

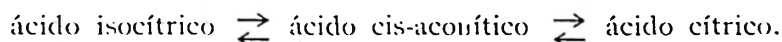
Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología General de Valencia

Sobre la naturaleza sulfhidrónica de los grupos activos en la aconitasa

por Santiago Grisolia, Becario "Juan de la Cierva" en Medicina

(Recibida para publicar el 29 de octubre de 1950)

Como ha sido demostrado por numerosos investigadores (8-3) el ácido cítrico juega un papel muy importante en el metabolismo intermediario. El ácido cítrico puede formarse por deshidratación catalítica enzimática del ácido isocítrico seguida por hidratación catalítica enzimática del ácido cis-aconítico. Aunque poco se sabe por el mecanismo íntimo de la reacción y aunque varios esquemas han sido propuestos, el más favorecido ha sido el de Johnson (7) y Martius (13) de acuerdo con la reacción:



Aunque la naturaleza de la catálisis enzimática de la reacción no ha sido bien establecida existen como mínimo dos posibles mecanismos: A) que la misma enzima sea capaz de actuar sobre ambos substratos, ácidos isocítrico y cis-aconítico, que presupone la existencia de dos «centros activos» a uno de los cuales se uniría el ácido isocítrico y al otro el ácido cis-aconítico. B) que existan dos enzimas distintas que operen de una manera independiente entre el ácido iso-cítrico, el cis-aconítico y el ácido cítrico.

A fin de obtener más información acerca de la naturaleza de la formación enzimática del ácido cítrico a partir de los ácidos cis-aconítico e isocítrico hemos realizado algunas investigaciones sobre la enzima aconitasa que se presentaron en varias comunicaciones. La primera de éstas se refiere a la naturaleza de los grupos -SH del enzima. Como es sabido Jacobsen (6) ha demostrado que el ácido iodoacético no inhibe la aconitasa. A partir de estos experimentos se ha aceptado que la enzima no requiere la presencia de grupos sulfhidrilos activos. Es conocido que el ácido iodoacético, a semejanza de otros agentes alquilantes, posee

afinidad muy limitada para los grupos -SH (1-16). Por ello creímos interesante comprobar la necesidad de grupos -SH activos para la actividad enzimática de la aconitasa. Para esto empleamos otros reactivos, particularmente compuestos capaces de formar mercaptanes. Nuestros experimentos demuestran que la actividad de la aconitasa puede inhibirse por concentraciones relativamente pequeñas de los ácidos p-Cl-Hg-benzoico y o-iodosobenzoico.

Métodos

Se utilizaron dos tipos diferentes de preparaciones enzimáticas que de aquí en adelante se referirán como preparación A ó B.

Preparación A. — Músculo de corazón de cerdo o del pectoral de palomas. Se extrae con ayuda de tampón de fosfato a pH 7,4 y a la concentración de 0.05 molar. La proporción de tejido a líquido de extracción es de 1/5. La extracción se lleva a cabo en un extractor del tipo conocido con el nombre de Waring Blendor durante 4-5 minutos. La suspensión así obtenida se centrifuga a 1.800 revoluciones por minuto durante 15 minutos. El líquido sobrenadante se separa, trata con ácido acético 1 normal hasta un pH de 4.8-5.0, y se centrifuga de nuevo a la misma velocidad y por el mismo tiempo con lo que se separa un nuevo precipitado. El líquido sobrenadante es claro, de color rojo intenso; después de ajustado a pH 7.2-7.4 con ayuda de NaOH 0.25 N, y diluido a un volumen doble del original posee gran actividad aconitásica. Todas las manipulaciones descritas se realizan en una habitación mantenida a dos grados centígrados.

Preparación B. — Se obtiene esencialmente por fraccionamiento con sulfato amónico, de acuerdo con el método descrito por Ochoa (14).

Substratos. — El ácido cis-aconítico se obtuvo por el método de Bruce (4) y Malachowski (10). El ácido isocítrico se sintetizó por el método de Vickery (15).

