

FACULTAD DE CIENCIAS

Tesis Doctoral

Manganeso Superóxido Dismutasa  
de una Planta Superior  
(*Pisum Sativum* L.)

Purificación y Caracterización de una  
nueva Mn- Enzima

Francisca Sevilla Valenzuela

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980





UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

DON ENRIQUE F. HITA VILLAVERDE PROFESOR ADJUNTO NUMERARIO Y SECRETARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

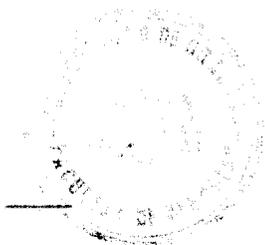
Núm. 304

C E R T I F I C O: Que la presente Tesis Doctoral corresponde a la presentada en esta Facultad por D<sup>ña</sup> Francisca Sevilla Valenzuela que fue calificada con Sobresaliente "cum laude" el día 12 de Diciembre de 1.980 por el Tribunal correspondiente, y que fue aprobado en Junta de Facultad celebrada el día 24 de Noviembre de 1.980, siendo el título de la tesis: "Manganeso Superóxido Dismutasa de una planta superior (*Pisum Sativum* L) Purificación y Caracterización de una nueva Mn-Enzima".

Y para que conste expido la presente certificación con el V<sup>o</sup>.B<sup>o</sup>. del Ilmo. Sr. Decano en Granada a quince de Octubre de mil novecientos ochenta y uno.

V<sup>o</sup>.B<sup>o</sup>.  
EL DECANO,

Enrique F. Hita Villaverde  
Secretario



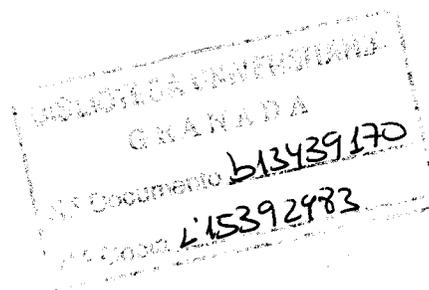
R.55.7A0

P.

FACULTAD DE CIENCIAS

MANGANESO SUPEROXIDO DISMUTASA DE UNA PLANTA SUPERIOR (*Pisum sativum* L.):  
PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA NUEVA Mn-ENZIMA

Francisca Sevilla Valenzuela



UNIVERSIDAD DE GRANADA

1980

*Tesis Doctoral dirigida por el Dr. D. Luis Alfonso del Río Legazpi, Colaborador Científico del C.S.I.C., en la Estación Experimental del Zaidín. Fue leída el 12 de Diciembre de 1980 ante el Tribunal formado por los profesores: Mayor Zaragoza, Madrid; García Olmedo, Madrid; Sánchez de Medina Contreras, Granada; García Peregriñ, Granada; López-Gorgé, Granada.*

*Obtuvo la calificación de Sobresaliente "cum laude".*

MANGANESO SUPEROXIDO DISMUTASA DE UNA PLANTA SUPE  
RIOR (*Pisum sativum* L.): PURIFICACION Y CARACTE-  
RIZACION DE UNA NUEVA Mn-ENZIMA.

Memoria que presenta la licencia-  
da en Ciencias Biológicas Dña.  
Francisca Sevilla Valenzuela para  
aspirar al grado de Doctor.

Fdo.: Francisca Sevilla Valenzuela

Vº Bº

EL DIRECTOR DEL TRABAJO,

Fdo.: Luís Alfonso del Río Legazpi  
Doctor en Ciencias Químicas  
Colaborador Científico del C.S.I.C.

La presente Memoria ha sido realizada en la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín, (C.S.I.C.) gracias a una Beca del P.F.P.I. de la Universidad de Granada (1977-1980) y a una ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados a la XVII Reunión - de la Sociedad Española de Bioquímica (Madrid, 1978), al "International Symposium on Superoxide and Superoxide Dismutase" (Malta, 1979), y al I Congreso Luso-Español de Bioquímica (Coimbra, 1980).

A mis padres

A Miguel y Paloma

En primer lugar, me complace citar mi más sincero y especial agradecimiento al Director de esta Tesis toctoral, el Dr. Luis A. del Río Legazpi, Doctor en Ciencias Químicas y Colaborador Científico del C.S.I.C., - con quien he tenido la suerte de poder trabajar y cuya formación científica así como el interés y ayuda prestados en todo momento, han constituido para mí un continuado estímulo, influyendo de manera notable en mi formación.

Temo expresar también lo agradable y formativa que ha supuesto la convivencia durante todo este tiempo con mis compañeros de la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal. Mi agradecimiento por la gran amistad que me han demostrado.

Quiero dejar constancia del importante papel que ha desarrollado en la elaboración de esta Tesis, mi compañera de laboratorio Matilde Garrido, su sincera amistad, capacitación profesional y continuos consejos han significado para mí una ayuda insustituible.

Quiero expresar mi agradecimiento a Manuel Martínez que ha dibujado las gráficas y figuras de esta Memoria, a Juan Rodríguez que ha realizado la labor fotográfica, a Mercedes Gómez-Moreno que la ha mecanografiado con esmero y a Torotea Rubí, por las facilidades prestadas.

Mi reconocimiento a los Dres. Manuel Gómez Ortega de la Unidad Estructural de Fisiología Vegetal y a Juan Yañez Fernández de la Unidad Estructural de Química Analítica. También quiero citar a los Dres. Victor Fernández y J. Soria Fuiz del Instituto de Catálisis del CSIC.

Durante los cursos 1977-80 me fué concedida una beca del P.F.P.I. por medio del Ipto. Interfacultativo de Fisiología Vegetal de la Universidad de Granada, a cuyo Catedrático le estoy agradecida.

Finalmente, mi reconocimiento y gratitud al Dr. Julio López Gorgé, Jefe de la Unidad Estructural de Bioquímica Vegetal por la favorable acogida dispensada.

Granada, 1980

INDICE

	<u>Pag.</u>
I. <u>INTRODUCCION</u> .....	1
LA MOLECULA DE OXIGENO: CONFIGURACION ELECTRONICA Y FORMAS EXCITADAS .....	4
REDUCCION DEL OXIGENO.....	8
FUENTES QUIMICAS Y BIOLOGICAS DE SUPEROXIDO .....	10
CITOTOXICIDAD DEL SUPEROXIDO Y DE RADICALES SECUNDARIOS.	12
LAS SUPEROXIDO DISMUTASAS .....	18
MECANISMO DE LA ACCION ENZIMATICA .....	20
METODOS DE ENSAYO DE LA ACTIVIDAD SUPEROXIDO DISMUTASA .	23
Ensayos directos .....	23
Ensayos indirectos .....	26
Generadores enzimáticos de $O_2^{\cdot-}$ .....	29
Generadores fotoquímicos de $O_2^{\cdot-}$ .....	30
Generadores químicos de $O_2^{\cdot-}$ .....	31
CUPROCINC SUPEROXIDO DISMUTASAS .....	34
MANGANESO SUPEROXIDO DISMUTASAS .....	41
FERRO SUPEROXIDO DISMUTASAS .....	48
IMPORTANCIA BIOLOGICA DE LAS SUPEROXIDO DISMUTASAS .....	54
Aspectos médicos de la superóxido dismutasa .....	59
Producción de superóxido en mitocondrias .....	62
Superóxido y superóxido dismutasas en organismos fotosintéticos .....	68
II. <u>OBJETO Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO</u> .....	78
III. <u>MATERIAL Y METODOS</u> .....	82
MATERIAL VEGETAL .....	83
Condiciones de cultivo .....	83

	<u>Pag.</u>
1. Germinación y crecimiento de la planta .....	83
2. Cultivo en invernadero .....	83
PREPARACION DE EXTRACTOS CRUDOS DE HOJAS .....	85
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD SUPEROXIDO DISMUTASA .....	86
Métodos basados en la generación enzimática de radicales superóxido .....	86
1. Detección de $O_2^{\cdot-}$ con azul de nitrotetrazolio .	86
2. Detección de $O_2^{\cdot-}$ con citocromo c .....	91
Método basado en la generación fotoquímica de radicales superóxido .....	95
Expresión de la actividad enzimática .....	97
SEPARACION Y DETERMINACION DE ACTIVIDADES ISOENZIMATICAS EN LOS EXTRACTOS CRUDOS .....	99
Electroforésis analítica en geles de poliacrilamida.	99
Revelado enzimático "in situ" .....	100
DETERMINACION DE PROTEINAS .....	103
Método de Lowry .....	104
Método de Potty .....	106
PURIFICACION DE LA ENZIMA .....	107
1. Fraccionamiento térmico .....	109
2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico ...	110
3. Adsorción sobre DEAE-celulosa .....	111
4. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa .....	112
5. Cromatografía en columna de Sephadex G-100 .....	114
6. Electroforésis preparativa en gel de poliacrilamida .....	115
CONTROL DE PUREZA .....	119
CARACTERISTICAS QUIMICO-FISICAS .....	122
Espectros de absorción visible-UV .....	122

	<u>Pag.</u>
Peso molecular .....	123
1. Filtración por gel de Sephadex G-100 .....	123
2. Electroforésis analítica en poliacrilamida a distintas concentraciones de gel .....	125
Punto isoeléctrico .....	128
Composición en aminoácidos.....	131
1. Hidrólisis ácida .....	132
2. Oxidación perfórmica .....	132
3. Hidrólisis en presencia de ácido tioglicólico .....	133
4. Análisis cromatográfico de aminoácidos .....	134
5. Cálculo del peso molecular atendiendo a la composición en aminoácidos .....	138
Contenido metálico .....	144
Ensayos de reconstitución del contenido en Mn de la enzima .....	147
Espectros de Resonancia de Spin Electrónico (RES)..	150
ESTRUCTURA CUATERNARIA .....	151
Electroforésis analítica en geles de poliacrilamida con SDS.....	151
1. Incubación con SDS y urea, en presencia y au- sencia de -mercaptoetanol .....	151
2. Determinación del peso molecular de las sub- unidades .....	152
ESTABILIDAD DE LA ENZIMA.....	156
1. Estabilidad térmica .....	156
2. Estabilidad frente al pH .....	157
CONDICIONES OPTIMAS DE pH Y TEMPERATURA PARA LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	159

	<u>Pag.</u>
1. pH .....	159
2. Temperatura .....	162
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA: CONSTANTE DE VELOCIDAD APARENTE .....	162
EFECTO DE INHIBIDORES ENZIMATICOS .....	165
1. Preparados homogéneos de Mn-superóxido dismutasa	165
2. Extractos crudos .....	172
 IV. <u>RESULTADOS</u> .....	 174
DISMUTASAS PRESENTES EN HOJAS DE GUISANTE .....	175
PURIFICACION DE LA ENZIMA .....	176
CARACTERISTICAS QUIMICO-FISICAS .....	183
Espectros de absorción visible-UV. Coeficiente de absorción molar.....	183
Punto isoeléctrico .....	186
Peso molecular .....	187
Composición en aminoácidos .....	194
Estequiometría Mn-proteína .....	201
Ensayos de reconstitución del contenido en Mn de la enzima .....	202
Espectro de Resonancia de Spin Electrónico (RES)...	203
ESTRUCTURA CUATERNARIA .....	205
ESTABILIDAD DE LA ENZIMA .....	209
CONDICIONES OPTIMAS DE pH Y TEMPERATURA PARA LA ACTIVIDAD ENZIMATICA .....	216
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA .....	219
EFECTOS DE INHIBIDORES ENZIMATICOS .....	224

	<u>Pág.</u>
V. <u>DISCUSION</u> .....	233
VI. <u>CONCLUSIONES</u> .....	282
VII. <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	286

INTRODUCCION

*Since the discovery of the enzymatic activity superoxide dismutase, the intellectual and creative explosion which has followed with respect to the metabolism and molecular biology of oxygen can only be compared with that occurring as a result of a well known publication in 1953 by Watson and Crick on the double helical structure of DNA. It can be confidently stated that studies of superoxide radical anions and superoxide dismutase indeed constitute a frontier in biology, biochemistry, and biophysics.*

A.M. Michelson

Aunque el oxígeno molecular fué introducido en la atmósfera de la tierra por organismos fotosintéticos primitivos mucho antes de la aparición del hombre, éste no descubrió científicamente que esta sustancia era tan vital para su propia existencia hasta hace unos dos---cientos años. El descubrimiento fue debido a Joseph Priestley en 1774, cuando enfocando los rayos del sol sobre óxido mercúrico, recogió el oxígeno puro o "aire deflogisticado" que se desprendía. Con una gran capacidad previsor, Priestley especuló no solamente con las posibles aplicaciones médicas del oxígeno puro, sino también con su probable toxicidad biológica (Priestley, 1775).

En realidad, todos los organismos que poseen respiración se ven afectados por la situación paradójica de que el oxígeno, fuente de su existencia, también es una sustancia tóxica en cuya presencia solamente pueden sobrevivir en virtud de un elaborado sistema de defensas. Su margen de seguridad es limitado, de tal manera, que los organismos respiratorios mueren por exposición a una presión parcial de oxígeno de cinco a diez veces la normal (Crapo y Tierney, 1974; McCord, 1979). Por el contrario, los anaerobios obligados, no poseen las defensas que posibilitan la vida aerobia y mueren simplemente por exposición al aire.

La atmósfera prebiótica de nuestro planeta, no es probable que haya contenido cantidades significativas de oxígeno molecular y, por lo tanto, el origen, proliferación y desarrollo inicial de la vida debe haber ocurrido en condiciones esencialmente anaerobias. Esta situación cambió drásticamente con la aparición de las algas verde-azuladas. Estos organismos fotosintéticos son capaces de utilizar agua como fuente de poder reductor y liberar oxígeno libre al medio ambiente. Este caso primitivo de "polución" atmosférica alteró la senda y dirección subsiguiente de la evolución.

El oxígeno fotosintético que entonces se acumuló en el aire y en las aguas de la tierra, presentaba a la vez una oportunidad y un desafío a todas las formas de vida existentes. La oportunidad era explotar las reactividades de este gas para producir energía y para reacciones biosintéticas; el desafío residía en el desarrollo de defensas frente a su toxicidad. El éxito con que se coronó esta situación es evidenciado por la enorme diversidad de criaturas aerobias facultativas presentes ahora en la biosfera, y por la variedad de reacciones metabólicas en que el oxígeno es utilizado.

## LA MOLECULA DE OXIGENO: CONFIGURACION ELECTRONICA Y FORMAS EXCITADAS

La explicación de la paradójica toxicidad del oxígeno para los organismos aerobios reside en las propiedades singulares de esta molécula que la hace tan adecuada como aceptor electrónico terminal en los esquemas metabólicos de casi todas las formas de vida existentes en este planeta. En primer lugar, el oxígeno molecular es termodinámicamente un agente oxidante extremadamente bueno. Acepta electrones de compuestos orgánicos reducidos, con liberación de una gran cantidad de energía. Sin embargo, una segunda característica compensativa de la primera es la reluctancia cinética del oxígeno a aceptar electrones. Esta barrera cinética se puede comprender si se considera la configuración de orbitales moleculares de la molécula de oxígeno.

En esta molécula solamente está compartido un par de electrones, existiendo dos electrones desapareados ( $^{\bullet}O-O^{\bullet}$ ) con lo que la propia molécula es un biradical (Halliwell, 1974). Los dos electrones desapareados como se indica en la Figura 1 ocupan diferentes orbitales moleculares  $\pi^*$  (antienlazantes), pero tienen el mismo número cuántico de spin. Esta forma de  $O_2$  se dice que está en estado *triple* y es el estado de mínima energía ó estado fundamental. Para que la molécula incorpore electrones adicionales con spines apareados de, por ejemplo, una molécula de azúcar, uno de los electrones solitarios debe experimentar una inversión de spin antes de aparearse. A temperaturas ordinarias ésto ocurre mucho más lentamente que la frecuencia colisional de las moléculas, y de aquí que, en ausencia de catálisis, deba suministrarse una alta energía de activación para que las oxidaciones puedan proceder espontáneamente.

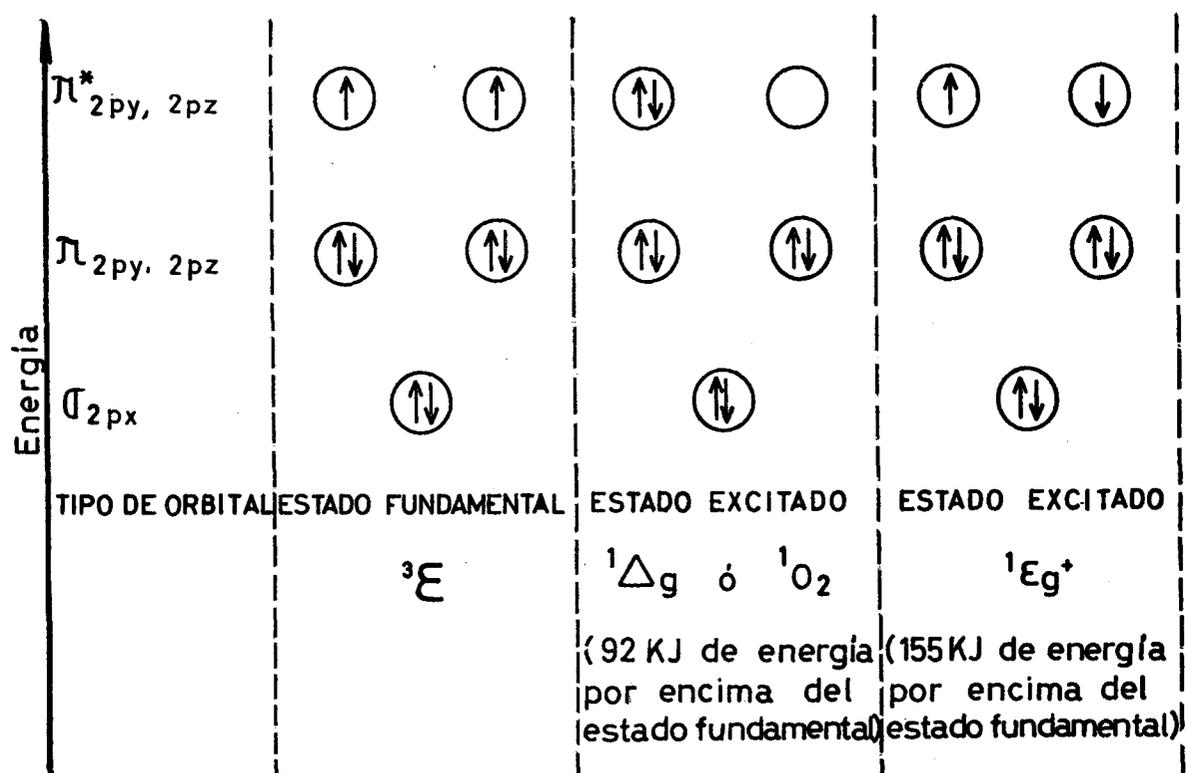


Figura 1. Esquema de orbitales moleculares del oxígeno (Halliwell, 1974).

Se conocen otros dos estados de la molécula de  $O_2$ , de alta energía ó estados excitados, en los cuales los dos electrones tienen spins opuestos. En el primer estado excitado, los dos electrones ocupan un mismo orbital en el que el momento angular es el mismo; se le deno

mina estado  $^1\Delta_g$  ó  $^1O_2$  y como estos dos electrones tienen spines -- opuestos, se dice que la molécula está en un estado *singlete*. El segundo estado excitado,  $^1\Sigma_g^+$ , tiene una vida media de solo  $1 \times 10^{-11}$  seg y decae rápidamente al estado  $^1\Delta_g$ , no existiendo evidencias de que - este segundo estado se forme en los sistemas biológicos (Krinsky, 1977).

El oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) es una especie altamente reactiva y manifiestamente tóxica para los organismos vivos (Trozzolo, 1970) y también es quizás la especie de oxígeno más difícil de estudiar en - sistemas biológicos. Aunque por el momento no existen pruebas rigurosas de su existencia en dichos sistemas (McCord, 1979) diversos autores han postulado la participación del  $^1O_2$  en distintas reacciones - biológicas entre las que destacan la quimioluminiscencia observada en los neutrófilos que intervienen en el mecanismo de la fagocitosis (Ba**bi**or, 1977) y, la formación de peróxidos lipídicos por reacción con ácidos grasos poliinsaturados (Halliwell, 1978a).

El oxígeno singlete se forma en el curso de oxidaciones fotosen**si**bilizadas (Foote, 1976) pero también se han empleado métodos quími**co**s para generar esta especie de oxígeno, y, como ocurre a menudo, es**to**s métodos químicos pueden servir de modelos para reacciones bioquí**mi**cas. De esta forma Krinsky (1977) ha propuesto una serie de siste**ma**s fotoquímicos, químicos y biológicos para la producción de  $^1O_2$ , - que se indican en la Figura 2.

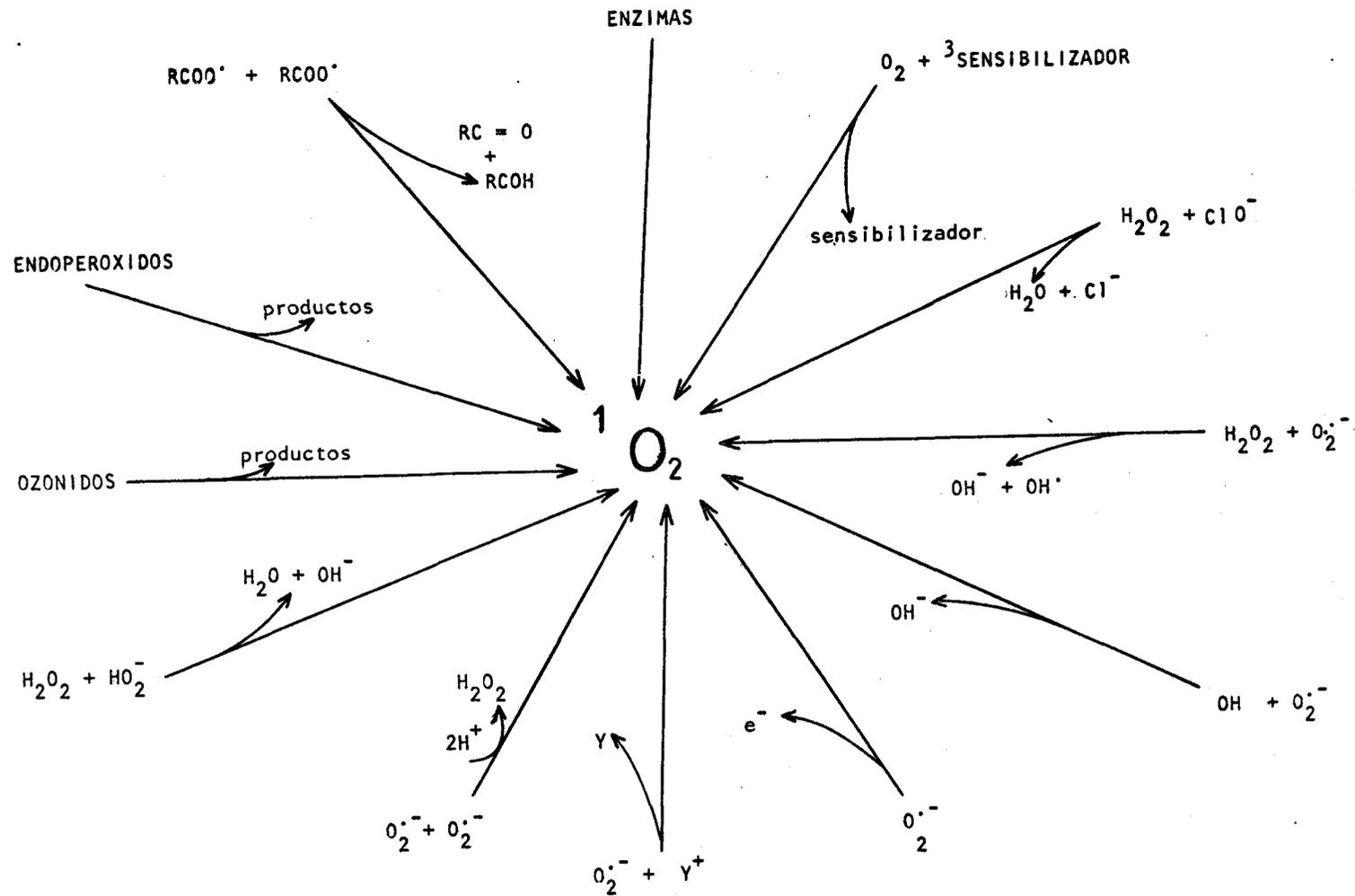
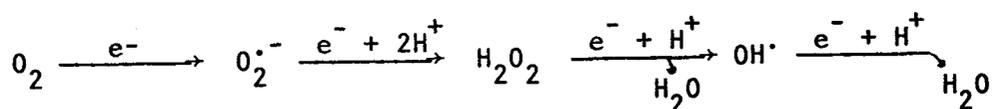


Fig. 2. Producción de  $^1O_2$  por sistemas fotoquímicos, químicos y biológicos.

## REDUCCION DEL OXIGENO

La reducción completa de una molécula de oxígeno a agua, requiere cuatro electrones y, cuando esta reacción tiene lugar por pasos -- univalentes, las distintas etapas del proceso son las siguientes:



Los intermediarios que se producen son el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). De éstos, el más estable y el único que se podría acumular apreciablemente en medios acuosos neutros es el  $H_2O_2$ , mientras que el  $O_2^{\cdot-}$  tiene una vida del orden de milisegundos, y ésta es todavía mucho más corta en el caso del radical  $OH^{\cdot}$  (Czapski, 1971). No es por lo tanto sorprendente que aunque el peróxido de hidrógeno haya sido reconocido desde hace muchos años como uno de los productos de la reducción biológica del oxígeno, y como una posible explicación de su toxicidad (McLeod y Gordon, 1923), en cambio los radicales intermedios sólo hayan recibido una consideración seria hasta hace poco tiempo.

En años recientes se han publicado varias revisiones acerca de las propiedades químicas y físicas del superóxido (Fee y Valentine, 1977; Fee, 1979). Este radical libre aniónico formado por la reducción univalente del  $O_2$  está fuertemente solvatado por moléculas de agua, una interacción que domina toda su reactividad química. Su forma protonada, el radical perhidroxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), es un ácido débil con un  $pK_a$  de 4,8 (Behar y col., 1970). El superóxido puede actuar como reductor, cediendo su electrón extra, o como oxidante, reduciéndose

a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , siendo los valores de los potenciales redox de ambos procesos de  $E_{\text{O}}^1 = -0,16 \text{ V}$  y  $E_{\text{O}}^1 = +0,87 \text{ V}$ , respectivamente (Fee, 1979). - Estas características están incluidas en la reacción de dismutación de estos radicales:



que es la reacción dominante del superóxido en medio acuoso.

Las vías univalentes de reducción del oxígeno son realmente favorecidas frente a otros mecanismos que implican transferencias de pares de electrones (Taube, 1965). La base de esto radica, como se indicó anteriormente, en que el oxígeno en estado fundamental es paramagnético, por ser un biradical, y tiene dos electrones desapareados con spines paralelos. Un par de electrones que entrase, vería obstaculizada su entrada en los orbitales disponibles por una restricción de spin. En consecuencia, un electrón tendría que experimentar una inversión de spin antes que el par entrante pudiera ser aceptado por la molécula de oxígeno, por lo que siempre y cuando sea energéticamente factible, las vías univalentes de reducción del oxígeno no deben ser favorecidas puesto que evitan esta restricción de spin (Taube, 1965).

En años recientes se ha puesto de manifiesto que la reducción univalente del oxígeno es un hecho común tanto en oxidaciones enzimáticas como espontáneas (McCord y col., 1971), y los radicales de oxígeno que anteriormente sólo eran objeto de estudio por los químicos de radiaciones, han pasado a acaparar también la atención de los bioquímicos.

Sin embargo, de lo dicho anteriormente no debe sacarse la conclusión de que el  $O_2^{\cdot-}$  es el producto principal de la reducción biológica del oxígeno. En realidad, algunas enzimas oxidativas han evolucionado de tal modo que son capaces de evitar la restricción de spin y llevar a cabo la reducción divalente e incluso tetravalente del  $O_2$ , sin liberación significativa de intermediarios. Así, la mayor parte del oxígeno consumido por las células aeróbicas es utilizado por la citocromo oxidasa, que reduce el oxígeno a agua sin liberación de  $O_2^{\cdot-}$  ó  $H_2O_2$  (Antonini y col., 1970). Según Fridovich (1978b) durante el metabolismo aeróbico ordinario la producción de  $O_2^{\cdot-}$  debe constituir una vía minoritaria, no superando el 5% de la fracción de oxígeno total reducido.

#### FUENTES QUIMICAS Y BIOLÓGICAS DE SUPEROXIDO

El anión radical libre  $O_2^{\cdot-}$  puede ser producido bien por reducción univalente del oxígeno ó por oxidación univalente del peróxido de hidrógeno. Hay una gran variedad de métodos descritos para la generación de estos radicales *in vitro*, como se indicará más adelante, aunque los más conocidos son quizás aquellos basados en la acción de radiaciones ionizantes de alta energía (como rayos  $\gamma$ , rayos X, y electrones acelerados) sobre soluciones acuosas conteniendo oxígeno (Fridovich, 1976a).

También se conocen algunas reacciones que dan lugar a la producción de cantidades sustanciales de  $O_2^{\cdot-}$ . En el curso de las autooxidaciones de hidroquinonas (Misra y Fridovich, 1972a), leucoflavinas (Misra y Fridovich, 1972a; Ballou y col., 1969), catecolaminas (Misra y Fridovich, 1972b; Cohen y Heikkila, 1974), tioles (Misra, 1974) y tetrahidropterinas (Fisher y Kaufman, 1973), se ha demostrado la generación de radicales  $O_2^{\cdot-}$ . Las ferredoxinas reducidas se oxidan espontáneamente, dando lugar a la producción de superóxido (Misra y

Fridovich, 1971). La hemoglobina y la mioglobina, en sus formas oxigenadas, liberan lentamente  $O_2^{\cdot-}$  cuando son convertidas en methemoglobina y metmioglobina (Misra y Fridovich, 1972c; Gotoh y Shikama, --- 1976). La producción de metmioglobina es lo suficientemente importante para que los eritrocitos contengan una methemoglobina reductasa que lleva a cabo una reversión neta de este proceso (Fridovich, 1978a). Igualmente, se ha verificado la producción de superóxido en la reducción univalente del oxígeno molecular por los iones metálicos  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ó  $Ni^{2+}$ , cuando estos iones están coordinados con ligandos específicos, tales como oligopéptidos sencillos (Michelson, 1977).

Por otra parte, aunque hoy día se sabe que el radical superóxido se produce durante la reducción biológica del oxígeno, todavía no existen evidencias suficientes para poder especificar la reacción responsable predominante en ninguna célula, ni de cuantificar la magnitud de su producción. En el curso de la acción de varias enzimas oxidativas se ha demostrado la producción de superóxido; entre éstas se encuentran la xantina oxidasa (McCord y Fridovich, 1968b; Fridovich, 1970), la aldehído oxidasa (Rajagopalan y col., 1962; Rajagopalan y col., 1964), y la dihidroorótico deshidrogenasa (Aleman y Handler, 1967). En el caso de la xantina oxidasa de la leche, se han estudiado los aspectos cuantitativos de la reducción univalente del oxígeno en función del pH,  $pO_2$  y de la concentración de xantina, encontrándose se que esta enzima lleva a cabo reducciones univalentes y divalentes del oxígeno. El porcentaje del flujo total de electrones a través de esta enzima, que resulta en la reducción univalente del oxígeno, se incrementa por elevación del pH y de la concentración de oxígeno, y por disminución de la concentración de xantina (Fridovich, 1970).

Massey y col. (1969) estudiaron la habilidad para generar  $O_2^{\cdot-}$  de varias flavoprotein hidroxilasas, oxidasas y deshidrogenasas, encontrando que sólo las flavoprotein deshidrogenasas producían  $O_2^{\cdot-}$ .

El radical superóxido también se ha demostrado que es un intermedio en el mecanismo de acción de varias enzimas oxidativas como la galactosa oxidasa (Hamilton y Libby, 1973), la indolamina dioxigenasa (Hirata y col., 1977; Ohnishi y col., 1977) y la 2-nitropropano dioxigenasa (Kido y col., 1976).

Se ha descrito la producción de radicales  $O_2^{\cdot-}$  de orgánulos -- celulares, tales como mitocondrias (Loschen y col., 1974; Boveris, 1977) y cloroplastos (Asada y Kiso, 1973; Epel y Neuman, 1973; Halliwell, 1975). En los leucocitos polimorfonucleares o granulocitos se ha observado la liberación de grandes cantidades de este radical durante la explosión respiratoria que acompaña a la fagocitosis activa (Chesson y col., 1977).

#### CITOTOXICIDAD DEL SUPEROXIDO Y DE RADICALES SECUNDARIOS

Como indicamos anteriormente, el radical superóxido puede actuar indistintamente como agente oxidante o reductor, y por lo tanto puede producir modificaciones en una variedad de moléculas de importancia biológica. A pesar de que la química de las interacciones del  $O_2^{\cdot-}$  con proteínas, lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y otros compuestos celulares necesita ser objeto de una investigación más -- exhaustiva, en los últimos años se han ido acumulando evidencias crecientes para suponer que el radical  $O_2^{\cdot-}$  es un agente importante de la toxicidad del oxígeno, y quizá el factor clave de ésta. Flujos de  $O_2^{\cdot-}$ , generados enzimáticamente, por radiolisis o electroquímicamente, se ha postulado que pueden producir distintos procesos degradativos *in vitro*, como se indica en la Tabla I.

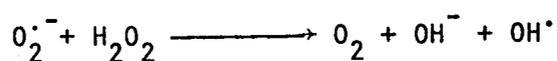
Sin embargo, el estudio detallado de las propiedades físicas y químicas del radical  $O_2^{\cdot-}$  llevado a cabo por distintos investigadores,

TABLA 1. PROCESOS DEGRADATIVOS *in vitro* EN LOS QUE SE HA POSTULADO LA PARTICIPACION DEL SUPEROXIDO

Proceso	Referencias
Degradación/despolimerización del ADN	(Van Hemmen y Meuling, 1975; Cone y col., 1976; Lorentzen y Tso, 1977)
Peroxidación lipídica	(Fee y Teitelbaum, 1972; Lynch y Fridovich, 1978; Kellogg y Fridovich, 1975; Tyler, 1975; Pederson y Aust, 1972; Bus y col., 1974; Tyler, 1975a; Noguchi y Nakano, 1974)
Despolimerización de polisacáridos	(McCord, 1974; Isbell y Frusch, 1977)
Hidroxilación de sustancias aromáticas	(Goscin y Fridovich, 1972a; Halliwell, 1975; Halliwell y Ahluwalia, 1976; Halliwell, 1977; McCord y Day, 1978)
Muerte de células (bacterias y mioblastos)	(Lavelle y col., 1973; Michelson y Buckingham, 1974; Gregory y col., 1973; Dechatelet y col., 1975; Van Hemmen y Meuling, 1977)
Formación de etileno a partir de metional	(Beauchamp y Fridovich, 1970; Weiss y col., 1978)

entre los que destacan el grupo de James A. Fee de la Biophysics Research Division de la Universidad de Michigan, han puesto de manifiesto que el radical superóxido *per se* tiene una reactividad bioquímica bastante más limitada de lo que anteriormente se pensaba y, en consecuencia, no puede llevar a cabo una gran variedad de reacciones con distintas moléculas biológicas.

Se ha demostrado, que en la mayoría de los casos descritos en la Tabla I, los efectos letales del  $O_2^{\cdot-}$  dependen también de la presencia simultánea de  $H_2O_2$ , y de hecho, la adición de catalasa confiere protección a los sistemas biológicos ensayados. Por otra parte, la presencia del  $H_2O_2$  resulta casi obligada, pues como se indicó anteriormente, el propio  $O_2^{\cdot-}$  genera este reactivo por dismutación espontánea. En realidad, hoy día goza de general aceptación la hipótesis de que la verdadera especie tóxica se forma por reacción del  $O_2^{\cdot-}$  con el  $H_2O_2$ , como propusieron Beauchamp y Fridovich en 1970, y que el producto formado es más letal biológicamente que cualquiera de los dos reactivos. Estos últimos autores propusieron al radical hidróxilo ( $OH^{\cdot}$ ) como la especie responsable, la cual se formaría mediante la lisis reductora del  $H_2O_2$  por el  $O_2^{\cdot-}$ , según la reacción:



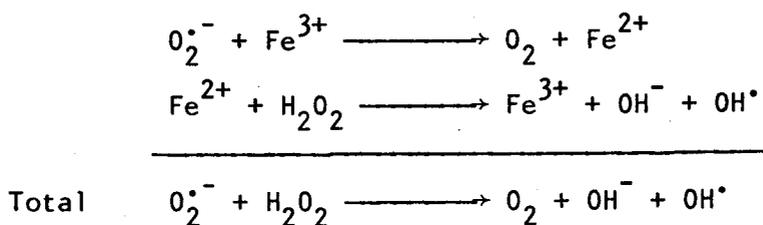
Esta reacción fue propuesta por Haber y Weiss en 1934 pero investigaciones posteriores fueron incapaces de confirmar la viabilidad de la reacción en sistemas químicamente definidos.

En realidad la denominada reacción de Haber-Weiss, después de su resurrección por Beauchamp y Fridovich en 1970, encontró muchos fervientes partidarios porque ofrecía una explicación simple a un auténtico cúmulo de observaciones experimentales, pero también fue

fuertemente contestada por muchos investigadores que consideraban que desde puntos de vista termodinámicos y cinéticos, la reacción no podía tener lugar. Aunque hoy día la polémica todavía continua parece ser que la verdad está en tierra de nadie.

Mediante estudios en condiciones cuidadosamente controladas Halliwell (1976) ha demostrado que la reacción directa, no catalizada, entre el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$ , aunque es factible termodinámicamente, en términos cinéticos es un proceso muy lento. En cambio, Koppenol y Butler (1977) han postulado mediante consideraciones de orbitales moleculares, que la reacción es posible si es catalizada, por  $Fe^{3+}$  y posteriormente McCord y Day (1978) han obtenido la consiguiente verificación experimental.

Así, la reacción puede ahora contemplarse como constituida por dos semi-reacciones, en las que interviene el hierro:



La segunda semi-reacción es análoga a la famosa reacción de Fenton (1894), en la que mediante mezclas de sales ferrosas y  $H_2O_2$  (reactivo del mismo nombre) se generan especies de gran poder oxidante que tienen amplio uso como reactivos hidroxilantes.

Experimentalmente, el hierro complejado por el EDTA, según McCord y Day (1978), es un catalizador efectivo, mientras que el Cu-EDTA no promueve la reacción. En realidad, los numerosos casos descritos en la literatura y atribuidos a la producción de  $OH^{\cdot}$  es posible que sean catalizados por trazas de hierro e incluso otros elementos de transición presentes en la mezcla de reacción. Ni que

decir tiene el interés y la importancia que reviste la identificación de la forma biológica específica en que está presente el metal.

Una reacción análoga al proceso de Haber-Weiss es la reacción del superóxido con hidroperóxidos orgánicos, ROOH, en lugar del peróxido de hidrógeno. En este caso, según Peters y Foote (1976), la reacción procede rápidamente sin necesidad de catálisis:

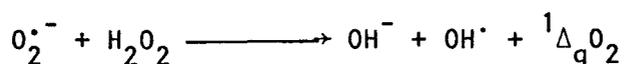


Este mecanismo permite al superóxido iniciar las reacciones en cadena de peroxidación de lípidos, siempre y cuando existan moléculas "iniciadoras" de peroxilípidos. Aunque las reacciones de este tipo sólo se han detectado recientemente, todo parece indicar que tienen un significado biológico potencial considerable.

El radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) es uno de los oxidantes más potentes conocidos y su química ha sido exhaustivamente estudiada por Czapski (1971). Una muestra de la gran reactividad de este radical la constituyen sus constantes de velocidad para las reacciones con etanol, ácido acético y ácido benzoico a 25°C que son de  $1,85 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  (Neta y Dorfman, 1968),  $1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  (Borggaard, 1972) y  $6,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  (Neta y Dorfman, 1968), respectivamente. Los radicales hidroxilo pueden atacar y dañar a prácticamente todas las moléculas presentes en las células (Anbar y Neta, 1967). Por ejemplo, pueden hidroxilar las bases púricas y pirimidínicas - presentes en el ADN, dando lugar a mutaciones (Halliwell, 1978a).

La forma excitada de oxígeno denominada oxígeno singlete ( $^1\Delta_g \text{O}_2$ ) es otra especie altamente reactiva, como mencionamos en otra parte de

esta introducción y, algunos autores (Arneson, 1970; Khan, 1970) han descrito la formación de  $^1\Delta_g O_2$  en la dismutación espontánea de 2 moles de  $O_2^{\cdot-}$ , aunque también se han vertido algunas dudas a este respecto (Poupko y Rosenthal, 1973). Según Kellogg y Fridovich (1975, 1977), la molécula de oxígeno que aparece como producto de la reacción neta de Haber-Weiss, no es el oxígeno triplete en estado fundamental ( $^3\Sigma O_2$ ), sino la forma electrónicamente excitada -- oxígeno singlete:



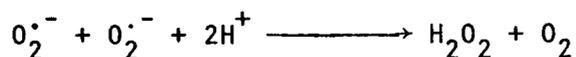
Koppenol (1976) ha calculado que esta reacción es termodinámicamente favorable si el oxígeno singlete está en el estado  $^1\Delta_g$ , pero la energía de reacción no es suficiente para producir el  $^1\Sigma_g^+$ , y considerando que el oxígeno singlete  $^1\Delta_g O_2$  es un oxidante de extremada reactividad, su producción en sistemas biológicos debe ser causa de grave preocupación.

En conclusión, parece que está fuera de duda que en los sistemas bioquímicos tiene lugar la producción de radicales  $O_2^{\cdot-}$ , y -- que esta especie, por reacción con el  $H_2O_2$  o con peróxidos orgánicos, puede dar lugar a la generación de oxidantes mucho más potentes que ellos mismos y, manifiestamente citotóxicos, como el  $OH^{\cdot}$  y el  $^1\Delta_g O_2$ . Considerando que el propio  $O_2^{\cdot-}$  es capaz de producir  $H_2O_2$ , se puede afirmar que la producción de este radical inicia una secuencia de acontecimientos que pueden conducir a daños celulares tan importantes como el ataque al ADN, membranas lipídicas y otros componentes celulares esenciales. Por tanto, aunque el radical  $O_2^{\cdot-}$  *per se*, puede que no sea una especie muy peligrosa, esto carece de importancia si se considera que puede engendrar otros reactivos -- que sí son ciertamente letales.

## LAS SUPEROXIDO DISMUTASAS

El descubrimiento de la actividad enzimática superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) tuvo lugar en 1969 y fue debido a Joe M. McCord e Irwin Fridovich, investigadores del Departamento de Bioquímica - del Duke University Medical Center de Durham (Estados Unidos). La historia de la superóxido dismutasa es en palabras de sus descubridores "el resultado de acontecimientos afortunados, de una investigación persistente y, de una financiación liberal y clarividente - por parte de la administración" (McCord y Fridovich, 1977a).

Esta familia de metaloenzimas cataliza el desproporcionamiento ó disminución de los radicales libres superóxido, según la reacción:



La xantina oxidasa de la leche había captado durante muchos años la atención de estos investigadores debido a que originaba varios procesos peculiares dependientes de oxígeno, tales como la reducción del citocromo c, la iniciación de la oxidación del sulfito y la quimioluminiscencia del luminol y de la lucigenina (McCord y Fridovich, 1977a). En 1968 se llegó al convencimiento de que la --xantina oxidasa liberaba el anión superóxido durante su acción catalítica aeróbica, y que este radical era la causa de las acciones antes descritas (McCord y Fridovich, 1968a).

Entonces ya tenían conocimiento los investigadores mencionados de que ciertas preparaciones proteicas eran capaces de inhibir la reducción del citocromo c, la oxidación del sulfito y la quimioluminiscencia del luminol y de la lucigenina, causadas por la xantina oxidasa, sin que tuviera lugar inhibición alguna del "turnover" catalítico de ésta enzima. Pareció entonces inmediatamente obvio -

que, si el  $O_2^{\cdot-}$  libre era la causa de todos estos procesos, entonces estas proteínas inhibidoras deberían actuar secuestrando  $O_2^{\cdot-}$ . Como estas proteínas eran efectivas en cantidades catalíticas, resultaba evidente que deberían actuar catalizando la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$ , según la reacción antes indicada. Esto fue demostrado experimentalmente llevándose a cabo después el aislamiento de la enzima responsable a partir de eritrocitos bovinos, que fue designada con el nombre de superóxido dismutasa (McCord y Fridovich, 1968b, 1969a).

En realidad, esta enzima una vez caracterizada resultó idéntica a las llamadas cupreínas, metaloproteínas que habían sido aisladas y caracterizadas de distintos orígenes durante los treinta años que precedieron al descubrimiento de su actividad superóxido dismutasa por McCord y Fridovich, pero en las que no se había detectado actividad enzimática alguna. Estas proteínas con la excepción de la orgoteína (Huber y col., 1968) fueron siendo designadas según el tejido de origen y su contenido en cobre: hemocupreína y hepatocupreína de eritrocitos e hígado de mamíferos, respectivamente (Mann y Keilin, 1938); hepatocupreína de hígado de caballo (Mohamed y Greenberg, 1953); cerebrocupreína de cerebro bovino (Porter y Folch, -- 1957), y eritrocupreína de glóbulos rojos humanos (Markowitz y col., 1959).

Posteriormente, Lippitt y Fridovich (1973) demostraron que una enzima hasta entonces conocida por el nombre de tetrazolio oxidasa era idéntica a la superóxido dismutasa aislada de eritrocitos bovinos por McCord y Fridovich (1969a).

Como resultado del descubrimiento de esta actividad enzimática, que tiene la propiedad singular de utilizar como sustrato un radical libre, numerosos investigadores volcaron su interés hacia el estudio de la biología del radical superóxido, como lo prueba el --

crecimiento exponencial de la literatura relacionada con este tema desde 1969, y, el que en los últimos cinco años las publicaciones aparecidas sobre superóxido dismutasa hayan superado en número a las de cualquier otra enzima (Pauling, 1979). Existen numerosas revisiones sobre esta materia debidas a Fridovich (1974, 1975, 1976a, 1976b, 1978a, 1978b, 1978c), Bors y col. (1974), Halliwell (1974), Asada (1976a), Michelson (1976, 1978), y McCord (1979), entre otros investigadores, y se han celebrado dos Simposios Internacionales sobre "Superóxido y Superóxido dismutasa" en 1976 y en 1979.

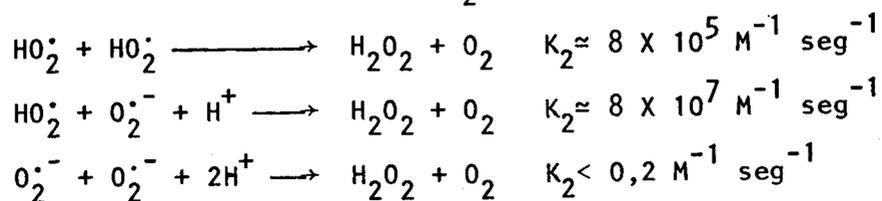
Hasta la fecha, se han caracterizado tres clases de superóxido dismutasas que difieren entre sí según el grupo prostético metálico ligado a la enzima. El primer grupo contiene cobre y cinc y, a él pertenece la primera superóxido dismutasa aislada por McCord y Fridovich (1969a) de eritrocitos bovinos y, los otros dos grupos contienen manganeso e hierro, respectivamente.

Estas metaloproteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, estando presentes en todas las células aerobias, tanto procariotas como eucariotas, e incluso en algunas bacterias anaeróbias.

#### MECANISMO DE LA ACCION ENZIMATICA

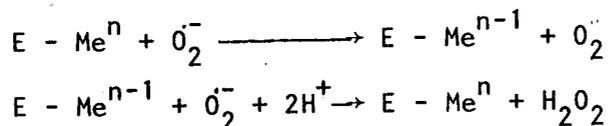
El radical superóxido no se puede acumular en medios acuosos ya que fácilmente experimenta una reacción de desproporcionamiento o dismutación. Teniendo en cuenta que el superóxido es la base conjugada de un ácido débil, el radical hidropéroxilo ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), cuya pKa es 4,8, es comprensible la dependencia de la dismutación espontánea respecto al pH. Behar y col. (1970) y Marklund (1976) han de--

mostrado la existencia de tres reacciones bimoleculares de dismutación del radical superóxido que tienen lugar a distintos rangos de pH entre las formas iónicas y neutras. Estas reacciones, junto con sus constantes de velocidad ( $k_2$ ) son las siguientes:



De acuerdo con estos autores, la dismutación espontánea es máxima a pH 4,8, y la velocidad disminuye en un factor de 10 por cada incremento de una unidad en el pH por encima de 4,8. La reacción de dismutación espontánea, a pH 7,8 y en medio acuoso, tiene una constante de velocidad de aproximadamente  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  (Fridovich, 1978a). El mecanismo de la dismutación espontánea ha sido estudiado también por Bielski y Allen (1977) y, Fee y McClune (1978). Según estos autores la forma iónica  $\text{O}_2^{\bullet -}$  no reacciona consigo misma para dismutarse sino con su ácido conjugado ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) que existe en equilibrio.

El mecanismo más aceptado para la catálisis de la reacción de dismutación es el que postula la reducción y reoxidación alternativa del catalizador durante encuentros sucesivos con  $\text{O}_2^{\bullet -}$ . El catalizador realizaría, por lo tanto, la transferencia de un electrón desde un  $\text{O}_2^{\bullet -}$  a otro sin necesidad de una aproximación estrecha de los aniones. Este mecanismo, en líneas generales, se ha demostrado en todas las superóxido dismutasas hasta ahora examinadas, tanto cuprocinc como ferro ó manganoenzimas (Klug y col., 1973; Pick y col., 1974; McAdam y col., 1977a; 1977b; Lavelle y col., 1977). El mecanismo puede esquematizarse mediante las reacciones:



donde E representa a la enzima y Me al metal. En el caso de las cuprocinc superóxido dismutasas es el cobre el que participa en el ciclo catalítico, oscilando del estado cúprico a cuproso, mientras que el cinc parece desempeñar un papel estructural. En las mangano y ferro superóxido dismutasas, los estados trivalentes y divalentes de los metales están implicados en el ciclo catalítico.

Las superóxido dismutasas son unos catalizadores extraordinariamente eficientes y su constante de velocidad de reacción con el  $O_2^{\cdot -}$  oscila entre  $0,5 \times 10^9$  y  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , según la fuente de origen de la enzima (Rotilio y col., 1972; Lavelle y col., 1977). Si se considera que a pH 7,8 la constante de velocidad de la dismutación espontánea del  $O_2^{\cdot -}$  es, como antes mencionamos, aproximadamente  $8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , puede parecer sorprendente que se requieran enzimas para catalizar una reacción que es tan rápida, incluso en ausencia de catalizador. Sin embargo, hay que considerar que, a pesar de la alta constante de velocidad, la reacción es de segundo orden en  $O_2^{\cdot -}$ , y la primera vida media es, por lo tanto, función del nivel de  $O_2^{\cdot -}$  en estado estacionario. Así, a una concentración de superóxido de  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$  la reacción sería lenta. Por el contrario, la reacción entre el  $O_2^{\cdot -}$  y la superóxido dismutasa es de primer orden en superóxido y en enzima, y además la enzima está presente en la mayor parte de los tejidos a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  (Fridovich, 1978a). A niveles de  $O_2^{\cdot -}$  de  $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ , la dismutación catalizada por la enzima sería  $10^3$  veces más rápida que la reacción espontánea. De hecho, al pH fisiológico la constante de velocidad en la reacción enzimática es --

aproximadamente  $10^4$  veces mayor que en la reacción espontánea. El incremento neto de la tasa de dismutación de  $O_2^{\cdot-}$ , causado por niveles intracelulares de superóxido dismutasa a una concentración estacionaria de superóxido de 0,1 nM, es así de  $10^9$  veces, y la ventaja proporcionada por la enzima sería todavía mayor a los niveles inferiores estacionarios de  $O_2^{\cdot-}$  que son de esperar en una célula.

#### METODOS DE ENSAYO DE LA ACTIVIDAD SOD

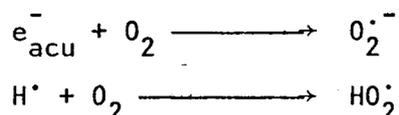
La medida de la actividad superóxido dismutasa presenta un gran problema, poco habitual en ensayos enzimáticos convencionales, derivado de la inestabilidad intrínseca en medios acuosos de su sustrato, el radical libre  $O_2^{\cdot-}$ . Los distintos métodos de que se dispone se pueden clasificar en dos grupos: directos e indirectos.

##### Ensayos directos

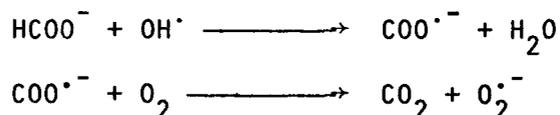
Estas determinaciones son teóricamente preferibles, toda vez que se mide la tasa de consumo de  $O_2^{\cdot-}$  por la enzima, o bien la tasa de formación de los productos de dismutación de los radicales  $O_2^{\cdot-}$ .

El método de la radiolisis de pulsos es, de todos los conocidos, el que reúne las condiciones del método ideal para la determinación de la actividad superóxido dismutasa y la investigación del mecanismo de la reacción, ya que hace posible la determinación directa de la constante de velocidad, tiene una gran sensibilidad y suministra una dependencia lineal de la concentración de enzima, a la vez que proporciona un alto rendimiento en  $O_2^{\cdot-}$ . En este método, los pulsos de electrones energéticos obtenidos en un acelerador li

neal de Van de Graaff, son dirigidos contra soluciones acuosas oxigenadas, dando lugar a la generación de electrones hidratados ( $e_{acu}^-$ )  $H^\cdot$  y  $OH^\cdot$ . En presencia de oxígeno se producen  $O_2^{\cdot-}$  y  $HO_2^\cdot$  (Fridovich 1976a) mediante las reacciones:



El formato dobla el rendimiento radiolítico de  $O_2^{\cdot-}$  y elimina el  $OH^\cdot$  mediante la siguiente reacción (Fricke y Thomas, 1964):



De esta manera, mediante radiolisis de pulsos es posible introducir rápidamente  $O_2^{\cdot-}$  en soluciones acuosas a concentraciones tan altas como  $2 \times 10^{-5}$  M, lo que permite el control espectrofotométrico directo de la desaparición del  $O_2^{\cdot-}$  por medida de su absorción al ultravioleta. Esta técnica se ha utilizado para medir directamente la acción catalítica de la cuprocinc superóxido dismutasa bovina (Rotilio y col., 1972), de la ferro-superóxido dismutasa de *Photobacterium leiognathi* (Lavelle y col., 1977), y de la manga no superóxido dismutasa de *Bacillus stearothermophilus* (McAdam y col., 1977a, 1977b), entre otras enzimas. En los tres casos citados las constantes de velocidad determinadas para la dismutación enzimática fueron de  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ,  $0,55 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  y  $0,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , respectivamente.

La resonancia paramagnética electrónica (RPE) de congelación rápida también se ha utilizado para la estimación de la actividad superóxido dismutasa (Ballou y col., 1969; Orme-Johnson y Beinert, 1969). En este método una mezcla de reacción es extinguida por con

gelación rápida, y la mezcla congelada se coloca después en una cavidad de microondas, examinándose su contenido en spines electrónicos desapareados (Bray, 1961). Se utiliza riboflavina tetracetilada reducida en condiciones anaerobias por un proceso fotoquímico. La flavina reducida se mezcla entonces rápidamente con oxígeno y se detecta por RPE la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por su habilidad para reducir el citocromo c. La superóxido dismutasa disminuye la señal de RPE del  $O_2^{\cdot-}$  e inhibe la reducción del citocromo c. De esta forma, se pudo calcular la constante de velocidad para la reducción del citocromo c por el  $O_2^{\cdot-}$  (Ballou y col., 1969). Una metodología similar se utilizó para la detección del  $O_2^{\cdot-}$  generado por la reoxida--ción de ferredoxina reducida de *Clostridium*, y en este caso el efecto catalítico de la superóxido dismutasa fue también observado directamente (Orme-Johnson y Beinert, 1969).

Otro método directo es el descrito por Rigo y col. (1974, 1975a) que está basado en la reducción polarográfica del oxígeno molecular en un electrodo de gota de mercurio. Se utiliza un cátodo cubierto con óxido de trifenilfosfina lo que hace que tenga lugar, casi exclusivamente, la reducción univalente del oxígeno, con formación de  $O_2^{\cdot-}$ . En estas condiciones, la superóxido dismutasa incrementa la altura de la onda polarográfica de reducción del oxígeno, dismutando el superóxido en las proximidades de la superficie del electrodo. Este ensayo, según sus autores, está libre de interferencias y puede utilizarse para el ensayo de fluidos biológicos y homogenados, aunque tiene la desventaja de su limitada precisión, ya que el incremento máximo en la altura de onda producida por la superóxido dismutasa es pequeño, y además sólo es aplicable a valores de pH superiores a nueve. Rigo y col. (1975b) aplicaron este método al estudio cinético de la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  por la Cu, Zn-SOD bovi-

na y, posteriormente, Rigo y Rotilio (1977), describieron una modificación de esta técnica polarográfica para la determinación simultánea de superóxido dismutasa y catalasa en materiales biológicos.

Marklund (1976) ha diseñado un método directo espectrofotométrico consistente en la utilización de superóxido potásico ( $KO_2$ ) - como sustrato, en una solución alcalina (pH 8,9-12,7), y en el seguimiento de la reacción durante tiempos de 15-20 segundos por espectrofotometría a 250 nm, longitud de onda de máxima absorción -- del radical  $O_2^{\cdot -}$ . Este procedimiento también se utilizó para determinar las constantes de velocidad de la mangano superóxido dismutasa bovina, y de las cupro, cinc superóxido dismutasas de origen bovino y humano, encontrándose valores del mismo orden a los determinados por radiolisis de pulsos.

Otro método descrito está basado en la utilización de un --- electrodo de oxígeno tipo Clark (Marshall y Worsfold, 1978). En este procedimiento, el  $O_2^{\cdot -}$  se genera fotoquímicamente a niveles saturantes en la célula del electrodo, por iluminación de mezclas de - riboflavina y tetrametiletildiamina (TEMED); y por medio del electrodo de oxígeno se mide su dismutación a oxígeno y peróxido de hidrógeno. El peróxido en exceso es secuestrado por una sal de tetrazolio que a su vez lo oxida a oxígeno. Se trata por lo tanto de un - método contínuo para la determinación de actividad superóxido dismutasa, que proporciona un registro lineal de la reacción, cuya -- pendiente es función directa de la cantidad de enzima añadida.

### Ensayos indirectos

Estos métodos son los más utilizados por los investigadores debido a que no presentan complicaciones metodológicas, y pueden -

llevarse a cabo con el aparataje del que normalmente se dispone en un laboratorio convencional de bioquímica. Estos métodos se basan en las alteraciones, catalizadas por la enzima, de la concentración estacionaria de los radicales superóxido.

Los métodos directos miden la concentración instantánea de  $O_2^{\cdot-}$  y, por esto, son inherentemente más insensibles que los métodos indirectos que integran la cantidad total de  $O_2^{\cdot-}$  producida en el curso de la reacción. Así, los métodos directos de determinación de superóxido dismutasa deben llevarse a cabo en presencia de concentraciones directamente observables de  $O_2^{\cdot-}$ , esto es, aproximadamente  $10^{-5}M$ . Por el contrario, los métodos indirectos pueden realizarse con niveles estacionarios de  $O_2^{\cdot-}$  en el rango de  $10^{-8}$  a  $10^{-13}M$  (McCord y Fridovich, 1969a). Si se considera que la dismutación espontánea del  $O_2^{\cdot-}$  es una reacción de segundo orden, mientras que la dismutación enzimática es de primer orden con respecto a este radical, cuanto más baja sea la concentración en estado estacionario de  $O_2^{\cdot-}$  más eficientemente competirá la enzima con la dismutación espontánea. Entonces, en igualdad de condiciones, cuando la concentración en estado estacionario de  $O_2^{\cdot-}$  disminuya, una determinada concentración de enzima interceptará mayores niveles de  $O_2^{\cdot-}$ .

Todos los métodos indirectos más comunmente utilizados constan de dos componentes: un generador y un detector de superóxido (Fig. 3). El generador sirve para producir el radical a una velocidad controlada constante. En ausencia de SOD el radical se acumula a una concentración tal que su velocidad de reacción (oxidación o reducción) con el detector iguala a su velocidad de generación, alcanzándose este estado estacionario en aproximadamente un segundo. Si la superóxido dismutasa está presente, compite con el detector por el superóxido, con el resultado de una disminución de la -

GENERADORES DE  $O_2^{\cdot-}$

DETECTORES DE  $O_2^{\cdot-}$

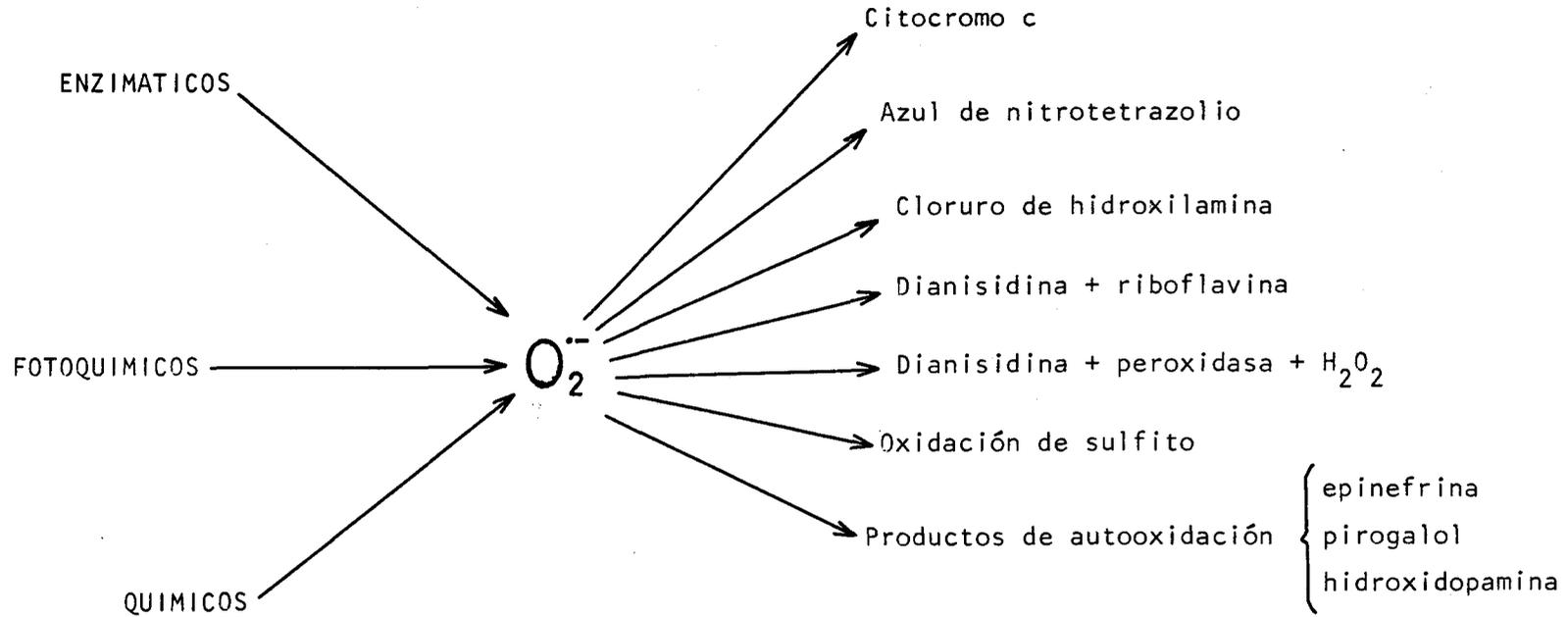


Fig. 3. Métodos indirectos de ensayo de la actividad superóxido dismutasa

concentración estacionaria del radical, que se manifiesta en una inhibición de la reacción del superóxido con el detector. Mientras que en los ensayos directos se puede medir la constante de velocidad entre la enzima y el sustrato, un defecto de los métodos indirectos es, que nunca se alcanza la saturación de la enzima por el sustrato, y las concentraciones de superóxido en estado estacionario son muy pequeñas, del orden de  $10^{-8}$  a  $10^{-13}$  M, teniendo por lo tanto que basarse en una competición entre la superóxido dismutasa y el detector. De aquí que la relación de las constantes de velocidad y la concentración del detector determinen la sensibilidad del ensayo para la superóxido dismutasa.

Los distintos métodos indirectos existentes, utilizan generalmente tres tipos de generadores de superóxido: enzimáticos, fotquímicos y químicos.

#### Generadores enzimáticos de $O_2^{\cdot -}$

El sistema xantina/xantina oxidasa es una fuente de  $O_2^{\cdot -}$  muy bien estudiada y caracterizada (Fridovich, 1970). Este sistema constituyó la base del primer ensayo de la enzima (McCord y Fridovich, 1969a), que con pequeñas modificaciones, continúa siendo el más -- utilizado actualmente por su versatilidad y fiabilidad.

Mientras que la xantina es el sustrato más empleado para la xantina oxidasa, la hipoxantina y la purina también pueden usarse cuando se requiere una generación de radical más duradera. La hipoxantina, además de ser más soluble, suministra dos veces más superóxido por mol que la xantina, y la purina hasta tres veces más -- (McCord y col., 1977b).

El citocromo c y el colorante azul de nitrotetrazolio (NBT)

se han utilizado como detectores de radicales  $O_2^{\cdot-}$  generados enzimáticamente, midiéndose por espectrofotometría la tasa de inhibición producida por la superóxido dismutasa en la reducción del citocromo c y del NBT por dichos radicales (McCord y Fridovich, 1969a; Salin y McCord, 1974; Beauchamp y Fridovich, 1971). Tyler (1975c) ha descrito un método basado en el empleo de la reacción de oxidación del sulfito como sistema detector y Elstner y Heupel (1975) han utilizado la oxidación del cloruro de hidroxilamina, midiéndose en ambos casos espectrofotométricamente la capacidad de la superóxido dismutasa para inhibir la oxidación de estos dos compuestos.

Por otra parte, Misra y Fridovich (1977a) han diseñado un método "positivo" basado en el efecto inhibitorio de los radicales  $O_2^{\cdot-}$  sobre la actividad peroxidasa. En un sistema detector constituido por peroxidasa, dianisidina y  $H_2O_2$ , la superóxido dismutasa elimina esta inhibición, provocando un incremento en la tasa de peroxidación de la dianisidina que se mide espectrofotométricamente.

#### Generadores fotoquímicos de superóxido

Massey y col. (1969) fueron los primeros en llevar a cabo la producción de superóxido por reoxidación espontánea de la flavina fotoreducida y en acoplar este sistema a la reducción del citocromo c. Beauchamp y Fridovich (1971) acoplaron esta generación fotoquímica de superóxido a la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) mediante un ensayo espectrofotométrico, pero la principal contribución de esta combinación ha sido su aplicación a la electroforésis en geles de poliacrilamida y agarosa como medio de localizar las bandas de actividad superóxido dismutasa.

Por otra parte, Misra y Fridovich (1977b) han descrito un método basado en la fotooxidación de la dianisidina sensibilizada -- por la riboflavina. En el curso de esta reacción interviene el radical superóxido inhibiendo la formación del derivado oxidado de la dianisidina, que tiene un máximo de absorción a 460 nm. En presencia de superóxido dismutasa tiene lugar un incremento en la tasa de fotooxidación de la dianisidina, debido a su efecto dismutante de los radicales  $O_2^{\cdot-}$ , el cual se mide espectrofotométricamente. Se trata, por tanto, de un método "positivo" donde se mide la actividad superóxido dismutasa sobre la base de la habilidad de la enzima para incrementar la formación de el producto oxidado de la dianisidina, en contraste con los métodos anteriores fundamentados en la capacidad inhibitoria de la dismutasa sobre ciertos procesos de reducción vinculados al radical  $O_2^{\cdot-}$ . Este método se ha utilizado para la localización de la actividad superóxido dismutasa en -- electroferogramas de geles de poliacrilamida (Misra y Fridovich, 1977c).

