

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Departamento de Bioquímica, Madrid
(Director: Prof. A. Santos-Ruiz)

Estudios sobre carboxilasas

IV. — Inhibición competidora de la descarboxilasa tirosínica por la acción de la tiramina. Determinación de la constante de inhibición.

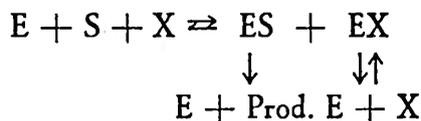
por R. Díaz Cadavieco y G. de la Fuente Sánchez

(Recibido para publicar el 12 de noviembre de 1954)

En una publicación anterior (1), hemos estudiado el efecto de la concentración de sustrato (L-tirosina) sobre la velocidad de reacción de la descarboxilasa tirosínica, es decir, consideramos el equilibrio:

Enzima + Sustrato \rightleftharpoons Enzima-sustrato \rightarrow Enzima + Productos de la reacción y observamos que nuestros datos experimentales, se ajustan a la ecuación de velocidad dada por Michaelis-Menten, calculando a partir de ellos la constante de Michaelis K_s .

El objeto del presente trabajo es estudiar la acción de la tiramina sobre el anterior equilibrio, o sea, considerar este otro de carácter más general:



en donde E, S y X representan el enzima, el sustrato y la tiramina respectivamente.

Hasta el momento se ha ensayado el comportamiento de numerosas substancias añadidas a dicho equilibrio a fin de es-

clarecer la naturaleza del cofermento. Así se ha visto que las descarboxilasas bacterianas de los aminoácidos se inhiben por los reactivos del grupo aldehído, como la hidracina, la hidroxilamina y semicarbazida (4). Posteriormente se encontró que la hidroxilamina es un inhibidor competidor de la descarboxilasa del ácido glutámico (12), y poco después, al ensayar la acción inhibidora de compuestos relacionados estructuralmente con el ácido glutámico, se ha comprobado que también el ácido α metilglutámico es un inhibidor competidor de dicho enzima (13).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA INHIBICIÓN

Teniendo en cuenta su mecanismo de acción, los inhibidores se pueden clasificar de una manera general en competidores y no competidores.

Aquellos compuestos que son análogos en estructura a la molécula de sustrato, pueden competir con él para unirse con ciertos grupos activos del enzima, evitando así la formación del complejo enzima-sustrato y, por lo tanto, reduce la actividad catalítica total.

El grado de inhibición dependerá en este caso de la concentración relativa del sustrato e inhibidor, así como de la afinidad del enzima para estos dos compuestos. Un ejemplo bien conocido lo tenemos en la inhibición de la deshidrogenasa del ácido succínico por el ácido malónico (11).

Pero también se presenta el caso de que el inhibidor y el grupo prostético o cofermento, puedan competir respecto al apoenzima. En este caso el grado de inhibición dependerá de la concentración relativa de los compuestos competidores y de la afinidad del apoenzima respecto a ellos. A este caso pertenece la inhibición del citocromo c por atebriina (6).

Inhibidores no competidores son aquellos que inhiben una reacción independientemente del sustrato o del grupo prostético, es decir, el grado de inhibición depende únicamente de la concentración del inhibidor, y por lo tanto, es independiente de la concentración del sustrato o del grupo prostético.

La inhibición no competidora al igual que la inhibición por competencia, tiene lugar por la acción de sustancias análogas al sustrato; pero cuando se presentan las dos formas de inhibición en un enzima, las sustancias que dan lugar a una inhibición por competencia son de una estructura más parecida a la del sustrato (9).

La cinética de la inhibición enzimática está basada en la teoría de Michaelis-Menten a quienes se deben los primeros es-

tudios en este campo. Posteriormente ha sido tratada por diferentes autores (3, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 16).

En el caso de la inhibición por competencia hay que considerar dos reacciones reversibles: la formación del complejo enzima-substrato (ES), y la formación del complejo enzima-inhibidor (EI).



