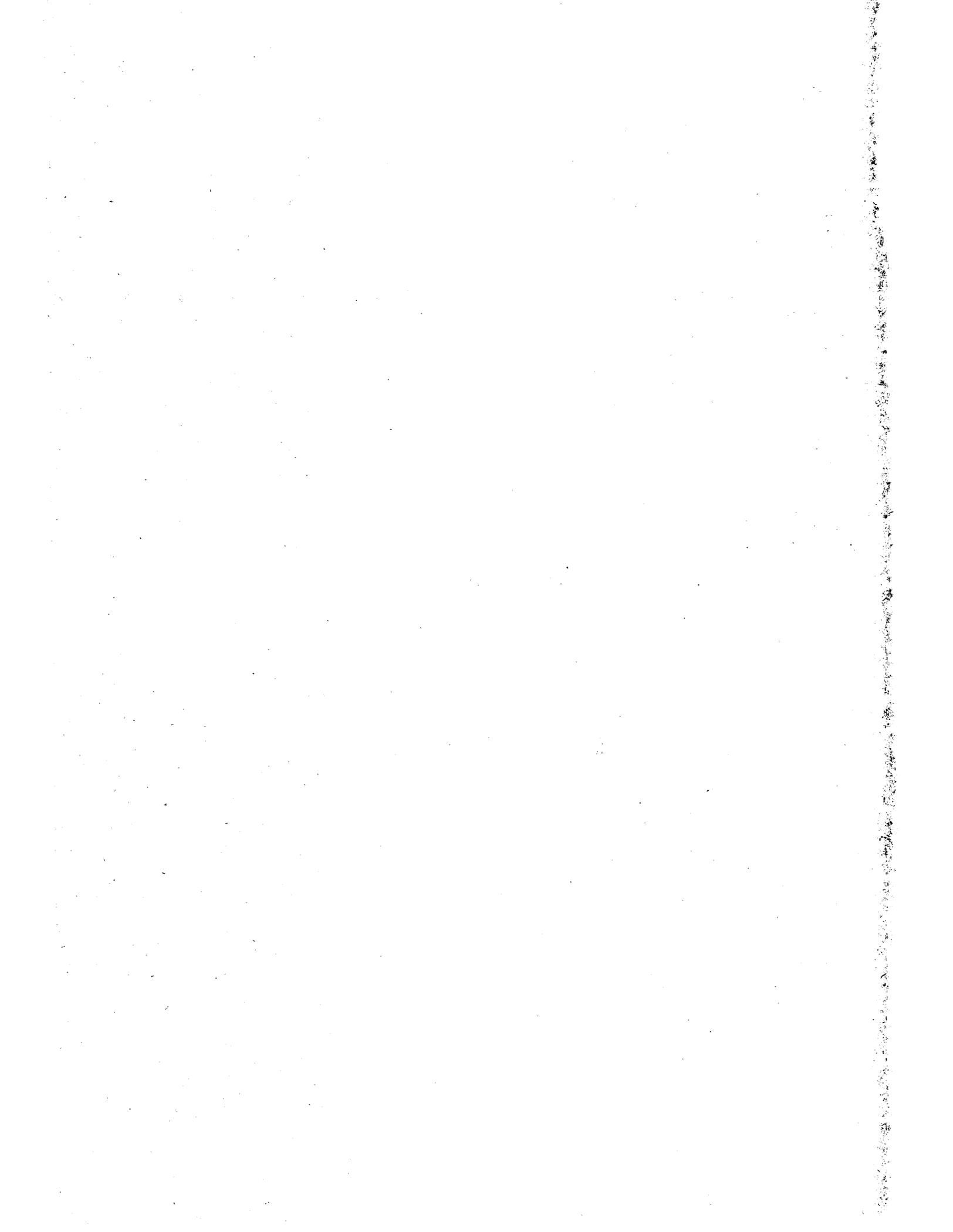
Meyer, anteriormente, había apuntado que la función del $-\text{SH}$ en la pirúvico descarboxilasa era enlazar el apo- y el coenzima. Los resultados posteriores de Stoppani ni confirman ni desaprueban esta tesis, en cuanto que, a

pH 6.0, la PDC purificada parece ser un compuesto no-disociable; pero, en cualquier caso, si la co-descarboxilasa, el Mg y la proteína estuvieran unidos por un enlace sulfuro, este -SH potencial no debería participar en las propiedades catalíticas de la descarboxilasa en su medio fisiológico (pH 6.0-6.3). Tampoco están de acuerdo con Meyer los trabajos de Kanopkaite sobre la protección de la apo-descarboxilasa contra el efecto inhibitor de los reactivos del grupo tiol, mediante co-descarboxilasa; dichas experiencias fracasaron, concluyendo sus autores que la co-descarboxilasa y el inhibidor se conjugan con diferentes grupos de la proteína y, en consecuencia, que los grupos -SH responsables en la descarboxilación del ác. pirúvico, por deso-carboxilasa de levadura, pertenecen exclusivamente a la parte proteica (apoenzima) de la molécula enzimática.

