

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE MEDICINA

**Estudios teóricos sobre el enzima D-aminoácido oxidasa.  
Nuevos aspectos experimentales sobre la oxidación  
aeróbica de los nucleótidos de piridina  
por la peroxidasa de rábano.**

TESIS DOCTORAL  
de  
COSME MORENO PUERTAS

Granada, Septiembre 1987



UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA

Curso de 1987 a 1988

Folio 7.ª

Número 13

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Comte  
Moreno Puertas, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente  
tema, que libremente había elegido: Estudios teóricos sobre la amina Diaminocacato  
Dardona. Nuevos aspectos Experimentales sobre la oxidación acrílica de los Quelocatos  
de piridina por la peroxidasa de robaro.

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este  
le calificó de Apto Cum laude

Granada 16 de Noviembre de 1987

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

Fdo.: H. Delgado Suarez

Fdo.: J. A. Gomez Ayllón

EL VOCAL,

EL VOCAL,

EL VOCAL,

Fdo.: A. Juan Puente de H.

Fdo.: Luis J. Ruiz López

Fdo.: Rafael Juan López

FIRMA DEL GRADUANDO,



*A mi familia*

*El presente trabajo ha sido realizado en el Servicio de Bioquímica Experimental de la Clínica Puerta de Hierro de Madrid, codirigido por el Profesor Mario Gosálvez, jefe del mencionado Servicio, y por el Profesor José Miguel Fernández, del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina de Granada.*

*Agradezco a la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Madrid, la concesión de una Beca y Ayuda paralela para la realización del mismo.*

*Ese trabajo también ha sido financiado en parte con la ayuda de CAICYT 1475/82-87.*

*Mencionar a todos los que profesional y vitalmente me han ayudado y estimulado a realizar este trabajo no sólo sería largo y tedioso, sino que además correría el riesgo de ser injusto por el olvido de alguno. A todos ellos mi agradecimiento y mi afecto.*



---

INDICE

---

---

PARTE I. INTRODUCCION	7
FUNDAMENTOS DE LA ENZIMOLOGIA DEL OXIGENO	8
<b>Precedentes históricos</b>	
<b>Enzimas con oxígeno molecular como sustrato</b>	
<b>Naturaleza y funciones biológicas de las reacciones     de oxigenación</b>	
<b>Características generales de las reacciones     de monooxigenación</b>	
CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE UNA OXIDASA: D-AMINOACIDO OXIDASA	16
<b>Características del enzima</b>	
PARTE II. ESTUDIO TEORICO SOBRE LOS SUBSTRATOS DEL ENZIMA D-AMINOACIDO OXIDASA	19
INTRODUCCION	20
MATERIAL Y METODOS	21
RESULTADOS TEORICOS	22
<b>Sobre los sustratos del enzima D-aminoácido oxidasa</b>	
<b>Sobre la actividad del enzima D-aminoácido oxidasa y     sus productos finales</b>	
<i>D-aminoácido oxidasa considerado como una         monooxigenasa externa</i>	



*D-aminoácido oxidasa considerado como un enzima  
con actividad hidropéroxido sintetasa*

DISCUSION	29
PARTE III. TRABAJOS EXPERIMENTALES	33
ENFOQUE EXPERIMENTAL DE NUESTRA HIPOTESIS Y SU JUSTIFICACION	34
TRABAJOS EXPERIMENTALES CON PEROXIDASA DE RABANO	36
<b>Propiedades fisico-químicas del enzima</b>	
<b>Actividades enzimáticas</b>	
<i>Actividad peroxidasa</i>	
<i>Actividad de oxidación aeróbica</i>	
MATERIAL Y METODOS	40
<b>Materiales</b>	
<i>Enzimas</i>	
<i>Proteínas</i>	
<i>Otros materiales</i>	
<b>Métodos</b>	
<i>Determinación del consumo de oxígeno</i>	
<i>Determinación del consumo de nucleótidos de piridina</i>	
<i>Determinación de peróxido de hidrógeno</i>	
<i>Determinación de piruvato</i>	
<i>Determinación de glutation reducido</i>	
<i>Realización de espectros de absorción</i>	
<i>Determinación de concentración de proteínas y otros</i>	
<i>Cálculo de parámetros cinéticos</i>	
RESULTADOS	49
ACTIVIDAD DE OXIDACION AEROBICA DE LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS POR LA PEROXIDASA DE RABANO	49
<b>Dependencia irregular del consumo de oxígeno y de         la velocidad de oxidación de la concentración         de piridin nucleótidos</b>	
<b>Dependencia del pH</b>	
<b>Influencia de cianuro, azida y catalasa</b>	
<b>Disparidad entre el consumo de oxígeno y de         oxidación de piridin nucleótidos</b>	



### Formación del compuesto III

INFLUENCIA DE LA SEROALBUMINA BOBINA (BSA) SOBRE LA ACTIVIDAD DE OXIDACION AEROBICA DE LA PEROXIDASA	55
<i>Experimentos de consumo de oxígeno</i>	
Estimulación del consumo de oxígeno por BSA	
Inhibición por cianuro y peróxido de hidrógeno	
Influencia de azida y catalasa	
Dependencia de las concentraciones de BSA y cinética de saturación del sistema NADH - POD - BSA	
Dependencia de la velocidad de reacción de la concentración de NADH y cinética de saturación respecto al mismo en presencia de BSA	
<i>Determinaciones espectrofotométricas del consumo de piridín nucleótidos</i>	
IDENTIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE ACTIVACION DEL OXIGENO EN PRESENCIA DE BSA	62
NATURALEZA DE LA INTERACCION POD - BSA: ESTUDIOS ESPECTRALES	66
Aparición del compuesto II	
Influencia del cianuro y peróxido de hidrógeno sobre el compuesto II	
INFLUENCIA DE LOS D- Y L- AMINOACIDOS SOBRE LOS SISTEMAS NADH - POD Y NADH - POD - BSA	69
D- y L-aminoácidos y el sistema NADH - POD	
D- y L-aminoácidos y el sistema NADH - POD - BSA	
INFLUENCIA DE OTROS SUBSTRATOS PROTEICOS Y NO PROTEICOS SOBRE EL SISTEMA NADH - POD	75
DISCUSION	77
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFIA	88

---



TESIS DOCTORAL

---

PARTE I

---

---

INTRODUCCION

---

FUNDAMENTOS DE LA ENZIMOLOGIA  
DEL OXIGENO

**Precedentes históricos**

Bien podría decirse que la verdadera historia de la bioquímica se inicia a finales del siglo XVIII, cuando Prestley descubre el oxígeno y demuestra que es producido por las plantas y consumido por los animales. Muy pronto, Lavoisier reconoce que la respiración es un proceso de oxidación. En 1897, Pasteur observó que las levaduras que crecían en ausencia de oxígeno sufrían procesos de degeneración en su estructura, al menos que algunos períodos de aerobiosis fueran intercalados durante su crecimiento, si bien ya era conocida su capacidad de mantenerse vivas bajo condiciones anaeróbicas estrictas (citado por Warburg, 1966). Este fenómeno sugería que el oxígeno, además de aportar energía en los procesos de oxidación, era necesario para la biosíntesis de compuestos necesarios para la morfogénesis.

Desde una perspectiva diferente, Traube realiza en 1874 sus investigaciones resumidas en su monografía *Oxydationsfermente* (citado por Keilin, 1966) en las que sugiere que las oxidaciones biológicas serían llevadas a cabo por enzimas intracelulares que tendrían al oxígeno como sustrato. Este concepto se afianzó muy pronto gracias a los trabajos de Yoshida en Japón y Bertrand en Francia, quienes a fines del siglo XIX trabajan con enzimas que oscurecen y endurecen al latex de los árboles de laca orientales (Keilin 1966, Fruton 1972). Lacasa fue el nombre que recibió el enzima responsable de la oxidación de las sustancias fenólicas del látex. Este enzima fue encontrado además en algunas setas, las cuales contenían también un enzima fenol oxidasa diferente, que fue llamado tirosinasa. Bertrand introduce el término *oxidasa* para estos enzimas y sugiere que son metaloproteínas con propiedades catalíticas.

Ya a principios del siglo XX Bach y Chodat proponen que la activación biológica del oxígeno sería llevada a cabo primero mediante una reacción del oxígeno con una molécula aceptora, que sería catalizada por una *oxige-*



nasa seguida de la oxidación de un sustrato orgánico dador de electrones; este segundo proceso sería catalizado por una *peroxidasa* y el resultado final sería la reducción del oxígeno a agua. Esta hipótesis no recibió el soporte experimental necesario y fue pronto abandonada.

Un panorama diferente surge de las investigaciones de Thumberg, Wieland, Warburg y Keilin. Sus trabajos demuestran que la oxidación biológica de los sustratos orgánicos implica una deshidrogenación de los mismos. El aceptor del hidrógeno sería un coenzima orgánico (por ej. el NAD), y la molécula de oxígeno el aceptor final de los electrones y protones quedando el coenzima oxidado de nuevo. Esto ocurre en la cadena respiratoria cuyo componente terminal, citocromo oxidasa, cataliza la reducción del oxígeno a dos moléculas de agua.

Otras oxidasas sólo reducían el oxígeno hasta el nivel de peróxido (agua oxigenada), pero en ningún caso se había observado antes de la década de los 50 que el oxígeno se insertase en un sustrato orgánico. En aquellos casos en que el oxígeno se incorporaba en compuestos orgánicos, se asumía que era derivado del agua a través de la adición al doble enlace resultante de la deshidrogenación del sustrato orgánico.

Pero la idea de que el oxígeno es fundamental para la vida, no sólo por ser el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria, sino también porque es necesario para la síntesis de metabolitos esenciales, (según la hipótesis de Pasteur), es nuevamente relanzada (Bloch *et al.*, 1946; Andreassen y Stier 1953) y en 1955, dos grupos de investigadores caracterizan independientemente un nuevo tipo de reacción enzimática, por la cual el oxígeno molecular es fijado en sustratos orgánicos. Por un lado Mason y por otro Hayaishi utilizando  $^{18}\text{O}_2$ , descubren respectivamente cómo uno de los átomos o los dos átomos del oxígeno molecular son insertados en un sustrato orgánico. Se propuso por tanto que los enzimas que catalizan tales reacciones fuesen llamados oxigenasas (Hayaishi *et al.*, 1956). Desde entonces, se han descubierto numerosas oxigenasas en animales, plantas y microorganismos. Estos enzimas han mostrado una gran versatilidad ya que no sólo participan en múltiples reacciones biosintéticas, sino que también en las vías de degradación de múltiples sustratos y compuestos extraños.

Así pues, desde una perspectiva actual se han establecido dos campos claramente diferentes en la enzimología del oxígeno. Por un lado, aquel que estudia la participación del oxígeno en los procesos de oxidación biológica, entendidos como aquellos en los que se produce una donación de electrones o átomos de hidrógeno de sustratos orgánicos, que son transferidos a través de cadenas de enzimas y portadores al oxígeno molecular como último aceptor, que es reducido a agua; durante esta transferencia, la energía es conservada y usada para la síntesis de adenosin trifosfato (ATP). El otro

campo de investigación, se ocupa de cómo el oxígeno es utilizado para la biosíntesis de algunos compuestos esenciales para la morfogénesis y la degradación de otros. Ambos procesos, hasta ahora entendidos como diferentes, pudieran ser manifestaciones distintas de una misma realidad biológica. Establecer los vínculos de unión entre ellos bien pudiera ser el reto de la enzimología del oxígeno en el futuro.

### Enzimas con el oxígeno molecular como sustrato

Antes de exponer un análisis más detallado de los enzimas que se ocupan en el metabolismo del oxígeno, conviene hacer algunas puntualizaciones terminológicas y algún comentario sobre las propiedades químicas del oxígeno.

Entendemos por oxígeno molecular o dióxígeno ( $O_2$ ) el producto de la unión covalente de dos átomos de oxígeno atómico (O). El oxígeno casi siempre se presenta en forma molecular en la naturaleza y es muy poco reactivo debido a su peculiar estructura electrónica (De Kock & Gray 1980). Una de las razones de su papel prominente en las oxidaciones biológicas es su alto potencial de reducción, es decir, es termodinámicamente un buen agente oxidante, pero así mismo, es bastante inerte. A temperaturas fisiológicas sólo reacciona en presencia de catalizadores; ésta es la principal causa de que sea precisamente el oxígeno y no otro elemento de la tabla periódica (por ej. el fluor) el elemento oxidante de los seres vivos.

La activación y reducción del oxígeno molecular se lleva a cabo enzimáticamente por la adición de electrones a los orbitales externos de la molécula, lo cual produce un alargamiento progresivo de la longitud de enlace y consecuentemente, un debilitamiento de la energía de enlace entre los dos átomos.

Todos los enzimas que activan y reducen al oxígeno molecular, son proteínas conjugadas; es decir, el enzima total (holoenzima) está constituido por una parte protéica (apoenzima) y un grupo prostético (coenzima). Los grupos prostéticos más frecuentes son flavinas, hemo y cobre (Keevil & Mason 1978), aunque también es frecuente observar al hierro formando parte de grupos no hemo.

Es el grupo prostético el que se combina con el oxígeno molecular. En sentido general son tres los tipos de activación del  $O_2$  llevados a cabo por los distintos grupos prostéticos (Malmström 1982):

1. Combinación del  $O_2$  con una flavina reducida para producir un flavin hidroperóxido, cuyo destino posterior es controlado por efectos específicos



en el centro activo.

2. Unión del  $O_2$  a un centro metálico reducido con grados variados de transferencia electrónica del metal al  $O_2$ .

3. Activación del sustrato orgánico por un centro metálico oxidado, que reacciona directamente con el  $O_2$  unido al centro activo.

Hasta la actualidad se conocen más de 200 enzimas que tienen al oxígeno molecular como uno de sus sustratos (Keevil & Mason 1978). Estos pueden ser divididos en dos categorías principales: a) oxidasas y b) oxigenasas.

Las oxidasas catalizan reacciones en las que el  $O_2$  actúa exclusivamente como aceptor de electrones, siendo reducido a ión superóxido ( $O_2^-$ ), a peróxido ( $H_2O_2$ ) o bien a agua ( $H_2O$ ) dependiendo que sea reducido estequiométricamente con uno, dos o cuatro electrones, respectivamente. (Figura I.1.).

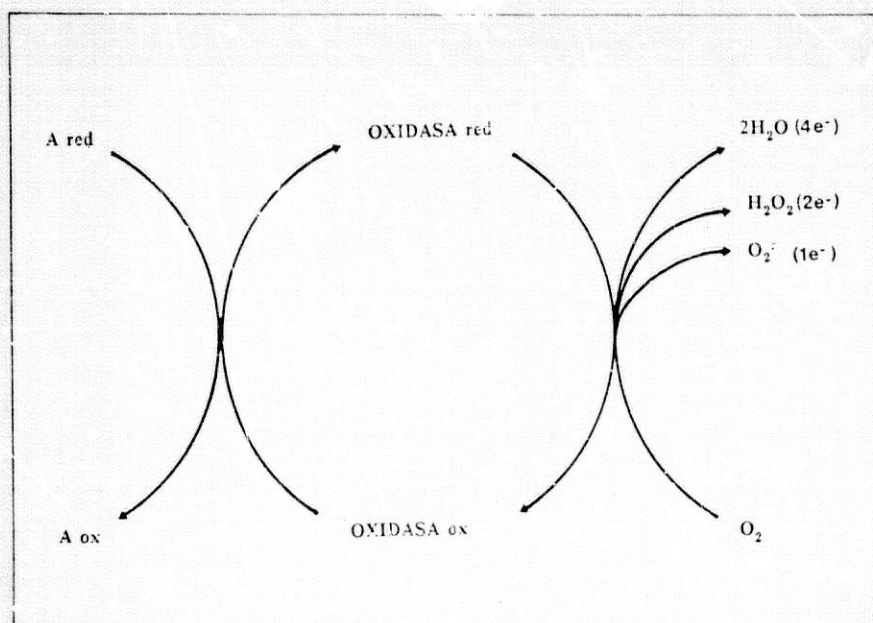


Figura I.1.: Mecanismo de reacción general de las oxidasas. A significa un sustrato externo que se oxida (por ej. NADH o una proteína reducida). El oxígeno molecular puede resultar reducido con 1, 2 ó 4 electrones.

Las oxigenasas catalizan las reacciones en las cuales uno ó dos átomos de oxígeno son incorporados en los sustratos (Hayaishi 1964 & Nozaki 1969). A su vez, pueden ser divididas en dos clases: dioxigenasas, que cata-

lizan la inserción de los dos átomos del oxígeno molecular en el sustrato, y monooxigenasas, también llamadas oxidasas de función mixta, que catalizan la inserción de un átomo de oxígeno en el sustrato, siendo el otro reducido a agua. (Figura 1.2.).

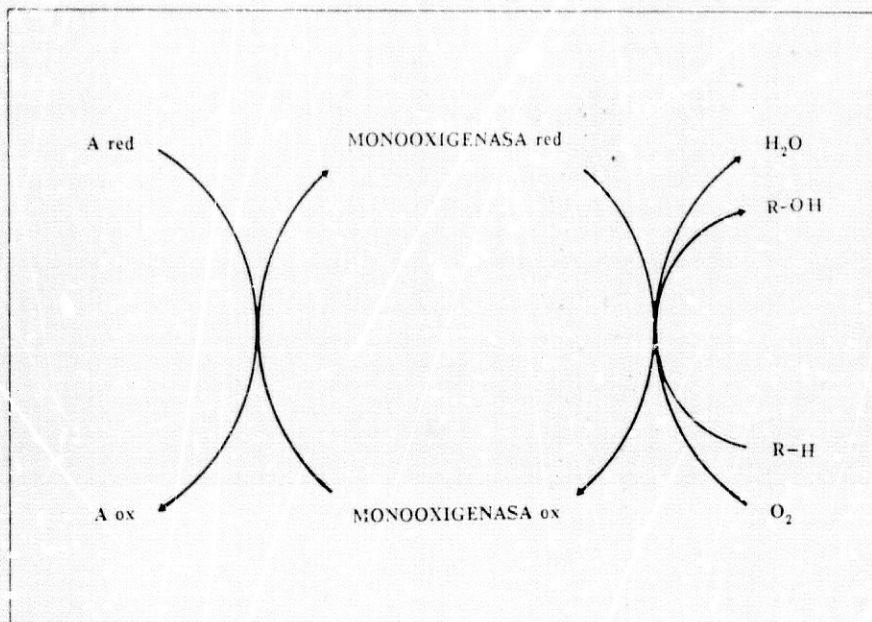


Figura 1.2.: Mecanismo general de reacción de una monooxigenasa de función mixta. A significa un sustrato oxidable que puede ser el propio sustrato hidroxilable (R - H), o bien un sustrato externo, por ej. NADH. El agua formada procede de la reducción de un átomo de oxígeno que es aceptor final de los electrones del sustrato hidroxilado o del sustrato externo.

A su vez las monooxigenasas se subclasifican en monooxigenasas externas e internas, dependiendo que la reducción a agua del segundo átomo de  $O_2$  sea a expensas de un sustrato externo (por ej. NADH) o bien por electrones del propio sustrato hidroxilado que resulta simultáneamente oxidado (Massey & Hemmerich 1975).

#### Naturaleza y funciones biológicas de las reacciones de oxigenación

Desde su descubrimiento, se han encontrado y estudiado muchas oxigenasas en animales, plantas y microorganismos.

En animales se localizan en el sistema de membranas interno conocido como microsomas o cuerpos microsomales, y son más abundantes en órganos



con funciones metabólicas, siendo el hígado de animales el principal portador de esta clase de enzimas y fuente de materia prima para la experimentación y conocimiento de este campo (Hildebrandt & Estabrook 1971; Nordblom & Coon 1977). Como se ha mencionado son enzimas muy versátiles e intervienen en multitud de rutas metabólicas:

a) Su participación en el metabolismo de aminoácidos aromáticos es conocida hace tiempo (Hayaishi 1962). Las síntesis de serotonina, NAD y acetyl coenzima A a partir del triptófano (Nishizuka & Hayaishi 1963; Okamoto *et al.*, 1967), se realizan fundamentalmente a través de reacciones de oxigenación que incorporan uno o dos átomos de oxígeno.

De igual forma, la síntesis de adrenalina, noradrenalina, melanina y hormonas tiroideas, a partir de la tirosina y fenilalanina, son realizadas por enzimas de esta clase (Kaufman, 1966; Udenfriend, 1966). La deficiencia de fenilalanina hidroxilasa (EC 1.14.3.1.) da lugar a la fenilcetonuria, un error metabólico congénito que conlleva graves deficiencias mentales. La alcaptonuria es también debida a la ausencia congénita de una dioxigenasa (E.C. 1.13.1.5.). La hidroxilación de la prolina a 4- hidroxiprolina (Hutton *et al.*, 1967, Kivirikko & Prockop, 1967), el único aminoácido constituyente del colágeno, es también realizada por una monooxigenasa que requiere ion ferroso, ascorbato y  $\alpha$ -cetoglutarato.

b) En cuanto al metabolismo lipídico, intervienen en la síntesis del colesterol, ácidos biliares y hormonas esteroideas (Hayano, 1962); desaturación de ácidos grasos y síntesis de prostaglandinas (Bergström, 1967); biosíntesis de la vitamina A (Olson & Hayaishi, 1965; Goodman *et al.*, 1967), etc.

c) Las oxigenasas intervienen también en el metabolismo de drogas. Las reacciones de monooxigenación catalizadas por microsomas hepáticos han sido el objeto de intensas investigaciones por enzimólogos, farmacólogos y toxicólogos, ya que estos enzimas son inducibles (Gillette *et al.*, 1957; Thurman *et al.*, 1972; Hildebrandt & Roets, 1975), y además de las ya mencionadas reacciones de hidroxilación, son capaces de catalizar otras reacciones, tales como dealquilación, decarboxilación, desaminación, etc. (Gillette *et al.*, 1966; Conney, 1967). Por estas razones, están íntimamente ligadas a los mecanismos de detoxificación de drogas y productos extraños, entre los que se incluyen aquellos que pueden inducir una transformación carcinogénica y también sustancias anticarcinogénicas. La hidroxilación de compuestos extraños, -en general compuestos alifáticos y aromáticos, poco solubles-, hacen que éstos tengan una mayor grado de solubilidad, y por lo tanto sean más metabolizables. De aquí que a estos enzimas, presentes también en plantas y microorganismos, se les haya adscrito un papel importante en la detoxificación de productos nocivos, constituyendo un importante control de la



polución (Massey & Hemmerich, 1975).

### Características generales de las reacciones de monooxigenación

Una de las propiedades más notable del grupo de monooxigenasas es el doble papel jugado por el sustrato, el cual es a la misma vez un efector y sustrato. El ser efector quiere decir que los mismos sustratos estimulan enormemente la velocidad de oxidación del sustrato externo (en general NAD(P)H). Este papel efector ha sido corroborado por muchos ejemplos de **sustratos análogos** (Staudt *et al.*, 1974; Massey & Hemmerich, 1975), los cuales incrementan también la velocidad de oxidación del sustrato externo, pero no sirven como sustratos hidroxidables, no siendo enzimáticamente atacados. En estos casos, el oxígeno consumido es reducido a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y no se produce agua, que es el producto habitual de las reacciones de hidroxilación cuando el sustrato es hidroxidable. Así pues, el incremento en el consumo del sustrato externo (NAD(P)H), más producción de  $H_2O_2$  es un test diagnóstico para estos pseudo-sustratos también llamados desacopiantes (Ullrich & Diehl, 1971; Ullrich, 1979). Se ha observado además, que en algunos casos, los sustratos muestran ambas propiedades, es decir, son hidroxilados y también dan lugar a un incremento de la producción de  $H_2O_2$ . La posible causa, a nivel molecular, del efecto estimulante de sustratos y desacopiantes, es la formación de un complejo enzima-sustrato en ambos casos, pero sin embargo, el desacoplante no podría incorporar el átomo de oxígeno por razones químicas o estéricas (White-Stevens & Kamin, 1970; Narasimhulu, 1971; Bernhardt *et al.*, 1973). Es altamente probable que el peróxido de hidrógeno producido sea originado a partir del ión superóxido ( $O_2^-$ ) por dismutación espontánea o bien enzimática (Richter *et al.*, 1977; Kuthan *et al.*, 1978; Kuthan & Ullrich, 1982).

Otra de las características importantes de estas enzimas, es que en casi todos los casos, la formación del complejo enzima - sustrato o pseudosustrato produce un cambio en las propiedades físicas del enzima que se aprecia mediante cambios substanciales en los espectros de absorción, fluorescencia y dicroísmo circular (Schenkman *et al.*, 1967; Peterson, 1971; Massey & Hemmerich, 1975).

En último lugar, mencionaremos que en el caso particular de los enzimas que contienen FAD como grupo prostético, se detecta un aducto covalente entre el  $O_2$  y la flavina reducida. Este aducto es llamado compuesto I o flavín-C (4a)-hidroperóxido (Ballou, 1982) (Figura I.3.). Esta especie intermedia es la responsable de la inserción de un átomo de oxígeno en el sustrato, resultando así hidroxilado.



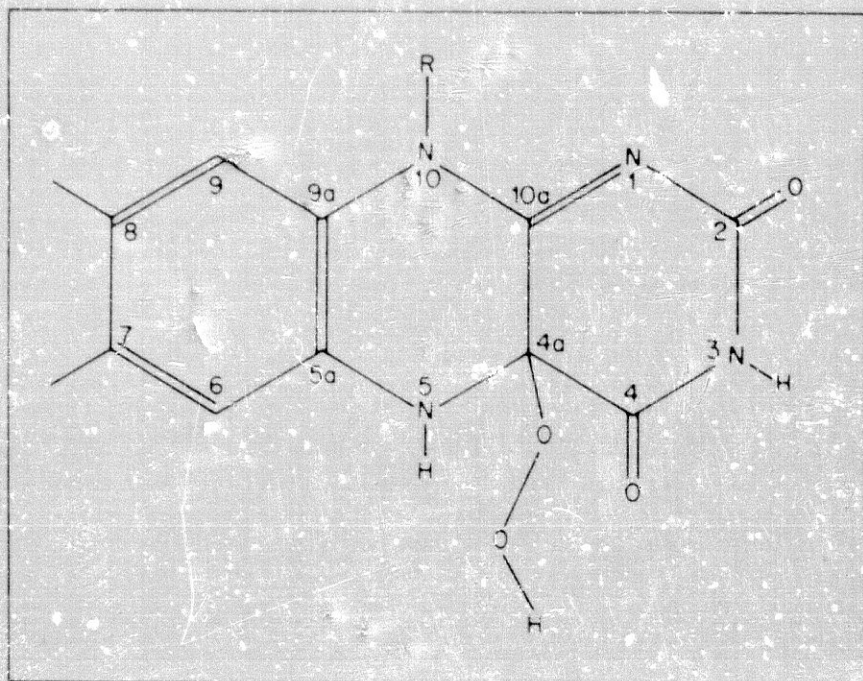
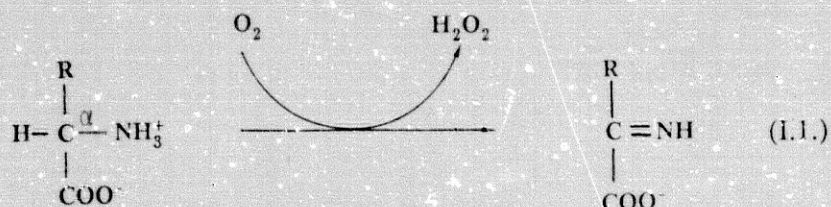


Figura I.3.: Flavin-C (4a)-hidroperóxido, compuesto I de la catálisis de monooxigenación de los enzimas que contienen FAD como grupo prostético.