Inhibidores y reactivadores. — Los ácidos para-cloro-mercurobenzoico y ortoiodoso-benzoico nos fueron generosamente proporcionados por los doctores L. Hellerman y E. S. G. Barron. La idoacetamida y el 2-3-dimercaptopropanol (Bal) nos fueron amablemente cedidos por el doctor Barron.

El glutatión y ácido iodoacético fueron productos comerciales de la casa Merck & Co.

Determinación del ácido cítrico. — Se empleó el método colorimétrico de Speck y colaboradores (17).

Resultados

1. La inhibición de aconitasa por el ácido para-cloro-mercuribenzoico.

Como puede verse en la figura 1 este reactivo inhibe poderosamente ambas preparaciones A y B. Es evidente que no existe diferencia en la inhibición cuando se usa cis-aconitato o isocitrato como substratos. Como es sabido, a fin de satisfacer plena-

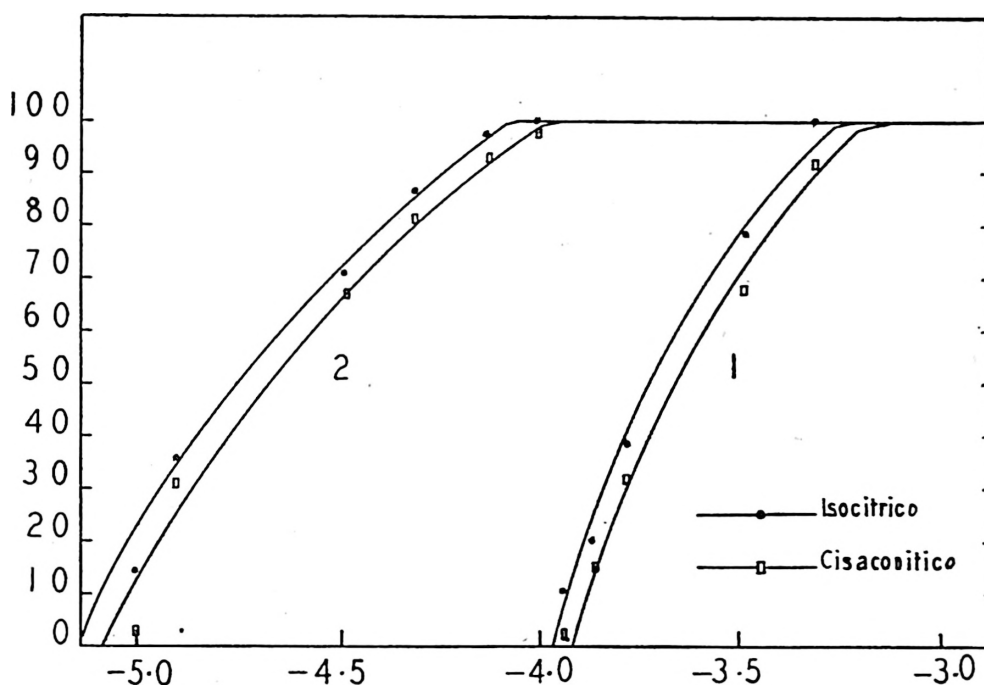


Figura 1. La inhibición de la aconitasa por el para-cloro-mercuribenzoato. En ordenadas, % de inhibición; en abscisas, log. de la concentración molar final del inhibidor. El par de curvas designado por 1 se refiere a experimentos realizados con la preparación A. El par de curvas designado por 2 se refiere a experimentos realizados con la preparación B. Los experimentos se llevaron a cabo incubando 0.5 cc. de la preparación A ó 0.3 cc. de la preparación B. La incubación se realizó en presencia de 0.3 cc. de tampón de fosfato a pH 7.4 y agua destilada en un volumen final de 2.9 cc. a 25° por cinco minutos. Entonces se añadió 0.1 cc. de cis-aconitato o isocitrato en una concentración final de 1.9×10^{-3} molar. Incubación por 40 minutos para el cis-aconitato y 53 minutos para el isocitrato. Temperatura 25°. En ausencia de el inhibidor se forman 3.5-4.0 mg. de ácido cítrico. En la figura se indica la concentración del inhibidor.