Recapitulando, hemos de insistir sobre la doble interacción metal-proteína y su influencia en la actividad enzimática. No se trata de un efecto primario sobre las propiedades del metal (por no tratarse de un metaloenzima verdadero), sino, más bien, de una cooperación del metal y la proteína, por una parte, y de un efecto primario sobre las características de la proteína enzimática, por otra. En la pirúvico descarboxilasa, ciertos metales (Cd, Co, Ni y en cierto modo Mn, entre los estudiados por nosotros) pueden afectar negativamente a la proteína -por la estabilidad de sus complejos - formando mercáptidos con los grupos -SH,

que parece ser están implicados directamente en la acción enzimática, como fijadores del sustrato. No obstante, su función primordial es la de actuar como puentes en la formación de complejos entre la proteína y la molécula de coenzima (considerándose a la velocidad de sustitución de las moléculas de H_2O por los ligandos como el factor decisivo de la especificidad de recombinação del metal), orientando correctamente a los grupos catalíticos pertenecientes exclusivamente al coenzima -de acuerdo con las investigaciones de Breslow y Schellenberger-, lo que viene a apoyar la definición de coenzima como epicentro de la actividad enzimática.

IV. CONCLUSIONES



IV. CONCLUSIONES.

1. La total disociación de la pirúvico descarboxilasa en sus componentes (apoenzima, TPP y Mg^{2+}) puede realizarse en función exclusiva del pH (8.9). Dicha disociación (en las condiciones del método propuesto) da lugar, por precipitación amónica al mismo pH, a la separación de una proteína muy sensible y de actividad totalmente reproducible. Se pone de manifiesto la ineficacia del tampón fosfato -generalmente usado por su carácter protector de enzimas- a los pH a que tiene lugar la separación total. Se acepta, por otra parte, el uso de EDTA, que libera un 20% de proteína enzimática susceptible de recombinación y que permanecía inhibida por cationes pesados, garantizando así la reproducibilidad de los resultados.
2. La recombinación máxima de la apo-descarboxilasa requiere un exceso del ión metal separado y tiene lugar a un pH diferente del de descarboxilación (pH de recombinación y descarboxilación: 6.7 y 6.1, respectivamente, conservando en el primer caso el 80% de la actividad a pH 6.1 y 7.3, mientras que las actividades durante la descarboxilación son inferiores al 25% a pH 5.5 y 6.5, respectivamente). Estos resultados revelan la existencia de un lugar de enlace independiente de los centros catalíticos activos del mecanismo de descarboxilación, apuntando, al mismo tiempo,

a la posibilidad de enlace sobre grupos que no son afectados por iones hidrógeno en el intervalo de pH 6.1-7.3 (carboxilo, hidroxilo, fenólicos, etc.).

3. Se pone de manifiesto el distinto comportamiento de los iones metal, en la fase estacionaria, al estudiar un amplio intervalo de sus concentraciones. Así, mientras todos los metales estudiados a concentraciones inferiores a $1 \cdot 10^{-4}$ son activadores (con excepción del Be), a concentraciones superiores muestran un comportamiento bien diferenciado: el Mg y el Mn son activadores a altas concentraciones, aunque se aprecia una cierta inhibición en el caso del Mn ($K_{m(Mg)} = K_{m(Mn)} = 3.6 \cdot 10^{-4} M$; $V_{m\acute{a}x. (Mg)} = V_{m\acute{a}x. (Mn)} = 120 \mu l CO_2 / 0.1 cc. E / 10 min.$); el Be es inhibidor competitivo ($K_i = 1.5 \cdot 10^{-3} M$); y el Cd, Co y Ni son elementos que experimentan un brusco cambio en su comportamiento cuando la concentración del catión alcanza un valor determinado ($\simeq 1 \cdot 10^{-4}$), transformándose en potentes inhibidores.
4. La doble analogía en la cinética de la fase estacionaria del Mg y Mn, esto es, por una parte la analogía de las velocidades máximas correspondientes a la pirúvico descarboxilasa recombinada con uno y otro metal, y, por otra, la analogía entre las K_m aparentes obtenidas por nosotros, indican, respectivamente, la existencia de un mismo mecanismo en los pasos posteriores a la recombinación y la ausencia de entorpecimiento en este estado.