Aplicando principios cinéticos elementales y el cálculo matemático, se tiene:

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

siendo: K_i = constante de disociación de EI
 K_s = " " " ES
 $[I]$ = concentración molar de inhibidor
 $[S]$ = " " " substrato
 v = velocidad de la reacción en ausencia de inhibidor
 v_i = velocidad de la reacción cuando la concentración de inhibidor es $[I]$
 V = velocidad máxima de la reacción en presencia de inhibidor

Hunter y Downs (9) introducen el término «actividad fraccional» (α) en lugar de v_i/v , con lo que resulta, después de sustituir $K_i + \frac{K_i}{K_s} [S] = C$ y hacer transformaciones, la siguiente ecuación:

$$[I] \frac{\alpha}{1 - \alpha} = C \quad (1)$$

en donde C es una constante proporcional a la concentración de substrato.

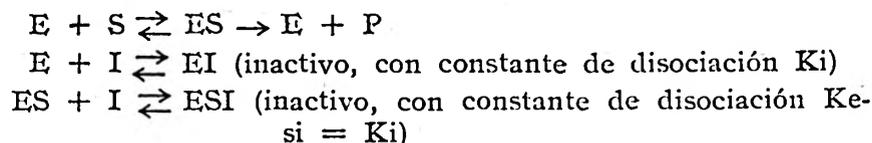
La ecuación anterior se puede escribir como sigue:

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{K_s}{K_i} \frac{[I]}{K_s + [S]} \quad (2)$$

Lineweaver y Burk (10) dan la siguiente ecuación de velocidad:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{V} + \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \frac{K_s}{V} \frac{[S]}{1} \quad (3)$$

En la inhibición estrictamente no competitiva el inhibidor se combina con el enzima y el compuesto enzima-sustrato (ES) con igual afinidad. En este caso hemos de considerar los siguientes equilibrios:



Manejando principios elementales de cinética y aplicando el cálculo matemático, tenemos:

$$K_i = \frac{[I]}{1 - v_i/v} = \frac{[I] \alpha}{1 - \alpha}; \quad (4), \quad \alpha = \frac{v_i}{v}$$

La ecuación anterior se puede escribir:

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{[I]}{K_i}; \quad (5)$$

y combinando esta última con la ecuación de Michealis-Menten en ausencia de inhibidor, tenemos:

$$\frac{1}{v_i} = \left[1 + \frac{[I]}{K_i} \right] \left[\frac{1}{V} + \frac{K_s}{V} \frac{1}{[S]} \right] \quad (6)$$

Determinación práctica del tipo de inhibición. — Umbreit y colaboradores (15) han señalado que la sola observación de la constancia de la inhibición a una concentración dada de inhibidor al variar la concentración de sustrato, no es suficiente para establecer que la inhibición es con competencia o sin ella. Es más seguro aplicar las ecuaciones derivadas de Lineweaver y Burk.

1. De las ecuaciones núm. 3 y 6 se deduce que si previamente hemos determinado la velocidad de la reacción (v), al variar lo más posible la concentración de sustrato (S), para dos o más concentraciones de inhibidor, y representamos $1/v$ frente al recíproco de la concentración de sustrato ($1/[S]$), obtendremos líneas rectas con las siguientes características:

a) En ausencia de inhibidor resultan líneas rectas cuyos coeficientes pendiente/ordenada en el origen es igual a K_s , y son, por consiguiente, constantes.

b) Si la inhibición es rigurosamente competitiva (ecuación núm. 3) la ordenada en el origen es constante, pero la pendiente aumenta por ser igual a $1 + [I]/K_i$. La K_s aparente (=pendiente/ordenada en el origen) aumenta.

c) En el caso de la inhibición no competidora la pendiente y la ordenada en el origen varían en la misma proporción, de modo que K_s permanece constante (ecuación núm. 6).

2. Otro método apropiado para distinguir entre inhibición exactamente con competencia o sin competencia, se basa en las ecuaciones núm. 2 y 5.

Representando v/v_i frente a $[I]$ para dos o más valores de $[S]$, si el inhibidor es competidor se obtienen líneas rectas con una sola ordenada en el origen pero diferente pendiente; si es no competidora, las líneas coinciden en una sola, puesto que en la ecuación correspondiente no interviene la variable S .