mente el criterio de necesidad de grupos -SH en un enzima es necesario no solamente el inhibir la actividad enzimática con un reactivo específico, sino demostrar también la reactivación de preparaciones parcialmente inactivas con ayuda de compuestos tales como Glutathion o Bal capaces de producir la reversión de la formación de mercaptanes. En experimentos dirigidos a este fin he-

PREPARACION	MOLARIDAD DE PARA-CLORO-MERCURI-BENZOATO AÑADIDO	CIS-AFONITATO			ISO-CITRATO		
		INHIBIDOR SOLAMENTE	EN PRESENCIA DE GLUTATION	EN PRESENCIA DE BAL	INHIBIDOR SOLAMENTE	EN PRESENCIA DE GLUTATION	EN PRESENCIA DE BAL
YO INHIBICION							
A	6.68×10^{-4}	99.0	84.5	50.0	100.0	92.5	60.0
A	5.0×10^{-4}	91.5	44.0	13.0	99.0	64.0	30.0
A	3.3×10^{-4}	67.5	15.0		79.0	45.0	
B	1×10^{-4}	96.0	60.0		99.0	75.0	
B	5×10^{-5}	81.0	5.0		84.0	45.0	

Tabla 1. Inhibición de la aconitasa por formación de mercaptano y reversibilidad de la inhibición por tioles de bajo peso molecular. Las concentraciones de enzima y sustratos son las mismas que las empleadas en la figura 1. Así como el volumen y la temperatura. La concentración del inhibidor se indica en la tabla. Después de un intervalo de 5-10 minutos de incubación con el inhibidor se añade glutatión o BAL en concentraciones 10 y 5 veces mayores respectivamente que la concentración de inhibidor. La incubación se prolonga por otros 10 minutos antes de completar el sistema con isocitrato o cis-aconitato.