Estas analogías en metales tan diferentes parecen poner de manifiesto que la función esencial de estos iones metálicos consiste simplemente en su participación en una colocación estéricamente muy diferenciada de la molécula de coenzima en el centro activo del apoenzima.

5. La inhibición a altas concentraciones de Mn, así como el comportamiento de los metales Cd, Co y Ni a concentraciones superiores a $1 \cdot 10^{-4}$, apunta fuertemente a una posible participación múltiple de estos iones metal. Se sugiere que la inhibición tiene lugar por bloqueo al nivel de la fijación del sustrato (paso 2) sobre grupos -SH, dado el carácter que los metales Co, Cd y Ni presentan como potentes reactivos de grupos -SH, a diferencia de los iones Mg, Be y en cierto modo Mn. Se considera a la estabilidad de los complejos metálicos como factor decisivo de este nuevo aspecto de los iones metal en la pirúvico descarboxilasa (bloqueadores de grupos fundamentales).

V. BIBLIOGRAFIA

1. Schubert, J., "Chemical Specificity in Biological Interactions" (Memoirs of the Univ. Laboratory of Physical Chemistry Related to Medicine and Public Health, Harvard Univ. Nº 3) ed. por F.R.N. Gurd, Academic Press Inc., New York, 1954, cap. IX.
2. Green, D.E., "Advances in Enzymology I (ed. por F.F. Nord), Interscience Publishers, New York (1941).
3. Lehninger, A.L., *Physiol. Rev.* 30(3), 393 (1950).
4. Calvin, M., "Symposium on the Mechanism of Enzyme Action", ed. por W.D. McElroy and B. Glass, The John Hopkins Press, 1954, pag. 221.
5. Mellor, D.P., en "Chelating agents and metal chelates" ed. por F.P. Dwyer y D.P. Mellor, Academic Press, New York (1964) cap. 1.
6. Schwarzenbach, G., "Chemical Specificity in Biological Interactions" (Memoirs of the Univ. Laboratory of Physical Chemistry Related to Medicine and Public Health, Harvard Univ. Nº 3), ed. por F.R.N. Gurd, Academic Press Inc., New York, 1954, cap. X.
7. Orgel, L.E., "Metals and Enzyme Activity" (Biochemical Society Symposia, Nº 15), ed. por E.M. Crook, Cambridge Univ. Press, 1958, pag. 8.
8. Lehninger, A.L., Discusión sobre "Chelation and Catalysis", "Symposium on the Mechanism of Enzyme Action", ed. por W.D. McElroy and B. Glass, The John Hopkins Press, 1954, pag. 255.

9. Bjerrum, J., Chem.Revs. 46, 381 (1950) (citado en la ref.29).
10. Bjerrum, J. y Jørgensen, C.K., Acta Chem.Scand. 7, 951 (1953) (citado en la ref. 29).
11. Eigen, M. y Hammes, G.G., Adv. in Enzymol. 25 (ed. por F.F. Nord), Interscience Publishers, New York (1963), pag.1.
12. Williams, R.J.P., The Enzymes I (ed. por P.D.Boyer, H.Lardy y K.Myrbäck, 2nd. ed.) Academic Press, N.Y. (1959) pag.391.
13. Eigen, M., Proc.Inter.Congr.Coord.Chem., 7th, Stockolm, 1962 (citado en la ref. 11).
14. Basolo, F. y Pearson, R.G., "Mechanisms of Inorganic Reactions", Wiley, New York (1958).
15. Lillie, R.S., 'Protoplasmic Action and Nervous Action', 2nd ed. Univ. of Chicago Press, Chicago (1932), pag. 167 (citado en la ref. 1).
16. Somers, I.I. y Shive, J.W., Plant Physiol. 17, 582 (1942) (citado en la ref. 1).
17. Williams, R.J.P., J.Chem.Soc. IV, 3770 (1952).
18. Irving, H. y Williams, R.J.P., J.Chem.Soc. 3192 (1953).
19. Van Arkel y Boer, Rec. Trav. Chim. 47, 593 (1928) (citado en la ref. 18).
20. Davies, C.W., J.Chem.Soc. 1256 (1951).
21. Walsh, A.D., J.Chem.Soc. 398 (1948).
22. Walsh, A.D., Proc. Roy. Soc. (London) 207 A, 13 (1951).
23. Pauling, L., J.Chem.Soc. 1461 (1948).
24. Irving, H. y Williams, R.J.P., Nature 162, 746 (1948).
25. Ackermann, H., Prue, J.E. y Schwarzenbach, G., Nature 163, 723 (1949).