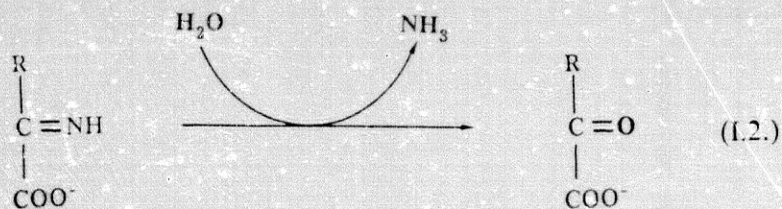


CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE UNA OXIDASA:  
D - AMINOACIDO OXIDASA

Aunque desde 1909 era conocida la oxidación de los  $\alpha$ -aminoácidos (Neubauer, 1909; Knoop, 1910), no fue hasta 1935 cuando Krebs aisló al enzima responsable de la oxidación de los D- $\alpha$ -aminoácidos. El enzima fue denominado D-aminoácido oxidasa (E.C. 1.4.3.3.) porque desamina a los D-aminoácidos como una oxidasa, es decir, tiene como uno de sus substratos al  $O_2$ . El carbono  $\alpha$  del D-aminoácido es oxidado para producir un iminoácido de acuerdo con la siguiente reacción (I.1.).



Los electrones correspondientes al hidrógeno  $\alpha$  son entregados al  $O_2$  para producir peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), mientras que el iminoácido se descompone espontáneamente mediante la entrada de agua en el correspondiente  $\alpha$ -cetoácido más amoniaco (Burton, 1972; Hamilton, 1985) de acuerdo con la reacción (I.2.).



Peróxido de hidrógeno, amoniaco y el correspondiente  $\alpha$ -cetoácido son los productos finales de la oxidación de un D-aminoácido por este enzima. El mecanismo de reacción del enzima ha sido intensamente estudiado



(Massey & Gibson, 1964; Dixon & Kleppe, 1965; Yagi, 1971; Porter *et al.*, 1975, 1977), aunque algunos aspectos aún no han sido dilucidados; la existencia de un  $\alpha$ -carbanión como compuesto intermediario ha sido demostrada por Walsh *et al.* (1971, 1973).

### Características del enzima

El enzima se ubica en los llamados microcuerpos o peroxisomas (Hruban & Rechigl, 1969; Böck *et al.*, 1980), que son sistemas de membranas internos, muy relacionados con el retículo endoplásmico.

El enzima es una proteína conjugada. La parte protéica tiene un peso molecular aproximado de 50.000 daltons, aunque suele presentarse en dímeros de 100.000 daltons (Fonda & Anderson, 1968; Shiga & Shiga, 1971). El enzima ha sido recientemente secuenciado (Swenson *et al.*, 1982; Ronchi *et al.*, 1982) y sometido a un intenso estudio para el conocimiento de la estructura de su centro activo y de los restos aminoácidos que intervienen en la función catalítica (Swenson *et al.*, 1981; Fitzpatrick & Massey, 1982 b).

Su grupo prostético está constituido por flavin-adenin-dinucleotido (FAD) que no está covalentemente unido al enzima (Porter & Bright, 1975). Su potencial de oxidación-reducción es de - 0,004 volts a pH=7; la parte protéica del enzima parece controlar las propiedades de oxidación-reducción del coenzima (Brunori *et al.*, 1971). En la figura I.4. se muestra el mecanismo de reacción básico del enzima.

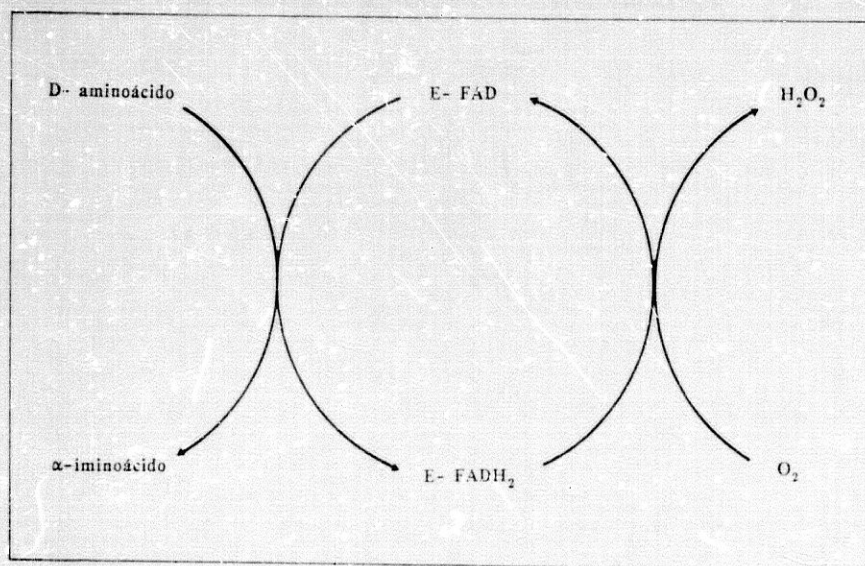


Figura I.4.



#### TESIS DOCTORAL

Es precisamente el grupo prostético el que, una vez reducido ( $\text{FADH}_2$ ) reacciona con el  $\text{O}_2$  para producir peróxido de hidrógeno, volviendo así de nuevo al estado oxidado.

El enzima, además de metabolizar a casi todos los D-aminoácidos con diferencias de  $K_m$  y  $V_{max}$  (Dixon & Kleppe, 1965; Young & Yamamoto, 1972), es también capaz de actuar lentamente sobre algún L-aminoácido como L-prolina y L-3,4-dihidroxi-prolina (Welner & Scannone, 1964). Además de estos substratos, el enzima actúa también sobre el ácido tiazolidin 2-carboxílico (Hamilton *et al.*, 1979); y algunos D-hidroxiácidos (Dixon & Kleppe, 1965; Yagi *et al.*, 1969).



TESIS DOCTORAL

---

PARTE II

---

---

ESTUDIO TEORICO DE LOS SUBSTRATOS  
DEL ENZIMA D-AMINOACIDO OXIDASA

---



## INTRODUCCION

El papel fisiológico del enzima D-aminoácido oxidasa (E.C. 1.4.3.3.) ha estado sometido a controversia desde su descubrimiento en 1935 (Krebs).

Aunque se ha demostrado que existe una actividad transaminasa para D-aminoácidos (Kakimoto *et al.*, 1969; Ozawa *et al.*, 1973; Durham *et al.*, 1973) y una actividad ciclasa para D-glutámico (Sekura *et al.*, 1976) en sistemas eucarióticos no se ha establecido ningún papel fisiológico para los D-aminoácidos (Meister *et al.*, 1960).

La hipótesis más generalizada para explicar la función del enzima, fue la propuesta por Krebs en 1948. Según ésta, el enzima tendría un papel detoxificador, siendo el encargado de metabolizar los D-aminoácidos originados por el metabolismo bacteriano, que cruzan la barrera intestinal y llegan al hígado. Pero con posteridad, se ha demostrado que el enzima se encuentra virtualmente en todos los tejidos de mamíferos, animales superiores y otros seres vivos pluri o unicelulares (Krebs, 1948; Neims & Hellerman; Barker & Hopkinson, 1977; Rosenfeld & Leiter, 1977; Robinson *et al.*, 1978; Jensen & Jakobsen, 1984). Los fallos habidos en detectarlo en algunos tejidos (Barker *et al.*, 1977) pudieran ser debidos a limitaciones técnicas o bien a que el enzima sea inducible (Meister *et al.*, 1960; Swank *et al.*, 1977) y esté ausente en algunas circunstancias no definidas. Esta ubicuidad cuestionaría la hipótesis de Krebs, ya que no justificaría la localización extrahepática de enzima.

Otra hipótesis es la que propone que el enzima sería una reliquia de la evolución y no juega ningún papel metabólico (Baker *et al.*, 1977), pero se ha establecido que su actividad incrementa con el desarrollo, siendo este comportamiento contrario al de un enzima vestigial (Hamilton, 1985).



Descartados los D-aminoácidos, se han propuesto otros sustratos. El más reciente e interesante de ellos ha sido el ácido tiazolidin-2-carboxílico (Hamilton *et al.*, 1979; Hamilton, 1985). Sin embargo, este sustrato también ofrece algunas dudas, ya que la  $K_m$  del enzima para este sustrato es varios órdenes de magnitud por encima de su probable concentración intracelular (Fitzpatrick & Massey, 1982 a).

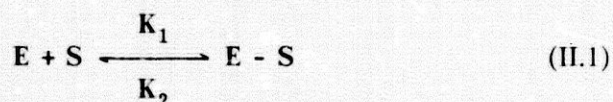
La ausencia, pues, de un papel fisiológico aceptable para el enzima D-aminoácido oxidasa, y la incógnita actual acerca de sus sustratos verdaderos, son las razones justificativas de este análisis teórico que tratará de arrojar alguna luz sobre los interrogantes planteados.

## MATERIAL Y METODOS

Para este estudio teórico se han utilizado modelos moleculares (con un error  $\leq 1\%$ ) y se han realizado figuras con una perspectiva adecuada a nuestros fines.

El desarrollo teórico está basado en modelos biológicos asentados desde el comienzo de la enzimología:

1. Existencia de un **complejo enzima-sustrato** (Brown, 1902; Henri, 1902). Este complejo, que sería el resultado de un reconocimiento estereoquímico del sustrato por el enzima, es el paso preliminar sin el cual no puede comenzar la catálisis enzimática. Desde el punto de vista cinético puede ser representado por medio de la ecuación:



Donde, E: enzima; S: sustrato; E-S: complejo enzima sustrato;  $K_1$  y  $K_2$  constantes de formación y disociación de dicho complejo.

2. **Modelo llave-cerradura:** Este modelo asume que el enzima posee una región llamada sitio activo, o sitio catalítico que es complementario en tamaño, forma y naturaleza química del sustrato. Así, solamente una sustancia, o un número limitado de ellas pueden unirse al enzima y actuar como sustratos (Fisher, 1894). Solamente cuando el sustrato es anclado con una orientación adecuada en el sitio activo, puede sufrir el cambio químico que lo transforma en producto.



Este modelo explica la alta especificidad exhibida por los enzimas y los fenómenos de inhibición competitiva llevados a cabo por moléculas parecidas estructural y químicamente a los sustratos (Segel, 1975).

3. El cuerpo de conocimiento actual sobre los enzimas que tienen al  $O_2$  como sustrato, ampliamente tratado en la parte I, ha sido utilizado para proponer una nueva actividad del enzima D-aminoácido oxidasa.

## RESULTADOS TEORICOS

### 1. Sobre los sustratos del enzima D-aminoácido oxidasa

#### a) D-aminoácido oxidasa oxida D- pero no L-aminoácidos

Como se ha mencionado previamente, casi todos los D-aminoácidos son sustratos del enzima, mientras que los L-aminoácidos no son metabolizados, con la excepción de L-prolina y L-3,4 dihidroxiprolina que son oxidados muy lentamente (Wellner & Scannone, 1964).

Para explicar esta especificidad para formas D, centrada fundamentalmente en el proceso de acoplamiento del sustrato con el enzima, es preciso formular dos observaciones fundamentales: la primera es que las cadenas laterales (R) de los D-aminoácidos, idénticas a las de los L-aminoácidos, intervienen de forma poco decisiva en el proceso de formación del complejo enzima-sustrato. Las características de la cadena lateral (R) influirían fundamentalmente en los parámetros cinéticos ( $V_{máx}$  y  $K_m$ ) (Dixon & Kleppe, 1965); y dado que las cadenas laterales de los aminoácidos tienen características químicas muy variadas, el enzima tendría poca especificidad en su reconocimiento (Bender & Krebs, 1950). Por lo tanto, la segunda observación a realizar es que el enzima debe reconocer a sus sustratos en función de la estructura del carbono  $\alpha$ , común a todos los D-aminoácidos y diferente, en tanto que imagen especular, de la de los L-aminoácidos. (Figura II.1.)

Además de la cadena lateral, el carbono  $\alpha$  de los aminoácidos es el portador de los grupos amino y carboxílico (ambos cargados positiva y negativamente en condiciones fisiológicas), así como del átomo de hidrógeno  $\alpha$ , que es concretamente el objeto de la catálisis enzimática (ambos electrones del enlace  $C \alpha - H$ , serán entregados al  $O_2$  por el enzima).

Por lo tanto, la posición espacial u ordenamiento estérico de los elementos citados -cadena lateral (R), grupos amino y carboxílico e hidrógeno  $\alpha$  - en una forma denominada convencionalmente D, para diferenciarla de su imagen especular L, es el factor decisivo en el formación del complejo



enzima-substrato que precede a la catálisis.

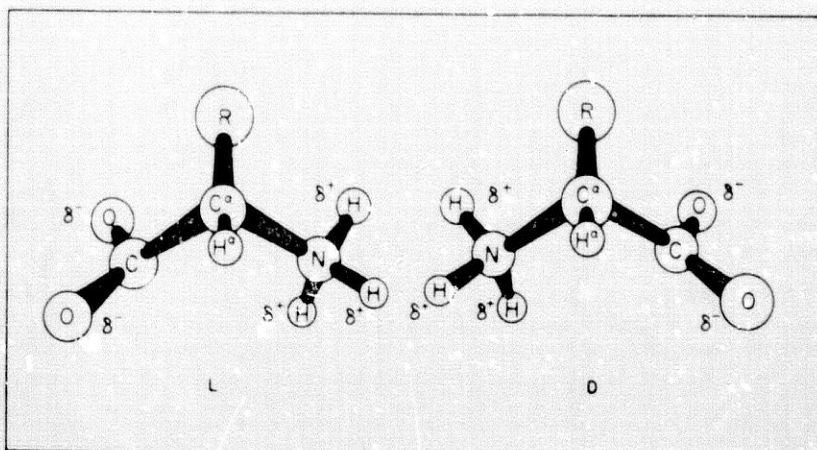


Figura II.1: L- y D-aminoácidos. La carga positiva del grupo amino está repartida entre los tres átomos de hidrógeno, y la negativa entre los dos átomos de oxígeno del grupo carboxilo.

Por otra parte, es razonable pensar que la especificidad del enzima para D-aminoácidos es debida al hecho que el sitio activo tenga otros grupos cargados electropositiva y electronegativamente (tirosina<sup>(-)</sup> 55 y lisina<sup>(+)</sup> 204 (Massey & Ghisla, 1983) que atraigan a los grupos cargados del D-aminoácido, de tal manera que el hidrógeno  $\alpha$  quede correctamente colocado y pueda sufrir el ataque catalítico, una vez completado el proceso de acoplamiento. Es obvio que la configuración del mencionado sitio activo del enzima es tal que permite exclusivamente el reconocimiento y catálisis de los D-aminoácidos. Sin embargo, el enzima tendría también cierta capacidad para reconocer a los L-aminoácidos, dado que éstos podrían ser acoplados con una orientación distinta del hidrógeno  $\alpha$ , pero debido a esto, no serían metabolizados. La inhibición competitiva por L-leucina, L-fenilalanina, L-metionina y L-norvalina, entre otros (Edlbacher & Wiss, 1944; Dixon & Kleppe, 1965; Rudie *et al.*, 1980) confirman esta posibilidad.

Pero, tal y como se ha apuntado al comienzo, no existe ninguna evidencia convincente que justifique que los D-aminoácidos (ni otros substratos propuestos hasta ahora) sean los substratos fisiológicos del enzima D-aminoácido oxidasa. Una búsqueda prospectiva de los substratos fisiológicos del enzima, podría apoyarse en el modelo «llave-cerradura» que explica el alto grado de especificidad de los catalizadores biológicos (Fisher, 1894). Según este modelo, en este caso concreto los D-aminoácidos podrían ser considerados como «ganzúas» o llaves falsas que encajarían en la «cerradura» constituida por el sitio activo del enzima. Por lo tanto, es razonable pensar que existirá cierta similitud estructural entre los D-aminoácidos y los substratos



reales, de la misma manera que una llave falsa debe parecerse a la llave original y verdadera.

Este parecido estructural con los posibles substratos fisiológicos debe ser establecido fundamentalmente a nivel de la estructura de carbono  $\alpha$  de los D-aminoácidos ya que como se ha deducido con anterioridad, es esta estructura la que es reconocida por el sitio activo del enzima.

*b) L-aminoácidos polimerizados*

Los L-aminoácidos constituyen los únicos materiales utilizados universalmente en la construcción de proteínas y enzimas. La unión sucesiva de un L-aminoácido a otro mediante enlace amido, determina la formación de polímeros de longitud variable que constituyen los llamados péptidos y proteínas. Tanto la longitud, como la composición aminoácida de cada uno de estos polímeros está previamente determinada por el código genético.

Durante el transcurso de su síntesis, el polímero de L-aminoácidos sufre una serie de plegamientos determinados por las características hidrofóbicas o hidrofílicas de las cadenas laterales (R) (Chou & Fasman, 1974), con el fin de conseguir una energía conformacional mínima en el seno de los fluidos biológicos constituidos fundamentalmente por agua.

Estos plegamientos, denominados en conjunto conformación secundaria de la proteína, consisten básicamente -además de la conformación no estable o al azar- en la hélice  $\alpha$  y la conformación  $\beta$  o lámina  $\beta$  (Kendrew, 1961; Dickerson & Geis, 1969).

Si ahora consideramos una proteína o polipéptido en conformación  $\beta$  (figura II.2.), y dirigimos la atención a cualquier hidrógeno correspondiente al carbono  $\alpha$  del L-aminoácido polimerizado (por ej. el que aparece en el área enmarcada del centro), se observan en su vecindad átomos con carga eléctrica. La carga negativa parcial del átomo de oxígeno del grupo carbonilo y la carga positiva parcial del átomo de hidrógeno del grupo imino, cercanos al átomo de hidrógeno  $\alpha$ , son el resultado de la estabilización por resonancia de los átomos incluidos en el enlace peptídico o amido. Ambas cargas configuran un entorno eléctrico para el átomo de hidrógeno  $\alpha$ .

Si ahora analizamos de la misma manera el entorno eléctrico y las posiciones relativas de grupos cargados con respecto al átomo de hidrógeno  $\alpha$  en D- y L-aminoácidos (figura II.1.) y los comparamos con los de la lámina  $\beta$  (figura II.2.), resulta que las posiciones de los átomos cargados del mismo signo y la cadena lateral (R) con respecto al hidrógeno  $\alpha$ , son similares en el D-aminoácido y en el lámina  $\beta$ ; más aún, las distancias reales entre los elementos en cuestión son muy parecidas en ambas estruc-



turas moleculares.

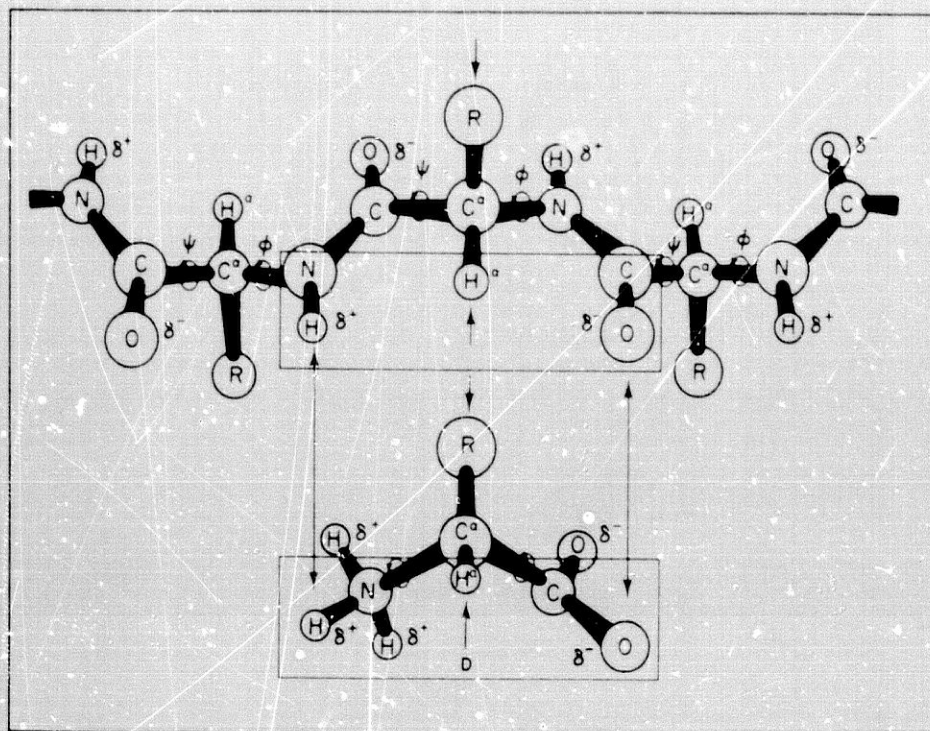


Figura II.2.: Arriba: Cadena proteica (hecha con L-aminoácidos polymerizados en conformación de lámina  $\beta$ ). Area marcada: átomo de hidrógeno positivo del grupo imino, y átomo de oxígeno del grupo carbonilo en relación con el átomo de hidrógeno  $\alpha$ . Abajo: D-aminoácido. Area marcada: átomo de hidrógeno positivo del grupo amino y átomo de oxígeno negativo del grupo carboxilo en relación con el átomo de hidrógeno  $\alpha$ . Las flechas indican las coincidencias de posición del hidrógeno  $\alpha$ , átomos cargados y cadena lateral (R) en ambas estructuras.

Aunque sólo se muestra una posición idéntica se muestra para ambas estructuras, se puede obtener un conjunto de ellas rotando los ángulos  $\psi$  y  $\phi$  de la lámina  $\beta$  y los ángulos correspondientes del D-aminoácido.

Evidentemente no existe una identidad global si se considera el enlace peptídico completo, pero a pesar de ello, el sitio activo del enzima podría acoplar a la lámina  $\beta$  por este borde. Por otra parte, es claro que ciertas partes de la lámina  $\beta$  muestran un gran parecido con la estructura del carbono  $\alpha$  de los D-aminoácidos, precisamente aquella que es, con gran probabilidad reconocida por el sitio activo del enzima.

Dado que el enzima D-aminoácido oxidasa es un enzima compartimentalizado y unido a membrana, se propone a la luz del argumento presentado



que sus substratos pudieran ser átomos de hidrógeno  $\alpha$  de locus/i en conformación  $\beta$  de otras proteínas de membrana.

## 2. Sobre la actividad enzimática del enzima D-aminoácido oxidasa y sus productos finales

Por su acción sobre los D-aminoácidos, el enzima D-aminoácido oxidasa es considerado actualmente una oxidasa (Mason, 1965; Yagi, 1971; Porter & Bright, 1975). Como se ha mencionado, el enzima oxida a los D-aminoácidos a nivel del carbono  $\alpha$  y reduce al oxígeno molecular entregándole  $2 e^-$ . Peróxido de hidrógeno, un  $\alpha$ -cetoácido y amoníaco son generalmente los productos finales (véase reacciones I.1. y I.2.).

Si consideramos ahora que sus substratos fuesen átomos de carbono e hidrógeno  $\alpha$  de lámina  $\beta$ , la actividad oxidasa mencionada no tendría sentido, ya que la oxidación de la proteína a este nivel probablemente dañaría su integridad y su estabilidad. Es preciso proponer otras alternativas con respecto al mecanismo de acción del enzima sobre los substratos que aquí se proponen:

### a) D-aminoácido oxidasa considerada como una monooxigenasa externa

Como se mencionó en la parte I, los enzimas que tienen al  $O_2$  como substrato pueden ser de dos clases: oxidasas y oxigenasas. Pertenecientes al segundo grupo, las monooxigenasas son enzimas que catalizan la incorporación de un átomo de oxígeno en el substrato, mientras que el otro es reducido a agua (Mason, 1965; Hayashi *et al.*, 1969; Gunsalus *et al.*, 1975; Malmström, 1982). Si el enzima no puede ser considerado como una oxidasa, la otra posibilidad es que funcionase como una monooxigenasa, de tal manera que un átomo de oxígeno fuera incorporado en el carbono  $\alpha$ , y el otro reducido a agua con los electrones de un substrato externo oxidable (de aquí la consideración de monooxigenasa externa). Los productos finales serían el carbono  $\alpha$  de la proteína hidroxilado ( $P \equiv C\alpha - OH$ ) de la figura II.3. y agua de acuerdo con el esquema de la figura II.4.

El mecanismo de reacción de las monooxigenasas (Massey & Hemmerich, 1975; Walsh, 1978; Malmström, 1982) podría aplicarse igualmente en este caso.



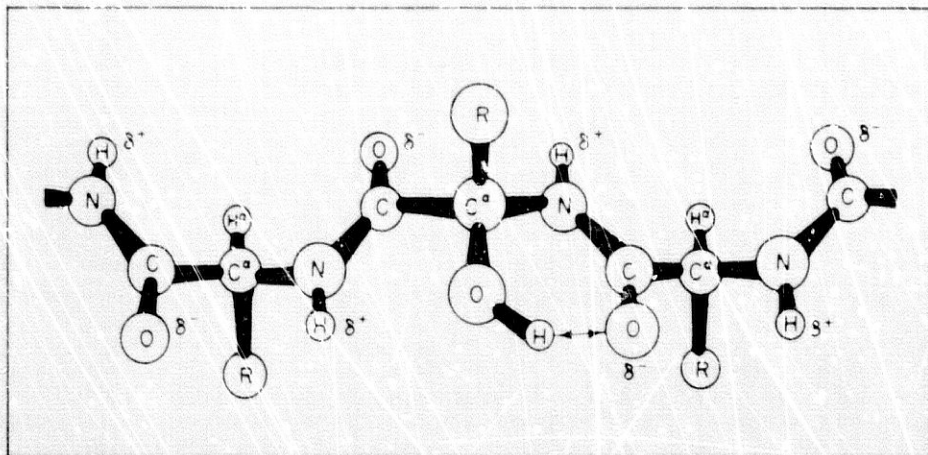


Figura II.3.: Aspecto químico-estructural de un carbono  $\alpha$  hidroxilado correspondiente a una proteína en conformación  $\beta$ . Un puente de hidrógeno puede formarse entre el átomo de hidrógeno del grupo hidróxilo y el oxígeno del grupo carbonilo de la cadena. Nótese la tetraesustitución del carbono  $\alpha$ .

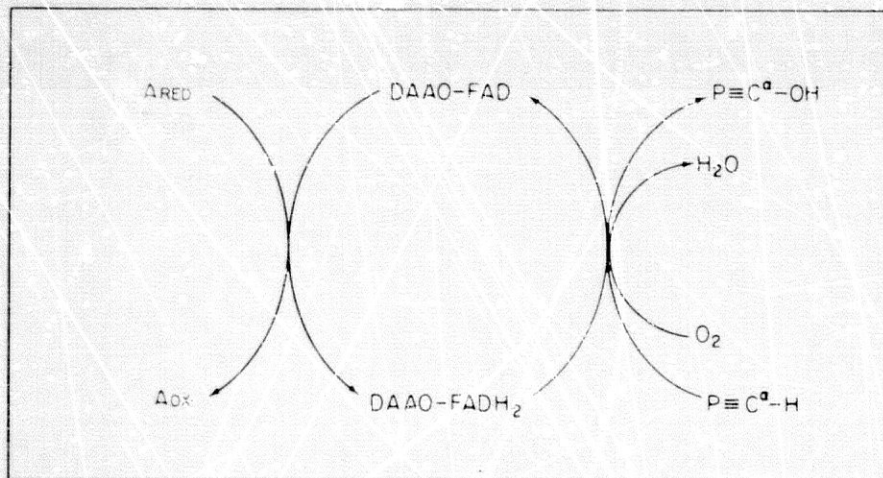


Figura II.4.: Mecanismo de monooxigenasa externa propuesto para D-aminoácido oxidada (DAAO indica el enzima).