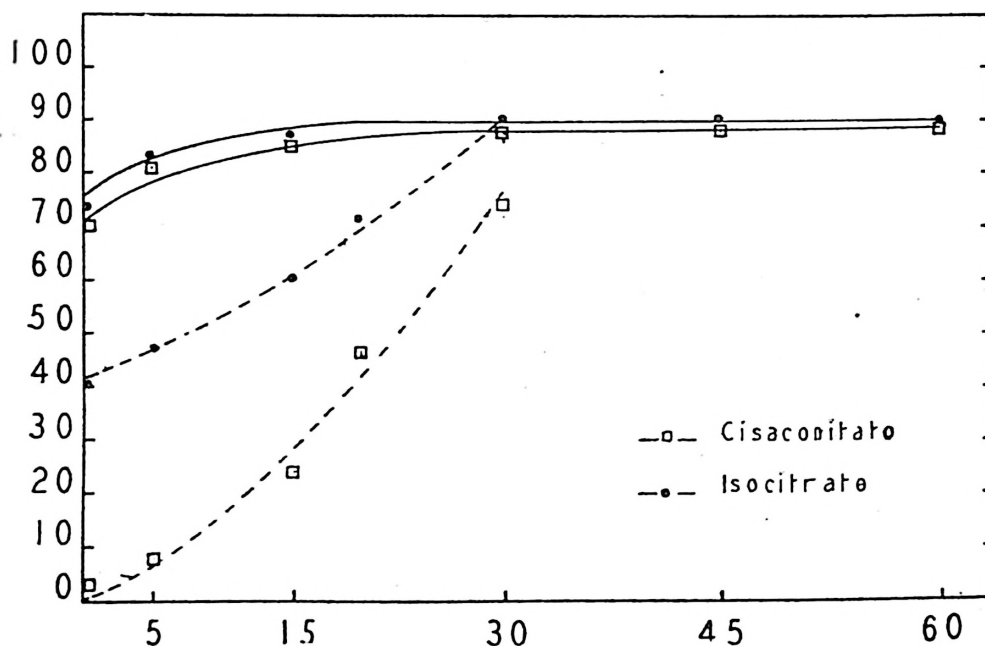


Figura 2. Efecto del tiempo de incubación de enzima con el inhibidor en presencia y ausencia de reactivador. 0.5 cc. de la preparación B fueron incubados con para-cloro-mercuri-benzoato con 5×10^{-5} molar en presencia de tampón fosfato por los tiempos indicados en la figura. Las líneas de puntos representan los valores experimentales obtenidos cuando se añade glutatión 5×10^{-4} molar. Las líneas sólidas representan el efecto del inhibidor sin reactivador. Cis-aconitato e isocitrato fueron añadidos a la misma concentración final que en los experimentos anteriores.

mos podido comprobar la reactivación de preparaciones de aconitasa por glutatión y Bal en presencia de inhibidores como se demuestra en la Tabla I.

Es interesante observar que la reactivación es más fácil de obtener si se emplea como sustrato el ácido cis-aconítico que el isocítrico.

Esta diferencia en reactivación se demuestra gráficamente en la figura 2. Es interesante que la diferencia en la reactivación entre

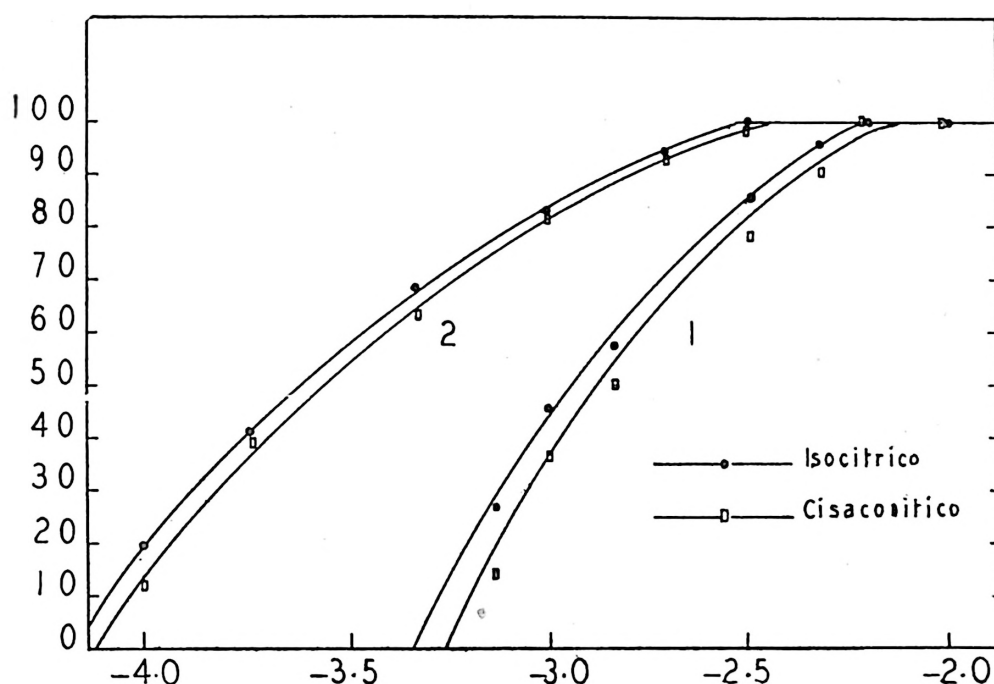


Figura 3. La inhibición de la aconitasa por el orto-iodoso-benzoato. En ordenadas, % de inhibición; en abscisas, log. de la concentración molar final del inhibidor. Las condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la figura 1. Asimismo el grupo de curvas 1 se refiere a experimentos realizados con la preparación A y el grupo de curvas designado con el número 2 se refiere a experimentos realizados con la preparación B. En la figura se indica la concentración del inhibidor.

el sistema cuyo sustrato es el cis-aconitato y el sistema que emplea el isocitrato se hace menor cuando se aumenta el tiempo de incubación.