26. Calvin, M. y Melchior, N.C., *J. Am. Chem. Soc.* 70, 3270 (1948).
27. Pauling, L., "Nature of the Chemical Bond", Cornell Univ. Press, (1941), pags. 352-372.
28. Latimer, L., *Chem. Reviews*, 18, 349 y 355 (1936)
(citado en las refs. 17 y 18).
29. Gurd, F.R.N. y Wilcox, P.E., *Adv. in Protein Chemistry XI*, 311 (1956).
30. Eigen, M., "Adv. in the Chemistry of the Coordination Compounds" (Kirschner, ed.) Macmillan, New York (1961), pag. 371 (citado en la ref. 31).
31. Hague, D.N. y Eigen, M., *Trans. Faraday Soc.* nº 521, vol. 62, part 5 (1966), pag. 1236.
32. Hammes, G.G. y Steinfeld, J.I., *J. Am. Chem. Soc.*
33. Klotz, I.M., "Symposium on the Mechanism of Enzyme Action" (ed. por W.D. McElroy and B. Glass) The John Hopkins Press (1954), pag. 257.
34. Scatchard, G., Hughes, W.L. Jr., Gurd, F.R.N. y Wilcox, P.E., "Chemical Specificity in Biological Interactions" (Memoirs of the Univ. Lab. of Physical Chem. Related to Medicine and Public Health, Harvard Univ., Nº 3), ed: por F.R.N. Gurd, Academic Press Inc., New York (1954), cap. XI.
35. Bjerrum, J., *Chem. Revs.* 46, 381 (1950) (citado en la ref. 6).
36. Sidwick, N.V., *J. Chem. Soc.* 433 (1941).
37. Albert, A., *Biochem. J.* 47, 531 (1950); 50, 690 (1952).
38. Mellor, D.P. y Maley, L., *Nature* 159, 370 (1947); 161, 436 (1948).

39. Monk, C.B., *Trans. Faraday Soc.* 47, 297 (1951).
40. Gordon, W.G., Semmett, W.F., Cable, R.S. y Morris, M.,
J. Am. Chem. Soc. 71, 3293 (1949).
41. Klotz, I.M., en "Modern Trends in Physiology and Biochemistry" (E.S.G. Barrón, ed.), Academic Press, New York (1952), pag. 427 (citado en la ref. 33).
42. Tanford, C., *J. Am. Chem. Soc.* 72, 441 (1950).
43. Tanford, C. y Roberts, G.L. Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2509 (1952).
44. Williams, R.J.P., *Biol. Rev.* 28, 381 (1953).
45. Wyatt, H.V., *J. Theoret. Biol.* 6 (3), 441 (1964).
46. Martell, A.E. y Calvin, M., "Chemistry of the Metal Chelate Compounds", cap. 8, Prentice-Hall, New York (1952).
47. Kroll, H., *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2034 (1952).
48. Smith, E.L., *Adv. in Enzymology* 12 (ed. por F.F. Nord), Interscience, New York-London (1951), pag. 191.
49. Malmström, B.G. y Rosenberg, A., *Adv. in Enzymology* 21, (ed. por F.F. Nord), Interscience, New York-London (1959), pag. 131.
50. Craig, D.P. y Nyholm, R.S., en "Chelating agents and metal chelates" (ed. por F.P. Dwyer y D.P. Mellor), Academic Press, New York (1964), cap. 2.
51. Nyholm, R.S., en "Metals and Enzyme Activity", (Biochemical Society Symposia, Nº 15), ed. por E.M. Crook, Cambridge Univ. Press (1958), pag. 1.
52. Bridgman, P.W., "The Logic of Modern Physics", MacMillan Co., New York (1946) (citado en la ref. 58).

53. Vallee, B.L., Adv. in Protein Chem. X, 317 (1955).
54. Smith, E.L., Discussions Faraday Soc. 20, 264 (1955).
55. Gurd, F.R.N., ed., "Chemical Specificity in Biological Interactions" (Memoirs of the Univ. Laboratory of Physical Chemistry Related to Medicine and Public Health, Harvard Univ. N^o 3), ed. por F.R.N.Gurd, Academic Press Inc., New York (1954).
56. McElroy, W.D. and Glass, B., eds., "The Mechanism of Enzyme Action", The John Hopkins Press, Baltimore (1954), pag. 221.
57. Crook, E.M., ed., "Metals and enzyme activity", Biochemical Soc. Symposia (Cambridge, Engl.) N^o 15 (1955).
58. Vallee, B.L., The Enzymes 3B (P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck, eds.), Academic Press, New York-London (1960), pag. 225.
59. Malmström, B.G., Rosenberg, A. y Lidskog, S., Symposium n^o IV, Vth International Congress of Biochemistry, Moscow (1961).
60. Dwyer, F.P. y Mellor, D.P., eds., "Chelating agents and metal chelates", Academic Press, N.Y., (1964), pag. 335.
61. Neubauer, C. y Fromherz, K.Z., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 70, 326 (1910).
62. Neubauer, C. y Hildesheimer, A., Biochem.Z. 31, 170 (1910).
63. Neubauer, C. y Tir, L., Biochem.Z. 32, 323 (1911).
64. Neubauer, C. y Karczag, L., Biochem.Z. 36, 60 (1911).
65. Neubauer, C. y Karczag, L., Biochem.Z. 37, 170 (1911).
66. Neubauer, C. y Peterson, P., Biochem.Z. 67, 32 (1914).