*b) D-aminoácido oxidasa considerado como un enzima con actividad hidroperóxido sintetasa*

Siendo D-aminoácido oxidasa un enzima de membrana, pudiera formar parte de una cadena de transporte electrónico ampliamente distribuidas en membranas peroxisomales, microsomales y mitocondriales. Desde este punto de vista, sería interesante proponer que el enzima (y quizás también otras





oxidado en el sitio  $N_5$  por el aceptor de electrones, con transferencia simultánea del grupo peroxeno ( $H - O - O^*$ ) a un  $\alpha$ -carbanión intermediario de la proteína similar al descrito para la catálisis de los D-aminoácidos (Walsh *et al.*, 1971, 1973).

## DISCUSION

La consideración del enzima D-aminoácido oxidasa como una monooxigenasa externa, es decir, considerar que una oxidasa pueda tener una actividad monooxigenasa no es una proposición nueva. Es ampliamente conocido que diversos enzimas monooxigenasas y los sistemas de hidroxilación microsomiales, cuyo componente mejor conocido es el citocromo P 450, pueden mostrar ambas actividades, oxidasa y monooxigenasa (Nordblom & Coon, 1977; White & Coon, 1980; Kuthan & Ullrich, 1982). Además, los enzimas que catalizan reacciones de monooxigenación, muestran una actividad oxidasa endógena, que es altamente potenciada por desacoplantes (Massey *et al.*, 1975).

De la misma manera, los D-aminoácidos podrían ser considerados como sustratos análogos -no hidroxidables- cuando son metabolizados *in vitro* por un enzima monooxigenasa, tal y como podría ahora ser considerado el enzima D-aminoácido oxidasa. Las peculiaridades de estos sustratos harían posible una oxidación en vez de una hidroxilación a nivel del carbono  $\alpha$ , cuyo producto sería la producción del iminoácido y peróxido de hidrógeno.

La propuesta de considerar una actividad hidroperóxido sintetasa para el enzima si una segunda molécula oxidante participase en la reacción, se vería apoyada por el hecho de peroxidases que también catalizan reacciones de monooxigenación (Buhler & Mason, 1961; Riddle & Mazelis, 1964) y por la posibilidad de que ciertos enzimas, como el citocromo P 450 puedan catalizar reacciones de hidroxilación bien, a partir de peróxido de hidrógeno, bien a partir de  $O_2$  y NAD(P)H (White *et al.*, 1980). En ambos casos, se puede postular la existencia de un hidroperóxido orgánico en el punto común de las reacciones de peroxidación y monooxigenación.

En este sentido, la síntesis no enzimática de radicales peróxido en el carbono  $\alpha$  de ciertas proteínas ha sido realizada tras su irradiación en vacío y transferencia posterior a una atmósfera de  $O_2$  (Dimmey & Gordon, 1980). Este hecho apoyaría la posibilidad estructural de derivados oxigenados en el carbono  $\alpha$  de las proteínas.

Por otra parte, la capacidad de los hidroperóxidos para sustituir al  $O_2$  en las reacciones de hidroxilación catalizadas por el citocromo P 450 pone



de nuevo a debate la cuestión de los peróxidos orgánicos sintetizados biológicamente como representantes de otro mecanismo de activación del oxígeno molecular diferente a los ya descritos (Malmström, 1982). Mediante este mecanismo, el oxígeno molecular sería incorporado en un sustrato orgánico para formar un hidropéroxido, que a continuación es reducido a hidroxilo con la formación de una molécula de agua, lo cual es esencialmente una reacción de monooxigenación. Esta reacción puede ser catalizada por un solo enzima como en el caso de las monooxigenasas, o alternativamente por dos enzimas en dos reacciones separadas, lo que significaría una actividad hidropéroxido sintetasa para el primero de ellos. Más aún, el hidroxilo resultante podría ser reducido de nuevo para regenerar el producto inicial y producir otra molécula de agua (figura II.7.).

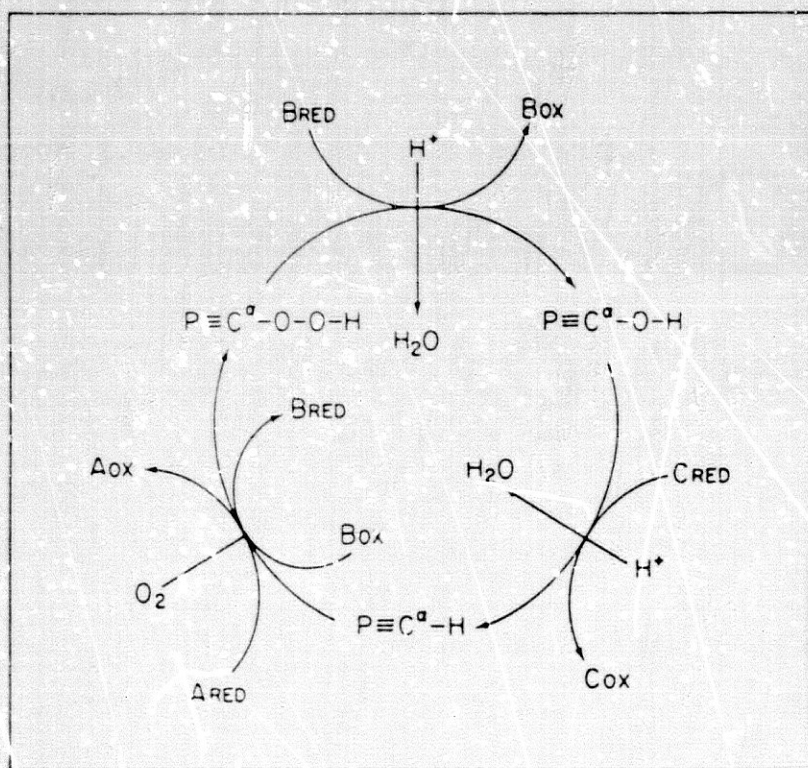


Figura II.7.: Ciclo del carbono  $\alpha$  propuesto para la activación y reducción del oxígeno molecular a agua.

En el esquema de la figura II.7. se resume cíclicamente el conjunto de reacciones que podrían suceder en el carbono  $\alpha$ : El  $O_2$  molecular se reduce a dos moléculas de agua mediante la adición de  $4 e^-$ . El primer par de  $e^-$  se destina a la síntesis del hidropéroxido y su peroxidación con producción de una molécula de agua, por un complejo enzimático con ambas



actividades. El hidroxilo resultante es reducido a agua por otro enzima que no reacciona directamente con el  $O_2$ , pero en relación estrecha con el primer complejo o incluso perteneciente a él.

Si se considera desde el punto de vista dinámico, el ciclo de carbono presentado es, en esencia, el esquema de una oxidasa terminal, y de hecho podría adaptarse a los esquemas previamente propuestos para el mecanismo de reacción del complejo citocromo oxidasa (Caughey *et al.*, 1975; Orii, 1982; Chance *et al.*, 1983). Es un hecho bien conocido que este complejo muestra una actividad oxidasa-peroxidasa (Chance *et al.*, 1983), la cual podría homologarse a una actividad carbono  $\alpha$  hidroperóxido sintetasa-peroxidasa. La segunda reducción sería llevada a cabo por el citocromo  $a$  del complejo  $a_3$ , cuya función es desconocida actualmente. Este componente no reacciona con el  $O_2$ , aunque participa en su reducción. Por último, el locus de carbono  $\alpha$  que intervendría en la reacción correspondería a la proteína  $F_1$  ATPasa (Racker, 1976), la cual se encuentra en estrecha relación con el complejo  $a_3$ .

Así, el enzima D-aminoácido oxidasa podría ser, junto con otras oxidasas, peroxidasas, monooxigenasas y otros, un miembro más de un amplio grupo de enzimas con una estereospecificidad dirigida hacia loci de carbono  $\alpha$  en conformación de lámina  $\beta$  o similar, capaces de activar el oxígeno molecular, oxidando y reduciendo en grado variable el carbono  $\alpha$  de ciertas proteínas que serían consideradas como sus sustratos.

De forma general, se presenta a continuación un resumen de las posibles funciones biológicas de los derivados oxigenados de carbono  $\alpha$  :

1. Además del papel mencionado en la activación del oxígeno, los hidroperóxidos de carbono  $\alpha$  pueden estar relacionados con las muchas reacciones de oxidación-reducción que ocurren en microsomas y mitocondrias en las cuales intervienen peróxidos orgánicos (por ej. oxidación del citocromo C por citocromo c peroxidasa y oxidación del glutatión por glutatión peroxidasa).

2. La reducción de los hidroperóxidos de carbono  $\alpha$  a hidroxilos podría tener un papel en los procesos de conservación de energía y ambos derivados podrían estar presentes en las ATPasas mitocondriales y de cloroplastos.

3. Los hidroperóxidos de carbono  $\alpha$  tendrían propiedades químicas de los peroxiácidos y ácidos peroximidicos debido a la proximidad de los grupos imino y carbonilo (figura II.5.). De esta manera, si se consideran ciertas modificaciones en el mecanismo de reacción del citocromo P 450 (White *et al.*, 1980) un hidroperóxido condensado a nivel de carbono  $\alpha$  pudiera ser el



peróxido protéico que necesariamente debe participar en la reacción. Este peróxido protéico condensado ha sido postulado pero aún no ha sido indentificado, por lo tanto, los derivados del carbono  $\alpha$  podrían estar presentes no sólo en proteínas substratos sino también en enzimas.

4. Las modificaciones postranslacionales a nivel del carbono  $\alpha$  podrían tener también un papel en la elaboración de la estructura de proteínas; la síntesis de estos derivados podría representar un paso necesario en el procesamiento de proteínas de membrana y citoesqueleto.

5. Los hidroxilos en el carbono  $\alpha$  podrían jugar un papel regulatorio en la actividad de las proteínas ya que este locus implica un lugar de fosforilación; una molécula de fosfato insertada a este nivel interaccionaría con los grupos cargados de la cadena produciendo cambios conformacionales en la lámina  $\beta$  que influirían sobre la actividad de la proteína. Los mismos cambios conformacionales producidos por hidrólisis de ATP y fosforilación de los hidroxilos de carbono  $\alpha$  podrían estar en relación con la transformación de la energía química en biomecánica.

6. De los puntos anteriores, cabe deducir un papel de regulación del crecimiento celular para este grupo hipotético de enzimas. Es ampliamente conocido que los fenómenos de activación celular, tanto normales como neoplásicos implican, por un lado, la activación del oxígeno (Klebanoff, 1959; Troll & Wiesner, 1985) y por otro fosforilación de proteínas (Cooper & Hunter, 1983; Hunter *et al.*, 1984). Particularmente, se ha reconocido un papel en los procesos de regulación al enzima D-aminoácido oxidasa. Observaciones realizadas en tejidos tumorales han mostrado que el número de peroxisomas y la actividad de los enzimas que contienen -entre ellos D-aminoácido oxidasa-, descienden considerablemente; si de alguna manera se consigue una reversión del estado neoplásico se observa una recuperación del número de peroxisomas y un aumento de la actividad de sus enzimas (Mochizuki *et al.*, 1976; Sun & Cederbaum, 1980).

En suma, estos hipotéticos derivados del carbono  $\alpha$  podrían estar ubicuamente distribuidos en los seres vivos, realizando potencialmente una amplia variedad de relevantes funciones biológicas.



TESIS DOCTORAL

---

PARTE III

---

---

TRABAJOS EXPERIMENTALES

---



## ENFOQUE EXPERIMENTAL DE NUESTRA HIPOTESIS Y SU JUSTIFICACION

El análisis teórico realizado sobre los substratos del enzima D-aminoácido oxidasa propone básicamente los siguientes postulados:

1º) El enzima D-aminoácido oxidasa sería un miembro más de un amplio grupo de enzimas que incluiría oxidasas, peroxidasas, monooxigenasas y otros, cuyos substratos, además del  $O_2$ , pueden ser otras proteínas.

2º) La parte concreta de las moléculas protéicas sobre la cual actuarían los enzimas de este grupo, serían locus/i del carbono  $\alpha$  con una conformación  $\beta$  o similar, con características esteroquímicas muy parecidas a las del carbono  $\alpha$  de los D-aminoácidos.

3º) La acción enzimática de este grupo de enzimas consistiría en la activación del oxígeno molecular mediante la síntesis de un hidroperóxido estable o intermediario en el carbono  $\alpha$ , cuya peroxidación daría lugar a un carbono  $\alpha$  hidroxilado.

Las posibilidades de abordaje experimental podrían ser, entre otras, las siguientes:

a) Identificación directa de derivados oxigenados de carbono  $\alpha$  en material biológico.

b) Síntesis enzimática en el laboratorio de dichos derivados en substratos adecuados y su identificación posterior. Los substratos a utilizar deberían reunir un mínimo de condiciones: estar dotados de estructuras de carbono  $\alpha$ , y que además adoptasen una conformación  $\beta$ , en unas condiciones de pH y medio de reacción adecuados para el funcionamiento enzimático.

Aunque en teoría existirían algunos polipéptidos y poli-L-aminoácidos



que reuniesen estas características, tanto la primera como la segunda posibilidad de abordaje experimental tropiezan con graves dificultades a la hora de aplicar la tecnología adecuada para la identificación de dichos derivados, aún en el caso que se consiguiera su síntesis.

Las técnicas necesarias para la identificación de estos derivados oxigenados exigen el uso de isótopos radiactivos del oxígeno y/o la utilización de espectrometría de resonancia -bien de spin electrón (ESR) o magnética nuclear (NMR). Aunque se pudiera utilizar la última de las dos técnicas mencionadas, sería necesario además introducir condiciones experimentales adicionales para la obtención de resultados, bien sea una elevada concentración del producto a identificar, bien el uso de sustratos marcados, en nuestro caso con  $C^{13}$ , en el lugar donde se produciría la reacción enzimática de oxigenación.

Tales exigencias ponen fuera de nuestro alcance los abordajes mencionados por su complejidad y no disponibilidad en nuestro entorno de trabajo habitual.

c) Por último, hemos optado por la realización de trabajos experimentales sobre aspectos más generales y con un carácter más funcional, presentando un fenómeno biológico no descrito previamente que, si bien no demuestra indiscutiblemente nuestros postulados, si los apoyan de forma indirecta, dejando una vía abierta al debate.



## TRABAJOS EXPERIMENTALES CON PEROXIDASA DE RABANO

Las peroxidasa (POD) son enzimas muy frecuentes en animales y plantas. Sólo unas pocas han sido purificadas, entre ellas la peroxidasa de rábano. Su purificación y cristalización fue conseguida hace tiempo (Keilin & Mann, 1931; Theorell, 1942). Es por eso que sus propiedades enzimáticas, físicas y químicas han sido estudiadas intensamente, pero su papel fisiológico no es del todo conocido en la actualidad.

### Propiedades fisico-químicas

El peso molecular de la peroxidasa de rábano es alrededor de 40.000 (Cecil & Ogston, 1951); el punto isoeléctrico es de 7,2 (Theorell & Akeson, 1943). El enzima es ampliamente estable a pH 3,5-12 (Maehly, 1952) y resiste a 63°C durante 15 minutos. Su potencial de oxidación-reducción es relativamente bajo con un valor aproximado de  $E_0 = -0,2$  volts a un pH de 6-7,5 (Harbury, 1957).

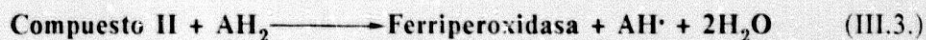
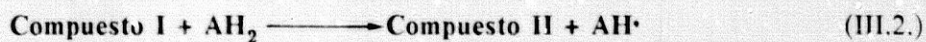
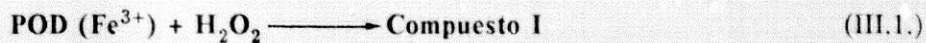
El enzima es una proteína conjugada cuyo grupo prostético está constituido por un grupo hemina, cuyo átomo de hierro tiene un estado de oxidación de 3 ( $Fe^{3+}$ ) cuando el enzima está purificado.

### Actividades enzimáticas

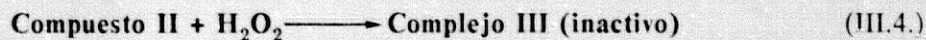
#### 1. Actividad peroxidasa

Esta actividad es considerada como clásica y es la más conocida; consiste en la reducción de peróxido de hidrógeno y de otros peróxidos orgánicos como el metil-etil-peróxido, utilizando electrones de diversos donantes. El mecanismo de peroxidación puede resumirse en las siguientes reacciones (George, 1953 a, b):





En algunos casos, ocurre la formación del compuesto III que es inactivo a partir del compuesto II y exceso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



Este complejo se identifica con oxiferroperoxidasa ( $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2$  o  $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$ ) (véase más adelante).

El donante de electrones,  $\text{AH}_2$ , puede ser un conjunto muy variado de sustancias tales como fenoles: hidroquinona, catecol, guayacol, resorcinol, pirogallol, etc.; aminas: anilinas, ácido p-amino benzóico, etc.; enedíoles: ácido ascórbico, y otros: ácido úrico, NAD(P)H, nitritos (Maehly, 1972).

Los compuestos I, II, y III de las reacciones de peroxidación, pueden ser registrados espectrofotométricamente. La tabla III.1. muestra las longitudes de onda (en nanómetros) y los coeficientes de extinción molar ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) de cada uno de ellos (Chance, 1952), y del enzima libre con cianuro (Chance, 1949).

Compuesto	$\lambda$	$\epsilon$	$\lambda$	$\epsilon$	$\lambda$	$\epsilon$
I	410	48	-	-	657	-
II	419	95	527	8.5	558	8.5
III	418	106	546	9.9	583	8.6
HCN	421	91.5	540	10	581	-

Tabla III.1.

## 2. Actividad de oxidación aeróbica

Junto a la actividad peroxidasa mencionada, el enzima puede también catalizar reacciones de oxidación de ciertos substratos, en las que el  $\text{O}_2$  es el aceptor de electrones. La primera de tales reacciones, fue descubierta utilizando como substrato oxidable el ácido dihidroxifumárico (Swedin &



Theorell, 1940); posteriormente se observó que otros substratos tales como triosa reductora (Yamazaki, *et al.*, 1956) y ácido indol-3-acético (Kenten, 1955) eran también adecuados para realizar este tipo de reacción; y por último los nucleótidos de piridina reducidos (NAD(P)H) (Yokota & Yamazaki, 1965).

Aunque existen ligeras diferencias en la oxidación de los cuatro substratos mencionados, las características generales de esta clase de reacción pueden resumirse en (Yamazaki *et al.*, 1965):

**a) Dependencia irregular de la velocidad de oxidación con respecto a la concentración de piridín-nucleótidos.** Esta falta de dependencia es debida a que, aunque la reacción es catalizada parcialmente por el enzima, es continuada posteriormente por un mecanismo autocatalítico en el que participan radicales libres, fundamentalmente el ión superóxido  $O_2^{\cdot-}$ . Se piensa en la actualidad que el mecanismo de la reacción implica en primer lugar la formación no enzimática de  $H_2O_2$  a partir del donante de electrones y de  $O_2$ , en una reacción mediada por radicales libres (Deng, 1969):



La dismutación espontánea del ión superóxido:



o bien la reacción del ión superóxido con el donante:



generan  $H_2O_2$  que es usada en la reacción de peroxidación del donante produciendo dos nuevos radicales libres del mismo (véase reacciones de peroxidación III.2. y III.3.) que contribuyen a propagar la acción de oxidación.

Las anteriores serían reacciones de ramificación de la reacción en cadena, mientras que la reacción de terminación sería efectuada por la dismutación de dos radicales libres del donante:

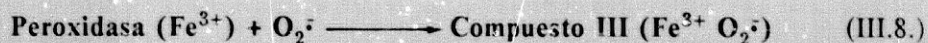


**b) Acumulación del compuesto III.** La oxidación aeróbica de los piridín nucleótidos y de otros substratos por la peroxidasa, se caracteriza por la formación del compuesto III detectable espectrofotométricamente. Sin embargo, como se ha mencionado, este compuesto es un típico intermediario inactivo. La oxidación rápida del donante, en este caso concreto NAD(P)H, sólo

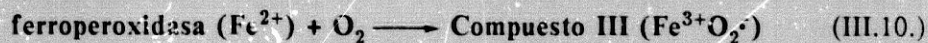
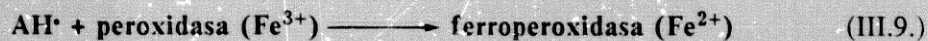


ocurre cuando el enzima se ha convertido en compuesto III. Dicho compuesto es el producto de dos posibles reacciones:

- Reacción del enzima con el ión superóxido:



- Reacción del oxígeno con la ferropoxidasa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) producida por reacción del radical libre del donante con el enzima



**c) Existencia de una concentración crítica de NADH para que se inicie la reacción.** Esta concentración crítica es típica de las reacciones autocatalíticas, mediadas por radicales libres, y en este caso concreto se necesita una concentración superior a 0,3 mM de NAD(P)H para que se inicie la reacción.

**d) Debido al punto anterior, el sistema constituido por  $\text{O}_2$ , NAD(P)H y peroxidasa tiene propiedades de oscilación** (Yamazaki & Yokota, 1967). Esta oscilación consiste en el comienzo y parada de la reacción a concentraciones críticas de los substratos  $\text{O}_2$  y NAD(P)H, las cuales son mutuamente dependientes (Olsen, 1978).

Por todo ello, esta segunda actividad del enzima peroxidasa, en la cual el  $\text{O}_2$  actúa como aceptor de electrones es conocida como **reacción de oxidación aeróbica**, para diferenciarla de la actividad oxidasa verdadera de otros enzimas, en la que la oxidación del sustrato y la activación del  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  o  $\text{H}_2\text{O}$  es regulada enzimáticamente y los fenómenos autocatalíticos están ausentes (Deng, 1969).

Nuestro desarrollo experimental consiste básicamente en el estudio de las reacciones de oxidación de NAD(P)H por la peroxidasa de rábano en nuestras condiciones experimentales, y mostrar la profunda influencia ejercida por ciertos sustratos de carácter protéico o pseudoprotéico y de los D-L-aminoácidos sobre dicha reacción.

A la luz de nuestros resultados y de los postulados teóricos de la parte II, trataremos de establecer un papel biológico que de coherencia a las distintas actividades enzimáticas realizadas *in vitro* por esta y otras peroxidases.



## MATERIALES Y METODOS

### A) Materiales

#### 1. Enzimas

- Peroxidasa de rábano (POD) (Donante:  $H_2O_2$  oxidoreductasa; E.C. 1.11.1.7). Se han utilizado dos preparaciones comerciales: Peroxidasa Tipo I de Sigma (R.Z. 0,6-0,8) para experimentación preliminar. Peroxidasa Grado I de Boehringer Mannheim (R.Z. 3). La pureza de la preparación viene dada por el cociente de la absorbancia a 403 nm., debida al grupo hem, y de la absorbancia a 275, debida a la proteína. Este cociente es llamado R.Z. (*Reinheitszahl*) y su valor máximo es de 3 para el enzima puro cristalizado (Theorell & Maehly, 1950). La concentración del enzima se determinó utilizando un coeficiente de absorción molar  $E_{403} = 100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Sawada & Yamazaki, 1973). Habitualmente se preparó en tampón fosfato 50 mM pH 6 a una concentración de 1-2 mg/ml (25-50  $\mu\text{M}$ ).

- Catalasa. ( $H_2O_2:H_2O_2$  oxidoreductasa; E.C. 1.11.1.6.), suspensión de hígado de buey, 20 mg/ml de Boehringer Mannheim.

- Láctico deshidrogenasa (LDH) (Lactato:  $NAD^+$  oxidoreductasa; E.C. 1.1.1.27) Suspensión cristalina de músculo de ratón, de Boehringer Mannheim.

#### 2. Proteínas

- Seroalbúmina bovina (BSA). Se han utilizado varios tipos de preparaciones: BSA cristalizada (BSAc) de Sigma y BSA deslipidada (BSAd) bien comercializada, de Sigma, o preparada en el laboratorio por el método de Chen (1966).

- Insulina cristalina, de Novo, 40 U.I./ml). Previamente a su utilización fue dializada contra tampón fosfato 50 mM pH 6.



- Glucagon, de Novo. Viales de 1 mg liofilizado. Para su utilización se disolvió en tampón fosfato 50 mM pH 6.

- Lisozima de huevo de Boehringer Mannheim.

### 3. Otros materiales

Glutation oxidado (GSSG) de Sigma; nucleótidos de piridina reducidos NADH y NADPH de Sigma y Boehringer Mannheim; D- y L-aminoácidos de Sigma; agua oxigenada de 10 volúmenes (c.a. 850-900 mM) de Peróxidos Farmacéuticos.

## B) Métodos

### 1. Determinación del consumo de $O_2$

El consumo de  $O_2$  fue determinado polarimétricamente mediante un electrodo de oxígeno tipo Clark (Clark, 1956) (YSI 1004, Yellow Springs Instruments) (figura III.1.) conectado a un registrador Honeywell FB 80.

La calibración del electrodo y el cálculo de la concentración de oxígeno del medio en reacción se realiza mediante partículas mitocondriales y NADH (Estabrook & Mackler, 1957). La concentración de oxígeno del medio de reacción saturado de aire, a una temperatura de 22-25°C es de aproximadamente 240-260  $\mu M$  (*Handbook of Chemistry & Physics* 1952).

El medio de reacción se preparó con tampón fosfato 50-100 mM, pH 5,5-8, aunque la mayoría de los experimentos se realizaron a pH 6. En algunas ocasiones se usaron otros tampones como Tris y MES, obteniéndose resultados parecidos. El medio de reacción contenía de 0,5-1 nmol de POD, concentración variables de BSAc o BSAd, de GSSG, de D- y L-aminoácidos y NAD(P)H según se especifique en cada caso en el apartado de resultados. En casos especiales se añadió también catalasa en exceso o bien azida 0,1 mM para inhibir la catalasa contaminante de la peroxidasa. El volumen de reacción fue siempre de 2 ml.