2. La inhibición de aconitasa por el ortoiodosobenzoato.

Como es sabido, este reactivo fué introducido por Hellerman y colaboradores como un agente oxidante capaz de actuar sobre grupos $-SH$ (5). Observando la figura 3 se deduce que dicho reactivo actúa inhibiendo a la aconitasa. No puede observarse diferen-

cia alguna en la inhibición si se substituye el cis-aconitato como substrato por el iso-citrato.

3. *Efecto de la amida del ácido iodoacético y del ácido iodoacético.*

En confirmación del experimento de Jacobson (6) no hemos apreciado inhibición alguna de la enzima por el ácido iodoacético hasta 1×10^{-2} de concentración final molar. De una manera similar al ácido iodoacético, su amida no posee efecto alguno sobre la enzima a las mismas concentraciones.

Discusión

Es fácil deducir, a partir de los experimentos anteriormente expuestos que la enzima aconitasa requiere integridad de sus grupos sulfhidrúlicos para su actividad enzimática.

Dada la susceptibilidad de la enzima para reactivos capaces de inhibir grupos sulfhidrúlicos, se intentó utilizar esta propiedad para dilucidar la presencia de una o dos aconitasas y para ello se emplearon varios inhibidores en presencia de ambos substratos, cis-aconitato e iso-citrato. Aunque no ha podido apreciarse diferencia alguna en la inhibición en las condiciones experimentales anteriormente expuestas, hemos podido observar una marcada diferencia en lo que se refiere a la reversibilidad de la inhibición. La relativa mayor facilidad para la reactivación cuando se emplea el cis-aconitato como substrato indica que se debe a que el punto de unión de ambos substratos, aunque situado en la misma proteína, lo está en distintos puntos de la superficie enzimática. Tal hipótesis supone que los grupos sulfhidrilos de la enzima toman parte, de manera hasta ahora desconocida, en la formación del complejo enzima-substrato.

Bailey (2) estudiando el sistema ATP-asa (miosina) encuentra que aparentemente el ATP (adenosintrifosfato) se une a la miosina a través de grupos sulfhidrilos, lo que apoya la hipótesis anteriormente expuesta.

El que la diferencia en la reactivación de ambos sistemas decrezca con el incremento en el tiempo de incubación quizás pueda explicarse admitiendo se formen mayores cantidades de ácido isocítrico al aumentar el tiempo de la incubación cuando se utiliza como substrato el cis-aconitato. Por lo tanto, en incubaciones prolongadas el sistema que emplea el cis-aconitato como substrato se comporta de manera semejante al sistema que emplea como substrato el iso-citrato.

Añadamos para terminar que el doctor Hale (de la Universidad

de California, Los Angeles, Cal.) nos indica que utilizando las condiciones experimentales usadas por nosotros es muy probable que el ácido paracloro-mercuri-benzoico se descomponga rápidamente y que por lo tanto el efecto inhibitor de este compuesto se deba en gran parte a la formación de mercurio inorgánico. Como es sabido, ambos tipos de compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio son capaces de formar mercaptanes (*).