67. Neubauer, C. y Karczag, L., *Biochem.Z.* 36, 68 (1911).
68. Krebs, H.A. y Roughton, F.J.W., *Biochem.J.* 43, 550 (1948).
69. Conway, E.J. y MacDonnell, E., *Nature* 156, 752 (1945).
70. Auhagen, E., *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 204, 149 (1932).
71. Auhagen, E., *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 209, 20 (1932).
72. Auhagen, E., *Biochem.Z.* 258, 330 (1933).
73. Lohmann, K. y Schuster, P., *Biochem.Z.* 294, 188 (1937).
74. Lohmann, K. y Schuster, P., *Naturwissenschaften* 25, 26 (1937).
75. Anderson, B., *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* 210, 15 (1932).
76. Zeijlemaker, F.C.J., *Akad. Wettensch. Amsterdam Proc. Sect. Sc.* 42, 187 (1939).
77. Bunting, A.H. y Janes, W.O., *New Physiologist* 40, 262 (1941).
78. Dickens, F. y Weil-Mlaherbe, H., *Cancer Res.* 3, 73 (1943).
79. Cohen, P.P., *J. Biol. Chem.* 164, 685 (1946).
80. Horowitz, N.H. y Heegaard, E., *J. Biol. Chem.* 137, 475 (1941).
81. Mee, S., *Arch. Biochem.* 22, 139 (1949).
82. Guzmán-Barrón, E.S. y colab., *Arch. Biochem.* 28, 377 (1950).
83. Sakaguchi, K. et al., *J. Agr. Chem. Soc. (Japan)* 18, 717 (1942).
84. Tytell, A.A. y Gould, B.S., *J. Bact.* 42, 513 (1941).
85. Cohen, G.N. y Cohen-Bazire, G., *Nature* 162, 578 (1948).
86. Clifton, C.E., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 43, 513 (1941).
87. Kobel, M. y Neubauer, C. en G. Klein. *Handbuch der Pflanzenanalyse*, Viena 4, 1253 (1933).
88. King, T.E. y Cheldelin, V.H., *J. Biol. Chem.* 208, 821 (1954).
89. Guzmán-Barrón, E.S. y colab., *J. Gen. Physiol.* 34, 211 (1950).
90. Kubowitz, F. y Lüttgens, W., *Biochem.Z.* 307, 170 (1941).

91. Green,D.E., Herbert,D. y Subrahmanyam,V., J.Biol.Chem. 138, 327 (1941); 135, 795 (1940).
92. Holzer,H., Schultz,G., Villar-Palasi,C. y Jüntgen-Sell,J. Biochem.Z. 327, 331 (1956).
93. De la Fuente,G., Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Madrid 1955.
94. Kay,W.W. y Murfitt,K.C., Biochem.J. 62, 601 (1956).
95. Melnick,J.L. y Stern,K.G., Enzimología 8, 129 (1940).
96. Koike,M., Reed,L.J. y Carroll,W.R., J.Biol.Chem. 238, 30, (1963).
97. Ullrich,J., Wittorf,J.H. y Gubler,C.J., Biochim.Biophys. Acta 113 (3), 595 (1966).
98. Aldous,J.G. y Stewart,K.D., Rev.Can.Biol. 11, 49 (1952).
99. Neuberger,C. y Rosenthal,P., Biochem.Z. 51, 128 (1913).
100. Wiethoff,E.O., Leppla,W. y Holt,C.v., Biochem.Z. 328, 576 (1957).
101. Buchman,E.R., Heegaard,E. y Bonner,J., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 26, 561 (1940).
102. Sevag,M.G. et al., J.Gen.Physiol. 25, 805 (1942).
103. Sevag,M.G. et al. J.Bact. 49, 65 (1945).
104. Eusebi,A.J. y Cerecedo,L.R., Abstracts, Division of Biological Chemistry American Chemical Society 116th. Meeting, Atlantic City (1949).
105. Eusebi,A.J. y Cerecedo,L.R., Federation Proc. 9, 169(1950).
106. Velluz,L. y Herbain,M., J.Biol.Chem. 190, 241 (1951).
107. Eich,S. y Cerecedo,L.R., J.Biol.Chem. 207, 295 (1954).