La sistemática general de los experimentos de determinación del consumo de  $O_2$  puede resumirse como sigue: Una vez equilibrada la cantidad de oxígeno del medio de reacción, conteniendo concentraciones variables de NAD(P)H (lo cual equivale a decir que el trazo de la línea de base es recto) se inicia la reacción con 20-25  $\mu l$  de POD (0,5-1 nmol). Transcurridos 5 minutos aproximadamente, se procedió a la adición de los otros componentes que intervienen o modifican la actividad basal del enzima. La variación del consumo de  $O_2$  es registrada y se calcula la velocidad de reacción, que es



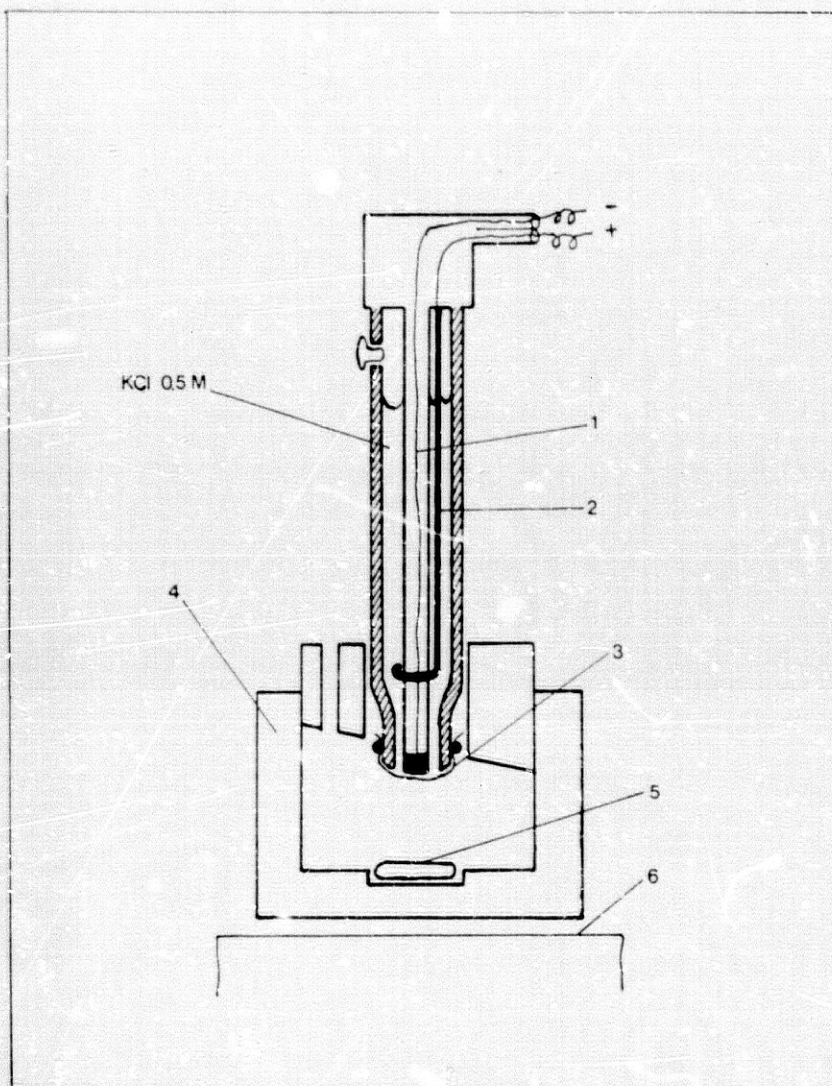


Figura III.1: Un electrodo de oxígeno tipo Clark. El electrodo de platino (1) es polarizado negativamente respecto al electrodo de plata-cloruro de plata (2). El  $O_2$  difunde a través de una membrana de teflón o celofán (3) y es reducido en la superficie del Pt de acuerdo con la reacción siguiente  $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ . Cada molécula de oxígeno reducida representa un consumo de  $4e^-$  que son aportados por la corriente del circuito externo. Es precisamente esta corriente, que es proporcional a la concentración del  $O_2$  del medio en el que está inmerso el electrodo la que es medida y registrada contra el tiempo. El electrodo va equipado con una cubeta de teflón de 2 ml de capacidad (4) en cuyo fondo se deposita una «pulga» magnética (5). El conjunto se coloca mediante un soporte sobre un agitador magnético (6) con el fin que el medio esté continuamente en agitación (Estabrook, 1967).



representada gráficamente respecto a distintas concentraciones de los metabolitos utilizados en cada caso.

### 2. Determinación del consumo de nucleótidos de piridina

La oxidación de NAD(P)H fue monitorizada gráficamente mediante un espectrofotómetro Aminco-Chance Dual UV-VIS, utilizando el *split mode*. Cuando el espectrofotómetro es utilizado de esta manera, el haz de luz de una determinada longitud de onda es dividido en dos y dirigido hacia las cubetas de muestra y de referencia; los cambios de absorbancia son registrados mediante el registrador incorporado en el mismo aparato. La longitud de onda utilizada osciló entre 340 y 380 nm, dependiendo de la concentración de NAD(P)H.

Dadas las limitaciones de la técnica no se realizaron determinaciones de consumo de NAD(P)H cuando la concentración de éstos excedió a 0.5 mM, utilizándose en este caso las longitudes de onda más altas. Previamente se calculó el coeficiente de extinción molar del NAD(P)H para cada longitud de onda utilizada tomando como referencia  $E_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y se comprobó la linealidad de las absorbancias.

El medio de reacción, los componentes y la sistemática utilizada fueron idénticos a los ya mencionados para los experimentos de consumo de oxígeno. Ambas cubetas de muestra y referencia contenían idénticos componentes en un volumen final de 2 ml, excepto el NADH, que sólo se añadió a la cubeta de muestra para iniciar la reacción.

### 3. Determinación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

El peróxido de hidrógeno producido en los distintos experimentos se determinó por dos métodos distintos:

a) Polarimétricamente: Este método se basa en la comparación del consumo de  $\text{O}_2$  en dos condiciones: una en presencia catalasa en exceso, la otra en ausencia de catalasa más azida 0,1 mM para inhibir la catalasa (Lemberg & Foulkes, 1949) que inevitablemente contamina cualquier preparación de peroxidasa (en nuestro caso, la casa comercial indica un contenido <1% para la preparación cristalina RZ. 3,0). Esta contaminación fue comprobada en nuestro laboratorio, así como casi un 100% de inhibición en presencia de azida, mediante la determinación del peróxido de hidrógeno producido por el método del ferriticionato (véase más adelante).

El consumo de  $\text{O}_2$  efectuado en un tiempo determinado en ambas condiciones es medido, y de la diferencia se deduce fácilmente la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido.



Una variante de este método, pero menos precisa, consiste en añadir catalasa al medio de reacción (sin azida) cuando se ha consumido una determinada cantidad de  $O_2$  en el transcurso de la reacción; la producción de  $O_2$  producida por la descomposición del  $H_2O_2$  presente por la catalasa es detectada por el electrodo de  $O_2$  y registrada. El inconveniente de este método es que en ausencia de azida, parte de  $H_2O_2$  ha sido destruido previamente por la catalasa contaminante, por lo que es preciso utilizarlo a tiempos cortos de reacción (1 o 2 minutos) o como comprobación rutinaria.

b) Por el método del ferritiocianato: La cantidad de peróxido de hidrógeno producido se obtiene directamente por este método, basado en la aparición de un complejo coloreado constituido por el ión férrico ( $Fe^{3+}$ ) y el tiocianato ( $^-SCN$ ) en medio ácido (Turman *et al.*, 1972). El método se adaptó a nuestras necesidades de la siguiente manera: Se retiran alícuotas de 0,2 ml del medio de reacción que se depositan en 0,1 ml de sulfato amónico ferroso al 0,8% en  $H_2SO_4$  2N. A continuación se añaden 0,5 ml de una solución acuosa de tiocianato potásico al 5% y se mide la absorbancia a 480 nm. Los valores obtenidos se comparan con una curva patrón realizada con  $H_2O_2$ . La concentración de la solución stock comercial de  $H_2O_2$  se determinó espectrofotométricamente a 240 nm utilizando un coeficiente de absorción molar de  $E_{240} = 40 M^{-1} cm^{-1}$  (Bergmeyer, 1955).

#### 4. Determinación de piruvato

El posible piruvato derivado de una posible desaminación de D-L alanina por la peroxidasa, se determinó por el método enzimático (Lamprech & Heinz, 1984). El método está basado en la reducción de piruvato a lactato acoplada a la oxidación estequiométrica de NADH a  $NAD^+$  por el enzima lactato deshidrogenasa a pH 6,8-6,9. El NADH consumido se determina por la desaparición de la absorbancia a 340 nm y esta misma cantidad corresponde al valor de piruvato presente. El método fue adaptado a nuestras condiciones experimentales como sigue: Se retiran alícuotas de 0,5 ml del medio de reacción que son depositadas sobre 0,1 ml de ácido preclórico 5 M frío. Tras dos horas, las muestras se centrifugan en una centrifuga Eppendorf y el sobrenadante deproteinizado se neutraliza con fosfato tripotásico 3 M hasta pH 7. Una vez centrifugado de nuevo para eliminar el perclorato potásico insoluble, se toman alícuotas del sobrenadante, a la que se añade el volumen necesario de Tris HCl 0,5 M pH 6,9 para completar un volumen final de 990 incluyendo 25  $\mu$ l de NADH 7 mM. Se determina la absorbancia a 340 nm y a continuación se añaden 10  $\mu$ l de una solución acuosa 1:10 de la solución stock de LDH. Transcurridos 5 minutos, se vuelve a medir la absorbancia inicial a 340 nm. La diferencia entre la absorbancia inicial y la final corresponde al número de nanomoles de NADH consumidos. Se realizan las correcciones necesarias debidas a las diluciones efectuadas en los procesos de deproteinización y neutralización y se obtiene así la cantidad de



piruvato.

#### 5. Determinación de glutatión reducido (GSH)

El posible glutatión reducido se determinó por el procedimiento de determinación de grupos tioles (Owens & Belcher, 1965). El grupo tiol del glutatión reducido reacciona a pH 8 con el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) para producir un ión coloreado (E max: 412 nm) y un disulfuro mixto. Las muestras de 0,5 ml son deproteinizadas con 0,05 ml de perclórico 5 M frío. Una vez centrifugadas, se cogen 0,5 ml de sobrenadante que son neutralizados con 180  $\mu$ l de  $K_3 PO_4$  3M. Se vuelven a centrifugar para eliminar el perclorato potásico insoluble y a 0,5 ml de sobrante se añaden 0,5 ml de una solución al 0,24% de DTNB en Tris HCl 0,5 M pH 8, que se ha mantenido en frío y en la oscuridad. Al cabo de dos minutos se lee la absorbancia a 412 nm y los resultados se comparan con la curva patrón procesada de igual modo que las muestras problema.

#### 6. Realización de espectros de absorción

Los espectros han sido realizados en un espectrofotómetro Aminco-Chance Dual UV-VIS, dispuesto en *split mode*. Como se ha mencionado, el haz de luz procedente de un monocromador es dividido en dos por un sistema de espejos y ambos rayos de idéntica longitud de onda inciden sobre las cubetas de muestra y referencia, de tal manera que la diferencia de absorbancia entre ambas, en un intervalo determinado de longitud de onda, es medida y registrada por el aparato.

El procedimiento utilizado puede ser resumido como sigue: 1. línea de base con tampón en ambas cubetas de muestra y referencia de 1 ml y 1 cm de paso óptico. El intervalo de longitudes de onda utilizado es entre 380-440 nm y 500-600 nm ya que el espectro de absorción del grupo prostético de la peroxidasa y sus compuestos tiene sus máximos a estas longitudes de onda. 2. A continuación se añade a la cubeta muestra 25-50  $\mu$ l de la solución de enzima (1-2  $\mu$ M) y se registra el espectro del enzima. 3. Las adiciones que en cada caso se realicen, se hacen tanto a la cubeta de referencia como de muestra para registrar exclusivamente los cambios espectrales debido a las interacciones de los distintos substratos con el grupo prostético del enzima, que se encuentra ubicado en el sitio activo del enzima, y así son registradas sucesivamente.

#### 7. Determinación de la concentración de proteína y otros

La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Lowry *et al.* (1951), empleando albumina bovina como estándar. La concentración de la misma se midió espectrofotométricamente utilizando



un coeficiente de extinción al 1% de  $E_{278} = 6,58 \text{ cm}^{-1}$  (Reisler & Eisemberg, 1969).

La concentración de otros metabolitos fue determinada siempre que fue posible mediante espectrofotometría. (Se han mencionado ya la determinación de la concentración de POD,  $E_{403} = 100 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Sawada & Yamazaki, 1973). Las concentraciones de piridín nucleotidos, NADH y NADPH, se determinaron utilizando un coeficiente de extinción molar de  $E_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Todas las medidas espectrofotométricas, excepto las realizadas con el Aminco-Chance Dual-UV-VISspectrophotometer, se realizaron en un espectrofotómetro Spektralphotometer PH 6 de Zeiss.

#### 8. Cálculo de los parámetros cinéticos

En cada caso, los datos obtenidos respecto a la concentración de sustrato se representaron gráficamente de forma directa (forma hiperbólica clásica) y también se utilizó la representación de inversos (Lineweaver-Burke) para el cálculo de la  $K_m$  y  $V_{max}$ .

En los experimentos de inhibición se ha utilizado el método de Dixon (Dixon & Webb, 1971; Segel, 1975) para identificar el tipo de inhibición y averiguar, de forma gráfica, los valores de  $K_i$ . El método fue escogido por ser el que mejor se adaptaba a nuestras condiciones experimentales.

Comenzando a partir de la ecuación recíproca de Lineweaver-Burke para inhibición competitiva:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{V_{max}} =$$

$$\frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{K_m [I]}{V_{max} [S]K_i} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$\boxed{\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max} [S]K_i} [I] + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \right)}$$

La ecuación de velocidad para la inhibición competitiva puede ser convertida en la de una línea recta en el cual la segunda variable es la concentración de inhibidor [I],



Una representación de  $1/V$  versus  $[I]$  a una concentración no saturante de sustrato  $[S]$ , daría una línea recta con una pendiente positiva como se muestra en la figura III.2. Si se conoce el valor de  $V_{max}$  en ausencia de inhibidor, se traza una línea horizontal a la altura de  $1/V_{max}$ ; esta línea horizontal significa también que a una concentración infinitamente alta de sustrato  $[S]$ , el incremento de la concentración de inhibidor no tendrá efecto sobre la velocidad,  $V$ . El valor de  $-[I]$  en la intersección con esta línea horizontal proporciona el valor de  $K_i$ :

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}}$$

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{K_m [I]}{V_{max} [S]K_i} + \frac{1}{V_{max}} \left( 1 + \frac{K_m}{[S]} \right);$$

$$1 = \frac{K_m [I]}{[S]K_i} + 1 + \frac{K_m}{[S]} - \frac{K_m [I]}{[S]K_i} = \frac{K_m}{[S]};$$

$$[I] = -K_i$$

Si hubiera alguna duda de que la inhibición no es competitiva, se realiza otra serie de experimentos a otra diferente concentración de sustrato. La intersección de ambas líneas para  $[S]_1$  y  $[S]_2$ , donde  $1/V_1 = 1/V_2$  proporciona el valor de  $K_i$  como se muestra a continuación. Si  $1/V_1 = 1/V_2$ :

$$\frac{K_m [I]}{V_{max} [S]_1 K_i} + \frac{[S]_1 + K_m}{V_{max} [S]_1} = \frac{K_m [I]}{V_{max} [S]_2 K_i} + \frac{[S]_2 + K_m}{V_{max} [S]_2}$$

$$\frac{[I] + K_i}{[S]_1} = \frac{[I] + K_i}{[S]_2}$$

La última ecuación sólo es cierta si  $[S]_1 = [S]_2$  que no es el caso, o cuando ambos términos son igual a cero; entonces  $[I] = -K_i$ .



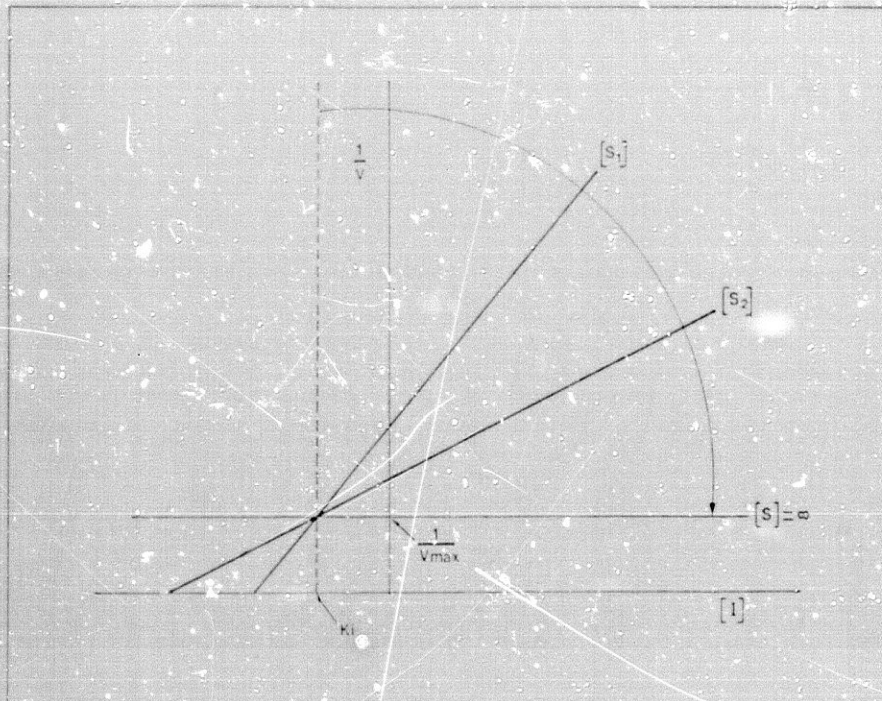


Figura III.2.: Representación de Dixon para inhibición competitiva:  $1/V$  versus  $[I]$  en la presencia de dos concentraciones fijas de sustrato. Si se conoce el valor de  $V_{max}$  se puede trazar directamente una línea a la altura  $1/V_{max}$ .



## RESULTADOS

### ACTIVIDAD DE OXIDACION AEROBICA DE PIRIDIN NUCLEOTIDOS DE LA PEROXIDASA DE RABANO

En nuestras condiciones experimentales, tanto con preparaciones menos puras de peroxidasa (RZ = 0,8) como con la preparación más pura (RZ = 3) se comprobó su capacidad de oxidar aeróbicamente los piridin nucleótidos reducidos. Esto se pudo comprobar, bien midiendo consumo de oxígeno mediante un electrodo tipo Clark, bien monotorizando espectrofotométricamente la desaparición de piridin nucleótidos. Utilizando uno u otro método, se apreciaron las características -unas comunes y otras distintas- de la reacción de oxidación que se exponen a continuación:

#### 1. Dependencia irregular del consumo de oxígeno y de la velocidad de oxidación, de la concentración de piridin nucleótidos.

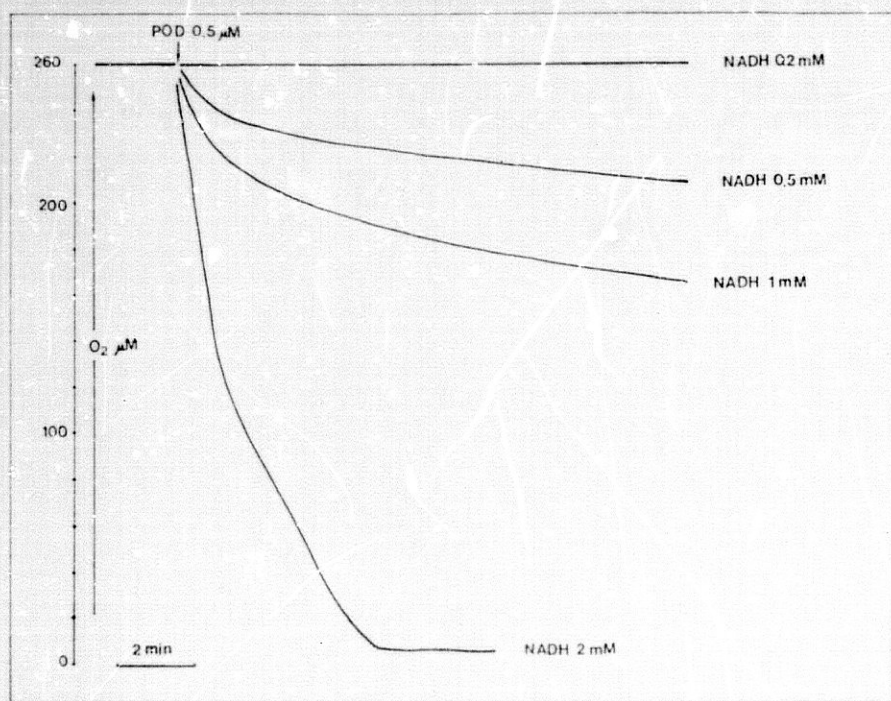


Figura III.3.: Registros gráficos del consumo de oxígeno por POD (0,5  $\mu\text{M}$ ) a distintas concentraciones de NADH. Condiciones: tampón fosfato 50 ml. pH 6, 25°C.



En la figura III.3. se muestra un registro gráfico del consumo de oxígeno en presencia de concentraciones variables (0,2, 0,5, 1 y 2 mM) de NADH.

Como se observa, la oxidación no se lleva a cabo cuando la concentración es de 0,2 mM, mientras que a concentraciones superiores de NADH la velocidad incrementa irregularmente de forma exponencial. A concentraciones de 0,5 mM y 1 mM de NADH, (y menos evidente a 2 mM) se observan dos fases distintas en el consumo de  $O_2$ : una inicial, rápida y a continuación un enlentecimiento de la reacción. Este enlentecimiento es debido a la formación del compuesto III, que es inactivo, a partir del enzima y del ión superóxido  $O_2^-$  generado en la reacción en cadena (Yamazaki & Yokota, 1965). Si en vez de NADH se utilizan concentraciones idénticas de NADPH, las velocidades de consumo de  $O_2$  (no mostradas) son alrededor de un 30% menores, mientras que si la reacción es seguida espectrofotométricamente no existe prácticamente ninguna diferencia entre uno y otro sustrato.

## 2. Dependencia del pH

El pH influye en gran manera en la velocidad de consumo de oxígeno y de oxidación de los piridín nucleotidos reducidos. En la figura III.4. se muestra tal dependencia utilizando una concentración fija de 1 mM NADH.

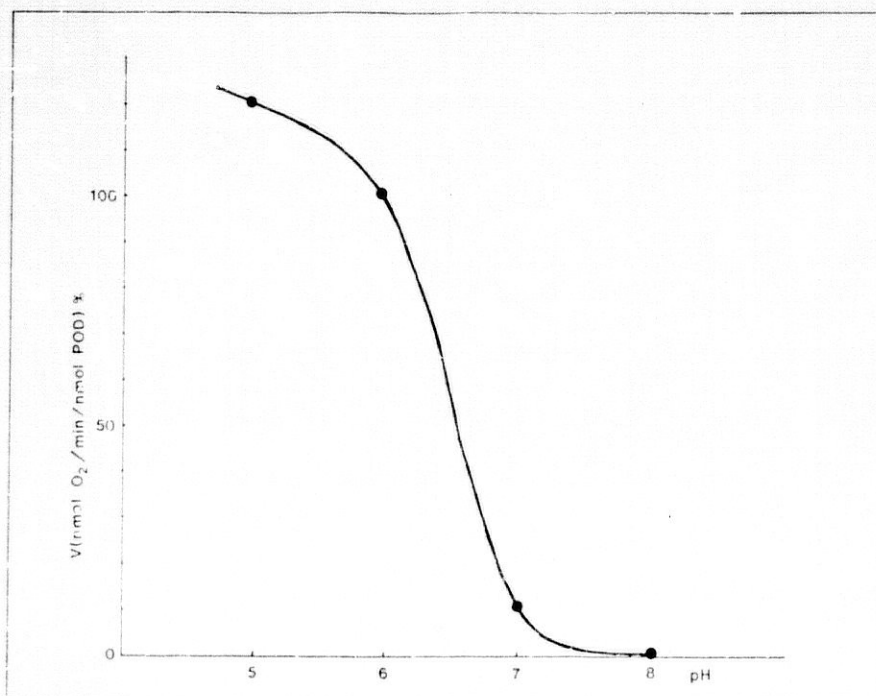


Figura III.4.: Dependencia del pH de la velocidad de consumo de oxígeno.



Como se observa, la velocidad de consumo de oxígeno es mínima a pH básico o cercano a la neutralidad, mientras que literalmente se dispara a pH ácido (se ha tomado como 100% el valor correspondiente a pH 6). Esta dependencia del pH es consistente con los resultados descritos en la literatura y está en relación con la naturaleza autocatalítica de esta reacción y de otras, en las que la concentración de protones juega un papel activador importante.

### 3. Influencia del cianuro, azida y catalasa

La adición de cianuro 1 mM, una vez iniciada la reacción no afecta para nada a su transcurso (figura III.5A.), mientras que la adición de azida 0,1 mM tiene un discreto efecto estimulador (Figura III.5B.). Como se ha mencionado en el apartado de Materiales y Métodos, este efecto estimulador es probablemente debido a la inhibición de la catalasa contaminante de la preparación de peroxidasa; así, parte del peróxido de hidrógeno producido en la reacción no se degrada a  $H_2O$  y  $O_2$ , con lo cual se produce este efecto aparentemente estimulador.

En el caso contrario, cuando la catalasa ( $0,2 \mu M$ ) está presente antes de iniciarse la reacción, la velocidad de reacción se enlentece, mientras que si se añade a los 5 minutos del inicio de la reacción, se observa una cesión de  $O_2$  al medio (figura III.5C.) correspondiente a la degradación del peróxido de hidrógeno producido a  $H_2O$  y  $O_2$ .

### 4. Disparidad entre el consumo de $O_2$ y de oxidación de piridín nucleótidos

Existen notorias diferencias entre el consumo de  $O_2$  y de piridín nucleótidos cuando se comparan los resultados obtenidos polariméricamente (electrodo de  $O_2$ ) y espectrofotométricamente. La velocidad de consumo de NADH dobla aproximadamente la del consumo de  $O_2$ , y es aproximadamente el triple cuando se utiliza NADPH. La explicación de este fenómeno radica quizás en la naturaleza autocatalítica de la reacción, en la cual, gran parte del NAD(P)H está oxidándose a su radical libre NAD(P) $\cdot$  que posiblemente pierda absorbancia de forma total, mientras que el ión superóxido  $O_2^{\cdot-}$  producido contribuya aún (al menos un 50% de la señal del  $O_2$ ) a la intensidad de la corriente de polarización del dispositivo del electrodo de oxígeno (Véase reacciones III.5. y III.7 y los fundamentos del electrodo de oxígeno en Materiales y Métodos).

Así pues, es imposible establecer una estequiometría coherente entre el consumo de piridín nucleótidos, oxígeno consumido y agua oxigenada producida en las reacciones de oxidación aeróbica realizadas por la peroxidasa.



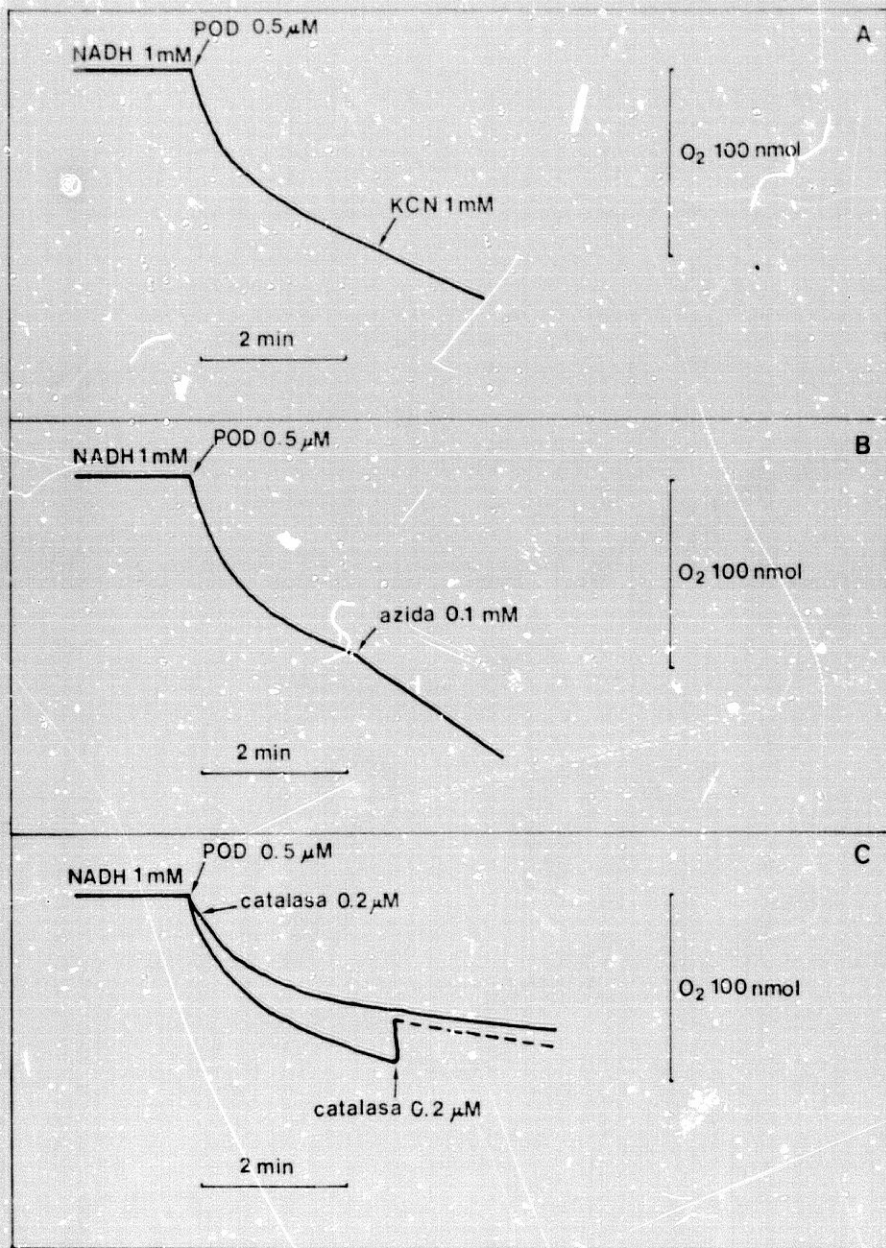


Figura III.5A.: Influencia del cianuro 1 mM.; B, azida 0,1 mM, C catalasa 0,2 μM en la reacción de oxidación aeróbica de NADH por la peroxidasa. Condiciones NADH 1 mM, POD 0,5 μM en tampón fosfato 50 mM, pH 6,0 t° 25°C.