3. Finalmente, con las ecuaciones de Hunter y Downs (ecuaciones núm. 1 y 4), representando en ordenadas $[I]^a / (1 - a)$ frente a $[S]$ en abscisas, los puntos experimentales están sobre una recta cuya ordenada en el origen es K_i ; si la inhibición es sin competencia la recta es paralela al eje de abscisas, y en la inhibición con competencia se obtiene una línea recta ascendente.

Material y métodos

Fermento. — Como fuente de la descarboxilasa tirosínica se utiliza el microorganismo *Streptococcus faecalis* (A. T. C. C. 8.043).

La composición del medio de cultivo, su preparación, conservación, trasplantes y siembra se procede exactamente igual que en nuestra anterior publicación (1).

TÉCNICA MANOMÉTRICA DE WARBURG

1. *Aparato.* — Para determinar la velocidad de descarboxilación se ha utilizado el aparato de Warburg (15).

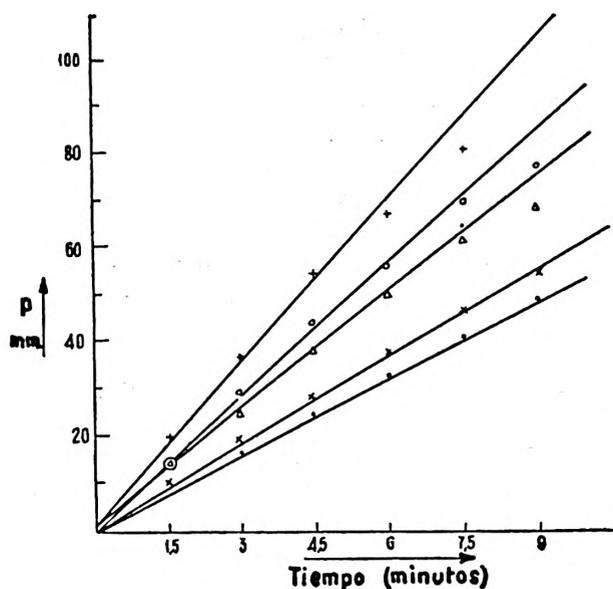
2. *Substrato.* — Hemos empleado como substrato soluciones sobresaturadas de L-tirosina (B. D. H.) en solución amortiguadora de acetato sódico M/5 de pH 5'5. Las tres series de experiencias que hemos realizado se efectúan manteniendo constante la concentración de substrato en cada una de ellas y variando la concentración de inhibidor (tiramina).

3. *Fermento.* — El polvo de microbio se disuelve en el tampón de acetatos obteniendo una solución opalescente debido a los restos celulares. Se coloca un volumen de 0'3 cc. en el brazo lateral del vaso. Hemos trabajado con una concentración constante de fermento de 7'5 mg./vaso.

4. *Inhibidor.* — Utilizamos tiramina (Schuchardt) que previamente pesada se pone en el compartimento principal en estado sódico antes de añadir la L-tirosina.

En cada una de las tres series de experiencias que hemos efectuado, trabajamos con cuatro concentraciones distintas de tiramina.

5. *Descarboxilación.* — Todas las experiencias de descarboxilación se han realizado a 30° C. Hemos trabajado en iguales condiciones que en nuestra anterior publicación, con la única diferencia que después de volcar la tirosina y esperar dos minutos



Tiempo (minutos)	0	1.5	3	4.5	6	7.5	9
------------------	---	-----	---	-----	---	-----	---

1	lecturas (l)	81	100	117	138	149	162	162
	$p_0 + c$ mm. (corregida)	0	19	36	54	67	80	86

2	\bar{p}	82	96	108	122	131	144	151
	$\bar{p}_0 + c$ mm.	0	14	26	39	49	61	68

3	\bar{p}	78	90	105	121	131	145	154
	$\bar{p}_0 + c$ mm.	0	14	29	44	55	68	77

4	\bar{p}	144	144	144	145	144	145	145
	$\bar{p}_0 + c$ correctada	0	0	0	+1	0	+1	+1