108. Koike, M., *Vitaminology* 1, 254 (1955).
109. Woolley, D.W., *J. Biol. Chem.* 191, 43 (1951).
110. Wetzell, K., *Planta* 15, 697 (1931).
111. Axmacher, F. y Bergstermann, H., *Biochem. Z.* 272, 259 (1934).
112. Kossel, A.J., *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 276, 251 (1942).
113. Kuhn, R. y Beinert, H., *Ber.* 76 B, 904 (1943).
114. Kuhn, R. y Beinert, H., *Chem. Ber.* 80, 101 (1947).
115. Stoppani, A.O.M. y Actis, A.S., *An. asoc. quim. argentina* 40, 128 (1952).
116. Aldous, J.G., *Can. J. Med. Sci.* 30, 68 (1952).
117. Gaudiano, A. y Maggiore, L., *Boll. soc. ital. biol. sper.* 31, 1341 (1955).
118. Antoniani, C., *Riv. biol.* 36, 3 (1943).
119. Meyerhof, O. y Kaplan, A., *Arch. Biochem. Biophys.* 37, 375 (1952).
120. Wallerstein, J.S. y Stern, K.G., *J. Biol. Chem.* 158, 1 (1945).
121. Lutwak-Mann, C., *Biochem. J.* 36, 706 (1942).
122. Von Euler, H. y Ahlström, L., *Arkiv Kemi Mineral Geol.* 16 B, nº 16 (1943).
123. Massart, L. y Vandendriessche, L., *Enzymologie* 10, 244 (1942).
124. Kensler, S.J., Young, N.F. y Rhoads, C.P., *J. Biol. Chem.* 143, 465 (1942).
125. Martín Hernández, D., de la Fuente, G. y Santos-Ruiz, A., *Rev. esp. Fisiol.* 12, 93, 117, 143, 225 (1956).

126. Schellenberger, A., Kolbe, A. y Hübner, G., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 341(1-3), 22 (1965).
127. Schellenberger, A. et al., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 346 (3-6), 123 (1966).
128. Ochoa, S. y Peters, R.A., Biochem. J. 32, 1501 (1938).
129. Lipton, M.A. y Elvehjem, C.A., J. Biol. Chem. 136, 637 (1940).
130. Westenbrink, H.G.K., Enzymologia 8, 97 (1940).
131. Westenbrink, H.G.K. et al., Enzymologia 9, 73 (1940).
132. Neubauer, C. y Minard, G., Enzymologie 1, 161 (1937).
133. Long, C. y Peters, R.A., Biochem. J. 33, 759 (1939).
134. Henkel, R. (citado en la ref. 136).
135. Kobayasi, S., J. Biochem. (Japan) 33, 301 (1941).
136. Schellenberger, A., Angew. Chem. 79(23), 1050 (1967).
137. Gale, G.R., Arch. Biochem. Biophys. 94, 236 (1961).
138. Steyn-Parvé, E. y Westenbrink, H.G.K., Z. Naturforsch. 15, 1 (1944).
139. Blanchaer, M.C. y Cohen, L.H., Canad. J. Res. 27 E, 275 (1949).
140. Lielknecht, W.L., Biochem. Z. 303, 101 (1939).
141. Auhagen, E., Naturwiss. 19, 916 (1931).
142. Westenbrink, H.G.K. et al., Z. f. Vitaminforsch. 13, 218 (1943).
143. Weil-Malherbe, H., Biochem. J. 33, 1997 (1939).
144. Warburg, O. y Christian, W., Biochem. Z. 298, 368 (1938).
145. Leuthardt, F. y Nielsen, H., Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 8, C 32, 1950.
146. Langenbeck, W. y Faust, G., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 292, 73 (1953).