## 5. Formación del compuesto III

Como se ha mencionado previamente, el conjunto de reacciones en cadena producidas por la oxidación aeróbica de NAD(P)H en presencia de peroxidasa da lugar a aparición de radicales libres derivados del  $O_2$ , fundamentalmente ión superóxido  $O_2^{\cdot -}$  y del donante de electrones NAD(P) $\cdot$ . La reacción del enzima con ambos productos puede dar lugar a la formación del compuesto III (oxiferroperoxidasa  $Fe^{3+}O_2^{\cdot -}$ ) que es un compuesto típicamente inactivo (véanse reacciones III.8., III.9. y III.10.). En nuestras condiciones experimentales se obtuvo el compuesto III con un pico de absorción máximo a 418 nm aproximadamente, tal y como se muestra en la figura III.6.

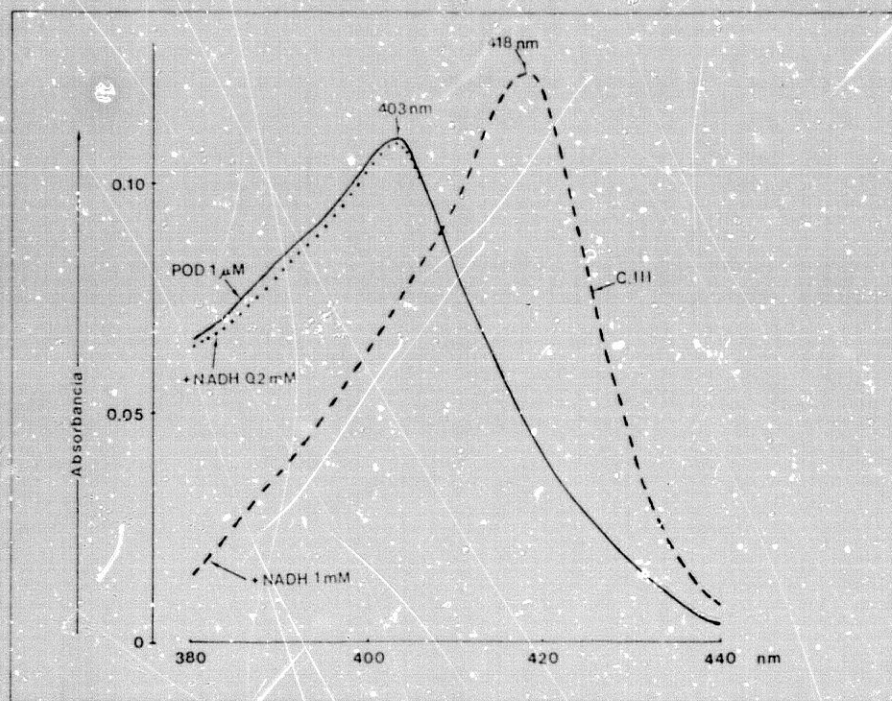


Figura III.6.: Espectro de absorción de la peroxidasa sola ( $1 \mu M$ ) (—) y tras la adición de  $0,2 \text{ mM}$  de NADH (.....),  $1 \text{ mM}$  NADH (-----) y por último KCN  $1 \text{ mM}$  que no altera el espectro del compuesto III obtenido. Condiciones: Tampón fosfato  $50 \text{ mM}$ , pH 6. Cubeta de muestra: peroxidasa  $1 \mu M$ , a continuación NADH ( $0,2 \text{ mM}$  y  $1 \text{ mM}$ ) y por último KCN  $1 \text{ mM}$ ; cubeta de referencia: todo lo mencionado excepto peroxidasa. Volumen final  $1 \text{ ml}$ .

A una concentración de  $0,2 \text{ mM}$  de NADH no se produce el compuesto III. Este resultado está de acuerdo con la ausencia de consumo  $O_2$  y de oxidación de NAD(P)H por debajo de la concentración crítica de  $0,3 \text{ mM}$ . Cuando la concentración de NADH es  $1 \text{ mM}$  la formación del compuesto III



es prácticamente instantánea. La adición de KCN no modifica en absoluto el compuesto III, ya que el KCN es activo solamente sobre los complejos I y II de la peroxidasa (Pütter & Becker, 1984).

Los cambios espectrales producidos por la formación del complejo III, se pueden detectar también en la zona del espectro correspondiente a los 500-600 nm (figura III.7.). En este rango de longitudes de onda tampoco se obtuvieron variaciones del compuesto III tras la adición de KCN 1 mM.

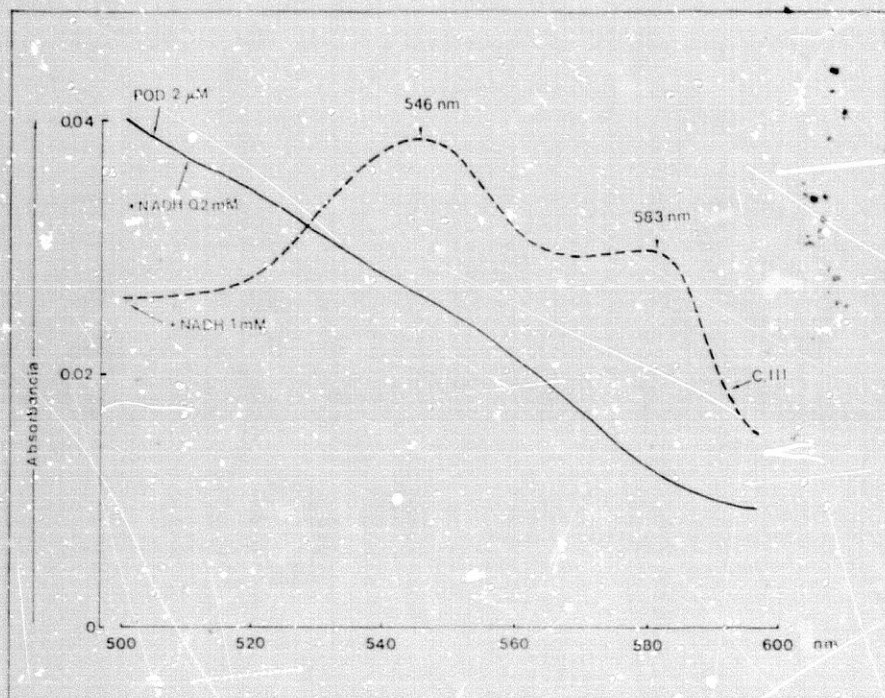


Figura III.7.: Espectro (500-600 nm) de la peroxidasa sola (—) y tras la adición de NADH 1 mM y formación del compuesto III (-----). Condiciones iguales a las del experimento anterior excepto 2 μM de peroxidasa.



INFLUENCIA DE LA SEROALBUMINA BOVINA (BSA) SOBRE LA ACTIVIDAD DE OXIDACION AEROBICA DE LA PEROXIDASA

a) Experimentos de consumo de  $O_2$

Si una vez que todo el enzima se encuentra en forma de oxiferropoxidasa ( $Fe^{3+}O_2^+$ ) o compuesto III inactivo, lo cual corresponde a la fase de entrecimiento del consumo de  $O_2$ , se añade al medio de reacción cantidades variables de seroalbúmina bovina cristalizada (BSAc) (Sigma) se observa un notable incremento en la velocidad de consumo de  $O_2$ . En la figura III.8. se muestra un registro típico de este efecto estimuladorio.

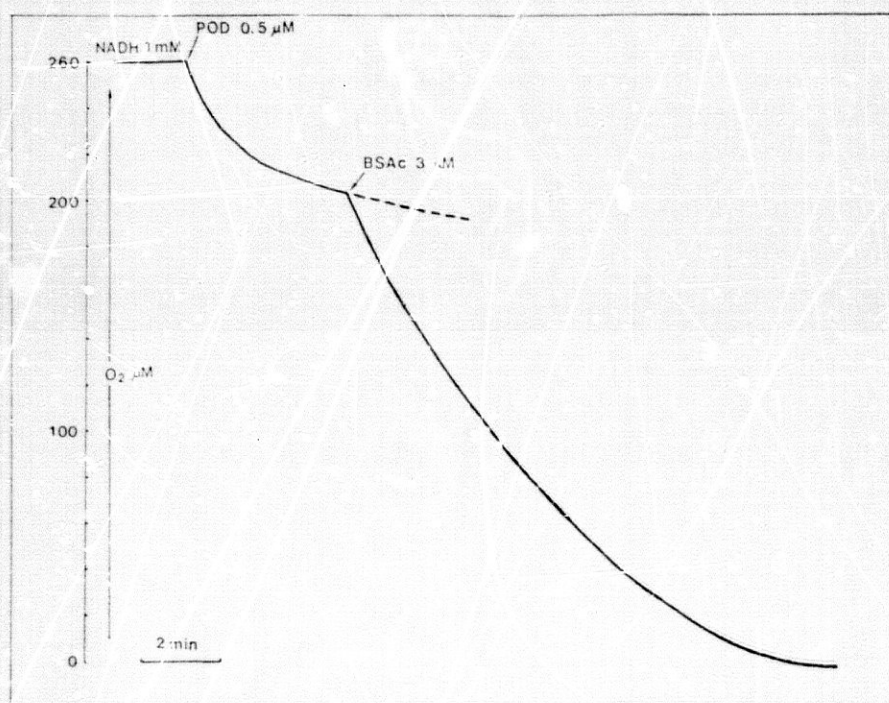


Figura III.8.: Efecto de la estimulación del consumo de  $O_2$  en el sistema NADH-POD por BSAc 2  $\mu M$ . La línea de puntos presenta el trazado del registro si no se hubiera realizado la adición. Condiciones POD 0.5  $\mu M$ , NADH 1 mM y tampón fosfato 50 mM pH 6 25°C. Volumen final 2 ml.

El efecto de estimulación del consumo de  $O_2$  en el sistema NADH-POD en presencia de BSA tiene unas características propias que lo definen. En contraposición con el sistema NADH-POD, la presencia de BSAc (que denominaremos sistema NADH-POD-BSAc) posee las siguientes:



### 1. Inhibición por KCN y $H_2O_2$

La adición al medio de reacción de KCN 1 mM y  $H_2O_2$  100  $\mu$ M, inhibe por completo el consumo de  $O_2$  que se produce en presencia de BSAC. En ambos casos, la velocidad de consumo de  $O_2$  retorna aproximadamente al valor que hubiese tenido si no se hubiese realizado la adición de BSAC (figura III.9A.).

### 2. Influencia de azida y catalasa

A una concentración de 0,1 mM, la azida inhibe eficazmente la catalasa contaminante de la preparación de peroxidasa. Su presencia en el sistema NADH-POD-BSAc produce un ligero incremento en la velocidad de consumo de  $O_2$  (figura III.9B.).

La adición de catalasa (0.2  $\mu$ M), disminuye sensiblemente la velocidad de consumo de  $O_2$  aproximadamente a la mitad que en presencia de azida 0,1 mM. Si en presencia de catalasa, añadimos de nuevo azida, la velocidad de consumo de  $O_2$  incrementa de nuevo alcanzando el doble de su valor (figura III.9B). Este efecto de la azida en presencia de catalasa sugiere que el producto de la reacción es predominantemente  $H_2O_2$ , que en presencia de catalasa se descompone a  $H_2O + 1/2 O_2$ ; por esta razón el consumo de  $O_2$  se reduce a la mitad. Si entonces inhibimos a la catalasa con azida, la velocidad vuelve a aumentar al doble. El producto final del sistema NADH-POD-BSAc será analizado detenidamente más adelante.

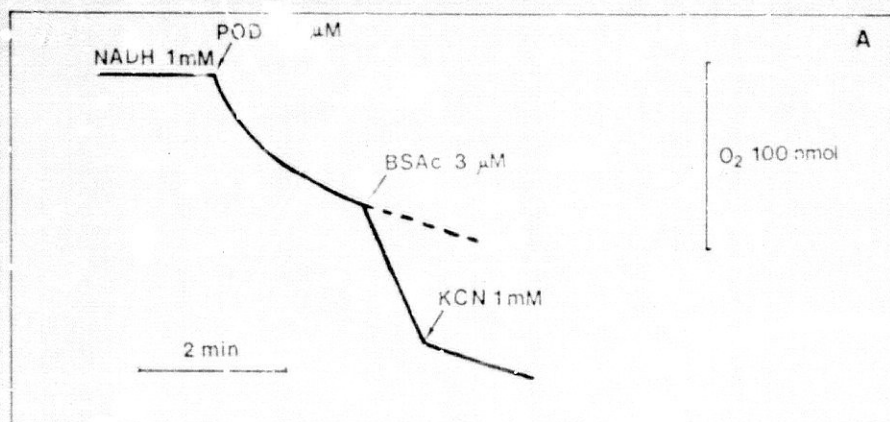


Figura III.9.A.: Influencia del cianuro 1 mM sobre la estimulación de la velocidad de consumo de  $O_2$  producida por BSAC. Obsérvese la inhibición total de dicha estimulación. Condiciones: POD 0.5  $\mu$ M, NADH 1 mM, en tampón fosfato 50 mM, pH 6, 25°C.



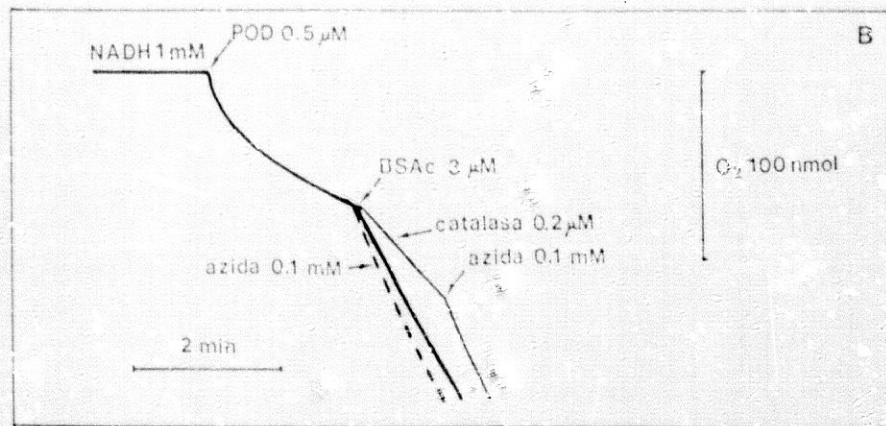


Figura III.9.B.: Influencia de azida 0.1 mM (---) y catalasa (—) sobre la velocidad de consumo de oxígeno estimada por BSAc. Nótese el incremento de velocidad por adición de azida 0.1 mM cuando catalasa está presente. Condiciones: idénticas al experimento anterior.

### 3. Dependencia de las concentraciones de BSAc y cinética de saturación del sistema NADH-POD-BSAc

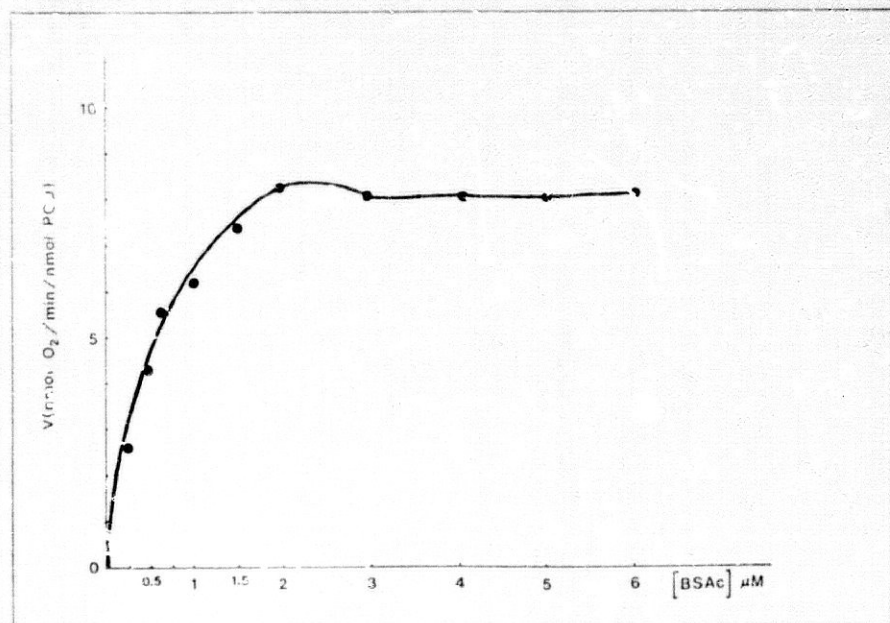


Figura III.10.: Representación gráfica de la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  en relación a la concentración de BSAc. Condiciones: POD 0.5  $\mu\text{M}$  NADH 1 mM en tampón fosfato 50 mM pH 6 25°C. Volumen final 2 ml.



El efecto estimulador de la velocidad de consumo de  $O_2$  es variable dependiendo de la cantidad de BSAC que se añada al sistema NADH-POD, de tal manera que con una cantidad fija de NADH, es posible obtener una cinética enzimática de saturación de dicho efecto estimulador. En la figura III.10. se muestra la dependencia de la estimulación de la velocidad del consumo de  $O_2$  en relación a la concentración de BSAC.

El valor de la estimulación correspondiente a cada concentración de BSAC se obtuvo sustrayendo la velocidad previa a la adición a la velocidad total resultante tras ella. Nótese la inhibición por sustrato que se produce cuando se añaden concentraciones superiores a  $2 \mu M$  de BSAC; cuando se hayan definido las características del sistema NADH-POD-BSAC se volverá a analizar esta inhibición que probablemente será artefactual.

La representación gráfica de Lineweaver-Burke (figura III.11.) nos permite un cálculo aproximado de los parámetros cinéticos que definen la reacción.

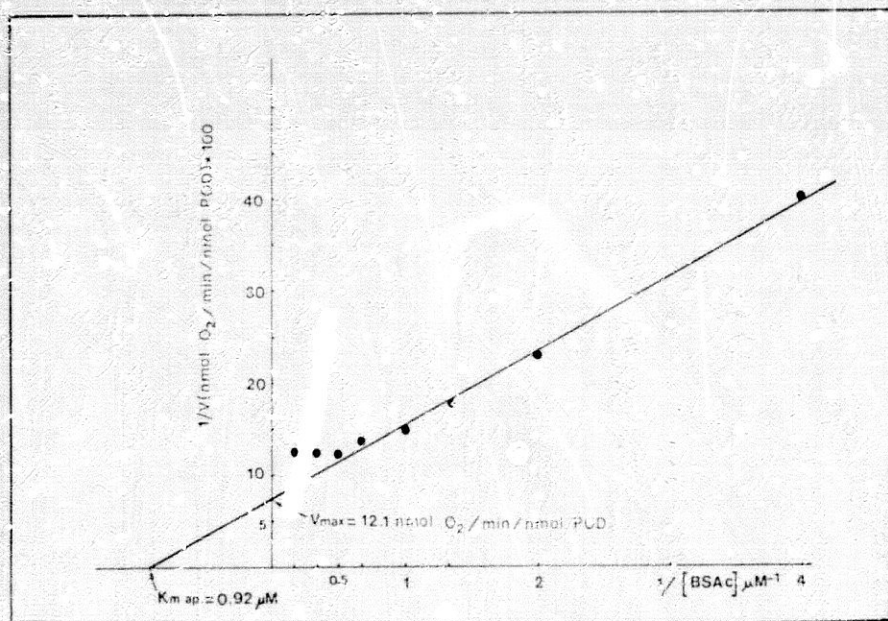


Figura III.11.: Representación de Lineweaver-Burke del efecto estimulador de la velocidad de consumo de  $O_2$  por BSAC.

La velocidad máxima aparente de la reacción ( $V_{max \text{ ap.}}$ ) es de 12,12 nmoles  $O_2$ /min/nmol POD, con una  $K_{m \text{ ap.}}$  de  $0,92 \mu M$ . Como se observa también en esta representación de inversos, existe una aparente inhibición por sustrato, pero al contrario de otros ejemplos típicos, en los cuales la inhibición aumenta progresivamente con concentraciones crecientes de subs-



trato, en este caso, se mantiene fija a partir de una determinada concentración de BSAC.

Debido a que la mayoría de las preparaciones de albúminas séricas contienen cantidades variables de lípidos (Kendall, 1941; Cohn *et al.*, 1947), que podrían ser los responsables de este efecto estimulador, decidimos comprobar si este efecto se producía también con preparaciones de BSA que estuviesen desprovistas de lípidos. Para estos experimentos se utilizó, bien seroalbúmina bovina deslipidada por el método de Chen (1966) obtenida a partir de la BSAC utilizada en los experimentos anteriores, o bien comercializada (Sigma).

Tanto una como la otra preparación (que denominaremos como BSAd), fueron capaces de repetir el efecto estimulador sobre la actividad oxidación aeróbica de la peroxidasa. Establecimos así que dicho efecto es debido al componente protéico de la molécula de BSA.

En la figura III.12. se muestra la representación de inversos del efecto estimulador de la BSAd sobre el consumo de  $O_2$  en el sistema POD-NADH.

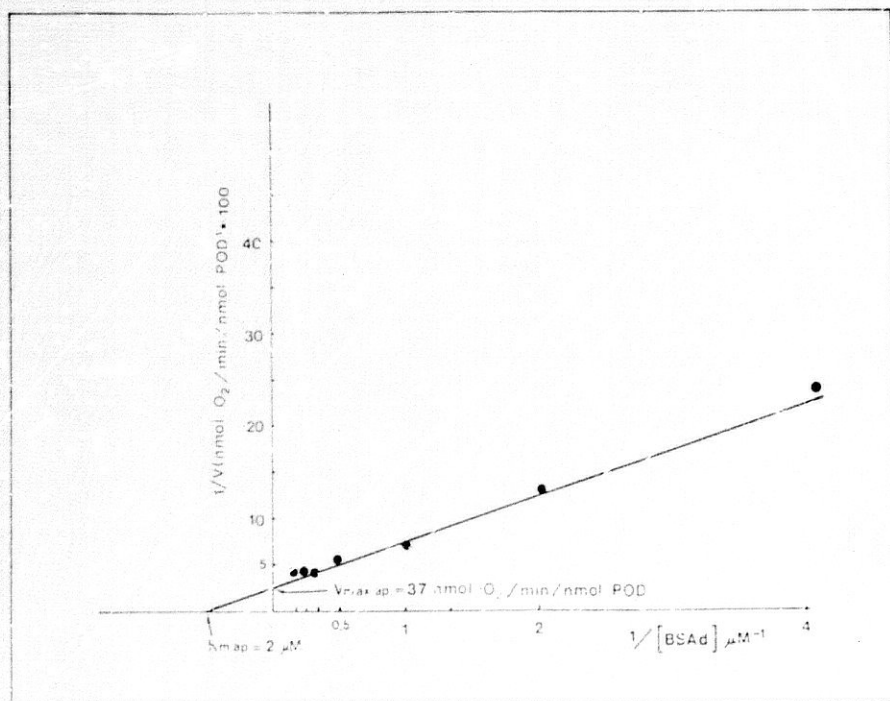


Figura III.12.: Representación de Lineweaver-Burke del efecto estimulador de la BSAd. Condiciones iguales a los experimentos anteriores.



En este caso el efecto estimulador es casi tres veces mayor ( $V_{max}$ : 37 nmoles  $O_2$ /min/nmol POD), sin embargo se observa un incremento en la  $K_m$  ap., que ahora tiene un valor aproximado de 2  $\mu M$ , el doble que en el caso de la BSAC.

Aunque las características de la BSAD parecen ser muy similares a las de BSAC en cuanto a sus parámetros de ultracentrifugación analítica, dicroidismo circular, capacidad de ligar de nuevo ácidos grasos y de unirse con el ácido 8-anilinoftaleno-1-sulfónico (Chen, 1966) los resultados con BSAD indicarían que las manipulaciones realizadas han afectado la conformación original de la molécula de proteína, de tal manera que la(s) parte(s) que interaccionan con el enzima han perdido su estructura original. Para confirmar este punto se realizaron experimentos con preparaciones de BSA desnaturalizada mediante calor (80°C 10'). En la tabla III.2. se muestran los resultados comparativos obtenidos con las distintas BSA utilizadas.

BSA	$V_{max}$ aparente (nmoles $O_2$ /min/nmol POD)	$K_m$ aparente ( $\mu M$ )
Cristalizada	12,2	0,92
deslipidada	37	2
desnaturalizada	42	2,3

Tabla III.2.

Los resultados de la tabla III.2. muestran que una progresiva pérdida de la conformación original de la BSA, conlleva también un cambio en los parámetros cinéticos del efecto estimulador de la BSA. En líneas generales, puede hablarse de una pérdida de afinidad ya que la  $K_m$  ap va siendo progresivamente mayor, y un aumento de la velocidad máxima. Estos cambios podrían indicar en principio, que la acción de la BSA no es inespecífica y que su efecto estimulador depende del grado de integridad de su conformación original.

#### 4. Dependencia de la velocidad de reacción de la concentración de NADH y cinética de saturación respecto al mismo en presencia de BSA

De la misma manera que es posible titular el efecto estimulador de las distintas concentraciones de BSA con una cantidad fija de NAD(P)H, también es ahora posible titular las distintas concentraciones de NAD(P)H en presen-



cia de una cantidad fija de BSA.

En presencia de BSA ligeramente en exceso y a un pH de 6,5 el consumo de  $O_2$  se hace dependiente de la concentración de NAD(P)H y se observa una cinética sigmoideal con saturación por sustrato tal y como se muestra en la figura III.13.