5	\bar{p}	50	60	70	80	88	97	105
	$\bar{p}_0 + c$ mm.	0	10	20	29	38	46	54

6	\bar{p}	79	88	96	106	112	122	129
	$\bar{p}_0 + c$ mm.	0	9	17	28	33	42	49

Vaso	Tiramina	Signo	pendiente en el gráfico	Constante del vaso (paq.)	Velocidad de descarboxilación por vaso	Velocidad de descarboxilación por s.c.
n°	[1] M/p		mm. %	$\mu\bar{p}$ mm	$\mu\bar{p}$ h	$\mu\bar{p}$ hgc.
1	0	+	70	1,34	1077	359
2	0,430	Δ	58	1,55	897	299
3	0,080	o	50	1,52	756	252
5	0,138	x	38	1,55	591	197
6	0,177	.	33	1,54	507	169

para que se restablezca el equilibrio térmico y hacer la primera lectura, las restantes se realizan a intervalos de 1'5 minutos hasta un total de 9 minutos, a fin de conseguir una mayor densidad de puntos.

6. *Determinación de la velocidad inicial de la reacción.*— A continuación damos un resumen de las operaciones realizadas para determinar la velocidad de descarboxilación; para más detalles, véase (1).

Resultados

Empleando la técnica manométrica de Warburg, hemos determinado un conjunto de valores de la función $v = g(I, S)$, variando los valores de I, y manteniendo constantes los de S dentro de cada serie; pero variando dichos valores de S al pasar de una serie a otra.

La cantidad de fermento es constante en todas las series e igual a 7'5 mg./vaso.

Hemos realizado tres series de experiencias (véase Tabla I), siendo la concentración de substrato en cada serie igual a 0'0030 M; 0'0050 M y 0'0112 M.

En cada serie se manejan cuatro concentraciones distintas de inhibidor (tiramina), que oscilan entre 0'06 — 0'225 M (serie número 2), y 0'030 — 0'177 M (series núms. 1 y 3).

En la columna 4.^a de la misma Tabla I, se ha calculado los valores v/v_i , siendo v la velocidad de descarboxilación en ausencia de inhibidor ($I = 0$), y v_i la velocidad cuando hay una concentración determinada de inhibidor, cociente que representa el valor recíproco del grado de inhibición (v_i/v).

En dicha columna se observa que v/v_i varía con la concentración de substrato para una misma concentración de inhibidor. Por ejemplo (datos tomados de la Tabla I):

$$[I] = 0'177 \left\{ \begin{array}{l} [S] \quad 0'0030 \quad 0'0050 \quad 0'0112 \\ v/v_i \quad 2'10 \quad 1'67 \quad 1'37 \end{array} \right.$$

y para

$$[I] = 0'060 \left\{ \begin{array}{l} [S] \quad 0'0030 \quad 0'0050 \quad 0'0112 \\ v/v_i \quad 1'42 \quad 1'23 \quad 1'10 \end{array} \right.$$

Este hecho experimental de que el grado de inhibición varíe con la concentración de substrato, para una misma concentración de inhibidor, nos hizo pensar que la inhibición fuese competitiva.

TABLA I

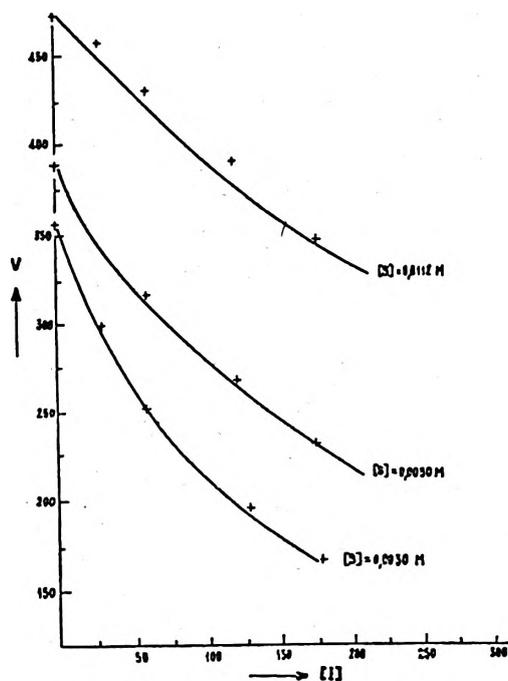
[I]	v	[S]	v/v _i	1/v	K _i gráfica	$K_i = \frac{K_s [I]}{\left(\frac{v}{v_i} - 1\right) (K_s + [S])}$
Serie n.º 1						
0'000	359	0'0030		0'00278	0'045	
0'030	299		1'20	0'00334		0'043
0'060	252		1'42	0'00396		0'040
0'130	197		1'82	0'00507		0'045
0'177	169		2'10	0'00591		0'046
Serie n.º 2						
0'000	389	0'0050		0'00257	0'050	
0'060	314		1'23	0'00318		0'050
0'120	268		1'45	0'00373		0'052
0'177	232		1'67	0'00431		0'051
0'225	205		1'89	0'00487		0'049
Serie n.º 3						
0'000	477	0'0112		0'00209	0'048	
0'031	460		1'04	0'00217		0'075
0'061	430		1'11	0'00232		0'054
0'121	392		1'22	0'00255		0'053
0'177	349		1'37	0'00286		0'046
					0'048	0'050