147. Holzer, H. y Goedde, H.W., *Biochem.Z.* 329, 192 (1957).
148. Shigeo, H., *J. Vitaminol (Osaka)* 3, 1 (1957).
149. Boffi, V., Lucarelli, A. y Bucci, E., *La Ricerca scientifica* nº 7, 2069 (1955).
150. Boffi, V., Lucarelli, A. y Bucci, E., *La Ricerca scientifica* nº 9, 2692 (1957).
151. Boffi, V. et al., *Internationale Zeitschrift f. Vitaminforsch.* XXIX, nº $\frac{1}{2}$, 1 (1958).
152. Barrón, E.S.G., *Adv. in Enzymology* 11, 201 (1951).
153. Barrón, E.S.G. y Singer, T.P., *J. Biol. Chem.* 157, 221 (1945).
154. Meyer, J., (citado en la ref. anterior).
155. Barrón, E.S.G., Miller, Z.B., Bartlett, G.R., Meyer, J. y Singer, T.P., *Biochem. J.* 41, 69 (1947).
156. Peters, R.A., Sinclair, H.M. y Thompson, R.H.S., *Biochem. J.* 40, 516 (1946).
157. Mackworth, J.F., *Biochem. J.* 42, 82 (1948).
158. Stoppani, A.O.M., Actis, A.S., Deferrari, J.O. y González, E.L., *Nature* 170, 842 (1952); *Biochem. J.* 54, 378 (1953).
159. Kanopkaite, S.I., *Biokhimiya* 21, 834 (1956).
160. Schellenberger, A. y Hübner, G., *Angew. Chem.* 80, 41 (1968).
161. Schubert, M.P., *J. Biol. Chem.* 114, 341 (1936).
162. Cavallini, D., *Biochem. J.* 49, 1 (1951).
163. Conway, E.J. y Downey, M., *Biochem. J.* 47, 355 (1950).
164. Metzler, D.E., *Enzymes II* (P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck, eds.) Academic Press, New York-London (1960), pag. 295.
165. Siliprandi, N., "Les Coenzymes de la décarboxylation",

V Jornadas Bioquímicas Latinas. Barcelona, 1959.

166. Santos-Ruiz, A. y Mayor, F., "Los enzimas descarboxilantes", V Jornadas Bioquímicas Latinas. Barcelona, 1959.
167. Simola, P.E., Biochem.Z. 254, 229 (1932).
168. Peters, R.A., Lancet 230, 1161 (1936).
169. Banga, I., Ochoa, S. y Peters, R.A., Biochem.J. 33, 1980 (1936).
170. De la Fuente, G. y Díaz-Cadavieco, R., Nature 174, 1014 (1954).
171. Kiessling, K.H., Biochim. Biophys. Acta 20, 293 (1956).
172. Rossi-Fanelli, A., Siliprandi, N., Siliprandi, D. y Ciccarone, P., Proc. Internat. Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo (1957), Pergamon Press, London, pag. 119.
173. Langenbeck, W., Ergeb. Enzymforsch. 2, 314 (1933).
174. Stern, K.G. y Melnick, J.L., J. Biol. Chem. 131, 597 (1939).
175. Schellenberger, A., Osske, G. y Rödel, W., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 329 (3-6), 149 (1962).
176. Breslow, R., Chem. and Ind. (London), 1956, R 28.
177. Ingraham, L. y Westheimer, F.H., Chem. and Ind. (London), 1956, 846.
178. Fry, K., Ingraham, L.L. y Westheimer, F.H., J. Am. Chem. Soc. 79, 5225 (1957).
179. Schellenberger, A., Hanke, H. y Hübner, G., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 349 (4) 517 (1968).
180. Karrer, P., Bull. Soc. Chim. (France) 149 (1947).
181. Lipmann, F., Nature 138, 1097 (1936); 140, 849 (1937).

182. Lipmann, F. y Perlmann, G., *J. Am. Chem. Soc.* 60, 2574 (1938).
183. Mizuhara, S. et al., *Proc. Japan Acad.* 27, 302, 700 (1951).
184. Mizuhara, S. y Handler, P., *J. Am. Chem. Soc.* 76, 571 (1954).
185. Breslow, R., *Chem. and Ind. (London)*, 893 (1957).
186. Breslow, R., *J. Am. Chem. Soc.* 79, 1762 (1957); 80, 3719 (1958).
187. Breslow, R. y McNelis, E., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3080 (1959).
188. Koffler, H. y Krampitz, L.O., *Bacteriol. Proc.* 7 (1955).
189. Yatco-Manzo, E. et al., *J. Biol. Chem.* 234, 733 (1959).
190. Wiesner, K. y Valenta, Z., *Experientia* 12, 190 (1956).
191. Weil-Malherbe, H., *Nature* 145, 106 (1940).
192. DeTar, D.F. y Westheimer, F.H., *J. Am. Chem. Soc.* 81, 175 (1959).
193. Maier, G.D. y Metzler, D.E., *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4386 (1957).
194. Yount, R.G. y Metzler, D.E., *J. Biol. Chem.* 234, 738 (1959).
195. Downes, J. y Sykes, P., *Chem. and Ind. (London)* 1095 (1957).
196. Biggs, J. y Sykes, P., *J. Chem. Soc.* 1849 (1959).
197. Pullman, B., Spanjaard, C. y Valdemoro, C., *Compt. rend.* 248, 2413 (1959).
198. Pullman, B. y Spanjaard, C., *Biochim. Biophys. Acta* 46, 576 (1961).
199. Krampitz, L.O. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 80, 5893 (1958).
200. Krampitz, L.O., Greull, G. y Suzuki, I., *Federation Proc.* 18, 266 (1959).
201. Holzer, H. y Beaucamp, K., *Biochim. Biophys. Acta* 46, 225 (1961).
202. Krampitz, L.O., Suzuki, I. y Greull, G., "Mechanism of Action of Thiamin Diphosphate" en *Brookhaven Symposia in*