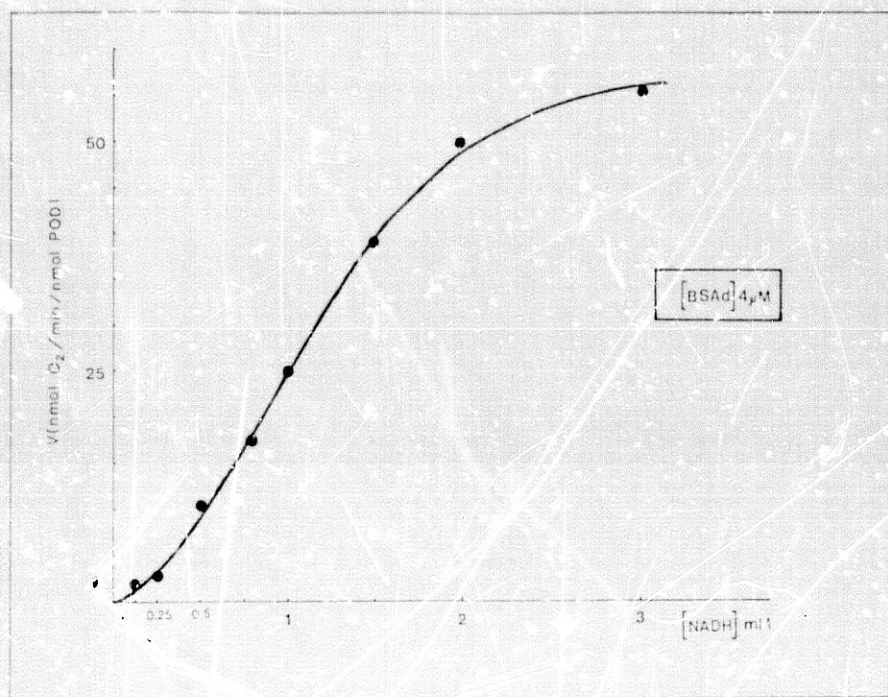


Figura III.13.: Cinética del consumo de  $O_2$  por la peroxidasa en presencia de distintas concentraciones de NADH, en presencia de BSA. Condiciones: POD  $0,5 \mu M$ , BSA  $4 \mu M$ , tampón fosfato  $50 mM$ , pH  $6,5$ ,  $25^\circ C$ .

La reacción se llevó a cabo a un pH de 6,5 porque así la velocidad de oxidación del NAD(P)H y de consumo de  $O_2$  es menor y permite valorar el efecto estimulador de la BSA a concentraciones superiores a  $1 mM$  de NADH y observar el efecto de saturación, que es característico de las reacciones enzimáticas. A pH más ácido, la oxidación autocatalítica del NADH a altas concentraciones es muy rápida y los efectos de la proteína son peor apreciados.



*b) Determinaciones espectrofotométricas del consumo de piridin nucleótidos*

Se realizaron a también experimentos monitorizando el consumo de piridin nucleótidos reducidos, pero el uso de esta metodología presenta el inconveniente de no poder operar a concentraciones superiores a 0,5 mM de NAD(P)H debido a su alto coeficiente de extinción molar, por lo que no se realizaron experimentos totalmente paralelos a los de consumo de  $O_2$ . La máxima concentración de NAD(P)H fue de 0,5 mM y se utilizó una longitud de onda de 375 nm, siendo el coeficiente de extinción molar aproximado  $E_{375} = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

El resultado más llamativo obtenido cuando se midió simultáneamente desaparición del piridin nucleótidos y consumo de  $O_2$  fue que, en presencia de BSAC en exceso, ambas velocidades de estimulación se hacían iguales. Ya se mencionó al principio, que cuando el sistema está constituido por NAD(P)H y POD existía una disparidad entre el consumo aparente de piridin nucleótidos y de  $O_2$ . Así pues, cuando la BSA está presente la oxidación de una molécula de NAD(P)H implica la reducción de 1 molécula de  $O_2$ .

Así mismo, se pudo seguir la oxidación de NAD(P)H inferiores a 0,3 mM. (También se mencionó que cuando el sistema está constituido solamente por POD y NAD(P)H, no existe oxidación por debajo de esta concentración crítica). Cuando la BSA está presente es posible titular cualquier concentración de NAD(P)H por pequeña que sea, siendo la velocidad de oxidación similar a la de consumo de  $O_2$  vista en la figura III.11.

Por lo demás, se puede decir que no existieron diferencias significativas entre ambas series de experimentos.

IDENTIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE ACTIVACION DEL OXIGENO EN PRESENCIA DE BSA

Cuando el sistema está constituido solamente por peroxidasa y NAD(P)H, la oxidación aeróbica de los piridin nucleótidos se lleva a cabo autocatalíticamente. Tanto el NAD(P)H como el  $O_2$  dan lugar a radicales libres,  $NADP^{\bullet}$  e ión superóxido  $O_2^{\bullet-}$ . Este último puede dar lugar por dismutación espontánea a peróxido de hidrógeno. No es posible en esta situación establecer de forma cuantitativa, durante el transcurso de la reacción, cuáles son los productos de activación del oxígeno molecular, ni establecer una relación estequiométrica entre ellos, aunque una vez finalizada y consumido tanto el  $O_2$  como el NAD(P)H la reacción global que se ha producido



es (Olsen, 1978):



Sin embargo, cuando la BSA está presente suceden los siguientes cambios:

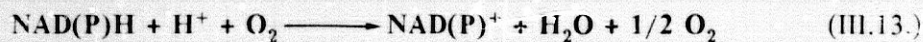
1ª) Las velocidades de consumo de NAD(P)H y de  $\text{O}_2$  se igualan.

2ª) Si el enzima catalasa está presente la velocidad de consumo de NAD(P)H no sufre cambios, mientras que la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  es aproximadamente la mitad.

Estos dos hechos surgieron que cuando la BSA está presente se produce la siguiente reacción



y cuando la catalasa está presente



Debido a la descomposición del peróxido de hidrógeno en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$  la velocidad de consumo de  $\text{O}_2$  se reduce a la mitad, mientras que este hecho no afecta a la velocidad de oxidación del NADPH.

Para verificar este punto, se realizaron experimentos paralelos en los que se determinó simultáneamente el consumo de NADH, de  $\text{O}_2$  y producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En estos experimentos la BSA se añadió al medio antes del comienzo de la reacción, que se inició por la adición de POD  $1 \mu\text{M}$ . Por un lado la reacción se monitorizó espectrofotométricamente, y cada 2 minutos se sacaron alicuotas de 0,2 ml para la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por el método del ferritocianato; por otro, se monitorizó el consumo de  $\text{O}_2$  mediante el electrodo de  $\text{O}_2$ ; transcurrido cierto tiempo en el que se hubo consumido una determinada cantidad de  $\text{O}_2$ , se sacaron alicuotas de 0,2 ml que se utilizaron para la medida de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ferritocianato) y de NADH que se diluyeron a 1 : 5 en OHNa y se determinó inmediatamente su absorbancia a 340 nm. Estos últimos valores se compararon con los obtenidos con otras muestras, procesadas igualmente, con igual cantidad de NADH añadido inicialmente, pero en ausencia de POD. De las diferencias resultantes se calculó la cantidad de NADH oxidado.

Los resultados obtenidos por ambos métodos fueron similares (Tabla



II.3.).

t (min)	NADH (nmol)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol)	O <sub>2</sub> (nmol)
(*) 2'	77	81±3	-
(*) 4'	125.3	122±3	-
(**) 4'	121±5	118±2,3	120

Tabla III.3.: Relación entre el consumo de NADH, producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>. Condiciones: POD 1 μM, BSA d 4 μM, NADH 0,5 mM en tampón fosfato 50 mM pH 6, azida 0,1 mM. Volumen final 2 ml. (\*) Datos espectrofotométricos. (\*\*) Datos con el electrodo de O<sub>2</sub>.

Los datos obtenidos indican una estequiometría NADH : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> de 1 : 1 : 1. Así pues, cuando la BSA está presente la reacción no sólo cambia cuantitativamente (mayor velocidad) sino que también se produce un cambio cualitativo en los productos de reacción.

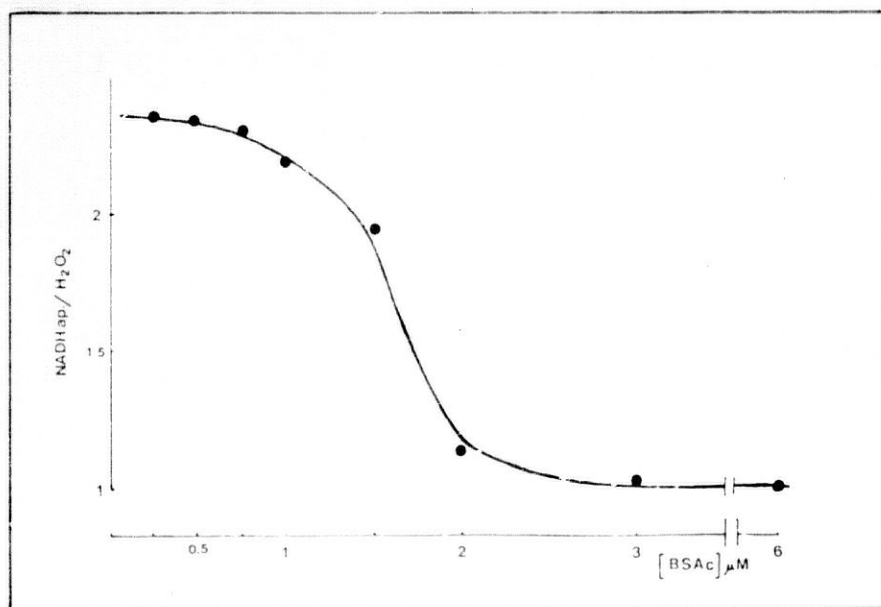


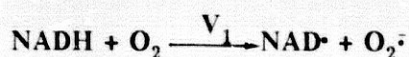
Figura III.14.: Dependencia de la concentración de BSAc respecto a la producción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en relación al consumo aparente de NADH.



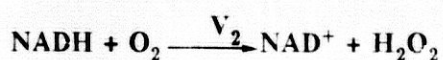
Se estudió la influencia de distintas concentraciones de BSAC en relación con la producción de  $H_2O_2$  respecto al consumo de NADH (figura III.14.). También en este caso la BSA estuvo presente desde el comienzo de la reacción.

La producción de  $H_2O_2$  sigue una cinética sigmoideal con un cociente  $NADH/H_2O_2 = 1$  cuando la BSAC está a una concentración  $2 \mu M$  que coincide con la concentración aproximada a la que se inicia la saturación aparente en el consumo de  $O_2$ . Cantidades mayores de BSAC no alteran ya esta relación. Esta total transformación del oxígeno consumido en  $H_2O_2$ , explicaría también el fenómeno de aparente inhibición por BSA en exceso como un artefacto resultante del cálculo de la velocidad de estimulación. Como se ha mencionado en los experimentos de consumo de  $O_2$ , el cálculo del efecto estimulador correspondiente a las distintas formas de BSA (BSAc, BSAd, y BSAn), se realizó restando la velocidad de consumo de  $O_2$  previa a la adición, a la velocidad total resultante tras la misma.

Considerando la velocidad previa de consumo de  $O_2$  ( $V_1$ ) (en ausencia de BSA) como la del proceso autocatalítico en el que se produce fundamentalmente ión superóxido:



y  $V_2$  como la resultante del proceso enzimático (en presencia de BSA) en el que se produce  $H_2O_2$ :



entonces, la velocidad de consumo de oxígeno tras la adición de BSA ( $V_T$ )

$$V_T = V_1 + V_2$$

Cuando la relación  $NADH/H_2O_2 = 1$ ,  $V_1 = 0$  y  $V_T = V_2$ . Es por esto que el cálculo de las velocidades de estimulación del consumo de  $O_2$  es portador de un error que va siendo progresivamente mayor: cuanto mayor es la concentración de BSA y que por lo tanto, el fenómeno de inhibición sea tan sólo probablemente un artefacto de cálculo. Debido a esto, también los cálculos cinéticos de  $V_{max}$  y  $K_m$  son meramente aproximativos; por lo tanto deben de ser interpretados desde un punto de vista más bien orientativo y dentro del conjunto total de datos experimentales aportados.



La reacción del ión superóxido, -producido en la reacción en cadena que se produce en el sistema NADH-POD-, con el enzima en su forma original (ferroperoxidasa  $\text{Fe}^{3+}$ ) determina la formación del compuesto III ( $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$ ), que es inactivo. Es razonable que el cambio de actividad inducido por la presencia de BSA en el sistema, de lugar a una serie de modificaciones espectrales que sean la expresión de tales cambios de actividad.

La presencia de BSA produce los siguientes cambios espectrales:

### 1º) Aparición del compuesto II

El compuesto II se definió como el resultado de la reacción del compuesto I con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (véanse reacciones III.1 y III.2.).

El compuesto II tiene unas características muy parecidas al compuesto III en la zona del espectro visible de los 400 nm. Sus máximos (C III 418 nm; C II 419 nm) y sus coeficientes de absorción molar (C III  $106 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; C II  $95 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) parecidos, hacen que sean poco distinguibles en esta zona del espectro. Sin embargo, en la zona de 500-600 nm están netamente diferenciados.

En la figura III.15. se muestran los cambios espectrales ocurridos en ambas zonas del espectro visible.

### 2º) La adición de cianuro 1 mM y $\text{H}_2\text{O}_2$ 100 $\mu\text{M}$ hace desaparecer el compuesto II

Como mencionamos, la adición de KCN sobre el compuesto III no tiene ningún efecto, pero en este caso, cuando la BSA está presente, el espectro del compuesto II desaparece (figura III.16.) para dar lugar a otro cuyas características son muy parecidas a las del compuesto POD-KCN. (Véase la tabla III.1.).

La adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) hace desaparecer el compuesto II; en su lugar aparece de nuevo el compuesto III. De igual manera, la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no modifica en absoluto al compuesto III. Esto significa que la aparición del compuesto II no está mediada por la interacción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (único producto de activación del  $\text{O}_2$  en presencia de BSA) con el enzima, sino que más bien la aparición de este compuesto está determinada posiblemente por la interacción POD-BSA con la formación de un hidroperóxido intermediario, como paso previo a la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este aspecto será analizado más detenidamente cuando se discuta el posible mecanismo de acción de la BSA



sobre el sistema NADH-POD.

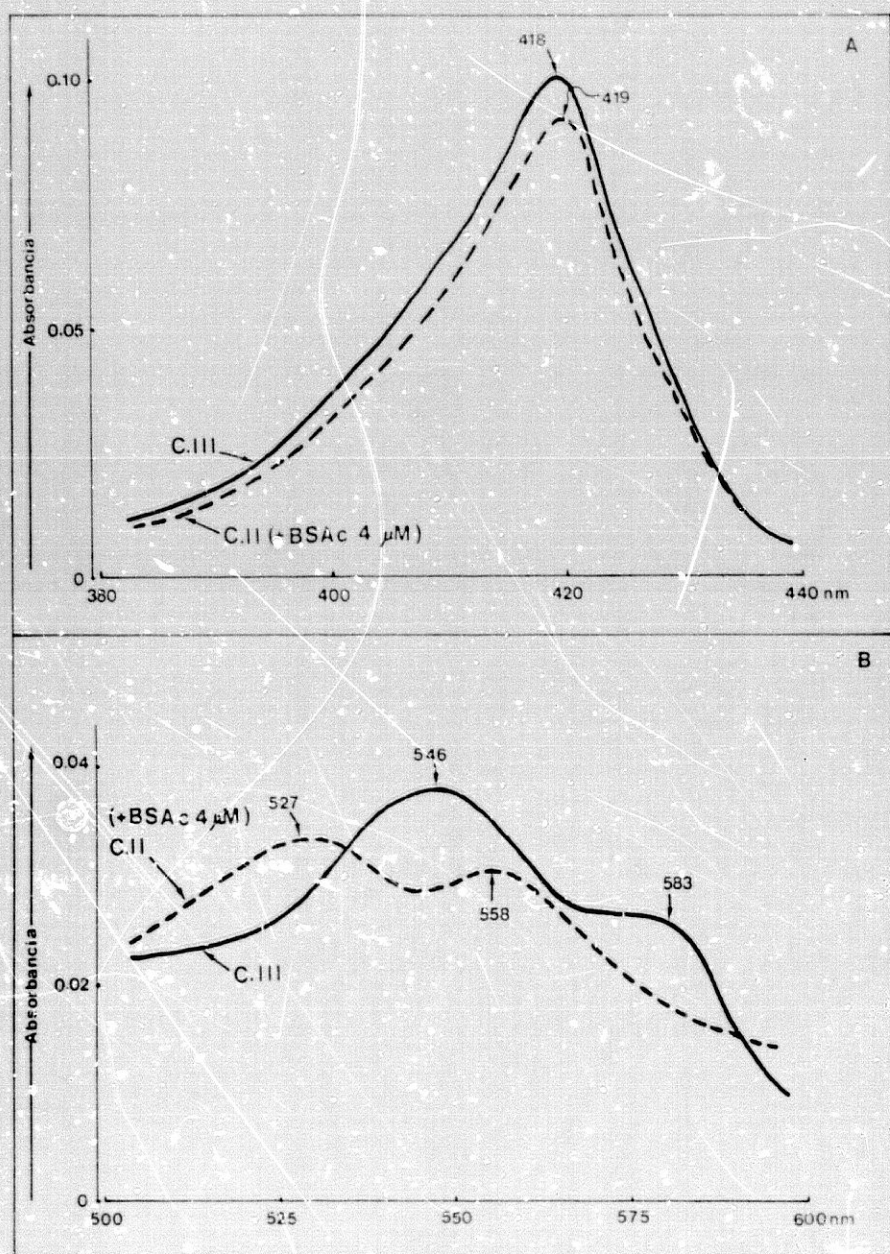


Figura III.15.: Aparición del compuesto II tras la adición de BSAc 4  $\mu$ M. Compuesto III (—); compuesto II (-----). Condiciones: A: POD 1  $\mu$ M; B: POD 2  $\mu$ M. Tampón fosfato 50 mM pH 6.



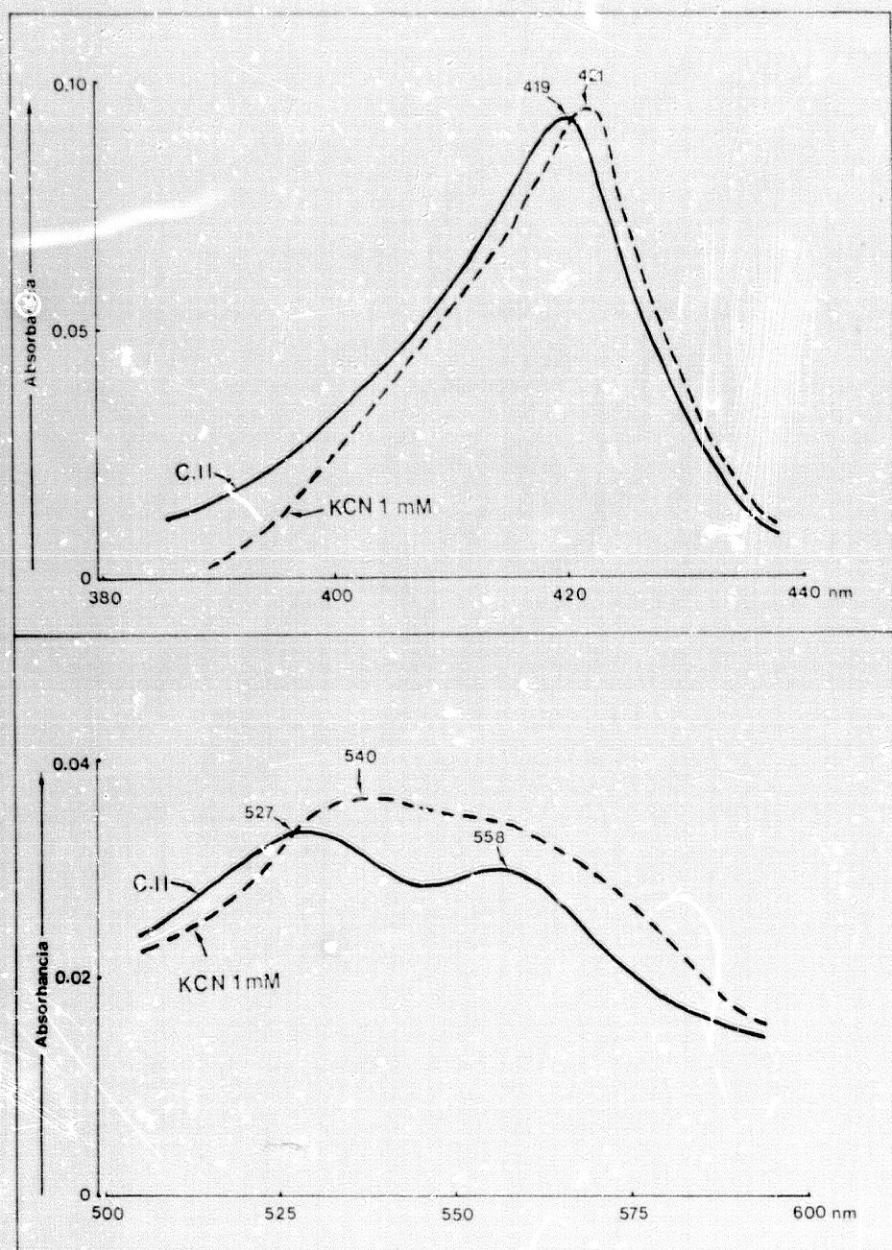


Figura III.16.: Desaparición del compuesto II tras adición de KCN 1 mM. El nuevo espectro presenta características similares a las del compuesto POD-KCN. Condiciones idénticas a la de los espectros anteriores.



INFLUENCIA DE LOS D- Y L-AMINOACIDOS SOBRE  
LOS SISTEMAS NADH-POD Y NADH-POD-BSA

En los experimentos presentados hasta ahora, se ha visto cómo el componente protéico de la molécula de BSA es capaz de modificar cuantitativa y cualitativamente el proceso de oxidación aeróbica de NAD(P)H por la peroxidasa de rábano. El siguiente paso de nuestro trabajo de investigación sería tratar de identificar aquellas partes o estructuras del componente protéico que son responsables de los cambios mencionados. Con este fin se decidió probar cuál sería el efecto de los D,L-aminoácidos aislados sobre los sistemas NADH-POD y NADH-POD-BSA.

**a) D- y L-aminoácidos y el sistema NADH-POD**

La adición de distintos aminoácidos al medio, produce también una serie de cambios en la reacción de oxidación aeróbica de NAD(P)H catalizada por la peroxidasa, cuyas características son muy parecidas a los producidos tras la adición de BSA. Estos fueron:

**1º. Incremento de la velocidad de consumo de O<sub>2</sub>**

La capacidad de estimular el consumo de O<sub>2</sub> del sistema NADH-POD es variable dependiendo del aminoácido que se utilice. La tabla III.4. muestra el incremento producido por diversos aminoácidos a una concentración de 3 mM.

Aminoácido (3 mM)	Incremento de la velocidad de consumo de O <sub>2</sub> en el sistema NADH-POD (nmol O <sub>2</sub> /min/nmol POD)
Histidina	25.8
Triptofano	18.2
Treonina	17
Aspártico	16.4
Glutámico	12.7
Fenilalanina	11.2
Asparragina	10.5
Serina	7.5
Leucina	6
Isoleucina	6
Valina	6
Alanina	4.2
Metionina	2
Glicina	0

Tabla III.4.



Todos los aminoácidos probados, excepto glicina, ejercen un efecto estimulador que varía, en términos generales, en función de las características de sus cadenas laterales (R). Así, los aminoácidos con una cadena lateral polar, cargada o no (histidina, treonina y aspártico) o bien voluminosa, pero apolar (triptofano, fenilalanina) son capaces de ejercer un estímulo mayor que los de cadena lateral apolar alifática (leucina, isoleucina, etc.), mientras que glicina no muestra ninguna capacidad de estimulación.

Es llamativo que el efecto estimulador de los aminoácidos no sólo es menor que el de las distintas clases de BSA en conjunto, sino que además es preciso utilizar concentraciones mucho más elevadas para obtenerlo. Se volverá a analizar este punto una vez que se haya mostrado los resultados de los experimentos realizados sobre la influencia de los aminoácidos sobre el sistema NADH-POD-BSA.

2ª) El efecto de los aminoácidos más eficaces en estimular al sistema NADH-POD es inhibido por aquellos que tienen una menor capacidad de estimulación. Pero además, si una vez que el sistema se encuentra inhibido, se incrementa la concentración del aminoácido estimulador, la velocidad de consumo de  $O_2$  vuelve a aumentar (figura III.17.).

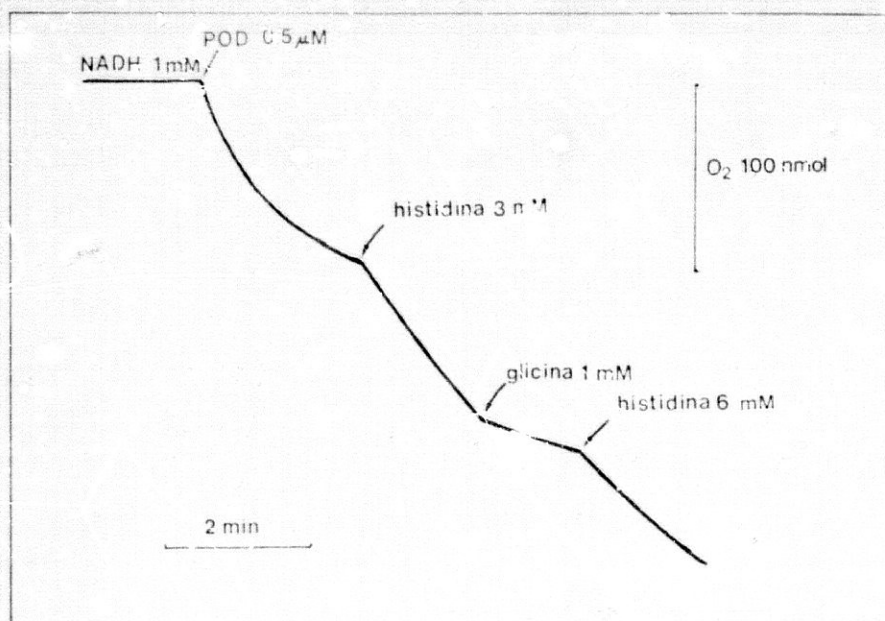


Figura III.17.: Estimulación e inhibición del sistema NADH-POD por la adición sucesiva de histidina 3 mM y glicina 1 mM. Obsérvese la estimulación producida por una nueva adición de histidina. Condiciones similares al experimento anterior.

Como se muestra en este experimento, a pesar de que unos aminoácidos tengan una mayor capacidad de estimular al sistema NADH-POD que otros, todos ellos deben relacionarse con el mismo sitio del enzima, de tal manera que el efecto inhibitor y su desaparición parcial tras incrementar la concentración de aminoácido estimulador, sería el resultado de un fenómeno competitivo entre ambos aminoácidos con una mayor y menor capacidad de estimulación respectivamente. Por lo tanto, es preciso distinguir entre dos fenómenos distintos: uno de ellos sería la capacidad de estimulación del sistema NADH-POD de cada aminoácido, que como hemos mencionado depende de las características de la cadena lateral (R) (muy diferentes entre sí e incluso ausente como en el caso de la glicina) y el otro sería la capacidad de relación que todos ellos son capaces de establecer con el enzima, que dependería lógicamente de una estructura molecular común a todos ellos.

3º) Inhibición del incremento de la velocidad de consumo de  $O_2$  por cianuro 1 mM

Esta inhibición es de idénticas características a la que se produce en el caso de la BSA.

4º) Mayor producción de  $H_2O_2$ . La relación entre el consumo de NADH, producción de  $H_2O_2$  y consumo de  $O_2$  se determinó de la misma manera que para el sistema NADH-POD-BSA, salvo que en este caso se utilizó histidina 3 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.5.

t (min)	NADH (nmol)	$H_2O_2$ (nmol)	$O_2$ (nmol)
(*) 2'	53	$38,2 \pm 2$	-
(*) 4'	84	$60,4 \pm 1,5$	-
(**) 4'	$77 \pm 4$	$59,3 \pm 0,9$	66

Tabla III.5.: Relación entre el consumo de NADH, producción de  $H_2O_2$  y consumo de  $O_2$  en presencia de histidina 3 mM. Condiciones: POD 1  $\mu$ M, NADH 0,5 Min, tampón fosfato 50 mM, pH 6, azida 0,1 mM. Volumen final 2 ml. (\*) Datos espectrofotométricos. (\*\*) Datos obtenidos con el electrodo de  $O_2$ .