COMPROBACIÓN GRÁFICA

Si representamos en un sistema de coordenadas cartesianas los valores experimentales de v en función de [I], tenemos la siguiente gráfica núm. 1.

Y en ella se observa de una manera indirecta, a la vista de la pendiente de las tres curvas, que la variación de la velocidad de descarboxilación es tanto mayor cuanto es menor la concentración de tirosina.

Sin embargo, una demostración gráfica directa de la dependencia del grado de inhibición con la concentración de substrato, para un mismo valor de [I], se consigue haciendo la siguiente representación: en ordenadas tomamos los valores recíprocos del grado de inhibición (Tabla I, columna IV) $1/(v_i/v)$, y en abscisas concentración de inhibidor [I] (Gráfica núm. 2); los puntos de cada serie se encuentran distribuidos a lo largo de una recta de ordenada en el origen 1.



Gráfica núm. 1

Si la tiramina fuese un inhibidor no competidor, las tres rectas deberían coincidir en una sola

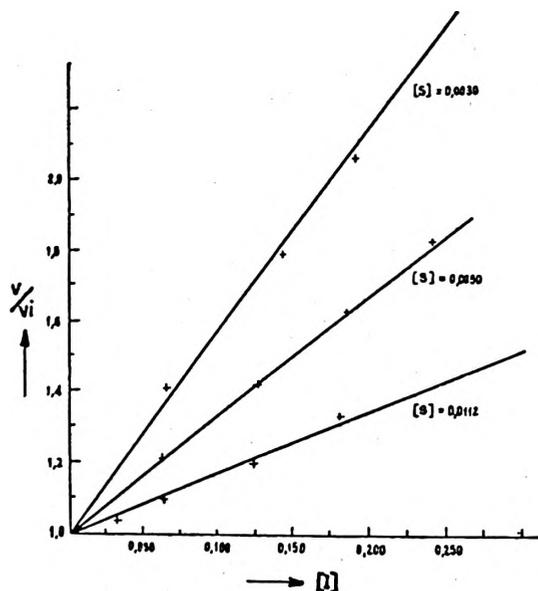
$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{[I]}{K_i}$$

puesto que el grado de inhibición sería independiente de la concentración de tirosina.

En nuestro caso, los hechos experimentales demuestran por sí solos de una manera clara (gráfica núm. 2) que la tiramina es un inhibidor competidor de la tirosina respecto a la descarboxilasa tirosínica.

En la ecuación $\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{K_s}{K_i} \frac{[I]}{K_s + [S]}$ que relaciona

v/v_i en función de I, cuando el inhibidor es de tipo competidor, interviene una constante K_i (constante de disociación del com-



Gráfica núm. 2

puesto enzima-inhibidor), que se calcula gráficamente midiendo la pendiente de las rectas obtenidas en la gráfica núm. y teniendo

en cuenta que dicho valor es igual a $\frac{K_s}{K_i [K_s + (S)]}$. Estos

valores de K_i están tabulados en la Tabla I, columna 6.ª.

Por otra parte, despejando K_i en la ecuación de arriba,

$$K_i = \frac{K_s [I]}{(v/v_i - 1) [K_s + (S)]}$$

calculamos su valor para cada

par de valores $v/v_i - I$ (Tabla I, columna 7.ª), teniendo en cuenta que K_s es igual a 0'0012 M (1).