Finalmente, existe otro método espectrofotométrico debido a Misra y Fridovich (1977a) dependiente de la inhibición de la actividad peroxidasa por  $O_2^{\cdot-}$  y de la supresión de esta inhibición por la superóxido dismutasa. Este procedimiento "positivo" ya se ha indicado en el apartado precedente de Generación Enzimática de  $O_2^{\cdot-}$ , y la única diferencia estriba en que el flujo de superóxido es generado fotoquímicamente por iluminación de soluciones conteniendo riboflavina, y metionina, como donador de electrones.

#### Generadores químicos de $O_2^{\cdot-}$

Se han propuesto varios ensayos basados en reacciones químicas productoras de superóxido. Misra y Fridovich (1972b) informa--

ron que la autooxidación de la epinefrina a adrenocromo procede por lo menos a través de dos vías distintas dependientes del pH. A valores altos de pH la autooxidación implica una reacción en cadena de radicales libres en donde interviene el superóxido. La reacción se inicia añadiendo epinefrina a un buffer a pH 10,2 y controlando la aparición de adrenocromo a 480 nm. La superóxido dismutasa inhibe esta reacción, y, dentro de un determinado rango, el grado de inhibición es función de la concentración de superóxido dismutasa. La principal ventaja de este método sobre otros, reside en que el superóxido implicado en el proceso parece funcionar como un oxidante y, por lo tanto, este ensayo es menos susceptible de interferencias específicas, por reductores endógenos, que otros que emplean un detector que es reducido por el superóxido. Este método ha sido modificado posteriormente por Sun y Zigman (1978) efectuando las lecturas espectrofotométricas a 320 nm en lugar de a 480 nm, con un aumento de sensibilidad de 6 a 10 veces con relación al anterior.

También se han utilizado otros compuestos que son susceptibles de autooxidación por mecanismos dependientes de la formación de superóxido. Cualquiera de éstos podría emplearse potencialmente como base de un ensayo de actividad superóxido dismutasa. Un ejemplo lo constituye el pirogalol (Marklund y Marklund, 1974; Puget y Michelson, 1974a). Su autooxidación también tiene lugar por más de un mecanismo, pero a pH 8,2 ésta es totalmente inhibible por la superóxido dismutasa, y de aquí que se pueda usar como un ensayo efectivo por la enzima. Y lo mismo se puede decir de otro método descrito que utiliza la autooxidación de la 6-hidroxidopamina como base para la determinación de actividad superóxido dismutasa (Heikkila y Cabbat, 1976), con la única diferencia de que este ensayo puede realizarse a pH 7,4.

En la autooxidación de la hidroxilamina tiene lugar la generación de radicales  $O_2^{\cdot-}$ , y esta propiedad se ha aprovechado para un método de determinación de actividad superóxido dismutasa que emplea el NBT como detector de radicales superóxido (Kono, 1978). Este ensayo tiene la ventaja de la simplicidad, y es útil para el control de actividad superóxido dismutasa en los eluidos de cromatografía en columna.

Otro método de determinación es el descrito por Fried (1975), basado en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por oxidación del NADH catalizada por el metasulfato de fenazina, y que utiliza NBT como detector. En ausencia de superóxido dismutasa, todo el superóxido producido es detectado por el NBT, presente en exceso, y tras la adición de la enzima, una fracción del superóxido producido es dismutado catalíticamente, resultando en una menor cantidad de NBT reducido.

Henry y col. (1976) han utilizado la reducción del NBT por superóxido potásico ( $KO_2$ ) disuelto en dimetilsulfóxido para desarrollar un nuevo ensayo de superóxido dismutasa. El método se basa en la capacidad de la enzima para inhibir la reducción del NBT por el  $KO_2$  añadido directamente a la mezcla de reacción. De esta forma se evita el problema de incluir sistemas complejos generadores de  $O_2^{\cdot-}$  en las mezclas de reacción, y se ahorra tiempo, ya que el desarrollo de color tiene lugar a los pocos segundos de la adición del  $KO_2$ . Sin embargo, una desventaja de este método es su menor sensibilidad en comparación con los otros ensayos descritos.

## CUPROCINC SUPEROXIDO DISMUTASAS

De todas las superóxido dismutasas, son las pertenecientes a esta familia las que han sido más estudiadas, y sobre las que se dispone de más información acerca de sus propiedades moleculares, estructura, características cinéticas y mecanismo de acción catalítico.

Como hemos indicado anteriormente, las cuprocinc superóxido dismutasas ya habían sido aisladas y caracterizadas, con el nombre de cupreínas, mucho antes del descubrimiento de su actividad enzimática. Estas enzimas se encuentran generalmente en el citoplasma de los organismos eucarióticos, con la única excepción de la "bacteriocupreína" aislada de la bacteria luminiscente *Photobacterium leiognathi* (Puget y Michelson, 1974b).

Una característica de este tipo de dismutasas es su sensibilidad frente al  $CN^-$ . La actividad de la mayoría de las cuprocinc superóxido dismutasas resulta inhibida en aproximadamente un 90% por cianuro a concentraciones de 1 mM, según la especie de origen, propiedad que se utiliza para diferenciarlas de las familias de -- las manganeso y ferro superóxido dismutasas, que no son afectadas por esta concentración de cianuro (Crapo y col., 1978).

Las cuprocinc superóxido dismutasas son, en general, unas enzimas bastante estables, como se deduce de los procedimientos drásticos que se han utilizado para el aislamiento de distintas cupreínas. Así, en la purificación de la hepatocupreína se utilizó la precipitación con acetona y con acetato de plomo, así como el calentamiento a 70°C (Mohamed y Greenberg, 1953). McCord y Fridovich (1969a) en la purificación de la enzima de eritrocitos bovinos, eliminaron la hemoglobina del lisado de glóbulos rojos por tratamiento con --

mezclas de cloroformo-etanol (reactivo de Tsuchihashi), obteniendo la enzima en la fase orgánica sin pérdidas sensibles de actividad.

Se han aislado superóxido dismutasas conteniendo cobre y zinc de un amplio espectro de eucariotas, incluyendo animales, plantas superiores y hongos. En las Tablas II y III, se presentan algunas propiedades químico físicas y el "lucus" celular de las cuprocinc superóxido dismutasas que han sido caracterizadas de microorganismos no fotosintéticos y animales, y de organismos fotosintéticos, respectivamente. Como se deduce de los datos presentados, las cuprocinc dismutasas eucarióticas son moléculas diméricas. Cada una de las subunidades idénticas contiene un átomo de cobre y un átomo de zinc, que están fuertemente unidos a una cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 16000. Cada una de estas cadenas tiene un puente disulfuro intracatenario, un grupo sulfidrilo y un resto amino terminal acetilado (Fridovich, 1976a). Se ha determinado la secuencia completa de aminoácidos de la enzima bovina (Steinman y col., 1974) y también su estructura tridimensional (Richardson, 1977).

La característica estructural dominante de cada subunidad es un cilindro con estructura  $\beta$ , también denominada de barril  $\beta$ . Las dos subunidades están unidas por interacciones no covalentes, predominantemente hidrófobas, entre los barriles  $\beta$ , encontrándose los centros activos en lados opuestos de la molécula. El centro activo está constituido por un ión  $\text{Cu(II)}$  rodeado por cuatro restos de histidina con una configuración plano-cuadrada distorsionada. Uno de los restos de histidina es un ligandopuente, con uno de sus nitrógenos unido al cobre, y el otro al  $\text{Zn(II)}$  contíguo. El zinc está también unido a dos restos adicionales de histidina y a un resto de ácido aspártico (Richardson, 1977). Los sitios de enlace

TABLA II. CUPROCINC SUPEROXIDO DISMUTASAS CARACTERIZADAS DE MICROORGANISMOS Y ANIMALES

Origen	Peso molecular	Número de subunidades	Átomos de Cu-Zn/molécula	Ubicación celular	Referencias
PROCARIOTAS					
<i>Photobacterium leiognathi</i>	33.000	2	1 Cu 2 Zn	---	Puget y Michelson (1974b)
EUCARIOTAS					
<i>Neurospora crassa</i>	31.000	2	2 Cu 2 Zn	---	Misra y Fridovich (1972d)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32.700	2	2 Cu 2 Zn	---	Goscin y Fridovich (1972b)
<i>Fusarium oxysporum</i>					Rapp y col. (1973)

...//...

TABLA II. (Continuación)

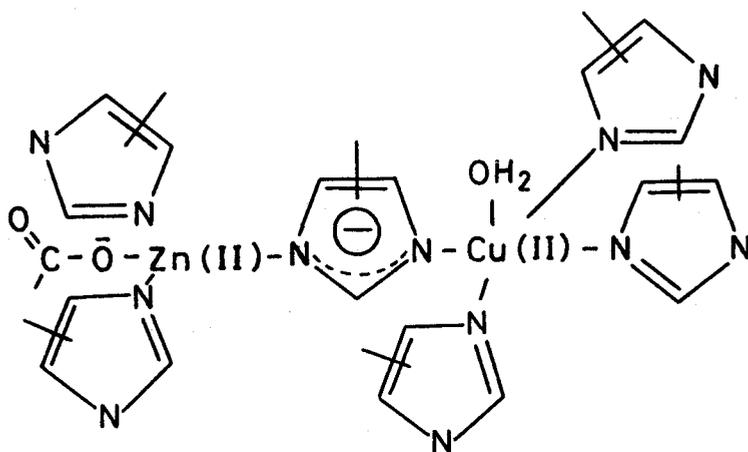
Origen	Peso molecular	Número de subunidades	Átomos de Cu-Zn/molécula		Ubicación celular	Referencias
Eritrocitos bovinos	33.000	2	2Cu	2Zn	---	McCord y Fridovich (1969a) Carrico y Deutsch (1970)
Eritrocitos de cerdo	32.000	2	2Cu	2Zn	---	Bartkowiak y col. (1979).
Higado de pollo	31.000	2	2Cu	2Zn	* Citoplasma y Mitocondrias	Weisiger y Fridovich (1973a, 1973b).
Higado bovino	32.500	2	2Cu	2Zn	Citoplasma	Weser y col. (1972)
Higado de cerdo	32.000	2	2Cu	2Zn	Citoplasma	Bartkowiak y col. (1979)
Higado de pez espada	32.500	2	2Cu	2Zn	Citoplasma	Bannister y col. (1977).
Higado de rata	33.000	2	2Cu	2Zn	Citoplasma	Reiss y Gershon (1976)
Corazón bovino	32.500	2	2Cu	2Zn	Citoplasma	Keel y col. (1971).

TABLA III.

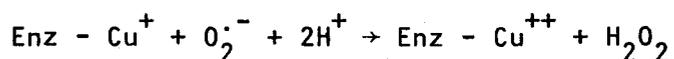
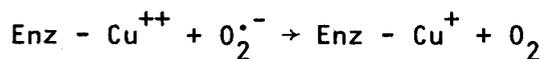
## CUPROCINC SUPEROXIDO DISMUTASAS CARACTERIZADAS DE ORGANISMOS FOTOSINTETICOS

Origen	Peso molecular	Número de Subunidades	Atomos de Cu y Zn/molécula	Ubicación celular	Referencias
Semilla de guisante	31.500	---	2 Cu 2 Zn	---	Sawada y col. (1972)
Germen de trigo	31.000	2	2 Cu 2 Zn	---	Beauchamp y Fridovich (1973)
Hojas de espinaca	32.000	2	2 Cu 2 Zn	cloroplastos	Asada y col. (1973)
Hojas de judia	32.000	2	---	---	Kono y col. (1979)

del cobre y del cinc en la superóxido dismutasa bovina se muestran en el esquema de la figura siguiente, propuesto por Bailey y col. (1980):



Las relaciones estructura-función y los mecanismos catalíticos de las cuprocinc superóxido dismutasas han sido revisados en años recientes por Fee (1977). En esta familia de dismutasas, solamente los iones cobre son catalíticamente activos, mientras que el cinc parece desempeñar fundamentalmente un papel estructural. Durante la catálisis los iones de cobre experimentan oxidaciones y reducciones cíclicas según las reacciones:



Ratilio y col. (1973) han utilizado la propiedad del ferrocianuro de decolorar parcialmente la enzima bovina y, del ferricianuro para oxidarla, para hacer un cálculo aproximado del potencial redox ( $E_0'$ ) del cobre en el centro activo de esta superóxido dismutasa encontrando un valor para el  $\text{Cu}^{2+}$  de 0,40 V.

Se ha sugerido que el imidazolato puente entre el cobre y el cinc tiene una función en la conducción de protones. De esta forma, la reducción del  $\text{Cu(II)}$  a  $\text{Cu(I)}$ , durante un paso del ciclo catalítico, podría estar acompañada por una ruptura del enlace entre el cobre y el imidazolato puente. Este imidazolato podría entonces tomar un protón del disolvente, y durante la reoxidación subsiguiente del  $\text{Cu(I)}$  por el  $\text{O}_2^-$ , la interacción puente se restablecería -- siendo donado el protón para formar el producto  $\text{HO}_2^-$  (Fridovich, -- 1978a). Sin embargo, conviene indicar que aunque este mecanismo es interesante, por el momento permanece enteramente en el campo de lo especulativo.

Tanto el  $\text{Cu}^{2+}$  como el  $\text{Zn}^{2+}$  pueden ser eliminados reversiblemente de estas superóxido dismutasas. Sin embargo, la apoenzima es mucho más labil que la holoenzima, y esta inestabilidad puede conducir a una inactivación irreversible en ciertas condiciones. Esto ha dado lugar a resultados conflictivos por lo que se refiere a la resolución reversible de la  $\text{Cu,Zn}$ -superóxido dismutasa. Forman y Fridovich (1973a) han explorado los efectos de los metales sobre la actividad y estabilidad de la superóxido dismutasa bovina, y, posteriormente, Beem y col. (1974) llevaron a cabo una investigación más detallada de la resolución reversible de esta enzima, utilizando la actividad enzimática, la movilidad electroforética y -- los espectros óptico y de RPE para estudiar el estado de la enzima. Estos últimos autores han demostrado claramente que tanto el  $\text{Cu}^{2+}$

como el  $Zn^{2+}$  pueden ser eliminados reversiblemente, y que el  $Co^{2+}$ , el  $Hg^{2+}$  ó el  $Cd^{2+}$  pueden reemplazar al  $Zn^{2+}$  en su función de reforzamiento de la estabilidad enzimática, mientras que, ningún metal puede reemplazar al  $Cu^{2+}$  en su función catalítica. También se ha encontrado que el  $Cu^{2+}$ , por sí sólo, puede restaurar hasta un 80% de la actividad catalítica, de la proteína nativa, y que el sitio del  $Zn^{2+}$  es necesario que esté ocupado para que tenga lugar la recuperación total de las propiedades nativas de la enzima.

#### MANGANESO SUPEROXIDO DISMUTASAS

La primera manganeso superóxido dismutasa aislada fue la procedente de *Escherichia coli*, y aunque su actividad catalítica resultó idéntica a la de la Cu,Zn-dismutasa del citoplasma de organismos eucarióticos, la Mn-dismutasa tenía unas propiedades bastante diferenciadas de esta última enzima (Keele y col., 1970). Además de su color rosa, en lugar de verde azulado típico de las Cu,Zn-dismutasas, tenía un peso molecular más elevado (40000) y también una composición en aminoácidos diferente. Otra propiedad de la Mn-superóxido dismutasa era su menor estabilidad en comparación con las Cu,Zn-dismutasas, como lo demostró su inactivación al ser tratada con mezclas de cloroformo y etanol, lo que motivó el que tuviera que ser diseñada una nueva metodología de purificación para su aislamiento (Keele y col., 1970).

Desde entonces, han sido caracterizadas distintas manganeso superóxido dismutasas de organismos procarióticos y eucarióticos, incluyendo bacterias, algas, hongos, levaduras y animales. En las Tablas IV y V, se muestran algunas propiedades químico-físicas, -- así como la localización celular de las Mn-superóxido dismutasas -- hasta la fecha estudiadas de microorganismos no fotosintéticos y --

TABLA IV. MANGANESO SUPEROXIDO DISMUTASAS CARACTERIZADAS DE MICROORGANISMOS NO FOTOSINTETICOS Y ANIMALES

Origen	Peso molecular	Número de subunidades	Atomos de Mn/molécula	Ubicación celular	Referencias
PROCARIOTAS					
<i>Escherichia coli</i> B	39.500	2	1	matriz celular	Keele y col. (1970); Weisiger y Fridovich (1973a); Britton y Fridovich (1977).
<i>Streptococcus mutans</i>	40.250	2	1	---	Vance y col. (1972); Weisiger y Fridovich (1973a).
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	40.000	2	1	---	Bridgen y col. (1975).
<i>Thermus thermophilus</i>	83.000	4	2	---	Sato y Nakazawa (1978)
<i>Thermus aquaticus</i>	80.000	4	2	---	Sato y Harris (1977)
<i>Mycobacterium phlei</i>	80.000	4	2	---	Chikata y col. (1975)
<i>Mycobacterium lepraemurium</i>	45.000	2	1Fe 1Zn	---	Ichihara y col. (1977)
<i>Mycobacterium</i> Sp., Strain Takeo	61.500	3	2	---	Kusunose y col. (1976a)

...//...

TABLA IV. (Continuación)

Origen	Peso molecular	Número de subunidades	Átomos de Mn/molécula	Ubicación celular	Referencias
EUCARIOTAS					
<i>Saccharomyces cerevisial</i>	96.000	4	4	matriz mitocondrial.	Ravindranath y Fridovich (1975)
<i>Pleurotus olearius</i>	76.000	4*	2	---	Lavelle y col. (1974)
	78.000	4	2	---	Lavelle y Michelson (1975)
Higado de pollo	80.000	4	2	matriz mitocondrial.	Weisiger y Fridovich (1973a, 1973b).
Higado de rata	89.000	4	4	matriz mitocondrial.	Salin y col. (1978); Panchenko y col. (1975).
Higado humano	83.300	4	4	Citoplasma y matriz mitocondrial.	McCord y col. (1977c)
Corazón bovino	86.000	4	2	mitocondrias	Marklund (1978)

\* Esta enzima está constituida por dos tipos de subunidades, de idéntico peso molecular (20.000) pero de cargas diferentes.

TABLA V. MANGANESO SUPEROXIDO DISMUTASAS CARACTERIZADAS DE ORGANISMOS FOTOSINTETICOS

Origen	Peso molecular	Número de subunidades	Atomos de Mn/molécula	Ubicación celular	Referencias
PROCARIOTAS					
<i>Rhodospseudomonas spheroides</i>	37.500	2	1	---	Lumsden y col. (1976)
EUROCARIOTAS					
<i>Porphyridium cruentum</i>	40.000	2	1	---	Misra y Fridovich (1977d)

animales, y de organismos fotosintéticos, respectivamente.

Las manganeso superóxido dismutasas, junto con las Fe-superóxido dismutasas, son características de los procariotas y están estrechamente relacionadas entre sí, como lo demuestra el alto grado de homología existente en su secuencia de aminoácidos, en contraposición con las Cu,Zn-superóxido dismutasas que no tienen secuencias homólogas a aquellas enzimas, lo que parece indicar que la familia de las Cu,Zn-dismutasas y, la de las Fe y Mn-dismutasas, tienen orígenes evolutivos independientes (Harris y Steinman, 1977).

Por lo que se refiere a la distribución celular de esta familia de dismutasas, en un principio se pensó que la mangano enzima de organismos superiores estaba exclusivamente confinada en las mitocondrias. Sin embargo, hoy día se sabe que en hígado humano y de otros mamíferos la manganeso superóxido dismutasa también se encuentra en el citosol junto con la Cu,Zn-superóxido dismutasa (McCord y col., 1977c).

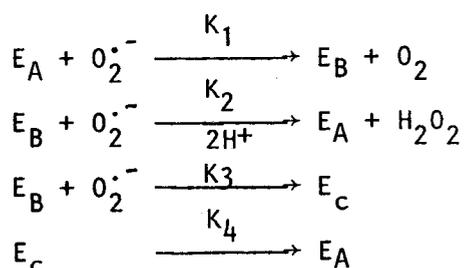
En comparación con las Cu,Zn-superóxido dismutasas, los estudios estructurales de las Mn-superóxido dismutasas son bastante escasos y aún no se ha determinado la estructura tridimensional de ninguna dismutasa perteneciente a esta familia, si bien se han realizado estudios preliminares de difracción de rayos X en cristales de las enzimas procedentes de *Escherichia coli* y mitocondrias de levadura (Beem y col., 1976), y de *Bacillus stearothermophilus* (Smit y col., 1977).

Se ha estudiado la secuencia completa de aminoácidos de la Mn-superóxido dismutasa de *Escherichia coli* B (Steinman, 1978), de *B. stearothermophilus* (Brock y Walker, 1980), y las secuencias de las regiones amino-terminales de varias manganeso dismutasas de

bacterias, levadura y mitocondrias de animales superiores, habiéndose postulado sobre esta base para estas enzimas estructuras secundarias principalmente  $\alpha$ -helicoidales, sin participación aparente de la estructura barril  $\beta$  (Harris y Steinman, 1977; Harris y col., 1980).

Recientemente, Brock y Walker (1980) han estudiado la naturaleza de los ligandos unidos al Mn del centro activo de la Mn-superóxido dismutasa de *B. stearothermophilus*. Mediante estudios de resonancia magnética nuclear de la enzima nativa y de la apoenzima, estos autores han postulado que en el centro catalítico de la enzima dimérica de *B. stearothermophilus* cuatro restos de histidina se encuentran unidos al átomo de Mn.

El mecanismo catalítico de esta familia de dismutasas es probablemente similar al de las cuprocinc superóxido dismutasas, en donde el metal activo es reducido y reoxidado alternativamente durante las sucesivas interacciones con el  $O_2^{\cdot-}$ . Los resultados de estudios preliminares basados en radiolisis de pulsos parecen confirmar este mecanismo (Pick y col., 1974). Sin embargo, McAdam y col. (1977a) utilizando también técnicas de radiolisis de pulsos, han postulado un modelo cinético para la acción enzimática de la manganeso superóxido dismutasa de *Bacillus stearothermophilus*, que es diferente del de las superóxido dismutasas que contienen Fe y Cu-Zn. Según este mecanismo, tiene lugar un ciclo rápido de oxidación-reducción con un electrón y, paralelamente, una reacción más lenta que origina una forma de la enzima que es esencialmente no reactiva frente al  $O_2^{\cdot-}$  ( $E_C$ ) y que experimenta una transformación de primer orden para dar lugar a la enzima nativa activa. El ciclo rápido implica la enzima nativa en forma oxidada ( $E_A$ ) y en forma reducida ( $E_B$ ), y el proceso puede considerarse constituido por los siguientes equilibrios:



Mediante radiolisis de pulsos se han determinado las constantes de velocidad de segundo orden para la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  por las Mn-superóxido dismutasas de *Escherichia coli* y de *Bacillus stearothermophilus*. Los valores obtenidos a pH 7,8 son de  $1,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  (Pick y col., 1974) y de  $0,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  (McAdam y col., 1977b), respectivamente. La actividad de las Mn-superóxido dismutasas, al igual que las Fe-superóxido dismutasas, muestra una dependencia del pH, como lo evidencia la disminución progresiva de sus constantes de velocidad conforme aumenta el pH desde 7 hasta 10,2, mientras que, en las mismas condiciones, la actividad de la Cu,Zn-superóxido dismutasa bovina no resulta afectada por el pH (Forman y Fridovich, 1973b; McAdam y col., 1977b).

En las manganeso superóxido dismutasas los átomos metálicos, están unidos muy firmemente a la proteína, y solamente son liberados en condiciones que provoquen la disociación de la estructura oligomérica, tales como la presencia de agentes caotrópicos como la urea o el cloruro de guanidina, a un pH ácido. De esta forma se ha llevado a cabo la eliminación reversible del manganeso de las superóxido dismutasas de *Escherichia coli* (Ose y Fridovich, 1976), *Bacillus stearothermophilus* (Harris, 1977) y *Thermus aquaticus* (Sato y Harris, 1977). En todos estos casos, la reconstitución de la manganoso-enzima activa tiene lugar por adición de  $Mn^{2+}$  a preparados --

apoenzimáticos sometidos a las mismas condiciones drásticas empleadas para la eliminación del metal. Ose y Fridovich (1979) han demostrado que en la reconstitución de la apoenzima de la mangano superóxido dismutasa de *Escherichia coli*, los cationes metálicos Co(II), Ni (II), Zn (II), Fe (II) y Cu (II) compiten con el Mn (II) por el sitio activo de la enzima. Además, el Co (II), Ni (II), y el Zn (II) son capaces de sustituir al manganeso de la enzima, ligándose a la proteína en cantidades estequiométricas, si bien ninguno de los derivados en que el Mn (II) ha sido reemplazado por otro metal es catalíticamente activo.

#### FERRO SUPEROXIDO DISMUTASAS

Yost y Fridovich aislaron y caracterizaron en 1973 la primera Fe-superóxido dismutasa a partir de células de *Escherichia coli* B. La enzima tenía color amarillo y un peso molecular de aproximadamente 40.000; contenía un átomo de  $Fe^{3+}$  por molécula, estando constituida por dos subunidades de igual tamaño. Los espectros visible y de resonancia de spin electrónico de esta enzima eran parecidos a los de la aconitasa, transferrina y conalbúmina (Yost y Fridovich, 1973). La ferro enzima no contenía sulfuro lábil y en su composición en aminoácidos era similar a la mangano superóxido dismutasa de la misma bacteria, siendo ambas enzimas sensibles al tratamiento con mezclas de cloroformo-etanol, pero resistentes a la inhibición por cianuro. Posteriormente, el estudio de las secuencias de aminoácidos de estas dos enzimas de *E. coli* demostró que las ferro y mangano enzimas estaban estrechamente relacionadas (Steinman y Hill, 1973).

Desde 1973 han sido caracterizadas numerosas Fe-superóxido dismutasas de origen procariótico incluyendo bacterias (aerobias y anaerobias) y algas. Hasta hace muy poco tiempo existía el convencimiento de que las superóxido dismutasas que contenían hierro como grupo prostético eran originarias exclusivamente de organismos procarióticos. Sin embargo, en 1979 Kanematsu y Asada, y Lengfelder y Elstner, en trabajos paralelos, purificaron y caracterizaron dos ferro superóxido dismutasas de la alga eucariótica *Euglena gracilis*, y, por otra parte, Salin y Bridges en 1980 caracterizaron una ferro superóxido dismutasa de hojas de la planta superior *Brassica campestris*. En las Tablas VI y VII se muestran algunas propiedades moleculares y la localización celular de las ferro superóxido dismutasas caracterizadas de bacterias no fotosintéticas y de organismos fotosintéticos, respectivamente.

Todavía no se ha determinado la estructura tridimensional de ninguna ferro superóxido dismutasa y los estudios estructurales de estas dismutasas son bastante escasos. Yamakura y col. (1976) han efectuado un estudio preliminar de difracción de rayos X de la enzima de *Pseudomonas ovalis*. Harris y Steinman (1977) han determinado las secuencias de aminoácidos de las regiones N-terminales de varias ferro superóxido dismutasas de algas y bacterias, y, más recientemente, Harris y col. (1980) ampliaron estos estudios a las enzimas de distintas clases de bacterias aerobias y anaerobias. Sobre la base de las secuencias de aminoácidos determinadas, se han hecho predicciones de estructuras secundarias para estas enzimas, según las cuales predomina la estructura  $\alpha$ -helicoidal y está ausente la estructura barril- $\beta$  (Harris y col., 1980) al igual que se ha postulado para las manganeso superóxido dismutasas.

El mecanismo de la dismutación catalítica del  $O_2^{\cdot -}$  por la ferro

TABLA VI. FERRO SUPEROXIDO DISMUTASAS CARACTERIZADAS DE BACTERIAS NO FOTOSINTETICAS

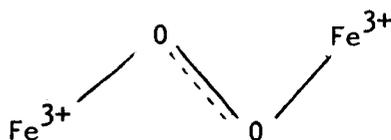
Origen	Peso molecular	Número de subunidades	Atomos de Fe/molécula	Ubicación celular	Referencias
<i>Escherichia coli</i> B.	38.700	2	1	matriz celular	Yost y Fridovich (1973)
	37.000	2	1	---	Britton y Fridovich (1977) Dougherty y col. (1978)
	38.700	-	2	---	Slykhouse y Fee (1976)
<i>Bacillus megaterium</i>	40.000	2	1	---	Anastasi y col. (1976)
<i>Pseudomonas ovalis</i>	40.000	2	1	---	Yamakura (1976)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	88.000	4	4	---	Kusunose y col. (1976b)
<i>Photobacterium leiognathi</i>	40.660	2	1,61	---	Puget y Michelson (1974a)
<i>Photobacterium sepia</i>	40.660	2	1,43	---	Puget y Michelson (1974a)
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	43.000	2	1,35	---	Baldensperger (1978)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	43.000	2	1,60	---	Hatchikian y Henry (1977)

TABLA VII. FERRO SUPEROXIDO DISMUTASAS CARACTERIZADAS DE ORGANISMOS FOTOSINTETICOS

Origen	Peso molecular	Número subunidades	Atomos de Fe/molécula	Ubicación celular	Referencias
PROCARIOTAS					
<i>Chromatium vinosum</i>	41.000	2	2	---	Kanematsu y Asada (1978a)
<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	43.000	2	2	---	Kanematsu y Asada (1978b)
<i>Spirulina platensis</i>	37.500	2	1	---	Lumsden y col. (1976)
<i>Plectonema boryanum</i>	41.700	2	2	citosol	Asada y col. (1975); Okada y col. (1979)
	36.500	2	1	---	Misra y Keele (1975)
<i>Anacystis nidulans</i>	37.500	2	1	---	Cséke y col. (1979)
EUCARIOTAS					
<i>Euglena gracilis</i>	45.000	2	2	estromas cloroplastos	Kanematsu y Asada (1979)
	45.000	2	2	" "	Kanematsu y Asada (1979)
	57.500	-	1	---	Lengfelder y Elstner (1979)
<i>Brassica campestris</i>	41.000	2	1,6	estroma cloroplastos	Salin y Bridges (1980)

superóxido dismutasa ha sido estudiado en la enzima de *E. coli* B, por Fee y McClune (1978), y en la de *Photobacterium leiognathi* por Lavelle y col. (1977), utilizándose en ambos casos técnicas de radiolisis de pulsos. Para la enzima de *Photobacterium leiognathi* es tos últimos autores han determinado una constante de velocidad de segundo orden para la reacción con el ión superóxido de  $0,55 \times 10^9$   $M^{-1} \text{seg}^{-1}$  a pH 8,0. Esta ferri superóxido dismutasa bacteriana con tiene aproximadamente 2 átomos g de hierro por mol de enzima, los cuales, según Lavelle y col. (1977) pertenecen a dos tipos diferen tes de hierro como lo demuestran los estudios llevados a cabo sobre los efectos de distintos agentes reductores sobre los espectros vi sible y de resonancia paramagnética electrónica. De acuerdo con es tos investigadores sólo uno de los átomos de hierro interviene en la catalisis enzimática, siendo este centro de hierro funcional el único que es oxidado y reducido alternativamente por el sustrato, según el mecanismo general de las superóxido dismutasas. La inter vención de un único átomo de hierro en la catálisis enzimática tam bién ha sido propuesta por Slykhouse y Fee (1976) para la enzima de *E. coli* B.

Por analogía con el mecanismo de la oxidación del hierro catalizada por la apoferritina, Vanopdenbosch y col. (1977) han postu lado que en la ferro superóxido dismutasa de *P. leiognathi* los dos átomos de hierro están suficientemente próxim os para fijar el supe róxido, pudiendo formar los dos átomos un complejo superoxo con es te radical, del tipo siguiente:



Con lo que solamente uno de los dos átomos de hierro experimen ta la reducción y oxidación alternativa, en conformidad con las hi pótesis que acabamos de mencionar, mientras que el otro sirve para

anclar el anión superóxido en posición y activar el enlace oxígeno-oxígeno. Este modelo tiene la ventaja de atribuir una función al segundo átomo metálico "inerte", que de esta manera se convierte en un ligando esencial para el sustrato. Vanopdenbosch y col. (1977), han propuesto un mecanismo idéntico para el Zn inactivo de las cu-procinc superóxido dismutasas.

En las ferro superóxido dismutasas, al igual que en las otras dos familias de dismutasas conteniendo Cu-Zn y Mn, también puede -- eliminarse reversiblemente el hierro de las proteínas, recuperándose posteriormente la actividad de las apoproteínas solamente en presencia del metal original. En las ferro superóxido dismutasas de -- las bacterias *Pseudomonas ovalis* (Yamakura, 1978) y *Photobacterium leiognathi* (Puget y col., 1977), siguiendo metódicas diferentes, y utilizando condiciones más suaves que para las Mn-superóxido dismutasas se han obtenido las correspondientes formas apoenzimáticas, llevándose a cabo posteriormente la reconstitución de la actividad enzimática con Fe (II). En la enzima de *Photobacterium leiognathi* se efectuaron ensayos de sustitución de los átomos de hierro por otros metales, encontrándose que los ligandos del lugar de enlace metálico son específicos para iones metálicos divalentes, incluyendo el  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Cr}^{2+}$ , mientras que el  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  no se pueden fijar a la apoenzima. En el caso del  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Cr}^{2+}$ , se comprobó que las metaloenzimas reconstituidas contenían solamente un átomo g de cada metal por mol de enzima, mientras que en el caso del  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  se podían unir dos átomos de metal. Sin embargo, las distintas metaloproteínas reconstituidas sólo mostraban actividad enzimática cuando contenían Fe (II).

La naturaleza de los ligandos del hierro en las ferro superóxido dismutasas está todavía por esclarecer. Yamakura (1978) ha su

gerido que grupos sulfídricos y restos de triptófano podrían estar estrechamente relacionados con el sitio de unión del hierro en la enzima.

#### IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS SUPEROXIDO DISMUTASAS

McCord y col. (1971) estudiaron la actividad superóxido dismutasa de diversos microorganismos, encontrando que esta enzima estaba presente en todos los organismos aeróbios y en los anaeróbios facultativos, mientras que en los anaeróbios obligados no se detectó actividad dismutasa. Esta distribución de la superóxido dismutasa - en todos los organismos que metabolizan el oxígeno llevó a McCord y col. (1971) a proponer que la principal función fisiológica de esta enzima consistía en la protección de las células aeróbicas frente a un importante agente de toxicidad del oxígeno, el radical superóxido, llevando a cabo su dismutación en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Estos autores postularon una nueva teoría de anaerobiosis-obligada basada en el efecto del superóxido y, según la cual, el nivel de superóxido dismutasa de un organismo, y no el de catalasa, es la base sobre la que puede ser clasificado como aeróbio, anaeróbio estricto o anaeróbio aerotolerante.

Cuando organismos facultativos como *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* eran expuestos al oxígeno se observó un incremento en la acumulación intracelular de superóxido dismutasa y además, los niveles elevados de la enzima estaban correlacionados con un aumento en la resistencia de estos microorganismos a los efectos letales del oxígeno hiperbárico (Gregory y Fridovich, 1973a, 1973b; Gregory y col., 1974).

En el caso de *E. coli*, que tiene Fe-superóxido dismutasa y -

Mn-superóxido dismutasa, las dos enzimas responden muy diferentemente a la oxigenación. La Fe-superóxido dismutasa es producida esté o no presente el oxígeno, mientras que la Mn-superóxido dismutasa sólo es producida en presencia de oxígeno (Hassan y Fridovich, 1977c). La transferencia de las células de condiciones anaerobias a aero---obias resulta en la rápida inducción de la síntesis de Mn-superóxido dismutasa, mientras que interferencias en la síntesis de esta manga no enzima hacen a las células crecidas anaeróbicamente susceptibles a la toxicidad del oxígeno (Hassan y Fridovich, 1977a).

En otros organismos se han observado correlaciones similares. Un mutante del alga verde *Chlorella* con actividades superóxido dismutasa incrementadas, era mucho más resistente a tensiones elevadas de oxígeno que la cepa nativa (Pulich, 1974). En ratas, cuando éstas eran expuestas durante varios días a tensiones de oxígeno por encima de la normal, se observó que adquirían la habilidad de sobrevivir en atmósfera de oxígeno al 100%, y este hecho estaba estrechamente correlacionado con un incremento en el contenido de superóxido dismutasa pulmonar (Crapo y McCord, 1976).

Por lo tanto, la inducción de la síntesis de Mn-superóxido dismutasa en *E. coli* y el aumento de la resistencia a la toxicidad del oxígeno, como consecuencia de la exposición al mismo, parecen estar relacionadas, si bien hay que tener en cuenta que la oxigenación de *E. coli* ó de otras células puede también inducir otros cambios además de la síntesis de Mn-superóxido dismutasa, y una de estas alteraciones podría haber sido la causa de la intensificación de la resistencia frente a la toxicidad del oxígeno.

Una evidencia importante en favor de la teoría de la toxicidadad del oxígeno por el superóxido se obtuvo mediante el uso del pa-

paraquat o metil viológeno (Hassan y Fridovich, 1977b, 1977c). Este compuesto ampliamente utilizado como herbicida, es fácilmente reducido a un radical relativamente estable, que entonces reacciona -- con el oxígeno, generando superóxido. Cuando se administra paraquat a *E. coli*, este compuesto subvierte el flujo de electrones de la vía normal de transporte electrónico, con el resultado de un incremento en la respiración resistente al cianuro y en la tasa de producción de  $O_2^{\cdot-}$ . En condiciones de aireación constante, el paraquat produce un notable incremento en la biosíntesis de Mn-superóxido dismutasa, mientras que en ausencia de oxígeno no tiene efecto alguno. Parece, por lo tanto, que el  $O_2^{\cdot-}$  bien directa o indirectamente, aumenta la tasa de síntesis de Mn-superóxido dismutasa en *E. coli*. Hassan y Fridovich (1977c) también observaron que cuando aumentaban los niveles de Mn-superóxido dismutasa como consecuencia de la exposición aeróbica al paraquat, las células se hacían resistentes a los efectos letales del oxígeno hiperbárico.

Estos mismos autores han demostrado recientemente que además del paraquat, otros compuestos redox como la piocianina, metosulfato de fenazina, estreptonigrina, juglona, menadiona, azul de metileno y el azul C, incrementan la producción intracelular de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  en *E. coli*. Además, el incremento en la actividad superóxido dismutasa de esta bacteria, causada por el paraquat y, posiblemente por los otros compuestos aludidos, parece ser debida a una síntesis enzimática *de novo* activada o dereprimida a nivel de transcripción (Hassan y Fridovich, 1979).

El estudio de mutantes con modificaciones en su actividad superóxido dismutasa ha suministrado indicaciones adicionales de que el  $O_2^{\cdot-}$  es un agente de la toxicidad del oxígeno y de que la superóxido dismutasa es una defensa esencial. Un mutante de *E. coli* que tenía un defecto, sensible a la temperatura, en su capacidad para

mantener niveles intracelulares normales de superóxido dismutasa, mostró un defecto paralelo en la tolerancia al oxígeno, y otro mutante seleccionado por su tolerancia al oxígeno hiperbárico se encontró que contenía un nivel elevado de Fe-superóxido dismutasa -- (Fridovich, 1978a).

Sin embargo, con posterioridad a la descripción de la teoría de anaerobiosis-obligada por McCord y col. en 1971, Gregory y col. (1978) detectaron actividad superóxido dismutasa en una amplia gama de anaerobios obligados, y otros investigadores lograron caracterizar varias Fe-superóxido dismutasas de los microorganismos anaerobios *Desulfovibrio desulfuricans* (Hatchikian y Henry, 1977), -- *Chromatium vinosum* (Kanematsu y Asada, 1978a) y *Chlorobium thiosulfatophilum* (Kanematsu y Asada, 1978b). Por lo tanto, la posesión de esta enzima no está restringida exclusivamente a aquellos organismos capaces de crecimiento aerobio, lo que parece entrar en conflicto con la teoría aludida de McCord y col. (1971) sobre la función protectora de esta enzima para los organismos que metabolizan el oxígeno.

En estas bacterias anaerobias existen distintos transportadores electrónicos que aseguran el acoplamiento entre la oxidación de los sustratos energéticos y la reducción de los aceptores terminales de electrones. Estos portadores electrónicos incluyen citocromos tipo b y tipo c, ferredoxina, flavodoxina, rubredoxina y menaquinona, la mayoría de los cuales son susceptibles de generar el anión superóxido en presencia de oxígeno (Hatchikian y Henry, 1977). Para explicar la presencia en anaerobios estrictos de superóxido dismutasas similares a las ferro dismutasas de organismos aerobios, se han propuesto dos hipótesis. Una es la sugerida por Lumsden y -

Hall (1975) según la cual, como consecuencia de la fotólisis del agua por la luz ultravioleta (efecto Urey), que pudo haber tenido lugar antes del establecimiento de la capa protectora de ozono en la atmósfera terrestre, se podría haber formado algo de oxígeno molecular en los océanos primitivos, contra el cual los anaeróbios estrictos tenían que estar protegidos. La segunda explicación es que la actividad superóxido dismutasa en los anaeróbios estrictos es una adquisición más reciente que permite la supervivencia de estos organismos cuando accidentalmente tienen que entrar en contacto con el oxígeno atmosférico (Hatchikian y Henry, 1977).

En la protección de las células aeróbicas contra la toxicidad producida por el oxígeno, también coadyuban con la superóxido dismutasa, en segunda línea de defensa, las enzimas hemínicas catalasa y peroxidasa. Estas enzimas catalizan la reducción divalente del  $H_2O_2$  a  $2H_2O$ , utilizando  $H_2O_2$  como donador de electrones en el caso de las catalasas, ó empleando diversos reductores en el caso de las peroxidasas. Como se indicó en la primera parte de esta Introducción, el  $H_2O_2$  puede reaccionar en determinadas condiciones con los radicales superóxido, dando lugar a la generación de una especie con gran poder oxidante, el radical  $OH^\bullet$ , por lo que la presenza de las enzimas catalasa y peroxidasa en las células constituye una ayuda importante frente a la toxicidad potencial de los radicales superóxido. Esta colaboración cobra mayor relevancia cuando se considera que niveles elevados de  $H_2O_2$ , además de dañar a los orgánulos celulares, pueden también inactivar a las superóxido dismutasas que contienen Fe y Cu-Zn como metales prostéticos.

El hecho de que el  $H_2O_2$  a elevadas concentraciones produzca la muerte de la mayoría de las células ha hecho pensar que las concentraciones elevadas de oxígeno son tóxicas porque incrementan la

producción intracelular de  $H_2O_2$ . Sin embargo, hoy día se sabe que en la mayoría de los organismos aeróbios el peróxido de hidrógeno no es el mecanismo primario de la toxicidad del oxígeno (Halliwell, 1978a). El  $H_2O_2$  está presente en concentraciones estacionarias bajas en tejidos animales, y los niveles no se incrementan por exposición a oxígeno hiperbárico (Oshino y col., 1975). Muchas bacterias y micoplasmas excretan  $H_2O_2$  en su medio ambiente en concentraciones elevadas (Costilow y Keele, 1972), y algunas algas verde-azuladas también expelen  $H_2O_2$  al medio al ser iluminadas, como producto de reacciones fotosintéticas (Halliwell, 1978b).

Todo esto ha hecho pensar que el peróxido de hidrógeno, a concentraciones bajas, puede ser tolerado por la mayoría de las células aerobias, y, de hecho, constituye un metabolito normal en plantas y animales, si bien la concentración de este compuesto no debe alcanzar niveles altos, lo que es impedido principalmente por la catalasa, y subsidiariamente por las peroxidasas, entre las que destaca la glutatión peroxidasa, presente en las células animales (Halliwell, 1974).

#### Aspectos médicos de la superóxido dismutasa

Desde la identificación de la actividad superóxido dismutasa de la eritrocupreína por McCord y Fridovich en 1969, los diversos aspectos y funciones de los radicales superóxido y de las distintas superóxido dismutasas han sido objeto de intensa investigación. Hoy día este tema es extremadamente vasto, habiéndose penetrado en muchas áreas que abarcan desde la fisiología de la hiperóxía y de la hipóxía, la protección contra las radiaciones de alta energía, hasta el mecanismo de la muerte fagocítica de las bacterias por los neutrófilos polimorfonucleares (Michelson, 1978).

Están ahora bastante avanzados los aspectos clínicos con respecto al significado patológico de niveles aberrantes de superóxido dismutasa y, el uso de esta enzima para disminuir la inflamación. Además de los estudios directos sobre el  $O_2^{\cdot-}$  las investigaciones sobre esta frontera particular en la biología químico-física han estimulado el interés por el significado biológico de otros radicales libres que contienen  $O_2$ .

Desde hace tiempo se sabe que los efectos tóxicos de las radiaciones ionizantes sobre bacterias y células animales son potenciados por el oxígeno, y se ha demostrado que dichas acciones son en parte debidas a la formación de varios radicales libres y especies activadas de oxígeno, tales como  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO\cdot$  o  $^1O_2$  (Misra y Fridovich, 1976).

El efecto de la irradiación de alta energía sobre mioblastos y células de riñón, así como la lisis fotosensibilizada de eritrocitos, han sido revisados recientemente por Michelson (1978) encontrando que en los dos primeros casos la adición a los cultivos celulares de superóxido dismutasa exógena confería un efecto radioprotector a aquellas células, lo que sugiere la participación de radicales  $O_2^{\cdot-}$  en la toxicidad debida a estas radiaciones, mientras que en la lisis fotosensibilizada de eritrocitos no se observó protección por la superóxido dismutasa, postulándose la implicación de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) producido por fotosensibilización con riboflavina.

En seres humanos se ha demostrado que la acción bactericida de los leucocitos fagocíticos es debida, en parte, a los radicales superóxido generados en el fagosoma (Michelson, 1976). Cuando los leucocitos polimorfonucleares engloban las bacterias, éstos liberan grandes cantidades de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  al medio, aparentemente debi-

do a la acción de una NAD (P)H oxidasa asociada con la membrana -- plasmática. Como las bacterias absorbidas están envueltas por una vesícula de la membrana plasmática del citoplasma leucocitario, es tán expuestas a un flujo acelerado de  $O_2^{\cdot -}$  y posiblemente también - de oxígeno singlete y  $OH^{\cdot}$ .

Se ha propuesto una teoría para explicar los mecanismos que regulan el envejecimiento ó "ageing", según la cual este proceso se debe a una acumulación progresiva en las células de moléculas proteicas defectuosas. Reiss y Gershon (1976) llevaron a cabo la purificación de la Cu,Zn-superóxido dismutasa de hígados de ratas viejas y jóvenes, resultando que la enzima homogénea de las ratas viejas era menos termostable y tenía una actividad específica más baja que la enzima de las ratas jóvenes. Apoyándose en las observaciones de Barber y Bernheim (1967) respecto a la acumulación de peróxidos lipídicos en las células durante el envejecimiento de éstas, Halliwell (1978a) ha aventurado la hipótesis de que el envejecimiento podría ser debido a una sobreexposición de las células a los radicales libres, cuando comienzan a fallar los mecanismos protectores hormonales. De esta forma, la superóxido dismutasa aparecería como la "primera línea de defensa" contra los radicales libres de oxígeno.

Michelson y su equipo del Institut de Biologie Physico-Chimique de París, han llevado a cabo un muestreo de los niveles de superóxido dismutasa en eritrocitos de personas normales y de pacientes afectados de distintos síndromes patológicos. El resultado fue que, en casos de policitemia rubra vera, trisomía-18 y trisomía-21, se detectaron niveles de superóxido dismutasa superiores a los normales. De los casos psiquiátricos estudiados se sacó la conclusión de que algunas enfermedades mentales están relacionadas con un in-

cremento en los niveles de superóxido-dismutasa, como consecuencia de estos hallazgos, Michelson (1978) ha especulado con algunas --- aproximaciones terapéuticas que podrían consistir en el uso de inhibidores de la superóxido dismutasa, o de preparaciones de anticuerpos específicos anti-Mn-SOD ó anti-Cu,Zn-SOD para la trisomía-21 o casos psiquiátricos, o en la administración de superóxido dismutasa en inyecciones cuando los niveles de esta enzima fueran demasiado bajos.

Menander-Huber y Huber (1977) han empleado la eritocupreina bovina (Cu,Zn-SOD) como droga antiinflamatoria en seres humanos y otros animales superiores, estando actualmente en trámite su utilización médica en los Estados Unidos, donde está registrada con el nombre de ontoseina. Esta superóxido dismutasa parece ser una droga antiinflamatoria efectiva y duradera que puede ser empleada en sustitución o en combinación con los fármacos antiinflamatorios habituales, y es única por lo que se refiere a carencia de toxicidad y de otras reacciones adversas. El hecho de que la superóxido dismutasa extracelular pueda ser útil (Menander-Huber y Huber, 1977) en el tratamiento de la artritis reumatoide, la osteoartritis y la inflamación como secuela de la terapia de radiación en tumores pélvicos, puede explicarse según Michelson (1978), en función de la actividad fagocítica. La liberación de  $O_2^{\cdot -}$  extracelular por granulocitos activados podría provocar daños considerables en las células adyacentes y tejido conectivo, así como la muerte del neutrófilo, ya que el plasma y los líquidos intracelulares carecen de su peróxido dismutasa.

#### Producción de superóxido en mitocondrias

En las células de los organismos superiores el orgánulo pri-

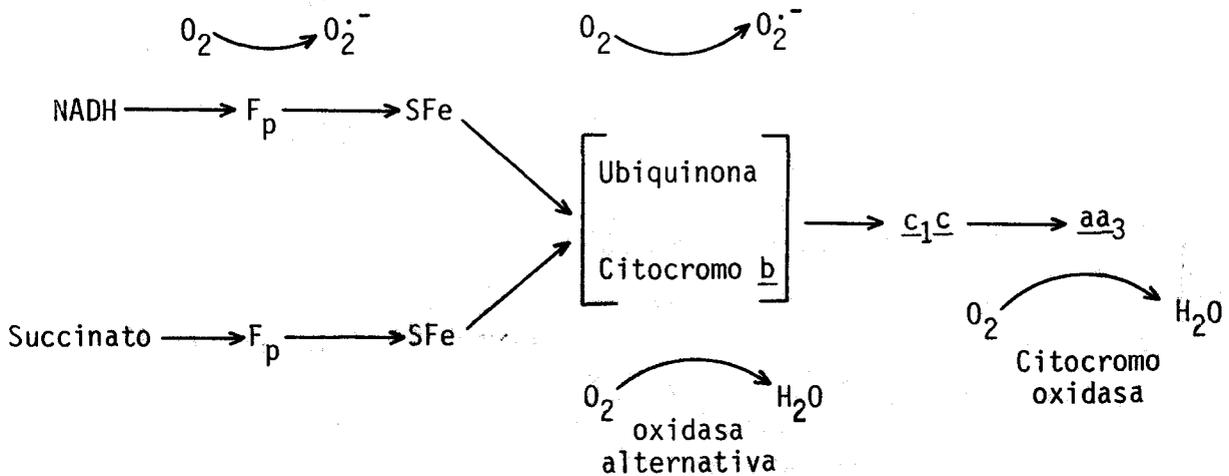
mordialmente implicado en la utilización del oxígeno es la mitocondria. Aunque es sobradamente conocido que este orgánulo cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua, con la conservación concomitante de energía química en forma de ATP, sin embargo, la cuestión de si esta reducción tetravalente es la única forma de utilización del oxígeno por la mitocondria no ha gozado de mucha atención hasta años recientes. Esta situación cambió cuando se llegó a demostrar la presencia en la matriz mitocondrial de dos enzimas -- que reaccionan con especies de oxígeno parcialmente reducidas: la manganeso superóxido dismutasa; y la seleno-proteína glutathion peroxidasa, presente en células animales, que reacciona con el  $H_2O_2$  y otros hidroperóxidos (Flohé y col., 1973).

Como hemos señalado anteriormente, se ha demostrado la localización mitocondrial de la Mn-superóxido dismutasa en diversos organismos eucarióticos, incluyendo levadura y distintos animales superiores. En plantas superiores, aunque todavía no ha sido caracterizada ninguna Mn-dismutasa, existen evidencias para pensar en su ubicación en mitocondrias de plantas de maíz (Giannopolitis y Ries, 1977a; Baum y Scandalios, 1979), espinaca (Jackson y col., 1978) y tubérculos de alcachofa (Arron y col., 1976).

Se sabe que la citocromo oxidasa mitocondrial cataliza la reducción por cuatro electrones del oxígeno a agua, sin que en este proceso se hayan podido detectar productos intermedios de reducción del oxígeno (Boveris, 1977). Flohé y col. (1977) han conseguido detectar la formación de radicales superóxido y de  $H_2O_2$  en mitocondrias y en partículas submitocondriales de mamíferos. La tasa de producción de  $O_2^{\cdot-}$  en estos sistemas es mayor que la de producción de  $H_2O_2$ . Considerando la dismutación espontánea del superóxido, parece lógico suponer que la formación de  $H_2O_2$  en partículas submito

condriales procede predominantemente, sino exclusivamente, del  $O_2^-$ . En mitocondrias aisladas de mamíferos y funcionalmente intactas, la tasa de generación de  $H_2O_2$  es del orden, nada despreciable, de 0,5-1,0 nmoles de  $H_2O_2$  por mg proteína/min (Flohé y col., 1977), y como las condiciones empleadas en estos ensayos se aproximan al status fisiológico, se puede considerar que la reducción incompleta del oxígeno por la cadena respiratoria es un hecho común que tiene lugar *in vivo*. De hecho, Rich y Bonner (1978) han demostrado que el consumo de oxígeno para producir agua, vía citocromo oxidasa, representa un 95% del consumo total del oxígeno en mitocondrias normales de plantas superiores sensibles al cianuro. En mitocondrias animales Flohé y col. (1977) han propuesto que los radicales superóxido se originan mediante la reducción monovalente del oxígeno molecular por el citocromo  $b_{566}$ , un componente de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Los sitios de producción del anión superóxido en mitocondrias y partículas submitocondriales de plantas superiores han sido estudiados por Rich y Bonner (1978). En mitocondrias de plantas superiores está descrita la existencia de una "oxidasa alternativa", insensible al cianuro y a la antimicina A, capaz de reducir el oxígeno a agua vía  $H_2O_2$ , pero parece ser que en este proceso no intervienen los radicales superóxido (Palmer, 1976; Rich y Bonner, 1978). Las vías de consumo de oxígeno en mitocondrias vegetales o en partículas submitocondriales, según Rich y Bonner (1978), son las indicadas en la figura:



donde  $F_p$  = flavoproteína, y  $SFe$  = centros sulfoferricos

La reducción directa del oxígeno a superóxido tiene lugar en dos zonas de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La primera corresponde a la región flavoproteínica del segmento de la NADH deshidrogenasa, siendo probablemente responsable la flavoproteína o quizás un centro sulfoferrico; y la segunda zona, de acuerdo con los autores mencionados, está localizada en la región de la ubiquinona-citocromos  $b$ . Si bien es obvio que las vías más importantes de consumo de oxígeno son las de la citocromo oxidasa y de la "oxidasa alternativa", sin embargo, las dos rutas de generación de superóxido mitocondrial parecen actuar produciendo cortocircuitos o drenaje de electrones en la cadena de transporte electrónico, cuya posible utilidad se desconoce.

Por otra parte, Ninneman y col. (1977) han demostrado que la irradiación de complejos multienzimáticos de mitocondrias animales suplementados con flavinas solubles y un donador electrónico para la flavina, resulta en una incorporación constante de oxígeno a -- una tasa que depende de la intensidad de la luz y de la concentración de flavina. En estas reacciones se detectó la formación de su peróxido, el cual sirve de donador electrónico selectivo para los citocromos del tipo b de la cadena de transporte electrónico. Dado que las flavoproteínas son compuestos frecuentes en distintas - vías metabólicas, y la conocida existencia de distintas fotoreac-- ciones con intervención de flavinas, Ninnemann y col. (1977) han - sugerido que la luz podría modificar el metabolismo celular a tra-- vés de fotoreacciones dependientes de flavinas, y en este sentido, la fotoproducción de  $O_2^-$  podría resultar en cambios dependientes - de la luz de distintos componentes celulares y vías metabólicas.

De las consideraciones expuestas, se deduce la posibilidad - de que el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido pueden existir simultáneamente en mitocondrias. Esta situación favorece - la formación de radicales todavía más letales o de especies de oxí-- geno de alta energía, y, ciertamente, requiere un sistema enzimáti-- co efectivo para la protección de las estructuras mitocondriales - frente a ataques oxidativos inespecíficos. Como no parece existir catalasa en las mitocondrias, el sistema protector podría consis-- tir en la Mn-superóxido dismutasa mitocondrial, y en la glutathion peroxidasa -en las células animales- en conexión con la glutathion reductasa e isocitrato deshidrogenasa suministrando NADPH (Halli-- well, 1978a).

Algunos modelos experimentales revelan las consecuencias para un sistema biológico de una protección insuficiente frente a especies de oxígeno altamente reactivas. Así, por ejemplo, preparados puros de membranas internas mitocondriales en presencia de glutatión, como agente autooxidable, son descompuestos lentamente con formación de malondialdehído, un producto típico de la peroxidación de los lípidos. Esta peroxidación de membranas puede ser retardada durante diez horas e inhibida en casi un 50%, por adición al medio de incubación de superóxido dismutasa  $7 \times 10^{-8} \text{ M}$  (Zimmerman y col., 1973). Este hecho está de acuerdo con otras observaciones que caracterizan a la superóxido dismutasa como un eficiente protector de varias estructuras biológicas, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y membranas lipídicas, y al radical superóxido como un metabolito reactivo del oxígeno con una poderosa capacidad letal indirecta (Lavelle y col., 1973; Halliwell, 1978a). Además, como la membrana interna mitocondrial es rica en hemoproteínas, que pueden catalizar la peroxidación lipídica, y tiene un alto contenido en ácidos grasos insaturados (Tyler, 1975c), es probable que una función importante de las manganeso y Cu,Zn-superóxido dismutasas, localizadas en cada lado de la membrana (Weisiger y Fridovich, 1973b), sea impedir la peroxidación y desintegración de su estructura.

Tyler (1975b) ha demostrado en células animales que los radicales superóxido formados durante la actividad de la cadena respiratoria, inhiben a la NADH-deshidrogenasa mitocondrial ligada a dicha cadena, habiendo postulado que esta inactivación es debida a la oxidación de grupos tiólicos de la NADH-deshidrogenasa por el  $\text{O}_2^{\cdot -}$ . La presencia de la superóxido dismutasa en el espacio matriz de la mitocondria (Weisiger y Fridovich, 1973b; Tyler, 1975c) en -

estrecha proximidad a la NADH-deshidrogenasa situada en la cara matriz de la membrana interna mitocondrial (Tyler, 1975b) parece indicar que la superóxido dismutasa mitocondrial está muy eficientemente situada para proteger a la deshidrogenasa frente a los efectos lesivos directos o indirectos del  $O_2^{\cdot-}$ , con lo que la dismutasa aseguraría el mantenimiento, en presencia de oxígeno, del papel clave de la deshidrogenasa en la actividad del ciclo del ácido cítrico y en las reacciones de conservación energética.

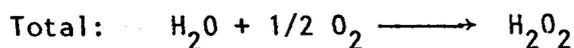
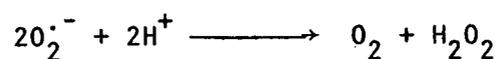
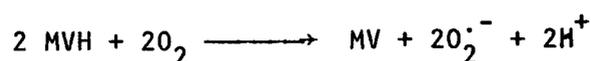
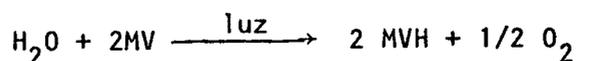
#### Superóxido y superóxido dismutasas en organismos fotosintéticos

En las Tablas III, Vy VII, se han indicado las distintas familias de superóxido dismutasas que han sido caracterizadas hasta el momento de organismos fotosintéticos,

En los cloroplastos de las plantas superiores *Spinacia oleracea* y *Beta vulgaris* se han localizado actividades superóxido dismutasa en el estroma y también ligadas a las lamelas cloroplastídicas (Asada y col., 1973; Elstner y Heupel, 1975, 1976). Según Asada y col. (1973, 1974) tanto la dismutasa soluble como la ligada son del mismo tipo, sensibles al cianuro, y conteniendo por lo tanto cobre y cinc. Elstner y Heupel (1975) han demostrado que aproximadamente un tercio de la actividad superóxido dismutasa cloroplastídica (unas 30 unidades enzimáticas por mg de clorofila) está unida a las lamelas.

Las plantas superiores, algas eucariotas y las algas verde-azuladas son capaces de utilizar el agua como donador electrónico dando lugar al conocido desprendimiento de oxígeno molecular, pero la incorporación inversa de oxígeno también tiene lugar en tejidos fotosintéticos iluminados. La fotoreducción del oxígeno molecular

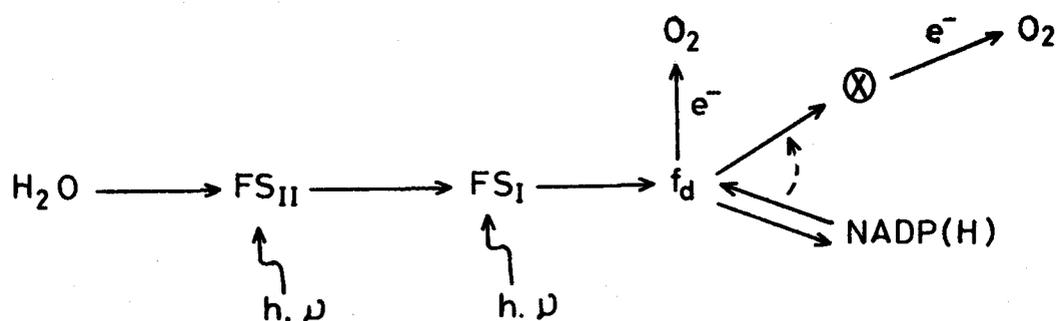
a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por cloroplastos iluminados fue demostrada por Mehler en -- 1951, y más recientemente, se ha descubierto que el radical superóxido es el producto inicial de la reducción fotosintética del oxígeno. Epel y Neuman (1973) utilizando el metilviológeno como portador electrónico entre el cloroplasto y el oxígeno, han demostrado que la reducción del  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reacción de Mehler, puede ser considerada como una reacción total que comprende la reducción univalente del  $\text{O}_2$  y la dismutación del  $\text{O}_2^{\cdot-}$ :



La reducción fotosintética del oxígeno, también denominada "transporte electrónico pseudocíclico", y la producción de peróxido dependiente de la luz ha sido observadas en algas intactas (Patterson y Myers, 1973; Glidewell y Raven, 1976; Radmer y Kok, 1976), en cloroplastos intactos aislados de plantas superiores (Egneus y col., 1975), y en lamelas aisladas de cloroplastos (Arnon y col., 1967; Bothe, 1969; Telfer y col., 1970; Elstner y Heupel, 1973).

Por lo que se refiere al fotosistema I, se sabe que la ferredoxina y, eventualmente otros compuestos localizados en el lado reductor de este fotosistema, como flavinas, quinonas, adrenalinas, dopamina y adrenocromo, están implicados en la donación de electro

nes al oxígeno molecular (Allen, 1977). En lamelas aisladas de cloroplastos, la reducción del oxígeno es activada tan pronto como es reducido aproximadamente un 80% del reservorio de NADP (Eltner y Heupel, 1973). Por otra parte, se sabe que la formación de  $O_2^-$  también es posible en lamelas aisladas de cloroplastos en la oscuridad, a expensas del NADPH, vía la NADP-ferredoxin reductasa y la ferredoxina (Eltner y Konze, 1974). Las dos reacciones anteriores han sido resumidas por Eltner (1979) en la Figura siguiente:



$\otimes$  = cofactor de la reducción del oxígeno

$\dashv$  = interruptor de la reducción del NADP a la reducción del  $O_2$

A partir de experiencias con cloroplastos de plantas superiores tratadas con herbicidas Eltner y Youngman (1978) han descrito modelos para algunas reacciones observadas *in vivo* donde están implicadas especies activadas de oxígeno, los cuales se indican en la Figura 4.

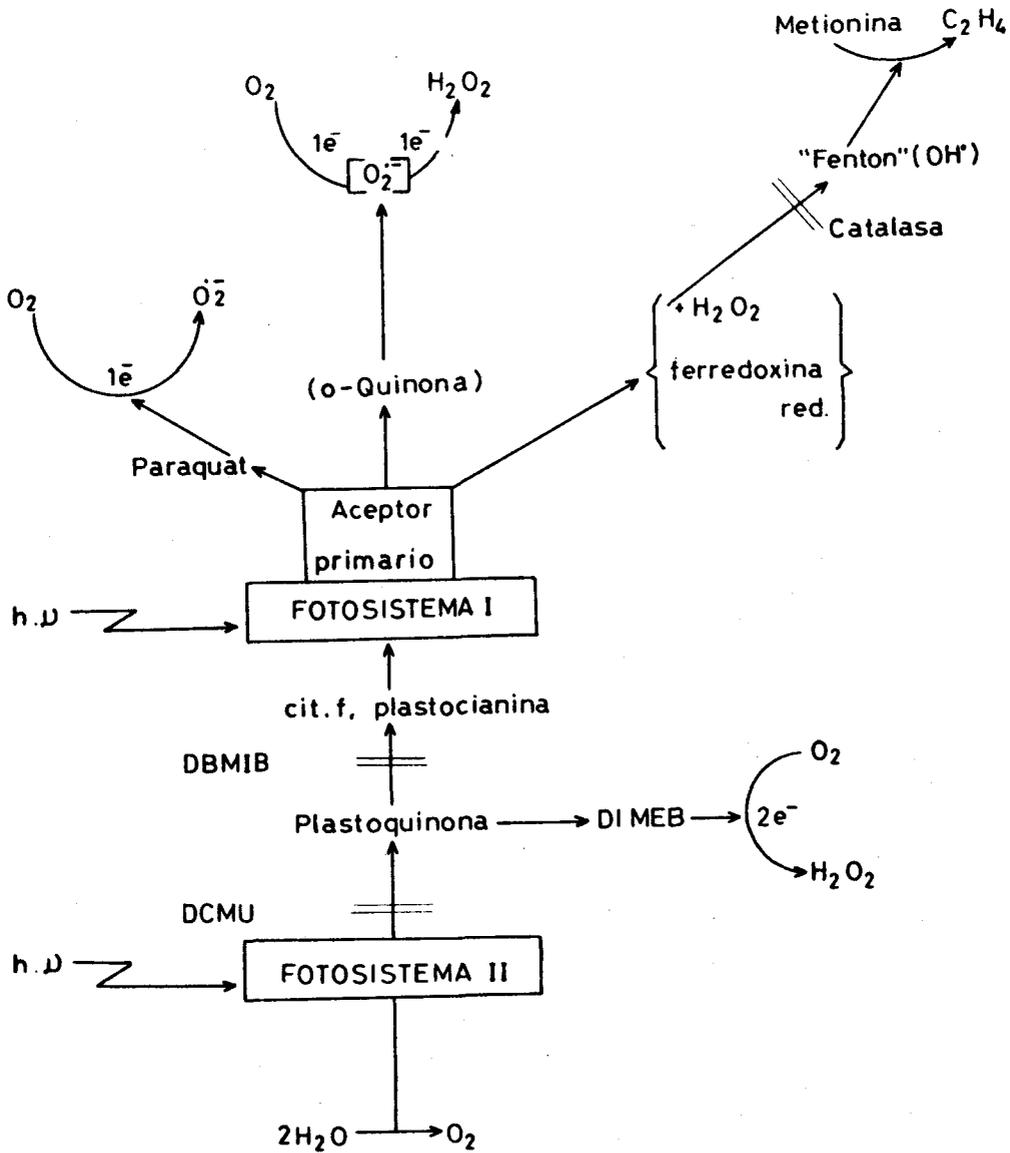


Fig. 4. Sitios y productos de la reducción fotosintética del  $O_2$ .  
 DCMU = Diclorofenil-dimetilurea; DBMIB = Dibromometil-isopropil-benzoquinona; DIMEB = 2,3-dimetil-5,6-metilen dioxil p-benzoquinona.