La estequiometría de la reacción  $NADH : H_2O_2 : O_2$  es en este caso 1 : 0,77 : 0,86 aproximadamente, y prácticamente no varió cuando se utilizaron concentraciones superiores de histidina. La capacidad de producción de  $H_2O_2$



por otros aminoácidos fue menor y en relación a su capacidad de estimulación.

### 5º) Formación del compuesto II

También la capacidad de formación del compuesto II es paralela a la capacidad de estimulación de cada aminoácido. En condiciones adecuadas (p. ej., histidina 3 mM) se produce el compuesto II con características muy parecidas al formado en presencia de BSA (figura III.18), mientras que en condiciones menos óptimas (histidina 1 mM) se produce un compuesto intermedio entre el II y el III o bien no aparece (metionina 1 mM).

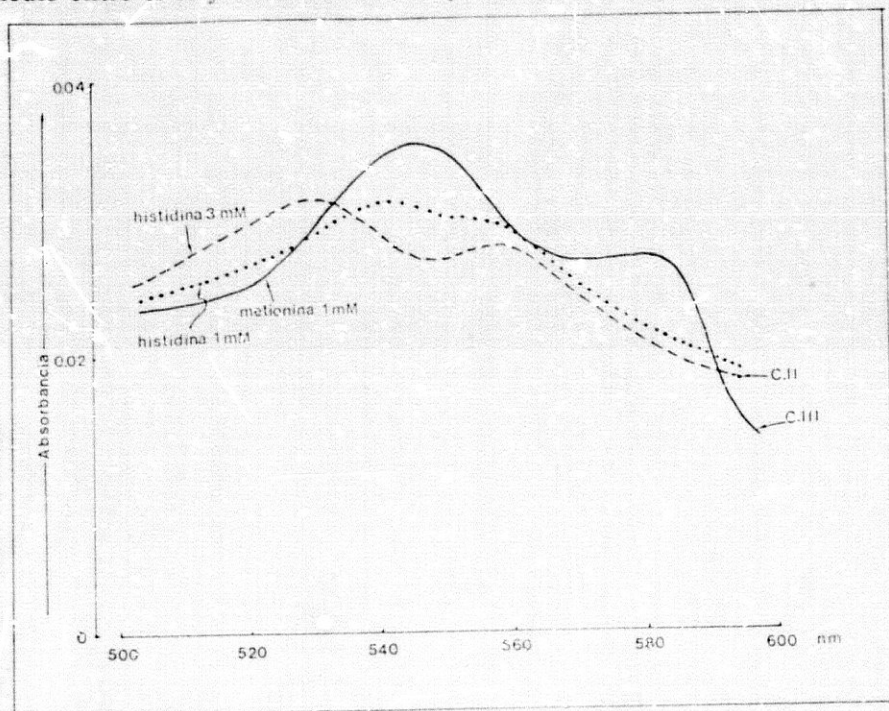


Figura III.18.: Formación del compuesto II por histidina 3 mM (----); 1 mM (.....) y compuesto III (—) que no se modifica en presencia de metionina 1 mM. Condiciones igual que en experimentos similares.

6º) No existieron diferencias significativas entre las formas D- y L- de los aminoácidos utilizados. Se intentaron otras condiciones experimentales para tratar de que el enzima pudiese discriminar entre D- y L-aminoácidos (pH, concentración de NAD<sub>1</sub>, presencia de cationes divalentes, adición de fosfolípidos, etc.) pero sin resultados satisfactorios.

7º) Los aminoácidos no parecen ser catalizados por el enzima, o por lo menos desaminados oxidativamente. Esto se comprobó incubando D-L-alanina



a una gran concentración (10 mM) con peroxidasa en presencia y ausencia de NADH, durante 4 horas. Posteriormente se midió piruvato, obteniéndose un resultado negativo.

**b) D- y L-aminoácidos en el sistema NADH-POD-BSA**

Como se acaba de mostrar, la presencia de ciertos aminoácidos produce cambios en la reacción del sistema NADH-POD muy similares a los producidos por BSA, y que estos cambios eran inhibidos por otros aminoácidos cuya capacidad para estimular al sistema es menor o nula. Se decidió comprobar si los cambios producidos por BSA eran inhibidos también por la presencia de estos aminoácidos y establecer el tipo de inhibición, con el fin de establecer una relación entre ambos efectos y las estructuras moleculares responsables de ellos.

Preliminarmente se comprobó que la adición de metionina, glicina o alanina a una concentración 1 mM inhiben el consumo de  $O_2$  del sistema NADH-POD-BSA, y que incluso los aminoácidos que más estimulan al sistema NADH-POD, como histidina, triptófano y treonina son capaces de inhibir la acción de la BSA cuando son utilizados a bajas concentraciones (0,5 - 1 mM) (figura III.19).

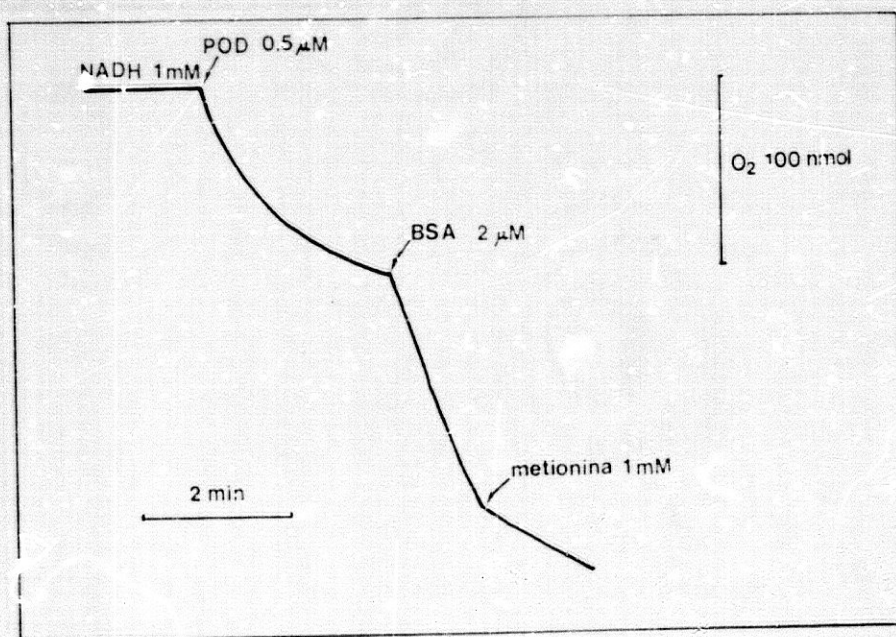


Figura III.19.: Inhibición del efecto estimulador producido por BSA en el sistema NADH-POD por la adición de aminoácidos (metionina 1 mM). Condiciones como en experimentos anteriores.



Para establecer el tipo de inhibición realizado por los aminoácidos se utilizó el método de Dixon, que consiste en titular distintas concentraciones de inhibidor a dos (o más) concentraciones no saturantes de BSA (véase Material y Métodos). Además de adaptarse mejor a nuestras condiciones experimentales, el método de Dixon es de gran sencillez y permite el cálculo de la constante de inhibición ( $K_i$ ) gráficamente. En la figura III.20. se muestra el resultado obtenido utilizando metionina como inhibidor del sistema NADH-POD-BSAc.

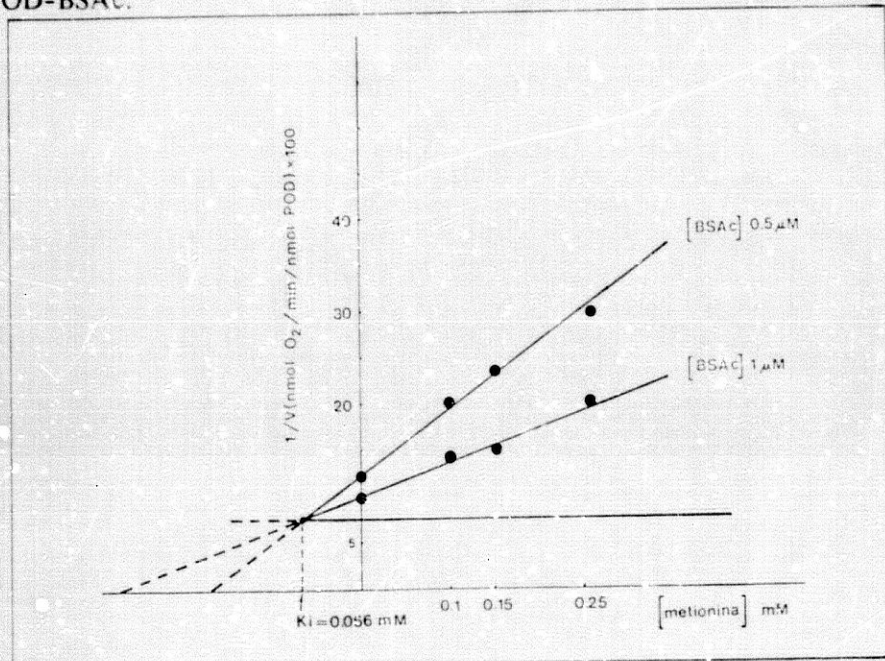


Figura III.20: Método de Dixon utilizado para establecer el tipo de inhibición del sistema NADH-POD-BSAc por aminoácidos. Condiciones: POD 0,5  $\mu$ M, NADH 1 mM, BSAc 0,5  $\mu$ M y 1  $\mu$ M; D-L metionina 0,1; 0,15 y 0,25 mM. Tampón fosfato 50 mM, pH 6,0;  $t^{\circ}$  25 $^{\circ}$ C.

La inhibición realizada por metionina es de tipo competitivo y también la realizada por otros aminoácidos como leucina, alanina y glicina. En la tabla III.6. se muestran los valores de las constantes de inhibición.

	$K_i$ (mM)
Metionina	0,066
Leucina	0,3
Alanina	0,43
Glicina	0,56

Tabla III.6.

Es notorio que, aunque los aminoácidos utilizados sean precisamente aquellos que poseen la menor capacidad de estimular el consumo de  $O_2$  del sistema NADH-POD sean capaces de inhibir al sistema NADH-POD-BSAc a concentraciones relativamente bajas. Este hecho, y la necesidad de concentraciones altas de otros aminoácidos para estimular al sistema NADH-POD, no son contradictorias sino que además, su análisis proporciona una información importante para comprender cuál es la base molecular de los cambios cualitativos que se producen tras la adición de BSA y aminoácidos.

#### INFLUENCIA DE OTROS SUSTRATOS PROTEICOS Y NO PROTEICOS SOBRE EL SISTEMA NADH-POD

Además de la BSA, se han testado otras proteínas tales como insulina, glucagon y lisozima, que se disponían con alto grado de pureza. De ellas, sólo la insulina dio resultados positivos, aunque la estimulación del sistema NADH-POD fue mucho menor que la BSAc con una  $V_{max}$  aproximada de 4 nmoles  $O_2$ /min/nmol POD. Se pudo constatar también una inhibición por KCN y por D-L-metionina y una producción mayor de  $H_2O_2$  por el sistema.

Los mejores resultados fueron obtenidos con glutatión oxidado (GSSG). Esta molécula constituida por la oxidación de dos moléculas de glutatión reducido, posee características polipeptídicas (Meister & Anderson, 1983) y aunque de tamaño muy reducido, posee dos locus de carbono  $\alpha$  a nivel del residuo cistina central (figura III.21.).

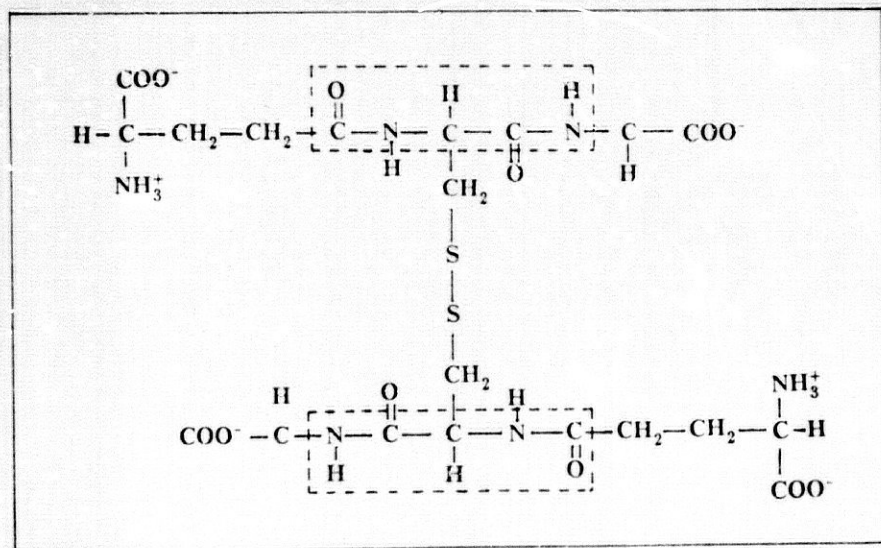


Figura III.21.: Estructura molecular del glutatión oxidado. Los recuadros indican los locus de carbono  $\alpha$ .



Se vio que el glutatión oxidado es capaz de estimular al sistema NADH-POD con unas características idénticas a las de la BSA con una  $V_{max}$  aparente de 34.5 nmoles  $O_2$ /min/nmol POD y una  $K_m$  ap de 62,5  $\mu$ M.

En presencia de glutatión oxidado el sistema: a) Se inhibe por KCN 1 mM; b) se produce una estequiometría NADH :  $H_2O_2$  :  $O_2$  de 1 : 1 : 1; c) formación del compuesto II; d) inhibición competitiva por D-L-metionina ( $K_i = 0,170$  mM). Se comprobó si el glutatión oxidado es reducido por el enzima, pero las determinaciones de glutatión reducido resultaron negativas.

En el transcurso de los trabajos experimentales realizados se observó que otras sustancias de características no proteicas eran capaces de estimular también la velocidad de consumo de  $O_2$  del sistema NADH-POD.

La presencia de EDTA a concentraciones inferiores a 10  $\mu$ M acelera la velocidad de reacción mucho más que los substratos de características proteicas o pseudo-proteicas, pero a diferencia de éstos, el sistema no se inhibe por KCN, ni por D-L-aminoácidos, no se produce compuesto II, etc. El papel del EDTA podría estar en relación con su papel de agente reductor (Tyson *et al.*, 1972; Sligar *et al.*, 1974) y participar en la formación del compuesto III y en la secuencia de reacciones en cadena como un radical libre más o bien catalizando de forma inespecifica la reacción autocatalítica.

También se comprobó que la presencia de ATP (0,1 - 1 mM) estimula el consumo de  $O_2$  del sistema, pero, de igual manera que el EDTA, la estimulación no reúne ninguna de las características descritas para la estimulación realizada por BSA, D-L-aminoácidos y otros. Su papel efector podría estar en relación con la presencia de cationes divalentes que contaminan frecuentemente las preparaciones comerciales de este producto. Se ha descrito que cationes divalentes como  $Mn^{++}$  pueden acelerar las reacciones de oxidación aeróbica de la peroxidasa (Akazawa & Conn, 1958). En este sentido, se observó un gran efecto estimulador al añadir insulina comercial al sistema, prácticamente insensible al cianuro. Tras dializar la preparación comercial, en la que se eliminó del todo el componente no proteico, se obtuvo la escasa estimulación que se ha mencionado, sensible al cianuro.



## DISCUSION

La actividad enzimática clásica de la peroxidasa de rábano (donante:  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidoreductasa E.C. 1.11.1.7) consiste en la oxidación del donante utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como aceptor de los electrones que es entonces reducido a  $\text{H}_2\text{O}$ . Sin embargo, la peroxidasa es también capaz de catalizar reacciones de oxidación en las cuales el  $\text{O}_2$  es el aceptor. Este proceso, conocido como oxidación aeróbica, es también catalizado por otras peroxidases (Klapper & Hackett, 1963; Nakamura *et al.*, 1969). Se ha propuesto un mecanismo autocatalítico y se ha sugerido que la peroxidasa cataliza la formación de radicales libres del donante; estos radicales son capaces entonces de reducir al oxígeno molecular (Yokota & Yamazaki, 1965). Sin embargo, la relación entre el donante, la peroxidasa y el  $\text{O}_2$ , es decir los tres elementos que participan en la reacción es poco conocida. Ninguno de los tres componentes involucrados son capaces de reaccionar entre sí. Se ha asumido entonces que la reacción de oxidación se inicia por la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir del  $\text{O}_2$  y del donante, en una reacción mediada por radicales libres, o bien que  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueda formarse en mínimas cantidades en la solución de NAD(P)H cuando ha pasado cierto tiempo desde su preparación (Yokota & Yamazaki, 1965). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado de una manera o de otra es utilizado entonces en la peroxidación del donante; este proceso da lugar a la aparición de radicales libres del donante, que reaccionan con el  $\text{O}_2$  y se establece así una reacción autocatalítica cuyo resultado final es la oxidación del NAD(P)H y reducción del  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (Deng, 1969). El papel iniciador atribuido al  $\text{H}_2\text{O}_2$  se apoya en el papel estimulante del  $\text{H}_2\text{O}_2$  añadido y del efecto inhibitorio de la catalasa. Pero si se realizan experimentos en los que se toma la precaución de evitar la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de cualquier origen, es decir, añadiendo catalasa no sólo al medio de reacción, sino también a la preparación de peroxidasa y de piridín nucleótido reducido, de tal manera que no exista ninguna posibilidad de participación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la reacción, ésta aún se sigue produciendo, aunque más lentamente. Por este motivo, otros autores (Ricard & Nari, 1967) han propuesto que en ciertas condiciones sea posible la reacción entre el donante y el enzima, que entonces reaccionaría con el



$O_2$  formando un compuesto III dotado de reactividad. El potencial de oxidoreducción del NAD(P)H es suficientemente bajo para reducir al enzima, pero hasta ahora no hay ninguna evidencia de la formación de un complejo POD... NAD(P)H, ni que el NAD(P)H pueda reducir al enzima (Olsen, 1978).

En resumen, se puede decir que el proceso de oxidación aeróbica de los piridín nucleótidos reducidos por las peroxidasas es un proceso poco conocido, cuya significación biológica está aún por establecer. En términos operativos, podemos describirlo como un **proceso autocatalítico**, en el que intervienen diversas reacciones mediadas por **radicales libres**. El papel del enzima en este proceso no es del todo conocido pero su acción es imprescindible para el comienzo y desarrollo de la reacción.

Como tal proceso autocatalítico, hemos podido contrastar experimentalmente los siguiente hechos:

- 1 Dependencia irregular de la velocidad de la reacción de la concentración de NAD(P)H.
- 2 Necesidad de una concentración crítica de NAD(P)H para el comienzo de la reacción (>0,3 mM).
- 3 No correlación entre las velocidades aparentes de consumo de NAD(P)H y de consumo de  $O_2$ .
- 4 Producción irregular de  $H_2O_2$  en relación al consumo de  $O_2$  y NAD(P)H.
- 5 Insensibilidad al KCN 1 mM.
- 6 Acumulación del compuesto III.

La presencia de BSA en el medio de reacción, una vez que todo el enzima se encuentra en forma de compuesto III, produce los cambios siguientes:

1. Estimulo de la velocidad de consumo de  $O_2$  y de oxidación de NAD(P)H dependiente de la concentración de BSA, con cinética enzimática de Michaelis y saturación. Esta estimulación depende del componente proteico, pues la BSA deslipidada produce aún mayor estímulo. Parece evidente que la eliminación de lípidos o desnaturalización térmica da lugar a una elevación de la velocidad de estimulación y a un aumento de la  $K_m$ . Aunque los valores cinéticos de  $V_{max}$  y  $K_m$  deben ser considerados como aproximativos, indican en términos generales una pérdida de afinidad en la interacción BSA-POD, sea a nivel del centro activo o cualquier otro centro del

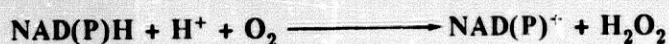


enzima. Estas variaciones de afinidad constituyen además un argumento a favor de la formación de un complejo POD-BSA y que el efecto producido por la BSA no es inespecífico.

2. Dependencia de la concentración de NAD(P)H de la velocidad de reacción con cinética sigmoideal y saturación de consumo de NAD(P)H y de O<sub>2</sub> cuando BSA está presente a una concentración fija. Como se ha mencionado previamente, el sistema NAD(P)H-POD necesita una concentración crítica de NAD(P)H para que se produzca la reacción de oxidación. Esta concentración crítica, propia de los procesos autocatalíticos, no es necesaria cuando BSA está presente en el sistema, y la reacción se inicia a cualquier concentración de NAD(P)H por debajo de la mencionada concentración.

Por otra parte, la cinética sigmoideal sugiere que la peroxidasa se comporta en estas circunstancias como un enzima alostérico. Generalmente, los enzimas alostéricos producen curvas de velocidad de naturaleza sigmoideal. La unión de una primera molécula de sustrato al enzima facilita la unión de una segunda molécula de sustrato debido a que se producen cambios conformacionales que dan lugar a un incremento de la afinidad de unión en otros sitios vacantes del enzima. Este fenómeno es conocido como cooperatividad positiva o respuesta homotrópica positiva y proporciona un control mucho más sensible de la velocidad de reacción por variaciones de la concentración del sustrato (Segel, 1975). En este caso concreto, el NAD(P)H no sería solamente un sustrato sino también un modulador, que uniéndose a un locus probablemente no catalítico de la peroxidasa, induciría cambios conformacionales en el enzima, cuyo resultado sería una mayor facilidad para unir una segunda molécula de NAD(P)H a nivel del centro catalítico. Hasta la actualidad no se dispone de ninguna evidencia de formación de un complejo NAD(P)H-POD (Olsen, 1978), pero cuando la BSA está presente, el comportamiento sigmoideal de la velocidad de la reacción así lo sugiere.

3. Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con una estequiometría NAD(P)H : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> de 1 : 1 : 1. Cuando la BSA está presente, las velocidades de oxidación de NAD(P)H y de consumo de O<sub>2</sub> se igualan. El resultado es que por cada molécula de oxígeno y de donante consumidas se produce una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acuerdo con la siguiente reacción



La producción de regular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la estequiometría NAD(P)H : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> de 1 : 1 : 1 indican que el sustrato NAD(P)H resulta completamente oxidado a NAD(P)<sup>+</sup> y no a su radical libre NAD(P)<sup>•</sup>, que es lo que sucede en el sistema NAD(P)H-POD. Este hecho refuerza la idea, vista en el apartado anterior, de que cuando la BSA está presente, el sustrato NAD(P)H es



capaz de unirse al enzima para constituir un complejo NAD(P)H...POD. De esta manera, la oxidación del sustrato queda regulada por el enzima, lo que da lugar a la no producción de radicales libres y a la producción sistemática de  $H_2O_2$ .

4. Formación del compuesto II. A los cambios ahora mencionados hay que añadir este hecho experimental no descrito previamente en el proceso de oxidación aeróbica de los piridin nucleótidos por la peroxidasa. El complejo II, descrito exclusivamente para las reacciones de peroxidación, está constituido por el enzima reducido con un electrón más  $H_2O_2$  ( $Fe^{2+} - H_2O_2$ ) (Maehly, 1972). La adición de  $H_2O_2$  al sistema NAD(P)H-POD acelera la formación del compuesto III (Yokota & Yamozaki, 1965) y ya mencionamos que hacia desaparecer el compuesto II, previamente formado en presencia de BSA, para aparecer de nuevo el espectro del compuesto III. Así pues, descartada la participación de  $H_2O_2$  en la formación del compuesto II, éste debe ser el resultado de la interacción POD-BSA, y probablemente pueda ser atribuido a un hidroperóxido formado en el sitio activo del enzima en el que interviene alguna estructura molecular correspondiente a la BSA.

5. Inhibición por KCN. El cianuro, inactivo sobre el complejo III, actúa sobre el complejo II formado en presencia de BSA. De la misma manera, el complejo enzima-cianuro necesita de la BSA para producirse. El resultado es la detención de los cambios producidos en presencia de BSA.

Con el conjunto de hechos mencionado es posible tratar de establecer el mecanismo de reacción del sistema NADH-POD-BSA (figura III.21.): 1º. Una vez constituido el compuesto III, se produce un complejo POD-BSA; 2º. la interacción entre ambos produce un cambio conformacional en el enzima; 3º. este cambio conformacional induce la aparición de uno o más locus para el sustrato NAD(P)H que es oxidado completamente en un proceso regulado por el enzima para dar lugar al compuesto II; como se ha mencionado, este compuesto sensible al cianuro, podría corresponder a un hidroperóxido intermediario en el que podría intervenir alguna estructura molecular correspondiente a la molécula de BSA. 4º. la entrada de una nueva molécula de  $O_2$  desplaza a este intermediario para dar lugar de nuevo al compuesto III y a una molécula de  $H_2O_2$ , y así sucesivamente.

De acuerdo con este mecanismo, la reacción de oxidación aeróbica del sistema NADH-POD entendida como un proceso autocatalítico en el que la participación del enzima no es bien conocida, se transforma en un proceso enzimático altamente regulado en presencia de BSA y otras sustancias de características protéicas como insulina y glutatión oxidado.



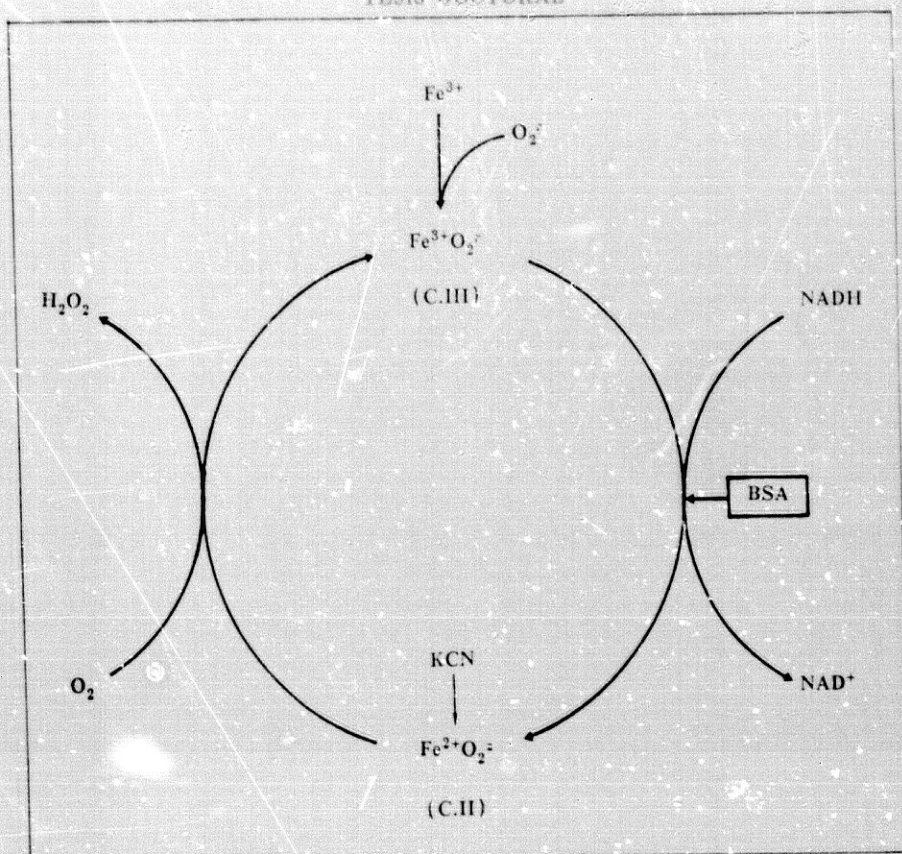


Figura III.21.: Mecanismos de reacción propuesta para el sistema NADH-POD-BSA. Se indican los lugares de actuación de BSA y KCN. (Véase texto).