Resumen y conclusiones

1. Se demuestra la inhibición de la aconitasa por el ácido p-cloro-mercuribenzoico. Esta inhibición es de igual magnitud para los dos sustratos, ácido isocítrico y ácido cis-aconítico.
2. La adición de glutathion o de BAL revierte la inhibición producida por el ácido p-cloro-mercúrico, siendo este efecto mayor cuando se usa como sustrato el ácido cis-aconítico.
3. El estudio de la cinética de los procesos reaccionales de inhibición y reactivación mostraron que en los primeros 20 minutos de acción del inhibidor sobre el sustrato, la reactivación es más amplia en el sistema cis-aconítico que en el isocítrico, haciéndose menor la diferencia transcurrido dicho tiempo.
4. El ácido o-iodoso-benzoico inhibe también la aconitasa en igual proporción para ambos sustratos.
5. El iodoacetato y la iodoacetamida no producen inhibición de la aconitasa.
6. La aconitasa, por tanto, requiere para su actividad que sus grupos sulfhidrúlicos permanezcan intactos.

Summary

1. The inhibition of aconitase by p-chloromercuribenzoic acid has been demonstrated. No difference in the extent of inhibition was observed when either isocitric or cis-aconitic acid was used as substrate.
2. It has been shown that the inhibition produced by p-chloromercuric acid could be reversed by the addition of glutathione or BAL and that the reversal was greater when cis aconitic acid was used as substrate.
3. The kinetics of inhibition and reactivation were studied and revealed that reactivation of the cis-aconitici acid system is more extensive than that of the isocitric acid system in the initial 20 minutes of the reaction of inhibitor with the enzyme. As the reaction proceeds, this difference becomes less marked.
4. O-iodoso-benzoic acid was also found to inhibit aconitase. The extent of this inhibition was identical for both substrates.

(*) Estos experimentos fueron iniciados durante la estancia del autor en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Chicago. El autor se complace en agradecer las numerosas facilidades proporcionadas por el Prof. E. A. Evans Jr. Así mismo la desinteresada colaboración del Dr. K. J. Altman en muchos experimentos aquí aportados. También quiere agradecer las amables y valiosas sugerencias del Prof. E. S. G. Barrón.

5. Iodoacetate, iodoacetamide, were found to be ineffective as inhibitors of aconitase.
6. It is concluded that aconitase is an enzyme requiring an intact sulfhydryl groups for its activity.

Bibliografía

- (1) BARRON, E. S. G. and Singer, T. P. : *J. Biol. Chem.*, **157**, 241. 1945.
- (2) BAYLEY, K., and Perry, S. V. : *Biochem. J.* **41**, XXII 1947.
- (3) BREUSCH, F. L. : *Z. physiol. Chem.*, **250**, 262. 1937.
- (4) BRUCE, W. F. : *Organic Syntheses*, **17**, 1. 1937.
- (5) HELLERMAN, L., CHINARD, F. P. and RAMSDELL, P. A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2551. 1941.
- (6) JACOBSON, K. P. and TAPADINHAS, J. : *Enzymologia*, **5**, 388. 1939.
- (7) JOHNSON, W. A. : *Biochem. J.* **33**, 1046. 1939.
- (8) KNOOP, F. and MARTIUS, C. : *Z. physiol. Chem.* **242**, I. 1936.
- (9) KREBS, H. A. and JOHNSON, W. A. : *Enzymologia*, **4**, 148. 1937.
- (10) MALACHOWSKI, R., GIEDROYS, M. and JERZMANOWSKA : *Z. Ber.*, **61**, 2525. 1928.
- (11) MARTIUS, C. : *Z. physiol. Chem.*, **247**, 104. 1937.
- (12) MARTIUS, C. and KNOOP, F. : *Z. physiol. Chem.* **246**, I. 1937.
- (13) MARTIUS, C. : *Z. physiol. Chem.* **257**, 29. 1938.
- (14) OCHOA, S. and KORNBERG, A. : Comunicación personal.
- (15) PUCHER, G. W. and VICKERY, H. B. : *J. Biol. Chem.* **163**, 169. 1946.
- (16) SINGER, T. P. and BARROW, E. S. G. : *J. Biol. Chem.* **157**, 241. 1945.
- (17) SPECK, J. F. MOULDER, J. W. and E. A. EVANS, Jr. : *J. Biol. Chem.* **164**, 119. 1946.