Según estos investigadores, en cloroplastos por mediación de la luz se producen las especies activadas de oxígeno siguientes: - oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peróxidos orgánicos y sus radicales ( $ROOH$ ,  $ROO^{\cdot}$ ), y, -- complejos metalo- $O_2$  como reactivos tipo Fenton o ión perferrilo -- ( $Fe-H_2O_2$ ,  $Fe^{2+} - O_2^{\cdot-}$ ). Sin embargo, no se encontraron evidencias de la fotoproducción del radical  $OH^{\cdot}$ . El fotosistema II parece estar implicado en la formación de  $^1O_2$ ,  $H_2O_2$  y  $ROOH$ ; mientras que en el fotosistema I puede tener lugar la generación de  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , complejos metalo- $O_2$ , y  $ROOH$ .

Por lo que respecta a las posibles funciones en los cloroplastos de las especies activadas de oxígeno, Takahama y Nishimura (1975) han demostrado que, en cloroplastos iluminados, el oxígeno singlete producido lleva a cabo la peroxidación de los lípidos de la membrana. Según Elstner y Konze (1974) las especies  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot}$  pueden producir la desaturación de los ácidos grasos, y también la hidroxilación de algunos compuestos aromáticos de cloroplastos, como el ácido cinámico y el p-cumárico (Halliwell, 1975).

Se ha sugerido que el  $H_2O_2$  y los radicales de oxígeno actúan como "iniciadores" de la fotorrespiración. De acuerdo con Plant y Gibbs (1970), el  $H_2O_2$  puede producir el desdoblamiento directo de un complejo de la transcetolasa con formación de glicolato, mientras que para los radicales de oxígeno se ha postulado una función "activadora" de la ribulosa-difosfato carboxilasa, enzima que actúa como una oxigenasa y desdobla la ribulosa difosfato, dando lugar a la formación de fosfoglicerato y fosfoglicolato (Wildner, 1976). En este contexto, Bhagwat y Sane (1978) han estudiado el mecanismo de la reacción oxigenásica catalizada por la ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa, utilizando superóxido dismutasa de eritrocitos bovinos. La inclusión de la superóxido dismutasa en la mezcla de reacción --

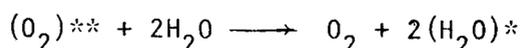
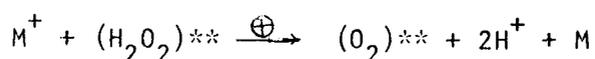
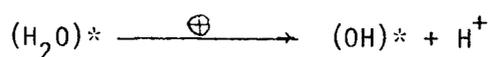
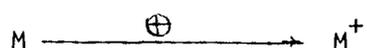
producía una inhibición fuerte de la reacción oxigenásica, y además se encontró que la ribulosa-1,5-difosfato competía por los aniones superóxido con la dismutasa y el azul de nitrotetrazolio (NBT), el cual también inhibía la reacción oxigenásica. Estas observaciones sugieren la implicación de los radicales superóxido en la reacción oxigenásica.

Por otra parte, Halliwell (1978b) ha postulado una función para la fotorrespiración consistente en la protección del cloroplasto contra la destrucción fotooxidativa. A elevadas intensidades luminosas y en ausencia de  $\text{CO}_2$ , no habría  $\text{NADP}^+$  disponible para aceptar electrones y, entonces, la tasa de generación de radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$  por el fotosistema I podría incrementarse hasta el punto de desbordar los mecanismos protectores del cloroplasto. En cambio, la fotorrespiración, mediante el reciclaje continuo de  $\text{CO}_2$ , aseguraría siempre el suministro de este gas a los cloroplastos, incluso cuando las plantas estuvieran en aire exento de  $\text{CO}_2$ .

Otra función propuesta para las especies de oxígeno activado en el cloroplasto es su participación en la formación de etileno. Konze y Elstner (1976) han demostrado que en cloroplastos aislados tiene lugar el desprendimiento de etileno a partir de metionina, en presencia de piridoxalfosfato y ferredoxina. Aunque la formación de etileno es inhibida por la luz en hojas de remolacha dañadas, la producción de este compuesto, en general, es estimulada por la luz, y Elstner y col. (1976) han propuesto que en esta reacción está implicada la cadena de transporte electrónico fotosintético y un ciclo quinona-semiquinona inducido por fenolasa, como sistema activador del oxígeno. Pero aparte de esta evidencia indirecta, no existen pruebas de que los cloroplastos representen una fuente importante de etileno en plantas, ni de que los radicales  $\text{OH}^{\cdot}$  estén implicados

en su formación, ya que la presencia de estos radicales libres en cloroplastos es bastante cuestionable (Eltner, 1979).

Para explicar la generación y cooperación de los cuatro equivalentes redox necesarios para la oxidación del agua a oxígeno que tiene lugar en la unidad operativa Y del fotosistema II, Renger -- (1977) ha propuesto un modelo molecular, según el cual en la oxidación secuencial del agua intervienen los radicales libres  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y el peróxido de hidrógeno. Estos intermediarios estarían estabilizados en grupos funcionales que contienen Mn como ión central, complejos a los que Renger denomina "criptohidroxilo"  $(\text{OH})^*$ , "criptoperhidroxilo"  $(\text{H}_2\text{O}_2)^{**}$ , y "criptosuperóxido"  $(\text{O}_2)^{**}$ , respectivamente. Sobre esta base ha propuesto la serie de reacciones siguientes para explicar la oxidación fotosintética del agua:



donde  $\oplus$  indica un equivalente redox oxidante producido por la chl- $a_{11}$  y transferido al sistema enzimático rompedor del agua (Y); uno ó dos asteriscos simbolizan complejación mono o binuclear con los grupos funcionales de Mn, y M es un donador de un electrón, cuya forma oxidada es estable en la oscuridad. Sin embargo, esta hipótesis de Renger, aunque proporciona una explicación al intrincado problema del -

mecanismo molecular del desprendimiento de oxígeno fotosintético, hoy por hoy resulta algo especulativo, pues como hemos indicado anteriormente, en el fotosistema II no se ha demostrado la producción de radicales  $O_2^{\cdot-}$  y  $OH^{\cdot}$ .

Según Asada y col. (1977b) la concentración de superóxido dismutasa en cloroplastos de espinaca y en células de algas verdeazuladas es de aproximadamente  $1 \times 10^{-5}$  M, un valor del mismo orden que el encontrado para la Mn-superóxido dismutasa de hígado humano (McCord y col., 1977c). Utilizando métodos de competición cinética y la constante de dismutación espontánea del  $O_2^{\cdot-}$ , se ha calculado que, en ausencia de compuestos que reaccionen con estos radicales, la concentración estacionaria de  $O_2^{\cdot-}$  en cloroplastos es de aproximadamente  $1,3 \times 10^{-5}$  M (Asada y col., 1977b). Como indicamos anteriormente, la actividad Cu,Zn superóxido dismutasa presente en cloroplastos está repartida entre el estroma y las lamelas, por lo que la mayor parte del  $O_2^{\cdot-}$  formado en cloroplastos iluminados puede ser secuestrado por la Cu,Zn superóxido dismutasa.

Sobre la base de la constante de velocidad aparente para la reacción entre el  $O_2^{\cdot-}$  y la Cu,Zn superóxido dismutasa ( $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ), Asada y col. (1977b) han estimado que en cloroplastos iluminados conteniendo Cu,Zn superóxido dismutasa  $10^{-5}$  M, la concentración estacionaria de  $O_2^{\cdot-}$  es de  $6 \times 10^{-9}$  M, aunque este valor es probablemente mayor que la concentración real debido a la existencia de otros mecanismos de reacción del  $O_2^{\cdot-}$  independientes de la superóxido dismutasa. Según apreciaciones de estos mismos autores basadas en la inducción de lesiones en plantas con herbicidas, los cloroplastos de las plantas verdes son resistentes a concentraciones de superóxido de  $10^{-9}$  M, pero resultan dañados a concentraciones de  $10^{-7}$ - $10^{-8}$  M.

Aparte del desproporcionamiento del  $O_2^{\cdot-}$  por la superóxido dis

mutasa, estos radicales también pueden ser eliminados por interacción con varios componentes de los cloroplastos como el citocromo f, plastocianina, ferredoxina,  $Mn^{2+}$ , ascorbato y glutation reducido. Sin embargo, si se tienen en cuenta las constantes de velocidad de reacción de estos compuestos con el  $O_2^{\bullet-}$  ( $10^5-10^6 M^{-1} seg^{-1}$ ) y sus concentraciones en los cloroplastos ( $10^{-3}-10^{-5}M$ ), es de esperar que la contribución de estas reacciones a la eliminación del  $O_2^{\bullet-}$  sea bastante inferior que la debida a la superóxido dismutasa (Asada y col., 1977b).

Otra función postulada para la superóxido dismutasa es la relacionada con la labilidad frente al oxígeno del complejo enzimático de la nitrogenasa, presente en bacterias fotosintéticas, algas verde-azuladas, y en los nódulos de la raíz de plantas leguminosas en simbiosis con *Rhizobium*.

En las algas verde-azuladas la nitrogenasa está confinada en los heterocistos, de paredes gruesas, donde no tiene lugar la fotogeneración de  $O_2$ , ya que el aparato fotosintético, ordinarios, está presente en las células vegetativas. Sin embargo, por su carácter aeróbico, las algas pueden estar expuestas al peligro de la difusión del oxígeno en los heterocistos. Henry y col. (1978) han demostrado la presencia en *Anabaena cylindrica* de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, tanto en células vegetativas como en heterocistos, sugiriendo estos investigadores que ambas enzimas intervienen en la protección de los sistemas donadores de protones que participan en la fijación del nitrógeno y, en el metabolismo de  $H_2$  de los heterocistos.

En las leguminosas fijadoras de nitrógeno, la leghemoglobina actúa de barrera de oxígeno en los nódulos de la raíz, manteniendo estabilizadas bajas concentraciones de  $O_2$ , en un rango óptimo para la función de la nitrogenasa. Además de este mecanismo, Yates (1977)

ha descrito la presencia en los nódulos de superóxido dismutasa junto con catalasa y peroxidasa, que podrían actuar como un mecanismo protector adicional frente a posibles daños indirectos producidos - por los radicales superóxido.

OBJETO Y JUSTIFICACION DEL TRABAJO

El estudio del mecanismo de acción de los micronutrientes en la planta a nivel enzimático constituye una de las líneas de investigación de la Unidad de Bioquímica Vegetal de la Estación Experimental del Zaidín.

En experiencias llevadas a cabo en nuestro laboratorio, utilizando plantas de guisante cultivadas en invernadero, se detectó la presencia en extractos crudos de hojas de tres superóxido dismutasas electroforéticamente distintas. Dos de estas actividades pertenecían a la familia de las cuprocinc-superóxido dismutasas, a juzgar por su sensibilidad al cianuro, enzimas que ya habían sido caracterizadas en *Pisum sativum* y en otras plantas superiores. En cambio, la tercera actividad detectada era resistente al cianuro - propiedad esta característica de las manganeso y ferro superóxido dismutasas.

Estudiando el efecto de distintos niveles nutricionales de manganeso sobre el espectro de las isosuperóxido dismutasas de hoja de guisante, se observó que concentraciones limitantes de manganeso producían una inhibición estadísticamente significativa de la actividad resistente al cianuro, lo que indujo a pensar que se tra

taba de una Mn-superóxido dismutasa (Del Río y col., 1977). La correlación existente entre las actividades de las tres isoenzimas - de superóxido dismutasa y los niveles nutritivos de Mn llevó a postular la utilización de este sistema enzimático como indicador del manganeso biológicamente activo implicado en el metabolismo celular y, a proponer su empleo para el estudio de la función e interacciones entre los micronutrientes Mn, Cu y Zn en la célula vegetal (Del Río y col., 1978).

Como se ha señalado en la Introducción, en organismos fotosintéticos solamente han sido caracterizadas hasta la fecha dos -- manganeso superóxido dismutasas, aquellas procedentes de la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas spheroides* (Lumsden y col., 1976) y de alga eucariótica *Porphyridium cruentum* (Misra y Fridovich, 1977). Por lo tanto, al no existir antecedentes bibliográficos sobre las propiedades y características de esta metaloenzima de plantas superiores, se consideró de interés llevar a cabo el aislamiento, purificación y caracterización de la Mn-superóxido dismutasa - de hojas de la planta *Pisum sativum*, especie habitualmente utilizada en nuestro laboratorio y en la que se demostró indirectamente - la presencia de esta dismutasa.

Indudablemente, la función más importante del manganeso en la planta es aquella relacionada con su implicación en el proceso primario de la fotosíntesis. El principal "locus" de la deficiencia de Mn en plantas está claramente identificado como el fotosistema II, donde desempeña por lo menos dos funciones en sitios diferentes (Von Kameke y Wegmann, 1977). Una de ellas está directamente relacionada con el desprendimiento de oxígeno, como lo prueba - el que la reacción de Hill se deprima en situaciones de deficiencia en Mn, paralelamente al contenido de este metal en cloroplastos (Anderson y Pylotis, 1969; Cheniae y Martín, 1970).

Precisamente, una razón de la carencia de información acerca del mecanismo de acción del manganeso en el cloroplasto, radica en las escasas evidencias existentes sobre las identidades de los complejos de este metal presentes en el orgánulo. La caracterización de estos compuestos es condición indispensable para elucidar la -- función fisiológica específica del metal en la fotosíntesis. Por -- otra parte, si se considera la implicación del radical  $O_2^{\cdot-}$  en la -- cadena de transporte electrónico fotosintética y mitocondrial, habrá que suponer una función para la Mn-superóxido dismutasa en el metabolismo del cloroplasto y de la mitocondria, por lo que su investigación podría constituir una contribución al esclarecimiento del papel del manganeso en la planta y, particularmente, a su posible participación en el sistema fotolítico del agua del fotosistema II.

Independientemente de la función fisiológica específica de -- esta enzima en las reacciones fotosintéticas del cloroplasto o en otro lugar celular, la obtención de preparados enzimáticos homogéneos de una mangano superóxido dismutasa de una planta superior, -- unido al conocimiento de sus propiedades y características químico -- físicas, representa un primer paso obligado para abordar el estudio cinético de la acción de la enzima, así como la investigación de -- sus relaciones estructura-función. Adicionalmente, la caracterización de esta nueva mangano enzima puede ser de utilidad para la -- realización de estudios filogenéticos comparativos entre la Mn-superóxido dismutasa de una planta superior, y las cuprocinc y ferro -- superóxido dismutasas de otros organismos fotosintéticos, así como con las superóxido dismutasas procedentes de otros orígenes, lo -- que podría contribuir al esclarecimiento de la compleja historia -- evolutiva de estas metaloenzimas.

MATERIAL Y METODOS

## MATERIAL VEGETAL

Se han utilizado plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) variedad Lincoln.

## CONDICIONES DE CULTIVO

### 1º Germinación y crecimiento de la plántula.

Las semillas utilizadas, con un índice de germinación del 95%, se distribuyeron en bateas de polietileno que contenían una capa de arena de cuarzo (tamaño partícula) humedecida, cubierta por otra capa de arena seca a la que se le añadía agua en cantidad suficiente para mantener el conjunto en condiciones óptimas de humedad y aireación.

Las bateas se mantuvieron en estufa a 25°C durante 72 horas al término de las cuales comenzaron a emerger las plántulas, trasladándose entonces al invernadero. Periódicamente se iban reponiendo las pérdidas de agua debidas a la transpiración.

Cuando las plántulas alcanzaron una etapa fisiológica equivalente a la tercera o cuarta ramificación del tallo, lo que ocurría a los 20 ó 30 días después de la siembra, se trasplantaban a los medios hidropónicos.

### 2º Cultivo en invernadero con solución hidropónica completa.

La solución nutritiva utilizada tenía un pH de  $5,5 \pm 0,2$  y la

composición siguiente en meq/l:  $\text{NO}_3^-$ , 12,09;  $\text{PO}_4\text{H}_2^-$ , 4,03;  $\text{SO}_4^{2-}$ , 3,02;  $\text{K}^+$ , 5,21;  $\text{Ca}^{2+}$ , 10,42;  $\text{Mg}^{2+}$ , 3,91; y en ppm: Fe, 5,0; Mn, 0,5; B, 0,5; Cu, 0,05; Zn, 0,05.

Esta solución se preparaba en el momento de ser utilizada, a partir de soluciones monosalinas de mayor concentración, empleando productos calidad Probus (reactivo) para los macronutrientes y Merck -- (p.a.) para los micronutrientes, que se disolvían en agua desmineralizada con un contenido en sales no superior a 2 mg/l.

Para el cultivo, se utilizaron recipientes tronco cónicos de polietileno con una capacidad de 2,5 litros. En las tapaderas de los mismos se practicaron seis orificios circulares de 2 cm de diámetro, en los que se colocaron las plántulas sostenidas por pequeños cilindros de esponja de plástico que presentaban una incisión radial para alojar el tallo.

Las plántulas se cultivaron mediante un sistema de solución fluyente en circuito cerrado (Leal y col., 1975) y las soluciones nutritivas se renovaban cuando el pH variaba más de 0,5 unidades. Este sistema no sólo permite una aireación constante y suficiente de la solución nutritiva, sino también el transporte de la misma a las diferentes unidades de cultivo.

En algunas ocasiones, cuando se precisó una gran cantidad de material vegetal, las plantas también se cultivaron en cámara de cultivo Conviron mod. PGW-36, con control de temperatura, humedad y fotoperiodo. Las condiciones de crecimiento eran análogas a las mencionadas para invernadero salvo que se utilizó un sistema de cultivo con solución no fluyente, con su correspondiente dispositivo de aireación.

Las plantas se recolectaron al final de la etapa de floración. Se separaron las hojas y se lavaron sucesivamente con abundante agua

corriente y agua destilada, secándolas finalmente sobre papel de filtro.

#### PREPARACION DE EXTRACTOS CRUDOS DE HOJAS

Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperaturas entre 0-4°C. Las muestras de hojas (1,2-7,5 Kg), en lotes de 250 g se homogeneizaron en 500 ml de buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 conteniendo --- EDTA 0,1 mM y Tritón X-100 al 0,2%. Se empleó un homogeneizador Sorvall Omnimixer, realizándose la trituración a velocidad tope durante 3 min.

El homogenado se filtró por cinco capas de malla de nylon y se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada Sorvall superspeed RC2-B. En estas condiciones, el extracto crudo obtenido de la centrifugación contenía la mayor parte de la actividad superóxido dismutasa presente en el homogenado.

#### REACTIVOS

Buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, Tritón X-100 al 0,2%.

Tris 0,1 M (12,11 g de Tris, calidad Merck p.a. , por litro de agua destilada) ..... 500 ml

ClH 0,1 M (8,3 ml de ClH concentrado  $d=1,19$ , calidad Merck p.a. , por litro de agua destilada) .....  $\approx$  400 ml

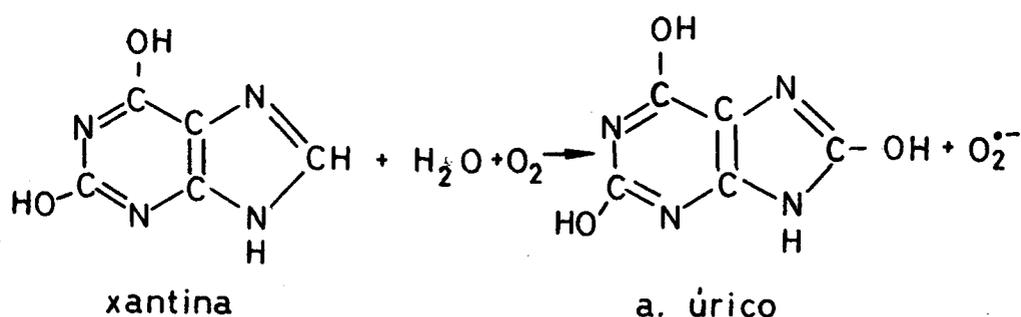
Se ajusta al pH indicado con la solución clorhídrica y se enrasa a un litro con agua destilada. A continuación se llevó al 0,2% (v/v) con Tritón X-100, calidad Sigma.

EDTA 0,1 mM (0,0372 g/l de buffer)

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD SUPEROXIDO DISMUTASA

### Métodos basados en la generación enzimática de radicales superóxido

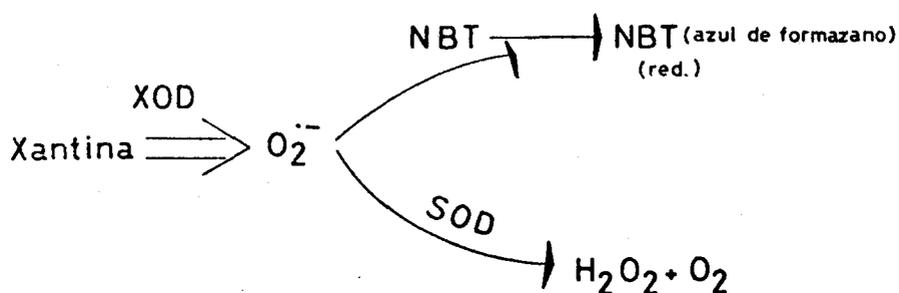
Como sistema productor de  $O_2^{\cdot-}$  se empleó el de la xantina-xantina oxidasa. Esta enzima es una ferrosulfoflavoproteína que cataliza la oxidación por oxígeno molecular de la xantina e hipoxantina, y contiene dos grupos de FAD, dos átomos de Mo y ocho de Fe por molécula. Cuando la xantina oxidasa utiliza como sustrato la base púrica xantina, en el curso de la reacción con el oxígeno molecular (McCord y Fridovich, 1968a), tiene lugar la formación del radical superóxido, según la reacción:



#### 1. Detección de $O_2^{\cdot-}$ con azul de nitrotetrazolio (NBT).

Este método se empleó en la determinación de la actividad SOD en cada una de las fracciones obtenidas en las diferentes etapas de purificación de la enzima.

El ensayo utilizado fué el descrito por Beauchamp y Fridovich (1971). El radical  $O_2^{\cdot-}$  producido por el sistema xantina-xantina oxidasa reduce al colorante NBT dando lugar a la formación de azul de formazano, pero en presencia de la superóxido dismutasa se deprime la formación de este compuesto, tal como se indica en la figura adjunta. De esta manera se puede calcular el porcentaje de inhibición de esta reacción ó actividad SOD según se indica más adelante.

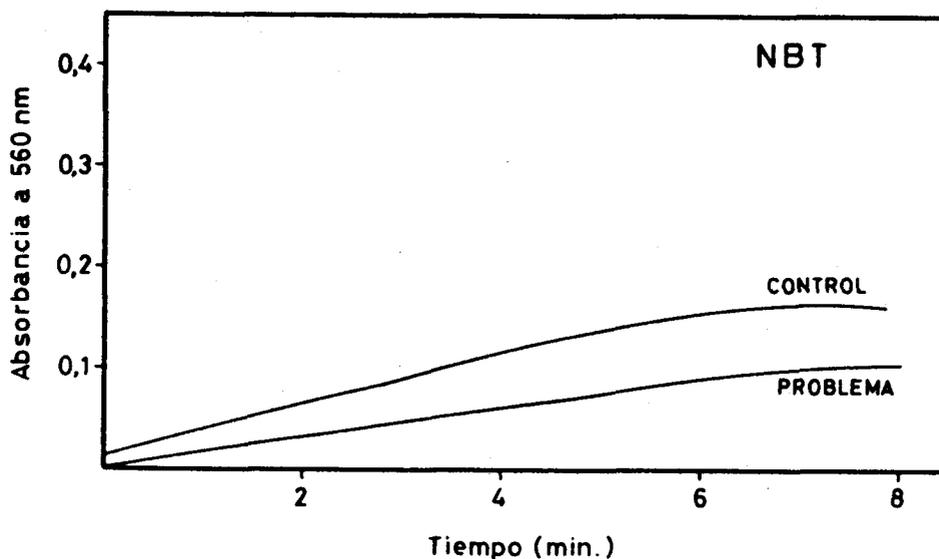


La mezcla de reacción en un volumen final de 3,225 ml contenía: NBT  $2,5 \times 10^{-5}$  M y xantina  $1,0 \times 10^{-4}$  M, en buffer carbonato sódico 50 mM pH 10,2, EDTA 0,1 mM. La tasa de reducción del NBT se siguió por registro continuo a 560 nm en un registrador Perkin Elmer mod. 165 acoplado a un espectrofotómetro de doble haz Perkin Elmer mod. 124.

Metódica: La reacción se llevó a cabo en cubetas espectrofotométricas de vidrio, con 1 cm de paso óptico, termostalizadas a 25°C mediante un portacubetas de dos plazas provisto de camisa de agua circulante mantenida a dicha temperatura. En la reacción que servía de control (reducción del NBT en ausencia de la enzima) ambas cubetas contenían los siguientes reactivos previamente estabilizados a 25°C y convenientemente aireados, en las cantidades y concentraciones que se indican: 0,2 ml de buffer carbonato sódico 50 mM pH 10.2, 0,1 mM EDTA; 3 ml de una solución de NBT y xantina a unas concentraciones de  $2,69 \times 10^{-5}$  M y  $1,08 \times 10^{-4}$  M, respectivamente, preparadas en el buffer anterior. En la reacción problema (reducción del NBT en presencia de la enzima), a las dos cubetas se les adicionó

0,1 ml de solución enzimática previamente diluida, igualándose seguidamente los volúmenes finales con buffer.

Las reacciones control y problema se iniciaban añadiendo a la cubeta de la muestra 25  $\mu$ l de una dilución adecuada de xantina oxidasa (XOD) capaz de producir en ausencia de la enzima una tasa de reducción del NBT de aproximadamente 0,020 unidades de absorbancia por minuto a 560 nm. Esta dilución variaba según la edad del lote de enzima utilizado y se preparaba a partir de una solución de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  2,3 M conteniendo salicilato sódico al 0,02% (p/v). En la figura siguiente se representa un registro espectrofotométrico obtenido utilizando este método de determinación de actividad SOD:



Con el fin de poder realizar la determinación de la actividad superóxido dismutasa de un gran número de muestras, se puso a punto -- una modificación rutinizada de este mismo método. En este ensayo, el volumen final de la mezcla de reacción fue de 4,225 ml y las concentraciones de los reactivos eran idénticas a las descritas anteriormente. La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo de unos 10 ml de capacidad en un baño termostatzado a 25°C. Los tubos de la reacción control contenían 0,2 ml de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, 0,1 mM EDTA a los que se les añadía 4 ml de solución  $2,58 \times 10^{-5}$  M en NBT y  $1,03 \times 10^{-4}$  M en xantina, preparada en el buffer indicado. Como problema y blanco se utilizaron tubos de ensayo con el mismo volumen final de mezcla de reacción pero en los que 0,1 ml de buffer carbonato sódico se sustituyeron por 0,1 ml de solución enzimática.

Para los controles y problemas la reacción se iniciaba añadiendo 25  $\mu$ l de una solución de xantina oxidasa preparada en condiciones -- análogas a las indicadas anteriormente, midiéndose igualmente la tasa de reducción del NBT por espectrofotometría a 560 nm.

Tanto en el ensayo normal como en la modificación rutinizada, el método utilizado para determinar la contribución en la actividad total de los tres tipos de isoenzimas de SOD (Cu,Zn-SOD, Fe-SOD y Mn-SOD) está basado en la distinta sensibilidad frente al cianuro de estas formas moleculares. La actividad de las superóxido dismutasas -- que contienen Cu y Zn es inhibida aproximadamente en un 90% por concentraciones de cianuro entre 1-2 mM mientras que en estas mismas -- condiciones, permanecen inalteradas las actividades de las manganeso o ferro-enzimas. Por lo tanto, en presencia de CNNa la actividad superóxido dismutasa determinada se debe casi totalmente a la actuación de las superóxido dismutasas resistentes al cianuro conteniendo manganeso ó hierro, pudiendo calcularse la actividad correspondiente a

a las Cu,Zn-SODs por diferencia entre la actividad total y la debida a las enzimas que contienen Fe ó Mn. Para ello a cada una de las mezclas de reacción correspondientes a los ensayos antedichos se les --añadía 0,1 ml de una solución de cianuro sódico 32,3 mM y 41,25 mM respectivamente, en el buffer habitual, manteniéndose fijos los volúmenes finales.

#### REACTIVOS

— Buffer  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ - $\text{CO}_3\text{HNa}$  50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM

Carbonato disódico 50 mM (5,2995 g de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ , calidad Merck p.a., por litro de agua destilada)-----  $\approx$  800 ml

Carbonato monosódico 50 mM (4,2005 g de  $\text{CO}_3\text{HNa}$ , calidad Merck p.a., por litro de agua destilada)----- 250 ml

Se hace el ajuste al pH-metro sobre el volumen indicado de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  50 mM, añadiendo solución de carbonato disódico 50 mM, hasta alcanzar el pH indicado. A continuación se lleva a 0,1 mM en EDTA, adicionando 0,0372 g de EDTA sal disódica, calidad Merck, por litro de buffer.

— Solución  $2,69 \times 10^{-5}$  M en NBT y  $1,08 \times 10^{-4}$  M en xantina.

0,0220 g de NBT, calidad Fluka, por litro de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

0,0164 g de xantina, calidad Sigma, por litro de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

— Solución de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  2,3 M, conteniendo salicilato sódico al --0,02%.

30,392 g de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , calidad Merck p.a., en 100 ml de agua destilada.

0,02 g de salicilato sódico, calidad Merck p.a., en 100 ml de agua destilada.

- Solución  $2,58 \times 10^{-5}$  M en NBT y  $1,03 \times 10^{-4}$  M en xantina.

0,0211 g de NBT, calidad Fluka, por litro de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

0,0157 g de xantina, calidad Sigma, por litro de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

- Solución de CNNa 32,3 mM y 41,25 mM.

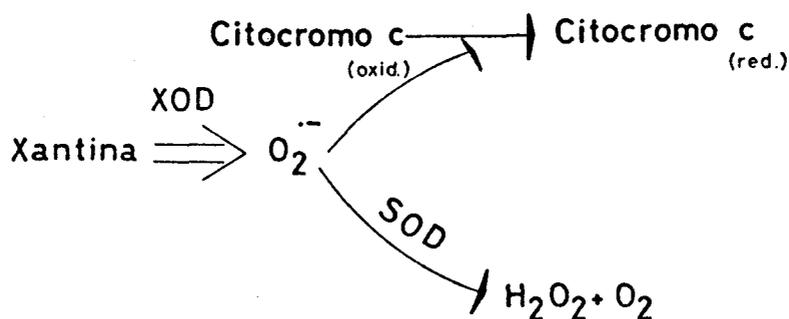
0,1583 g de CNNa, calidad Merck p.a., en 100 ml de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

0,2020 g de CNNa, calidad Merck p.a., en 100 ml de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

- 2. Detección de  $\dot{O}_2^-$  con citocromo c.

Este método se utilizó en los preparados enzimáticos purificados para la determinación de la temperatura y pH óptimos, tiempo de incubación, influencia de la concentración de la enzima y el efecto de inhibidores enzimáticos.

Se empleó una modificación del ensayo descrito por McCord y Fridovich (1969a), basado en la habilidad de la enzima para inhibir la reducción del citocromo c producida por el radical  $\dot{O}_2^-$  generado por el sistema xantina-xantina oxidasa:

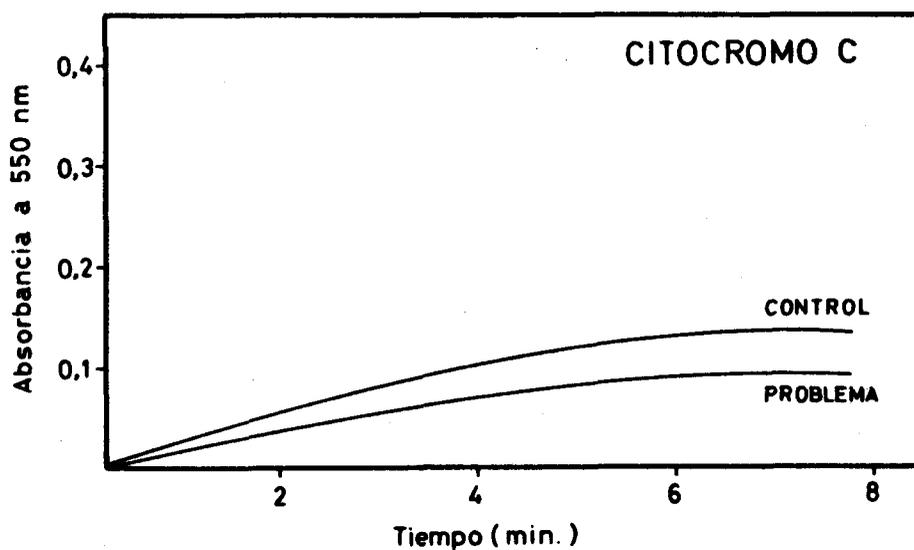


La mezcla de reacción en un volumen final de 3,225 ml contenía: citocromo c  $1 \times 10^{-5}$  M, xantina  $1 \times 10^{-4}$  M, en buffer fosfato potásico pH 7,8, EDTA 0,1 mM. La reducción del citocromo c se efectuó en cubetas termostatzadas a 25°C siguiéndose su curso por registro contínuo a 550 nm en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer mod. 124 acoplado a un registrador.

Metódica: Para la reacción control (reducción del citocromo c en ausencia de la enzima) en dos cubetas de vidrio de 1 cm de paso óptico, termostatzadas a 25°C, según se indicó anteriormente, se colocaron 0,2 ml de buffer fosfato potásico 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM, a los que se añadió 3 ml de solución  $1,075 \times 10^{-5}$  M en citocromo c y  $1,075 \times 10^{-4}$  M en xantina, preparada en el buffer anterior.

En la reacción problema (reducción del citocromo c en presencia de la enzima), a sendas cubetas con 3 ml de la solución de citocromo c y xantina, en las concentraciones indicadas, se les incorporó 0,1 ml de solución enzimática convenientemente diluída.

Las dos reacciones (control y problema), se iniciaban añadiendo a la cubeta muestra 25  $\mu$ l de una dilución de xantina oxidasa capaz de producir en ausencia de la enzima una tasa de reducción del citocromo c de aproximadamente 0,020 unidades de absorbancia por min, a 550 nm. Esta dilución se preparó como se ha descrito anteriormente. Un registro espectrofotométrico obtenido empleando este método de de terminación de actividad se representa en la figura siguiente:



La determinación de actividad SOD en presencia de CNNa 1 mM se realizó, en las reacciones control y problema, añadiendo a ambas cu-

betas 0,1 ml de una solución 32,3 mM en CNNa, manteniéndose fijos los volúmenes finales de reacción por adición del buffer utilizado en el ensayo.

#### REACTIVOS

— Buffer  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM.

Fosfato dipotásico 50 mM (8,7090 g de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , calidad Merck p.a., por litro de agua destilada)----- 900 ml

Fosfato monopotásico 50 mM (6,8040 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  calidad Merck p.a., por litro de agua destilada)-----  $\approx$  100 ml

Se hace el ajuste al pH-metro sobre el volumen indicado de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  50 mM, añadiendo solución de fosfato monopotásico 50 mM, hasta alcanzar el pH indicado. A continuación se lleva a 0,1 mM en EDTA adicionando 0,0372 g de EDTA sal disódica, calidad Merck p.a., por litro de buffer.

— Solución  $1,075 \times 10^{-5}$  M en citocromo c y  $1,075 \times 10^{-4}$  M en xantina.

0,1331 g de citocromo c tipo III, calidad Sigma, por litro de buffer fosfato K 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM.

0,0164 g de xantina, calidad Sigma, por litro de buffer fosfato K 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM.

— Solución de CNNa 32,3 mM.

0,1583 g de CNNa, calidad Merck, en 100 ml de buffer fosfato K 50 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM.

Método basado en la generación fotoquímica de radicales superóxido

Este método se utilizó en el proceso de purificación de la enzima para la determinación de la actividad SOD en las fracciones procedentes de los desarrollos cromatográficos en columna.

Se utilizó el ensayo de Beauchamp y Fridovich (1971), modificado por Giannopolitis y Ries (1977a). La producción de radicales  $O_2^{\cdot-}$  tiene lugar por iluminación de mezclas de reacción conteniendo riboflavina, metionina y azul de nitrotetrazolio. En estas condiciones, tiene lugar la fotorreducción de la riboflavina por la metionina, y posteriormente la flavina reducida cede electrones al oxígeno para producir radicales  $O_2^{\cdot-}$ , que dan lugar a la reducción del NBT. De esta forma, bajo la influencia de la luz la mezcla se colorea debido a la formación del azul de formazano y la superóxido dismutasa inhibe dicha coloración mediante el secuestro de los radicales  $O_2^{\cdot-}$ .

La mezcla de reacción en un volumen final de 4,225 ml contenía: riboflavina  $1,3 \times 10^{-6}M$ , metionina  $13 \times 10^{-3}M$ , NBT  $63 \times 10^{-6}M$ , en buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, 0,1 mM en EDTA. Tanto el buffer carbonato sódico como la solución generadora de radicales superóxido se estabilizaron previamente a 25°C, y se airearon abundantemente. La tasa de reducción del colorante NBT se midió espectrométricamente a 560 nm.

Metódica: Se utilizaron tubos de ensayo de grosor y color uniforme que se colocaron en una gradilla de plástico circular sumergida en un baño de vidrio termostatzado a 25°C. Una lámpara fluorescente circular Osram de luz día de 40W y 2.300 lm rodeada toda la pared del baño, cubriéndose el conjunto por medio de una tapadera recubierta interiormente con papel de aluminio, con el fin de que todos los tubos reciban una intensidad luminosa semejante.

Los tubos considerados como control y problema contenían respectivamente 0,2 y 0,1 ml de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2,

0,1 mM en EDTA, a los que se adicionaban posteriormente 4 ml de una solución  $1,33 \times 10^{-6}$  M en riboflavina,  $13,32 \times 10^{-3}$  M en metionina y  $64,57 \times 10^{-6}$  M en NBT, preparada en el buffer citado. A los tubos -- problema se les añadía 0,1 ml de una dilución adecuada de solución -- enzimática, utilizando como blancos, tubos de ensayo que contenían -- una mezcla de reacción idéntica a la problema, pero que no eran some tidos a iluminación, permaneciendo protegidos de la luz hasta el momento de la lectura espectrofotométrica.

La reacción se iniciaba por iluminación que era mantenida durante 2 minutos, y en dicho periodo de tiempo, en ausencia de la enzima, la tasa de reducción del NBT a 560 nm era de unas 0,200 unidades de absorbancia.

La cuantificación de las actividades Mn-SOD y Cu,Zn-SOD, se realizó añadiendo a las mezclas de reacción 0,1 ml de cianuro sódico -- 41,25 mM, lo que proporciona una concentración final 1 mM en cianuro, igualándose después los volúmenes finales con buffer.

#### REACTIVOS

— Buffer  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ - $\text{CO}_3\text{HNa}$  50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

Carbonato disódico 50 mM (5,2995 g de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) -----  $\approx$  800 ml

Carbonato monosódico 50 mM (4,2005 g de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  calidad Merck p. a., por litro de agua destilada) ----- 250 ml

Se hace el ajuste al pH-metro sobre el volumen indicado de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  50 mM, añadiendo solución de carbonato disódico 50 mM, hasta alcanzar el pH indicado. A continuación se lleva a 0,1 mM en EDTA, adicionando 0,0372 g de EDTA sal disódica, calidad Merck, por litro de buffer.

— Solución  $1,33 \times 10^{-6}$  M en riboflavina,  $13,32 \times 10^{-3}$  M en metionina, y  $64,57 \times 10^{-6}$  M en NBT.

0,0005 g de riboflavina, calidad Sigma, por litro de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

1,9873 g de metionina, calidad Sigma, por litro de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

0,0528 g de NBT calidad Fluka, por litro de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

— Solución de CNNa 41,25 mM.

0,2020 g de CNNa, calidad Merck, en 100 ml de buffer carbonato sódico 50 mM, pH 10,2, EDTA 0,1 mM.

### Expresión de la actividad enzimática

La actividad superóxido dismutasa se ha cuantificado en base a la capacidad de la enzima para inhibir el efecto producido por la interacción de los radicales libres  $O_2^-$  con el sistema detector utilizado. McCord y Fridovich (1969) definieron una unidad de actividad SOD como la cantidad de enzima requerida para producir una inhibición de un 50% en la velocidad inicial de reducción del detector utilizado (NBT ó citocromo c) a 25°C y en unas condiciones determinadas.

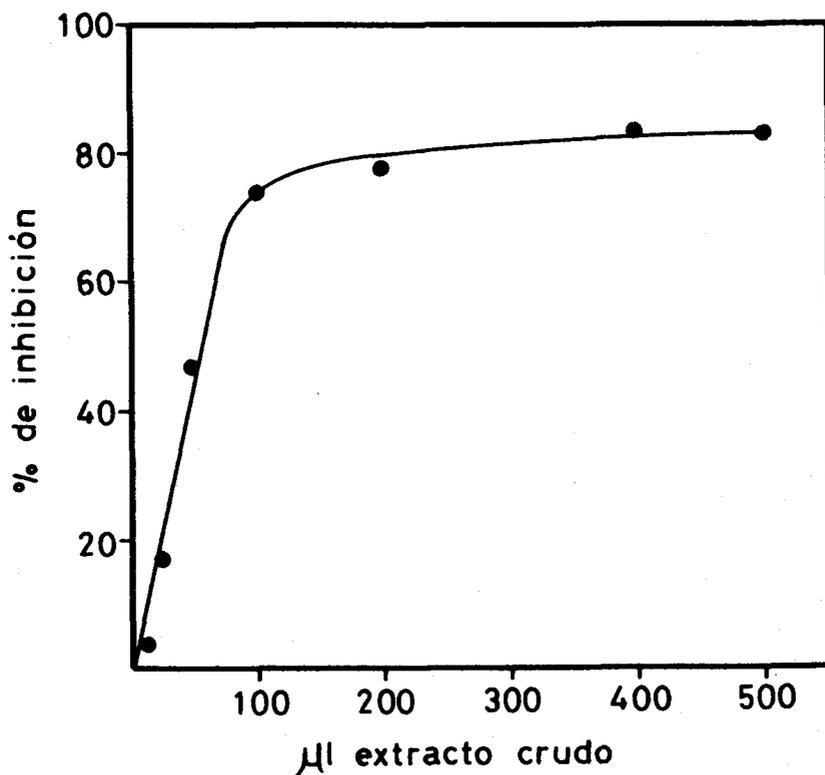
El cálculo de la actividad se realiza por determinación del porcentaje de inhibición producido por la enzima. Para ello se calculan las pendientes ( $\Delta E_{550}/\text{min}$  ó  $\Delta E_{560}/\text{min}$ ) relativas a la reacción control y problema, y a partir de ellas se obtiene el % de inhibición mediante la expresión:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{p \text{ (control)} - p \text{ (problema)}}{p \text{ (control)}} \times 100$$

Una vez conocido el porcentaje de inhibición y teniendo en cuenta el volumen de solución enzimática utilizado (0,1 ml), el cálculo de las unidades enzimáticas por mililitro, se hace según la fórmula:

$$\begin{aligned} \text{unidades SOD/ml} &= \frac{\% \text{ inhibición}}{50 \times 0,1} \times \text{factor dilución} = \\ &= \% \text{ inhibición} \times 0,2 \times \text{factor de dilución} \end{aligned}$$

En la figura siguiente se representa, a modo de ejemplo, el efecto de la concentración de la enzima de extractos crudos de hoja de guisante sobre la tasa de reducción del NBT, utilizando el sistema xantina-xantina oxidasa.



Como se deduce de la gráfica, para el empleo de estas unidades, es preciso que los porcentajes determinados estén comprendidos hasta un 60% por existir en esta zona una relación lineal entre la concentración de superóxido dismutasa y el porcentaje de inhibición -- producido.

#### SEPARACION Y DETERMINACION DE ACTIVIDADES ISOENZIMATICAS EN LOS EXTRACTOS CRUDOS

En los extractos de hoja de guisante, las isoenzimas de superóxido dismutasa se separaron por electroforesis a 4°C en geles de poliacrilamida, utilizando el sistema de buffer discontinuo y la metodología de Ornstein (1964) y Davis (1964).

Se utilizó gel tipo "Cyanogun 41" (relación acrilamida: bis de 19/1) con un 10% de acrilamida y 0,53% de bis-acrilamida. Para su preparación se disuelven en buffer Tris-ClH 377 mM, pH 8,9, 2,5127 g de acrilamida y 0,1322 g de N-N'-metilen-bis-acrilamida hasta un volumen final de 25 ml. A esta solución se le añaden 100 µl de 3-dimetilaminopropionitrilo, y en el momento de gelificar 1,35 ml de una solución recién preparada de riboflavina al 0,013% en el buffer anterior ó de persulfato amónico al 7%, según el tipo de polimerización empleada. Antes de efectuar la gelificación es conveniente filtrar y desgasar la solución de acrilamida-bis. La gelificación fotoquímica se llevó a cabo con dos lámparas fluorescentes Sylvania mod. F. 6TS/D a una distancia de aproximadamente 15 cm. Los geles se prepararon en tubos de vidrio de 7,5 X 0,5 cm que una vez colocados sobre un soporte adecuado, se llenaron de solución hasta una distancia de 8 mm del borde. Para evitar la formación de un menisco cóncavo en la superficie del gel, se dejaron resbalar por las paredes de los tubos unas -

gotas del buffer utilizado en su preparación. De esta forma, los geles quedan con una longitud útil de aproximadamente 6,5 cm.

Una vez gelificados, los tubos se montaron en la cubeta de electroforesis cuyos compartimentos anódico y catódico se inundaron con el buffer de electrodos (glicocola-Tris-ClH 38 mM, pH 8,2). En estas condiciones de pH, la casi totalidad de las fracciones proteicas se cargan negativamente y emigran hacia el ánodo situado en el tanque inferior.

Las muestras se llevaron al 10% en sacarosa para aumentar su densidad, y se les añadió una mínima cantidad del colorante azul de bromofenol (Merck) para fijar el frente electroforético. Los volúmenes de muestra utilizados variaban de 10 a 100  $\mu$ l según la concentración protéica.

Los desarrollos se hicieron a 4°C con un prerrecorrido de 1mA por gel durante 15 minutos, que posteriormente se aumentó a 5mA por gel, durante aproximadamente 1 hora 15 minutos, tiempo que tarda el frente electroforético en situarse a 1 cm del extremo anódico. Finalizado el desarrollo los geles se sacan de los tubos inyectando agua con una microjeringa entre las paredes de vidrio y los geles.

Las actividades superóxido dismutasa se localizaron en los geles por el método fotoquímico de Weisiger y Fridovich (1973a). En este ensayo, el radical libre  $O_2^{\cdot -}$  producido por la acción de la luz sobre una solución de riboflavina y tetrametiletildiamina (TEMED) provoca la reducción del colorante NBT, tiñéndose los geles uniformemente de azul, excepto en aquellas zonas donde hay actividad superóxido dismutasa, que aparecen incoloras.

Metódica: Una vez terminado el desarrollo electroforético los geles se incubaron a 25°C durante 20 minutos en una solución de NBT  $2,45 \times 10^{-3} \text{ M}$  en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8. A continuación, se eliminó esta solución y se realizó una nueva incubación a la misma temperatura y durante 15 minutos, en una solución de TEMED 0,280 M y riboflavina  $2,8 \times 10^{-5} \text{ M}$  en el buffer anterior. - Tras el periodo de incubación, los geles se suspendieron en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, y seguidamente se iluminaron con dos lámparas fluorescentes, análogas a las empleadas para la polimerización fotoquímica. Por acción de la luz los geles se tiñen uniformemente por el azul de formazano producido, excepto en aquellas zonas que contenían actividad superóxido dismutasa. La iluminación se interrumpía una vez alcanzado el máximo contraste entre las zonas activas acromáticas y la coloración de fondo (aproximadamente 7-10 minutos).

Las superóxido dismutasas sensibles al cianuro, que contienen Cu y Zn, eran diferenciadas de la Mn-SOD, resistente a este inhibidor, llevando a cabo los revelados enzimáticos en presencia y en ausencia de CNNa 1 mM.

Los geles con las bandas activas eran densitometrados a 560 nm en un fotómetro integrador-registrador Vernon modelo PHI-6. En los registros obtenidos se calculó el porcentaje de actividad correspondiente a cada isoenzima a partir de las áreas de los distintos picos determinadas por pesada del papel. Conocidos los porcentajes isoenzimáticos, la actividad SOD correspondiente a cada uno de ellos, se obtuvo multiplicando la actividad superóxido dismutasa total de la muestra por los respectivos porcentajes.

## REACTIVOS

- \_ Buffer Tris-ClH 377 mM, pH 8,9.

11,4137 g de Tris, calidad Merck, en 250 ml de agua destilada, ajustando el pH a 8,9 con ClH concentrado calidad Merck.

- Solución de gelificación.

Acrilamida, calidad Sigma ----- 2,5127 g

N-N'-metilen-bis-acrilamida, calidad Sigma --- 0,1322 g

3-dimetilaminopropionitrilo, calidad BDH -----100  $\mu$ l

Buffer Tris-ClH 377 mM, pH 8,9 ----- c.s.p. 25 ml

Se filtra y desgasa a vacío antes de usar.

- \_ Solución de riboflavina.

Riboflavina, calidad Sigma, al 0,013% en buffer Tris-ClH 377 mM, pH 8,9.

Es de preparación extemporánea.

- \_ Solución de persulfato amónico.

Persulfato amónico, calidad Sigma, al 7% en buffer Tris-ClH 377 mM, pH 8,9.

Es de preparación extemporánea.

- \_ Buffer de electrodos, Glicocola-Tris-ClH pH 8,2.

1,425 g de Glicocola, calidad Merck, en 500 ml de agua destilada.

Esta solución 38 mM en Glicocola, antes de enrasar a 500 ml, se ajusta a pH 8,2 con buffer Tris-ClH 377 mM, pH 8,9.

- Buffer  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  50 mM, pH 7,8.

Fosfato dipotásico 50 mM (8,7090 g de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , calidad Merck, p. a., por litro de agua destilada) -----  $\approx$  900 ml

Fosfato monopotásico 50 mM (6,8040 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , calidad Merck, p.a., por litro de agua destilada) -----  $\approx$  100 ml

Hacer el ajuste al pH-metro sobre el volumen indicado de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  50 mM, añadiendo solución de fosfato monopotásico 50 mM, hasta alcanzar el pH indicado.

- Solución de NBT  $2,45 \times 10^{-3}$  M.

0,2003 g de NBT, calidad Fluka, en 100 ml de buffer fosfato 50 mM, pH 7,8.

- Solución 0,028 M en TEMED y  $2,8 \times 10^{-5}$  M en riboflavina.

4,17 ml de TEMED, calidad Sigma, por litro de buffer fosfato 50 mM, pH 7,8.

0,0105 g de riboflavina, calidad Sigma, por litro de buffer fosfato 50 mM, pH 7,8.

- Solución de CNNa  $1 \times 10^{-3}$  M.

0,0490 g de CNNa, calidad Merck, por litro de cada una de las dos soluciones anteriores de revelado.

#### DETERMINACION DE PROTEINAS

Durante todo el proceso de purificación se determinó el contenido en proteínas de las distintas fracciones utilizando dos métodos:

el de Lowry y col. (1951), y el de Potty (1969). El primero de ellos se empleó en los últimos estadios de la purificación, mientras que el de Potty (1969) fué utilizado en los extractos crudos iniciales - donde es presumible la presencia de compuestos que interfieren en la determinación de proteínas por el método de Lowry, tales como fenoles y pectinas. En ambos casos, se usó como patrón albúmina sérica - bovina cristalizada.

#### Método de Lowry

Es un método espectrofotométrico basado en la reacción de biuret, característica de los enlaces peptídicos, y en la de Folín, propia - de los grupos fenólicos de los restos de tirosina.

#### Curva patrón de albúmina

Se ha usado una curva patrón de albúmina sérica bovina a concentraciones entre 25-400  $\mu\text{g/ml}$ . Se preparó una solución madre de albúmina en agua destilada, con una concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$  (25 mg/50 ml) y a partir de esta, por dilución, se prepararon soluciones conteniendo 25, 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{g/ml}$ .

#### Metódica

Se tomó 1 ml de cada una de las concentraciones de la curva patrón, que se dispuso en los correspondientes tubos de ensayo, utilizando como blanco 1 ml de agua destilada. En una serie de tubos de ensayo se colocó 1 ml de las soluciones problema, convenientemente - diluidas, para que la concentración protéica quedase dentro del rango de concentraciones de la curva patrón.

A tiempo cero se agrega a cada uno de los tubos anteriores 5 ml de solución alcalina de cobre con agitación y, al cabo de 15 mi-

nutos, se añaden 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu, agitando bien la mezcla. Pasados 20 minutos se efectúa la lectura espectrofotométrica a 630 nm. En algunas ocasiones, cuando se ensayaba el contenido protéico de preparados enzimáticos puros, al objeto de no desperdiciar muestra, se empleó un micrométodo con volúmenes de reacción cuatro veces inferiores a los normales, esto es, 0,25 ml de muestra, 1,25 ml de solución alcalina de cobre y 0,125 ml de reactivo de fenoles, manteniéndose constantes todas las demás condiciones de la reacción.

Con los resultados obtenidos se construye una gráfica representando en el eje de ordenadas los valores de absorción y en abscisas las concentraciones protéicas correspondientes ( $\mu\text{g/ml}$ ). Sobre ella se llevan los valores de D.O. de los problemas, deduciéndose por interpolación, y una vez tenidas en cuenta las diluciones previas, la concentración proteica final.

#### REACTIVOS

— Solución madre de albúmina sérica bovina (500  $\mu\text{g/ml}$ ), calidad Calbiochem.

— Solución alcalina de cobre.

Es de preparación extemporánea. Se prepara mezclando 50 ml de solución de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2% (Merck) en NaOH 0,1 N (Merck), con 1 ml de solución conteniendo  $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck) y tartrato sódico (Merck) al 0,5% y 1%, respectivamente.

— Reactivo diluido de Folin-Ciocalteu.

Se utilizó reactivo de fenoles, calidad Analema, que en el mo-

mento de su uso se diluyó dos veces con agua destilada.

#### Método de Potty

Es un método espectrofotométrico en el que cada muestra es sometida por separado al ensayo de Lowry y col., (1951), que se acaba de describir, y a una reacción blanco de determinación de fenoles - libres y pectinas, compuestos que dan reacción positiva de proteí--nas por el método de Lowry. De esta forma, a las proteínas totales determinadas por dicho método se les substraen la contribución debida a aquellos compuestos interferentes aproteicos de naturaleza fenólica.

#### Curva standard de albúmina.

La curva patrón de albúmina sérica bovina, comprendida entre concentraciones de 25 y 400  $\mu\text{g/ml}$ , se preparó de la misma manera que se describió en el método de Lowry y col., (1951).

#### Metódica

En dos tubos de ensayo que se toman como blancos se coloca 1 ml de agua destilada. A continuación, de cada una de las concentraciones patrón de albúmina bovina se pipetea dos alícuotas de 1 ml en sendos tubos de ensayo. En una serie de tubos se colocan dos alícuotas de 1 ml de cada solución problema a medir, convenientemente diluida, para que la concentración proteica caiga dentro del rango comprendido por la curva patrón.

Al tiempo cero se agrega a cada pareja de tubos 5 ml de solución alcalina de cobre y 5 ml de solución de carbonato sódico al 2% en NaOH 0,1 N, respectivamente, con agitación. Al cabo de 15 min se añaden a todos los tubos 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, y

se mezcla. Transcurridos 20 min se efectúa la lectura espectrofotométrica a 630 nm de todas las fracciones ensayadas.

Con los valores de D.O. suministrados por los distintos pares de concentraciones de la solución de referencia, se construye una curva patrón de albúmina, representando en ordenadas las diferencias entre los valores de absorbancia de cada par de tubos, correspondientes a la reacción normal de Lowry y a la resultante de la sustitución de los 5 ml de solución alcalina de cobre por un mismo volumen de solución de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ . Sobre esta gráfica, y a partir de las diferencias de D.O. de cada pareja de tubos problema, se obtiene, por interpolación, la concentración de proteínas, que después de multiplicada por la dilución empleada, proporcionará la concentración proteica final de la muestra.

#### REACTIVOS

— Solución de carbonato sódico.

$\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 2%, calidad Merck, en NaOH 0,1N (Merck).

La solución alcalina de cobre y el reactivo diluido de Folin-Ciocalteu se prepararon como se describió para el método de Lowry.

#### PURIFICACION DE LA ENZIMA

El método seguido para la obtención de preparados puros de Mn-superóxido dismutasa se puso a punto realizando experiencias previas de aislamiento con pequeños lotes de hojas de guisante (*Pisum sativum* L.) cultivadas en invernadero.

Todas las operaciones se efectuaron en frío a temperaturas entre 0 y 4°C, bien en cámara refrigerada o en baño de hielo. Igualmente, todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a 4°C, en una centrífuga Sorvall Superspeed, mod. RC2-B, en las condiciones que en cada caso se indican.

Los fraccionados cromatográficos se efectuaron utilizando columnas de Pharmacia Fine Chemicals, y columnas Quickfit, equipadas en sus terminales con émbolos provistos de placas porosas de teflón que permiten regular la altura útil de la columna. En todos los casos se empleó flujo descendente con impulsión mediante bomba peristáltica (Pharmacia P-3 ó LKB ReCyChrom). El desarrollo de los procesos cromatográficos se controló mediante medida continua de la transmitancia a 280 nm de los eluidos de las columnas, en un aparato Uvicord de LKB equipado con célula de cuarzo de flujo continuo de 2 mm de paso óptico, haciendo el ajuste previo del 100% de transmitancia con el buffer base usado en el proceso.

Finalmente, los eluidos de los desarrollos cromatográficos en columna se recogieron en fracciones de volumen variable, según los casos, utilizando un colector de fracciones automático (LKB Ultrac).

A lo largo de todo el proceso de purificación, la actividad superóxido dismutasa sensible y resistente al  $\text{CN}^-$ , se determinó por el método de Beauchamp y Fridovich (1971) según se indica en el apartado de Determinación de Actividad. El comportamiento de las distintas isoenzimas en cada una de las etapas de aislamiento se controló por electroforesis en geles de poliacrilamida, efectuando la localización de la actividad enzimática según la metodología de Weisiger y Fridovich, (1973a).

### 1. Fraccionamiento térmico.

En experiencias previas se estudió el efecto producido, sobre la actividad SOD de extractos de hojas, por el calentamiento a 60°C durante distintos tiempos (5, 10, 20, 40 y 60 minutos).

Para ello, volúmenes de extracto crudo de 5 ml se calentaron en tubos de ensayo, en un baño termostatzado a 60°C, durante los tiempos anteriormente mencionados. Se controló la temperatura de los extractos y, cuando ésta alcanzó los 60°C se comenzaron a contar los tiempos. Seguidamente, las distintas muestras fueron enfriadas inmediatamente en un baño de hielo, eliminándose las proteínas desnaturalizadas por centrifugación a 10500 g durante 15 minutos. En los sobrenadantes se determinó la actividad SOD residual en presencia y ausencia de  $\text{CN}^-$  1 mM. Paralelamente, las muestras se desarrollaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida, ensayándose la actividad de cada isoenzima. La determinación de proteínas se efectuó según la metódica de Potty (1969).

Estas experiencias pusieron de manifiesto que el calentamiento de los extractos crudos a 60°C durante 5 minutos no afectaba esencialmente a la actividad Mn-SOD, por lo que se eligieron estas condiciones como primer criterio de purificación.

De acuerdo con estos resultados, en el primer paso de purificación los extractos crudos obtenidos de hoja de guisante (3000-18000 ml), se distribuyeron en alícuotas de 25 ml que se calentaron a 60°C, comenzándose a contar el tiempo cuando el extracto alcanzó aquella temperatura. Pasados 5 minutos, los tubos se enfriaron en baño de hielo y, cuando la temperatura de éstos era de 4°C se procedió a la eliminación de las proteínas floculadas por centrifugación a 10500 g durante 15 minutos.

## 2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico.

En ensayos preliminares, los sobrenadantes procedentes del calentamiento de los extractos crudos de hojas a 60°C durante 5 min, fueron precipitados fraccionadamente con sulfato amónico en baño de hielo. Se utilizaron los siguientes porcentajes de saturación a 0°C: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%.

Cantidades crecientes de sulfato amónico (Merck), finamente pulverizado en mortero, se fueron añadiendo lentamente a alíquotas de 30 ml de los sobrenadantes del calentamiento a 60°C, hasta alcanzar cada una de las concentraciones de saturación mencionadas. La precipitación se realizó en baño de hielo, con agitación constante y durante una hora, ajustándose el pH a 7 por adición de solución amoniacal concentrada. Los precipitados se recuperaron por centrifugación a 10500 g durante 20 min y, posteriormente, se suspendieron en 3 ml de buffer fosfato potásico 50 mM, pH 7,8.

En cada una de las fracciones se determinó: la actividad SOD en presencia y ausencia de  $\text{CN}^-$  1 mM, según el método de Beauchamp y Fridovich (1971); la actividad de cada isoenzima por electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción enzimática (Weisiger y Fridovich 1973a); y el contenido protéico (Potty, 1969).

Los resultados obtenidos, indicaron que la mayor parte de la actividad específica de la isoenzima Mn-superóxido dismutasa aparecía en el intervalo de saturación con sulfato amónico del 40-70%.

En consecuencia, en el segundo estadio de purificación enzimática los sobrenadantes procedentes del calentamiento de los extractos crudos a 60°C durante 5 min (2500-16000 ml) fueron sometidos a una precipitación fraccionada con sulfato amónico entre el 40-70% de saturación. Para ello, dicha sal finamente pulverizada en mortero

ro (22,6 g/l para llevar la solución al 40% de saturación) se fué adicionando lentamente y con agitación constante en baño de hielo. Una vez disuelto el sulfato amónico, se mantuvo la agitación durante una hora y se centrifugó a 10500 g durante 20 min. Se midió el volumen del nuevo sobrenadante, y se agregó más sulfato amónico --- (187 g/l para una saturación del 70%), procediéndose como antes. En las dos precipitaciones, el pH de la solución se mantuvo en la neutralidad por adición de solución amónica concentrada. El sedimento final obtenido por centrifugación, se suspendió en un volumen de buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, aproximadamente diez veces menor que el de partida, manteniéndose en maceración con agitación constante hasta la desaparición de grumos. Finalmente, la suspensión se aclaró - por centrifugación a 10500 g durante 15 min, y el sobrenadante obtenido se sometió a diálisis continua durante doce horas frente al buffer de suspensión indicado, utilizando una célula de ultrafiltra--ción Amicon equipada con una membrana PM-10. El precipitado que aparecía durante la diálisis se eliminó por centrifugación a 5800 g durante diez min. La solución final obtenida tenía coloración amarillo verdosa.

### 3. Adsorción sobre DEAE-celulosa.

Se utilizó DEAE-celulosa Whatman, tipo DE-23 (fibroso). La cantidad de cambiador a utilizar, deducida sobre la base de que por cada ml de lecho se necesitan unos 0,15 g de cambiador seco, se activó por lavados sucesivos con ClH 0,5 N, agua destilada, NaOH 0,5 N y agua destilada, según las instrucciones del fabricante. El equilibrado se inició suspendiendo la DEAE-celulosa activada en un exceso de buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, 2 mM en DTT, manteniendo el conjunto bien mezclado por agitación durante 15 min. Se decantó el sobre-

nadante y el tratamiento se repitió hasta que el pH del sobrenadante era idéntico al del de equilibración. Finalmente la suspensión del cambiador se desgasó a vacío con agitación, quedando lista para proceder al llenado de la columna.

La solución enzimática procedente de la etapa anterior de purificación ( $\approx 100$  ml) se pasó entonces por una columna (11 X 4,5 cm) de celulosa DE-23 equilibrada como se indicó anteriormente, utilizándose un flujo de 0,5 ml/min. La actividad Mn-SOD de la muestra era adsorbida cuantitativamente por el cambiador, arrastrándose el material no fijado haciendo pasar buffer de equilibración ( $\approx 600$  ml) a un flujo de 0,5 ml/min hasta que se registró en el eluido una absorbancia constante a 280 nm, del orden de 0,1. Después de este lavado, se procedió a la elución de la actividad SOD fijada haciendo pasar, a un flujo igual al anterior, unos 600 ml de una solución de buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, 2 mM en DTT, conteniendo ClNa 0,5M. El eluato se fue recogiendo en un vaso de precipitado hasta que -- por ensayos periódicos de la actividad SOD de las fracciones de cola, se comprobó que toda la actividad había sido desplazada del lecho del cambiador.

La fracción activa así obtenida se dializó frente a buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, 2 mM en DTT, en una célula de ultrafiltración - Amicon con una membrana PM-10. Finalmente, el dializado se concentró en la misma célula hasta un volumen de 60 ml, eliminándose el precipitado aparecido durante la diálisis por centrifugación a 5800 g durante 10 min.

#### 4. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

Se utilizó DEAE-celulosa Whatman, tipo DE-52. Esta celulosa se

suministra en forma de polvo húmedo que, por no haber sufrido ningún proceso de secado durante su elaboración, está exenta de "finos y - además no necesita tratamiento previo de reciclado. El proceso de - equilibrado se lleva a cabo de forma análoga a la descrita anterior<sub>mente</sub> para el tipo DE-23. Finalmente, la suspensión del cambiador - se desgasó a vacío, con agitación, quedando lista para realizar el llenado y estabilización de la columna, que se efectuó en cámara -- fría.

La fracción activa procedente del estadío de purificación anterior sobre DEAE-celulosa (DE-23) se hizo pasar, a un flujo de 0,5 ml/min, a través de una columna de celulosa DE-52 de 2,5 X 24 cm, - equilibrada en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, DTT 2 mM. La actividad isoenzimática Mn-superóxido dismutasa queda, junto con otros compues<sub>tos</sub>, fijada cuantitativamente por el cambiador, formando una franja ancha de color marrón-rojizo oscuro. Se procedió entonces al lavado de la columna, haciendo pasar buffer de equilibración a un flujo de 0,5 ml/min, hasta que se registró en el eluido una absorción a 280 nm de aproximadamente 0,1. La elución de la actividad Mn-superóxido dismutasa se realizó mediante un gradiente continuo y lineal de clo<sub>ru</sub>ro, en forma de ClNa, desde 0 a 0,5 M en el buffer de equilibra<sub>ción</sub>. Se utilizaron para establecer el gradiente 325 ml de buffer - sin ClNa, en la célula de mezcla, y 325 ml del mismo conteniendo -- ClNa 0,5 M, en el reservorio anexo.

Se recogieron fracciones de 10 ml, con un flujo idéntico al - descrito anteriormente, y se determinó la pendiente del gradiente - salino por medida de la conductividad a 4°C de las muestras eluidas, con un conductímetro Crison mod. 522, utilizando como patrones dis<sub>tintas</sub> concentraciones de ClNa en el buffer base (0,05, 0,10, 0,20, 0,40, 0,80 y 1,0 M). Una vez localizada la posición del pico de ac-

tividad Mn-SOD en el eluido, se reunieron las fracciones activas, y se sometieron a un proceso de diálisis continúa en una célula de ultrafiltración Amicon sobre una membrana PM-10, frente a buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, 2 mM en DTT. El dializado fue finalmente concentrado por ultrafiltración hasta un volumen aproximado de 5 ml. El precipitado aparecido durante la diálisis se eliminó por centrifugación a 5800 g durante 10 min.

#### 5. Cromatografía en columna de Sephadex G-100.

Se ha utilizado Sephadex G-100 fino, calidad Pharmacia Fine - Chemicals ( Upsala), con un diámetro de partícula de 40-120  $\mu$ . El - Sephadex se suministra en forma de polvo seco, por lo que antes de utilizarlo se hincha con un exceso de 10-12 veces (p/v) de buffer - fosfato 50 mM, pH 7,8, 2 mM en DTT, durante tres días a temperatura ambiente, teniendo en cuenta que 1 g de Sephadex G-100 suministra - un volumen de lecho de 15-20 ml. Pasado este tiempo, se desgasa el gel a vacío, con agitación, y se procede al llenado y estabiliza--- ción de la columna ("Quickfit" de 2,5 X 74 cm), a una temperatura - de 4°C.