El examen de los valores de K_i que figuran en la Tabla de valores, pone de manifiesto que dentro de los errores experimentales, se trata de una verdadera constante cuyo valor es 0'050 M.

Discusión

No es posible llevar a cabo un estudio adecuado de los inhibidores enzimáticos sin una investigación de la cinética de la in-

hibición, lo cual se lleva a cabo en la actualidad por un número creciente de investigadores.

Ante una sustancia que actúa como inhibidora de una reacción enzimática se plantea la siguiente pregunta: la velocidad relativa o grado de inhibición v_i/v , constante a una concentración dada de inhibidor, ¿depende de la concentración de sustrato? Para contestarla, es suficiente un estudio cualitativo, pero para llegar a conclusiones definitivas son necesarios los métodos basados en el mecanismo de la reacción.

Estos métodos tienen las siguientes ventajas:

1.º Son corrientemente más sensibles y los resultados se consideran simultáneamente, lo cual es más efectivo que hacer comparaciones parciales.

2.º Nos dan un criterio definitivo para conocer los diferentes tipos de inhibición.

3.º Finalmente, proporciona la determinación de importantes constantes de la reacción.

Basándonos en este criterio y en los desarrollos matemáticos existentes, nuestros datos experimentales han puesto de manifiesto que la tiramina actúa como inhibidor competidor de la tirosina respecto a la descarboxilasa tirosínica, siendo el valor de K_i , constante de disociación del complejo tiramina-descarboxilasa tirosínica, igual a 0'050 M, o sea, unas 40 veces mayor que K_s ($K_s = 0'0012$ M).

En la inhibición por competencia con el sustrato, los valores relativos de K_i y K_s (constante esta última denominada de Michaelis-Menten, que corrientemente se considera igual a la de disociación del complejo enzima-sustrato), juegan un papel muy importante para determinar la eficacia de un inhibidor.

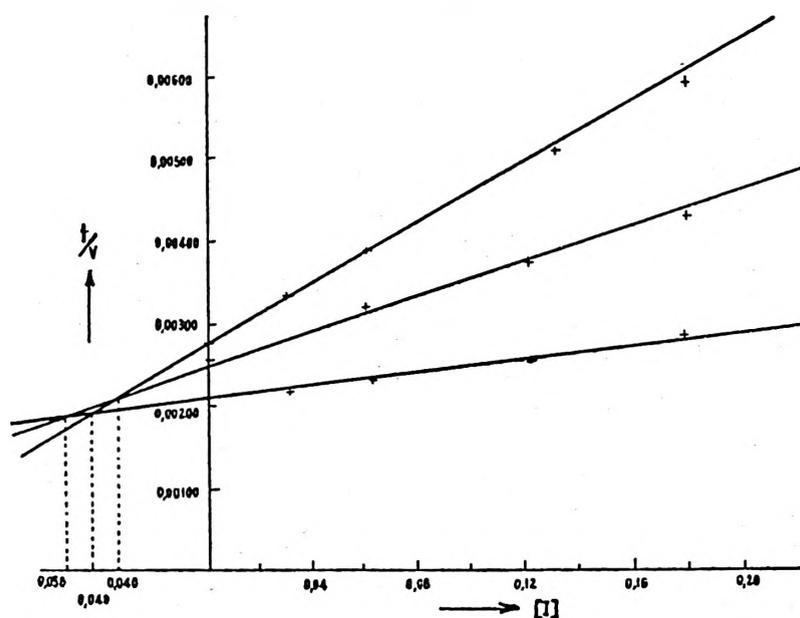
El inhibidor ideal por competencia sería aquel cuya afinidad por el enzima fuera considerablemente mayor que la del sustrato, puesto que de no ocurrir así, la relación de concentraciones inhibidor/sustrato tendrá que ser alta.

En el caso de la inhibición de la deshidrogenasa succínica por el ácido malónico, existe una gran afinidad entre el homólogo del sustrato y el enzima, siendo la relación inhibidor/sustrato del orden de 1/50 para una inhibición del 50 %.

Esta elevada afinidad representa más bien una excepción que una regla, y en la mayor parte de los casos de inhibición por competencia hasta ahora estudiados se ha encontrado que K_s es menor que K_i , lo cual es de esperar dada la gran afinidad que presenta cada enzima por su sustrato natural.