Con los datos experimentales que se poseen es posible sugerir a qué nivel de la estructura molecular de la peroxidasa se lleva a cabo la interacción con las sustancias mencionadas. Parece evidente que los cambios que se producen en el sistema NADH-FOD no son meramente cuantitativos, como podría ser una aceleración de la velocidad de reacción producida por una molécula efectora. La impresión general que producen los cambios observados, es que el sistema aislado NADH-POD es un sistema incompleto, con un funcionamiento anómalo, al que es difícil proponer un papel biológico. Al añadir determinadas sustancias adquiere las características de una oxidasa verdadera. Es obvio que ni BSA ni los otros pueden ser considerados sustratos del enzima, sino que actuarían en cierta manera supliendo su ausencia; así pues, podríamos considerarlos como pseudo-sustratos.

Por otra parte, el cambio espectral producido por la adición de estos pseudo-sustratos, con aparición del compuesto II no dependiente de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sugiere una interacción con el mismo centro activo del enzima, de la misma manera que en los sistemas enzimáticos de monooxigenación, la interacción



del sustrato o pseudo-sustrato da lugar a cambios espectrales debido a la formación de un complejo enzima-sustrato a nivel del sitio activo del enzima (Schenkman *et al.*, 1966; Peterson, 1971; Massey & Hemmerich, 1975).

Desde este punto de vista el conjunto tendría aún mayor sentido, pues el *sustrato verdadero* regularía la actividad del enzima. En ausencia de éste, el enzima estaría en forma de compuesto III inactivo, y sólo en su presencia se produciría una transición a compuesto II activo, de tal manera que el propio sustrato condicionaría la actividad o inactividad del enzima, evitándose de esta manera un consumo indiscriminado de equivalentes de reducción y de  $O_2$ .

Profundizando aún más, cabe preguntarse ahora cuáles serían las estructuras moleculares que participan directamente en el proceso de regulación del sistema NADH-POD. En este sentido es llamativo que el glutatión oxidado, sea capaz de reproducir exactamente los efectos de la BSA observados al inicio de nuestros trabajos experimentales. El glutatión oxidado fue elegido *a priori*, ya que desde el punto de partida de la hipótesis propuesta se supuso que esta molécula, portadora de dos locus de carbono  $\alpha$  en conformación  $\beta$  o similar debería ser capaz de actuar sobre el sistema NADH-POD. Pero en rigor no es posible afirmar que sean estas estructuras moleculares las responsables del efecto regulador.

Los experimentos llevados a cabo con D-L-aminoácidos tendrían más valor experimental para la identificación de las estructuras moleculares responsables del efecto regulador. Aunque cada aminoácido ejerce un efecto variable dependiendo de las características de su cadena lateral (R), se puede afirmar en general que también ejercen un efecto regulador sobre el sistema NADH-POD, aunque para ello se necesiten unas concentraciones mucho más elevadas respecto a BSA o GSSG.

Sin embargo, son capaces de ejercer un efecto inhibitorio a concentraciones relativamente bajas sobre el efecto regulador de la BSA ( $K_i$  metionina : 0,066 mM) y del GSSG ( $K_i$  metionina : 0,170 mM), lo cual está indicando que ocupan el centro activo del enzima aunque por alguna razón, poseen una menor capacidad de ejercer un efecto regulador sobre el sistema NAD(P)H-POD. Ya se analizó que la base molecular de este efecto regulador está constituida probablemente por cambios conformacionales del enzima, resultantes de la formación de un complejo enzima-sustrato/pseudo-sustrato. La razón por la cual los aminoácidos tienen una capacidad menor de regulación tendría su explicación en la *hipótesis de adaptación inducida o del enzima flexible* (Koshland, 1963). Según esta hipótesis, compuestos que son químicamente parecidos al sustrato normal, pero que poseen grupos menos voluminosos, a menudo fallan en reaccionar, aunque se adaptan correctamente al sitio activo del enzima. Esto es debido a que el sustrato



induce un cambio conformacional en el enzima que es necesario para un posicionamiento correcto de los grupos catalíticos. Análogamente en este caso concreto, los aminoácidos serían capaces de ocupar el centro activo del enzima pero por razones estéricas tendrían una capacidad menor de producir tales cambios conformacionales, de tal manera que sólo un número determinado del total de ocupaciones del centro activo se traduciría en un cambio de conformación; de aquí que para conseguir un efecto regulador, los aminoácidos deban estar presentes a concentraciones más elevadas y sin embargo sean capaces de inhibir el efecto regulador de la BSA a concentraciones bajas. Además, este efecto regulador nunca llegaría a ser del 100%, puesto que siempre habría ocupaciones del centro activo que no se traducirían en cambios conformacionales.

Así pues, la posibilidad de ejercer un efecto regulador no depende tan sólo de formación de un complejo enzima-substrato, sino que además, es necesario que este complejo se traduzca en un cambio conformacional del enzima.

En principio, los experimentos llevados a cabo indican que tanto los aminoácidos libres como la BSA compiten entre sí para formar un complejo enzima-substrato. Debe de haber por lo tanto, una relación de identidad o parecido entre las estructuras moleculares correspondientes a los D-L aminoácidos y de la BSA que son reconocidas por el centro activo del enzima. Insistimos de nuevo en que las características de las cadenas laterales (R) de los aminoácidos, bien libres o formando parte de la BSA son muy importantes para que el complejo enzima-substrato se traduzca o no en un cambio conformacional que es con gran probabilidad, la base molecular de los efectos reguladores que se han detectado. Sin embargo, la estructura molecular por la cual el enzima reconoce a un conjunto muy variado de aminoácidos, debe ser común a todos ellos y debe obligatoriamente ubicarse a nivel de carbono  $\alpha$ .

Por otra parte, los resultados obtenidos utilizando D- y L-aminoácidos han sido parecidos, lo cual indicaría que sólo una parte de la estructura del carbono  $\alpha$  es reconocida por el enzima, de tal manera que la única diferencia entre la unión de un D- o un L-aminoácido sería un cambio de orientación del pequeño hidrógeno  $\alpha$ . La orientación de este grupo sería muy importante a efectos de catalisis, como se ha mencionado en la parte II para el enzima D-aminoácido oxidasa, pero no en el caso de la peroxidasa, ya que en este estudio experimental sólo hemos detectado fenómenos de regulación y no cambios catalíticos. Por otra parte es conocido que L-aminoácidos tales como L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina y L-norvalina (Edlblacher & Wiss, 1944; Dixon & Kleppe, 1965; Rudie *et al.*, 198) pueden inhibir competitivamente la catalisis de D-aminoácidos por el enzima D-aminoácido oxidasa; es decir: son capaces de ocupar el centro activo del enzima



aunque no sean catalizados.

Es posible que en ciertas condiciones experimentales también la peroxidasa pudiera distinguir entre las formas D y L, o bien que la sensibilidad de nuestra metodología sea insuficiente para detectar diferencias significativas. También es posible que un enzima que ha sido arrancado de su contexto celular, en donde se encuentra altamente organizado, y a continuación purificado por procedimientos que no se caracterizan precisamente por su suavidad, haya perdido parte de su estructura original y de sus propiedades de reconocimiento; y más aún si estas supuestas propiedades no han sido tenidas en cuenta previamente al proceso de purificación.

Dado que la similitud estructural entre las estructuras de carbono de los D-aminoácidos y el carbono  $\alpha$  de proteína en conformación  $\beta$  similar, fue el punto de partida que establecimos en nuestro trabajo teórico, hubiera sido deseable que se hubiera establecido alguna diferencia en las formas D- y L- en el caso concreto de la peroxidasa, pero aún así creemos que existe una posibilidad razonable de sugerir que sean también las estructuras de carbono  $\alpha$  de BSA las responsables del efecto regulador de la actividad enzimática de las peroxidases.

En resumen: en este trabajo experimental se expone la relación existente entre sustancias de características proteicas y la actividad enzimática de la peroxidasa. Este hecho experimental no descrito previamente, podría sugerir que los substratos reales de esta y otras peroxidases y oxidasas pudieran ser otras proteínas, tal y como se ha propuesto en nuestros planteamientos teóricos previos, estableciendo así un vínculo preliminar entre nuestro trabajo teórico y de experimentación que trataremos de ensanchar en el futuro.



TESIS DOCTORAL

---

CONCLUSIONES

---



1. Hemos comprobado, en nuestras condiciones experimentales, las características de la reacción de oxidación aeróbica de los piridin nucleóticos por la peroxidasa de rábano. Este proceso puede ser definido como una reacción autocatalítica en la que participan radicales libres del oxígeno y del donante de electrones; el papel realizado por el enzima en este proceso y el significado biológico de esta reacción no han sido establecidos hasta el momento.
2. La presencia de BSA en el medio de reacción produce cambios cuantitativos y cualitativos, a la luz de los cuales se puede afirmar que la actividad de oxidación aeróbica de la peroxidasa es transformada en una **actividad oxidasa verdadera** regulada enzimáticamente.
3. La parte responsable del efecto regulador es el componente protéico de la BSA.
4. Otras proteínas probadas tales como insulina y sustancias de características peptídicas como el glutatión oxidado son capaces de reproducir el efecto regulador de la BSA sobre la actividad de oxidación aeróbica de la peroxidasa.
5. El papel adscrito a estas sustancias sería el de **pseudosustrato**, que constituyendo un **complejo enzima-pseudosustrato** condicionaria cambios conformacionales que serian la base molecular del efecto regulador.
6. Los cambios espectrales detectados sugieren que el complejo enzima-pseudosustrato se lleva a cabo en el centro activo del enzima, con formación de un hidropéroxido intermediario que posteriormente se descompone a  $H_2O_2$ .
7. Los D-L-aminoácidos aislados son capaces también de ejercer un efecto



regulador parcial sobre la actividad del enzima. Este efecto regulador estaría condicionado por las características de la cadena lateral (R) de cada aminoácido, siendo probablemente la estructura de su carbono  $\alpha$  la que es reconocida por el enzima a nivel de su centro activo.

8. Se ha podido comprobar que existe un fenómeno competitivo entre los pseudosustratos protéicos y los aminoácidos en la ocupación en el centro activo de la enzima. Este hecho sugeriría en principio que las estructuras implicadas en el efecto regulador serían estructuras de carbono  $\alpha$  de la BSA.



TESIS DOCTORAL

---

BIBLIOGRAFIA

---

1. Andreassen, A. & Stier, T.J.B. (1953). *J. Cell. comp. Physiol.* **41**, 23.
2. Akazawa, T. & Conn, E.E. (1958). *J. Biol. Chem.* **232**, 403.
3. Ballou, D.P. (1982). En «*Flavins and flavoproteins*», p. 301. (Massey, V., Williams, C.H. eds.). Elsevier North Holland, Amsterdam.
4. Barker, R.F. & Hopkinson, D.A. (1977). *Ann. Hum. Genet.* **41**, 27.
5. Bender, A.E. & Krebs, H.A. (1950). *Biochem. J.* **46**, 210.
6. Bermeyer, H.U. (1955). *Biochem. Zeitschr.* **327**, 255.
7. Bergström, S. (1967). *Science* **158**, 382.
8. Bernhardt, H.F., Erdin, N.; Staudinger, H.J. & Ullrich, V. (1973). *Eur. J. Biochem.* **35**, 126.
9. Bloch, K.; Borek, E. & Rittenberg, D. (1946). *J. Biol. Chem.* **162**, 441.
10. Böck, P.; Kramer, R. & Pavelka, M. (1980). «*Peroxisomes and Related Particles in Animal Tissues*», Springer Verlag, New York.
11. Brown, A.J. (1902). *Trans. Chem. Soc. (Lond.)* **81**, 373.
12. Brunori, M.; Rotilio, G.C.; Antonini, E.; Curti, B.; Branzoli, V. & Massey, V. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 3140.
13. Buhler, D.R. & Mason, H.S. (1961). *Arch. Biochem. Biophys.* **92**, 424.
14. Burton, K. (1972). *Methods in Enzymol.* **2**, 199.
15. Caughey, W.S., Wallace, W.S., Volpe, J.A. & Yoshikawa, S. (1975). En: «*The Enzymes*», 3<sup>a</sup> ed. (Boyer, P.D. ed). Voi. XIII, p. 299. Academic Press, New York.
16. Cecil, R. & Ogston, A.G. (1951). *Biochem. J.* **49**, 105.
17. Clark, L.C. (1956). *Trans. Am. Soc. Artificial Internal Organs* **2**, 41.
18. Cohn, E.J.; Hughes, W.L. & Weare, J.H. (1947). *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1753.
11. Conney, A.H. (1967). *Pharmacol. Rev.* **19**, 317.
12. Cooper, J.A. & Hunter, T. (1983). *Top. Microbiol. Immunol.* **107**, 125.
13. Chance, B. (1949). *Arch. Biochem.* **21**, 416.
14. Chance, B. (1952). *Arch. Biochem. Biophys.* **41**, 404.
15. Chance, B., Kumar, C., Powers, L. & Ching, Y.C. (1983). *Biophys. J.* **44**, 353.
16. Chen, R.F. (1966). *J. Biol. Chem.* **242**, 173
17. Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1974). *Biochemistry* **13**, 211.



18. Deng, H. (1969). *Biochem. Biophys. Acta* **180**, 271.
19. De Kock, R.L.; Gray, H.B. (1980). *Chemical Structure and Bonding*, pp. 232-244, Menlo Park, Benjamin, California.
20. Dickerson, R.E. & Geis, J. (1969). *The structure and Action of Proteins*, Harper & Row, New York.
21. Dimmey, L.J. & Gordy, W. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 343.
22. Dixon, M. & Kleppe, K. (1965). *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 368.
23. Dixon, M. & Webb, E.C. (1971). *Enzymes*, p. 318. Longman, London.
24. Durham, J.J., Morgan, P.W., Prescott, J.M. & Lyman, C.M. (1973). *Phytochemistry* **12**, 2123.
25. Edlbacher, S. & Wiss, O. (1944). *Helv. Chim. Acta* **27**, 1831.
26. Estabrook, R.W. & Mackler, B. (1957). *J. Biol. Chem.* **229**, 1091.
27. Estabrook, R.W. (1967). En «*Methods in Enzymology*». Vol. X, p. 41. (Estabrook, R.W. & Pullman eds.) Academic Press, New York.
28. Fisher, E. (1894). *Berichte* **27**, 2985.
29. Fitzpatrick, P.F. & Massey, V. (1982 a). *J. Biol. Chem.* **257**, 1166.
30. Fitzpatrick, P.F. & Massey, V. (1982 b). *J. Biol. Chem.* **258**, 9700.
31. Fonda, K. & Anderson, J.W. (1968). *J. Biol. Chem.* **243**, 5635.
32. Fruton, J.S. (1972). *Molecules and Life*, pp. 262-396. Wiley-Intersci., New York.
33. George, P. (1953a). *Biochem. J.* **54**, 267.
34. George, P. (1953b). *Biochem. J.* **55**, 220.
35. Gillette, J.R.; Brodie, B.B. & Ladu, B.N. (1957). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **119**, 532.
36. Gillette, J.R. (1966). *Advan. Pharmacol.* **4**, 219.
37. Goodman, D.S.; Huang, H.S.; Kanai, M. & Shiratori, T. (1967). *J. Biol. Chem.* **242**, 3543.
38. Grahame-Smith, D.G. (1965). *Biochem. J.* **105**, 351.
39. Gunsalus, J.C., Pederson, T.C., Sligar, S.G. (1975). *Ann. Rev. Biochem.* **44**, 377.
40. Hamilton, G.A. (1985). *Adv. Enzymol.* **57**, 85.
41. Hamilton, G.A., Buckthal, D.L.J., Mortensen, R.M. & Zerbi, K.W. (1979). *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 2625.
42. *Handbook of Chemistry & Physics* (1952). 33 ed., p. 1.481. Chemical Rubber Publ. Co., Cleveland, Ohio.
43. Harbury, H.A. (1957). *J. Biol. Chem.* **225**, 1009.
44. Hayaishi, O. (1962). En «*Oxygenases*», p. 1. (Hayaishi, O. ed.), Academic Press, New York.
45. Hayaishi, O. (1964). «*Proceedings of the Planetary Sessions*», *Int. Congr. Biochem. Abstr.* **6th** **33**, 31.
46. Hayaishi, O. (1969). *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 21.
47. Hayaishi, O.; Katagiri, S. & Rothberg, S. (1955). *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 5450.
48. Hayaishi, O.; Roghberg, S. & Melher, A.H. (1956). *Abstr. 130th. Meeting Amer. Chem. Soc.*, p. 53C.

49. Hayaishi, O. & Nozaki, M. (1969). *Science* **164**, 389.
50. Hayano, M. (1962). En «*Oxygenases*», p. 181. (Hayaishi, O. ed.) Academic Press, New York.
51. Henry, V. (1902). *Acad. Sci. (Paris)* **135**, 916.
52. Hildebrandt, A.G. & Estabrook, R.W. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **143**, 66.
53. Hildebrandt, A.G. & Roots, J. (1975). *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 385.
54. Hruban, Z. & Recheigl, M. (1969). «*Microbodies and Related Particles*». Academic Press, New York.
55. Hunter, T.; Gould, K.L.; Cooper, J.A. (1984). *Biochem. Soc. Trans.* **12**, 757.
56. Hutton, J.J. Jr.; Tappel, A.L.; Udenfriend, S. (1967). *Arch. Biochem. Biophys.* **118**, 231.
57. Jensen, P.K. & Jacobsen, N.O. (1984). *Arch. Dermatol. Res.* **276**, 57.
58. Kakimoto, Y., Taniguchi, K. & Sano, J. (1969). *J. Biol. Chem.* **244**, 335.
59. Kaufman, S. (1966). En «*Biological and Chemical Aspects of Oxygenases*», p. 61 (Bloch, K. y Hayaishi, O. eds.) Mazuren, Japan.
60. Keevil, T; Mason, H.S. (1978). *Methods Enzymol.* **52**, 3.
61. Keilin, D. & Mann, T. (1931). *Proc. Roy. Soc. (London)* **B 122**, 119.
62. Keilin, D. (1966). *The History of Cell Respiration and Cytochrome*. Cambridge Univ. Press., London.
63. Kendall, F.E. (1941). *J. Biol. Chem.* **138**, 97.
64. Kenten, R.H. (1955). *Biochem. J.* **59**, 110.
65. Kendrew, J.C. (1961). *Sci. Am.* **205**, 96.
66. Kivirikko, K.I. & Prockop, D.J. (1967). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **57**, 782.
67. Klapper, M.H. & Hackett, T.D.P. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, 3736.
68. Klebanoff, S.J. (1959). *J. Biol. Chem.* **234**, 2480.
69. Knoop, F. (1910). *Hoppe-Seylers. Physiol. Chem.* **67**, 489.
70. Koshland, D.E. (1963). *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* **28**, 473.
71. Krebs, H.A. (1935). *Biochem. J.* **29**, 1620.
72. Krebs, H.A. (1948). *Biochem. Soc. Symp.* nº 1, Cambridge University Press, Cambridge:
73. Kuthan, H. & Ullrich, V. (1982). *Eur. J. Biochem.* **126**, 583.
74. Lamprecht, W. & Heinz, F. (1984). En «*Methods of Enzymatic Analysis*». Vol VI, p. 570. (Bermeyer, H.U. ed) Verlag Chemie, Weinheim, (Bermeyer, H.U. ed.), Florida, Basil.
75. Lemberg, R. & Foulkes, E.C. (1949). *Nature (London)* **161**, 131.
76. Lowry, O.H.; Rosebrough, A.L.; Farr, A.L. & Randall, J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 264.
77. Maehly, A.C. (1952). *Biochim Biophys. Acta* **8**, 1.
78. Maehly, A.C. (1972). En «*Methods in Enzymology*». Vol. II, p. 810. (Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. eds.) Academic Press, New York.
79. Malström, B.G. (1982). *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 21.
80. Mason, H.S.; Fowlks, W.L. & Peterson, E. (1955). *J. Amer. Chem. Soc.*



- 77, 2914.
81. Mason, H. (1965). *Ann. Rev. Biochem.* **34**, 595.
  81. Massey, V. & Gibson, Q.H. (1964). *Fed. Proc.* **23**, 18.
  82. Massey, V. & Hemmerich, P. (1975). En: «*The Enzymes*», 3<sup>a</sup> ed. (Boyer, P. D. ed.). vol. XII, p. 191. Academic Press, New York.
  83. Massey, V. & Ghisla, S. (1983). *Colloquium - Mosbach. Biological oxidations*, p. 114. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
  84. Meister, A., Wellner, D. & Scott, S.J. (1960). *J. Natn. Cancer Inst.* **24**, 31.
  85. Meister, A. & Anderson, M.E. (1983). *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 711.
  86. Mochizuki, Y.; Itabashi, M. & Haga, H. (1976). *Tumor Res.* **11**, 38.
  87. Nakamura, S.; Ichiyama, A. & Hayaishi, O. (1965). *Fed. Proc.* **24**, 604.
  88. Nakamura, S.; Yokota, K. & Yamazaki, I. (1969). *Nature* **222**, 794.
  89. Narasimhulu, S. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 384.
  90. Neims, A.H. & Helierman, L. (1970). *Ann. Rev. Biochem.* **39**, 867.
  91. Neubauer, O. (1909). *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **95**, 211.
  92. Nishizuka, Y. & Hayaishi, O. (1963). *J. Biol. Chem.* **238**, PC 483.
  93. Nordblom G.D. & Coon, M.J. (1977). *Arch. Biochem. Biophys.* **180**, 343.
  94. Okamoto, H.; Yamamoto, S.; Nozaki, M.; Hayaishi, O. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 309.
  95. Olsen, L.F. (1978). *Biochem. Biophys. Acta* **527**, 212.
  96. Olson, J.A. & Hayaishi, O. (1965). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 1364.
  97. Orii, Y. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 9246.
  98. Owens, C.W.I. & Belcher, R.V. (1965) *Biochem. J.* **94**, 705.
  99. Ozawa, T., Fukuda, M. & Sasaoka, K. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 998.
  100. Peterson, J.A. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **144**, 678.
  101. Porter, D.J., Voet, J. & Bright, J.J. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**, 1951.
  102. Porter, D.J. & Bright, H.J. (1975). En: «*The Enzymes*», 3<sup>a</sup> ed. (Boyer, P.D. ed.). Vol. XII, p. 421. Academic Press, New York.
  103. Porter, D.J.; Voet, J.G. & Bright, H. (1977). *J. Biol. Chem.* **251**, 4464.
  104. Pütter, J. & Becker, R. (1984). En «*Methods of Enzymatic Analysis*». Vol. III, p. 287. (Bergemeyer, H.U. ed.) Verlag Chemie, Weinheim, Florida, Basel.
  105. Racker, E. (1976). En «*A New look at Mechanisms in Bioenergetics*», p. 1. Academic Press, New York.
  106. Reisler, E. & Eisenberg, H. (1969). *Biochemistry* **8**, 473.
  107. Ricard, J. & Nari, J. (1967). *Biochem. Biophys. Acta.* **132**, 321.
  108. Richter, C.; Azzi, A.; Weser, U. & Wendel, A. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 5061.
  109. Riddle, V.M. & Mazelis, M. (1964). *Nature* **202**, 391.
  110. Robinson, J.M., Briggs, R.T. & Karnousky, M.J. (1978). *J. Cell. Biol.* **77**, 59.
  111. Ronchi, S.; Minchiotti, L.; Galliano, M.; Curti, B.; Swenson, R.P.; Williams, C.H. & Massey, V. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 8824.



112. Rosenfeld, M.G. & Leiter, E.H. (1977). *Can. J. Biochem.* **55**, 66.
113. Rudie, N.G.; Porter, D.J.T. & Bright, H.J. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 498.
114. Sawada, Y. & Yamazaki, I. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* **327**, 257.
115. Sekura, R., Van der Werf, P. & Meister, A. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 11.
116. Schenkman, J.B.; Remmer, H. & Estabrook, R.W. (1967). *Mol. Pharmacol.* **3**, 113.
117. Segel, I.H. (1975). *Enzyme Kinetics*. p. 9. Wiley - Interscience, New York, Sidney, Toronto.
118. Shiga, K. & Shiga, T. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **145**, 701.
119. Sligar, S.G.; Lipscomb, J.D.; Debrunner, P.G. & Gunsalus, I.C. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 290.
120. Staudt, H.; Lichtenberger, F. & Ullrich, V. (1974). *Eur. J. biochem.* **46**, 99.
121. Sun, A.S. & Cederbaum, A.J. (1980). *Cancer Res.* **40**, 4677.
122. Swank, R.T., Davey, R., Joyce, L., Reid, P. & Macey, H.R. (1977). *Endocrinology* **100**, 473.
123. Swedin, B. & Theorell, H. (1940). *Nature* **145**, 71.
124. Swenson, R.P.; Williams, C.H. & Massey, V. (1981). *J. Biol. Chem.* **257**, 1937.
125. Swenson, R.P.; Williams, C.H.; Massey, V.; Ronchi, S.; Minchiotti, L.; Galliano, M. & Curti, B. (1982). *J. Biol. Chem.* **257**, 8817.
126. Swenson, R.P.; Williams, C.H. & Massey, V. (1982). *J. Biol. Chem.* **258**, 497.
127. Theorell, H. (1942). *Enzymologia* **10**, 250.
128. Theorell, H. & Akeson, A. (1943). *Arkiv. Kemi. Mineral. Geol.* **17B**, nº 7.
129. Theorell, H. & Maehly, A.C. (1950). *Acta Chem. Scand.* **4**, 422.
130. Thurman, R.G.; Ley, H.G. & Scholz, R. (1972). *Eur. J. Biochem.* **25**, 420.
131. Troll, W. & Wiesner, R. (1985). *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **25**, 509.
132. Tyson, C.A.; Lipscomb, J.D. & Gunsalus, I.C. (1972). *J. Biol. Chem.* **247**, 5777.
133. Ullrich, V. & Diehl, H. (1971) *Eur. J. Biochem.* **20**, 509.
134. Ullrich, V. (1979). En «*Topics in Current Chemistry*». Vol 83, p. 99. Springer Verlag, Berlin, New York.
135. Udenfriend, S. (1966). *Harvey lect.* **60**, 57.
136. Walsh, C.T., Schonbrunn, Abeles R.H. (1971). *J. Biol. Chem.* **246**, 6855.
137. Walsh, C.T., Krodol, E., Massey, V. & Abeles, R.H. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 1940.
138. Walsh, C.T. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 881.
139. Warburg, O. (1966). En «*Current Aspects of Biochemical Energetics*», pp. 103. (Kaplan, N.O. y Kennedy, E.P. eds.) Academic Press, New York.
140. Wellner, D. & Scannone, H. (1964). *Biochemistry* **3**, 1746.



141. White-Stevens, R.H. & Kamin, H. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 882.
142. White, R.E. & Coon, M.J. (1980). *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 315.
143. Yagi, K., Ozawa, T. & Naos, M. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 31.
144. Yagi, K. (1971). *Adv. Enzymol.* **34**, 41.
145. Yamazaki, I. & Fujinaga, K.; Takehara, I & Takahashi, H. (1956) *J. Biochem. (Tokio)* **43**, 377.
146. Yamazaki, I.; Yokota, K. & Nakajima, R. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 582.
147. Yamazaki, I. & Yokota, K.N. (1967). *Biochim. Biophys. Acta* **132**, 310.
148. Yokota, K. & Yamazaki, I. (1965) *Biochim. Biophys. Acta.* **105**, 301.
149. Young, J.L. & Yamamoto, M. (1972). *Anal. Biochem.* **49**, 118.