La solución enzimática (5 ml) obtenida por cromatografía so-- bre DE-52 celulosa, previamente dializada frente a buffer fosfato - 50 mM, pH 7,8, 2 mM en DTT, se pasó por la columna de Sephadex a un flujo de 0,4 ml/min, recogiénose 80 fracciones de 5 ml. Como en los pasos anteriores, el control de la elución se efectuó por registro de la absorción a 280 nm. Se reunieron las fracciones que mostraron actividad superóxido dismutasa (unos 55 ml), y se dializaron frente a buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, en una célula de ultrafiltración - Amicon, como se indicó en la etapa precedente. Finalmente, el diali

zado fue concentrado hasta un volumen de aproximadamente 1 ml.

#### 6. Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida.

El aparato empleado fué el PREP-DISC de Canalco que se muestra en la Figura 5. En él, la columna del gel tiene una sección de corona circular, con refrigeración por agua a 4°C, tanto por la parte interna como externa. La muestra, suspendida en sacarosa, se deposita sobre el gel, disponiéndose los electrodos de tal forma que el sentido de emigración de las fracciones separadas sea hacia la parte inferior. Cuando una fracción alcanza el extremo del gel, es arrastrada por una corriente centrípeta de buffer de elución que se establece en la estrecha ventana, existente entre la base del gel y una placa de vidrio poroso. Tanto la parte inferior de la placa como el espacio que queda por encima del gel, se encuentran bañados por el buffer de electrodos.

Se usó gel al 10% en acrilamida, con una relación acrilamida/bisacrilamida de 50:1, en una columna de 320 mm<sup>2</sup> de sección y 20 cm de altura. El gel separador de poliacrilamida, de 2-3 cm de altura, se preparó en buffer Tris-ClH 0,375 M, pH 8,9, siendo el tampón de electrodos Tris 0,025 M-glicina 0,2 M, pH 8,3. La elución se realizó con buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5.

La columna se llenó con la solución de gelificación hasta una altura de 2-3 cm, con una jeringa conectada a un tubo largo de teflón que llegaba hasta el fondo de la columna, depositándose después cuidadosamente sobre la solución de gelificación una capa de agua de unos milímetros de altura, mediante una bomba peristáltica a flujo lento, para evitar de este modo la formación de menisco. Ter

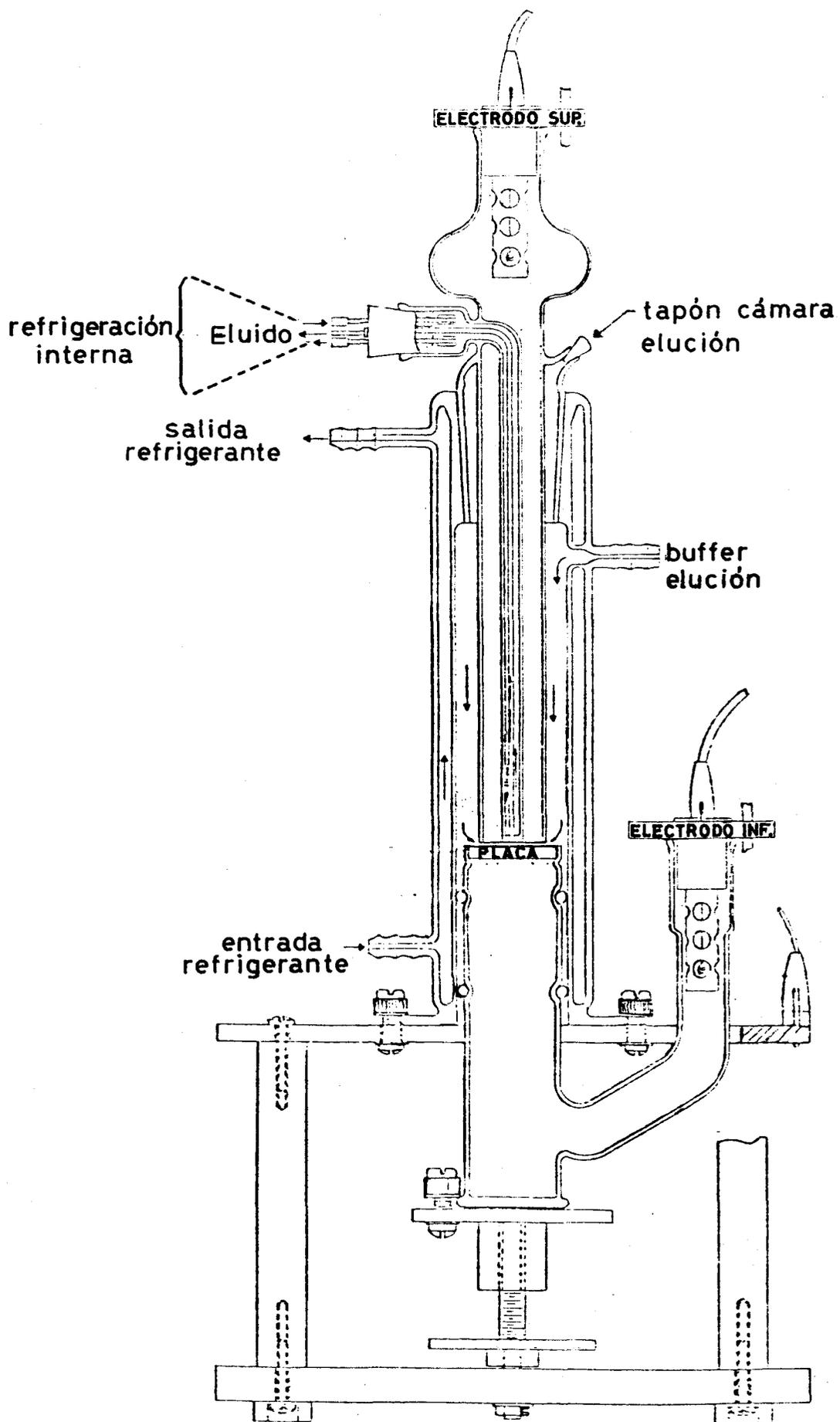


Figura 5

minada la gelificación con persulfato (5-10 min), se eliminó la capa de agua y se montó la columna sobre el aparato, llenándose la porción por encima del gel con buffer de electrodos y, permaneciendo la parte inferior del gel sumergida en el buffer de elución. El sistema de refrigeración está constituido por un baño enfriado por el serpentín de un grupo compresor, y termostatizado, al mismo tiempo, a 4°C por un grupo calefactor provisto de termostato. Finalmente una bomba impulsora establece el circuito de refrigeración a través de las camisas externa e interna de la columna. Para evitar difusiones debe quedar una ventana muy reducida entre el extremo inferior del gel y la placa de vidrio poroso, especialmente en el momento de salida de la fracción a aislar, lo que se consigue mediante un tornillo de ajuste. La corriente de buffer de elución, que en dirección centrípeta, tiene lugar a través de dicha ventana, se consigue con una bomba peristáltica a un flujo de 2 ml/3 minutos.

La preparación enzimática obtenida por cromatografía en Sephadex G-100, en un volumen de 1 ml, y conteniendo 1,5-10 mg de proteínas se llevó al 10% en sacarosa y se le añadió un cristalito de azul de bromofenol, como marcador del frente electroforético. La muestra se aplicó con bomba peristáltica a flujo lento, cuidadosamente, sobre la parte superior del gel.

El ánodo se sitúa en la parte inferior. Primero se efectúa un prerrecorrido a 6 mA ( $\approx 230$  V) durante 30 minutos, realizándose después el recorrido a 480 V (12-16 mA). En estas condiciones, el frente electroforético tarda en salir unos 30 minutos, y toda la actividad enzimática se eluye al cabo de unas 3 horas.

Se recogieron 100 fracciones de 2 ml al flujo antes señalado, controlándose la elución por medida de la absorbancia a 280 nm. Una vez determinada la actividad SOD de las distintas fracciones, éstas

se reunieron ( $\approx 40$  ml) y dializaron frente a buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 siendo finalmente concentradas hasta un volumen de 3-5 ml, que se conservó bien a 4°C ó congelado en distintas alícuotas a -20°C.

#### REACTIVOS

— Buffer  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  50 mM, pH 7,8.

Fosfato dipotásico 50 mM (8,7090 g de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) -----  $\approx 900$  ml

Fosfato monopotásico 50 mM (6,8040 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) -----  $\approx 100$  ml

Hacer el ajuste al pH-metro sobre el volumen indicado de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  50 mM, añadiendo solución de fosfato monopotásico 50 mM, hasta alcanzar pH indicado.

— Buffer  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  50 mM, pH 7,8, 2 mM DTT.

Se prepara como se indica anteriormente y se lleva a 2 mM en DTT añadiendo 0,3090 g de DTT, calidad Sigma, por litro de buffer.

— Buffer Tris-ClH 0,375 M, pH 8,9.

Tris----- 36,3 g

ClH 1 N (8,1 ml de ClH/100 ml) ----- 48 ml

Agua c.s.p. ----- 100 ml

Se hace el ajuste al pH indicado con ClH 1 N

— Buffer Tris-glicina, pH 8,3

Tris ----- 3,0 g

Glicina (Merck) ----- 14,4 g  
 Agua c.s.p. ----- 100 ml

— Buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5

Tris 0,1 M (12,11 g de Tris. calidad Merck p.a., por litro  
 de agua destilada ----- 500 ml

— ClH 0,1 N (8,3 ml de ClH concentrado,  $d = 1,19$ , calidad Merck  
 p.a., por litro de agua destilada -----  $\approx 400$  ml

Se ajusta el pH indicado con la solución clorhídrica y se en-  
 rassa a un litro con agua destilada.

#### CONTROL DE PUREZA

Durante todo el proceso de purificación se efectuaron ensayos de homogeneidad tanto a nivel isoenzimático como protéico, mediante electroforesis "en disco" en geles de poliacrilamida, utilizando el sistema de buffer discontinuo y la metódica de Ornstein (1964) y Da vis (1964).

El gel utilizado fue del tipo "Cyanogum 41" con un 10% de acrilamida y un 0,53% de bis-acrilamida. La preparación de los geles y muestras, así como el tipo de cubeta utilizada ya han sido descritos en Material y Métodos (pag 99). La gelificación se realizó bien con persulfato amónico (al 7 %), ó fotoquímicamente con riboflavina (al 0,013%). En este último caso, una vez añadidos 1,35 ml de riboflavina a la solución de gelificación, ésta se llevaba a cabo mediante iluminación con dos lámparas fluorescentes Sylvania, mod. F.6T5/D, situadas a una distancia de los geles de aproximadamente 15 cm.

Los desarrollos se realizaron a 4°C, con un prerreconido de 1 mA por gel durante 15 min. Posteriormente se aumentó la intensidad de corriente a 4 mA por gel durante 1 hora 15 min, tiempo aproximado que tarda el frente en situarse a 1 cm del extremo anódico del gel. Finalizado el recorrido, se extrajeron los geles de los tubos, por inyección de agua con una microjeringa, y cada gel muestra fue sometido paralelamente a un análisis de proteínas y a un revelado enzimático "in situ".

Para la tinción de proteínas, se sumergieron los geles durante una hora en una solución de negro de amido al 0,2% en ácido acético al 7% decolorándose el fondo de los geles por lavado con agitación y flujo continuo de acético al 7%. Cuando las muestras tenían una concentración baja de proteínas, se utilizó un colorante más sensible, el azul Coomassie. En este caso, los geles se tiñeron durante cinco horas en una solución al 0,25%, llevándose a cabo la decoloración con una solución de ácido acético y metanol.

El revelado enzimático se efectuó por medio de la técnica fotoquímica de Weisiger y Fridovich (1973a) descrita en la página 100 de Material y Métodos.

Tanto en el caso de la tinción protéica como enzimática, las bandas detectadas en los geles fueron registradas gráficamente y cuantificadas mediante un densitómetro integrador-registrador Vernon, mod. PHI-6.

#### REACTIVOS

— Solución de Negro de Amido.

Negro de Amido 10B, calidad Analema, a saturación: aproximada

mente 0,2% en acético glacial al 7%. Se filtra antes de usar.

— Solución de Azul Coomassie.

Azul Coomassie, calidad Sigma ----- 0,25 g

Metanol, calidad Probus ----- 45,4 ml

Acido acético glacial, calidad Probus ----- 9,2 ml

Agua destilada ----- c.s.p.100 ml

Se filtra antes de utilizar.

— Solución de decoloración de Negro de Amido.

Acido acético glacial, calidad Probus, al 7% (v/v).

— Solución de decoloración de Azul Coomassie.

Acido acético glacial, calidad Probus ----- 75 ml

Metanol, calidad Probus ----- 50 ml

Agua destilada -----c.s.p.1000 ml

## CARACTERISTICAS QUIMICO-FISICAS

### Espectros de absorción visible-UV.

El registro del espectro visible se llevó a cabo a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Zeiss mod. PMQ-11, equipado con registrador. Se utilizaron microcubetas de cuarzo  $MT_4$  de 1 cm de paso óptico, y se midió frente a un blanco de referencia de buffer -- Tris-ClH 50 mM, pH 7,5. Previamente se registró la línea base desde 350 hasta 750 nm utilizando en ambas cubetas el buffer blanco, y -- con la misma escala de sensibilidad que luego se emplearía para registrar el espectro. Se utilizaron soluciones de enzima pura en buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, con una concentración protéica de 5 mg/ml. En un principio se efectuaron registros en el rango de longitudes de onda de 350-750 nm, y una vez localizada la zona de absorción de la enzima, se llevaron a cabo barridos en el rango de 350-680 nm.

También se registró el espectro visible de la enzima una vez reducida con ditionito sódico (calidad Merck). Para ello, a ambas cubetas (muestra y referencia) provistas de tapones de goma, se les añadió con una jeringa Hamilton, perforando la goma, un volumen adecuado de ditionito sódico 0,1 M para obtener una concentración final de este reactivo de 2 mM. Inmediatamente después se registró el espectro de 350 a 680 nm.

El registro del espectro ultravioleta se efectuó a temperatura ambiente, en un rango de longitudes de onda de 210-310 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer mod. 124 equipado con registrador. Se utilizaron cubetas de cuarzo tipo Spectrosil de 1 cm de paso óptico, midiéndose frente al buffer de referencia indicado para el visible. Los espectros se determinaron utilizando concentraciones enzimáticas de 0,14 mg/ml y 1,0 mg/ml.

### Coefficiente de absorción molar.

El coeficiente de absorción molar de la enzima a 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) se determinó utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, y midiendo la absorción de la solución problema a esta longitud de onda frente a un blanco del buffer de disolución de la enzima (Tris-ClH 50 mM, pH 7,5). La concentración de proteínas del preparado enzimático puro se determinó por triplicado según el método de Lowry y col. (1951). Conocida la absorción a 280 nm ( $A_{280}$ ) y la molaridad de la enzima ( $c$ ), su coeficiente de absorción molar ( $\epsilon_{280}$ ) se calculó a partir de la fórmula:

$$\epsilon_{280} = \frac{A_{280}}{l \cdot c} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

donde  $l$  es la longitud en cm del paso óptico de las cubetas espectrofotométricas utilizadas.

### Peso molecular.

Se llevó a cabo por tres procedimientos diferentes: filtración por gel de Sephadex G-100, electroforesis analítica en poliacrilamida a distintas concentraciones de gel, y atendiendo a la composición en aminoácidos. Este último método se describirá más adelante en el apartado dedicado a la composición en aminoácidos de la Mn-superoxi-do dismutasa.

#### 1. Filtración en columna de Sephadex G-100.

Se siguió el método de Andrews (1965), utilizando Sephadex G-100 fino (diámetro de partícula de 40-120  $\mu$ ), calidad Pharmacia Fine

Chemicals (Upsala), y una columna cromatográfica de 2,5 X 74 cm -- equilibrada en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8. La preparación del gel, el tipo de columna empleada, así como la aplicación y elución de la muestra, se realizó de forma idéntica a la descrita en el apartado 6 de Purificación de la Enzima (pag.115).

Las proteínas patrón, preparadas a una concentración de 4-5 mg/ml, fueron las siguientes:

Quimotripsinógeno A, Serva (p.m. 25000).

Ovoalbúmina, Serva (p.m. 45000).

Albúmina bovina, Sigma.

Monómero (p.m. 67000).

Dímero (p.m. 134000).

Trímero (p.m. 201000).

Los volúmenes de elución respectivos se determinaron exactamente una vez localizadas las distintas proteínas por el método de Lowry (1951), y por medidas de la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones.

Se hicieron filtraciones independientes para las proteínas stan dard quimotripsinógeno-ovoalbúmina, albúmina bovina, y problema, uti lizando un volumen de muestra de 1 ml. Las fracciones recogidas fue ron de 5 ml, con un flujo de elución de 0,3 ml/minuto.

Las muestras de Mn-superóxido dismutasa utilizadas contenían una concentración proteica de 0,60 mg/ml, y el volumen de elución de la enzima se determinó una vez efectuado el ensayo de la actividad SOD de to das las fracciones eluidas, por el método fotoquímico de - Giannopolitis y Ries (1977a), en presencia de  $\text{CN}^-$  1 mM. Los resultata

dos obtenidos con las proteínas patrón se llevaron a un sistema de ejes coordinados, representando en ordenadas los logaritmos de los pesos moleculares y en abscisas los volúmenes de elución. El peso molecular de la enzima se determinó, por interpolación, a partir de su volumen de elución.

## 2. Electroforesis analítica en poliacrilamida a distintas concentraciones de gel.

Se utilizó la metódica de Hedrick y Smith (1968). El método se basa en la variación exponencial que experimenta la movilidad relativa de una proteína al variar la concentración del gel. Cuando los logaritmos de estas movilidades se representan frente a la concentración del gel se obtiene una recta, cuya pendiente está relacionada con el peso molecular (Ferguson plots). Así mismo, y de acuerdo con la ecuación de Ferguson, rectas paralelas indican proteínas de peso molecular análogo que difieren en su carga, mientras que rectas no paralelas convergentes en el eje de ordenadas (concentración nula de acrilamida), son indicativas de proteínas con carga análoga y peso molecular distinto.

La solución madre de acrilamida, con una relación acrilamida: bis-acrilamida de 30/1, se preparó de la siguiente forma:

Acrilamida -----	20 g
Bis-acrilamida -----	0,6666 g
Buffer Tris-ClH 377 mM, pH 8,9, c.s.p. ----	100 ml

A partir de ésta se prepararon los geles a distintas concentraciones de acrilamida, según se indica a continuación:

	Concentración de acrilamida					
	6%	7%	8%	9%	10%	11%
Solución madre acrilamida(ml)	7,5	8,75	10	11,25	12,5	13,75
Buffer TrisClH <sub>3</sub> 77 mM, pH 8,9(ml)	17,5	16,25	15	13,75	12,5	11,25
Dimetilaminopropionitrilo (μl)	60	70	80	90	100	110
Solución persulfato al 7%(ml)	0,8	0,9	1	1,15	1,30	1,45

Antes de agregar la solución de persulfato debe filtrarse y - desgasar separadamente cada una de las soluciones. Por otro lado, - antes de proceder a la gelificación conviene enfriar previamente las soluciones y llevar a cabo el llenado de los tubos en cámara fría, sobre todo para las altas concentraciones de acrilamida. Se hizo un recorrido para cada concentración de acrilamida utilizada.

Las muestras, patrones y problemas, se prepararon al 10% en sa carosa, y se les añadió unos cristales de azul de bromofenol como - marcador del frente electroforético.

Los patrones empleados fueron los siguientes:

Albúmina bovina (Sigma) al 0,5%, que en el desarrollo se des-  
dobla en las siguientes formas:

Monómero (p.m. 67000)

Dímero (p.m. 134000)

Trímero (p.m. 201000)

Tetrámero (p.m. 268000)

Hexoquinasa (Sigma) al 0,1% (p.m. 99000)

Los volúmenes de muestra patrón utilizados fueron de 50 μl.

Para la muestra problema se emplearon 25  $\mu$ l de una solución con una concentración proteica de 0,950 mg/ml.

Las condiciones empleadas, así como el aparato utilizado, han sido descritos en la página 99 de Material y Métodos. Conviene resaltar la dificultad que representa la extracción de los geles con alta concentración en acrilamida, lo cual puede facilitarse mediante congelación de los mismos durante 5-10 min. Por otro lado los tiempos de prerreconido y reconido han de ser rigurosamente iguales - para cada una de las concentraciones de gel.

Antes de la tinción se señaló la posición del frente (azul de bromofenol) con un alambre de cobre. La localización de las bandas protéicas pertenecientes tanto a los standards como a las muestras problema, se hizo por tinción con negro de amido. En algunas ocasiones las fracciones con actividad SOD se detectaron por revelado enzimático "in situ" según el método fotoquímico de Weisiger y Fridovich (1973a).

Finalmente, se procedió al registro de los geles a 620 nm en un densitómetro Vernon, mod. PHI-6, midiéndose gráficamente las distancias de emigración del frente y de las diferentes bandas de proteínas y actividad. La movilidad relativa de cada una de las fracciones proteicas se calculó según la fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia de emigración de la proteína}}{\text{distancia de emigración del frente}}$$

En un sistema de ejes coordenados se representaron las concentraciones de acrilamida en abcisas y en ordenadas los logaritmos de las movilidades relativas, para cada una de las proteínas o fracciones proteicas, standard y problema. Se calcularon las pendientes de

las rectas así obtenidas, que se llevaron a ordenadas en otro sistema coordinado, representando en abscisas los pesos moleculares correspondientes. Por interpolación de los valores de la proteína problema se calculó su peso molecular.

### Punto isoelectrico

El punto isoelectrico de la Mn-superóxido dismutasa se determinó utilizando la técnica de electroenfoque en gel de poliacrilamida descrita por Wrigley (1968).

Electroenfoque es el proceso que tiene lugar cuando un anfólito se somete a un campo eléctrico en un medio en que existe un gradiente de pH, de tal forma que cuando se introduce en el sistema -- una mezcla de proteínas con pI comprendidos dentro del gradiente usado, cada una de ellas adquirirá una carga que provocará su emigración y focalización final en la zona de su pH isoelectrico.

Se emplearon geles al 7,5% en acrilamida y 0,2% en bis-acrilamida, conteniendo un 2% de anfolinas con un gradiente de pH de 3,5-10. Aunque en esta técnica el material utilizado es el mismo que en la electroforesis "en disco", sin embargo, aquí la gelificación no se verifica en un medio tamponado a un pH fijo, sino en una solución de anfolinas con un intervalo determinado de pH. Las anfolinas están constituidas por una mezcla de diferentes ácidos alifáticos poliamino-policarboxílicos, de bajo peso molecular y gran difusibilidad, de tal forma que producen un espectro continuo de pH entre límites pre-seleccionados. Una diferencia fundamental de esta técnica respecto a la electroforesis "en disco" es que aquí el gel de poliacrilamida tiene sólo una misión de soporte anticonvectivo, nunca de filtro mo

lecular como en aquella, hasta tal punto que, para evitar una excesiva resistencia al movimiento de las macromoléculas es preciso preparar un gel con amplio tamaño de poro.

La muestra puede incorporarse a la solución a gelificar, ó bien, ya hecha densa en sacarosa, depositarse en forma de capa líquida sobre la superficie del gel, como en la electroforesis en poli-acrilamida clásica. En nuestro caso se utilizó el segundo procedimiento.

La preparación del gel se lleva a cabo a partir de una solución madre de acrilamida y bis-acrilamida, con una relación acrilamida:bis de 37,5/1:

Bis -----	0,04 g
Acrilamida -----	1,5 g
Agua c.s.p. -----	5 ml

y de la solución catalítica:

Dimetilaminopropionitrilo -----	0,16 ml
Agua c.s.p. -----	10,0 ml

Con ambas se prepara la siguiente solución concentrada de gelificación:

Solución catalítica -----	0,75 ml
Solución madre de acrilamida-bis -----	4,5 ml
Afolinas al 40%, pH 3,5-10 -----	0,90 ml

A partir de esta solución se prepara otra diluida tomando 5,5 ml a los que se adicionan 9,9 ml de agua. Una vez desgasada esta mez

cla, se le añade 1,1 ml de solución recién preparada de persulfato amónico al 1%. De esta forma la solución de acrilamida-bis queda a un porcentaje del 7,5% en acrilamida.

El llenado de los tubos (7,5 X 0,5 cm) se hace como ya se describió en la pag. 99 de Material y Métodos, evitándose la formación de menisco colocando una pequeña capa de agua en la parte superior del gel. Las soluciones anódica y catódica utilizadas fueron ácido sulfúrico (Merck) al 0,2% y trietanolamina (Merck) al 0,4% en volumen, respectivamente, estando el ánodo situado en la parte superior.

Se utilizaron volúmenes de muestra de 50  $\mu$ l, conteniendo sacarosa al 10% y una gota de anfolinas al 40%. En cada muestra se aplicaron 9  $\mu$ g de proteínas. Para evitar el contacto de las muestras con la solución anódica, se coloca encima del gel una capa protectora de unos 3 mm de espesor de la siguiente solución al 5% en sacarosa:

Anfolinas al 40% -----	150 $\mu$ l
Sacarosa -----	150 mg
Agua -----	3 ml

Bajo esta solución se deposita la muestra con ayuda de una microjeringa.

El desarrollo electroforético se inicia con un prerrecurso sin muestra a 2 mA por gel -16 mA en total- durante 30 min. Para el recorrido se utiliza el mismo amperaje, hasta un voltaje máximo de 350 V, durante tres horas.

Terminado el proceso electroforético, se lavó rápidamente con agua destilada la parte superior de los geles con el fin de eliminar

los restos de ácido sulfúrico, y después se procedió a cortarlos longitudinalmente en dos partes iguales. En una de las mitades se llevó a cabo la localización "in situ" de la actividad Mn-superóxido - dismutasa, según el método fotoquímico de Weisiger y Fridovich (1973a), mientras que la otra mitad se conservó a 4°C en tanto se efectuaba esta reacción. Una vez conocida la posición de las zonas activas, - se tomó la otra mitad intacta del gel, conservada en frío, y se cortó con una cuchilla aquella sección coincidente con la banda detectada de actividad SOD. El valor de pH de esta zona corresponde aproximadamente al pI de la enzima. El resto del gel fue troceado completamente en secciones de unos 2 mm de grosor. Todos los trozos de gel se incubaron separadamente, a 4°C durante 12 horas, en tubos de ensayo conteniendo 0,5 ml de agua destilada hervida recientemente, con el fin de extraer las anfolinas de la malla del gel. Finalmente, todos los fragmentos se maceraron en sus correspondientes tubos con ayuda de una varilla de vidrio de base plana, llevándose a cabo la medida del pH de todas las soluciones.

#### Composición en aminoácidos

Para la determinación de la composición en aminoácidos de la enzima se utilizó un preparado puro con una concentración de proteínas de aproximadamente 2,0 mg/ml. De esta solución se tomaron 5 alícuotas de 0,45 ml: dos de ellas para análisis de aminoácidos previa hidrólisis clorhídrica durante 20 horas; una para el mismo análisis pero con 72 horas de hidrólisis; otra para la determinación por duplicado de cisteína-cistina por oxidación perfórmica; y la última - para la determinación por duplicado de triptófano con ácido tioglicólico.

### 1. Hidrólisis ácida.

La hidrólisis se realizó en tubos de vidrio de 5 ml de capacidad, provistos de un cuello estrecho de 5 cm de longitud. A través de éste se pasó a cada tubo la solución de superóxido dismutasa llevada previamente a un volumen final de 1 ml con agua destilada, y se adicionó después un volumen igual de ClH concentrado del 37% (d=1,19) calidad Merck p.a., quedando de esta forma la solución final 6 N en ClH. El contenido de los tubos se congeló a  $-60^{\circ}\text{C}$  en mezcla acetona-nieve carbónica, practicándose entonces a través del cuello un vacío progresivo hasta unos 20 micrones. Finalmente, los tubos se cerraron a la llama por la zona estrechada, y se llevaron a hidrólisis a  $110^{\circ}\text{C}$ , permaneciendo dos de ellos durante 20 horas y el tercero 72 horas.

Pasado este tiempo, los tubos se dejaron enfriar, y su contenido se pasó cuantitativamente, por sucesivos lavados, a los respectivos matraces de un rotavapor Buchi, donde se procedió a eliminar el ClH a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  y a presión reducida. El residuo seco se disolvió en 10 ml de agua destilada y se volvió a evaporar. Repitiendo esta operación dos veces más, se consiguió la eliminación total del ácido. El último residuo seco se disolvió en 3,2 ml de buffer cítrico-citrato 0,2 N en  $\text{Na}^+$ , pH 2,2, de tal forma que, la concentración final en aminoácidos era equivalente a unos 0,3 mg/ml de proteína original. Estas soluciones antes de inyectarlas en el analizador de aminoácidos se filtraron para eliminar cualquier residuo insoluble.

### 2. Oxidación perfórmica.

La cuarta alícuota de 0,45 ml se dividió en dos fracciones de

0,225 ml que fueron sometidas por separado a oxidación perfórmica - según la técnica de Moore (1963), seguida de hidrólisis a 110°C durante 20 horas. Cada muestra, previamente liofilizada, se disolvió en 2 ml del reactivo oxidante de ácido perfórmico, previamente preparado y enfriado en baño de hielo a 0°C. El ataque se prolongó durante 4 horas a 0°C, permaneciendo mientras tanto los tubos tapados con "Parafilm". Pasado éste tiempo se destruyó el exceso de oxidante agregando 0,3 ml de BrH del 47%, calidad Merck p.a., manteniéndose también la mezcla a 0°C.

El contenido de cada tubo se trasvasó cuantitativamente a pequeños matraces de rotavapor, eliminándose el bromo formado y el -- BrH en exceso, mediante evaporaciones a 40°C y presión reducida, y disoluciones sucesivas en agua destilada.

Finalmente el residuo seco se disolvió en 0,5 ml de ClH 6 N, pasándolo cuantitativamente, mediante lavados con 2 ml adicionales del reactivo clorhídrico, a sendos tubos de hidrólisis donde, previa congelación y vacío, según se indicó anteriormente, se realizó la hidrólisis de la proteína oxidasa a 110°C durante 20 horas.

El residuo seco final, una vez evaporado el ClH, se disolvió en 1,3 ml de buffer cítrico-citrato 0,2 N en Na<sup>+</sup>, pH 2,2.

### 3. Hidrólisis en presencia de ácido tioglicólico.

La última alícuota de solución enzimática se dividió en dos - fracciones de 0,225 ml, llevándose seguidamente ambas soluciones a un volumen final de 1 ml por adición de agua destilada.

La hidrólisis de las muestras se efectuó según la metodología general pero en presencia de ácido tioglicólico a una concentración - final del 2% (v/v).

De este modo, a sendos tubos de hidrólisis que contenían 1 ml de solución enzimática, se les adicionó un volumen igual de la siguiente solución de ataque:

CIH concentrado del 37%, d=1,19 -----	9,4 ml
Acido tioglicólico al 70% (v/v) -----	0,6 ml

Con lo que la solución final en el tubo de hidrólisis queda a una concentración 6N en ácido clorhídrico y al 2% (v/v) en ácido tioglicólico.

El contenido de los tubos, previa congelación y vacío, según se indicó con anterioridad, se sometió a hidrólisis durante 20 horas a 110°C. Transcurrido este tiempo, y después de eliminar los restos de CIH y ácido tioglicólico por medio de sucesivos lavados con agua destilada y evaporaciones, el residuo seco final se disolvió en 1,3 ml de buffer cítrico-citrato.

#### 4. Análisis cromatográfico de aminoácidos.

Se efectuó según la técnica de Moore y col. (1958), en un autoanalizador de aminoácidos JEOL, mod. JLC-6AH, provisto de sistema de doble columna termostatizable: una corta para aminoácidos básicos, estabilizada y eluida con buffer cítrico-citrato sódico 0,35 N en  $\text{Na}^+$ , pH 5,30, y una larga para aminoácidos ácidos y neutros, estabilizada y eluida primero con buffer cítrico-citrato sódico 0,2 N en  $\text{Na}^+$ , pH 3,28, y con buffer cítrico-citrato sódico 0,2 N en  $\text{Na}^+$ , pH 4,30, después. El aparato posee sistema de inyección automática de muestra, pudiéndose programar todo el proceso hasta un total de 6 muestras, mediante un sistema de cintas perforadas.

El desarrollo del proceso cromatográfico queda impreso en un

registrador de tres canales, por inscripción discontinua cada dos segundos de las lecturas a 440 nm (canal 1 en sensibilidad X 3) y a 570 nm (canales 2 y 3 en sensibilidades X 3 y X 1), que un doble detector efectúa en sendas células de flujo continuo sobre los compuestos coloreados producidos al reaccionar los aminoácidos con el reactivo ninhidrínico.

Las lecturas de absorción correspondientes a cada pico son acumuladas y, finalmente, totalizadas por un integrador de doble canal, provisto además de discriminadores de modificación de línea base y de picos espúreos debidos a ruidos electrónicos. Los datos finales son registrados a ambas longitudes de onda en un impresor de datos, que suministra además el tiempo de retención del aminoácido en cuestión.

La determinación cuantitativa de cada aminoácido se efectúa por comparación de la absorción totalizada de su pico, con la correspondiente al mismo aminoácido de una solución standard de concentración conocida, y cromatografiada en paralelo.

En resumen, las características del proceso cromatográfico fueron:

Columna corta (básicos)

Columna larga (ácidos y neutros)

Resina: Sulfónica JEOL LC-R-1

Dimensiones: 0,8 X 15 cm.

Dimensiones: 0,8 X 50 cm.

Buffer de elución:

Buffers de elución:

cítrico-citrato 0,35 N en Na<sup>+</sup>, pH 5,30 (2 horas).

1º) Cítrico-citrato 0,2 N en Na<sup>+</sup>, pH 3,28 (1 hora 45 min).

Regeneración: NaOH 0,2 N (10 min)

2º) Cítrico-citrato 0,2 N en Na<sup>+</sup>, pH 4,30 (1 hora 45 min).

Flujo de columna: 1,15 ml/min

Regeneración: NaOH 0,2 N (20 min)

Flujo de columna: 1,15 ml/min

Temperatura de las columnas: 52°C

Flujo del detector: 0,42 ml/min

Flujo de ninhidrina: 0,21 ml/min

Temperatura del baño de ninhidrina: 95°C

Tiempo de reacción: 7 min

Paso óptico de las células del detector: 2 mm

Sensibilidad del detector:

a 570 nm: X 1 (0-100% T)

X 3 (70-100% T)

a 440 nm: X 3 (70-100% T)

Velocidad de carta del registrador: 12 cm/hora

El volumen de muestra necesario es, aproximadamente, de 1 ml por columna, dependiendo de la posición del muestreador en que se inyecta. Cada una de estas posiciones posee un factor de corrección - en relación con la posición nº 1, que standariza el volumen de muestra analizado. Puesto que la solución standard contiene 0,1 µmoles/ml de cada aminoácido, la cantidad de los mismos en la solución de superóxido dismutasa vendrá dada por la expresión:

$$\mu\text{moles de aminoácido/ml} = \frac{A_p \times f \times 0,1 \times d}{A_s \times f'}$$

$A_p$  = absorción totalizada del pico de aminoácido en la solución problema.

$A_s$  = absorción totalizada del pico de aminoácido en la solución standard.

$f$  = factor de corrección de la posición muestreadora del pro-

blema.

$f'$  = factor de corrección de la posición muestreadora del stand-  
dard.

$d$  = factor de dilución de la muestra original.

Debido a que la hidrólisis ácida a 110°C durante 20 horas, en las condiciones indicadas, produce una destrucción parcial de los aminoácidos treonina, y serina, estimada en aproximadamente un 5% para el primero y un 10% para el segundo, quedando los restantes intactos, la cuantificación de éstos últimos se realizó sobre los hidrolizados de 20 horas, mientras que con los dos aminoácidos indicados se efectuó el cálculo independiente para los hidrolizados de 20 y 72 horas, haciéndose luego la extrapolación a tiempo cero de hidrólisis según la expresión:

$$\log A_0 = \left( \frac{t_2}{t_2 - t_1} \right) \times \log A_1 - \left( \frac{t_1}{t_2 - t_1} \right) \times \log A_2$$

$A_0$  = concentración de aminoácidos a tiempo 0 de hidrólisis.

$A_1$  = concentración de aminoácido a tiempo 20 horas de hidrólisis.

$A_2$  = concentración de aminoácido a tiempo 72 horas de hidrólisis.

$t_2$  = tiempo máximo de hidrólisis (72 horas).

$t_1$  = tiempo mínimo de hidrólisis (20 horas).

El análisis cromatográfico del ácido cistéico se realizó en el mismo autoanализador utilizando sólo la columna larga. Su tiempo de retención es muy corto, debido a que su alta acidez impide su fija-

ción por la resina a pH 3,28, por lo que el programa se reduce a inyectar la muestra en la columna larga y esperar su elución.

Sin embargo, hay que tener la precaución de que el material hidrolizado no contenga ningún otro componente ácido que no pueda ser fijado por la resina o que absorba a 570 nm, longitud de onda a la que tiene lugar la cuantificación del ácido cisteico. Como patrón se utiliza una solución de ácido cisteico que contiene 0,1  $\mu\text{moles/ml}$  y las condiciones de cálculo son idénticas a las expuestas anteriormente, dándose el resultado final en  $\mu\text{moles/ml}$  de  $\frac{1}{2}$  - cistina, expresión que indica la suma de los valores de cisteína y cistina presentes en la molécula enzimática.

El análisis cromatográfico del triptófano se llevó a cabo en el mismo autoanализador empleando sólo la columna corta, equilibrada en las condiciones habituales, a pH 5,30.

Debido al bajo poder separador de esta columna, los picos correspondientes al triptófano y la lisina aparecen solapados por lo que la cuantificación se hace por diferencia entre los valores obtenidos para la lisina en la hidrólisis ácida normal y, los obtenidos al cuantificar los dos picos procedentes del hidrolizado en presencia de ácido tioglicólico. Por esta razón hay que tener la precaución de que la cantidad de material hidrolizado en presencia de ácido tioglicólico e inyectado en el autoanализador, sea exactamente la misma que la que se utiliza para la hidrólisis ácida normal. Como patrón se emplea una solución de triptófano que contiene 0,1  $\mu\text{moles/ml}$  y los resultados finales se expresan en  $\mu\text{moles/ml}$  de triptófano.

5. Cálculo del peso molecular atendiendo a la composición en aminoácidos.

La determinación del peso molecular de la enzima se hizo según el criterio del peso molecular mínimo. Teniendo en cuenta que, una proteína está compuesta por moléculas completas de aminoácidos, se puede considerar que el aminoácido minoritario se encuentra en una proporción de 1 resto por molécula. Por lo que, dividiendo las concentraciones de los restantes aminoácidos por la correspondiente al aminoácido en mínimo -para la Mn-superóxido dismutasa de guisante es la metionina- se obtendrán las razones molares de cada uno de ellos con relación a la metionina. Estos valores, una vez ajustados a unidades, representan el número mínimo de restos de cada aminoácido que compone la molécula proteica.

El factor de multiplicación de esta composición mínima podrá deducirse a partir de los datos suministrados por otras técnicas - paralelas utilizadas para la determinación del peso molecular.

Este método presenta el gran inconveniente de emplear como base de cuantificación el contenido del aminoácido minoritario, cuya determinación, precisamente por eso, está frecuentemente sometida a un considerable error, que es extendido a todos los demás.

Por ello, muchos autores toman como base de cuantificación el contenido en un aminoácido de concentración media en la proteína estudiada, que aparezca perfectamente individualizado en el proceso de elución cromatográfica del autoanализador, características que permitirán una determinación lo más exacta posible. Por lo que se refiere a la Mn-superóxido dismutasa de guisante el aminoácido tirosina es uno de los que cumple estos requisitos.

Estableciendo distintos contenidos molares de tirosina por molécula de proteína se obtendrá, siguiendo el procedimiento antes -- apuntado, los correspondientes a los demás aminoácidos y, a partir

de ellos, los pesos moleculares mínimos correspondientes a la Mn-superóxido dismutasa. De los resultados obtenidos a partir de este aminoácido, habrá que deducir las  $n-1$  moléculas de agua de los enlaces peptídicos establecidos entre las  $n$  moléculas de aminoácidos y, finalmente, agregar el contenido en manganeso obtenido en determinaciones independientes.

De los distintos pesos moleculares calculados se considerará más probable el que se aproxime más al obtenido por otra u otras técnicas paralelas, en nuestro caso los datos suministrados por la electroforesis analítica en geles con distintas concentraciones de acrilamida ó por filtración en Sephadex G-100.

#### REACTIVOS

- Buffer cítrico-citrato 0,2 N en  $\text{Na}^+$ , pH 2,2.

Disolver 9,85 g de citrato sódico.2  $\text{H}_2\text{O}$ , calidad Merck p.a., en unos 480 ml de agua bidestilada. Ajustar al pH indicado con ClH concentrado ( $d = 1,19$ ), calidad Merck p.a., completando después a 500 ml con más agua bidestilada.

- Reactivo de ácido perfórmico.

Peróxido de hidrógeno del 30%, Perhidrol, calidad Merck p.a.

----- 1 ml

Acido fórmico del 88% ----- 9 ml

Se deja estar a la temperatura ambiente durante 1 hora, enfriándolo después a  $0^\circ\text{C}$  en baño de hielo. Usarlo inmediatamente.

- Acido clorhídrico 6 N.

Diluir v/v ClH concentrado ( $d = 1,19$ ), calidad Merck p.a., con agua destilada

— Buffer cítrico-citrato 0,2 N en  $\text{Na}^+$ , pH 3,28.

Disolver los siguientes componentes:

Citrato sódico. $2\text{H}_2\text{O}$ , calidad Merck p.a.	-----	98,5 g
ClH concentrado ( $d = 1,19$ ), calidad Merck p.a.	-	58,2 ml
Acido n-caprílico, calidad Merck p.a.	-----	0,5 ml
Tiodiglicol, calidad Merck p.a.	-----	25 ml
n-propanol, calidad Merck p.a.	-----	350 ml

en agua bidestilada hasta un volumen de 5 litros. Ajustar el pH con ClH concentrado o solución concentrada de NaOH, según el caso.

— Buffer cítrico-citrato 0,2 N en  $\text{Na}^+$ , pH 4,30.

Disolver los siguientes componentes:

Citrato sódico. $2\text{H}_2\text{O}$	-----	98,5 g
ClH concentrado ( $d = 1,19$ )	-----	39,7 ml
Acido n-caprílico	-----	0,5 ml
Tiodiglicol	-----	25 ml

en agua bidestilada hasta un volumen de 5 litros, y ajustar según se indicó anteriormente.

— Buffer cítrico-citrato 0,35 N en  $\text{Na}^+$ , pH 5,30.

Disolver los siguientes componentes:

Citrato sódico. $2\text{H}_2\text{O}$	-----	171,5 g
ClH concentrado ( $d = 1,19$ )	-----	30,7 ml

Acido n-caprílico ----- 0,5 ml

en agua bidestilada hasta un volumen de 5 litros y ajustar al pH-metro según las normas anteriores. Para la preparación de este buffer conviene extremar las precauciones respecto a la ausencia de amoniaco en el agua y reactivos usados, así como de vapores del mismo en el ambiente donde se prepare.

- Buffer acético-acetato 4 N en  $\text{Na}^+$ , pH 5,5.

Disolver a unos 60°C y con agitación constante, los siguientes componentes:

Acetato sódico.  $3\text{H}_2\text{O}$ , calidad Merck p.a. ----- 544,05 g

Acido acético glacial, calidad Merck p.a. ----- 100 ml

en 500 ml de agua bidestilada. Dejar enfriar y llevar a 1 litro con más agua, ajustando al pH indicado con ácido acético glacial ó solución concentrada de NaOH, según el caso. Debe ponerse el mismo cuidado, cómo se indicó anteriormente, para su preparación en ausencia de trazas de amoniaco.

- Solución tamponada de ninhidrina.

Se prepara en el mismo recipiente, herméticamente cerrado, -- que trae el aparato para el almacenaje de este reactivo. Dada su -- gran inestabilidad al aire, a temperaturas aún moderadas y, sobre -- todo, frente a trazas de amoniaco, su preparación ha de ser muy cuj-- dada. El problema del aire se evita preparándolo en atmósfera de nitrógeno, el de la temperatura trabajando a 4°C, y la presencia de amoniaco usando reactivos totalmente exentos de él.

Una vez desalojado el aire del recipiente mencionado, mediante flujo continuo de nitrógeno del 99,999% de pureza, se disponen en el recipiente los siguientes reactivos:

Buffer acético-acetato 4 N en  $\text{Na}^+$ , pH 5,5 ----- 500 ml  
 Metilcelosolve, calidad BDH -----1500 ml

Se hace borbotear nitrógeno a su través durante 10 min, agregándose entonces 40 g de ninhidrina, calidad Merck p.a. Este borboteo de nitrógeno ayuda a su disolución y, cuando ésta es completa, se añaden 1,2 g de  $\text{Cl}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , calidad Merck p.a. Se mantiene el borboteo durante 15 min más, conservándose después el reactivo bajo una presión de nitrógeno de  $0,5 \text{ Kg/cm}^2$ .

El reactivo recién preparado es de color rojo oscuro, pero a las 24 horas toma una coloración rojo-rubí pálido, estando en disposición de usarse. Una preparación defectuosa se manifiesta por una coloración azul purpúrea.

— Solución de regeneración de las columnas de resina.

Solución 0,2 N de NaOH (8 g/l de NaOH, calidad Merck p.a.)

— Solución de lavado de los circuitos de ninhidrina.

Agua destilada: metil celosolve (v/v).

— Solución patrón de aminoácidos.

Se preparó diluyendo al 1/25 la solución madre de aminoácidos de la casa Hamilton, con buffer cítrico-citrato 0,2 N en  $\text{Na}^+$ , pH 2,2. Esta solución contiene  $2,500 \pm 0,004 \mu\text{moles/ml}$  de los siguientes aminoácidos: lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicocola, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina, más una concentración análoga de  $\text{NH}_4^+$  en forma de clorhidrato, y una concentración mitad de cistina. Por lo que la solución diluida contendrá  $0,1 \mu\text{moles/ml}$

de cada uno de ellos, y 0,05  $\mu$ moles/ml de cistina.

— Solución patrón de ácido cisteico.

Se prepara previamente una solución madre conteniendo 2,5  $\mu$ moles/ml de ácido cisteico (46,8 mg de ácido cisteico monohidratado, calidad Sigma, en 100 ml de buffer cítrico citrato 0,2 N en  $\text{Na}^+$ , pH 2,2). Esta solución se diluyó 25 veces con el mismo buffer, quedando a una concentración final de 0,1  $\mu$ moles/ml.

#### Contenido metálico

En la enzima purificada se determinó la presencia de Mn, Fe y Cu por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito (L'Vov, 1961) (Perkin-Elmer, 1971). Esta técnica tiene una sensibilidad 100 a 1000 veces mayor que la absorción atómica convencional con llama, al tiempo que requiere volúmenes mínimos de las muestras a analizar, motivos que aconsejaron su utilización debido tanto a los bajos contenidos de Mn, Fe y Cu presentes en las soluciones enzimáticas a determinar, como a los pequeños volúmenes disponibles de las mismas.

El método se basa en la propiedad que tienen los átomos neutros de un elemento de absorber su propia radiación de resonancia, siendo la cuantía de esta absorción proporcional al número de átomos sobre los que incide dicha radiación.

En un espectrofotómetro de absorción atómica, la radiación de resonancia del elemento en cuestión -de  $\lambda$  y  $\nu$  características y específicas- producida por la fuente de emisión ( $I_0$ ), se hace pasar a través de una nube de vapor atómico de dicho elemento, producida en

un pequeño horno de grafito por vaporización y atomización de alta temperatura de la solución en él depositada. La radiación de resonancia no absorbida ( $I$ ) es seleccionada por un monocromador y cuantificada por un receptor fotoeléctrico que la transforma en impulsos eléctricos medibles, siendo en estas condiciones la razón  $I/I_0$  función de la concentración del elemento en la solución a analizar. En la práctica esta concentración se determina sobre una curva patrón que se obtiene a partir de soluciones standard del mismo.

Se emplearon tres preparados enzimáticos procedentes de distintos lotes de purificación, que antes de ser analizados se dializaron primero frente a buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, 0,1 mM en EDTA, y después frente a este mismo buffer sin EDTA. Los volúmenes de muestra inyectados en el horno de grafito del espectrofotómetro, así como las diluciones previas de las mismas, variaban dependiendo del contenido proteico del lote utilizado en cada caso, que oscilaba entre 55-350  $\mu\text{g/ml}$ .

En general, para los preparados de superóxido dismutasa con menor contenido proteico se hicieron diluciones de 25 veces y, se inyectaron volúmenes de 50  $\mu\text{l}$  del preparado enzimático diluido. En las muestras enzimáticas más concentradas las diluciones efectuadas fueron de unas 100 veces y, los volúmenes de muestra inyectados de 20  $\mu\text{l}$ .

La determinación de Mn, Fe y Cu se llevó a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica, Perkin-Elmer, mod. 503, equipado de horno de grafito mod. HGA-74, corrector de fondo de deuterio y registrador Perkin-Elmer mod. 56.

Las condiciones operatorias del espectrofotómetro, así como de

la fuente de alimentación del horno quedan resumidas a continuación:

	<u>Fe</u>	<u>Cu</u>	<u>Mn</u>
Longitud de onda, nm	248,3	324,7	279,5
Rendija Å	2	7	2
Temperatura de secado, °C	100	100	100
Tiempo de secado, seg	40	40	40
Temperatura de quemado, °C	1200	900	100
Tiempo de quemado, seg	25	25	25
Temperatura de atomización, °C	2500	2550	2600
Tiempo de atomización, seg	15	15	15

Finalmente, tanto el material utilizado como las soluciones enzimáticas a analizar fueron escrupulosamente manipuladas con el fin de evitar contaminaciones por metales.

El número de átomos-g de Mn por mol enzima se calculó a partir de la expresión:

$$\text{Átomos-g Mn/mol enzima} = \frac{\{\text{Mn}\}}{\{\text{Prot}\}} \times \frac{\text{p.m. E}}{\text{p.a. Mn}} \times f = \frac{\{\text{Mn}\}}{\{\text{Prot}\}} \times 1711,0 \times f$$

donde {Mn} = concentración de manganeso determinada por absorción atómica, en µg/ml.

{prot} = concentración de proteínas de la solución enzimática utilizada en µg/ml.

p.m. E = peso molecular de la enzima (94000).

p.a. Mn = peso atómico del Manganeso (54,94).

f = factor de dilución.

## REACTIVOS

Solución patrón de Fe, Cu y Mn.

Se prepararon, por dilución, a partir de una solución conjunta de sales de Cu, Fe y Mn conteniendo 0,4  $\mu\text{g/ml}$  de Cu, 0,5  $\mu\text{g/ml}$  de Fe y 0,02  $\mu\text{g/ml}$  de Mn. Para ello, en un matraz de 250 ml se dispusieron: 2 ml de Sol. de Cu de 50  $\mu\text{g/ml}$ ; 2,5 ml de Sol. de Fe de 50  $\mu\text{g/ml}$  y 1 ml de Sol. de Mn de 5  $\mu\text{g/ml}$ , enrasándose finalmente con agua bidestilada.

A continuación, en matraces de 50 ml que se enrasaron finalmente a ese volumen con agua bidestilada, se dispusieron diferentes volúmenes de la solución conjunta anterior para obtener las siguientes concentraciones patrón:

Patrón nº	ml de solución conjunta	contenido en $\mu\text{g} / \text{ml}$		
		Fe	Cu	Mn
1	50,0	0,500	0,400	0,020
2	40,0	0,400	0,320	0,016
3	25,0	0,250	0,200	0,010
4	12,5	0,125	0,100	0,005

#### Ensayos de reconstitución del contenido en Mn de la enzima

Con el fin de averiguar si la Mn-superóxido dismutasa obtenida en forma homogénea había perdido durante la metodología de purificación parte de su contenido en manganeso, unido lábilmemente a la apoenzima, se ensayó la desnaturalización de la proteína y la reconstitución de su actividad enzimática según una modificación de la técnica de Ose y Fridovich (1976).

Una alícuota de 3 ml de enzima pura, en buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, conteniendo 0,6 mg/ml de proteína, fue sometida a un proceso

de diálisis secuencial frente a 250 ml de las siguientes soluciones:

1<sup>a</sup>) Solución 50 mM en Tris, pH 3,8, conteniendo:

8-hidroxiquinoleína 20 mM

Cloruro de guanidina 2,5 M

Cloruro de manganeso (II) 0,1 mM

2<sup>a</sup>) Buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, 0,1 mM en  $Cl_2Mn$

3<sup>a</sup>) Buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, 0,1 mM en EDTA

4<sup>a</sup>) Buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5.

Los procesos de diálisis se realizaron siguiendo el orden indicado, a 4°C durante 24 horas, con dos cambios de volumen en cada etapa, utilizando una tripa de celofán de dimensiones adecuadas al volumen de muestra. La membrana de diálisis fue hervida previamente en una solución de EDTA 2 mM, durante 10 min, con el fin de eliminar trazas de metales pesados que pudieran haber quedado ligados a su superficie como consecuencia del proceso de fabricación.

Tanto en la muestra inicial como en la obtenida después del tratamiento de desnaturalización y reconstitución, se ensayó la actividad superóxido dismutasa por el método de Beauchamp y Fridovich (1971) utilizando NBT y el sistema generador xantina-xantina oxidasa según se describió en Material y Métodos (pag 86). Así mismo, en ambas muestras se determinó la concentración de Mn por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito, según la metodología descrita en la pág.144 y su contenido en proteínas por el método de Lowry (1951).

## REACTIVOS

- Solución 50 mM en Tris, pH 3,8

Se disuelven 6,06 g de Tris, calidad Merck p.a., en unos 950 ml de agua destilada, ajustándose el pH a 3,8 con ClH conc. (d=1,19), calidad Merck p.a.. Una vez alcanzado este valor, se enrasa a 1 litro por adición de agua destilada.

A continuación se agregan los siguientes reactivos:

8-hidroxiquinoleína 20 mM, calidad Sigma -----	2,9 g/l
Cloruro de guanidina 2,5 M, calidad Fluka -----	238.8 g/l
Cl <sub>2</sub> Mn.4H <sub>2</sub> O 0,1 mM, calidad Merck -----	0,020 g/l

- Buffer Tris-ClH 50 mM pH 7,5 0,1 mM en Cl<sub>2</sub>Mn.

Tris 0,1 M (12,11 de Tris, calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) ----- 500 ml

ClH 0,1 M (8,3 ml de ClH concentrado d=1,19, calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) ----- ≈400 ml

Se hace el ajuste al pH indicado por adición de la solución clorhídrica, enrasándose finalmente a 1 litro con agua destilada. A continuación se agregan 0,02 g/l de Cl<sub>2</sub> Mn.4H<sub>2</sub>O, calidad Merck p.a.

Buffer Tris-ClH 50 mM pH 7,5, 0,1 mM en EDTA.

Se prepara el buffer de la forma descrita anteriormente, adicionando después 0,0372 g/l de EDTA sal disódica, calidad Merck p. a.

### Espectros de Resonancia de Spin Electrónico (RSE)

Para la realización de los espectros de resonancia de spin - electrónico de la enzima pura se ha utilizado un espectrofotómetro JEOL mod. "JES PE-3X" operándose en banda X ( $\approx 9,5\text{GZ}$ ) con una modulación de  $100\text{ KH}_2$ , y empleando una cavidad resonante cilíndrica, modelo  $\text{TE}_{011}$ . Se registraron espectros a temperatura ambiente y a la temperatura del nitrógeno líquido ( $77^\circ\text{K}$ ), colocando la muestra, en el primer caso, en un tubo capilar de cuarzo, y, en el segundo, en un tubo de cuarzo standard de 5 mm de diámetro. Todos los espectros se efectuaron en un campo entre 100 y 5100 gauss utilizando una potencia de microondas de 40 mWattios.

Se emplearon soluciones de enzima pura en buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, con una concentración proteica de aproximadamente 14,2 mg/ml (0,15 mM), y se registraron los espectros de la enzima correspondientes a: 1) Estado nativo; 2) Una vez reducida con ditionito - sódico; 3) Después de su hidrólisis con ClH.

Para obtener el espectro de la manganeso superóxido dismutasa reducida, se añadió a la muestra el volumen adecuado de una solución de ditionito sódico (Merck) 0,5 M en buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, para obtener una concentración final en ditionito de 2 mM. Inmediatamente se registró el espectro tras haber cerrado cuidadosamente el capilar por ambos extremos para evitar la reoxidación de la muestra. La aparición de la señal correspondiente al radical libre  $\text{SO}_2^\cdot$  se tomó como prueba de la presencia de ditionito, y por consiguiente de la existencia de un medio fuertemente reductor.

La hidrólisis clorhídrica de la enzima se llevó a cabo añadiendo suficiente ClH concentrado (calidad Merck) para conseguir una con

centración final aproximadamente 0,1 N, y calentando después a la muestra a 100°C durante 3 minutos.

## ESTRUCTURA CUATERNARIA

### Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida con SDS

El hecho de que el lauril sulfato sódico (SDS) sea capaz de disociar a las proteínas en sus cadenas polipeptídicas constituyentes, ha servido de base al método de Weber y Osborn (1969) de determinación del peso molecular de dichas cadenas, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. En este proceso, los distintos complejos proteína-SDS formados, que poseen una carga neta negativa por unidad de masa aproximadamente constante, se separan según sus pesos moleculares, pudiendo determinarse éstos para una proteína determinada por comparación de sus movilidades relativas, en geles conteniendo SDS, con las movilidades de proteínas patrón con pesos moleculares de sus cadenas polipeptídicas bien caracterizadas.

Utilizando el método de Weber y Osborn (1969) y empleando el SDS y la urea, como desestabilizantes de la estructura proteica, se llevó a cabo el estudio de la existencia de subunidades en la Mn-superóxido dismutasa purificada.

1. Incubación con SDS y urea, en presencia y ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Como paso previo a la electroforesis, se efectuó la incubación de las muestras proteicas y de los standards de peso molecular, en distintas condiciones. En una primera fase, se incubaron las mues--

tras con SDS al 1%, con y sin  $\beta$ -mercaptoetanol, utilizando porcentajes (v/v) de este compuesto tiólico del 1% y 8%, y posteriormente se estudió el efecto de la incubación de las muestras con SDS al 1% y urea 8 M, también en presencia y ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol al 1%. Estos ensayos se llevaron a cabo, en el primer caso, a temperaturas de 37<sup>o</sup>, 50<sup>o</sup> y 100<sup>o</sup>C, con diferentes tiempos de incubación, y, en el segundo caso, a 37<sup>o</sup> y 100<sup>o</sup>C. En todos estos ensayos se utilizó Mn-superóxido dismutasa, pura siendo la cantidad neta de proteínas en la mezcla de reacción de 18  $\mu$ g..

## 2. Determinación del peso molecular de las subunidades.

Se utilizaron geles con un 10% de acrilamida y un 0,2% de bisacrilamida, que fueron preparados en buffer fosfato sódico 0,1 M al 0,1% (p/v) en SDS, al que se incorporaba  $\beta$ -mercaptoetanol al 1% cuando se efectuaban las incubaciones en presencia de este reactivo.

La polimerización se llevó a cabo en volúmenes de 30 ml de solución de gelificación preparada en el buffer antes indicado, por adición de 1 ml de la solución catalítica de persulfato, efectuándose previamente el enfriamiento de la mezcla a 4<sup>o</sup>C. En aquellos casos en que se hicieron incubaciones en presencia de urea 8 M, se agregaron las cantidades correspondientes de este producto a la solución de gelificación, para obtener la misma concentración en los geles.

Para la electroforesis se emplearon tubos de vidrio de 7,5 X 0,5 cm, que se llenaron de forma análoga a la descrita en la pag. 99 de Material y Métodos. En todos los desarrollos el ánodo estaba situado en el compartimento inferior de la cubeta de electroforesis.

Las muestras standard y problema, preincubadas como se indicó

anteriormente, se prepararon al 10% en sacarosa y se les añadió una pequeña cantidad de azul de bromofenol, depositándose sobre la superficie del gel con ayuda de una microjeringa y en volúmenes de 50  $\mu$ l. Las cantidades de Mn-superóxido dismutasa y proteínas standard colocadas en los geles fueron 9  $\mu$ g y 12,5  $\mu$ g, respectivamente.

Se utilizaron como patrones de peso molecular de cadenas polipeptídicas, las siguientes proteínas, calidad Serva, al 0,025% (p/v):

Albúmina sérica bovina	(p.m. 67000)
Ovoalbúmina	(p.m. 45000)
Quimotripsinógeno	(p.m. 25000)
Mioglobina	(p.m. 17800)
Aldolasa	(p.m. 16000)
Citocromo c	(p.m. 12400)

Los desarrollos se realizaron a temperatura ambiente con una corriente constante de 6 mA por gel -48 mA en total- durante 3 horas 30 min. Después de la electroforesis los geles eran extraídos de los tubos, señalándose la posición del frente con un alambre de cobre. La tinción de proteínas se llevó a cabo sumergiendo los geles durante 5 horas en una solución de Azul Coomassie al 0,25%, decolorándose después el fondo por lavado, con agitación y flujo continuo, con una solución acuosa de metanol y ácido acético. En algunas ocasiones se efectuaron ensayos "in situ" de la actividad SOD de las bandas proteicas separadas en los geles, empleando la metodología de Weisiger y Fridovich (1973a) descrita en la página 100.

Finalmente, los geles teñidos y decolorados, se registraron a 540 nm en un densitómetro Vernon tipo PHI-6, midiéndose sobre las gráficas obtenidas las distancias de emigración del frente y de las distintas bandas de proteínas. La movilidad relativa de cada una de las fracciones se calculó según la fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia de emigración de la proteína}}{\text{distancia de emigración del frente}}$$

En un sistema de ejes coordenados, se representaron en abscisas los logaritmos de los pesos moleculares de los polipéptidos patrón y, en ordenadas el valor de sus correspondientes  $R_f$ . Por interpolación en la recta de regresión obtenida, de los valores de  $R_f$  -- calculados para los problemas, se determinó el peso molecular de -- las subunidades enzimáticas.

#### REACTIVOS

- Buffer de base:  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}-\text{PO}_4\text{HNa}_2$  0,1 M, pH 7,0.  
 Fosfato sódico 0,1 M (6,90 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , calidad Merck p.a., en 500 ml de agua destilada) ----- 390 ml  
 Fosfato disódico 0,1 M (14,2 g de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) ----- 710 ml  
 Se mezclan en las proporciones indicadas, y se ajusta el pH por adición de fosfato monosódico 0,1 M.
  
- Buffer de incubación de la muestra:  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}-\text{PO}_4\text{HNa}_2$  0,01 M, pH 7,0, con SDS y  $\beta$ -SH al 1%.  
 Lauril sulfato sódico (SDS), calidad Sigma ----- 0,1 g  
 $\beta$ -mercaptoetanol, calidad Sigma ----- 0,1 g  
 Buffer base ----- 1,0 ml  
 Agua destilada ----- 9,0 ml  
 En ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol, el volumen correspondiente

era sustituido por agua destilada. Las incubaciones en presencia de urea 8 M (con y sin  $\beta$ -SH) se realizaron adicionando la cantidad correspondiente de este reactivo a las soluciones standard y problema (0,0960 g/0,2 ml.)

— Buffer de electrodos.

Se prepara a partir del buffer base anterior, llevándolo al 0,1% en SDS, e incorporando  $\beta$ -mercaptoetanol al 1% (v/v) cuando la incubación de la muestra se hace en presencia de este reactivo tió-lico.

— Solución catalítica de persulfato.

Persulfato amónico, calidad Merck s.a., al 7% (p/v) en buffer de electrodos.

Es de preparación extemporánea

— Solución de gelificación

Geles con urea	Geles sin urea
Acrilamida, calidad BDH --- 3,06 g	Acrilamida, calidad BDH-- 3,06 g
N-N', metilenbis-acrilamida, calidad BDH ----- 0,0612g	N-N' metilenbis-acrilamida calidad BDH ----- 0,0612 g
3-dimetilaminopropionitrilo calidad BDH ----- 100 $\mu$ l	3-dimetilaminopropionitri lo calidad BDH ----- 100 $\mu$ l
Urea 7M, calidad Merck ---- 12,86 g	- - - - -
Buffer de electrodos c.s.p. 30 ml	Buffer de electrodos c.s.p. 30 ml

— Solución de Azul Coomassie

Azul Coomassie, calidad Sigma ----- 0,25 g

Metanol, calidad Probus ----- 45,4 ml  
 Acido acético glacial, calidad Probus ----- 9,2 ml  
 Agua destilada ----- c.s.p. 100 ml  
 Una vez preparada es necesario filtrar

— Solución de decoloración.

Acido acético glacial, calidad Probus ----- 75 ml  
 Metanol, calidad Probus ----- 50 ml  
 Agua destilada ----- c.s.p. 1000 ml

## ESTABILIDAD DE LA ENZIMA

### 1. Estabilidad térmica

La estabilidad frente a la temperatura de los preparados puros de Mn-SOD se ensayó sometiendo los mismos en buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 a temperaturas de  $-18^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  y  $80^{\circ}\text{C}$ . Las determinaciones correspondientes a  $50^{\circ}$ ,  $60^{\circ}$  y  $80^{\circ}\text{C}$  se llevaron a cabo durante tiempos de 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos y 40 ó 50 minutos. Para las temperaturas de  $-18^{\circ}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  los ensayos de actividad se hicieron al cabo de 1 día, 5 días, 7 días, 15 días, 1 mes, 2 meses, 3 meses, y 4 meses. Finalmente, los tiempos correspondientes a las temperaturas de  $25^{\circ}\text{C}$  fueron de: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas y 24 horas.

En todos estos ensayos se utilizaron soluciones enzimáticas con una concentración de proteínas de 0,35 mg/ml. La metodología seguida en estas experiencias consistió en disponer volúmenes de 0,2 ml de las muestras a ensayar en distintos tubos de hemolisis que, una

vez cerrados con parafilm, se llevaron cada uno a las temperaturas antes señaladas. De ellos se fueron tomando alícuotas de 20  $\mu$ l para las determinaciones a los tiempos indicados.

Para la muestra que se iba a someter a la temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  se dispusieron tantos tubos con 20  $\mu$ l como tiempos a ensayar, con objeto de evitar posibles pérdidas de actividad por sucesivas congelaciones y descongelaciones.

Las actividades enzimáticas se determinaron por el método de Beauchamp y Fridovich (1971) usando NBT como detector de los radicales  $\dot{\text{O}}_2^-$  generados enzimáticamente. Debido a la elevada actividad específica de los preparados enzimáticos utilizados, antes de determinar su actividad, fue necesario efectuar diluciones de los mismos - en el buffer de ensayo, hasta una concentración de 8-9  $\mu\text{g/ml}$ .

## 2. Estabilidad frente al pH

Se ensayó el efecto de la preincubación a  $25^{\circ}\text{C}$  y a distintos pH (4-10,6) sobre la actividad enzimática de preparados puros de Mn-superóxido dismutasa. Las soluciones tampón empleadas para los distintos pH, a una concentración final de 0,05 M, fueron las siguientes:

Cítrico-citrato	(pH: 4,0; 5,0; 6,0)
$\text{PO}_4\text{HK}_2-\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	(pH: 6,0; 7,0; 7,8)
Tris-ClH	(pH: 7,8; 8,7)
Glicina-NaOH	(pH: 8,7; 10,0; 10,6)

Se tomaron 30  $\mu$ l de preparado enzimático, con una concentración de proteínas de 3,0 mg/ml, y se dispusieron en distintos tubos de ensayo a los que se añadió 2,97 ml de cada uno de los buffers an

tes indicados, de tal forma que la concentración final de enzima en la mezcla de incubación era de 30  $\mu\text{g/ml}$ . De estas diluciones, se tomaron inmediatamente alícuotas de 0,5 ml que se incubaron a 25°C durante distintos tiempos, excepto las muestras correspondientes al tiempo cero que se conservaron en baño de hielo hasta el momento de su determinación. El pH final de las mezclas de incubación se determinó en diluciones preparadas de manera análoga a las que se acaba de describir.

A las 0, 5 y 24 horas, se determinó la actividad superóxido dismutasa de las muestras incubadas a 25°C a distintos pH, según el método de Beauchamp y Fridovich (1971), descrito anteriormente.