Recientemente Dixon (2) ha dado a conocer un método gráfico sencillo para determinar K_i que juzgamos muy instructivo a efectos de comprobación de nuestros resultados. Consiste en representar

$1/v$ frente a $[I]$, manteniendo $[S] = \text{constante}$, para dos o más valores de la concentración de sustrato.



Gráfica núm. 3

En el caso de un inhibidor competidor se obtienen rectas diferentes para cada valor de $[S]$ que se cortan en un punto a la izquierda y por encima del eje de las abscisas, cuya abscisa es $-K_i$.

Si el inhibidor es no competidor, las rectas se cortan igualmente en un mismo punto, pero en este caso está situado en la parte negativa del eje de abscisas, siendo su valor igual a $-K_i$.

En la gráfica núm. 3 se ve de una manera clara que representando $1/v$ respecto a $[I]$ (datos de la Tabla I, columna 5.^a), los valores experimentales están sobre rectas que se cortan por encima de la línea de la base en puntos cuyas abscisas ($= -K_i$) son los siguientes:

$$K_i = 0'040; 0'048; 0'056 \text{ M.}$$

valores de K_i que coinciden satisfactoriamente con el calculado anteriormente ($= 0'048 \text{ M}$).

Resumen

Henos estudiado experimentalmente la acción de la tiramina sobre la velocidad de descarboxilación de la tirosina catalizada por la descarboxilasa tirosínica, encontrando que actúa inhibiendo la reacción de descarboxilación.

Se demuestra analítica y gráficamente que los resultados experimentales corresponden a una inhibición de tipo competidor, cuya ecuación de velocidad es :

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{K_s}{K_i} \frac{[I]}{K_s + [S]}$$

Se determina la constante de inhibición, K_i , cuyo significado es la de una constante de disociación del compuesto descarboxilasa tirosínica-tiramina, siendo su valor 0'050 M.

Summary

Thyramine inhibited tyrosine decarboxylation by tyrosinic de carboxylase.

The mathematical analysis of the experimental results showed that the inhibition was a competitive one, according to the following equation.

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{K_s}{K_i} \frac{[I]}{K_s + [S]}$$

Inhibition constant K_i amounted to 0.050 M, the meaning of which being that of a dissociation constant of the complex Tyrosine-Decarboxylase and Thyramine.

Bibliografía

1. DÍAZ CADAVIECO, R. y DE LA FUENTE SÁNCHEZ, G. : *R. esp. Fistol.* **10**, 103, 1954.
2. DIXON, M. : *Biochem. J.* **55**, 170. 1953.
3. EBERSOLE, E. R., GUTTENTAG, C. y WILSON, P. W. : *Arch. Biochem.* **3**, 399. 1944.
4. GALÉ, E. F. : *Avances in Enzymology.* **6**, 1. 1946.
5. GOLDSTEIN, A. : *J. Gen. Physiol.* **27**, 529. 1944
6. HAAS, E. : *J. Biol. Chem.* **155**, 321. 1944.
7. HALDANE, J. B. S. : *Enzymes.* London, 1930.
8. HELLERMAN, L., LINDSAY, A. y BOVARNICK, M. J. : *J. Biol. Chem.* **163**, 553. 1946.
9. HUNTER, A. y DOWNS, C. E. : *J. Biol. Chem.* **157**, 427. 1945.
10. LINEWEAVER, H. y BURK, D. : *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658. 1934.
11. POTTER, V. R. y DUBOIS, K. P. : *J. Gen. Physiol.* **26**, 391. 1943.
12. ROBERTS, E. : *J. Biol. Chem.* **198**, 495. 1952.
13. ROBERTS, E. : *J. Biol. Chem.* **202**, 559. 1953.
14. STRAUS, O. H. y GOLDSTEIN, A. : *J. Gen. Physiol.* **26**, 559. 1943.
15. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. y STAUFER, J. F. : *Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism.* Burgess Publishing Co. Minneapolis. Minn. 1945.
16. WILSON, P. W. : *Respiratory Enzymes.* Lardy, H. A., Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn. 1950.