- Biology, nº 15, 282 (1962).
203. Carlson, G.L., y Brown, G.M., J. Biol. Chem. 235(2), PC3 (1960).
 204. Holzer, H. y Beaucamp, K., Angew. Chem. 71, 776 (1959).
 205. Holzer, H. et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 98, 453 (1962).
 206. Goedde, H.W., Inouye, H. y Holzer, H., Biochim. Biophys. Acta 50, 41 (1961).
 207. Datta, A.G. y Racker, E., J. Biol. Chem. 236, 624 (1961).
 208. Schellenberger, A. y Winter, K., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 164 (1960).
 209. Schellenberger, A., Rödel, W. y Rödel, H., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 339 (1-6), 122 (1964).
 210. Langenbeck, W., Chem. Geol. Biol. (4) 16pp (1964).
 211. Goedde, H.W., Ulrich, B., Stahlmann, C. y Holzer, H., Biochem. Z. 343, 204 (1965).
 212. Juni, E., J. Biol. Chem. 236 (8), 2302 (1961).
 213. Schellenberger, A., Müller, V., Winter, K. y Hübner, G., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 344 (4-6) 244 (1966).
 214. Schellenberger, A., Heinroth, I. y Hübner, G., Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 348 (5), 506 (1967).
 215. Lyons, J.W. y Siebenthal, C.D., Biochim. Biophys. Acta 120, 174 (1966).
 216. Karrer, P. y Viscontini, M., Helv. Chim. Acta 29, 1981 (1946).
 217. Viscontini, M., Bonetti, G. y Karrer, P., Helv. Chim. Acta 32, 1478 (1949).
 218. Velluz, L., Amiard, G. y Bartos, J., Bull. Soc. Chim. (Fr.) 871 (1948).

219. Velluz,L., Amiard,G. y Bartos,J., J.Biol.Chem.180, 1137 (1949).
220. Siliprandi,D. y Siliprandi,N., Biochim.Biophys.Acta 14, 52 (1954).
221. Perrin,D.D. y Sharma,V.S., Biochim.Biophys.Acta 127, 35 (1966).
222. Malmström,B.G. y Rosenberg,A., Adv. in Enzymology 21, (ed. por F.F.Nord), Interscience, New York-London (1959) pag. 131.
223. O'Sullivan,W.J. y Cohn,M., J.Biol.Chem.241(13),3104(1966).
224. Mildvan,A.S. y Cohn,M., J.Biol.Chem.241(5), 1178 (1966).
225. Van Steveninck,J., Biochem. 5 (6), 1998 (1966).
226. Larsson,M. y Malmström,B.G., Arch.Biochem.Biophys. 92, 94 (1961).
227. Cohn,M. y Hughes,T.R.Jr., J.Biol.Chem.237(1), 176 (1962).
228. Martonosi,A. y Meyer,H., J.Biol.Chem.239(2), 640 (1964).
229. Josse,J., J.Biol.Chem. 241 (9), 1948 (1966).
230. Briggs,P.R., J.Biol.Chem. 134, 261 (1940).
231. Schellenberger,A. y Winter,K., Hoppe Seyler's Z.physiol. Chem. 344 (1-3), 16 (1966).
232. Verma,S.D. y Dey,A.N., Indian J.Appl.Chem.26(3),71(1963).
233. Schellenberger,A., Wendler,K., Creutzburg,P. y Hübner,G., Hoppe Seyler's Z.physiol.Chem. 348(5) 501 (1967).
234. Utsumi,J. et al., J.Vitaminol. (Kyoto) 9(1) 41 (1963) (C.A. 60 (11) 13479e (1964)).
235. Hamamoto y Yamanouchi (C.A. 46, 6999c, 1952).
236. Schellenberger,A. y Hübner,G., Hoppe Seyler's Z.physiol. Chem.348(5), 491 (1967).