#### REACTIVOS

- Buffers cítrico-citrato sódico 50 mM.

	pH		
	4,0	5,0	6,0
Acido cítrico 50mM (2,63g/250 ml)	59,0 ml	35,0 ml	11,5 ml
Citrato sódico $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50mM (3,68g/250 ml)	$\approx 41,0$ ml	$\approx 65,0$ ml	$\approx 88,5$ ml

Se hace el ajuste final al pH-metro con la solución de citrato sódico.  $2\text{H}_2\text{O}$ , 50 mM.

- Buffers  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  50 mM.

	pH		
	6,0	7,0	7,8
$\text{PO}_4\text{HK}_2$ 50 mM (8,709g/l)	18,0 ml	90,0 ml	137,0 ml
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 50 mM (6,804g/l)	$\approx 130,0$ ml	$\approx 58,5$ ml	$\approx 13,0$ ml

Se hace el ajuste final al pH-metro con la solución de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  50 mM.

— Buffers Tris-ClH 50 mM.

Se prepara una solución de Tris 0,1 M, calidad Merck p.a., -- (1,8767g/250 ml), y se toman volúmenes de 50 ml para cada pH (7,8 y 8,7), ajustándose los valores finales al pH-metro con ClH 0,4 N (8,1 ml ClH concentrado  $d=1,19/250$  ml). El volumen se lleva finalmente a 100 ml con agua destilada.

— Buffers Glicina-NaOH 50 mM.

Se prepara una solución de Glicocola 0,1 M, calidad Merck p. a. (1,8767 g/250 ml), y se toman volúmenes de 50 ml que se ajustan al pH-metro a cada valor de pH (8,7; 10,0; 10,6) con NaOH 0,4 M. El volumen se completa a 100 ml con agua destilada.

#### CONDICIONES OPTIMAS DE pH Y TEMPERATURA PARA LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

##### 1. pH

Inicialmente, se ensayaron valores de pH comprendidos entre 6,0 y 10,5 con un intervalo de variación de aproximadamente 1 unidad. Con este fin, se utilizaron los cuatro sistemas tampones siguientes:

Cítrico-citrato	(pH 6,0)
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	(pH 6,0 a 7,8)
Tris-ClH	(pH 7,8 a 8,9)
Glicina-NaOH	(pH 8,7 a 10,6)

Siendo todos ellos utilizados a una concentración inicial de

62 mM, lo que corresponde a una concentración de 50 mM en la mezcla de reacción. Así mismo, a todos los buffers preparados se les incorporó EDTA en una concentración 0,124 mM, lo que proporciona una concentración final de 0,1 mM.

Las determinaciones de actividad se realizaron a 25°C según una modificación del ensayo debido a McCord y Fridovich (1969) que utiliza citocromo c como detector de  $O_2^-$  y, que ha sido descrito en el apartado de Determinación de Actividad Superóxido Dismutasa. En este caso se mantuvieron fijas las concentraciones finales de los reactivos, en la mezcla de reacción (3,225 ml) pero se introdujo una variación en la metodología, consistente en utilizar 0,5 ml de una solución conteniendo citocromo c y xantina a concentraciones de  $6,45 \times 10^{-5} M$  y  $3,22 \times 10^{-4} M$ , respectivamente, que se llevaron a un volumen final de 3,225 ml por adición de la cantidad adecuada de cada uno de los buffers a ensayar. Una vez preparada la mezcla de incubación se midió su pH al añadir el preparado enzimático (tiempo 0), siendo la concentración de éste en dicha mezcla de 1,6 µg/ml.

Determinada así la zona de pH óptimo, éste se precisó efectuando incubaciones en dicho margen utilizando una serie de buffers Tris-HCl 62 mM y Glicina-NaOH 62 mM entre los valores de pH 7,9 y 9,2, con intervalos de unas 0,2 unidades. Al igual que antes, se determinó el pH a tiempo cero.

#### REACTIVOS

Todos los sistemas buffer que se indican a continuación se prepararon 0,124 mM en EDTA (0,0046g/100 ml).

- Buffer ácido cítrico-citrato 62 mM, pH 6,0

Acido cítrico 62 mM (3,327 g de ácido cítrico, calidad Merck p.a., en 250 ml de agua destilada) -----  $\approx$  11,5 ml

Citrato trisódico. $2H_2O$  62 mM (4,559 g de citrato sódico, calidad Merck p.a., en 250 ml de agua destilada) ----- 88,5 ml

Se hace el ajuste al pH-metro añadiendo ácido cítrico 62 mM hasta alcanzar el pH indicado.

— Buffers  $PO_4HK_2$ - $PO_4H_2K$  62 mM

	pH		
	6,0	7,0	7,8
$PO_4HK_2$ 62 mM (2,69 g/250 ml)	18 ml	90 ml	137 ml
$PO_4H_2K$ 62 mM (2,11 g/250 ml)	$\approx$ 130 ml	$\approx$ 58,5 ml	$\approx$ 13 ml

Se hace el ajuste final al pH-metro con las soluciones de ---  $PO_4H_2K$  62 mM.

— Buffers Tris-CIH 62 mM.

Se toman 50 ml de Tris 0,124 M, calidad Merck p.a. (3,7553 g/250 ml), que se ajustan al pH-metro a cada pH (7,80; 8,10; 8,40; -- 8,70; 8,90) con CIH 0,4 N (8,1 ml CIH concentrado  $d=1,19/250$  ml). El volumen se lleva finalmente a 100 ml con agua destilada.

— Buffers Glicina-NaOH 62 mM

Se prepara una solución de glicocola, calidad Merck p.a., --- 0,124 M (2,3272 g/250 ml), y se toman volúmenes de 50 ml para cada pH (8,7; 8,83; 9,35; 10,0; 10,6), ajustando con NaOH 0,4 M al pH de seado. El volumen se completa a 100 ml con agua destilada.

## 2. Temperatura.

Se hicieron ensayos a las siguientes temperaturas de reacción: 4°; 15°; 25°; 31°; 37°; 41°; 45° y 60°C. Antes de cada reacción se equilibran los reactivos a la temperatura correspondiente, la cual era después regulada en las cubetas termostalizadas del espectrofotómetro mediante un baño de agua con un grupo calefactor provisto de termostato con bomba impulsora. En el ensayo a 4°C, se utilizó el mismo sistema salvo que el baño se enfrió con el serpentín de un grupo compresor.

Las determinaciones de actividad se efectuaron en buffer Tris-ClH 62 mM ajustado al pH óptimo de la enzima determinado en la experiencia anterior, y según la metódica descrita por McCord y Fridovich (1969). Las concentraciones de enzima en la mezcla de reacción eran de 0,15 µg/ml.

### INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA: CONSTANTE DE VELOCIDAD APARENTE

Empleando las condiciones óptimas de pH y temperatura, previamente determinadas, se llevaron a cabo ensayos de actividad con concentraciones finales de enzima pura, de elevada actividad específica, comprendidas entre 0,087-2,44 µg/ml. La actividad enzimática se determinó empleando el sistema xantina/XOD como generador de radicales  $\dot{O}_2^-$  y el citocromo c como detector de este radical, según se describió en el apartado de Determinación de la Actividad Superóxido - Dismutasa.

Por otra parte, empleando las condiciones óptimas de pH y temperatura, también se estudió el efecto sobre la velocidad de reac--

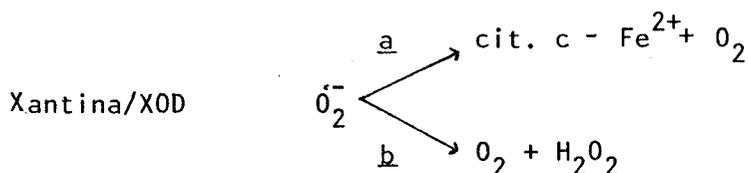
ción de las mismas concentraciones de superóxido dismutasa pura antes indicadas, utilizando NBT como detector de radicales  $\dot{O}_2^-$ , que -- eran generados igualmente por el sistema xantina/XOD.

Las constantes de velocidad aparente para la reacción de manganeso superóxido dismutasa de hojas de guisante con superóxido --- se determinó a 25°C según el método descrito por Forman y Fridovich (1973b), basado en la competición cinética del radical  $\dot{O}_2^-$  entre la superóxido dismutasa y el citocromo c ó el NBT. Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones standard, esto es, a pH 7,8 para el citocromo c y, a 10,2 para el NBT.

Las constantes de velocidad a 25°C para la reacción del ----  $\dot{O}_2^-$  con el ferricitocromo c y con el NBT, determinadas por radiolisis de pulsos, son  $6,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  a pH 7,8 (Land y Swallow, -- 1971) y,  $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  a pH 10,2 (McCord y col., 1977b) respectivamente. A partir de estas constantes se puede calcular indirectamente la constante de reacción de la Mn-superóxido dismutasa sin recurrir a radiolisis de pulsos.

La generación de radicales  $\dot{O}_2^-$  se efectuó enzimáticamente mediante el sistema xantina/XOD, en las condiciones descritas en la -- página 86, determinándose la concentración de superóxido dismutasa necesaria para competir igualmente con el ferricitocromo o con el - NBT y, por lo tanto, capaz de inhibir la tasa de producción de sus derivados reducidos en un 50%. Finalmente, a partir de éstos se calcularon las | constantes de velocidad correspondientes.

Para el cálculo se tiene en cuenta que, en las condiciones -- standard de ensayo, los radicales superóxido generados enzimática-- mente reaccionan principalmente según dos vías, que en el caso del citocromo c son:



En la reacción a tiene lugar la cesión de un electrón al ferri citocromo c (cit. c-Fe<sup>3+</sup>) viniendo dada la velocidad de esta reacción por la expresión:

$$v = \frac{d \{ \text{cit. c-Fe}^{2+} \}}{dt} = K_c \{ \text{cit. c-Fe}^{3+} \} \{ \text{O}_2^{\cdot -} \}$$

En la reacción b, los radicales superóxido son desproporcionados catalíticamente por la superóxido dismutasa, estando definida la velocidad del proceso por:

$$d \{ \text{O}_2 \} / dt = K_e \{ \text{SOD} \} \{ \text{O}_2^{\cdot -} \}$$

De un modo similar al indicado precedentemente, se estudió el efecto producido sobre la tasa de reducción del citocromo c por concentraciones de Mn-superóxido dismutasa comprendidas entre 0,087-2,44 µg/ml, con la excepción de que, en este caso, no se emplearon las condiciones óptimas de temperatura y pH, sino que los ensayos se llevaron a cabo en condiciones standard, esto es a 25°C y a valores de pH de 7,8 y 10,2 para el citocromo c y el NBT, respectivamente.

De acuerdo con el método de Forman y Fridovich (1973b), para aquella concentración de Mn-superóxido dismutasa que produce un 50% de inhibición en la reducción del citocromo c a pH 7,8 y 25°C, tiene lugar una competición entre las reacciones a y b, verificándose entonces:

$$K_c \{ \text{cit.c-Fe}^{3+} \} \{ \dot{\text{O}}_2^- \} = K_e \{ \text{SOD} \} \{ \dot{\text{O}}_2^- \}$$

y a partir de esta expresión se obtiene la constante de velocidad aparente,  $K_e$ , para la reacción de desproporcionamiento de los radicales  $\dot{\text{O}}_2^-$  catalizada por la Mn-superóxido dismutasa:

$$K_e = \frac{K_c \{ \text{cit.c-Fe}^{3+} \}}{\{ \text{SOD} \}}$$

donde  $K_c$  es la constante de velocidad a pH 7,8 para la reacción del ferricitocromo c con el  $\dot{\text{O}}_2^-$ , que tiene un valor de  $6,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , y  $\{ \text{cit.c-Fe}^{3+} \}$  es la concentración inicial de citocromo c en la mezcla de reacción ( $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ).

De idéntica forma puede calcularse la constante de velocidad aparente para la reacción enzimática, cuando el ensayo se efectúa utilizando NBT a pH 10,2, en lugar de citocromo c. En este caso se hace a partir de la expresión:

$$K_e = \frac{K_N \{ \text{NBT}_{\text{ox.}} \}}{\{ \text{SOD} \}}$$

donde  $K_N$  = constante de velocidad a pH 10,2 de la reacción del NBT con el  $\dot{\text{O}}_2^-$  ( $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ), y  $\{ \text{NBT}_{\text{ox.}} \}$  = concentración inicial de NBT en la mezcla de reacción ( $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ).

## EFFECTO DE INHIBIDORES ENZIMATICOS

### 1. Preparados homogéneos de Mn-superóxido dismutasa

Se ensayó la acción de distintos inhibidores enzimáticos sobre la actividad superóxido dismutasa de fracciones proteicas puras, de

alta actividad específica. Las concentraciones finales de los distintos inhibidores utilizados fueron las siguientes:

CN <sub>Na</sub> , calidad Merck, p.a.:	0,1	0,2	0,5	1,0	y	2,0	mM
N <sub>3</sub> Na, calidad Merck, p.a.:	5,0	10,0	15,0	20,0	y	35,0	mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Perhydrol Merck, p.a.:	0,1 y 0,5 mM						
p-hidroximercuribenzoato, calidad Sigma:	0,1 y 1,0 mM						
O-fenantrolina, calidad Merck, p.a.:	0,1	0,2	0,4	1,0	y	5,0	mM
EDTA sal disódica, calidad Merck, p.a.:	0,1	0,2	0,5	1,0	y	2,0	mM
Dietilditiocarbamato (DIECA), calidad Sigma:	0,25	0,50	1,0	5,0	y	10,0	mM

Los inhibidores, preparados en buffer fosfato 50 mM pH 7,8, fueron incorporados directamente a las mezclas de reacción enzimáticas a las concentraciones indicadas, salvo en el caso del p-hidroximercuribenzoato y del peróxido de hidrógeno en que fue necesario efectuar -- preincubaciones. Estas se llevaron a cabo a 25°C durante tiempos de 30-120 min y de 1 hora para cada concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de p-hidroximercuribenzoato, respectivamente, efectuando para cada muestra ensayada la incubación paralela del correspondiente control de enzima sin inhibidor. Las concentraciones de enzima en la mezcla de incubación eran de 0,43 mg/ml. Finalmente, se determinó la actividad superóxido dismutasa residual de los distintos problemas y controles, una vez diluidos éstos convenientemente.

El método seguido para la determinación de la actividad enzimática fué una modificación del de McCord y Fridovich (1969) que utiliza el sistema xantina-XOD/citocromo c, salvo en el caso del DIECA, en que tuvo que emplearse la metódica de Beauchamp y Fridovich (1971) --

con xantina-XOD/NBT, debido a las interferencias producidas en el ensayo por dicho agente quelante.

En todos los casos, se efectuaron las reacciones control en -- presencia de volúmenes de 0,1 ml de las correspondientes concentra-- ciones de inhibidor, iniciándose las reacciones por adición de una -- dilución adecuada de xantina oxidasa capaz de producir un cambio de densidad óptica del orden de 0,020 unidades de absorbancia por min a la longitud de onda correspondiente a cada método. Debido a la eleva da actividad específica de las muestras de Mn-SOD utilizadas, fue -- preciso efectuar diluciones previas con buffer Tris-ClH 50 mM, pH -- 7,5, hasta concentraciones en la mezcla de reacción de aproximadamen te 1,6  $\mu\text{g/ml}$ .

#### REACTIVOS

- Buffer  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ - $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  50 mM, pH 7,8

Fosfato dipotásico 50 mM (8,7090 g de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) ----- 900 ml

Fosfato monopotásico 50 mM (6,8040 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) -----  $\approx$  100 ml

Hacer el ajuste el pH-metro sobre el volumen indicado de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  50 mM, añadiendo solución de fosfato monopotásico 50 mM, hasta alcan zar el pH indicado

- Buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5

Tris 0,1 M (12,11 g de Tris, calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) ----- 500 ml

ClH 0,1 M (8,3 ml de ClH concentrado,  $d = 1,19$ , calidad Merck p.a., por litro de agua destilada) -----  $\approx 400$  ml

Se ajusta al pH indicado con la solución clorhídrica y se enrasa a un litro con agua destilada.

- Soluciones CNNa

Se preparó una solución madre de CNNa 64,6 mM en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8 (0,316 g de CNNa Merck p.a./100 ml buffer), y a partir de ésta, por dilución con el buffer base, se obtuvieron distintas concentraciones que, una vez añadidas a la mezcla de reacción en volúmenes de 0,1 ml, proporcionaron las siguientes concentraciones finales:

Dilución n <sup>o</sup> veces	Conc. de CNNa en la mezcla de reacción mM
-	2,0
2	1,0
4	0,5
10	0,2
20	0,1

- Soluciones de azida sódica

Se preparó una solución madre de  $N_3Na$  1,128 M en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8 (7,336 g de  $N_3Na$ , Merck, p.a./100 ml buffer), y a partir de ésta, por dilución con el buffer base, se obtuvieron distintas concentraciones que una vez añadidas a la mezcla de reacción

en volúmenes de 0,1 ml, proporcionaron las concentraciones finales siguientes:

Dilución nº veces	Conc. de $\text{N}_3\text{Na}$ en la mezcla de reacción mM
-	35,0
1,75	20,0
2,3	15,0
3,5	10,0
7	5,0

- Soluciones de agua oxigenada

Se preparó una solución madre de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. Se pipetearon 0,1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Perhydrol Merck, al 30% en peso y con una concentración titulada permanganimétricamente de 10,39 M, llevándose después a un volumen final de 1 litro con buffer fosfato 50 mM, pH 7,8.

Por dilución se obtuvieron las concentraciones para efectuar la preincubación con la enzima pura.

Dilución nº veces	Conc. de $\text{H}_2\text{O}_2$ en la mezcla de preincubación mM
2	0,5
10	0,1

- Soluciones de p-hidroximercuribenzoato (PHMB)

Se preparó una solución madre de PHMB 2 mM en NaOH 0,1 M, calidad Merck (0,072 g de PHMB Sigma/100 ml de NaOH 0,1 M), y a partir de esta solución por dilución con NaOH 0,1 M, se obtuvieron las concentraciones para efectuar la preincubación de la enzima pura

Dilución nº veces	Conc. de PHMB en la preincubación mM
2	1 mM
20	0,1 mM

- Soluciones de O-fenantrolina

Se preparó una solución madre de O-fenantrolina 161,25 mM en etanol, calidad Merck (3,19 g de O-fenantrolina Merck/100 ml de etanol), y a partir de esta solución por dilución con etanol, se obtuvieron distintas concentraciones que una vez añadidas a la mezcla de reacción en volúmenes de 0,1 ml, proporcionaron las siguientes concentraciones finales:

Dilución nº veces	Conc. de O-fenontralina en la mezcla de reacción mM
-	5,0
5	1,0
10,5	0,4
25	0,2
50	0,1

- Soluciones de EDTA

Se preparó una solución madre de EDTA 64,6 mM en buffer fosfato 50 mM, pH 7,8 (2,40 g de EDTA, Merck p.a./100 ml buffer), y a partir de esta solución, por dilución con el buffer base, se obtuvieron distintas concentraciones, que una vez añadidas a la mezcla de reacción en volúmenes de 0,1 ml, proporcionaron las concentraciones finales siguientes:

Dilución nº veces	Conc. de EDTA en la mezcla de reacción mM
-	2,0
2	1,0
4	0,5
10	0,2
20	0,1

- Soluciones de dietilditiocarbamato (DIECA)

Se preparó una solución madre de DIECA 322,5 mM en buffer fosfato 50 mM pH 7,8 (5,52 g de DIECA, Sigma/100 ml buffer), y a partir de esta solución, por dilución con el buffer base, se obtuvieron distintas concentraciones que, una vez añadidas a la mezcla de reacción en volúmenes de 0,1 ml, proporcionaron las siguientes concentraciones finales:

Dilución nº veces	Conc. de DIECA en la mezcla de reacción mM
-	10,0
2	5,0
10,0	1,0
20,0	0,5
40,0	0,25

## 2. Extractos crudos

Se estudió el efecto producido por  $\text{CN}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre las actividades isoenzimáticas de superóxido dismutasa de extractos crudos de hojas de guisante. La concentración proteica de los extractos utilizados fue de 0,16 mg/ml.

Los extractos crudos se incubaron separadamente, a  $25^\circ\text{C}$  durante una hora en presencia de CNNa y,  $\text{H}_2\text{O}_2$  más CNNa a una concentración final de 1 mM en ambos casos junto con los correspondientes controles sin inhibidor. En la incubación con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se adicionó también cianuro, con el fin de inhibir las actividades catalasa y peroxidasa, abundantes en los extractos crudos, que podrían provocar una disminución de la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la mezcla. Seguidamente se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra (8  $\mu\text{g}$  de proteína bruta) y se sometieron a electroforesis analítica en geles de poliacrilamida a  $4^\circ\text{C}$ , según el procedimiento descrito en la página 99. Finalizado el desarrollo electroforético, se localizaron las bandas de actividad superóxido - dismutasa por la metódica usual de revelado enzimático "in situ" de Weisiger y Fridovich (1973a).

### REACTIVOS

- Solución de CNNa 12,5 mM

Se pesan 0,1532 g de CNNa, calidad Merck p.a., y se disuelven en buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, enrasándose finalmente a un volumen de 250 ml con el mismo buffer.

- Solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  12,5 mM

Se pipetea 0,30 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Perhydrol Merck, al 30% en peso,

y con una concentración titulada permanganométricamente de 10,39 M, llevándose después a un volumen final de 250 ml con buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7,5.

Las soluciones de CNNa y  $H_2O_2$  12,5 mM se diluyeron 12,5 veces al efectuar la preincubación con los extractos crudos.

RESULTADOS

En extractos crudos de hojas de guisante (*Pisum sativum* var. Lincoln), están presentes tres superóxido dismutasas electroforéticamente distintas, tal y como se muestra en la Figura 6. De ellas, la isoenzima de menor movilidad no es inhibida por cianuro 1 mM, mientras que las otras dos isoenzimas, denominadas I y II, en orden de movilidad creciente, son sensibles a este inhibidor, por lo que seguramente se trata de Cu,Zn-superóxido dismutasas.

Por lo que respecta al porcentaje de cada isoenzima en las hojas de guisante, éste depende de la edad de la planta, pero oscila - en términos generales entre 10-21% para la Mn-superóxido dismutasa, y un 29-36% y un 47-54% para las Cu,Zn-superóxido dismutasas I y II, respectivamente.

En la Tabla 8 se presenta la actividad superóxido dismutasa - de las distintas isoenzimas de hojas de guisante, en relación con -- las diferentes etapas del desarrollo de la planta. Los valores de actividad son media de tres determinaciones efectuadas con distintos lotes de hojas, indicándose para cada valor el error standard de la media correspondiente. En esta Tabla se observa que, mientras la actividad Mn-superóxido dismutasa foliar se incrementa en aproximadamente un 37% desde el estadio de plántula (tiempo 0) al inicio de fructificación (45 días), las Cu,Zn-superóxido dismutasas, sufren en di-

cho periodo de tiempo una disminución de su actividad del orden de un 40% para la isoenzima (I), y un 33% para la isoenzima (II).

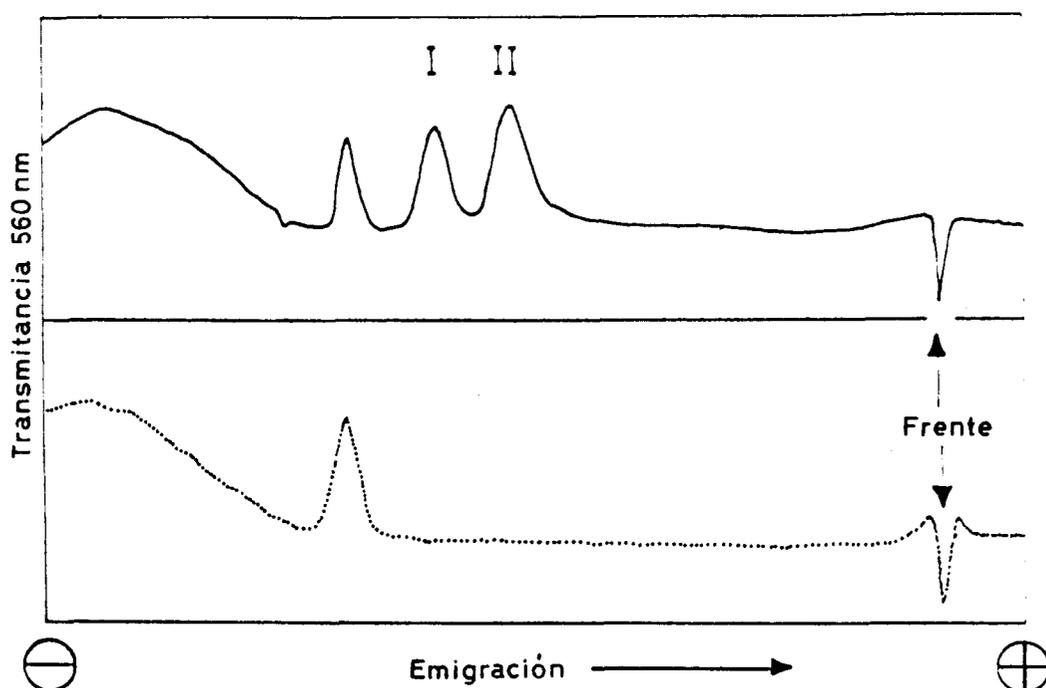


Fig. 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de hojas de *Pisum sativum* L. En los electroferogramas se reveló la actividad SOD en ausencia (—) y en presencia (---) de cianuro 1 mM. La transmitancia de los geles a 560 nm se registró con un aparato lector de geles.

#### PURIFICACION DE LA ENZIMA

El método de purificación seguido para la manganeso superóxido dismutasa de hojas de guisante incluye los siguientes pasos:

1. Fraccionamiento térmico.
2. Precipitación fraccionada con sulfato amónico.
3. Adsorción sobre DEAE-celulosa (DE-23).
4. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa (DE-52).
5. Cromatografía en columna de Sephadex G-100.
6. Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida.

TABLA VIII Actividad de las distintas isosuperóxido dismutasas de hojas de guisante en diferentes etapas del desarrollo de la planta.

Etapa de desarrollo	Actividad SOD $\pm$ ESM (Unidades/g.p. fresco)		
	Mn-SOD	Cu,Zn-SOD I	Cu,Zn-SOD II
Plántula (tiempo 0)	59,5 $\pm$ 6,0	203,5 $\pm$ 13,5	309,0 $\pm$ 29,4
Crecimiento vegetativo (15 días)	66,2 $\pm$ 2,8	180,2 $\pm$ 20,5	269,9 $\pm$ 8,2
Inicio de floración (30 días)	74,5 $\pm$ 1,5	96,4 $\pm$ 2,2	145,8 $\pm$ 19,8
Inicio de fructificación (45 días)	81,2 $\pm$ 10,1	121,3 $\pm$ 14,6	207,5 $\pm$ 15,2

Para la puesta a punto del método de purificación y la obtención de preparados homogéneos de enzima para los estudios subsiguientes, se procesaron alrededor de unos 30 Kg de hojas de plantas de guisante cultivadas en invernadero. En los distintos lotes de purificación efectuados se utilizaron pesos de hojas comprendidos entre 1,2 y 7,5 Kg que suministraban por término medio volúmenes de 3000 ml y 18000 ml de extracto crudo respectivamente, de acuerdo con la metódica señalada en Material y Métodos.

En relación con el calentamiento de los extractos crudos a 60°C durante 5 minutos, hay que resaltar la sensibilidad que presenta la isoenzima Cu,Zn-superóxido dismutasa I, que sufre una inactivación considerable con este tratamiento, mientras que las otras dos isoenzimas, Cu,Zn-superóxido dismutasa (II) y Mn-superóxido dismutasa, experimentan ligeros cambios en su actividad.

En la siguiente fase de purificación, correspondiente a la precipitación fraccionada con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , los resultados obtenidos indicaron que más del 65% de toda la actividad Mn-superóxido dismutasa precipitaba en un rango de saturación del 40-70%. De las otras dos isoenzimas que contienen Cu y Zn, parte de la Cu,Zn-SOD I y prácticamente toda la Cu,Zn-SOD II, también se separan en esta fracción.

El análisis del elúido procedente de la adsorción sobre DEAE-celulosa (DE-23) indicó que la actividad Mn-superóxido dismutasa que daba fijada cuantitativamente por el cambiador aún después de realizarse el lavado del mismo con el buffer empleado en su equilibrio. Sin embargo, por elución con  $\text{ClNa}$  0,5 M se conseguía el desplazamiento de toda la actividad superóxido dismutasa del lecho de DEAE-celulosa.

En las Figuras 7 y 8, se presentan los pasos siguientes de la metódica de purificación, el proceso cromatográfico de elución en co

lumnas de DE-52 celulosa y Sephadex G-100, respectivamente. En la cromatografía sobre DE-52 celulosa, mediante el lavado de la columna con el buffer base se consigue la elución total de la actividad superóxido dismutasa sensible al  $\text{CN}^-$ , mientras que la Mn-superóxido dismutasa adsorbida es eluida con un gradiente lineal de  $\text{ClNa}$  - 0-0,5M, a un rango de concentración de 0,14-0,28M en cloruro.

Por filtración en gel de Sephadex G-100 se logra la eliminación de una fracción proteica de elevado peso molecular, que en su volumen de elución, está bastante distanciada del pico de actividad superóxido dismutasa (Fig. 8), a la vez que se obtienen unos rendimientos enzimáticos bastante buenos. Finalmente, por electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida al 10% se obtuvo un máximo de actividad Mn-superóxido dismutasa, coincidente con un pico de absorción a 280 nm, y bien individualizado respecto a otras proteínas eluidas.

Las fracciones activas tenían una coloración amarillo parduzca, y una vez reunidas, se dializaban frente a buffer Tris-ClH 50 mM - pH 7,5, y posteriormente se concentraban hasta un volumen mínimo para conservarlas, bien precipitadas con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  a 4°C, ó congeladas a -20°C, según se describe en la parte experimental.

En la Tabla 9 se recoge, a modo de ejemplo, la evolución de uno de los procesos de purificación de entre los numerosos llevados a cabo. En ella se indica el rendimiento final obtenido así como la actividad específica del preparado enzimático final, que solía oscilar de un lote a otro entre 2500 y 3500 unidades de actividad SOD/mg de proteína.

El grado de purificación obtenido para la enzima fue de unas 215 veces, y el rendimiento del proceso oscilaba entre 0,4-2%. Por otra parte, teniendo en cuenta el peso inicial de hojas, el rendimiento conseguido por esta metódica fue de aproximadamente 1,2 mg de Mn-superóxido dismutasa/Kg de hoja completa.

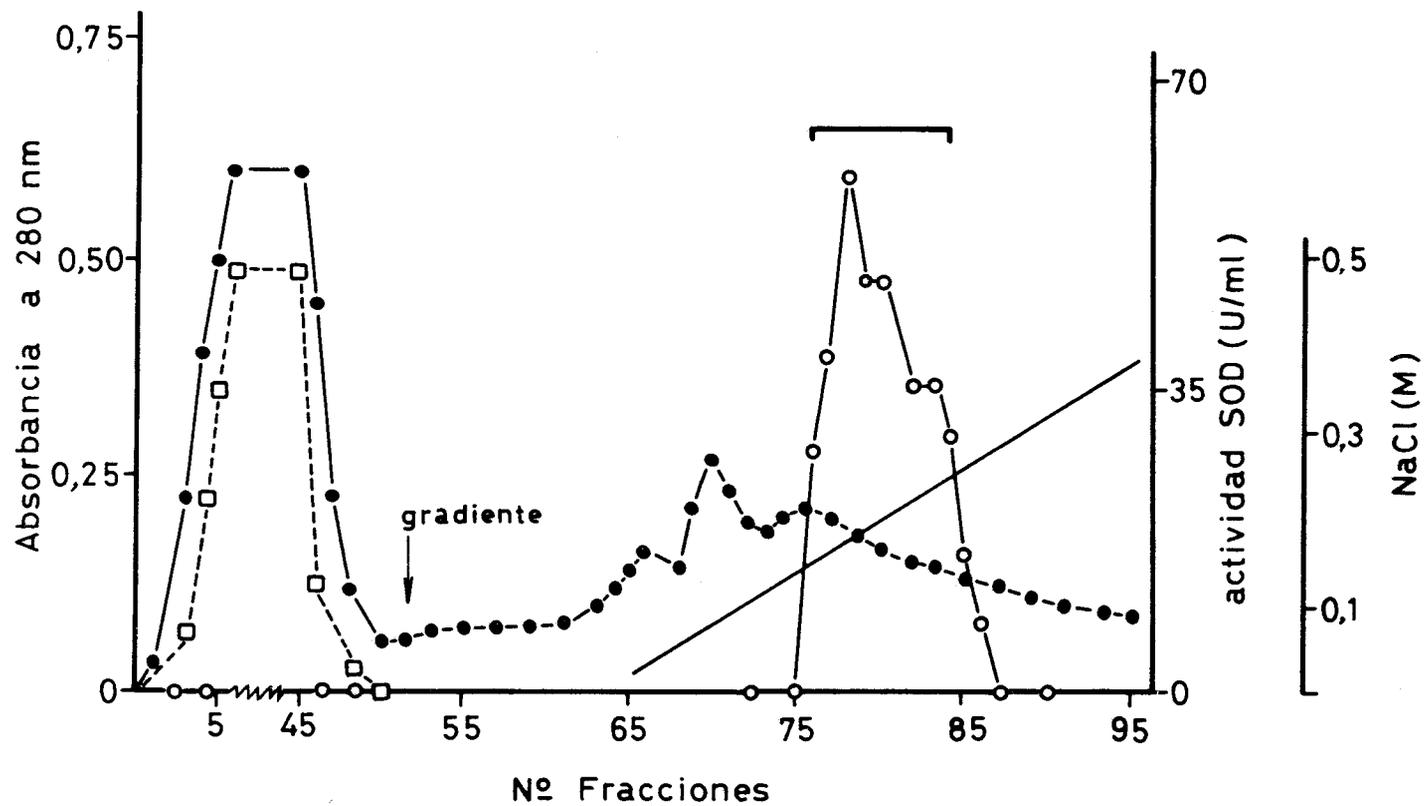


Fig. 7. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa. (□—□) actividad Cu,Zn-SOD; (○—○) actividad Mn-SOD; (●—●) Absorbancia a 280nm; (—) gradiente de ClNa.

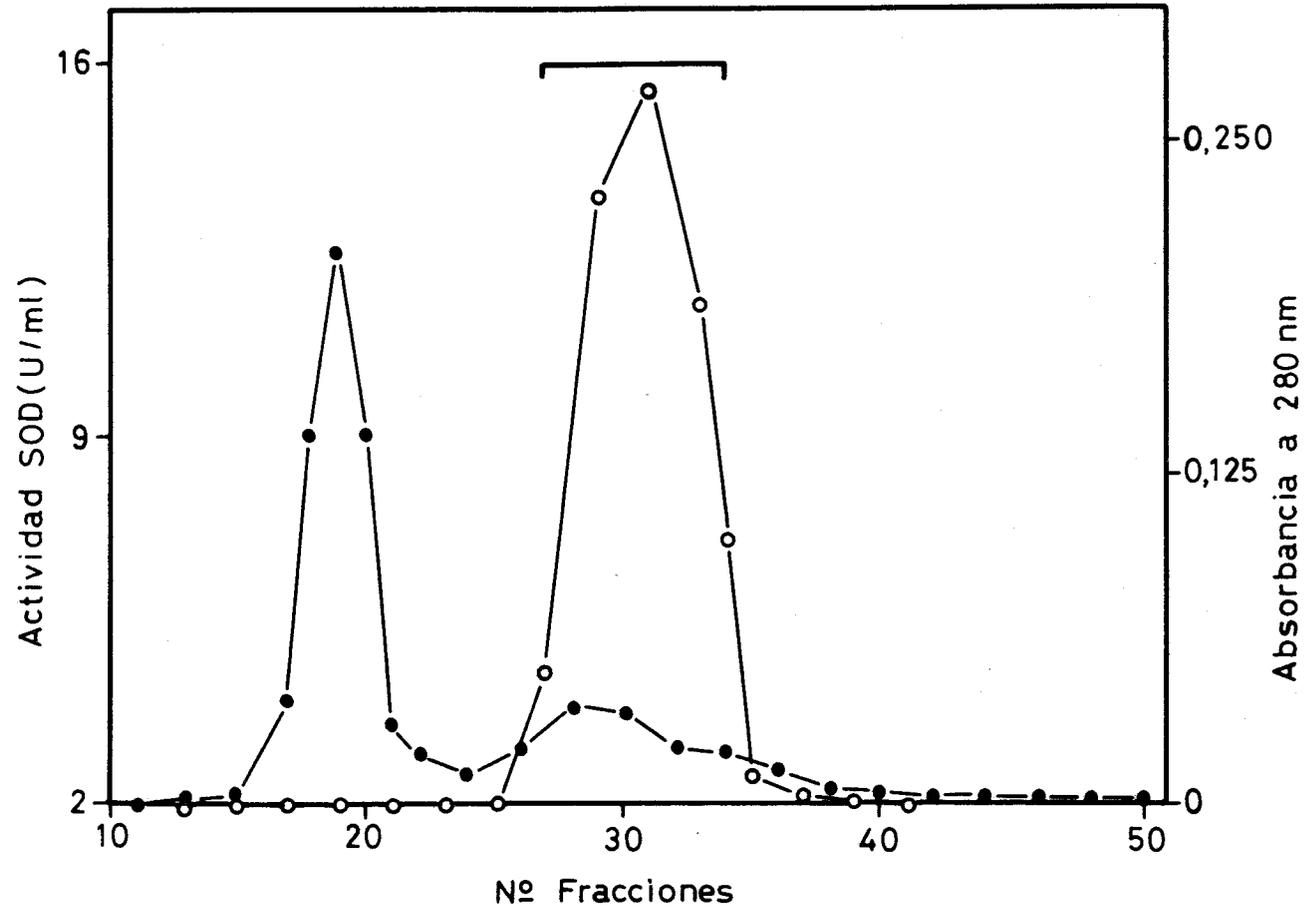


Fig. 8. Cromatografía en columna de Sephadex G-100. (o—o) actividad Mn-superóxido dismutasa; (●—●) absorbancia a 280 nm.

TABLA IX. Purificación de manganeso superóxido dismutasa de hojas de guisante.

Etapa	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteínas Totales (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	6500	82,76	5,81	537.940	37.765	14	100
Fracc. térmico	5850	51,83	3,33	303.205	19.480	16	56
Precip. fracc. con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	48	2506,0	15,50	120.288	744	162	22
Adsorc. DEAE-celulosa (DE-23)	53	1689,0	5,0	89.517	265	338	17
Cromatografía en DEAE- celulosa (DE-52)	60	292,8	0,425	17.568	26	689	3,3
Cromatografía en Sephadex G-100	35	352,7	0,134	12.345	5	2632	2,3
Electroforesis prepara- tiva en poliacrilamida	12	762,0	0,253	9.144	3	3012	1,7

En la Figura 9 se muestra una fotografía de electroferogramas en poliacrilamida en la que se pone de manifiesto la homogeneidad y pureza de la Mn-superóxido dismutasa aislada de hojas de guisante, - por la aparición en estos geles de una sola banda de actividad superóxido dismutasa coincidente con una única banda de proteínas. Así - mismo, se observa que estas dos bandas (actividad y proteínas) pertenecientes al purificado final presentan una movilidad electroforética idéntica a la de la Mn-superóxido dismutasa del extracto crudo.

La enzima era también homogénea por electroforesis en geles - con diferentes concentraciones de acrilamida (6-11%).

#### CARACTERISTICAS QUIMICO-FISICAS

##### Espectros de absorción visible-UV. Coeficiente de absorción molar.

La Figura 10 muestra el espectro de absorción visible-UV de - la Mn-superóxido dismutasa. El espectro visible (C) se hizo a temperatura ambiente utilizando soluciones de enzima pura con una concentración protéica de 5 mg/ml. Los registros se efectuaron con la enzima sin reducir (espectro I) y una vez reducida ésta con ditionito sódico 2 mM (espectro II).

En primer lugar se hicieron registros en un rango de longitudes de onda de 350-750 nm y una vez establecida la zona de máxima absorción de la enzima, se hicieron barridos en el rango de 350-680nm. Como puede observarse en la figura citada, la absorción al visible - de la muestra sin reducir (I) ofrece una caída continua casi regular, con un hombro débil a unos 480-490 nm y otro, algo más intenso, a -- aproximadamente 600 nm. El registro de la absorción al visible de la enzima reducida muestra una desaparición significativa del componente coloreado del espectro, que se anula prácticamente a partir de 500 nm.

Figura 9

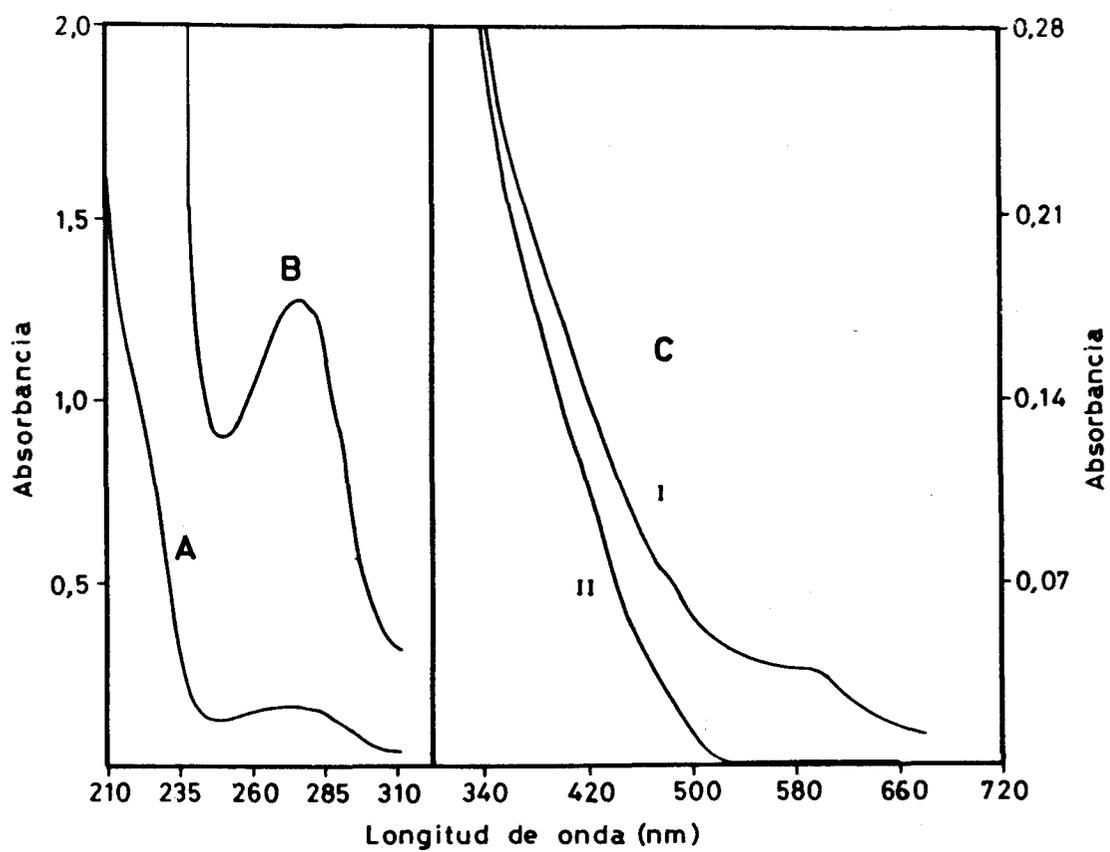


Fig. 10. Espectros visible-UV de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante.

El espectro ultravioleta se realizó también a temperatura ambiente, en un rango de longitudes de onda de 210-310 nm, utilizando concentraciones enzimáticas de 0,14 mg/ml (espectro A) y 1,0 mg/ml (espectro B). En estas condiciones, la Mn-superóxido dismutasa muestra un máximo de absorción a aproximadamente 275 nm, y tres hombros a unos 225, 280 y 290 nm.

Coefficiente de absorción molar.

El coeficiente de absorción molar de la enzima se determinó a una longitud de onda de 280 nm por presentar en esta zona un máximo de absorción, y con el fin de comparar su valor con el descrito por otras superóxido dismutasas.

El cálculo de este coeficiente, viene dado por la expresión siguiente:

$$\epsilon_{280} = \frac{A_{280}}{l \times c} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Que fue indicada anteriormente en Material y Métodos, y en donde  $c = 0,478 \text{ mg/ml}$  equivalente a una concentración enzimática de  $5,085 \times 10^{-6} \text{ M}$ , sobre la base de un peso molecular de 94.000. La concentración de proteínas se determinó por triplicado aplicando el método de Lowry y col. (1951). El resultado final para el coeficiente de absorción molar, obtenido al sustituir cada uno de los valores en la expresión anterior, es el siguiente:

$$\epsilon_{280} = \frac{0,608}{1 \text{ cm} \times 5,085 \times 10^{-6} \text{ M}} = 119.565 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

#### Determinación del punto isoeléctrico

La determinación se efectuó utilizando la técnica de electroenfoque en gel de poliacrilamida descrita por Wrigley (1968). Se em-

pleó un rango de pH de 3,5-10 y un voltaje constante de 350 voltios aplicado durante 3 horas.

La Figura 11 muestra la representación gráfica del proceso anterior, una vez finalizada la focalización, con la recta de regresión obtenida de los datos experimentales. Por interpolación sobre esta recta, se obtuvo como valor del punto isoeléctrico para la Mn-superóxido dismutasa, el correspondiente a un pH de 5,4.

#### Determinación del peso molecular

En las Figuras 12 y 13 se muestran los procesos de elución que se efectuaron en columna de Sephadex G-100, con la serie de patrones utilizados, para determinar el peso molecular de la Mn-superóxido dismutasa. La primera de ellas (Fig. 12) corresponde al perfil de elución de la albúmina sérica bovina, mientras que para la ovoalbúmina y el Quimotripsinógeno, se efectuaron filtraciones conjuntas tal y como se esquematiza en la Figura 13. Así mismo, la Figura 14 recoge el proceso de elución, en la misma columna de Sephadex G-100, de la Mn-superóxido dismutasa.

Finalmente, en la Figura 15 aparece la representación gráfica de los datos obtenidos con los patrones y problema -volumen de elución frente al logaritmo del peso molecular- y por interpolación en la recta resultante, le correspondió a la Mn-superóxido dismutasa un peso molecular de 84.600 daltons.

Por lo que respecta al segundo método empleado para la determinación del peso molecular, aplicando la técnica de electroforesis en gel a distintas concentraciones de acrilamida (Hedrick y Smith, 1968), se obtuvieron en primer lugar los "Ferguson plots" correspondientes a standards y problema, representando en abcisas la concen-

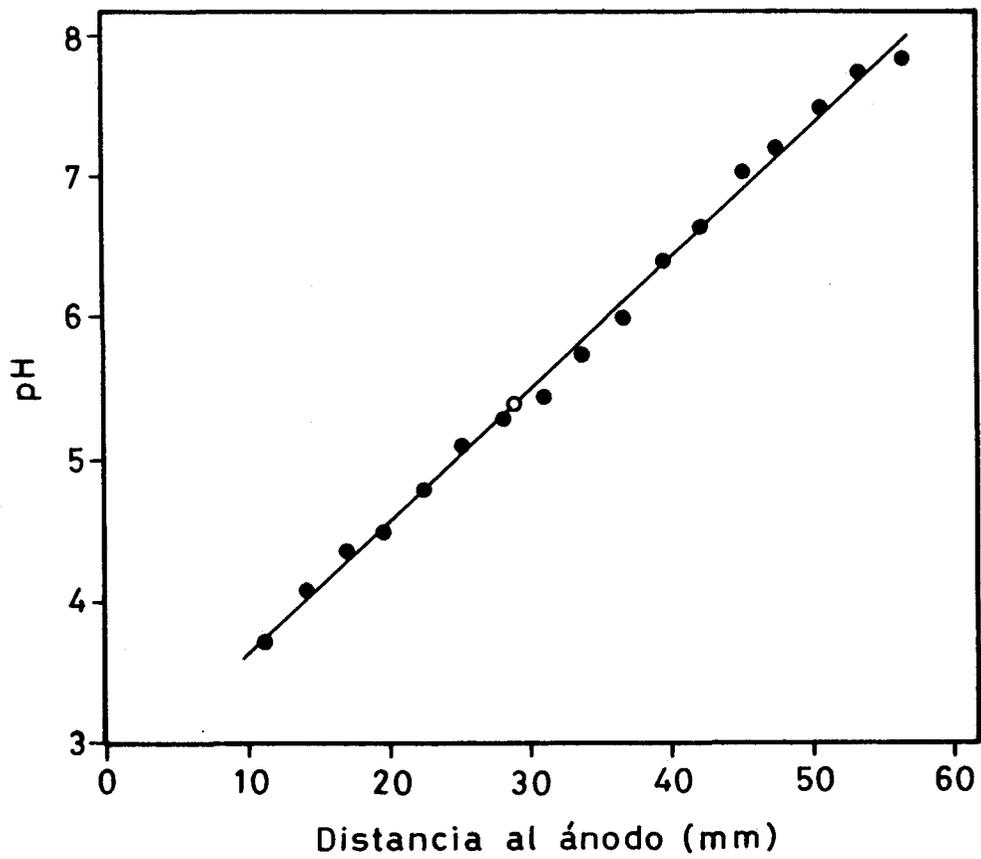


Fig. 11. Determinación del punto isoeléctrico de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante.

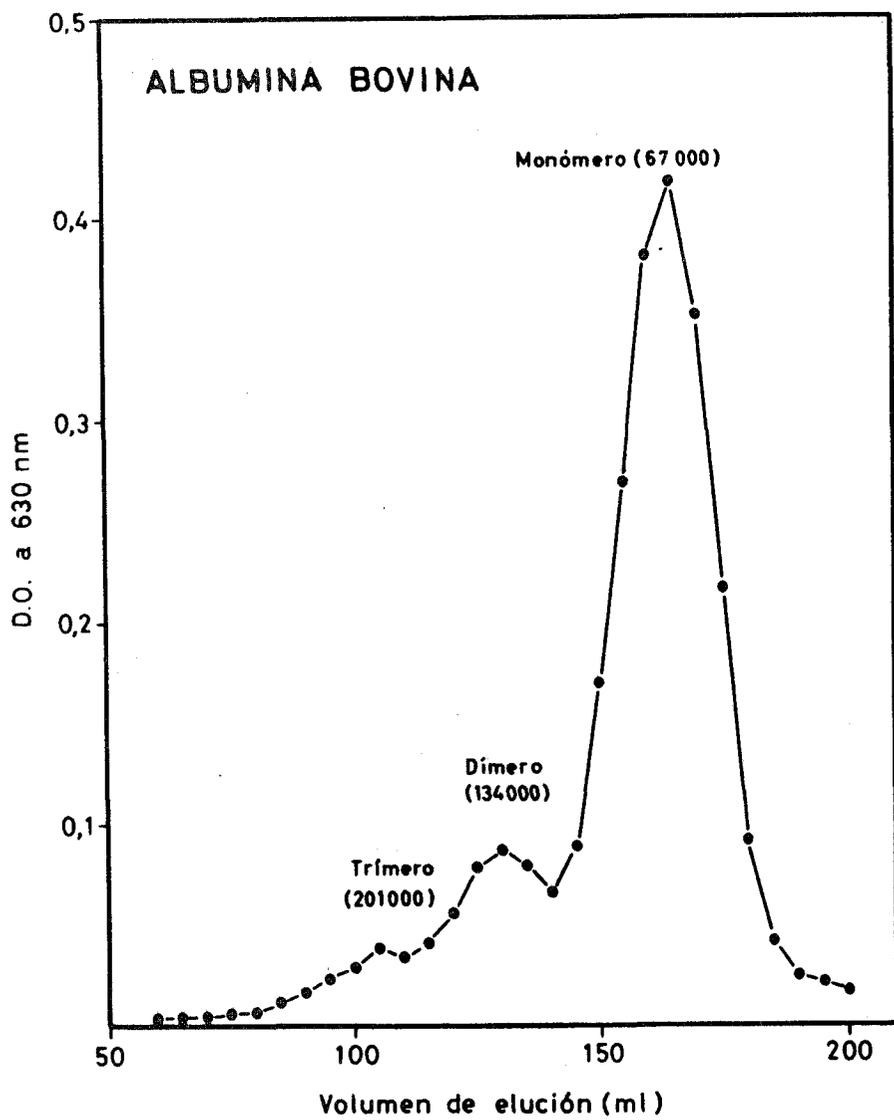


Figura 12

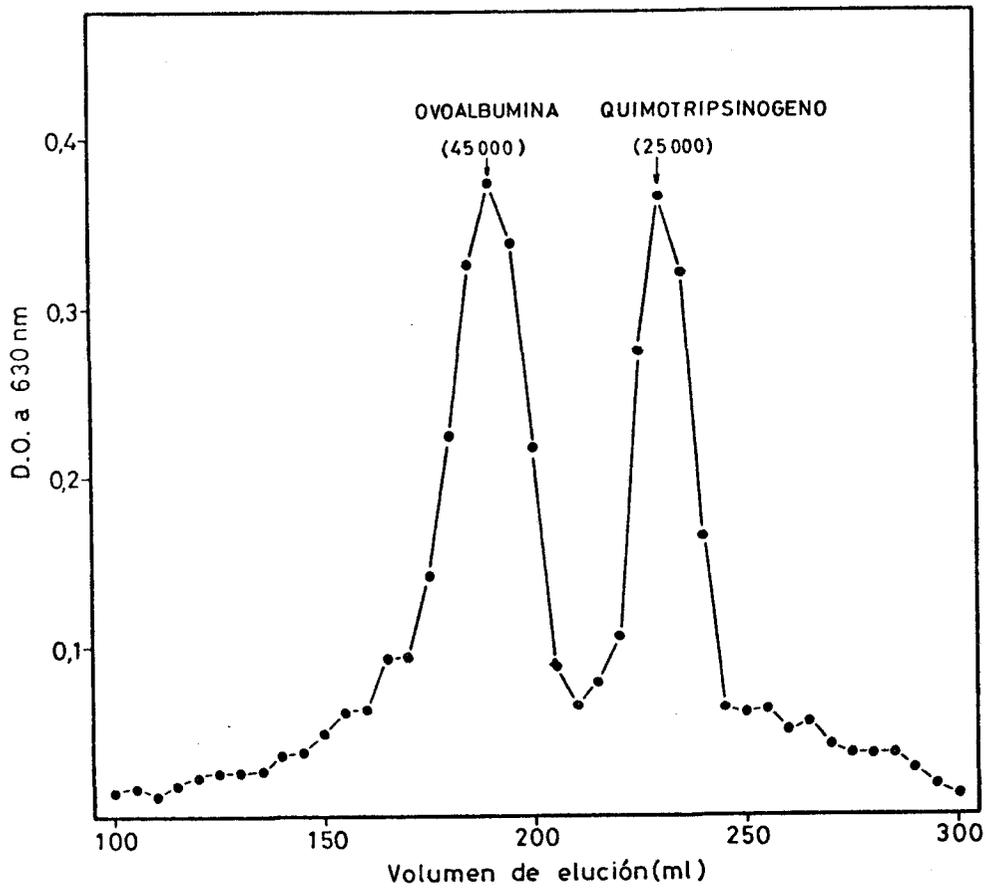


Figura 13

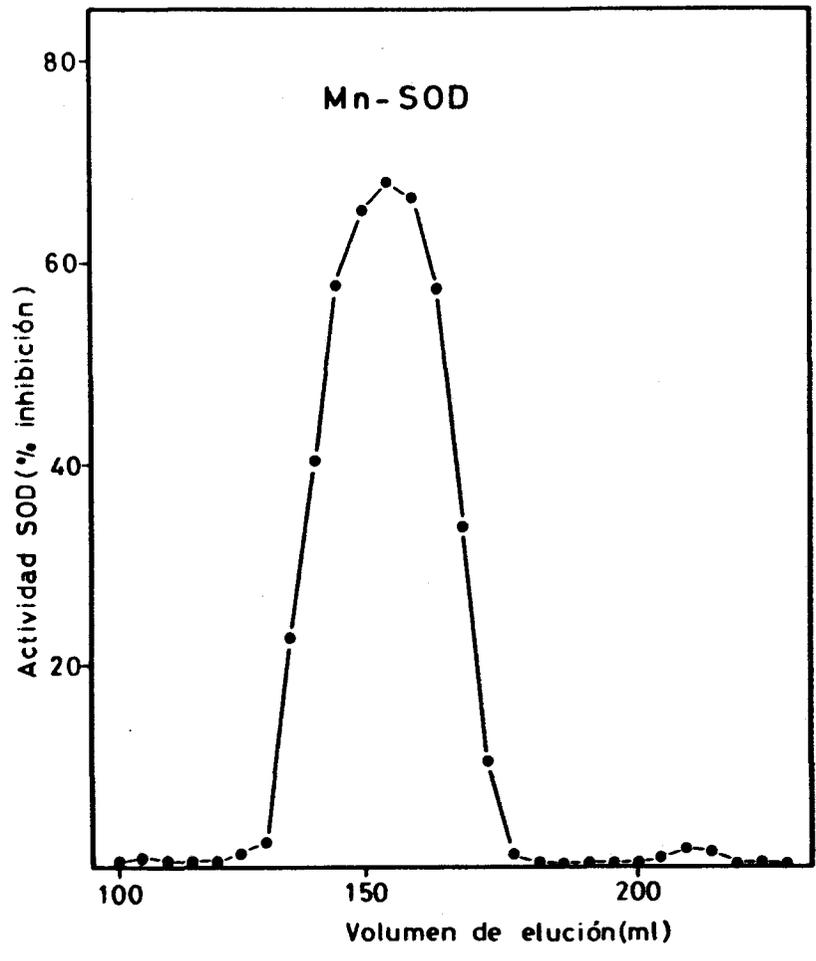


Figura 14

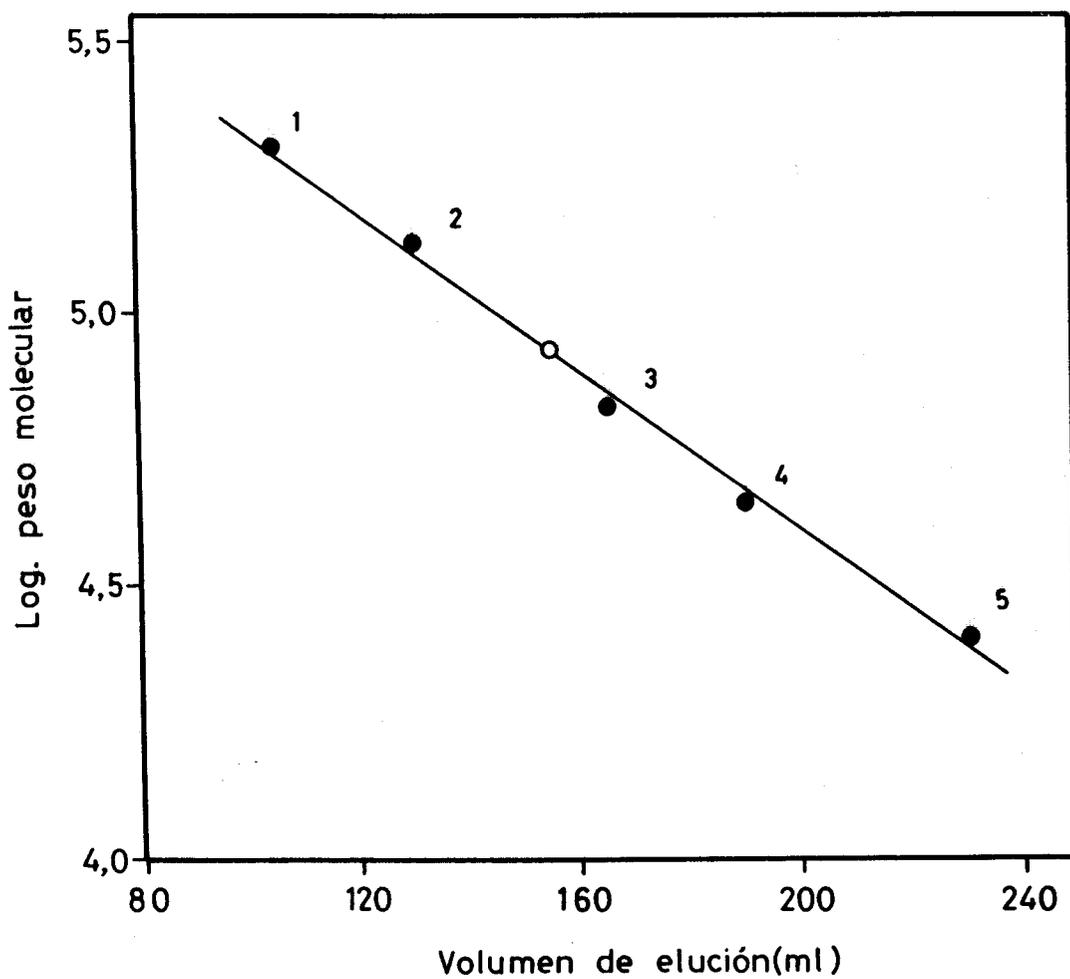


Fig. 15. Peso molecular de la Mn-superóxido dismutasa por filtración molecular en Sephadex G-100.

tración del gel y en ordenadas el valor  $100 \times \log (100 \times R_f)$ . En la Figura 16 se exponen los diagramas obtenidos para las distintas formas moleculares de la albúmina sérica bovina, en la Figura 17 el obtenido para la hexoquinasa, y en la Figura 18 el diagrama correspondiente a la enzima (Mn-superóxido dismutasa) pura. En todas estas figuras están también indicadas las pendientes calculadas para cada una de las muestras (patrones y problema).

Por último, en la Figura 19 está recogida la representación gráfica de las distintas pendientes frente a los pesos moleculares de las proteínas respectivas. Por interpolación en la recta de regresión resultante, se obtuvo un peso molecular para la Mn-superóxido dismutasa de 94.000 daltons.

El tercer método utilizado para determinar el peso molecular, es el basado en la composición en aminoácidos de la enzima pura. Sobre la base de un contenido en tirosina de cinco restos por mol de proteína, se obtuvo un peso molecular mínimo para la enzima de 12.700 como se indica en la Tabla 10. Multiplicando este valor por un factor de 8 se obtiene para la Mn-superóxido dismutasa un peso molecular de 101600. El valor obtenido de este modo es próximo a los calculados por las otras dos técnicas anteriores (Sephadex G-100 y electroforesis en gel a distintas concentraciones de acrilamida) particularmente por lo que se refiere a esta última.

En la Tabla 11 se recogen los valores de pesos moleculares -- que resultan de utilizar los tres ensayos indicados.

TABLA 11. Peso molecular de la Mn-superóxido dismutasa de guisante según la técnica utilizada.

Técnica utilizada	Peso molecular
Filtración por gel de Sephadex G-100	84.600
Electroforesis en poliacrilamida	94.000
Composición en aminoácidos	101.600

#### Composición en aminoácidos

Las determinaciones se han hecho por duplicado, en análisis alternantes de problema y standard, cuantificándose cada problema - por comparación del área totalizada de su pico con la correspondiente al standard desarrollado inmediatamente después.

Se han efectuado simultáneamente análisis de muestras sometidas a 20 y 72 horas de hidrólisis, frente a los standard paralelos, cuantificándose en los últimos hidrolizados los aminoácidos treonina y serina según las indicaciones expuestas en la parte experimental. Del mismo modo, se llevaron a cabo análisis cromatográficos - del ácido cisteico y del triptófano, con un tiempo de hidrólisis de 20 horas en los dos casos y con la utilización paralela de soluciones standards.

En la Figura 20 se reproduce el aminograma obtenido con una muestra de hidrolizado durante 20 horas, de Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante y en la Tabla 10 se presentan las concentracio

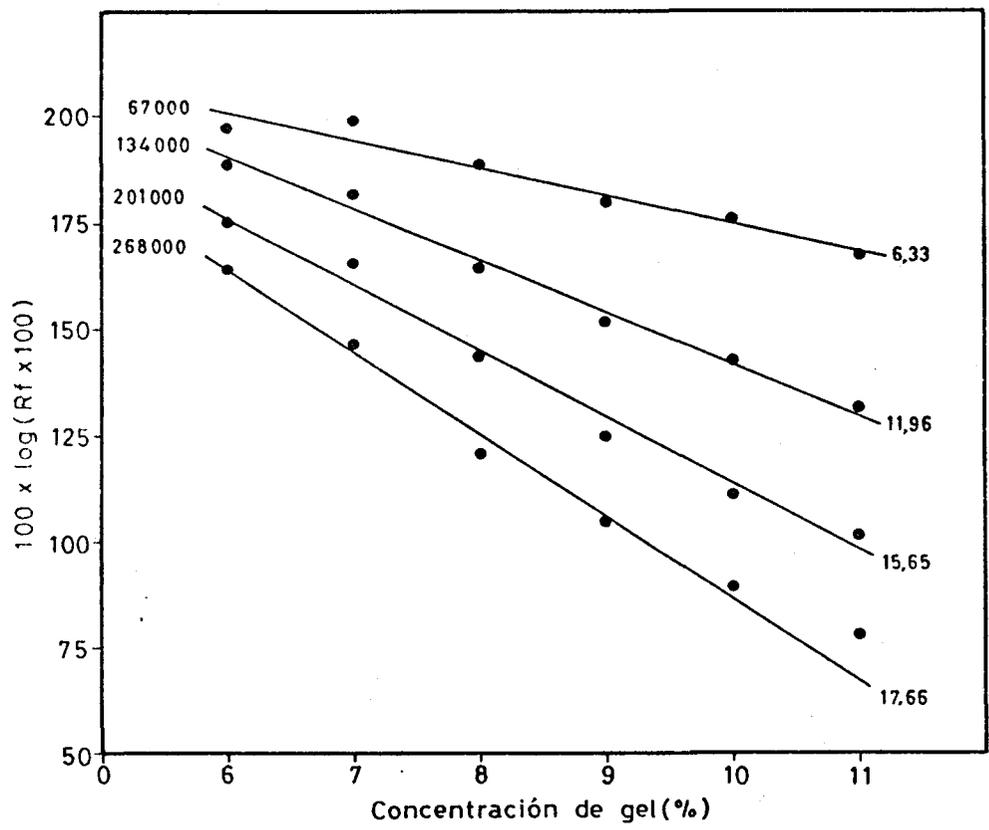


Figura 16

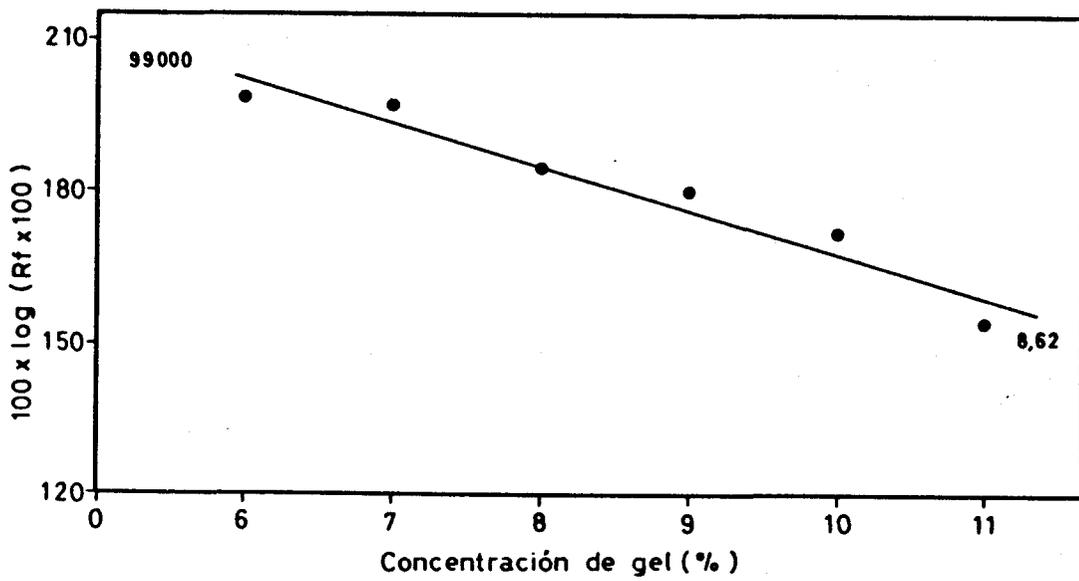


Figura 17

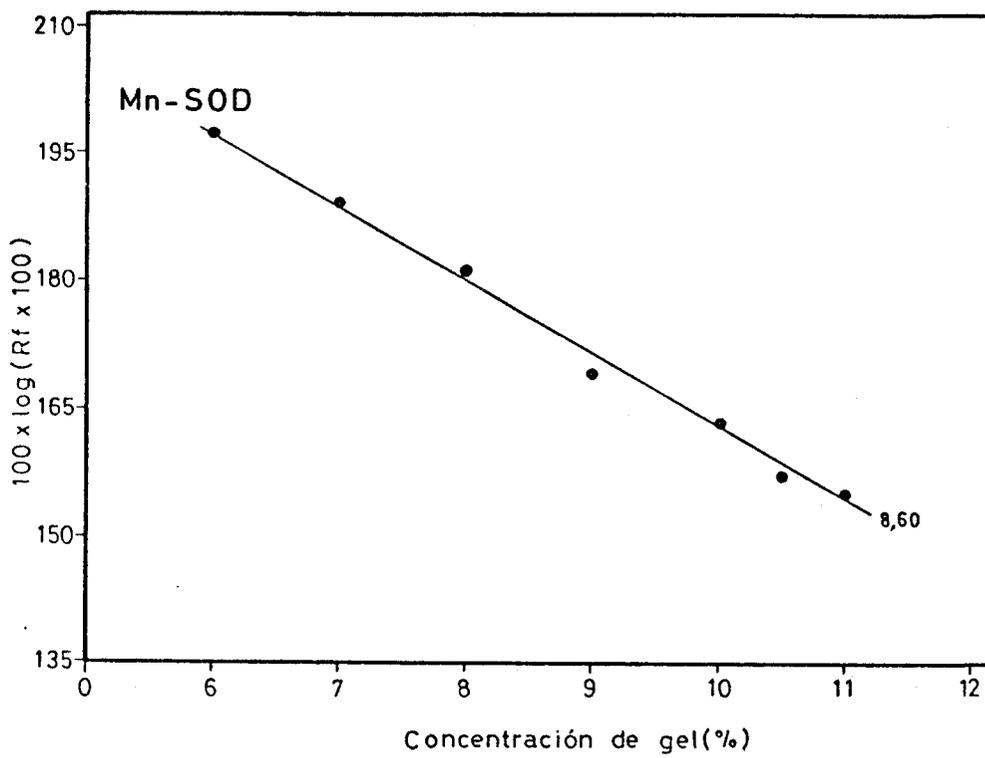


Figura 18

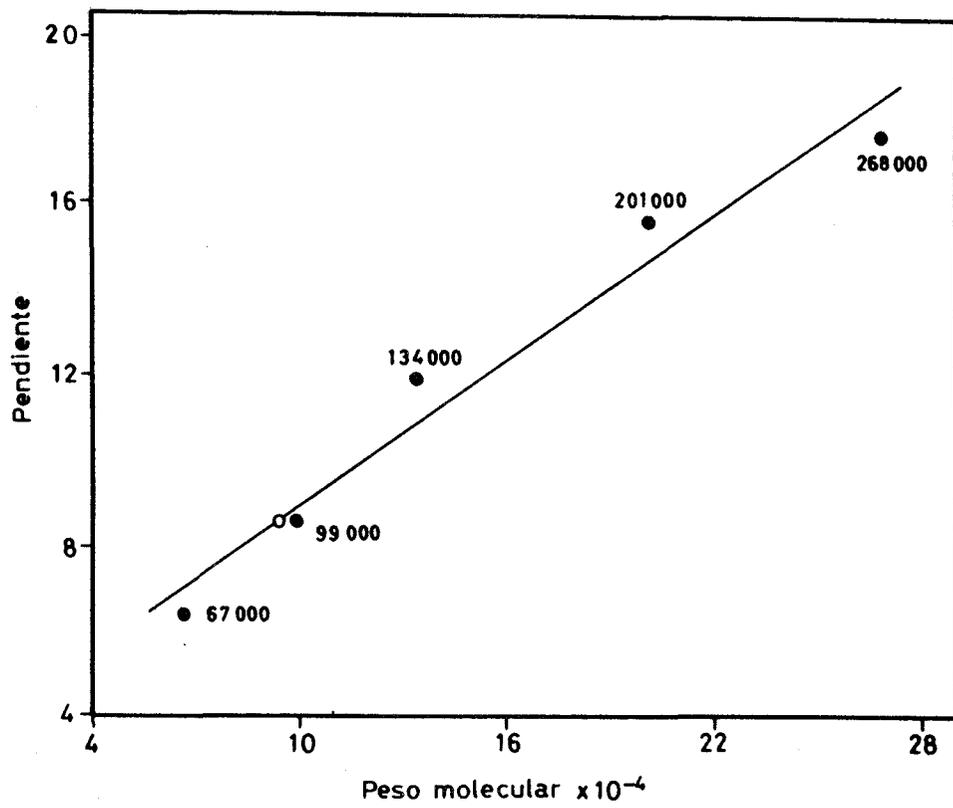


Figura 19

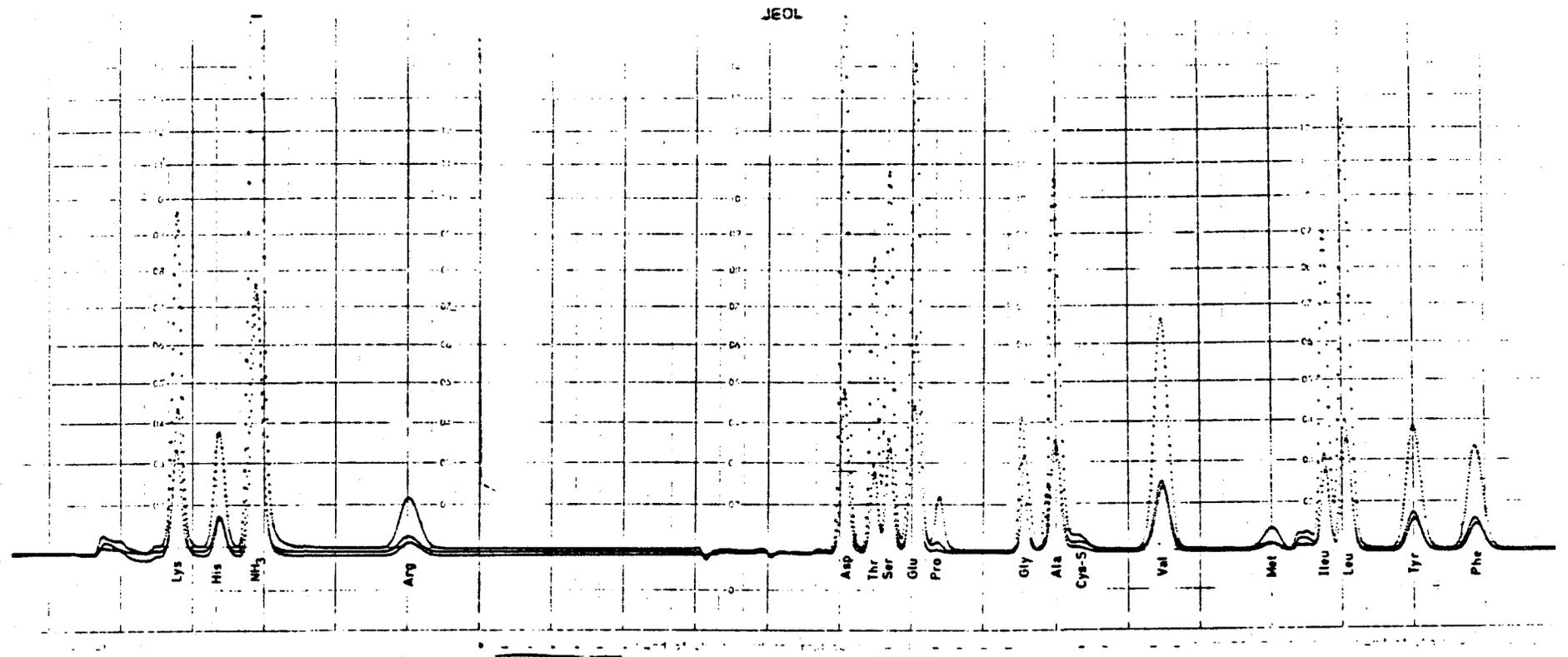


Figura 20

TABLA X. COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE MANGANESO SUPEROXIDO DISMUTASA DE HOJAS DE GUISANTE

Aminoácido	µmoles/ml	Normalizacion a 5 tirosinas	Ajuste a N° en tero de restos	Moles/mol de enzima	Ajuste a N° entero de restos	% en moles	N° restos por subunidad
Lisina	1,2451	8,48	8	59,73	60	7,31	15
Histidina	0,6218	4,23	4	29,83	60	3,65	7
Arginina	0,4278	2,91	3	20,52	21	2,56	5
A. aspártico	1,5774	10,75	11	75,67	76	9,26	19
Treonina	1,0344	7,05	7	49,62	50	6,09	12
Serina	1,1430	7,79	8	54,83	55	6,70	14
A. glutámico	1,7142	11,68	12	82,23	82	10,00	21
Prolina	0,7967	5,43	5	38,22	38	4,63	10
Glicocola	0,9696	6,60	7	46,51	47	5,72	12
Alanina	1,6664	11,35	11	79,94	80	9,74	20
<sup>1</sup> -Cistina	0,2616	1,78	2	12,55	13	1,58	3
<sup>2</sup> Valina	1,2899	8,79	9	61,88	62	7,55	15
Metionina	0,1499	1,02	1	7,19	7	0,85	2
Isoleucina	1,1003	7,49	7	52,78	53	6,45	13
Leucina	1,7089	11,64	12	81,98	82	10,00	20
Tirosina	0,7336	4,99	5	35,19	35	4,26	9
Fenilalanina	0,6175	4,21	4	29,62	30	3,65	7
Triptófano	0,0	0,0	0	0,0	0	0,0	0
Peso molecular mínimo .....			12.700	Número total de restos .....			821

nes de aminoácidos ( $\mu\text{moles/ml}$ ) determinadas en los hidrolizados de preparados homogéneos de esta enzima. A partir de estos valores, y sobre la base de un peso molecular enzimático de 94.000, se calculó el número de restos de cada aminoácido por mol de enzima, expresándose también los resultados, con fines comparativos, en forma de porcentaje molar y de número de restos por subunidad. En la misma tabla se indican los resultados obtenidos para el peso molecular mínimo de la enzima, mediante normalización de las concentraciones determinadas de aminoácidos a un contenido de cinco restos de tirosina por molécula enzimática. Los valores así calculados fueron -- ajustados al número entero más próximo.

Sobre esta base, se calculó el peso molecular mínimo, una vez deducidas las correspondientes  $n-1$  moléculas de agua de los enlaces peptídicos, obteniéndose un valor de 12.700.

#### Estequiometría Mn-proteína

La determinación del contenido metálico se efectuó por triplicado, utilizando tres lotes distintos de Mn-superóxido dismutasa purificada, que fueron dializados primero frente a buffer Tris-ClH 50 mM pH 7,5, 0,1mM en EDTA y después frente a este mismo buffer sin -- EDTA. Los cálculos se hicieron sobre la base de un peso molecular para la enzima de 94.000 daltons obtenido por electroforesis en geles de poliacrilamida. El número de átomos-g de Mn por mol enzima, resultó ser de  $0,94 \pm 0,14$ , valor éste media de las tres determinaciones realizadas con los diferentes preparados enzimáticos utilizados. Este resultado indica claramente la presencia de 1 átomo gramo de manganeso por mol de superóxido dismutasa.

Análogamente, sólo se detectaron trazas de Cu de casi nula significación, correspondientes a  $0,16 \pm 0,01$  átomos-g Cu/mol de enzima.

posiblemente debidos a contaminaciones por los reactivos o recipientes utilizados en el curso de la metodología. En relación con el contenido en Fe de los preparados de Mn-superóxido dismutasa, los valores que se detectaron estaban por debajo del límite de sensibilidad del método de absorción atómica utilizado.

En la Tabla 12 están pormenorizados los valores del contenido metálico de la enzima, resultantes de las determinaciones realizadas con los tres lotes de purificación empleados para este ensayo. Cada valor es media de cinco determinaciones, y en el resultado final se indica la desviación standard.

TABLA 12. Determinación del contenido metálico de Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante.

Lote de purificación	Conc. de proteínas µg/ml	Dilución nº veces	ng Mn/ml	Atomos-g Mn/mol
IV	630,0	101	3,840	1,05
VIII	55,2	25	1,283	0,99
IX	352,0	25	6,500	0,79

Media  $\pm$  DE ..... 0,94  $\pm$  0,14

#### Ensayos de reconstitución del contenido en Mn de la enzima

El resultado de los ensayos realizados para la reconstitución del contenido en Mn de la enzima, utilizando una modificación de la técnica de Ose y Fridovich (1976), queda detallada en la Tabla 13. - De los datos obtenidos se pone de manifiesto la semejanza existente

entre la actividad específica y contenido en Mn que presenta la muestra de Mn-superóxido dismutasa utilizada, antes y después de someterla al proceso de reconstitución, que se llevó a cabo con un rendimiento del 60%.

Por otra parte, la enzima nativa y la enzima reconstituida - mostraban una movilidad electroforética idéntica en geles de poliacrilamida.

TABLA 13. Ensayos de reconstitución del contenido en manganeso de la enzima.

	Actividad U/ml	Proteínas mg/ml	Actividad específica U/mg	Atomos-g Mn por mol enzima
Enzima nativa	428,5	0,595	720,2	0,82
Enzima reconstituida	227,3	0,352	645,6	0,79

#### Espectros de Resonancia Spin Electrónico (RSE)

Los resultados correspondientes al espectro de RSE aparecen detallados en la Figura 21. En ella se observa que en el espectro - correspondiente a la enzima pura (registro A) no apareció ninguna - señal atribuible a manganeso libre ó ligado, tanto a temperatura ambiente, como a la del nitrógeno líquido, tras haber explorado todo el rango - de sensibilidad del aparato. Después de la adición del reductor dinitrito sódico (registro B), únicamente se observó una señal a  $g \approx g_e$

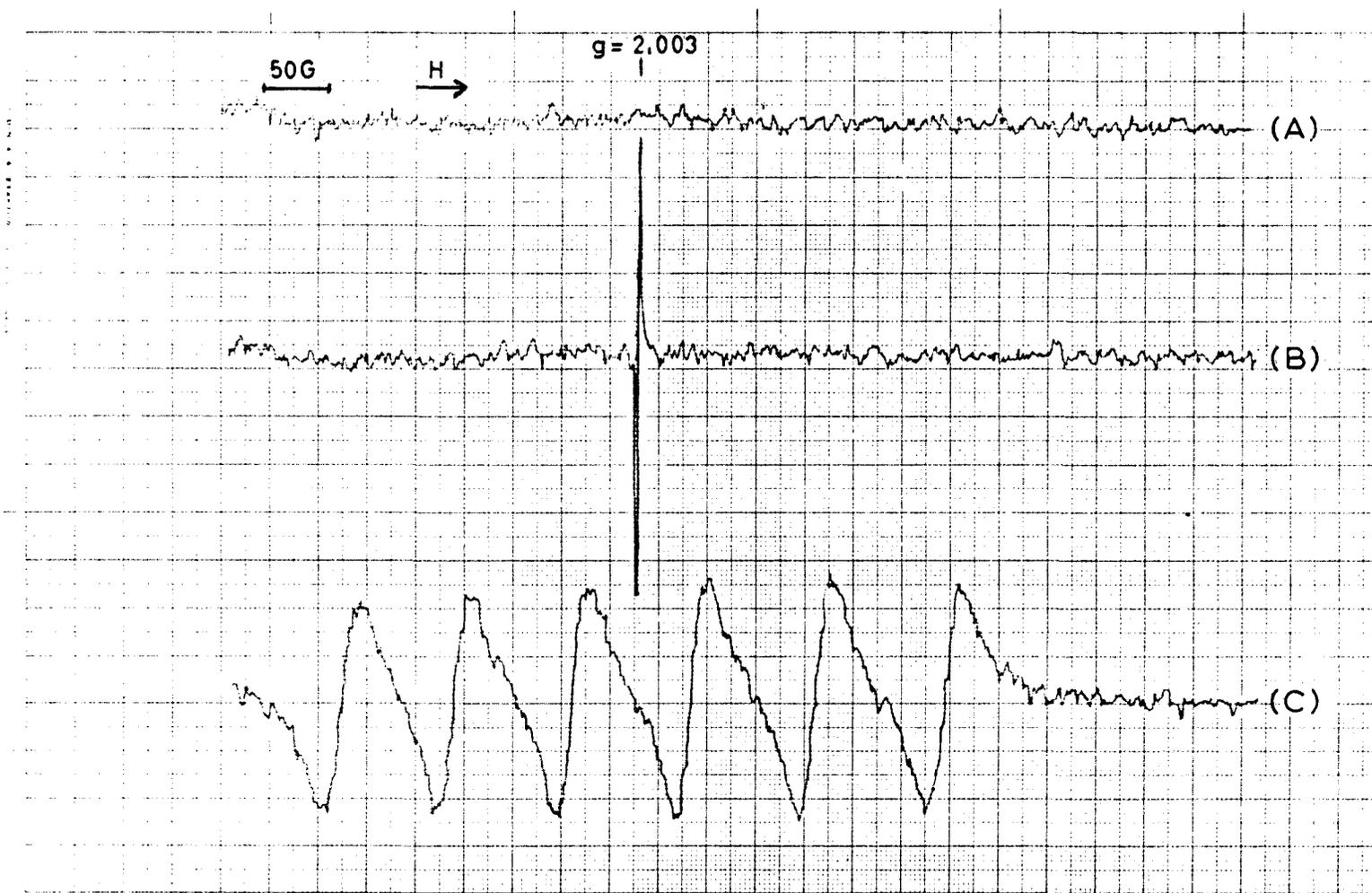


Fig. 21. Espectro de Resonancia de Spin Electrónico de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante.

atribuible al radical libre del ditionito monómero en exceso, pero no se detectó señal alguna correspondiente al Manganeso(II), a pesar de haber reductor en exceso. Finalmente, después de la desnaturación de la enzima por hidrólisis clorhídrica (registro C), apareció el espectro característico del complejo hexaacuo-Mn(II).

## ESTRUCTURA CUATERNARIA

### Determinación del peso molecular de las subunidades

Como se muestra en la Tabla 14, la incubación de manganeso su peróxido dismutasa con SDS al 1%, a 37°, 50° y 100°C, en presencia y ausencia 2-mercaptoetanol, y la posterior electroforesis de la muestra en geles de poliacrilamida-SDS, reveló la presencia de dos bandas proteicas, una mayoritaria y de mayor movilidad, y otra más lenta, cuyos porcentajes medios, determinados por densitometría después de la tinción de los geles con azul Coomassie, eran de aproximadamente un 67% y un 33%, respectivamente.

Sin embargo, la incubación de la enzima con SDS al 1% y urea 8M a 37°C durante 2 horas, dió lugar a la aparición mayoritaria ≈ 90%) de la proteína de menor peso molecular. Y cuando empleando mezclas de incubación análogas, se efectuaba un calentamiento a 100°C durante 5 minutos, tenía lugar la conversión total de la enzima en su subunidad elemental (Figura 22). Utilizando el método de Weber y Osborn (1969), se obtuvo para esta subunidad un peso molecular de  $23.500 \pm 1.120$ , media de cinco determinaciones. En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos con proteínas patrones y problema, en uno de los numerosos recorridos electroforéticos efectuados en presencia del SDS, empleando la técnica de los autores mencionados utilizando esta metódica, el peso molecular determinado para la banda proteica minoritaria fue de 46.300.

Fig. 22. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS de Mn-superóxido dismutasa incubada con urea 8M en presencia y ausencia de 2-mercaptoetanol. La enzima fué incubada a 100°C durante 5 min en presencia de: SDS al 1% + urea 8M (A), y SDS 1% + urea 8M + 2-mercaptoetanol al 1% (B). La electroforesis se llevó a cabo en geles conteniendo la misma composición de la mezcla de incubación, con la excepción del SDS cuyo porcentaje era del 0,1%. m=monómero; d="dímero"

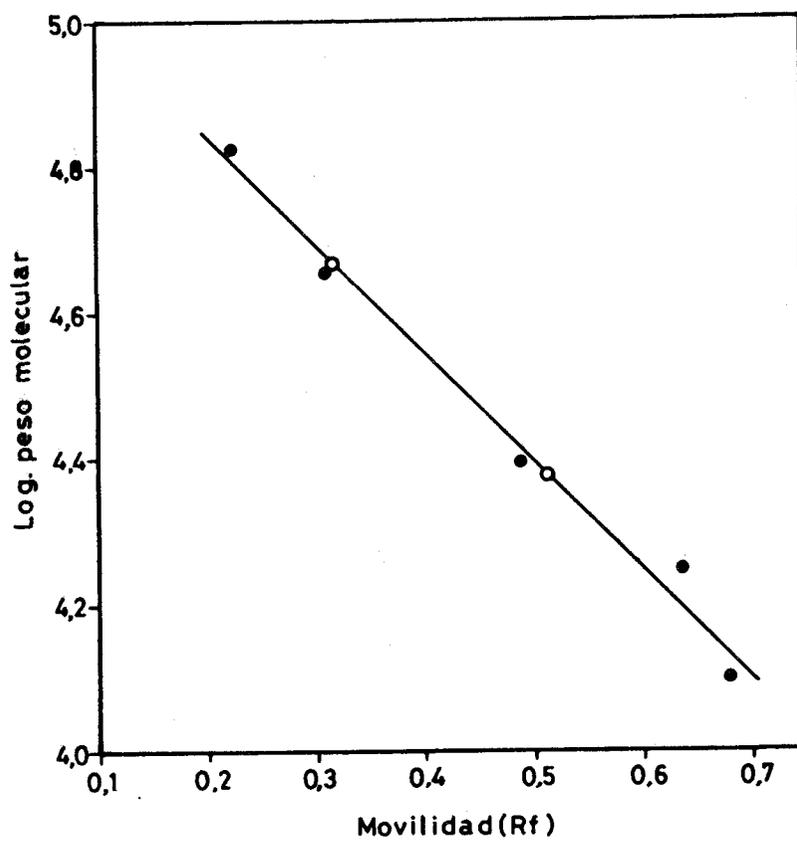


Fig. 23. Determinación del peso molecular de las subunidades de Mn-SOD por electroforesis en geles de acrilamida\_SDS.

TABLA XIV.EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LA DISOCIACION EN SUBUNIDADES DE Mn-SUPEROXIDO DISMUTASA. La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se efectuó en geles al 10% en acrilamida, en buffer fosfato sódico 0.1M, pH 7,0. Un asterisco in dica que los geles contenían las mismas concentraciones de reactivos que las mezclas de incubación con la excepción del SDS que era del 0.1%.

Mezcla de incubación	Condiciones de calentamiento	Monómero	Dímero	Relación monómero/dímero
		(23500)	(46300)	
Porcentaje				
SDS 1% + mercaptoetanol 8%	37°C 2 horas	64,4	35,6	1,8
SDS 1% + mercaptoetanol 8%	50°C 2 minutos	72,6	27,4	2,6
SDS 1% + mercaptoetanol 8%	100°C 2 minutos	68,4	31,6	2,2
SDS 1% + mercaptoetanol 1%	100°C 5 minutos	64,6	35,4	1,8
SDS 1% - mercaptoetanol	100°C 5 minutos	69,3	30,7	2,3
SDS 1% + mercaptoetanol 8%	100°C 15 minutos	65,2	34,8	1,9
* SDS 1% + urea 8M + mercaptoetanol 1%	100°C 5 minutos	66,8	33,2	2,0
* SDS 1% + urea 8M - mercaptoetanol 1%	37°C 2 horas	90,2	9,8	9,2
* SDS 1% + urea 8M - mercaptoetanol	100°C 5 minutos	100	-	-

Estos resultados indican que la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante está compuesta por cuatro subunidades de igual tamaño, con un peso molecular de 23.500.

La adición al medio de incubación con urea 8M, de 2-mercaptoetanol, producía la conversión parcial de la subunidad monomérica en la "dimérica" (aproximadamente un 33%) lo que sugiere la existencia de una agregación anormal en presencia del tiol. En la mayoría de los casos, cuando se obtenía la subunidad monomérica y la dimérica, la razón entre los porcentajes de ambas formas era de aproximadamente dos.

Se ensayó la actividad "in situ" de las subunidades por el método fotoquímico de Weisiger y Fridovich (1973a), después de incubar la enzima con urea 8M a 100°C durante 5 minutos y a 37°C durante dos horas. En estas condiciones, tanto la subunidad monomérica como la dimérica no tenían actividad superóxido dismutasa. Sin embargo, en aquellos geles que contenían urea y 2-mercaptoetanol, aparecía una banda azul oscura sobre un fondo azulado, con una movilidad idéntica a la de la forma monomérica. Aparentemente, en presencia del tiol la subunidad elemental de la manganeso superóxido dismutasa produce la reducción del NBT, el colorante usado para la tinción enzimática.

## ESTABILIDAD DE LA ENZIMA

### 1. Estabilidad térmica

En las Tablas 15, 16 y 17, así como en las Figuras 24, 25 y 26, se expone la evolución de la actividad Mn-superóxido dismutasa en función de las distintas temperaturas y tiempos de ensayo.

En las Tablas 15 y 16 se presenta la estabilidad de la enzima a -18°C y 4°C, respectivamente. Los resultados indican que la Mn-su-

TABLA XV. ESTABILIDAD ENZIMATICA A -18° C

Tiempos	Actividad SOD (U/ml)	Actividad residual (%)
0	215,79	100,0
7 días	197,09	91,3
15 días	171,65	79,5
1 mes	186,80	86,6
2 meses	193,82	89,8
3 meses	180,52	83,7
4 meses	175,40	81,3

TABLA XVI. ESTABILIDAD ENZIMATICA A 4° C

Tiempos	Actividad SOD (U/ml)	Actividad residual (%)
0	215,79	100,0
1 día	205,40	95,2
5 días	194,73	90,2
7 días	195,66	90,7
11 días	179,83	83,3
15 días	165,37	76,6
1 mes	173,02	80,2
2 meses	167,73	77,7
3 meses	165,32	76,6
4 meses	168,18	77,9

TABLA XVI. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA A 25° C

Tiempos	Actividad SOD (U/ml)	Actividad residual (%)
0	208,94	100
15 minutos	220,77	106
30 minutos	208,10	99,6
1 hora	208,94	100
2 horas	205,80	98,5
3 horas	204,55	97,9
5 horas	204,13	97,7
24 horas	201,84	96,6

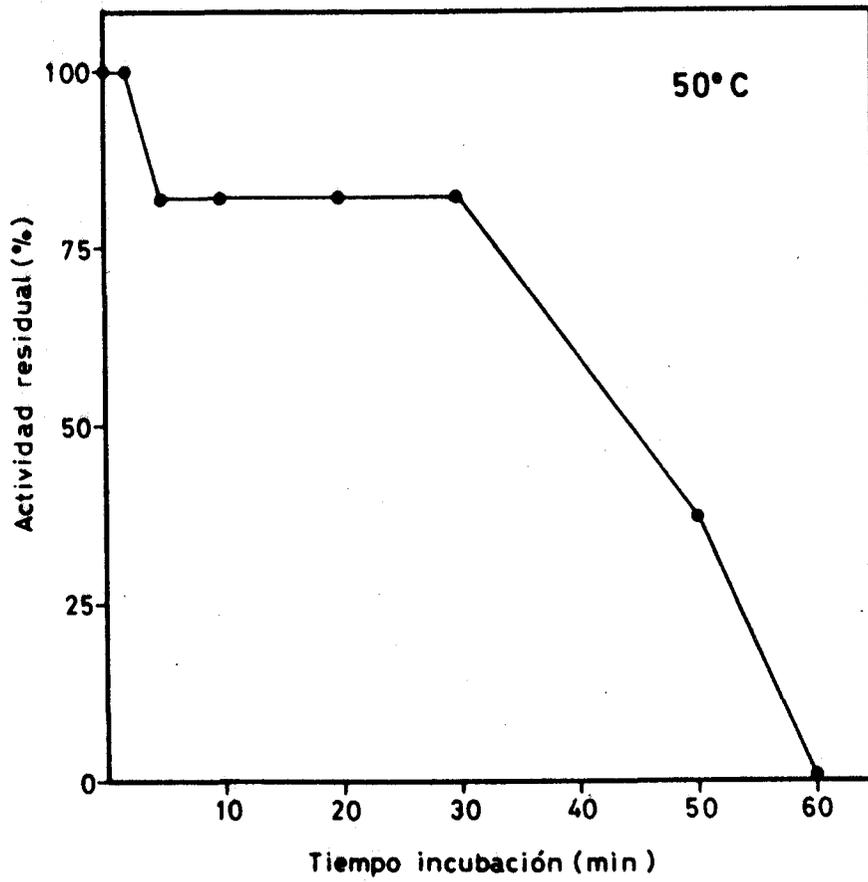


Figura 24

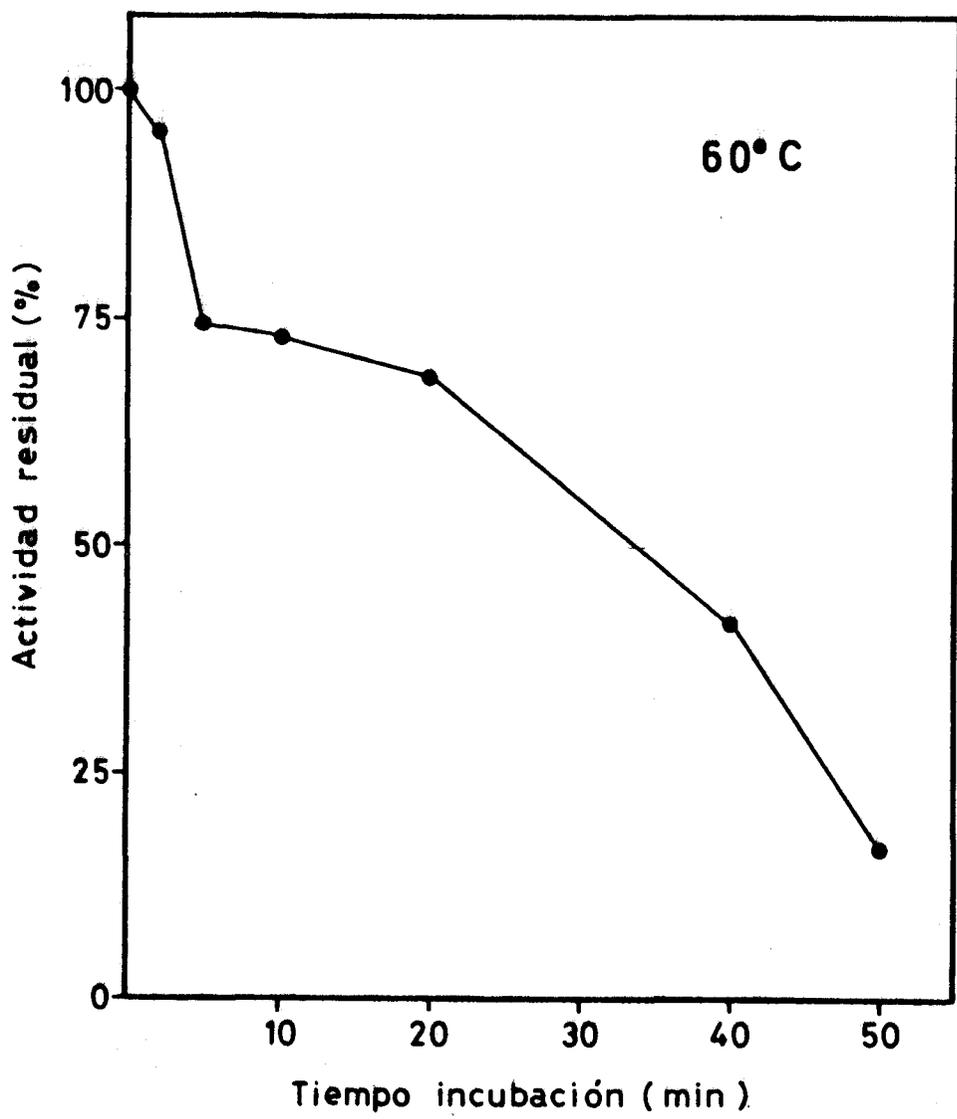


Figura 25

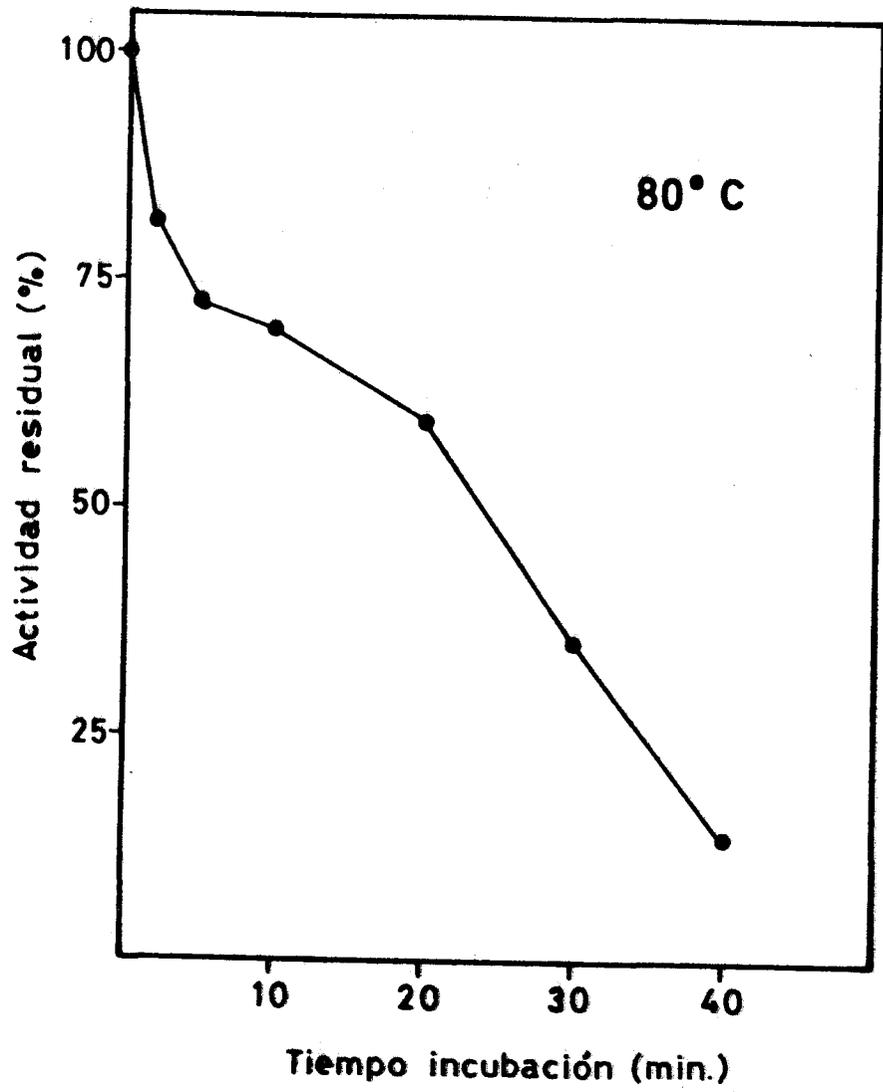


Figura 26

peróxido dismutasa es estable a bajas temperaturas, y así al cabo de cuatro meses a  $-18^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$ , la enzima aún retiene el 81% y el 78% de su actividad inicial, respectivamente.

A  $25^{\circ}\text{C}$ , y después de 24 horas de incubación a esta temperatura, la Mn-superóxido dismutasa permanecía casi inalterada, presentando un 97% de actividad residual, como se deduce de los resultados de tallados en la Tabla 17.

El curso de la inactivación de la enzima a  $50^{\circ}\text{C}$  no es exponencial, como ocurre con la mayor parte de las proteínas, sino que muestra una meseta entre los 5 y 30 minutos de permanencia de la enzima a esta temperatura, llegándose a la desnaturalización total al cabo de los 60 minutos de calentamiento (Figura 24). Por el contrario, la inactivación a  $60^{\circ}\text{C}$  y  $80^{\circ}\text{C}$  seguía un curso exponencial (Figuras 25 y 26), siendo la desnaturalización casi completa después de los 50 minutos para los  $60^{\circ}\text{C}$  y de 40 minutos para los  $80^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Estabilidad frente al pH

En la Tabla 18 se presenta la evolución de la actividad Mn-superóxido dismutasa en función del tiempo de preincubación en cuatro buffers distintos de idéntica molaridad (50 mM), que cubrían un rango de pH de 4,0 - 10,0. Las actividades enzimáticas determinadas en cada uno de los tiempos de incubación, permanecían prácticamente inalteradas para valores de pH comprendidos entre 7,8 - 10, observándose en cambio pérdidas sensibles de actividad Mn-superóxido dismutasa a  $\text{pHs} \leq 5$ .

## CONDICIONES OPTIMAS DE pH Y TEMPERATURA PARA LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

### 1. pH

La Figura 27 muestra el efecto del pH del medio de reacción

TABLAXVIII Estabilidad de la enzima frente al pH a 25° C

Buffer 50 mM	pH	Actividad SOD residual (%)		
		Tiempo (horas)		
		0	5	24
Cítrico-citrato	4,11	9,1	0	0
Cítrico-citrato	5,10	88,6	62,5	61,7
Cítrico-citrato	6,09	95,5	94,3	87,3
Fosfato K	6,05	90,9	79,5	61,7
Fosfato K	7,20	90,9	86,4	79,2
Fosfato K	7,80	88,6	89,8	85,6
Tris-ClH	7,97	98,9	96,6	95,5
Tris-ClH	8,70	93,2	94,3	94,3
Glicina-NaOH	8,70	104,5	106,8	104,8
Glicina-NaOH	10,00	90,9	94,3	94,3
Glicina-NaOH	10,60	97,7	97,7	96,6

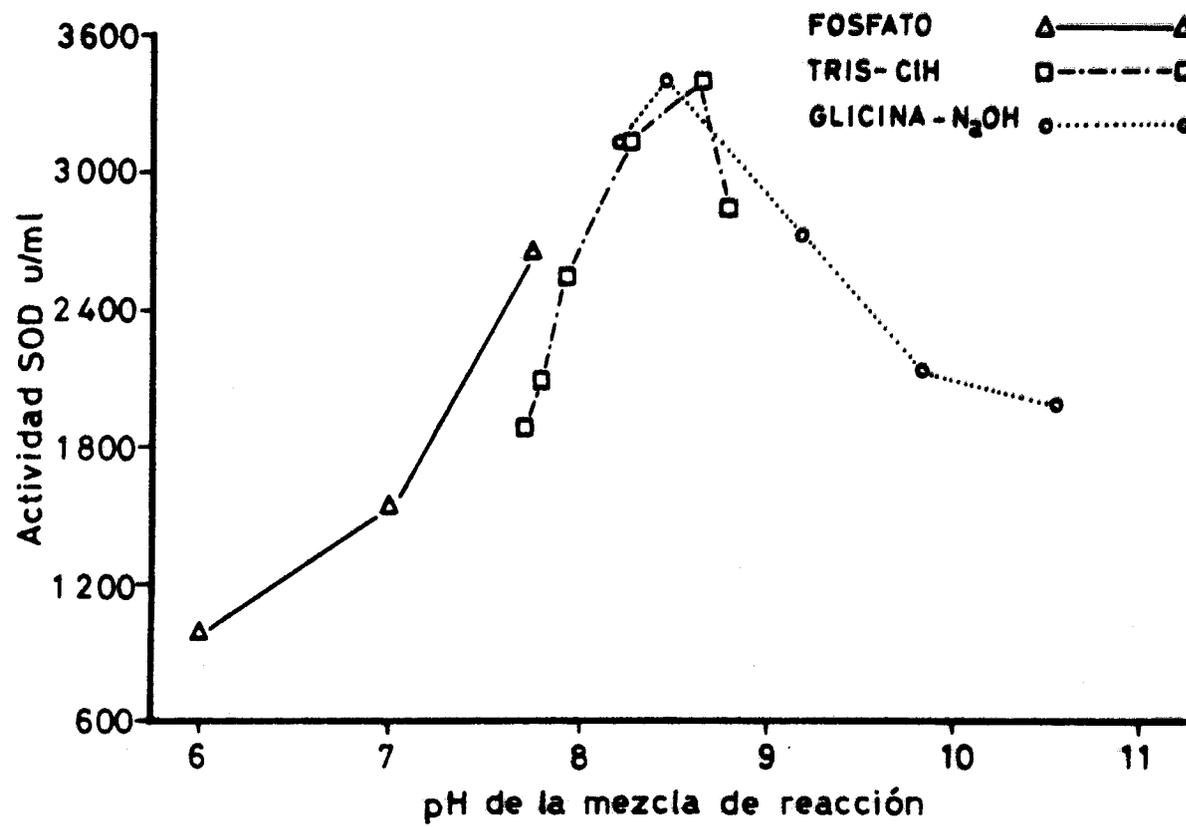


Figura 27

sobre la actividad enzimática. A valores de pH inferiores a 6,0 no fue posible determinar la actividad superóxido dismutasa por producirse, en estas condiciones, interferencias con el sistema generador de los radicales superóxido, aunque presumiblemente la actividad enzimática debe ser mínima teniendo en cuenta el efecto de valores ácidos de pH sobre la actividad, que acabamos de mencionar.

A partir de pH 6,0, se produce un aumento de la actividad superóxido dismutasa hasta alcanzar el óptimo, a pH comprendido entre 8,47 y 8,65, es decir, a un pH aproximado de 8,6. Hacia la zona alcalina de disminución que sufre la actividad tiene una pendiente similar a la que se presenta en la zona ácida.

## 2. Temperatura

En la Tabla 19 se recogen los valores correspondientes a la influencia de la temperatura de reacción sobre la actividad manganeso superóxido dismutasa. El máximo de actividad enzimática se presenta a una temperatura de 31°C, iniciándose después una disminución en la velocidad de reacción, que alcanza un mínimo a 60°C, donde es presumible que tengan lugar, en mayor o menor medida, inactivaciones enzimáticas por efecto de la temperatura.

## INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: CONSTANTE DE VELOCIDAD APARENTE.

En las Figuras 28 y 29 se muestra el efecto de distintas concentraciones de manganeso superóxido dismutasa sobre la velocidad inicial de reducción del citocromo c y del NBT por radicales superóxido, en las condiciones óptimas de pH y temperatura previamente determinadas. En ambos casos, tanto si se utiliza como "detector" de los radicales uno u otro compuesto, puede apreciarse una evolución -

TABLAXIX. Influencia de la temperatura de reacción sobre la actividad manganeso superóxido dismutasa.

Temperatura (° C)	Actividad SOD (U/ml)
4	2222,2
15	2269,6
25	2461,5
31	3070,4
37	2680,0
41	2732,0
45	2285,6
60	1897,6

parecida en la marcha de la reacción. Así, a partir de concentraciones enzimáticas de 1.500 ng/ml, para el ensayo con el citocromo c, y de 1.200 ng/ml para el del NBT, se observa como la actividad permanece prácticamente estacionaria.

En las Figuras 30 y 31 se muestra también la influencia de la concentración enzimática sobre el nivel de actividad, pero utilizando los ensayos con citocromo c y NBT en las condiciones standard. -- Por interpolación en la gráfica correspondiente, se calcula la concentración de superóxido dismutasa que produce una inhibición del -- 50% en la reducción del citocromo c y del NBT por los radicales superóxido y, por tanto, capaz de competir por estos radicales con concentraciones de citocromo c de  $1,0 \times 10^{-5} \text{M}$ , y de NBT  $2,5 \times 10^{-5} \text{M}$ .

Una vez conocida esta concentración (Figura 30), el cálculo de la constante de velocidad aparente para la reacción de la Mn-superóxido dismutasa con los radicales superóxido, empleando citocromo c como detector, se efectuó a partir de la fórmula:

$$K_e = \frac{K_c \{ \text{Cit. c} - \text{Fe}^{3+} \}}{\{ \text{SOD} \}}$$

donde:  $K_c$  = constante de velocidad para la reacción del  $\text{O}_2^-$  con el citocromo c;  $\{ \text{Cit. c} - \text{Fe}^{3+} \}$  = conc. de citocromo c en la mezcla de reacción; y  $\{ \text{SOD} \}$  = conc. de Mn-superóxido dismutasa que produce un 50% de inhibición a pH 7,8 y 25°C.

Por sustitución de los valores correspondientes en la expresión general, se obtiene el valor de la constante de velocidad aparente de la Mn-superóxido dismutasa ( $K_e$ ), utilizando citocromo c como detector de  $\text{O}_2^-$ :

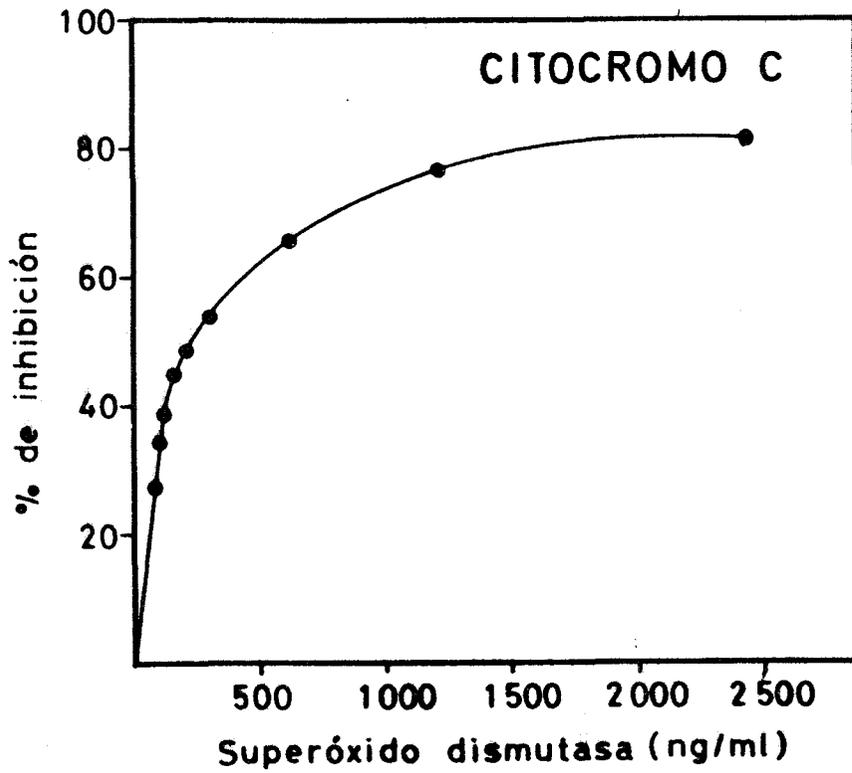


Fig. 28

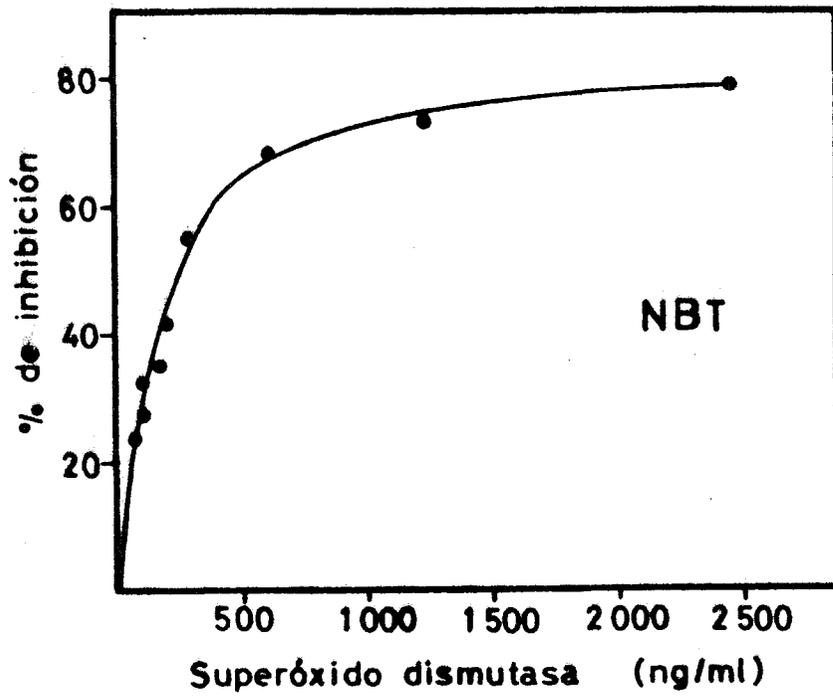


Fig. 29

Efectos de distintas concentraciones de Mn-superóxido dismutasa sobre la actividad enzimática, en condiciones standard de ensayo.

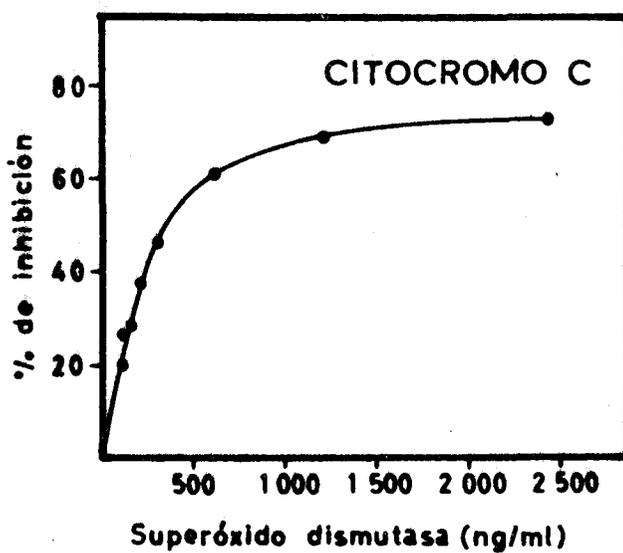


Fig. 30

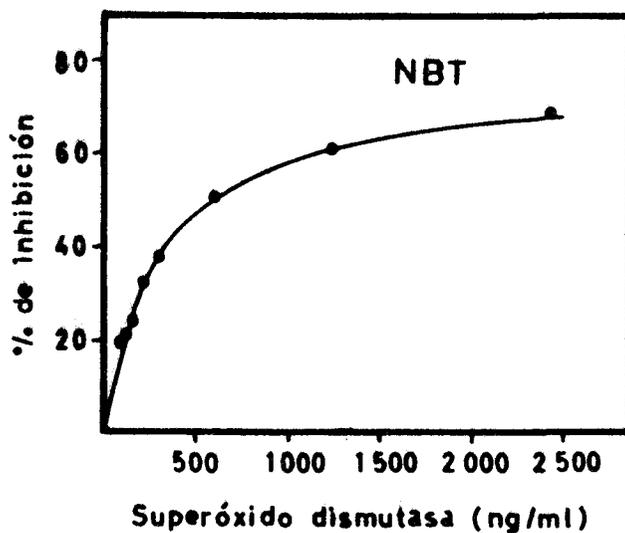


Fig. 31

$$K_e = \frac{6 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1} \times 10^{-5} \text{M}}{3,72 \times 10^{-9} \text{M}} = 1,61 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$$

De igual manera, la constante de velocidad aparente para la Mn-superóxido dismutasa cuando se utiliza el NBT, en condiciones de ensayo standard, es decir pH 10,2 y 25°C, se obtiene a partir de la Figura 31, y viene dada por la expresión:

$$K_e = \frac{K_N \{ \text{NBT}_{\text{ox.}} \}}{\{ \text{SOD} \}}$$

y por sustitución

$$K_e = \frac{1 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1} \times 2,5 \times 10^{-5} \text{M}}{6,38 \times 10^{-9} \text{M}} = 0,39 \times 10^8 \text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$$

## EFFECTO DE INHIBIDORES ENZIMATICOS

### 1. Preparados homogéneos de enzima

En la Tabla 20 se presenta la evolución de la actividad Mn-superóxido dismutasa, en función del tiempo de preincubación de la enzima con distintas concentraciones de agua oxigenada, observándose que en ninguna de las condiciones descritas se produce una inhibición apreciable de la actividad enzimática. Análogamente, en la Tabla 21, se exponen los resultados de la preincubación de la enzima con p-hidroximercuribenzoato, poniéndose de manifiesto la fuerte inhibición de la actividad Mn-superóxido dismutasa por concentración 1 mM de este inhibidor de grupos tiolitos.

Las Tablas 22 y 23 recogen los efectos sobre la actividad enzimática de concentraciones variables de  $\text{CN}^-$  y de dietilditiocarbamato, adicionadas directamente a las mezclas de reacción. Como era de

TABLA XX. Efecto de la preincubación de la enzima a 25°C con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la actividad manganeso superóxido dismutasa

(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) mM	Tiempo preincubación	Actividad SOD U/ml		% de inhibición
		E	E + I	
0,1	30 minutos	339,1	327,2	3,5
	60 minutos	333,9	316,3	5,2
	90 minutos	333,9	310,8	6,9
	120 minutos	341,9	313,6	8,3
0,5	30 minutos	339,1	311,2	8,2
	60 minutos	333,9	300,8	9,9
	90 minutos	333,9	296,9	11,1
	120 minutos	260,9	237,7	8,8

TABLA XXI.Efecto de la preincubación de la enzima a 25°C con p-hi  
droximercuribenzoato (PHMB) sobre la actividad manganeso  
superóxido dismutasa.

(PHMB) mM	Tiempo preincubación	Actividad SOD (U/ml)	% de inhibición
-	60 minutos	589,4	0
0,1	60 minutos	647,3	0
1,0	60 minutos	44,6	92,4

TABLA XXI.Efecto de distintas concentraciones de cianuro sobre la actividad manganeso superóxido dismutasa.

(CN <sup>-</sup> ) mM	Actividad SOD (U/ml)	% de inhibición
—	465,9	-
0,1	464,1	0,4
0,2	464,5	0,3
0,5	463,6	0,5
1,0	550,2	0,0
2,0	463,2	0,6

TABLA XXIII. Efecto de distintas concentraciones de dietilditiocarbamato (DIECA) sobre la actividad manganeso superóxido dismutasa

(DIECA) mM	Actividad SOD (U/ml)	% de inhibición
-	983,2	0
0,25	1005,7	0
0,50	931,9	5,2
1,0	853,2	13,2
5,0	743,4	24,4
10,0	751,2	23,6

esperar, por la naturaleza del grupo prostético de la enzima, el  $\text{CN}^-$  no tiene efecto alguno sobre la actividad de la misma. Por otro lado el dietilditiocarbonato, a la concentración máxima, produce una inhibición de la actividad de un 24%.

Finalmente, en las Figuras 32, 33 y 34 se representa gráficamente el porcentaje de inhibición alcanzando en presencia de distintas concentraciones de azida, EDTA y o-fenantrolina, respectivamente, en la mezcla de reacción. En la Fig. 32 se observa que la azida produce una inhibición máxima de un 62%, siendo esta inhibición del orden de un 34% y un 25% para el caso del EDTA y de la o-fenantrolina, respectivamente, tal y como se deduce de las Figuras 33 y 34.

## 2. Extractos crudos

En la Figura 35 se muestra el efecto de la preincubación con cianuro y  $\text{H}_2\text{O}_2$  de extractos crudos de hojas de guisantes, sobre la actividad de las tres superóxido dismutasas presentes en esta especie vegetal. De izquierda a derecha, el primer electroferograma corresponde al revelado enzimático "in situ" del extracto crudo control, y el segundo y tercero, al extracto crudo después de la preincubación con  $\text{CN}^-$  1mM, y  $\text{CN}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  1mM, respectivamente. Los resultados son coincidentes con los obtenidos empleando Mn-superóxido dismutasa pura, anteriormente descritos, poniéndose de manifiesto la resistencia de la Mn-enzima (banda más lenta) frente al  $\text{CN}^-$  y al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , -- mientras que, en análogas condiciones, la actividad de las dos Cu,Zn-superóxido dismutasas presentes en hojas de guisante resulta totalmente inhibida.

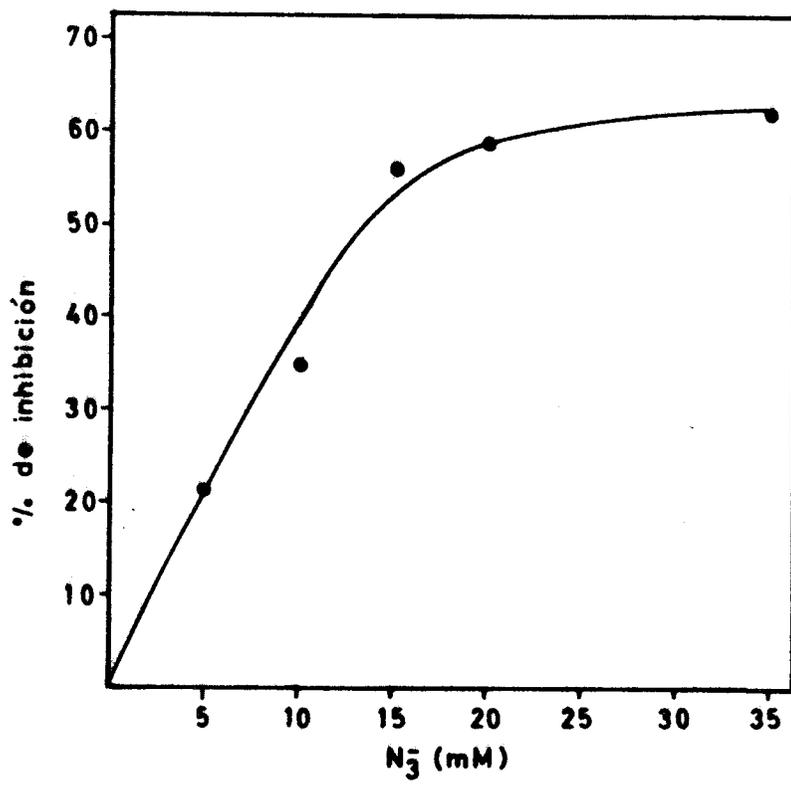


Figura 32

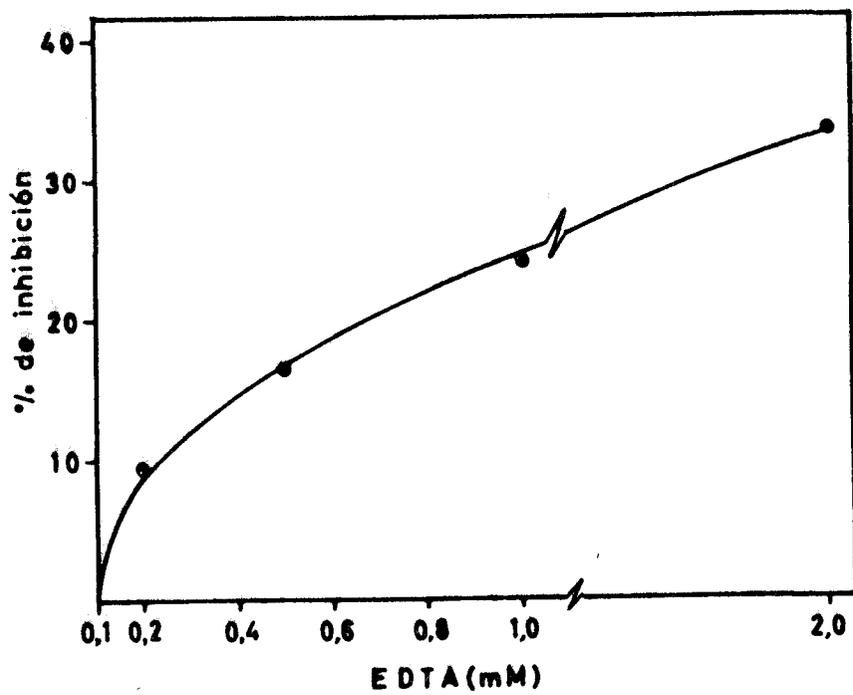


Fig. 33

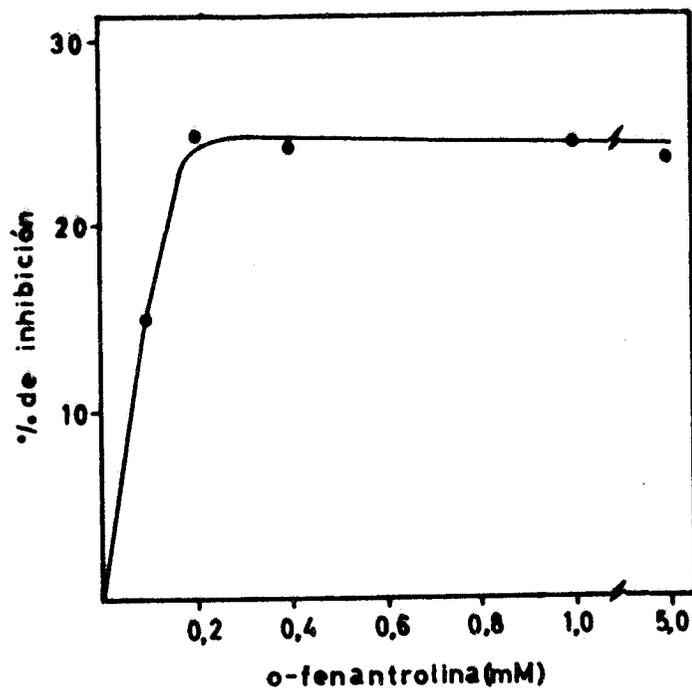


Fig. 34

Figura 35

DISCUSSION

En plantas superiores todavía no se ha llevado a cabo la purificación a homogeneidad de ninguna superóxido dismutasa conteniendo manganeso como grupo prostético. Los únicos intentos de aislamiento efectuados son aquellos relacionados con las enzimas de hojas de espinaca (Lumsden y Hall, 1974) y de hojas de judía (Kono y col., 1979). En ambos casos solamente se llevaron a cabo purificaciones parciales, no llegando a obtenerse preparados enzimáticos homogéneos, por lo que no pudo verificarse la identidad del grupo metálico presente en aquellas superóxido dismutasas (hierro ó manganeso) ni, consiguientemente, efectuar estudios de caracterización bioquímica de estas metaloenzimas. Por lo tanto, mediante el proceso de purificación descrito en esta Memoria Doctoral ha sido posible obtener, por primera vez, en forma homogénea una manganeso superóxido dismutasa de una planta superior y llevar a cabo el estudio de sus propiedades bioquímicas.

Los preparados enzimáticos obtenidos tenían una actividad específica de aproximadamente 3000U/mg proteína, según el método de la xantina oxidasa-NBT de Beauchamp y Fridovich (1971), equivalente a unas 3700 U/mg proteína por el método de la xantina oxidasa-citocromo c. La actividad específica de esta Mn-superóxido dismutasa es superior a las descritas para las dos mangano dismutasas hasta ahora pu-

rificadas de organismos fotosintéticos, la bacteria *Rhodospseudomonas spheroides* (Lumsden y col., 1976) y el alga roja *Porphyridium cruentum* (Misra y Fridovich, 1977d), que son de 2600 y 2000 U/mg, respectivamente, utilizando el método de determinación del citocromo c.

Sin embargo, la actividad específica de los preparados obtenidos de Mn-superóxido dismutasa de guisante es del mismo orden que la descrita para las mangano enzimas de las bacterias *Escherichia coli* - (Keele y col., 1970), *Mycobacterium lepraemurium* (Ichiara y col., 1977), *Mycobacterium* strain Takeo (Kusunose y col., 1976a) y de hígado de pollo (Weisiger y Fridovich, 1973a), siendo también similar a los valores obtenidos para diversas cuprocinc y ferro-superóxido dismutasas aisladas de distintas fuentes (Briggs y Fee, 1978; McCord y Fridovich, 1969a; Beauchamp y Fridovich, 1973; Kono y col., 1979; Kanematsu y Asada, 1978a, 1978b; Yamakura, 1976).

En hojas de guisante, la manganeso superóxido dismutasa constituye aproximadamente un 20% de la actividad superóxido dismutasa total, y sobre la base de su actividad específica, el contenido de esta enzima representa del 0,2 - 0,4% de las proteínas solubles de hojas de *Pisum sativum*, valor que, por extrapolación, está de acuerdo con los porcentajes proteicos descritos por Giannopolitis y Ries (1977b) para la actividad superóxido dismutasa de plantas de maíz, guisante y avena.

Con relación a la metódica de purificación diseñada para el aislamiento de la enzima a partir de extractos crudos de hojas, ésta consiste en 6 etapas, y está basada en criterios de diferente solubilidad de las fracciones componentes de los extractos, bien frente a la temperatura (I) ó a la concentración salina (II), en la carga neta de la molécula proteica (III y IV), en su peso molecular (V) y en el tamaño y carga neta de la proteína (VI).

La etapa de cromatografía de adsorción sobre el cambiador aniónico DEAE-celulosa, tipo 23, resulta conveniente con el fin de efectuar una concentración previa del material activo, eliminando todos aquellos compuestos que debido a su carga no son fijados por el cambiador y que podrían interferir en el paso siguiente de cromatografía de intercambio iónico con elución con gradiente salino. En este proceso, el simple lavado de la columna con el buffer base utilizado, permite la elución de las dos cuprocinc-superóxido dismutasas (denominadas I y II) presentes en las hojas de guisante, y su separación de la manganeso superóxido dismutasa, que en las condiciones de ensayo utilizadas, permanece fijada a la columna. Posteriormente, la aplicación de un gradiente lineal de  $\text{ClNa}$  produce la elución de la mangano enzima en un rango de concentración salina de 0,14-0,28M.

Llaman la atención los bajos rendimientos obtenidos en la purificación de la enzima (0,4-2%) en comparación con los descritos en la literatura para otras superóxido dismutasas de diferentes orígenes, que en general oscilan entre un 15-40% a pesar de haber empleado en nuestro trabajo criterios de purificación similares.

Las dos únicas excepciones son las correspondientes a la Mn-superóxido dismutasa de hígado de rata (Salin y col., 1978) y a la Fe-superóxido dismutasa de hojas de mostaza (Salin y Bridges, 1980), enzimas para las que se obtuvieron rendimientos del 7% y del 1%, respectivamente. En el primer caso Salin y col. (1978) informaron de ligeros aumentos en los rendimientos enzimáticos, mediante la adición de inhibidores de proteasas o de compuestos tiólicos a los buffers de la purificación. De igual manera, nosotros hemos encontrado que la incorporación de ditiotreitól (DTT) a los buffers de algunos pasos del procedimiento de purificación de Mn-superóxido dismutasa de guisante, también coadyuaban ligeramente a la estabilización de la enzima, lo que sugiere posibles alteraciones en la molécula enzimática por agentes oxidantes.

Una explicación de los bajos rendimientos obtenidos en el -- proceso de purificación, independientemente de una inestabilidad in herente a esta Mn-superóxido dismutasa de guisante, podría ser la - presencia en los extractos crudos de hojas, de compuestos con acti- vidad superóxido dismutasa inespecífica, aunque tampoco se puede -- descartar la posibilidad de interferencias en el método de determi- nación de la actividad superóxido dismutasa, por algún producto exis- tente en los extractos crudos.

De hecho, es conocido que los iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , en or- den decreciente de actividad, catalizan la dismutación del superoxi- do (Lumsden y Hall, 1975; Fee, 1979) y que los complejos de  $\text{Fe}^{3+}$  ó  $\text{Fe}^{2+}$  con compuestos quelatos como el EDTA, son más reactivos frente a los radicales superóxido que los propios iones libres (Halliwell, 1975). También se ha descrito actividad superóxido dismutasa inespe- cífica en complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  con algunos aminoácidos, salicilato y D- penicilamina (Lengfelder y Elstner, 1978; Fee, 1979).

Por otra parte, otros complejos de cobre y hierro de mayor - peso molecular e importancia biológica, también presentan cierta ac tividad superóxido dismutasa, encontrándose entre éstos la hematina (Halliwell, 1975), la citocromo oxidasa (Markossian y col., 1978) y la galactosa oxidasa (Hamilton y col., 1973). Por lo que se refiere a organismos fotosintéticos, también se ha observado actividad supe- róxido dismutasa en algunos componentes de la cadena de transporte electrónico fotosintético como la plastocianina (Foyer y Hall, 1979), y en diversos complejos de elevado peso molecular constituidos por Mn-proteína-pigmentos fotosintéticos aislados de *Dunaliella tertio- lecta* y *Phaeodactylum tricornutum* (Von Kameke y Wegman, 1977; Foyer y Hall, 1980), y de cloroplastos de espinaca (Foyer y Hall, 1979).

Adicionalmente, también el ácido ascórbico y el glutathion presentes en el cloroplasto, son capaces de reaccionar con el radical superóxido mostrando por lo tanto actividad superóxido dismutasa (Halliwell, 1978a).

De lo dicho se desprende que, independientemente de la posible inactivación de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante a lo largo del proceso de purificación, por distintos agentes, la presencia en los extractos crudos de un buen número de compuestos - dotados de actividad superóxido dismutasa residual, podría conducir a conclusiones erróneas respecto a las recuperaciones enzimáticas obtenidas por el método de aislamiento empleado. De esta manera, la eliminación en el curso de una etapa de purificación de productos - con actividad inespecífica superóxido dismutasa podría provocar una disminución aparente en la actividad Mn-superóxido dismutasa del purificado obtenido y dar lugar a un rendimiento final de la enzima - purificada artificialmente bajo.

El espectro de absorción en el ultravioleta de la Mn-superóxido dismutasa de guisante es similar al que presentan muchas proteínas que contienen tirosina y triptófano, aminoácidos responsables del máximo de absorción a 280 nm, y muestra un hombro a 225 nm que también ha sido observado en las manganoso superóxido dismutasas mitocondriales de levadura (Ravindranath y Fridovich, 1975), hígado de pollo (Weisiger y Fridovich, 1973a), corazón bovino (Marklund, 1978) e hígado humano (McCord y col., 1977c). Este hombro según McCord y col. (1977c), parece ser debido al grupo cromóforo del manganeso.

El coeficiente de absorción molar de la enzima a 280 nm --- ( $120.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) está comprendido dentro del amplio rango descrito para distintas Mn-superóxido dismutasas de diferentes orígenes - ( $49.000\text{-}200.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), siendo de un orden similar a los de las enzimas de *Thermus aquaticus* (Sato y Harris, 1977), *Thermus thermophilus* (Sato y Nakazawa, 1978), hígado de pollo (Weisiger y Fridovich, 1973a), e inferior a los coeficientes de absorción molar de las manganeso superóxido dismutasas de corazón bovino (Marklund, -- 1978), hígado humano (McCord y col., 1977c) y levadura (Ravindranath y Fridovich, 1975) que se acercan al valor de  $200.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Por el contrario, el orden de magnitud de esta constante óptica es bastante superior a los descritos para aquellas mangano dismutasas de los organismos fotosintéticos *Rhodospseudomonas spheroides* (Lumsden y col., 1976) y *Porphyridium cruentum* (Misra y Fridovich, 1977d), de aproximadamente  $50.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , lo que, por otra parte, era de esperar, considerando el peso molecular bastante más bajo de estas dos superóxido dismutasas, en comparación con la manganeso superóxido dismutasa de hojas de guisante.

El espectro visible de la enzima muestra una banda de absorción débil y amplia en el rango de 350-700 nm y es muy similar al - de la manganeso superóxido dismutasa de levadura (Ravindranath y -- Fridovich, 1975). En lugar del máximo de absorción claro a 470-480 nm, característico de esta familia de superóxido dismutasas, presenta un hombro débil a esta longitud de onda, y otro más intenso a -- aproximadamente 600 nm que también ha sido descrito para las Mn-superóxido dismutasas de los siguientes organismos: levadura (Ravindranath y Fridovich, 1975); el hongo *Pleurotus olearius* (Lavelle y col., 1974); las bacterias *Thermus thermophilus* (Sato y Nakazawa, -

1978), *Thermus aquaticus* (Sato y Harris, 1977) y una especie de *Mycobacterium* (Kusunose y col., 1976a); hígado humano (McCord y col., 1977c) e hígado de pollo (Weisiger y Fridovich, 1973a).

Villafranca y col. (1974) sobre la base de estudios de resonancia magnética han postulado que en las Mn-superóxido dismutasas el manganeso en el estado de reposo, se encuentra probablemente en forma de Mn(III). De acuerdo con esto, cabría esperar que la reducción de la enzima diera lugar a una disminución de color, al reducir un complejo de Mn(III) (de alto spin) a Mn(II), cuyas bandas de absorción en el visible son demasiado débiles para ser observadas a las concentraciones utilizadas en estos experimentos (Cotton y Wilkinson, 1966).

De hecho, la reducción con ditionito de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante provoca una desaparición parcial del componente visible del espectro. Resultados análogos se han obtenido con la manganeso superóxido dismutasa de levadura (Ravindranath y Fridovich, 1975), con la avimanganina, una forma inactiva de la Mn-superóxido dismutasa de hígado de pollo (Weisiger y Fridovich, 1973a; Scrutton, 1971), y con la Mn-superóxido dismutasa de *Escherichia coli* (Fee y col., 1976), resultados que han sido interpretados asignando al manganeso en la enzima "en reposo" un estado trivalente, por analogía con la conducta espectral observada en complejos bien definidos de Mn(III) (Dingle, 1966), lo que ha sido posteriormente confirmado en la enzima de *Escherichia coli* mediante medidas de susceptibilidad magnética (Fee y col., 1976).

Los espectros de resonancia de spin electrónico de la enzima

de hojas de guisante, registrados a la temperatura del nitrógeno líquido y a temperatura ambiente, utilizando distintas concentraciones de Mn-superóxido dismutasa, no mostraron señal alguna atribuible a Mn(II) tras haber explorado todo el rango de sensibilidad del instrumento. Del mismo modo, tampoco se observó señal de Mn(II) tras la adición de ditionito a una concentración final de 5 mM, a excepción de una señal a  $g \approx g_e$  atribuible al radical libre del ditionito monómero en exceso. Únicamente, después del proceso de desnaturación de la proteína, por hidrólisis ácida, apareció el espectro característico del complejo hexaacuo-Mn(II) lo que confirma la presencia de manganeso fuertemente ligado a la proteína.

La ausencia de señal de RSE en la "enzima en reposo" es compatible con la presencia de Mn(III) ó Mn(II) fuertemente ligado a la enzima, tal como ha sido discutido por Keele y col. (1970) para la Mn-superóxido dismutasa de *Escherichia coli* B. Aunque el ión Mn(II) es paramagnético, puede no dar señal típica de RSE correspondiente a esta valencia, si el Mn(II) está fuertemente inmovilizado por la proteína, como han observado Reed y Cohn (1970) en el complejo Mn(II)-concanavalina A, y más recientemente, Buttlair y col. (1980) en el Mn(II) ligado a tubulina.

Por otra parte, la formación de complejos entre electrones  $\pi$  de aminoácidos aromáticos de la proteína y electrones 3d del Mn(II), puede tener como resultado un ensanchamiento tan amplio de la señal del Mn(II) en el espectro de RSE, que sea prácticamente imposible registrarla, como han postulado Tikhomirova y Nikoleva (1980) para explicar la ausencia de señal de Mn(II) en zeolitas tipo A conteniendo Mn(II) tras la adsorción de benceno ó cumeno.

Como hemos indicado, la ausencia de señal en el espectro de RSE de la enzima nativa, es también compatible con la existencia -- del ión  $Mn(III)$ , silencioso a la RSE. La reducción del  $Mn(III)$  a --  $Mn(II)$ , en ausencia de otras influencias, debería ir acompañada de la aparición de la señal correspondiente al  $Mn(II)$ , pero como acaba mos de mencionar, son varios los factores que pueden producir un -- gran ensanchamiento de señal, que la hagan indetectable.

Así pues, la ausencia de señal de RSE a las temperaturas em pleadas en nuestros experimentos, no nos permiten concluir acerca - del estado de valencia del ión manganeso presente en la superóxido dismutasa de hojas de guisante. Por el contrario, las diferencias - observadas entre los espectros de absorción en el visible de la en zima nativa y, una vez reducida ésta con ditionito, permiten postu lar, sobre la base de la literatura mencionada, la existencia de -- manganeso trivalente en la superóxido dismutasa nativa. Indudable-- mente, el estudio mediante RSE de la reacción entre la enzima y los radicales superóxido, utilizando técnicas de congelación rápida, -- arrojaría evidencias directas sobre la presencia del estado de va-- lencia  $Mn(III)$  en la "enzima en reposo", pero estas técnicas están, hoy por hoy, fuera del alcance de nuestras posibilidades.

Si se acepta que en la  $Mn$ -superóxido dismutasa de guisante - el metal se encuentra en estado trivalente, a la vista de los resul tados obtenidos respecto a la reconstitución del contenido metálico de la enzima con  $Mn(II)$ , parece obligado suponer que el proceso de incorporación del metal a la apoproteína va acompañado de una oxida ción del ión manganeso hasta el estado de  $Mn(III)$ , valencia que es únicamente estable en presencia de un fuerte campo ligando (Cotton y Wilkinson, 1966). Igualmente, después de la desnaturalización de

la proteína por tratamiento ácido, el Mn(III) debe ser reducido a Mn(II), como se deduce de la señal típica de RSE detectada en la enzima hidrolizada, correspondiente al complejo haxaacuo-Mn(II).

Como se indicó en la Introducción, el mecanismo de acción catalítico de las tres familias de superóxido dismutasa implica, según Fridovich (1978a) la reducción y reoxidación alternativa del ión metálico tras dos encuentros sucesivos con sendas moléculas de superóxido. En este sentido, los resultados que acabamos de mencionar respecto al cambio de valencia del ión manganeso de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante, parecen ser, en principio, compatibles con el mecanismo de acción general postulado para las superóxido dismutasas.

Como se deduce de las Tablas IV y V de la Introducción, las distintas manganeso superóxido dismutasas caracterizadas presentan en general pesos moleculares de dos órdenes de magnitud, 37.000-40.000 y 80.000-96000. En bacterias no fotosintéticas se encuentran enzimas con los dos tipos de pesos moleculares, mientras que en eucariotas no fotosintéticos solamente se presentan las Mn-superóxido dismutasas de mayor peso molecular.

Contrariamente, en organismos fotosintéticos, tanto procarióticos como eucarióticos, las únicas Mn-superóxido dismutasas hasta ahora caracterizadas, de la bacteria *Rhodopseudomonas spheroides* (Lumsden y col., 1976) y la alga roja *Porphyridium cruentum* (Misra y Fridovich, 1977d), ambas enzimas pertenecen al grupo con entidades moleculares más pequeñas, y en esto se diferencian de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante, cuyo peso molecular, deter

minado por electroforesis en geles a distintas concentraciones de acrilamida, es de 94.000. Este peso molecular es del mismo orden -- que los determinados para las Mn-superóxido dismutasas de levadura (Ravindranath y Fridovich, 1975), hígado de rata (Salin y col., 1978) hígado humano (McCord y col., 1977c) y corazón bovino (Marklund, 1978).

La molécula de Mn-superóxido dismutasa de *Pisum sativum* está compuesta por cuatro subunidades de igual tamaño, aparentemente unidas por fuerzas no covalentes. En su estructura tetramérica la enzima es similar a las mangano superóxido dismutasas de: hígado de pollo (Weisiger y Fridovich, 1973a); mitocondrias de corazón bovino (Marklund 1978); hígado de rata (Salin y col., 1978), hígado humano (McCord y col., 1977c); levadura (Ravindranath y Fridovich, 1975); el hongo *Pleurotus olearius* (Lavelle y col., 1974; Lavelle y Michelson, 1975); y las bacterias *Thermus aquaticus* (Sato y Harris, 1977), *Thermus thermophilus* (Sato y Nakazawa, 1978) y, *Mycobacterium phlei* (Chikata y col., 1975). Por el contrario, en la familia de las Fe-superóxido dismutasas la única enzima tetramérica descrita es la de *Mycobacterium tuberculosis* (Kusunose y col., 1976b).

Las restantes mangano superóxido dismutasas hasta ahora caracterizadas están constituidas por dos subunidades, y se presentan en bacterias (Keele y col., 1970; Vance y col., 1972; Harris, 1977; Ichihara y col., 1977) entre las que se cuenta un organismo fotosintético (Lumsden y col., 1976), y también una alga roja (Misra y Fridovich, 1977d). La única excepción es la enzima de una especie de *Mycobacterium*, que parece ser un trímero, existiendo, no obstante, algunas dudas respecto a este particular (Kusunose y col., 1976a).

La manganeso superóxido dismutasa de *Pisum sativum* muestra una resistencia marcada a la disociación en subunidades con dodecil sulfato sódico (SDS). Únicamente después del calentamiento a 100°C en presencia de urea 8M, la enzima puede ser totalmente convertida en la forma monomérica. Otras superóxido dismutasas para las que también se ha descrito resistencia a la desnaturalización con SDS, son la Mn-superóxido dismutasa de una especie de *Mycobacterium* (Kusunose y col., 1976a), la Fe-superóxido dismutasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Kusunose y col., 1976b), y las cuprocinc dismutasas de eritrocitos bovinos (Keele y col., 1971) e hígado de pollo (Weisiger y Fridovich, --- 1973a).

La conversión total de la mangano superóxido dismutasa en monómeros de peso molecular 23.500, por tratamiento con urea 8M y SDS, está de acuerdo con la demostración por Bannister y col. (1978), y por Marmocchi y col. (1978), mediante experiencias de filtración por gel, de que Cu,Zn-superóxido dismutasas de diferentes orígenes se disocian en sus correspondientes monómeros en presencia de urea 8M.

Sin embargo, mientras los autores mencionados encontraron que los monómeros de estas enzimas eran catalíticamente activos, por el contrario, en la subunidad elemental de manganeso superóxido dismutasa de hoja de guisante no se detectó actividad SOD después del revelado enzimático de los geles de acrilamida-SDS.

Esta carencia de actividad superóxido dismutasa en la forma monomérica de la enzima contrasta con la situación descrita para una Cu,Zn-superóxido dismutasa de germen de trigo (isoenzima I) en la que se detectó actividad en las formas monomérica y dimérica de la enzima una vez separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS - (Marmocchi y col., 1974).

Un aspecto que todavía está por elucidar es la aparición sistemática de una posible forma dimérica, cuando la enzima se incubaba en presencia de urea 8M y 2-mercaptoetanol. Dejando a un lado la posibilidad de un artefacto derivado del método electroforético y/o -- los reactivos utilizados, una explicación de este hecho podría estar basada en la existencia de puentes disulfuro intracatenarios en el protómero enzimático disociado por acción de la urea 8M, y la ruptura posterior de estos puentes por el 2-mercaptoetanol, tal como ha sido sugerido por Weisiger y Fridovich (1973a) para la manganeso superóxido dismutasa de mitocondrias de hígado de pollo.

En estas condiciones, las subunidades serían menos compactas y, por lo tanto, menos móviles electroforéticamente, lo que produciría un incremento aparente en el peso molecular. Otra explicación para la formación del "dímero", podría ser la agregación de monómeros por interacciones entre los puentes disulfuro intracatenarios de una molécula de monómero y los restos sulfidrilos, producidos por reducción con mercaptoetanol, de otra molécula, resultando en la unión de dos protómeros por un puente disulfuro para formar un dímero. En cualquier caso, antes de que se pueda aceptar esta explicación son necesarias evidencias experimentales adicionales.

En las manganeso superóxido dismutasas, el átomo metálico está unido más firmemente que el cobre y el cinc en la familia de las Cu,Zn-superóxido dismutasas y, además, las formas apoenzimáticas de las mangano-enzimas son, en general, más inestables que las correspondientes a las Cu,Zn-superóxido dismutasas (Valentine y Pantoliano 1980). Así, en la manganoenzima de *Bacillus stearothermophilus* el --

átomo metálico parece estar compartido por las dos subunidades y, solamente es liberado, bajo condiciones que provocan la disociación de la estructura dimérica, como en presencia de urea 8M a pH 3,7 (Harris 1977). En este caso, la apoproteína forma un dímero estable en ausencia de manganeso y, la disociación del dímero, parece ser un paso esencial en la reconstitución de la Mn-enzima activa.

Sato y Harris (1977) han descrito idénticos resultados para la superóxido dismutasa aislada de una bacteria termófila más extrema (*Thermus aquaticus*). Esta dismutasa es tetramérica y contiene dos átomos de manganeso por molécula. La formación de la apoproteína tetramérica estable, así como la reconstitución de la mangano-enzima activa, tiene lugar en condiciones similares a las descritas para la superóxido dismutasa de *B. stearothermophilus* (Harris, 1977).

Por otra parte, Ose y Fridovich (1976) han llevado a cabo la eliminación reversible del manganeso de la superóxido dismutasa de *Escherichia coli*, consiguiendo la reconstitución de la Mn-enzima a un pH ácido (3,8), por adición de Mn(II) en presencia de un agente quelante de metales, la 8-hidroxiquinoleína, y cloruro de guanidina 2M, condiciones que permiten que el metal sea liberado de la enzima nativa.

Por lo tanto, parece lógico pensar, como ha afirmado Harris (1977), que en el sitio metálico de la Mn-superóxido dismutasa, el movimiento del metal fuera ó dentro del sitio activo sólo es posible a un pH bajo y en presencia de un agente caotrópico como el cloruro de guanidina ó la urea.

En la manganeso superóxido dismutasa de hojas de *Pisum sativum* solamente se demostró la presencia de un átomo-g de manganeso -

por tetrámero de peso molecular 94.000, no detectándose la presencia de hierro ni de cobre. Considerando que la movilidad electroforética de la enzima pura es idéntica a la de la Mn-superóxido dismutasa de los extractos crudos, no parece probable que se hayan producido pérdidas de parte del contenido en manganeso de la enzima, durante el proceso de purificación, aunque tampoco se puede descartar totalmente esta posibilidad, ya que Ose y Fridovich (1976) han encontrado -- que la Mn-superóxido dismutasa de *Escherichia coli* y su forma apoenzimática, poseen valores de  $R_f$  idénticos en electroforesis en geles de poliacrilamida. Por otro lado, también conviene indicar que las plantas de *Pisum sativum*, utilizadas en nuestro trabajo, fueron cultivadas en soluciones nutritivas conteniendo niveles óptimos de Mn, por lo que no cabe pensar en un contenido más bajo de este metal en la enzima como respuesta a limitaciones nutricionales en manganeso.

Por todo ello, y para corroborar la presencia de un sólo átomo de Mn por mol de enzima, se efectuó el ensayo de reconstitución del contenido en manganeso de la Mn-superóxido dismutasa pura de hojas de guisante, empleando el método antes mencionado debido a Ose y Fridovich (1976). En las condiciones drásticas empleadas, que posibilitan la liberación del metal de la enzima nativa, y en presencia de Mn(II), debería tener lugar la incorporación de los posibles restos metálicos que se hubieran perdido como consecuencia del proceso de purificación. Sin embargo, una vez finalizado el proceso de reconstitución, la actividad específica del preparado enzimático era prácticamente idéntica a la de la enzima nativa, manteniéndose igualmente constante la estequiometría Mn-proteína en ambos preparados. El rendimiento del proceso de reconstitución, en términos de concentración de proteína enzimática, fue de aproximadamente un 60%, mientras que los descritos para las Mn-superóxido dismutasas de *Escherichia coli*

(Ose y Fridovich, 1976) y de *Bacillus stearothermophilus* (Harris, 1977) fueron de un 97% y de un 33%, respectivamente.

Por lo tanto, sobre la base de los resultados mencionados, parece razonable concluir que la manganeso superóxido dismutasa de hojas de *Pisum sativum* contiene solamente un átomo de Mn por molécula, pudiendo descartarse la posibilidad de una pérdida de Mn durante el proceso de aislamiento.

Un átomo de manganeso por tetrámero de peso molecular 94.000, es una estequiometría poco usual para una manganeso superóxido dismutasa. Las enzimas de esta familia hasta el momento caracterizadas contienen tres tipos de estequiometrías diferentes: 1 átomo de Mn por dímero, 2 átomos por tetrámero y 4 átomos por tetrámero. En la primera categoría están clasificadas las Mn-superóxido dismutasas de distintas bacterias (Harris, 1977; Ichihara y col., 1977; Keele y col., 1970; Vance y col., 1972), incluido un organismo fotosintético (Lumsden y col., 1976) y también la de una alga eucariótica (Misra y Fridovich, 1977d).

Las manganeso superóxido dismutasas que contienen 2 átomos de Mn por tetrámero son las procedentes de bacterias y hongos (Sato y Nakazawa, 1978; Sato y Harris, 1977; Chikata y col., 1975; Lavelle y Michelson, 1975), de hígado de pollo (Weisiger y Fridovich, 1973a) y mitocondrias de corazón bovino (Marklund, 1978), mientras que las enzimas con 4 átomos de Mn por tetrámero están presentes en levaduras (Ravindranath y Fridovich, 1975) y en mamíferos (Salin y col., 1978; McCord y col., 1977c).

En la familia de las ferrosuperóxido dismutasas, enzimas fundamentalmente procariotas, se presentan tres tipos de estequiometría metal-proteína, con algunas modificaciones con relación a las que acabamos de indicar para las manganeso superóxido dismutasas: 1 átomo de Fe por dí-

mero; 2 átomos de Fe por dímero y 4 átomos de Fe por tetrámero. Las dos primeras categorías como se muestra en las tablas VI y VII de la Introducción se presentan en organismos procarióticos y en los únicos eucariotas en que hasta el momento se ha demostrado su presencia, la alga verde *Euglena gracilis* (Lengfelder y Elstner, 1979 ; Kanematsu y Asada, 1979) y la planta superior *Brassica campestris* (Salin y Bridges 1980), mientras que la estequiometría 4 Fe por tetrámero, solo se presenta en la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Kusunose y col., 1976b)

Sin embargo, hay que indicar la existencia de resultados contradictorios entre distintos autores respecto a los contenidos en Fe de enzimas procedentes de un mismo organismo, como es el caso de la ferrosuperóxido dismutasa de *Escherichia coli* donde se ha descrito la presencia de 1 y 2 átomos de Fe por dímero (Yost y Fridovich, 1973 ; Dougherty y col., 1978 ; Slykhouse y Fee, 1976) e igual ha sucedido con las Fe-dismutasas de las algas *Plectonema boryanum* (Asada y col., 1975; Misra y Keele, 1975), y *Euglena gracilis* (Kanematsu y Asada, 1979 ; Lengfelder y Elstner, 1979).

La razón de estas discrepancias podría residir, como han sugerido Lumsden y col. (1977) y Yamakura (1976), en eventuales pérdidas de Fe durante los procedimientos de aislamiento utilizados para estas ferrosuperóxido dismutasas, ó en las condiciones específicas de crecimiento de los organismos utilizados, particularmente por lo que a los niveles nutritivos de Fe se refiere.

Considerando las distintas estequiometrías metal-proteína de las Mn-superóxido dismutasa actualmente conocidas, puede ser significativo el hecho de que aquellas enzimas caracterizadas de organismos fotosintéticos, la bacteria *Thiodopseudomonas spheroides* (Lumsden y col., 1976) y la alga roja *Porphyridium cruentum* (Misra y Fridovich, 1977d), ambas

posean 1 átomo de Mn por dímero. Si se tiene en cuenta el incremento que tiene lugar en el peso molecular de ciertas proteínas de importancia filogenética, durante la transición desde etapas inferiores a superiores en la escala evolutiva, como es el caso de las ferredoxinas (De la Torre, 1977), no resulta extraño que la manganeso superóxido - dismutasa de una planta superior, descrita en este trabajo, tenga una estequiometría de 1 átomo de Mn por tetrámero nativo.

La composición en aminoácidos de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante muestra, al igual que la mayoría de las superóxido - dismutasa pertenecientes a esta familia, un predominio de los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico sobre los aminoácidos básicos, - lo que por otra parte se traduce en el valor ácido determinado para el punto isoelectrónico de esta Mn-superóxido dismutasa, de 5,4. En la Tabla XXIV se presentan las composiciones en aminoácidos de Mn-superóxido -- dismutasas procedentes de organismos en distintos estadios de la escala filogenética. Dada la heterogeneidad de los pesos moleculares enzimáticos, y teniendo en cuenta el tamaño molecular similar de las subunidades de las distintas Mn-superóxido dismutasas, se han expresado los resultados, con fines comparativos, en forma de número de restos ó moles de aminoácidos por mol de subunidad.

Como se puede observar en la Tabla XXIV, la Mn-superóxido dismutasa de guisante presenta la importante diferencia con relación a las demás superóxido dismutasas de esta familia, de carecer del aminoácido triptófano. En este aspecto, como se puede ver en la Tabla XXV, la enzima de hojas de guisante se parece a las Cu, Zn-superóxido dismutasas, a pesar de existir importantes diferencias entre estas familias enzimáticas, como es la ausencia de tirosina en las Cu, Zn-superóxido dismutasas y las variaciones significativas en los contenidos de otros aminoácidos

aunque también hay que tener en cuenta el menor peso molecular de esta clase de dismutasas, en comparación con la mangano enzima de guisante, lo que tiende a acentuar estas diferencias.

Aparte de la ausencia de triptófano, los contenidos en los restantes aminoácidos de la Mn-enzima de guisante, están comprendidos dentro del rango de concentraciones presentes en estas Mn-dismutasa con la excepción de los aminoácidos serina y glicocola que están ligeramente por encima y por debajo, respectivamente, de los niveles medios descritos para las Mn-superóxido dismutasas.

De la observación de los datos enunciados en la Tabla XXIV se desprende que el organismo cuya Mn-superóxido dismutasa presenta mayor analogía en su contenido en aminoácidos con la enzima de hojas de guisante es un mamífero (la rata), seguido por las bacterias *E. coli*, *Th. spheroides* y *Th. thermophilus*, y los organismos eucarióticos *Sacharomyces cerevisiae* e hígado humano, que muestran todos ellos órdenes de semejanza similares.

Con respecto a los dos organismos fotosintéticos mostrados en la tabla XXIV, la bacteria *Rhodospseudomonas spheroides* y el alga roja *Porphyridium cruentum*, la Mn-superóxido dismutasa de guisante muestra frente al primer organismo sensibles diferencias en el contenido en los aminoácidos isoleucina, glicocola, leucina y treonina, diferencias que, en el caso del alga roja, además de en los tres primeros aminoácidos citados, también se observan en los contenidos de ácido glutámico, lisina, serina, valina, tirosina y semi-cistina, aminoácido éste que está ausente de la enzima.

Comparativamente, la Mn-superóxido dismutasa de guisante, a excepción de su carencia de triptófano, muestra mayores analogías en su composición en aminoácidos con las ferrosuperóxido dismutasas que con la familia de las Cu,Zn-superóxido dismutasas, antes mencionadas, como se puede

TABLA XXIV. COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE MANGANESO SUPEROXIDO DISMUTASA DE DISTINTOS ORIGENES

Aminoácido	E. coli <sup>a</sup>	T. thermophilus <sup>b</sup>	Rh. sphaerooides <sup>c</sup>	Porphy. cruentum <sup>d</sup>	S. cerevisiae <sup>e</sup>	Bisum sativum <sup>f</sup>	Hígado rata	Hígado humano
n°restos/subunidad								
Lisina	14	12	15	8	19	15	18	15
Histidina	6	8	8	8	7	7	8	9
Arginina	5	5	3	6	4	5	6	5
A. aspártico	21	16	19	20	28	19	21	23
Treonina	9	7	8	13	11	12	10	5
Serina	11	3	11	9	8	14	12	6
A. glutámico	18	20	22	11	28	21	24	22
Prolina	7	12	7	8	10	10	12	10
Glicocola	13	16	19	16	19	12	21	19
Alanina	23	18	18	18	21	20	17	17
1/2-cistina	-	0	2	0	1	3	3	3
Valina	10	12	12	11	14	15	14	11
Metionina	1	3	4	2	1	2	3	3
Isoleucina	7	6	5	7	12	13	12	9
Leucina	19	20	15	12	20	20	21	16
Tirosina	6	9	7	5	9	9	8	7
Fenilalanina	9	8	10	6	11	7	7	5
Triptófano	-	6	4	3	6	0	6	5

<sup>a</sup>Keele y col. (197); <sup>b</sup>Sato y Nakasawa (1978); <sup>c</sup>Lumsden y col. (1976); <sup>d</sup>Misra y Fridovich (1977d);  
<sup>e</sup>Ravindranath y Fridovich (1975); <sup>f</sup>Resultados nuestros; <sup>g</sup>Salin y col. (1978); <sup>h</sup>McCord y col. (1977c).

TABLA XXV. COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE CUPROCI NC SUPEROXIDO DISMUTASA DE DISTINTOS ORIGENES

Aminoácido	Semilla de trigo (1) <sup>a</sup>	Semilla de guisante <sup>b</sup>	Hojas de espinaca <sup>c</sup>	Eritrocitos bovinos <sup>d</sup>	Eritrocitos humanos <sup>e</sup>	Hígado de cerdo <sup>f</sup>
	n° restos/subunidad					
Lisina	5	5	6	10	11	10
Histidina	9	9	7	8	8	9
Arginina	4	3	3	4	4	4
A. aspártico	14	22	17	17	18	15
Treonina	16	15	14	12	8	7
Serina	7	7	5	8	10	9
A. glutámico	10	10	10	11	13	15
Prolina	9	7	8	6	5	4
Glicocola	27	28	21	25	26	24
Alanina	14	10	11	9	10	10
1/2-cistina	3	3	2	3	3	2
Valina	15	11	14	15	14	14
Metionina	1	0	1	1	0	1
Isoleucina	6	10	3	9	8	6
Leucina	11	10	11	8	9	7
Tirosina	0	0	0	1	0	1
Fenilalanina	3	4	3	4	4	3
Triptófano	-	0	0	0	2	0

<sup>a</sup>Beauchamp y Fridovich (1973); <sup>b</sup>Sawada y col. (1972); <sup>c</sup>Asada y col. (1973);

<sup>d</sup>Steinman y col. (1974); <sup>e</sup>Bannister y col. (1977); <sup>f</sup>Bartkowiak y col. (1979).

TABLA XXVI. COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE FERRO SUPEROXIDO DISMUTASAS DE DISTINTOS ORIGENES

Aminoácido	Desul. de-sulfuricans <sup>a</sup>	Th. denitrificans <sup>b</sup>	Chromatium vinosum <sup>c</sup>	Escherichia coli <sup>d</sup>	Plectonema boryanum <sup>e</sup>	Euglena gracilis <sup>f</sup>	Brassica campestris <sup>g</sup>
	n°restos/subunidad						
Lisina	16	14	8	10	12	4	11
Histidina	5	9	4	6	5	7	4
Arginina	4	4	2	4	1	10	5
A. aspártico	27	22	23	22	23	19	22
Treonina	12	12	11	13	10	11	13
Serina	7	10	16	10	9	5	10
A. glutámico	18	13	19	16	16	22	16
Prolina	8	8	7	9	10	13	10
Glicocola	19	15	13	16	15	20	16
Alanina	22	20	21	26	24	26	17
1/2-cistina	2	-	1	1	1	5	2
Valina	8	9	14	11	11	11	11
Metionina	2	3	2	0	2	3	1
Isoleucina	7	5	8	8	2	6	6
Leucina	15	14	16	14	17	16	14
Tirosina	8	6	9	6	5	7	6
Fenilalanina	12	10	8	10	12	10	7
Triptófano	6	6	6	4	5	8	4

<sup>a</sup>Hatchikian y Henry (1977); <sup>b</sup>Baldensperger (1978); <sup>c</sup>Kanematsu y Asada (1978a); <sup>d</sup>Yost y Fridovich (1973); <sup>e</sup>Asada y col. (1975); <sup>f</sup>Kanematsu y Asada (1979); <sup>g</sup>Salin y Bridges (1980).

ver en la Tabla XXVI. De entre las ferrosuperóxido dismutasas, las que parecen mostrar mayores semejanzas en su contenido en aminoácidos con la Mn-enzima de guisante, son las procedentes de la bacteria anaerobia fotosintética *Chromatium vinosum* (Kanematsu y Asada, 1978a) y de hojas de la planta superior *Brassica campestris* (Salin y Bridges, 1980).

En la tabla XXVII se presenta la estabilidad a temperaturas de -60-70°C, de distintas superóxido dismutasas hasta la fecha estudiadas. La Mn-superóxido dismutasa de guisante, aunque no es tan resistente frente a la temperatura como las Mn-superóxido dismutasas de las bacterias termófilas *Thermus aquaticus* (Sato y Harris, 1977), y *Bacillus stearothermophilus* (Bridgen y col., 1975), que son capaces de soportar temperaturas de 95°C y 70°C sin pérdidas sensibles de actividad, es relativamente termoestable, superando en esta propiedad a las enzimas de *Pleurotus olearius* (Lavelle y col., 1974) y *Thiodopseudomonas spheroides* (Lumsden y Hall, 1976). En su resistencia frente a la temperatura, la Mn-enzima de guisante es análoga a la ferro-superóxido dismutasa de *Photobacterium leiognathi* (Puget y Michelson, 1974b), e incluso más estable que una Cu,Zn-superóxido dismutasa, de hígado de rata (Salin y col., 1978), enzimas que en general, son bastante termoestables.

Mientras que a 50°C la Mn-superóxido dismutasa de guisante muestra un perfil de inactivación bifásico, a 60°C y 80°C el proceso de inactivación enzimática es exponencial, como se deduce de las representaciones de los logaritmos de las actividades correspondientes, y en cualquier caso, la inactivación térmica no parece conllevar el desdoblamiento de la molécula enzimática ni su disociación en subunidades, toda vez que la movilidad electroforética en poliacrilamida de la enzima desnaturalizada es idéntica a la de la Mn-superóxido dismutasa nativa.

Por otra parte, la enzima es estable a bajas temperaturas, mantenién

TABLA 27. Vida media de distintas superóxido dismutasas después del calentamiento a 60-70°C.

Superóxido dismutasa	Temperatura (°C)	Vida media (mh)
Cu,Zn-SOD de hígado de cerdo <sup>a</sup>	70	50
Cu,Zn-SOD de hígado de rata <sup>b</sup>	70	16
Cu,Zn-SOD de <i>Photobacterium leiognathi</i> <sup>c</sup>	60	120
Fe-SOD de <i>Chromatium vinosum</i> <sup>d</sup>	60	60
Fe-SOD de <i>Photobacterium leiognathi</i> <sup>e</sup>	60	40
Fe-SOD de <i>Photobacterium sepia</i> <sup>f</sup>	60	10
Fe-SOD de <i>Euglena gracilis</i> <sup>g</sup>	60	17
Fe-SOS de <i>Spirulina platensis</i> <sup>h</sup>	60	60
Mn-SOD de <i>Pleurotus olearius</i> <sup>i</sup>	60	20
Mn-SOD de <i>Rhodopseudomonas spheroides</i> <sup>j</sup>	70	13
Mn-SOD de <i>Pisum sativum</i> <sup>k</sup>	60	33

<sup>a</sup>Bartkowiak y col. (1979); <sup>b</sup>Reiss y Gershon (1976); <sup>c</sup>Puget y Michelson (1946); <sup>d</sup>Kanematsu y Asada (1978a); <sup>e</sup>Puget y Michelson (1974a); <sup>f</sup>Puget y Michelson (1974b); <sup>g</sup>Kanematsu y Asada (1979); <sup>h</sup>Lumsden y col. (1976); <sup>i</sup>Lavelles y col. (1974); <sup>j</sup>Lumsden y col. (1976); <sup>k</sup>Resultados nuestros.

dose aproximadamente un 80% de la actividad inicial después de una permanencia de 4 meses a temperaturas de  $-18^{\circ}\text{C}$  y de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Por lo que se refiere al efecto del pH sobre la estabilidad enzimática, la mangano enzima de guisante se comporta de una manera análoga a los tres tipos de superóxido dismutasas, la mayoría de las cuales son lábiles a valores de pH inferiores a 5, siendo en cambio bastante estables en medio alcalino. A pH 4 la Mn-superóxido dismutasa se inactiva casi instantáneamente, permaneciendo en cambio su actividad prácticamente inalterada a valores de pH comprendidos entre 7,5-10, después de 24 horas a temperatura ambiente. A estos pH alcalinos se observa un posible efecto sobre la actividad Mn-superóxido dismutasa, de los buffers empleados en el ensayo, ya que dicha actividad se incrementa, para valores similares de pH, conforme se progresa de los buffers fosfato, a los Tris-HCl, y de éstos a los sistemas glicina-NaOH donde las actividades medidas son máximas.

Aunque no se han llevado a cabo estudios detallados sobre los valores óptimos de pH para la acción de las superóxido dismutasas, en general, como han demostrado Forman y Fridovich (1973b), las cuprocinc superóxido dismutasas muestran la misma actividad enzimática a pH<sub>s</sub> de reacción comprendidos entre 7,8-10,2, mientras que, en condiciones similares, tanto las ferro como las mangano superóxido dismutasas sufren una disminución progresiva de actividad en la zona alcalina.

Este mismo comportamiento es aplicable a la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante, cuyo pH óptimo es de aproximadamente 8,6, observándose para valores superiores de pH un decaimiento de la actividad enzimática. Los pocos datos existentes en la literatura acerca de valores óp

timos de pH para la acción de estas enzimas son próximos al encontrado para la Mn-enzima de guisante, con la excepción de la Mn-dismutasa de *Pleurotus olearius* (Lavelle y col., 1974) que presenta su mayor eficacia a pH 10. Así, la cuprocinc superóxido dismutasa y la ferro superóxido dismutasa de *Photobacterium leiognathi* presentan ambas -- sus óptimo de actividad a pH 9 (Puget y Michelson, 1974a, 1974b), y para la cuprocinc superóxido dismutasa de hígado de rata se ha descrito un pH óptimo de 8 (Reiss y Gershon, 1976).

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que los valores de pH óptimo de todas las superóxido dismutasas que acabamos de mencionar, están determinados utilizando métodos indirectos basados en la competición por el  $O_2^{\cdot -}$  entre la superóxido dismutasa y un segundo -- acceptor del radical (citocromo c, NBT, luminol, etc), y es posible -- que si se utilizasen técnicas de pulsos electrónicos para generar  $O_2^{\cdot -}$  con las que se puede seguir la concentración de sustrato, los valores de pH óptimo que entonces se obtuviesen fueran distintos a los -- mencionados. Mientras tanto, conviene considerar todos estos datos -- indicados como provisionales, en términos absolutos, en tanto en cuanto no se lleven a cabo determinaciones finas del efecto de pequeñas variaciones del pH sobre la velocidad de reacción utilizando técnicas directas más sofisticadas.

Idénticas reservas, a las que acabamos de indicar, son también aplicables a los resultados obtenidos respecto a la temperatura óptima para la reacción de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante, ya que se ha utilizado el mismo método indirecto para la estimación de la actividad enzimática. A temperaturas de 4°C la Mn-superóxido dismutasa muestra una actividad considerable, casi del mismo

orden que a 25°C, lo que era de esperar teniendo en cuenta la gran eficiencia catalítica de estas enzimas, que hace que en su reacción con los radicales superóxido funcionen casi en el límite de difusión y, como sucede en procesos de estas características, la energía de activación requerida para la reacción es muy pequeña (Klug y col., 1972).

En la Tabla 28 se indican los valores de las constantes de velocidad de segundo orden para la dismutación del superóxido por distintos tipos de superóxido dismutasas, a 25°C y pH 7,8 determinados utilizando métodos directos e indirectos. En nuestro caso, aunque estos valores de pH y temperatura no corresponden a las condiciones óptimas de actuación de la enzima, se han utilizado para la determinación de la constante de velocidad con el fin de comparar su valor con el de otras superóxido dismutasas, estudiadas en esas condiciones.

Como se deduce de los datos presentados en la Tabla 28, la Mn-superóxido dismutasa de guisante en su reacción de desproporcionamiento de los radicales  $O_2^{\cdot -}$  tiene una constante de velocidad aparente de  $1,61 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , y en su eficiencia catalítica es equiparable, en términos generales, a las superóxido dismutasas que hasta ahora han sido caracterizadas.

Su constante de velocidad es idéntica a la descrita para las Fe-superóxido dismutasas de *E. coli* (Forman y Fridovich, 1973b) y del alga verde-azulada *Spirulina platensis* (Lumsden y col., 1976) y del mismo orden que las constantes determinadas para las Mn-superóxido dismutasas de *E. coli* (Forman y Fridovich, 1973b) y de la bacteria fotosintética no sulfurada *Rhodospirillum rubrum* (Lumsden y col., 1976).

TABLA XXVIII. Actividad catalítica de distintas superóxido dismutasas a 25°C y a pH 7,8.

Enzima	Constante de velocidad $\times 10^{-9}$ ( $M^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$ )	Método utilizado	Referencia
Cu,Zn-SOD de eritrocitos bovinos	2,00	radiolisis de pulsos	Klug y col. (1972)
Cu,Zn-SOD de eritrocitos bovinos	1,90	competición cinética	Forman y Fridovich (1973b)
Fe-SOD de <i>E. coli</i>	1,60	competición cinética	Forman y Fridovich (1973b)
Fe-SOD de <i>Ph. leiognathi</i>	0,55	radiolisis de pulsos	Lavelle y col. (1977)
Fe-SOD de <i>Chromatium vinosum</i>	2,40	competición cinética	Kanematsu y Asada (1978a)
Fe-SOD de <i>Spirulina platensis</i>	1,60	competición cinética	Lumsden y col. (1976)
Mn-SOD de <i>B. stearothermophilus</i>	0,60	radiolisis de pulsos	McAdam y col. (1977b)
Mn-SOD de <i>Rh. spheroides</i>	1,72	competición cinética	Lumsden y col. (1976)
Mn-SOD de <i>E. coli</i>	1,80	competición cinética	Forman y Fridovich (1973b)
Mn-SOD de hígado de pollo	4,70	competición cinética	Forman y Fridovich (1973b)
Mn-SOD de <i>Pisum sativum</i>	1,61	competición cinética	Resultados nuestros

En todos los métodos de competición cinética se utilizó el citocromo c como detector de superóxido, realizándose las reacciones en condiciones standard.

Es digno de destacar el hecho de que, en estos casos mencionados, tanto la Mn-SOD de guisante como las otras superóxido dismutasas todas contienen 1 átomo metálico por molécula enzimática, mientras que en aquellas otras dismutasas de mayor eficiencia catalítica, como la Mn-enzima de hígado de pollo (Forman y Fridovich, 1973b), la Fe-dismutasa de *Chromatium vinosum* (Kanematsu y Asada, 1978a) y la Cu,Zn-superóxido dismutasa de eritrocitos bovinos (Forman y Fridovich 1973b), el contenido metálico por molécula es de dos átomos de Mn, dos átomos de Fe y dos átomos de Cu y Zn, respectivamente.

Esto parece sugerir la existencia de una relación entre la actividad catalítica de las tres familias de superóxido dismutasa y el número de átomos metálicos presentes en sus moléculas, idea que parece coherente con el mecanismo de acción de estas enzimas que implica la reducción y reoxidación alternativa del metal de la enzima ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$  ó  $\text{Fe}^{3+}$ ) durante sus sucesivos encuentros con los radicales  $\text{O}_2^-$  (Fridovich, 1978a).

Como ya indicamos anteriormente, al discutir el pH y la temperatura óptima de la enzima, el carácter indirecto del método de competición cinética empleado para el cálculo de la constante de velocidad, obliga a considerar con reservas, en términos absolutos, los valores obtenidos para dichas constantes, si bien este método es de utilidad para establecer comparaciones con los resultados obtenidos para otras superóxido dismutasas, empleando idéntica metodología.

Por otra parte, el hecho de que en la Cu,Zn-superóxido dismutasa de eritrocitos bovinos el valor de la constante de velocidad determinada por el método de competición cinética (Forman y Fridovich, 1973b) sea idéntico al obtenido por radiolisis de pulsos, confiere cierta fiabilidad a este método, el cual resulta muy conveniente ---

cuando no se tiene acceso a metodologías directas tan complejas y - costosas como la radiolisis de pulsos.

Mientras que las Cu,Zn-superóxido dismutasas resultan inhibi das por el  $\text{CN}^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Beauchamp y Fridovich, 1973), la Mn-supe róxido dismutasa de guisante es insensible frente a estos inhibido res a concentraciones de 2 mM y 0,5 mM, respectivamente. En su re-- sistencia frente al peróxido de hidrógeno la Mn-enzima de guisante se comporta como las superóxido dismutasas análogas de *Spirulina pla tensis* (Lumsden y col., 1976), *Pleurotus olearius* (Lavelle y Michel son, 1975), *Bacillus stearothermophilus* (McAdam y col., 1977b) y -- *Porphyridium cruentum* (Misra y Fridovich, 1977d).

Precisamente, este comportamiento frente al  $\text{H}_2\text{O}_2$  se ha utili zado como criterio para diferenciar las Mn-superóxido dismutasas de las Fe-superóxido dismutasas en extractos crudos (Asada y col., 1975), debido a la inactivación de estas últimas por el peróxido de hidróge no, como se ha demostrado en las Fe-superóxido dismutasas de *Plecto nema boryanum* (Asada y col., 1975), *Rhodopseudomonas spheroides* --- (Lumsden y col., 1976), *Photobacterium leiognathi* (Lavelle y col., 1977), *Chromatium vinosum* (Kanematsu y Asada, 1978a), *Chlorobium -- thiosulfatophilum* (Kanematsu y Asada, 1979), *Brassica campestris* -- (Salin y Bridges, 1980) y *Euglena gracilis* (Kanematsu y Asada, 1979).

Esta inhibición de las ferro-superóxido dismutasas por el --  $\text{H}_2\text{O}_2$  podría deberse, como han sugerido Lavelle y col. (1977), a la reacción del peróxido de hidrógeno con la forma reducida de la enzi ma, para producir un intermediario reactivo capaz de atacar a algu nos aminoácidos esenciales de la molécula.

El tratamiento de la Mn-superóxido dismutasa de guisante con

p-hidroxicloromercuribenzoato (PHMB), un inhibidor típico de grupos -SH, resulta en una inhibición casi total de la actividad enzimática a una concentración 1 mM en este inhibidor, si bien la enzima es resistente a una concentración de 0,1 mM. Por el contrario, la ferro superóxido dismutasa de *Plectonema boryanum* es insensible frente al PHMB a una concentración 1 mM (Asada y col., 1975), mientras que la cuprocinc superóxido dismutasa de hojas de espinaca, en estas condiciones, experimenta una inhibición de un 35% (Asada y col., 1974).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas dos superóxido dismutasas mencionadas, tienen dos y cuatro restos de  $\frac{1}{2}$  - cistina por mol de enzima, respectivamente (Asada y col., 1975; Asada y col., 1973), mientras que en la Mn-superóxido dismutasa de guisante están presentes 13 restos de  $\frac{1}{2}$  - cistina por mol de enzima.

Brock y Walker (1980) han postulado que en la Mn-superóxido dismutasa de *Bacillus stearothermophilus*, al igual que en todas las Cu,Zn-superóxido dismutasas caracterizadas, el Mn(III) de la enzima está ligado a cuatro restos de histidina, no estando implicados restos -SH en el mecanismo catalítico. Si esta situación fuera aplicable a la Mn-superóxido dismutasa de guisante, la fuerte inhibición producida por el PHMB podría ser interpretada como debida a un cambio conformacional provocado en la molécula, por reacción con alguno de los numerosos restos de semi-cistina, presentes en esta enzima, y que podría afectar notablemente a su acción catalítica.

La azida sódica también inhibe sensiblemente la actividad de la Mn-enzima de guisante, alcanzando tasas de más del 60% para concentraciones de azida de 35 mM. Misra y Fridovich (1978) han demostrado que las Fe-superóxido dismutasas son más sensibles a la inhibición por azida que las correspondientes enzimas conteniendo manganeso, mientras que las cuprocinc superóxido dismutasas son las me--

nos sensibles. Estos autores utilizando varias Cu,Zn-superóxido dismutasas (de eritrocitos bovinos, hígado humano y de pollo), Mn-superóxido dismutasas (de *E. coli*, *Plectonema boryanum* e hígado humano) y Fe-superóxido dismutasas (de *E. coli* y *Plectonema boryanum*), demostraron que a pH 7,8, la azida, a una concentración 10 mM, inhibía a las Cu,Zn Mn y Fe-enzimas en aproximadamente un 10%, 30% y 73% respectivamente, lo que les impulsó a proponer la sensibilidad a la azida como criterio para distinguir las tres clases de enzimas.

En las mismas condiciones descritas por Misra y Fridovich -- (1978) nosotros hemos encontrado que concentraciones 10 mM de azida producen una inhibición de aproximadamente un 38% en la actividad de la Mn-superóxido dismutasa de guisante, resultado casi idéntico al descrito para las Mn-enzimas de *Porphyridium cruentum* (Misra y Fridovich, 1977d) y *Bacillus stearothermophilus* (Bridgen y col., -- 1975).

Por otra parte, Kanematsu y Asada (1979) han informado que las ferrosuperóxido dismutasas de *Chlorobium thiosulfatophilum*, *Chromatium vinosum*, *Plectonema boryanum* y *Pseudomonas ovalis*, todas resultan inhibidas entre un 67-77% por azida 10 mM a pH 7,8, en tanto que la manganeso superóxido dismutasa de *Plectonema boryanum* sólo era deprimida en un 28%. Por lo tanto, parece ser que, en líneas generales, el comportamiento de la manganeso superóxido dismutasa de guisante frente a la inhibición por azida coincide con los datos -- existentes en la literatura para otras Mn-superóxido dismutasas.

Los otros agentes formadores de complejos metálicos ensayados con la Mn-superóxido dismutasa de guisante, la o-fenantrolina, el EDTA y el dietilditiocarbamato (DIECA), todos reprimen ligeramente la actividad enzimática, en intensidad decreciente del primero --

al último. La o-fenantrolina, a una concentración 1 mM, produce una inhibición de un 25% en la Mn-enzima de guisante, mientras que en la Cu,Zn-superóxido dismutasa de hojas de espinaca se ha observado una inhibición de un 38% en su actividad (Asada y col., 1974).

En la familia de las ferro-superóxido dismutasas, mientras que en la enzima de *Photobacterium leiognathi* no se ha detectado ningún efecto inhibitorio por o-fenantrolina 1 mM (Puget y Michelson, 1974a), en la Fe-enzima de *Plectonema boryanum* se ha observado una inhibición de un 58% por este compuesto (Asada y col., 1975). Este hecho pone de manifiesto la latitud de variación estructural previsible dentro de cada clase de superóxido dismutasa, al igual que sucede con otras enzimas.

Sin embargo, el efecto inhibitorio de la o-fenantrolina podría explicarse, de alguna manera, por las constantes de estabilidad de los complejos formados por este compuesto con los metales de las tres familias de enzimas, ya que mientras los cationes de cobre cinc y hierro tienen constantes de estabilidad similares, la del complejo del Mn y la o-fenantrolina es aproximadamente 1,6 veces menor (Dawson y col., 1969).

La Mn-superóxido dismutasa de guisante es sensible a la acción del agente quelante EDTA, alcanzándose una disminución en su actividad de un 34% a una concentración 2 mM en EDTA. Aunque en la Fe-superóxido dismutasa de *Photobacterium leiognathi* (Puget y Michelson, 1974a) no se demostró inhibición alguna por este quelante, en cambio, se ha descrito recientemente la inhibición por EDTA de la ferro dismutasa de la bacteria anaerobia facultativa *Propionibacterium shermanii* (Meier y Schwartz, 1980), si bien no se ha especificado su orden de magnitud.

En cualquier caso el efecto del EDTA sobre la manganeso ó fe rro superóxido dismutasa es comprensible dentro de los condiciona-- mientos estructurales de cada enzima, al igual que comentamos en el caso de la o-fenantrolina, sobre la base de la constante de estabi-- lidad de los complejos EDTA-Mn ó EDTA-Fe, que es máxima entre valo-- res de pH 7-9 para el manganeso y de 6,3-7 para el Fe (Ringbom, 1963).

Consideraciones similares de competición residual por el man ganeso, pueden aplicarse a la ligera inhibición producida en la ac-- tividad Mn-superóxido dismutasa de guisante, por el agente comple-- jante de Cu(II) dietilditiocarbamato (DIECA), un potente inhibidor de las cuprocinc superóxido dismutasas. Esta inhibición es del or-- den de un 24% para una concentración 10 mM en DIECA, mientras que, - en análogas condiciones de ensayo, la actividad de la cuprocinc su-- peróxido dismutasa de hojas de espinaca resulta inhibida en un 68% (Asada y col., 1974), llegándose incluso a la supresión total de la actividad en distintas Cu,Zn-superóxido dismutasas de origen animal, tanto *in vitro* como *in vivo*, por acción de este inhibidor (Heikkila y Cohen, 1977).

Como se ha indicado en la Introducción de esta Memoria Docto-- ral, las Cu,Zn-superóxido dismutasas son enzimas eucariotas, con la única excepción de la dismutasa procedente de *Photobacterium leiog-- nathi* (Puget y Michelson, 1974b), y en las células animales tienen una localización fundamentalmente citoplasmática, aunque también se ha descrito su presencia en el espacio intermembranoso mitocondrial (Weisiger y Fridovich, 1973b; Panchenko y col., 1975). En organis-- mos eucarióticos fotosintéticos, las Cu,Zn-superóxido dismutasas se presentan en las plantas terrestres más primitivas, helechos y mus-- gos, y en las plantas de semilla, estando la mayor parte de la enzi

ma ubicada en los cloroplastos, principalmente en el estroma, aunque también está presente, en una proporción menor en los tilacoides (Jackson y col., 1978; Asada y col., 1973).

Las ferro superóxido dismutasas de bacterias no fotosintéticas se encuentran localizadas en la matriz celular (Britton y Fridovich, 1977). En organismos fotosintéticos Okada y col. (1979), utilizando las algas verde-azuladas *Plectonema boryanum*, *Anabaena variabilis* y *Anacystis nidulans*, identificaron la presencia de Fe-superóxido dismutasas solamente en el citosol, mientras que en la alga verde *Euglena gracilis* y en la planta superior *Brassica campestris* estas enzimas se han encontrado en el espacio estromático de los cloroplastos (Kanematsu y Asada, 1979; Salin y Bridges, 1980).

Por lo que se refiere a la familia de las Mn-superóxido dismutasas bacterianas (no fotosintéticas), al igual que sucede con las ferro dismutasas, estas enzimas parecen estar localizadas en la matriz celular (Britton y Fridovich, 1977). En los organismos eucarióticos no fotosintéticos no parecen existir dudas respecto a su "locus" celular, el cual está claramente identificado como la matriz mitocondrial, aunque en el mono *Papio ursinus* McCord y col. (1977c) encontraron que la Mn-superóxido dismutasa, sorprendentemente, también estaba presente en el citoplasma, donde incluso era más abundante que en las propias mitocondrias.

Una situación muy distinta es la que se presenta en las mangano enzimas de eucariotas fotosintéticos, las únicas hasta ahora estudiadas en este aspecto, donde existen bastantes discrepancias en torno a su ubicación celular. Únicamente parece existir acuerdo general, por el momento, respecto a su presencia en la matriz mitocondrial, como han demostrado Arron y col. (1976) y Giannopolitis y Ries (1977a) en *Helianthus tuberosus* y *Zea mays*, respectivamente, -

si bien las Mn-dismutasas correspondientes fueron identificadas mediante el empleo de inhibidores ( $\text{CN}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y todavía no han sido purificadas y caracterizadas. Adicionalmente, en *Spinacia oleracea* también se ha descrito la presencia en la matriz mitocondrial de -- una superóxido dismutasa insensible al cianuro, aunque los auto --- res no se han pronunciado respecto a su pertenencia a la familia de las manganeso ó de las ferro superóxido dismutasas (Jackson y col., 1978).

Lumsden y Hall (1974) postularon la presencia en lamelas de cloroplastos de espinacas, de una superóxido dismutasa resistente - al cianuro (posiblemente una Mn-superóxido dismutasa), evidencia -- que fue rebatida por Elstner y Heupel (1975) utilizando métodos di- ferentes de aislamiento de partículas subcloroplastídicas y de deter- minación enzimática. Estos investigadores, después de un minucioso estudio de la metodología empleada por Lumsden y Hall, llegaron a - la conclusión de que la actividad "manganeso superóxido dismutasa", por ellos descrita en lamelas de cloroplastos, era irreal y se de- bía a un artefacto derivado del procedimiento de aislamiento utili- zado, basado en la extracción con dodecilsulfato sódico.

Posteriormente, se procedió a una revisión de la localización celular de la actividad "Mn-superóxido dismutasa" utilizando tres - plantas de tipo  $\text{C}_3$ , incluyendo espinacas, con la deducción de que - la posible Mn-SOD estaba realmente localizada en la parte externa - de los cloroplastos, en donde podría haber sido adsorbida inespecí- ficamente durante el proceso de aislamiento de éstos (Jackson y col., 1978; Foyer y Hall, 1980).

A pesar de todo esto, la polémica respecto a la posible pre- sencia de una Mn-superóxido dismutasa en cloroplastos todavía conti

nua. Asada y col. (1980) siguen manteniendo en apoyo de los resultados de Lumsden y Hall (1974), la presencia de esta enzima en lamelas de cloroplastos de espinaca, e incluso han aportado resultados que demuestran la ubicación de una posible "Mn-superóxido dismutasa" en tilacoides de las algas verde-azuladas *Plectonema boryanum*, *Anabaena variabilis* y *Anacystis nidulans* (Okada y col., 1979), y en los de la alga verde *Euglena gracilis* (Kanematsu y Asada, 1979).

Por otra parte, recientemente se ha detectado actividad "Mn-SOD" asociada a complejos de alto peso molecular Mn-proteína-pigmentos, posiblemente relacionados con el FSII, procedentes de los organismos fotosintéticos *Dunaliella tertiolecta* y *Phaeodactylum tricornutum* (Foyer y Hall, 1980) y estos mismos autores también han identificado actividad "Mn-SOD" residual en un complejo Mn-proteína-LHC ("light-harvesting chlorophyll a/b") de elevado peso molecular, presente en la estructura interna tilacoidal de cloroplastos de espinaca.

En consecuencia, considerando todos los datos expuestos, parece obligado suponer que la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante debe estar principalmente ubicada a nivel de mitocondrias ó cloroplastos. En experiencias realizadas en nuestro laboratorio utilizando extractos crudos de semillas de guisante en germinación y raíces no noduladas de esta planta, hemos detectado la presencia de tres superóxido dismutasas -una resistente al  $CN^-$  y dos sensibles a este inhibidor- cuyas movilidades electroforéticas en geles de acrilamida son idénticas a las de las dismutasas presentes en hojas de esta misma planta.

En un primer examen de estos resultados, y a falta de un obligado estudio más exhaustivo, el hecho de encontrar en tejidos no fotosintéticos de guisante un zimograma de superóxido dismutasas similar al de las hojas

de esta planta superior, induce a pensar ó en una ubicación preferentemente mitocondrial para la Mn-superóxido dismutasa, ó en la presencia de la misma enzima en cloroplastos y mitocondrias; dejando aparte, obviamente, la posibilidad de que ambas Mn-enzimas sean realmente diferentes a pesar de poseer idénticas propiedades electroforéticas.

Sin embargo, teniendo en cuenta la controversia actualmente existente sobre la localización cloroplastídica de la Mn-superóxido dismutasa de plantas superiores, sería enteramente especulativo pronunciarse por una adscripción celular determinada para la enzima, por lo que es necesario llevar a cabo experiencias encaminadas a este fin en plantas de *Pisum sativum*, para cuya consecución contamos con la ventaja-- del conocimiento de un buen número de propiedades moleculares de la - Mn-superóxido dismutasa, cuya localización se pretende elucidar.

En general, las superóxido dismutasas son unas proteínas ideales para estudiar las relaciones evolutivas entre las diferentes especies,-- debido a que la función protectora ejercida por estas enzimas es tan esencial, que su presencia es casi obligada en prácticamente todos los organismos vivos. El citocromo c y la ferredoxina son proteínas que han sido exhaustivamente estudiadas con este fin (Smith, 1970; De la Torre, 1977). Sin embargo, el rango de distribución de la superóxido dismutasa es algo más amplio que el del citocromo c y la ferredoxina, ya que, en el primer caso, esta proteína solo está presente en organismos aerobios y, por -- otra parte, la ferredoxina solo se presenta en bacterias y en organismos fotosintéticos. En cambio, en todos los organismos hasta ahora estudiados, incluidos los anaerobios estrictos, está presente alguna ó algunas de las tres familias de superóxido dismutasa.

La distribución de los tres tipos de superóxido dismutasa en los -

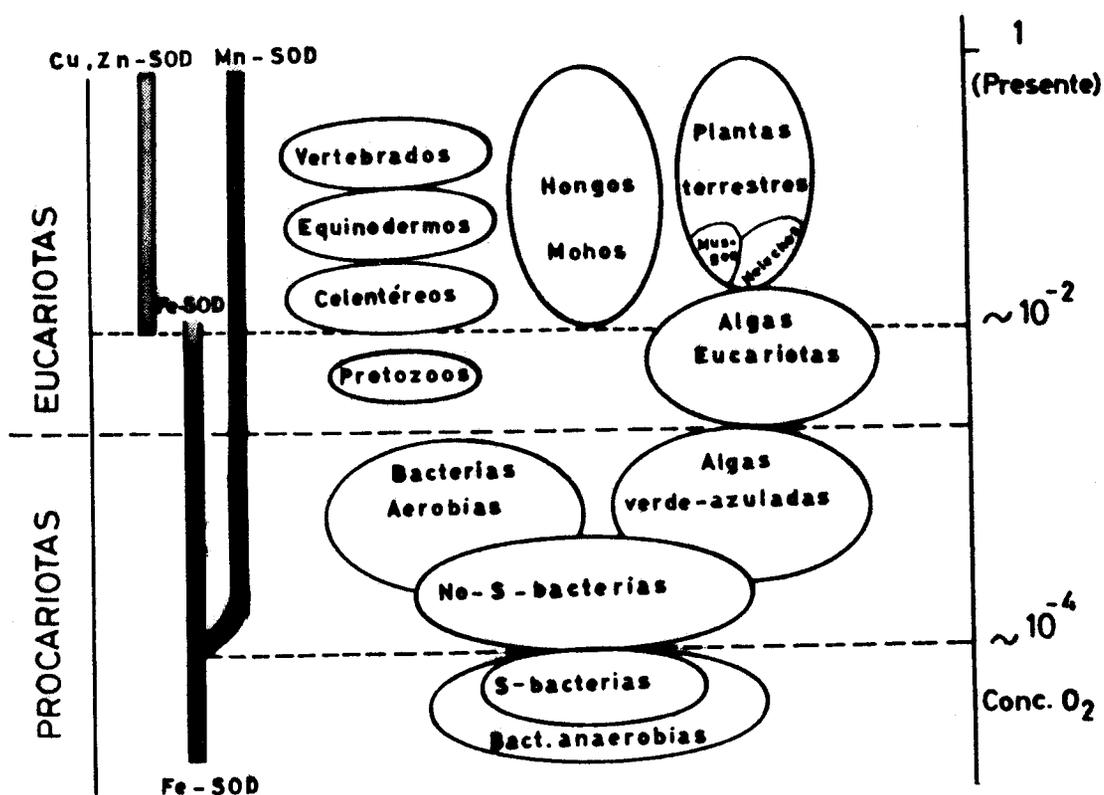
organismos vivos parece ser una peculiaridad de su etapa de evolución y de los distintos orgánulos celulares presentes. Se piensa que esta distribución característica podría ser un reflejo de la historia evolutiva en la adquisición de defensas frente a la toxicidad del oxígeno, y que por lo tanto, podría suministrar información acerca de las funciones fisiológicas de la superóxido dismutasa y de su evolución molecular.

La presencia de los tres tipos de dismutasas en distintos organismos ha sido determinada mediante su aislamiento y caracterización, como acabamos de señalar, pero en muchos casos se ha tenido constancia de su presencia en extractos crudos basándose en la resistencia de la Mn-enzima al cianuro y al  $H_2O_2$ , en las sensibilidades de las Cu,Zn-superóxido dismutasas al cianuro y, de estas últimas y de las Fe-dismutasas frente al  $H_2O_2$  (Beauchamp y Fridovich, 1973; Asada y col., 1975). Adicionalmente, también se ha hecho uso de las diferentes tasas de inhibición producidas por la azida sobre los tres tipos de enzimas, para distinguirlas entre sí, y del efecto de anticuerpos de diferentes superóxido dismutasas purificadas (Misra y Fridovich, 1978; Asada y col., 1977a).

Por lo que a estudios evolutivos de organismos fotosintéticos -- se refiere, son particularmente relevantes los trabajos de Lumsden y Hall (1977) del "Department of Plant Sciences" del King's College de Londres, y de Asada y col. (1980) del "Research Institute for Food Science" de la universidad de Kyoto (Japón).

En la Figura 36 se representa un compendio de los conocimientos actuales acerca de la distribución filogenética de los tres tipos de superóxido dismutasas en organismos a distintas etapas evolutivas, tomado de un trabajo de Asada y col. (1980). Sin embargo, debe indicarse que muy re-

cientemente se ha demostrado la presencia de una Fe-superóxido dismutasa en una planta superior (Salin y Bridges, 1980) situación no contemplada en este esquema, y que obligará a una reconsideración de la distribución filogenética de estas enzimas.



Los organismos anaerobios y los diazotrofos aerobicos, cuya concen

tración de oxígeno intracelular se supone que debe ser muy baja, solamente contienen la Fe-enzima. Las bacterias aeróbicas y facultativas, las algas procariotas, los protozoos y la mayoría de las algas eucariotas, contienen la ferro ó manganeso superóxido dismutasa, ó ambas, mientras que la Cu,Zn-superóxido dismutasa está ausente en estos organismos. Los procariotas facultativos como el *E. coli* cuando se cultivan anaeróbicamente solamente contienen la Fe-enzima, mientras que, como se indicó anteriormente, la biosíntesis de la Mn-enzima es inducida por el oxígeno (Fridovich, 1978b).

La Cu,Zn-enzima ha sido encontrada en animales, hongos y plantas; incluso en organismos tan primitivos como poríferos, celentéreos, mohos, helechos y musgos. Estos organismos carecen de la Fe-superóxido dismutasa a excepción de la planta superior *Brassica campestris* (Salin y Bridges, 1980), y la Mn-enzima se presenta principalmente en la matriz mitocondrial y en los tilacoides cloroplastídicos, según Kanematsu y Asada, (1979).

La superóxido dismutasa del espacio intermembranoso mitocondrial y del estroma de cloroplastos (citosol en las algas verde-azuladas) parece ser la Fe-enzima en algas y protozoos, y la Cu,Zn-enzima en animales, hongos y plantas. Son muchos los investigadores que hoy día son partidarios de la hipótesis de que las ferro y manganeso superóxido dismutasas de aeróbios, pueden haber evolucionado de un ancestro común -la Fe-enzima de los anaeróbios- fundamentando esta idea en el alto grado de homología existente entre las secuencias de aminoácidos de los dos tipos de enzimas.

Basándose en todas estas consideraciones, Asada y col. (1980) han sugerido que, la divergencia de la Mn-enzima respecto a la Fe-enzima, debe haber respondido a un incremento en la concentración de oxígeno en la bios

fera. Aunque el momento de la aparición de los procariotas aerobios sobre la tierra, y la cuestión de, hasta que punto el oxígeno libre se produjo mediante reacciones abióticas, son objeto de controversia (Schwarz y Dayhoff, 1978; Towe, 1978), sin embargo, según Asada y col. (1980) se puede suponer que la divergencia de la Mn-dismutasa respecto a la ferro enzima se produjo en los inicios del periodo Precámbrico, esto es, hace unos  $30-20 \times 10^8$  años, cuando la concentración atmosférica de oxígeno, según Berkner y Marshall (1965) era alrededor de  $10^{-4}$  veces el nivel actual.

La adquisición de la Cu,Zn-superóxido dismutasa se piensa que pudo haber ocurrido en el periodo Cámbrico, hace unos  $6-4,5 \times 10^8$  años, a juzgar por la aparición de animales primitivos como poríferos y celentéreos en fósiles (Asada y col., 1980). De acuerdo con Berkner y Marshall (1965), en aquel tiempo la concentración de oxígeno en la atmósfera era aproximadamente  $10^{-2}$  veces la concentración actual.

Los estudios estructurales de las superóxido dismutasas procedentes de distintos orígenes, han contribuido no poco, a reavivar la polémica en torno a la hipótesis endosimbiótica sobre el origen de las mitocondrias. Esta hipótesis sugiere que las mitocondrias de los eucariotas evolucionaron a partir de bacterias que existían como simbiosis intracelulares en eucariotas primitivos (Raven 1970).

Se postula que, conforme la atmósfera se hizo más aeróbica y menos anaeróbica, estos simbiosis fueron adquiridos como medio de afrontar presiones selectivas que demandaban vías oxidativas (Fridovich, 1974b). Se ha argumentado, como antes indicábamos para los organismos fotosintéticos, que la superóxido dismutasa también evo-

lucionó después de la divergencia eucariota-procariota, esto es, solamente cuando los niveles de oxígeno atmosférico llegaron a ser lo bastante altos para necesitar una defensa enzimática contra la toxicidad del oxígeno (Steinman, 1978; Fridovich, 1974b).

Los altos grados de semejanza en las secuencias de aminoácidos determinados en distintas superóxido dismutasas mitocondriales y procariotas (Harris y col., 1980), parecen apoyar la teoría endosimbiótica, la cual cuenta con arduos defensores en Lumsden y Hall (1975), Fridovich (1978a) y Harris y col. (1980). Sin embargo, la explicación endosimbiótica del origen mitocondrial es un concepto amplio, que incide sobre muchos aspectos de la biología y la bioquímica, y debe hacerse especial énfasis en que, las similitudes encontradas en las secuencias de las dismutasas son simplemente una evidencia en favor de la hipótesis de la endosimbiosis, pero que en modo alguno la demuestran.

Los estudios actualmente en marcha en muchos laboratorios, sobre la secuencia completa de aminoácidos y estructura tridimensional de manganeso y ferro superóxido dismutasas, suministrarán probablemente evidencias más concluyentes sobre el origen evolutivo de las mitocondrias y acerca de las relaciones estructurales, funcionales y evolutivas, existentes entre las diferentes clases de superóxido dismutasa.

En este sentido, la obtención de preparados homogéneos de una Mn-superóxido dismutasa de una planta superior y su caracterización, descritos en esta Memoria Doctoral, posibilita el desarrollo futuro de estas investigaciones, que serán igualmente útiles, una vez elucidada la ubicación celular de la enzima en la célula vegetal para el establecimiento de comparaciones filogenéticas entre esta Mn-proteína de una planta superior y, las superóxido dismutasas que contienen Cu-Zn y Fe de organismos fotosintéticos así como de otros orígenes.

A pesar de que hoy día todavía es mayoritariamente aceptada la hipótesis ya clásica del grupo de Fridovich (McCord y col. 1971), sobre la función protectora de las superóxido dismutasas contra los efectos deletéreos de los radicales  $O_2^{\cdot-}$  y de sus derivados, también es cierto que está siendo activamente contestada por algunos investigadores que postulan una función distinta y, por el momento desconocida, para la superóxido dismutasa, afirmando que su reconocida acción sobre el superóxido es subsidiaria.

Aún aceptando como hipótesis de trabajo la función postulada para la enzima, por McCord y col. (1971), algunos grupos han propuesto diversas matizaciones que afectan a la idea inicial de sus creadores. Así, Halliwell (1979) recogiendo la sugerencia lanzada por Tyler en (1975c) ha propuesto que la superóxido dismutasa podría actuar más bien como una enzima "protectora", dirigida a conseguir una generación controlada de radicales libres  $O_2^{\cdot-}$ , que podrían ser de utilidad en varios procesos metabólicos, entre los que destacan la fagocitosis, y la maduración del fruto, además de su importancia para la acción de algunas enzimas como peroxidases y oxidasas.

Fee (1979) ha puesto de manifiesto que los iones  $Cu(II)$  en medio acuoso, tienen una eficiencia catalítica en la dismutación de los radicales  $O_2^{\cdot-}$  cuatro veces mayor que la  $Cu,Zn$ -superóxido dismutasa bovina. Y considerando la actividad dismutásica, también observada en algunos complejos metálicos y, en varias metaloproteínas de importancia biológica, este investigador ha indicado la posibilidad de que la acción sobre el superóxido de las superóxido dismutasas, resulte de una coincidencia fortuita derivada de las características estructurales de los lugares de unión metálica de la enzima.

Este investigador ha propuesto que la Cu,Zn-superóxido dismutasa podría estar implicada en el metabolismo del cobre y del cinc en semillas en germinación, actuando como fuente de almacenamiento de estos metales para su ulterior utilización en la biosíntesis de metaloproteínas.

Otro flanco débil de la hipótesis de Fridovich, es la presencia de la Fe-superóxido dismutasa en diversos organismos anaerobios estrictos (Gregory y col., 1978), donde en algunos casos alcanza niveles similares a los detectados en organismos aerobios. Aunque la función postulada por los defensores de la idea de Fridovich para la adquisición de una Fe-SOD por bacterias anaerobias, es la --eliminación del  $O_2^{\cdot-}$  originado por procesos anaeróbicos ó mediante la reacción de Urey, como se indicó en la Introducción, ésta no parece particularmente convincente y es bastante cuestionable a juicio de Gregory y col. (1978) y de Fee (1979).

Precisamente, también se ha llegado a poner en entredicho la importancia del propio  $O_2^{\cdot-}$  como fuente primordial de los radicales letales  $OH^{\cdot}$ . Así, Winterbourn (1979) ha demostrado que el quelato  $Fe^{3+}$  - EDTA es capaz de catalizar la producción de  $OH^{\cdot}$  a partir del  $H_2O_2$  y de un reductor como el ascorbato, por un mecanismo independiente del superóxido. Y en presencia de ascorbato y superóxido, - el mecanismo del ascorbato es, incluso más importante que el del superóxido como fuente de  $OH^{\cdot}$ .

Según esta investigadora, aunque la generación de  $OH^{\cdot}$  dependiente de  $O_2^{\cdot-}$  pueda ser más significativa en ciertos casos, como - cuando los granulocitos activados se concentran alrededor de un objetivo (Michelson, 1976), el ascorbato en combinación con el  $H_2O_2$  y  $Fe^{3+}$  - EDTA parece ser, en general, más importante que el  $O_2^{\cdot-}$  como fuente de  $OH^{\cdot}$ , y en consecuencia, a menos que se demuestre un -

mecanismo dependiente de  $O_2^{\cdot-}$  más eficiente, podrían existir dudas respecto a que la función principal de la superóxido dismutasa sea impedir la producción de  $OH^{\cdot}$ . En cualquier caso, lo que parece más relevante es la implicación del  $H_2O_2$  en ambos procesos, por lo que una eliminación eficiente de este compuesto sería una medida preventiva muy importante, para la eliminación de los radicales  $OH^{\cdot}$ .

Precisamente, el peróxido de hidrógeno generado en cloroplastos por acción de la luz, además de ser un inhibidor de la Cu,Zn-superóxido dismutasa presente en el orgánulo (Asada y col., 1975), también puede inhibir la fijación de  $CO_2$  a concentraciones de  $10^{-5}M$  (Robinson y col., 1980), por lo que debe ser eliminado del estroma cloroplastídico. Para ello, Halliwell (1980) ha propuesto el funcionamiento en cloroplastos *in vivo* de un ciclo ascorbato-glutation, constituido por estos dos agentes reductores, y la enzima NADP-dependiente glutatión reductasa, presente en el cloroplasto. De esta forma, el dehidroascorbato producido bien por reacción con radicales  $O_2^{\cdot-}$  ó con  $H_2O_2$ , sería reducido por el glutatión, y la forma reducida de éste regenerada por la glutatión reductasa.

Halliwell (1979) ha puesto de manifiesto la existencia en cloroplastos de plantas superiores de otros mecanismos de protección frente a las especies activadas de oxígeno ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $^1O_2$ ), - que podrían restarle importancia a la esencialidad postulada para la superóxido dismutasa como enzima protector frente a la toxicidad del oxígeno.

En cloroplastos están presentes varios compuestos de la cadena de transporte electrónico que reaccionan con los radicales superóxido, como la ferredoxina, citocromo f y plastocianina, y también reductores como el glutatión, el ascorbato, e incluso iones libres

Mn(II) vinculados al fotosistema II (Asada y col., 1977b). De todos ellos, los más reactivos frente al superóxido son el  $Mn^{2+}$  y el ascorbato, siendo la constante de velocidad de este último  $2,7 \times 10^5 M^{-1} \text{seg}^{-1}$  (Halliwell y col., 1980). A pesar de que este valor es bastante inferior a la constante de velocidad de las superóxido dismutasas, si se tiene en cuenta que la concentración de ascorbato en el estroma cloroplastídico puede alcanzar niveles de hasta 50 mM, según la edad de la hoja y su estado fisiológico (Walker, 1971), es presumible que el ascorbato sea capaz de interceptar una proporción significativa de los  $O_2^{\cdot -}$  formados *in vivo*.

Además del ascorbato, los pigmentos carotenoides presentes en los cloroplastos, según Halliwell (1978b) son unos secuestradores poderosos del oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), lo que proporcionaría un mecanismo de protección adicional al cloroplasto frente a la toxicidad del oxígeno. Tampoco conviene olvidar que algunos complejos de Mn con proteínas y pigmentos, como el Mn-LHC (Foyer y Hall, 1980), presentes en la estructura interna tilacoidal y vinculados al fotosistema II, pueden coadyuvar a la eliminación de los radicales  $O_2^{\cdot -}$  generados en el cloroplasto.

Por otro lado, considerando las contestaciones mencionadas a la hipótesis de Fridovich sobre el papel de la superóxido dismutasa, tampoco puede excluirse la posibilidad de que esta enzima desarrolle una función, hasta ahora desconocida, en algún segmento de la cadena de transporte electrónico de cloroplastos ó mitocondrias. De hecho, la acción del ditionito sobre el espectro visible de la Mn-superóxido dismutasa de hojas de guisante, es compatible con la presencia de Mn(III) en la enzima y parece apoyar esta hipótesis.

En conclusión, es evidente que existen algunos datos experimentales que hacen dudar de la esencialidad de la superóxido dis

mutasa, como mecanismo primordial de eliminación de los radicales superóxido, y que apuntan hacia la existencia de otra función fisiológica para esta familia enzimática, hasta ahora ignorada. Sin embargo, hasta que esta posible función alternativa sea demostrada experimentalmente, habrá que continuar admitiendo, con todas las reservas pertinentes, la hipótesis de McCord y col. (1971) acerca del papel protector de estas enzimas frente a la toxicidad potencial de los radicales  $O_2^{\cdot-}$  generados en el curso de distintas oxidaciones biológicas.

CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo, por primera vez en plantas superiores, la purificación a homogeneidad de una superóxido dismutasa conteniendo manganeso, a partir de extractos crudos de hojas de *Pisum sativum* L., con un rendimiento de aproximadamente 1,2 mg/Kg de hojas.
2. El peso molecular de la enzima determinado por filtración en gel, electroforesis en poliacrilamida y atendiendo a su composición en aminoácidos, es de 84.600, 94.500 y 101.600, respectivamente.
3. La Mn-enzima de *Pisum sativum* L. está compuesta por cuatro subunidades de igual tamaño, con un peso molecular de 23.500, aparentemente unidas por fuerzas no covalentes. La estructura tetramérica de la enzima es bastante estable, obteniéndose la conversión total en la subunidad elemental solamente después de incubaciones a 100°C en presencia de dodecil sulfato sódico y urea 8M.
4. La estequiometría metal-proteína de la Mn-superóxido dismutasa es de 1 mol de Mn por mol de enzima, habiendo sido corroborada esta relación mediante ensayos de desnaturalización y reconstitución.

- ción del contenido en Mn de la enzima nativa. Los resultados obtenidos de los estudios de espectroscopía óptica y de resonancia de spin electrónico de la mangano-enzima, son coherentes con la presencia del estado de valencia Mn(III) en la superóxido dismutasa en reposo.
5. El análisis de la composición en aminoácidos de la enzima muestra un alto contenido en ácido glutámico, leucina, alanina y ácido aspártico, no habiéndose detectado la presencia de triptófano. La metionina es el aminoácido minoritario y existe un número apreciable de restos de  $\frac{1}{2}$  - cistina.
  6. La constante de velocidad aparente determinada para el desproporcionamiento del superóxido por la Mn-superóxido dismutasa de guisante ( $1,61 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ) demuestra que, en su eficacia catalítica, esta enzima es equiparable a otras superóxido dismutasas - que contienen un sólo átomo metálico por molécula.
  7. Se ha realizado un estudio comparativo de las propiedades de la Mn-superóxido dismutasa de la planta superior *Pisum sativum* L., con las de otras superóxido dismutasas de diferentes orígenes, que han sido hasta ahora investigadas. De las características - estructurales, químico-físicas y cinéticas que han sido determinadas para la enzima (espectro de absorción visible-UV y de RSE, peso molecular, punto isoelectrico, composición en aminoácidos, contenido metálico, estructura cuaternaria, estabilidad frente al pH y temperatura, condiciones óptimas de actividad, constante de velocidad aparente y efecto de inhibidores) se deduce que la Mn-superóxido dismutasa de guisante, aunque tiene algunas propiedades comunes con enzimas análogas de otros organismos fotosinté

ticos, no muestra en general características totalmente coincidentes con las descritas para estos organismos, presentando también ciertas similitudes con Mn-superóxido dismutasas de procariontas y eucariotas no fotosintéticos, cuya posición filogenética está bastante distanciada de las plantas superiores.

**BIBLIOGRAFIA**

- ALEMAN, V. and HANDLER, P. (1967). Dihydroorotate dehydrogenase. I. General properties. J. Biol. Chem. 242, 4087-96.
- ALLEN, J.F. (1977). Superoxide and photosynthetic reduction of oxygen. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits. A.M. Michelson J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 417-436. Academic Press, New York.
- ANASTASI A., BANNISTER, J.V. and BANNISTER, W.H. (1976). Isolation and characterization of iron superoxide dismutase from *Bacillus megaterium*. Int. J. Biochem. 7, 541-546.
- ANBAR, M. and NETA, P. (1967). A compilation of specific bimolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution. Int. J. Appl. Radiat. Isotop. 18, 495-523.
- ANDERSON, J.M. and PYLIOTIS, N.A. (1969). Studies with manganese-deficient spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. 189, 280-293.
- ANDREWS, P. (1965). The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96, 595-606.
- ANTONINI, E., BRUNORI, M., GREENWOOD, C. and MALMSTROM, B.G. (1970). Catalytic mechanism of cytochrome oxidase. Nature, 228, 936-937.
- ARNESON, R.M. (1970). Substrate-induced chemiluminescence of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 136, 352-360.

- ARNON, D.I., TSUJIMOTO, H.Y. and McSWAIN, B.D. (1967). Ferredoxin and photosynthetic phosphorylation. Nature, 214, 562-566.
- ARRON, G.P., HENRY, L., PALMER, J.M. and HALL, D.O. (1976). Superoxide dismutases in mitochondria from *Helianthus tuberosus* and *Neurospora crassa*. Biochem. Soc. Trans. 4, 618-620.
- ASADA, K., URANO, M. and TAKAHASHI, M. (1973). Subcellular location of superoxide dismutase in spinach leaves and preparation and properties of crystalline spinach superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 36, 257-266.
- ASADA, K. and KISO, K. (1973). Initiation of aerobic oxidation of sulfite by illuminated spinach chloroplasts. Eur. J. Biochem. 33, 253-257.
- ASADA, K., TAKAHASHI, M. and NAGATE, M. (1974). Assay and inhibitors of spinach superoxide dismutase. Agr. Biol. Chem. 38, 471-473.
- ASADA, K., YOSHIKAWA, K., TAKAHASHI, M., MAEDA, Y. and ENMANJI, K. (1975). Superoxide dismutases from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. J. Biol. Chem. 250, 2801-2807.
- ASADA, K. (1976a). Oxygen toxicity. J. Biochem. (Tokyo) 48, 226-257.
- ASADA, K., KANEMATSU, S., TAKAHASHI, M. and KONO, Y. (1976b). Superoxide dismutases in photosynthetic organisms. En: Iron and Copper Proteins. Edits. K.T. Yasunobu, H.F. Mower and O. Hayaishi, pp. 551-564. Plenum Publishing Corporation, New York.
- ASADA, K., KANEMATSU, S. and UCHIDA, K. (1977a). Superoxide dismutases in photosynthetic organisms: Absence of the cuprozinc enzyme in eukaryotic algae. Arch. Biochem. Biophys. 179, 243-256.
- ASADA, K., TAKAHASHI, M. TANAKA, K. and NAKANO, Y. (1977b). Formation of active oxygen and its fate in chloroplasts. En: Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen. Edts. O. Hayaishi and K. Asada, pp. 45-63. Japan Scientific Society Press. Tokyo.

- ASADA, K. and KANEMATSU, S. (1978). Distribution of cuprozinc, manganic and ferric superoxide dismutases in plants and fungi: An evolutionary aspect. En: Evolution of Protein Molecules. Edits. H. Matsubara y T. Yamanaka, pp. 361-372. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- ASADA, K., KANEMATSU, S., OKADA, S. and HAYAKAWA, T. (1980). Phylogenetic distribution of three types of superoxide dismutase in organisms and in cell organelles. En: Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase. Edits. J.V. Bannister y H.A.O. Hill, pp. 136-151. Elsevier/North-Holland, New York.
- BABIOR, B.M. (1977). Recent studies on oxygen metabolism in human neutrophils: superoxide and chemiluminescence. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edts. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 271-281. Academic Press Inc., New York.
- BAILEY, D.B., ELLIS, P.D. and FEE, J.A. (1980). Cadmium-113 nuclear magnetic resonance studies of cadmium-substituted derivatives of bovine superoxide dismutase. Biochemistry 19, 591-596.
- BALDENSPERGER, J.B. (1978). An iron-containing superoxide dismutase from the chemolithotrophic *Thiobacillus denitrificans* "RT" strain. Arch. Microbiol. 119, 237-244.
- BALLOU, D., PALMER, G. and MASSEY, V. (1969). Direct demonstration of superoxide anion production during the oxidation of reduced flavine and of its catalytic decomposition by erythrocyuprein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 898-904.
- BANNISTER, W.H., ANASTASI, A. and BANNISTER, J.V. (1977). Human erythrocyte superoxide dismutase (erythrocyuprein). En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 107-128. Academic Press Inc., New York.

- BANNISTER, J.V., ANASTASI, A. and BANNISTER, W.H. (1978). Active subunits from superoxide dismutase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 469-472.
- BARBER, A.A. and BERNHEIM, F. (1967). Lipid peroxidation: its measurement, occurrence and significance in animal tissues. Adv. Gerontol. Res. 2, 355-403.
- BARTKOWIAK, A., LEYKO, W. and FRIED, R. (1979). A comparative characterization of cytosolic superoxide dismutase (SOD) from hog liver and erythrocytes, Comp. Biochem. Physiol. 62B, 61-66.
- BAUM, J.A. and SCANDALIOS, J.G. (1979). Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutases in maize. Differentiation 13, 133-140.
- BEAUCHAMP, C.O. and FRIDOVICH, I. (1970). A mechanism for the production of ethylene from methional: The generation of hydroxyl radical by xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 245, 4641-4646.
- BEAUCHAMP, C.O. and FRIDOVICH, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and a assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem. 44, 276-87.
- BEAUCHAMP, C.O. and FRIDOVICH, I. (1973). Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. Biochim. Biophys. Acta. 317, 50-64.
- BEEM, K.M., RICH, W.E. and RAJAGOPALAN, K.V. (1974). Total reconstitution of copper-zinc superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 249, 7298-7305.
- BEEM, K.M., RICHARDSON, J.S. and RICHARDSON, D.C. (1976). Manganese superoxide dismutases from *Escherichia coli* and from yeast mitochondria: Preliminary X-ray crystallographic studies. J. Mol. Biol. 105, 327-332.
- BEHAR, D., CZAPSKI, G., RABANI, J., DORFMAN, L.M. and SCHWARZ, H.A. (1970). The acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical. J. Phys. Chem. 74, 3209-3213.

- BERKNER, L.C. and MARSHALL, L.C. (1965). On the origin and rise of oxygen concentration in the earth's atmosphere. J. Atmos. Sci. 22, 225-261.
- BHAGWAT, A.S. and SANE, P.V. (1978). Evidence for the involvement of superoxide anions in the oxygenase reaction of ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 865-873.
- BIELSKI, B.H.J. and ALLEN, A.O. (1977). Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. J. Phys. Chem. 81, 1048-1050.
- BORGGAARD, O.K. (1972). Polarographic determination of stability constants and rate constants of iron chelates. Acta Chem. Scand. 26, 393-395.
- BORS, W., SARAN, M., LENGFELDER, E., SPÖTTL, R. and MICHEL, C. (1974). The relevance of the superoxide anion radical in biological systems. Curr. Top. Radiat. Res. Quart. 9, 247-309.
- BOTHE, H. (1969). Ferredoxin as a cofactor of cyclic photophosphorylation in a cell-free system from the blue algae *Anacystis-nidulans*. Z. Naturforsch. 24b, 1574-1582.
- BOVERIS, A. (1977). Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. Adv. Exp. Med. Biol. 78, 67-82.
- BRAY, R.C. (1961). Sudden freezing as a technique for the study of rapid reactions. Biochem. J. 81, 189-193.
- BRIDGEN, J., HARRIS, J.I. and NORTHROP, F. (1975). Evolutionary relationships in superoxide dismutase. FEBS Lett. 49, 392-395.
- BRIGGS, R.G. and FEE, J.A. (1978). Further characterization of human erythrocyte superoxide dismutase. Biochim. Biophys. Acta 537, 86-99.

- BRITTON, L. and FRIDOVICH, I. (1977). Intracellular localization of the superoxide dismutases of *Escherichia coli*: a revaluation. J. Bacteriol. 131, 815-820.
- BROCK, C.J. and WALKER, J.E. (1980). Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*: Metal binding and complete amino acid sequence. En: The significance of Superoxide and Superoxide Dismutase. Vol. 1. Chemical and Biochemical Aspects. Edits. J. V. Bannister y H.A.O. Hill. Elsevier, en Prensa.
- BUS, J.S., AUST, S.D. and GIBSON, J.E. (1974). Superoxide and singlet oxygen-catalyzed lipid peroxidation as a possible mechanism for paraquat (methyl viologen) toxicity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 749-755.
- BUTTLAIRE, D.H., CZUBA, B.A., STEVENS, T.H., LEE, Y.C. and HIMES, H. (1980). Manganous ion binding to tubulin. J. Biol. Chem. 255, 2164-2168.
- CARRICO, R.J. and DEUTSCH, H.F. (1970). Presence of zinc in human cytochrome c and some properties of the protein. J. Biol. Chem. 245 (4), 723-727.
- COHEN, G. and HEIKKILA, R.E. (1974). The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. J. Biol. Chem. 249, 2447-2452.
- CONE, R., HASAN, S.K., LOWN, J.W. and MORGAN, A.R. (1976). Studies related to antitumor antibiotics. Part. IV. The mechanism of the degradation of DNA by streptonigrin. Can. J. Biochem. 54, 219-223.
- COSTILOW, R.N. and KEELE, B.B. (1972). Superoxide dismutase in *Bacillus popilliae*. J. Bacteriol. 111, 628-630.

- COTTON, F.A. and WILKINSON, D. (1966). *Advanced Inorganic Chemistry*. 2<sup>nd</sup> ed, p. 841. Interscience, New York.
- CRAPO, J.D. and TIERNEY, D.F. (1974). Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. Am. J. Physiol. 226, 1401-1407.
- CRAPO, J.D. and McCORD, J.M. (1976). O<sub>2</sub>-induced changes in pulmonary superoxide dismutase assayed by antibody titrations. Am. J. Physiol. 231, 1196-1203.
- CRAPO, J.D., McCORD, J.M. and FRIDOVICH, I. (1978). Preparation and assay of superoxide dismutases. Methods Enzymol. 53, 382-393.
- CHENIAE, G.M. and MARTIN, I.F. (1970). Sites of function of manganese within photosystem II. Roles in O<sub>2</sub> evolution and system II. Biochim. Biophys. Acta 197 (2), 219-239.
- CHESON, B.D., CURNUTTE, J.T. and BABIOR, B.M. (1977). The oxidative killing mechanisms of the neutrophil. Prog. Clin. Immunol. 3, 1-65.
- CHIKATA, Y., KUSUNOSE, E., ICHIHARA, K. and KUSUNOSE, M. (1975). Purification of superoxide dismutases from *Mycobacterium phlei*. Osaka City Medical J. 21, 127-136.
- CZAPSKI, G. (1971). Radiation chemistry of oxygenated aqueous solutions. Ann. Rev. Phys. Chem. 22, 171-208.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
- DAWSON, R.M.C., ELLIOTT, D.C., ELLIOT, W.H. and JONES, K.M. (1969). *Data for biochemical research*. 2<sup>nd</sup> edn, p. 429. Oxford University Press, London.
- DeCHATELET, L.R., SHIRLEY, P.S., GORDSON, P.R. and McCALL, C.E. (1975). Bactericidal activity of superoxide anion and of hydrogen peroxide: investigations employing dialuric acid, a superoxide-generating drug. Antimicrob. Ag. Chemother. 8, 146-153.

- DE LA TORRE CASAS, A. (1977). Purificación, características físico-químicas y especificidad bioquímica de la ferredoxina de hojas de lechuga. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- DEL RIO, L.A., SEVILLA, F., GOMEZ, M. and YAÑEZ, J. (1977). Superoxi de dismutases of *Pisum sativum*: Effect of Mn nutrient levels on the isozyme pattern during plant growth. 11th FEBS Meeting, Copenhagen. Abstract C-5 356 8/9.
- DEL RIO, L.A., SEVILLA, F., GOMEZ, M., YAÑEZ, J. and LOPEZ-GORGE, J. (1978). Superoxide dismutase: An enzyme system for the study of micronutrient interactions in plants. Planta **140**, 221-225.
- DINGLE, R. (1966). The visible and near infrared spectrum of manganese (III) complexes. Acta Chem. Scand **20**, 33-44.
- DOUGHERTY, H.W., SADOWSKI, S.J. and BAKER, E.E. (1978). A new iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **253**, 5220-5223.
- EGNEUS, H., HEBER, U., MATTHIESEN, U., KIRK, M. (1975). Reduction of oxygen by the electron transport chain of chloroplasts during assimilation of carbon dioxide. Biochim. Biophys. Acta **408**, 252-268.
- ELSTNER, E.F. and HEUPEL, A. (1973). On the decarboxilation of  $\alpha$ -keto acids by isolated chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta **325**, 182-188.
- ELSTNER, E.F. and KONZE, J.R. (1974). Light-dependent ethylene production by isolated chloroplasts. FEBS Lett. **45**, 18-21.
- ELSTNER, E.F. and HEUPEL, A. (1975). Lamellar superoxide dismutase of isolated chloroplasts. Planta **123**, 145-154.
- ELSTNER, E.F. and HEUPEL, A. (1976). Inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride: A simple assay for superoxide dismutase. Anal. Biochem. **70**, 616-620.

- ELSTNER, E.F., KONZE, J.R., SELMAN, B.R. and STOFFER, C. (1976). Ethylene formation in sugar beet leaves. Evidence for the involvement of 3-hydroxytyramine and phenoloxidase after wounding. Plant Physiol. 58, 163-168.
- ELSTNER, E.F. and YOUNGMAN, R. (1978). Oxygen activation in chloroplasts: Models for "in vivo" observations. Ber. Deutsch. Bot. Ges 91, 569-577.
- ELSTNER, E.F. (1979). Oxygen activation and superoxide dismutase in chloroplasts. En: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 6. Photosynthesis II. Edits. M. Gibbs y E. Latzko, pp. 410-415.
- EPEL, B.L. and NEUMAN, J. (1973). The mechanism of the oxidation of ascorbate and  $Mn^{2+}$  by chloroplasts; the role of the radical superoxide. Biochim. Biophys. Acta 325, 520-529.
- FEE, J.A. and TEITELBAUM, H.D. (1972). Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 150-158.
- FEE, J.A., SHAPIRO, E.R. and THOMAS, H. (1976). Direct evidence for manganese (III) binding to the manganosuperoxide dismutase of *Escherichia coli* B. J. Biol. Chem. 251, 6157-6159.
- FEE, J.A. and VALENTINE, J.S. (1977). Chemical and physical properties of superoxide. En: Superoxide and Superoxide dismutases. Eds. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 19-60. Academic Press Inc., New York.
- FEE, J.A. (1977). Structure- function relationships in superoxide dismutases. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Eds. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 173-192. Academic Press Inc., New York.
- FEE, J.A. and McCLUNE, G.J. (1978). Mechanisms of superoxide dismutases. En: Mechanisms of Oxidizing Enzymes. Eds. T.P. Singer y R.N. Ondarza, pp. 273-284. Elsevier/North Holland, Amsterdam.

- FEE, J.A. (1979). On the question of superoxide toxicity and the biological function of superoxide dismutases. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Oxidases and Related Oxidation-Reduction Systems, Albany, New York.
- FENTON, H.J. (1894). J. Chem. Soc. London, 65, 899-910.
- FISHER, D.B. and KAUFMAN, S. (1973). Tetrahydropterin oxidation without hydroxylation catalyzed by rat liver phenylalanine hydroxylase. J. Biol. Chem. 248, 4300-4304.
- FLOHE, L. GUENZLER, W.A. and SHOCK, H.H. (1973). Glutathione peroxidase. Seleno enzyme. FEBS Lett. 32, 132-134.
- FLOHE, L., LOSCHEN, G., AZZI, A. and RICHTER, CH. (1977). Superoxide radicals in mitochondria. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 323-334. Academic Press Inc., New York.
- FOOTE, C.S. (1976). Photosensitized oxidation and singlet oxygen. Consequences in biological systems. En: Free Radicals in Biology Vol. 2 Edit. W.A. Pryor, pp. 85-133. Academic Press, New York.
- FORMAN, H.J. and FRIDOVICH, I. (1973a). Stability of bovine superoxide dismutase. Effects of metals. J. Biol. Chem. 248, 2645-2649.
- FORMAN, H.J. and FRIDOVICH, I. (1973b). Superoxide dismutase: A comparison of rate constants. Arch. Biochem. Biophys. 158, 396-400.
- FOYER, C.H. and HALL, D.O. (1979). A rapid procedure for the preparation of light harvesting chlorophyll a/b protein complex. FEBS Lett. 101, 324-328.
- FOYER, C.H. and HALL, D.O. (1980). Superoxide dismutase activity in the functioning chloroplast. En: The Significance of Superoxide and Superoxide Dismutase. Vol. 1. Chemical and Biochemical Aspects. Edits. J.V. Bannister y H.A.O. Hill, pp. 380-389. Elsevier, en prensa.

- FRICKE, H. and THOMAS, J.K. (1964). Pulsed electron beam kinetics. Radiat. Res. 4, 35-53.
- FRIDOVICH, I. (1970). Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 245, 4053-4057.
- FRIDOVICH, I. (1974). Superoxide dismutases. Adv. Enzymol. 41, 35-97.
- FRIDOVICH, I. (1974b). Evidence for the symbiotic origin of mitochondria. Life Sci. 14, 819-826.
- FRIDOVICH, I. (1975). Superoxide dismutases. Ann. Rev. Biochem. 44, 147-159.
- FRIDOVICH, I. (1976a). Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. En: Free Radicals in Biology. Vol. I. Edit. W.A. Pryor, pp. 239-277. Academic Press, New York.
- FRIDOVICH, I. (1976b). Superoxide dismutases: Studies of structure and mechanism. Adv. Exp. Med. Biol. 74, 530-539.
- FRIDOVICH, I. (1978a). The biology of oxygen radicals. Science 201, 875-880.
- FRIDOVICH, I. (1978b). Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. Photochem. Photobiol. 28, 733-741.
- FRIDOVICH, I. (1978c). Les superoxydes ou les dangers de la vie aérobie. La Recherche 9, 743-749.
- FRIED, R., FRIED, L.W. and BABIN, D.R. (1973). Biological role of xanthine oxidase and tetrazolium reductase inhibitor. Eur. J. Biochem. 33, 439-445.
- FRIED, R. (1975). Enzymic and nonenzymic assay of superoxide dismutase. Biochimie 57, 657-660.

- GIANNOPOLITIS, C.N. and RIES, S.K. (1977a). Superoxide dismutases. 1. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59, 309-314.
- GIANNOPOLITIS, C.N. and RIES, S.K. (1977b). Superoxide dismutases. 2. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. Plant Physiol. 59, 315-318.
- GLIDEWELL, S.M. and RAVEN, J.A. (1976). Photorespiration: ribulose di phosphate oxygenase or hydrogen peroxide. J. Exp. Bot. 27, 200-204.
- GOSCIN, S.A. and FRIDOVICH, I. (1972a). Role of superoxide radical in a nonenzymic hydroxylation. Arch. Biochem. Biophys. 153, 778-783.
- GOSCIN, S.A. and FRIDOVICH, I. (1972b). The purification and properties of superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 289, 276-283.
- GOTOH, T. and SHIKAMA, K. (1976). Generation of the superoxide radical during autoxidation of oxymyoglobin. J. Biochem. 80, 397-400.
- GREGORY, E.M., YOST, F.J. and FRIDOVICH, I. (1973). Superoxide dismutases of *E. coli*: intracellular localization and functions. J. Bact. 115, 987-991.
- GREGORY, E.M. and FRIDOVICH, I. (1973a). Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. J. Bacteriol. 114, 543-548.
- GREGORY, E.M. and FRIDOVICH, I. (1973b). Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. J. Bacteriol. 114, 1193-1197.
- GREGORY, E.M., GOSCIN, S.A. and FRIDOVICH, I. (1974). Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote. J. Bacteriol. 117, 456-460.

- GREGORY, E.M., MOORE, W.E.C. and HOLDEMAN, L.V. (1978). Superoxide dismutase in anaerobes: survey. Appl. Environ. Microbiol. **35**, 988-991.
- HABER, F. and WEISS, J. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proc. Roy. Soc. Lond. A **147**, 332-351.
- HALLIWELL, B. (1974). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. New Phytol. **73**, 1075-1086.
- HALLIWELL, B. (1975). Hydroxylation of p-coumaric acid by illuminated chloroplasts. The role of superoxide. Eur. J. Biochem. **55**, 355-360.
- HALLIWELL, B. and AHLUWALIA, S. (1976). Hydroxylation of p-coumaric acid by horseradish peroxidase. Biochem. J. **153**, 513-518.
- HALLIWELL, B. (1976). An attempt to demonstrate a reaction between superoxide and hydrogen peroxide. FEBS Lett. **72**, 8-10.
- HALLIWELL, B. (1977). Generation of hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals during the oxidation of dihydroxy fumaric acid by peroxidase. Biochem. J. **163**, 441-448.
- HALLIWELL, B. (1978a). Biochemical mechanisms accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: The key role of superoxide dismutase. Cell Biol. Int. Rep. **2**, 113-128.
- HALLIWELL, B. (1978b). The chloroplast at work. A review of recent developments in our understanding of chloroplast metabolism. Prog. Biophys. Mol. Biol. **33**, 1-54.
- HALLIWELL, B. (1979). Oxygen-free-radicals in living systems: Dangerous but useful? En: *Strategies of Microbial Life in Extreme Environments*. Ed. M. Shilo, pp. 195-221. Verlag Chemie, Weinheim.

- HALLIWELL, B., FOYER, C.H. and CHARLES, S.A. (1980). The fate of hydrogen peroxide in illuminated chloroplasts. Fifth International Congress on Photosynthesis (grecœ). Abstracts, p. 243.
- HAMILTON, G.A., LIBBY, R.D. and HARTZELL, CH.R. (1973). Valence of copper and the role of superoxide in the D-galactose oxidase catalyzed reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 333-340.
- HARRIS, J.I. (1977). Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*. En: Superoxide and superoxide dismutase. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 151-157. Academic Press Inc., New York.
- HARRIS, J.I. and STEINMAN, H.M. (1977). Amino-acid sequence homologies among superoxide dismutases. En: Superoxide and Superoxide dismutases. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 225-230. Academic Press Inc., New York.
- HARRIS, J.I., AUFFRET, A.D., NORTHROP, F.D. and WALKER, J.E. (1980). Structural comparisons of superoxide dismutases. Eur. J. Biochem. 106, 297-303.
- HARTZ, J. and DEUTSCH, H.F. (1972). Subunits structure of human superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 247, 7043-7050.
- HASSAN, H.M. and FRIDOVICH, I. (1977a). Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli* K 12. J. Bacteriol. 129, 1574-1583.
- HASSAN, H.M. and FRIDOVICH, I. (1977b). Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Escherichia coli*; glucose effect. J. Bacteriol. 132, 505-510.
- HASSAN, H.M. and FRIDOVICH, I. (1977c). Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 252, 7667-7672.

- HASSAN, H.M. and FRIDOVICH, I. (1979). Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. Arch. Biochem. Biophys. 196, 385-395.
- HATCHIKIAN, E.C. and HENRY, Y.A. (1977). An iron-containing superoxide dismutase from the strict anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* (Norway 4). Biochimie 59, 153-161.
- HEDRICK, J.L. and SMITH, A.J. (1968). Size and charge isomeric separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164.
- HEIKKILA, R.E. and CABBAT, F. (1976). A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine. Anal. Biochem. 75, 356-362.
- HEIKKILA, R.E. and COHEN, G. (1977). The inactivation of copper-zinc superoxide dismutase by diethyldithiocarbamate. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 367-373. Academic Press, New York.
- HENRY, L.E.A., HALLIWELL, B. and HALL, D.O. (1976). The superoxide dismutase activity of various photosynthetic organisms measured by a new and rapid assay technique. FEBS Lett. 66, 303-306.
- HENRY, L.E.A., GOGOTOV, I.N. and HALL, D.O. (1978). Superoxide dismutase and catalase in the protection of the proton-donating systems of nitrogen fixation in the blue-green alga *Anabaena cylindrica* Biochem. J. 174, 373-377.
- HIRATA, F., OHNISHI, T. and HAYAISHI, O. (1977). Indoleamine 2,3-Dioxygenase. Characterization and properties of enzyme  $O_2^-$  complex. J. Biol. Chem. 252, 4637-4642.
- HUBER, W., SCHULTE, T., CARSON, S., GOLDHAMER, R. and VOGIN, E. (1968). Some chemical and pharmacological properties of a novel anti-inflammatory protein. Toxicol. Appl. Pharmacol. 12, 308.

- ICHIHARA, K., KUSUNOSE, E., KUSUNOSE, M. and MORI, T. (1977). Superoxide dismutase from *Mycobacterium lepraemurium*. J. Biochem. 81, 1427-1433.
- ISBELL, H.S. and FRUSCH, H.L. (1977). Superoxide-catalyzed reactions of carbohydrates. Carbohydrate Res. 59, C25-C31.
- JACKSON, C., DENCH, J., MOORE, A.L., HALLIWELL, B., FOYER, C.H. and HALL, D.O. (1978). subcellular localization and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. Eur. J. Biochem. 91, 339-344.
- KANEMATSU, S. and ASADA, K. (1978a). Superoxide dismutase from an anaerobic photosynthetic bacterium, *Chromatium vinosum*. Arch. Biochem. Biophys. 185, 473-482.
- KANEMATSU, S. and ASADA, K. (1978b). Crystalline ferric superoxide dismutase from an anaerobic green sulfur bacterium, *Chlorobium thiosulfatophilum*. FEBS Lett. 91, 94-98.
- KANEMATSU, S. and ASADA, K. (1979). Ferric and manganic superoxide dismutases in *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys. 195, 535-545.
- KEELE, B.B., Jr., McCORD, J.M. and FRIDOVICH, I. (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. J. Biol. Chem. 245, 6176-6181.
- KEELE, B.B., McCORD, J.M. and FRIDOVICH, I. (1971). Further characterization of bovine superoxide dismutase and its isolation from bovine heart. J. Biol. Chem. 216, 2875-2880.
- KELLOGG, E.W. and FRIDOVICH, I. (1975). Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J. Biol. Chem. 250, 8812-8817.
- KELLOGG, E.W. and FRIDOVICH, I. (1977). Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 252, 6721-6728.

- KHAN, A.V. (1970). Singlet molecular oxygen from superoxide anion and sensitized fluorescence of organic molecules. Science 168, 476-477.
- KIDO, T., SODA, K., SUZUKI, T. and ASADA, K. (1976). A new oxygenase 2-nitropropane dioxygenase of *Hansenula invaqui*. Enzymologic and spectrophotometric properties. J. Biol. Chem. 251, 6994-7000.
- KLUG, D., RABANI, J. and FRIDOVICH, I. (1972). A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. J. Biol. Chem. 247, 4839-4842.
- KLUG, D., FRIDOVICH, I. and RABANI, J. (1973). Pulse radiolytic investigations of superoxide catalyzed disproportionation. Mechanism for bovine superoxide dismutase. J. Am. Chem. Soc. 95, 2786-2790.
- KONO, Y. (1978). Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. Arch. Biochem. Biophys. 186, 189-195.
- KONO, Y., TAKAHASHI, M. and ASADA, K. (1979). Superoxide dismutases from kidney bean leaves. Plant & Cell Physiol. 20, 1229-1235.
- KONZE, J.R. and ELSTNER, E.F. (1976). Pyridoxal-phosphate-dependent ethylene production from methionine by isolated chloroplasts. FEBS Lett. 66, 8-11.
- KOPPENOL, W.H. (1976). Reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. Nature 262, 420-421.
- KOPPENOL, W.H. and BUTLER, J. (1977). Mechanisms of reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. FEBS Lett. 83, 1-6.
- KRINSKY, N.I. (1977). Singlet oxygen in biological systems. Trends Biochem. Sci. 2, 35-38.

- KUSUNOSE, M., NODA, Y., ICHIHARA, K. and KUSUNOSE, E. (1976a). Superoxide dismutase from *Mycobacterium* species, strain Takeo. Arch. Microbiol. 108, 65-73.
- KUSUNOSE, E., ICHIHARA, K., NODA, Y. and KUSUNOSE, M. (1976b). Superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biochem (Tokyo) 80, 1343-1352.
- LAND, E.J. and SWALLOW, A.J. (1971). One-electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis. Arch. Biochem. Biophys. 145, 365-372.
- LAVELLE, F., MICHELSON, A.M. and DIMITRIJEVIC, L. (1973). Biological protection by superoxide dismutase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 350-357.
- LAVELLE, F., DUROSAY, P. et MICHELSON, A.M. (1974). Purification et propriétés de la superoxide dismutase du champignon *Pleurotus olearius*. Biochimie 56, 451-458.
- LAVELLE, F. et MICHELSON, A.M. (1975). Purification et étude des deux superoxyde dismutases du champignon *Pleurotus olearius*. Biochimie 57, 375-381.
- LAVELLE, F., McADAM, M.E., FIELDEN, E.M., ROBERTS, P.B., PUGET, K. and MICHELSON, A.M. (1977). A pulse-radiolysis study on the catalytic mechanism of the iron-containing superoxide dismutase from *Photobacterium leiognathi*. Biochem. J. 161, 3-11.
- LEAL, A., GOMEZ, M., SANCHEZ-RAYA, A.J. and RECALDE, L. (1975). A closed continuous flow system for hydroponic culture in plant nutrition research. Agrochimica 19, 408-412.
- LENGFELDER, E. and ELSTNER, E.F. (1978). Determination of the superoxide dismutating activity of D-penicillamine copper. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 751-757.

- LENGFELDER, E. and ELSTNER, E.F. (1979). Cyanide insensitive iron superoxide dismutase in *Euglena gracilis*. Comparison of the reliabilities of different test systems for superoxide dismutases. Z. Naturforsch. 34c, 374-380.
- LIPPITT, B. and FRIDOVICH, I. (1973). Tetrazolium oxidase and superoxide dismutase: Evidence for identity. Arch. Biochem. Biophys. 159, 738-741.
- LORENTZEN, R.J. and TS'0, P.O.P. (1977). Benzo (a) pyrenedione benzo (a) pyrenediol oxidation-reduction couples and the generation of reactive reduced molecular oxygen. Biochemistry 16, 1467-1473.
- LOSCHEN, G., AZZI, A., RICHTER, C. and FLOHE, L. (1974). Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. FEBS Lett. 42, 68-72.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- LUMSDEN, J. and HALL, D.O. (1974). Soluble and membrane-bound superoxide dismutases in a blue-green alga (*Spirulina*) and spinach. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 35-41.
- LUMSDEN, J. and HALL, D.O. (1975). Superoxide dismutase in photosynthetic organisms provides an evolutionary hypothesis. Nature 257, 670-672.
- LUMSDEN, J., CAMMACK, R. and HALL, D.O. (1976). Purification and physicochemical properties of superoxide dismutase from two photosynthetic microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 438, 380-392.
- LUMSDEN, J., HENRY, L. and HALL, D.O. (1977). Superoxide dismutase in photosynthetic organisms. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits: A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 437-450. Academic Press Inc., New York.

- LYNCH, R.E. and FRIDOVICH, I. (1978). Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. J. Biol. Chem. 253, 1838-1845.
- McADAM, M.E., FOX, R.A., LAVALLE, F. and FIELDEN, M. (1977a). A pulse-radiolysis study of the manganese-containing superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*. A Kinetic Biochem. J. 165, 71-79.
- McADAM, M.E., LAVALLE, F., FOX, R.A. and MARTIN-FIELDEN, E. (1977b). A pulse-radiolysis study of the manganese-containing superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*. Further studies on the properties of the enzyme. Biochem. J. 165, 81-87.
- McCORD, J.M. and FRIDOVICH, I. (1968a). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 243, 5753-5760.
- McCORD, J.M. and FRIDOVICH, I. (1968b). Fifty-third Annual Meeting of the Federation of American Societies for Experimental Biology. Fed. Proc. 28, 346.
- McCORD, J. and FRIDOVICH, I. (1969a). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythro-cuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244, 6049-55.
- McCORD, J.M. and FRIDOVICH, I. (1969b). Utility of superoxide dismutase in studying free-radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. J. Biol. Chem. 244, 6056-63.
- McCORD, J.M., KEELE, B.B., Jr. and FRIDOVICH, I. (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 68, 1024-1027.
- McCORD, J.M. (1974). Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. Science 185, 529-531.
- McCORD, J.M. and FRIDOVICH, I. (1977a). Superoxide dismutases. A history. En: *Superoxide and Superoxide Dismutases*. Edits. A. M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 1-10. Academic Press Inc., New York.

- MCCORD, J.M., CRAPO, J.D. and FRIDOVICH, I. (1977b). Superoxide dismutase assays: A review of methodology. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 11-17. Academic Press Inc., New York.
- MCCORD, J.M., BOYLE, J.A., DAY, E.D. Jr., RIZZOLO, L.J. and SALIN, M. L. (1977c). A manganese-containing superoxide dismutase from human liver. En: Superoxide and Superoxide Dismutase. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord, y I. Fridovich, pp. 129-138. Academic Press Inc., New York.
- MCCORD, J.M. and DAY, E.D., Jr. (1978). Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. FEBS Lett. 86, 139-142.
- MCCORD, J.M. (1979). Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity. En: Reviews in Biochemical Toxicology. Edts. Hodgson, Bond y Philpot., pp. 109-124. Elsevier North Holland, Inc.
- MCLEOD, J.M. and GORDON, J. (1923). J. Pathol. Bacteriol. 26, 332-343.
- MANN, T. and KEILIN, D. (1938). Hemocuprein and hepatocuprein, copper-protein compounds of blood and liver in mammals. Proc. Roy. Soc. (London) B126, 303-315.
- MARKLUND, S. and MARKLUND, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47, 469-474.
- MARKLUND, S. (1976). Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 251, 7504-7507.
- MARKLUND, S. (1978). Purification and characterization of a manganese containing superoxide dismutase from bovine heart mitochondria. Int. J. Biochem. 9, 299-306.

- MARKOSSIAN, K.A., POGHOSSIAN, A.A., PAITIAN, N.A. and NALBANDYAN, R. M. (1978). Superoxide dismutase activity of cytochrome oxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1336-1343.
- MARKOWITZ, H., CARTWRIGHT, G. and WINTROBE, M. (1959). Studies on copper metabolism. XXVII. The isolation and properties of an erythrocyte cuproprotein (cythrocuprein). J. Biol. Chem. 234, 40-45.
- MARMOCCHI, F., VENARDI, G., CAULINI, G. and ROTILIO, G. (1974). Enzyme activity of superoxide dismutase protomers. FEBS Lett. 44, 337-339.
- MARMOCCHI, F., VENARDI, G., BOSSA, F., RIGO, A. and ROTILIO, G. (1978). Dissociation of Cu-Zn superoxide dismutase into monomers by urea. Evidence from gel filtration and molecular hybridization. FEBS Lett. 94, 109-111.
- MARSHALL, M.J. and WORSFOLD, M. (1978). Superoxide dismutase: A direct continuous linear assay using the oxygen electrode. Anal. Biochem. 86, 561-573.
- MASSEY, V., STRICKLAND, S., MAYHEM, S.G., HOWELL, L.G., ENGEL, P.C., MATTHEWS, R.G., SCHUMAN, M. and SULLIVAN, P.A. (1969). Production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavines and flavoproteins with molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 891-897.
- MATSUBARA, H. and SASAKI, R.M. (1969). High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 175-181.
- MEHLER, A.H. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts. Mechanism of the reduction of  $O_2$  and other Hill reagents. Arch. Biochem. Biophys. 33, 65-77.

- MEIER, B. and SCHWARTZ, C. (1980). Properties of the iron-containing superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*. En: Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase. Edits. J.V. Bannister y H.A.O. Hill, pp. 160-167. Elsevier/North-Holland, New York.
- MENANDER- HUBER, K.B. and HUBER, W. (1977). Orgotein, the drug version of bovine Cu-Zn superoxide dismutase. II. A summary account of clinical trials in man and animals. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord y I. Fridovich, pp. 537-549. Academic Press. Inc., New York.
- MICHELSON, A.M. and BUCKINGHAM, M.E. (1974). Effects of superoxide radicals on myoblast-growth and differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 1079-1086.
- MICHELSON, A.M. (1976). Rôle biologique du radical anion superoxyde et des superoxyde-dismutases dans le métabolisme cellulaire. Comptes rendus des séances de la Société de Biologie. 170, 1137-1146.
- MICHELSON, A.M. (1977). Production of superoxide by metal ions. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, pp. 77-86. Academic Press Inc. New York.
- MICHELSON, A.M. (1978). Biological aspects of superoxide dismutase. En: Frontiers in Physicochemical Biology, pp. 309-355. Academic Press Inc., New York.
- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1971). Generation of superoxide radical during the autooxidation of ferredoxins. J. Biol. Chem. 246, 6886-6890.
- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1972a). The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. J. Biol. Chem. 247, 188-192.

- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1972b). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem. 247, 3170-3175.
- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1972c). Generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. J. Biol. Chem. 247, 6960-6962.
- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1972d). The purification and properties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 247, 3410-3414.
- MISRA, H.P. (1974). Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. J. Biol. Chem. 249, 2151-2155.
- MISRA, H.P. and KEELE, B.B. Jr. (1975). The purification and properties of superoxide dismutase from a blue-green alga. Biochim. Biophys. Acta 379, 418-425.
- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1976). Superoxide dismutase and the O<sub>2</sub> enhancement of radiation lethality. Arch. Biochem. Biophys. 176, 577-581.
- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1977a). Superoxide dismutase: "Positive" spectrophotometric assays. Anal. Biochem. 79, 553-560.
- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1977b). Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay. Arch. Biochem. Biophys. 181, 308-312.
- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1977c). Superoxide dismutase and peroxidase: A positive activity stain applicable to polyacrylamide gel electropherograms. Arch. Biochem. Biophys. 183, 511-515.
- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1977d). Purification and properties of superoxide dismutase from a red alga, *Porphyridium cruentum*. J. Biol. Chem. 252, 6421-6423.

- MISRA, H.P. and FRIDOVICH, I. (1978). Inhibition of superoxide dismutases by azide. Arch. Biochem. Biophys. 189, 317-322.
- MOHAMED, M.S. and GREENBERG, D.M. (1953). Isolation of purified copper protein from horse liver. J. Gen. Physiol. 37, 433.
- MOORE, S., SPACKMAN, D.H. and STEIN, W.H. (1958). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. Anal. Chem. 30, 1185-1190.
- MOORE, S. (1963). The determination of cystine as cysteic acid. J. Biol. Chem. 238, 235-237.
- NETA, P. and DORFMAN, L.M. (1968). Pulse radiolysis studies. XIII. Rate constants for the reaction of hydroxyl radicals with aromatic compounds in aqueous solutions. Advan. Chem. Ser. 81, 222-230.
- NINNEMANN, H., STRASSER, R.J. and BUTLER, W.L. (1977). The superoxide anion as electron donor to the mitochondrial electron transport chain. Photochem. Photobiol. 26, 41-47.
- NOGUCHI, T. and NAKANO, M. (1974). Effect of ferrous ions on microsomal phospholipid peroxidation and related light emission. Biochim. Biophys. Acta 368, 446-455.
- OHNISHI, T., HIRATA, F. and HAYAISHI, O. (1977). Indoleamine 2,3-Dioxygenase. Potassium superoxide as substrate. J. Biol. Chem. 252, 4643-4647.
- OKADA, S., KANEMATSU, S. and ASADA, K. (1979). Intracellular distribution of manganic and ferric superoxide dismutases in blue-green algae. FEBS Lett. 103, 106-110.
- ORME-JOHNSON, W.H. and BEINERT, H. (1969). Formation of the superoxide anion radical during the reaction of reduced iron-sulfur proteins with molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 905-11.

- ORNSTEIN, L. (1964). Disc electrophoresis. I. Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-403.
- OSE, D.E. and FRIDOVICH, I. (1976). Reversible removal of manganese and its substitution by cobalt, nickel, or zinc. J. Biol. Chem. 251, 1217-18.
- OSE, D.F. and FRIDOVICH, I. (1979). Manganese-containing superoxide dismutase from *E. coli*: Reversible resolution and metal replacements. Arch. Biochem. Biophys. 194, 360-364.
- OSHINO, N., JAMIESON, D., SUGANO, T. and CHANCE, B. (1975). Optical measurement of the catalase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intermediate (compound I) in the liver of anaesthetized rats and its implication to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production *in situ*. Biochem. J. 146, 67-77.
- PALMER, J.M. (1976). The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 133-157.
- PANCHENKO, L., BRUSOV, O.S., GERASIMOV, A.M. and LOKTAEVA, T.D. (1975). Intramitochondrial localization and release of rat liver superoxide dismutase. FEBS Lett. 55, 84-87.
- PATTERSON, C.O.P. and MYERS, J. (1973). Photosynthetic production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by *Anacystis nidulans*. Plant Physiol. 51, 104-109.
- PAULING, L. (1979). The discovery of the superoxide radical. Trends Biochem. Sci. 4, N 270-N271.
- PEDERSON, T.C. and AUST, S.D. (1972). NADPH-Dependent lipid peroxidation catalyzed by purified NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 789-795.
- PETERS, J.W. and FOOTE, C.S. (1976). Chemistry of superoxide ion. II. Reaction with hydroperoxides. J. Am. Chem. Soc. 98, 873-5.

- PICK, M., RABANI, J., YOST, F. and FRIDOVICH, I. (1974). The catalytic mechanism of the manganese-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli* studied by pulse radiolysis. J. Am. Chem. Soc. 96, 7329-7333.
- PLAUT, Z. and GIBBS, M. (1970). Glycolate formation in intact spinach chloroplasts. Plant Physiol. 45 (4), 470-474.
- PORTER, H. and FOLCH, J. (1957). Cerebrocuprein I. A copper-containing protein isolated from brain. J. Neurochem. 1, 260-268.
- POTTY, V.H. (1969). Determination of proteins in the presence of phenols and pectins. Anal. Biochem. 29, 535-39.
- POUPKO, R. and ROSENTHAL, I. (1973). Electron transfer interactions between superoxide ion and organic compounds. J. Phys. Chem. 77, 1722-1724.
- PRIESTLEY, J. (1975). Experiments and observations on different kinds of air. Vol. II. London.
- PUGET, K. and MICHELSON, A.M. (1974a). Iron-containing superoxide dismutases from luminous bacteria. Biochimie 56, 1255-1267.
- PUGET, K. and MICHELSON, A.M. (1974b). Isolation of a new copper-containing superoxide dismutase bacteriocuprein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 830-838.
- PUGET, K., LAVELLE, F. and MICHELSON, A.M. (1977). Superoxide dismutases from procaryote and eucaryote bioluminescent organisms. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord y I. Fridovich, pp. 139-150. Academic Press Inc., New York.
- PULICH, W.M. (1974). Resistance to high O<sub>2</sub> tensions, streptomycin and UV-irradiation in the green alga *Chlorella sorokiniana*. J. Cell. Biol. 62, 904-907.

- RADMER, R.J. and KOK, B. (1976). Photoreduction of oxygen primes and replaces carbon dioxide assimilation. Plant Physiol. 58, 336-340.
- RAJAGOPALAN, K.V., FRIDOVICH, I. and HANDLER, P. (1962). Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. J. Biol. Chem. 237, 922-28.
- RAJAGOPALAN, K.V., FRIDOVICH, I. and HANDLER, P. (1964). Hepatic aldehyde oxidase. II. Differential inhibition of electron transfer to various electron acceptors. J. Biol. Chem. 239, 2022-2026.
- RAPP, U., ADAMS, W.C. and MILLER, R.W. (1973). Purification of superoxide dismutase from fungi and characterization of the reaction of the enzyme with catechols by electron spin resonance spectroscopy. Can. J. Biochem. 51, 158-171.
- RAVEN, P.H. (1970). A multiple origin for plastids and mitochondria. Science 169, 641-646.
- RAVINDRANATH, S.D. and FRIDOVICH, I. (1975). Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. J. Biol. Chem. 250, 6107-6112.
- REED, G.H. and COHN, M. (1970). Electron paramagnetic resonance spectra of manganese (II)-protein complexes. J. Biol. Chem. 245, 662-667.
- REISS, U. and GERSHON, D. (1976). Rat-liver superoxide dismutase. Purification and age-related modifications. Eur. J. Biochem. 63, 617-623.
- RENGER, G. (1977). A model for the molecular mechanism of photosynthetic oxygen evolution. FEBS Lett. 81, 223-228.
- RICH, P.R. and BONNER, W.D., Jr. (1978). The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 188, 206-213.

- RICHARDSON, D.C. (1977). The three-dimensional structure of Cu,Zn superoxide dismutase. En: Superoxide and Superoxide Dismutases. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord, y I. Fridovich, pp. 217-223. Academic Press Inc., New York.
- RIGO, A., TOMAT, R. and ROTILIO, G. (1974). Determination of the superoxide dismutase activity and rate constants by the polarographic catalytic currents method. Electroanal. Chem. Interf. Electrochem. 57, 291-296.
- RIGO, A., VIGLINO, P. and ROTILIO, G. (1975a). Polarographic determination of superoxide dismutase. Anal. Biochem. 68, 1-8.
- RIGO, A., VIGLINO, P. and ROTILIO, G. (1975b). Kinetic study of  $O_2^{\cdot-}$  dismutation by bovine superoxide dismutase. Evidence for saturation of the catalytic sites by  $O_2^{\cdot-}$ . Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 1013-1018.
- RIGO, A. and ROTILIO, G. (1977). Simultaneous determination of superoxide dismutase and catalase in biological materials by polarography. Anal. Biochem. 81, 157-166.
- RINGBOM, A. (1963). Complexation in analytical chemistry. Edits. P.J. Elving e I.M. Kolthoff. Interscience Publishers. New York/London.
- ROBINSON, J.M., SMITH, M.G. and GIBBS, M. (1980). Influence of hydrogen peroxide upon carbon dioxide photoassimilation in the spinach chloroplast. 1. Hydrogen peroxide generated by broken chloroplasts in an intact chloroplast preparation is a causal agent of the warburg effect. Plant Physiol. 65, 755-759.
- ROTILIO, G., BRAY, R.C. and FIELDEN, E.M. (1972). A pulse radiolysis study of superoxide dismutase. Biochim. Biophys. Acta 268, 605-609.
- ROTILIO, G., MORPURGO, L., CALABRESE, L. and MONDOVI, B. (1973). Mechanism of superoxide dismutase reaction of the bovine enzyme with hydrogen peroxide and ferrocyanide. Biochim. Biophys. Acta 302, 229-235.

- SALIN, M.L. and McCORD, J.M. (1974). Superoxide dismutases in polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest. 54, 1005-1009.
- SALIN, M.L., DAY, E.D., Jr. and CRAPO, J.D. (1978). Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 187, 223-228.
- SALIN, M.L. and BRIDGES, S.M. (1980). Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from *Brassica campestris*. En: The Significance of Superoxide and Superoxide Dismutase. Vol. 1. Chemical and Biochemical Aspects. Edits. J.V. Bannister y H.A.O. Hill pp. 176-184. Elsevier/North-Holland, New York.
- SATO, S. and HARRIS, J.I. (1977). Superoxide dismutase from *Thermus aquaticus*. Eur. J. Biochem. 73, 373-381.
- SATO, S. and NAKAZAWA, K. (1978). Purification and properties of superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB8. J. Biochem. 83, 1165-1171.
- SAWADA, Y., OHYAMA, T. and YAMAZAKI, I. (1972). Preparation and physicochemical properties of green pea superoxide dismutase. Biochim. Biophys. Acta 268, 305-312.
- SCRUTTON, M.C. (1971). Purification and some properties of a protein containing bound manganese (avimanganin). Biochemistry 10, 3897-3905.
- SCHWARZ, R.M. and DAYHOFF, M.O. (1978). Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. Science, 199, 395-403.
- SLYKHOUSE, T.O. and FEE, J.A. (1976). Physical and chemical studies on bacterial superoxide dismutases. Purification and some anion binding properties of the iron-containing protein of *Escherichia coli*. B. J. Biol. Chem. 251, 5472-5477.

- SMIT, J.D.G., PULVER-SLADEK, J. and JANSONIUS, J.N. (1977). Preliminary X-ray diffraction studies of orthochombic crystals of superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*. J. Mol. Biol. 112, 491-494.
- SMITH, E.L. (1970). Evolution of enzymes. En: The Enzymes. 3<sup>rd</sup> edition Vol. 1. Ed. P.D. Boyer, p. 267. Academic Press, New York.
- STEINMAN, H.M. and HILL, R.L. (1973). Sequence homologies among bacterial and mitochondrial superoxide dismutases. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 3725-3729.
- STEINMAN, H.M., NAIK, V.R., EBERNETHY, J.L. and HILL, R.L. (1974). Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Complete amino acid sequence. J. Biol. Chem. 249, 7326-7338.
- STEINMAN, H.M. (1978). The amino acid sequence of manganese superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. J. Biol. Chem. 253, 8708-8720.
- SUN, M. and ZIGMAN, S. (1978). An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. Anal. Biochem. 90, 81-89.
- TAKAHAMA, U. and NISHIMURA, M. (1975). Formation of singlet molecular oxygen in illuminated chloroplasts. Effects on photoinactivation and lipid peroxidation. Plant and Cell Physiol. 16, 737-748.
- TAUBE, H. (1965). Mechanisms of oxidations with O. J. Gen. Physiol. 49, 29-50.
- TELFER, A., CAMMACK, R. and EVANS, M.C.W. (1970). Hydrogen peroxide as the product of autoxidation of ferredoxin: reduced either chemically or by illuminated chloroplasts. FEBS Lett. 10, 21-24.

- TIKHOMIROVA, N.N. and NIKOLEVA, I.V. (1980). The coordinatively-insaturated manganous ions in the synthetic zeolites as studied by ESR methods. En: Proceeding of the Fifth International Conference on Zeolites. Edit. L.V.C. Rees, pp. 230-233. Heyden, London.
- TOWE, K.M. (1978). Early precambrian oxygen: a case against photosynthesis. Nature 274, 657-661.
- TROZZOLO, A.M. (1970). Singlet oxygen and possible mimics in sensitized photooxygenations. Ann. N.Y. Acad. Sci. 171, 61-66.
- TYLER, D.D. (1975a). Role of superoxide radicals in the lipid peroxidation of intracellular membranes. FEBS Lett. 51, 180-183.
- TYLER, D.D. (1975b). A protective function of superoxide dismutase during respiratory chain activity. Biochim. Biophys. Acta 396, 335-346.
- TYLER, D.D. (1975c). Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. Biochem. J. 147, 493-504.
- VALENTINE, J.S. and PANTOLIANO, M.V. (1980). Metal binding properties of copper-zinc superoxide dismutase. En: The Significance of Superoxide and Superoxide Dismutase. Vol. 1. Chemical and Biochemical Aspects. Edits. J.V. Bannister y H.A.O. Hill, pp. 254-264. Elsevier/North-Holland, New York.
- VAN HEMMEN, J.J. and MEULING, W.J.A. (1975). Inactivation of biologically active DNA by  $\gamma$ -ray-induced superoxide radicals and their dismutation products singlet molecular oxygen and hydrogen peroxide. Biochim. Biophys. Acta 402, 133-141.
- VAN HEMMEN, J.J. and MEULING, W.J.A. (1977). Inactivation of *Escherichia coli* by superoxide radicals and their dismutation products. Arch. Biochem. Biophys. 182, 743-748.

- VANCE, P.G., KEELE, B., Jr. and RAJAGOPALAN, K.V. (1972). Superoxide dismutase from *Streptococcus mutans*. Isolation and characterization of two forms of the enzyme. J. Biol. Chem. 247, 4782-4786.
- VANOPDENBOSCH, B., CRICHTON, R.R. and PUGET, K. (1977). Chemical modification studies on a ferri-superoxide dismutase from marine bacteria. En: Superoxide and Superoxide Dismutase. Edits. A.M. Michelson, J.M. McCord y I. Fridovich, pp. 199-205. Academic Press Inc., New York.
- VILLAFRANCA, J.J., YOST, F.J. and FRIDOVICH, I. (1974). Magnetic resonance studies of manganese (III) and iron (III) superoxide dismutases. J. Biol. Chem. 249, 3532-3536.
- VON KAMEKE, E. and WEGMANN, K. (1977). Isolation of manganese-containing subchloroplast fractions from *Dunaliella*. Plant Science Letters 8, 1-5.
- WALKER, D.A. (1971). Chloroplasts (and grana): Aqueous (including high carbon fixation ability). En: Methods in Enzymology. Ed. A. San Pietro, pp. 211-220. Academic Press, New York.
- WEBER, K. and OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-12.
- WEISIGER, R.A. and FRIDOVICH, I. (1973a). Superoxide dismutase. Organelle specificity. J. Biol. Chem. 248, 3582-92.
- WEISIGER, R.A. and FRIDOVICH, I. (1973b). Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J. Biol. Chem. 248, 4793-6.
- WEISS, S.J., RUSTAGI, P.K. and LOBUGLIO, A.F. (1978). Human granulate generation of hydroxyl radical. J. Exp. Med. 147, 316-323.

- WESER, U., PRINZ, R., SCHALLIES, A., FRETZDORFF, A., KRAUS, P., VOELTER, W. and VOETSCH, W. (1972). Microbial and hepatic cuprein (superoxide dismutase). Isolation and characterization of cuprein from *Saccharomyces cerevisiae* and bovine liver. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 1821-1831.
- WILDNER, G.F. (1976). The role of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase and its oxygenase activity in the events of photorespiration. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 89, 349-360.
- WINTERBOURN, C.C. (1979). Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. Biochem. J. 182, 625-628.
- WRIGLEY, C. (1968). Gel electrofocusing. A technique for analyzing multiple protein samples by isoelectric focusing. Science Tools (LKB Instrument Journal). 15, 17-23.
- YAMAKURA, F. (1976). Purification, crystallization and properties of iron-containing superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*. Biochim. Biophys. Acta 422, 280-294.
- YAMAKURA, F., SUZUKI, K. and MITSUI, Y. (1976). Crystallization and preliminary crystal data of iron-containing superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*. J. Biol. Chem. 251, 4792-4793.
- YAMAKURA, F. (1978). A study on the reconstitution of iron-superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*. J. Biochem. 83, 849-857.
- YATES, M.G. (1977). Physiological aspects of nitrogen fixation. In: Recent Developments in Nitrogen Fixation. Edits. W. Newton, J.R. Postgate y C. Rodriguez-Barrueco, pp. 219-270. Academic Press, London.
- YOST, F.J., Jr. and FRIDOVICH, I. (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 248, 4905-4908.

ZIMMERMAN, R., FLOHE, L., WESER, V. and HARTMANN, H.J. (1973). Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase. FEBS Lett. 29, 117-120.



Biblioteca Universitaria de Granada



01052362