

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

Estudios sobre enzimas descarboxilantes

XIX. L-Glutamato descarboxilasa. Nuevos datos sobre la enzima de *Lupinus albus*

por
F. Mayor, M.ª Cascales y A. Santos Ruiz

(Recibido para publicar el 11 de abril de 1962)

En anteriores publicaciones (7, 8) hemos dado cuenta de los resultados obtenidos en nuestros estudios sobre la L. glutamato descarboxilasa de origen vegetal (*Lupinus albus*). Este trabajo, continuación de la serie dedicada a esta enzima, recoge varios ensayos — realizados principalmente con la preparación parcialmente purificada — cuyas conclusiones pueden contribuir al mejor conocimiento de sus características enzimáticas.

Material y métodos

Los aparatos utilizados, la procedencia de los productos y la técnica seguida para la medida de la actividad enzimática han sido expuestos detalladamente en nuestra última publicación (8). Las variantes metodológicas del presente estudio se consignan en el lugar oportuno.

La obtención del purificado se realizó como hemos descrito en nuestros trabajos anteriores (7), modificando únicamente, en algunos casos, las condiciones de preparación del extracto crudo. Como aconsejaban los resultados que exponemos, se ha llevado a cabo a la temperatura ambiente y se ha mantenido

durante una hora a 30° C, en lugar de la extracción con tampón a 4° C y baño de hielo-sal que veníamos empleando hasta ahora.

Resultados

Determinación del pH óptimo del purificado. En el compartimento central del vaso de Warburg se disponen 0,3 ml. de la enzima purificada; 0,5 ml de una solución de piridoxal-5-fosfato (PLP) que contiene 80 μg por ml., y se completa hasta 3,5 ml. con tampón fosfatos Na-K 0,5 M, de los pH siguientes: 4,8; 5; 5,3; 5,5; 5,7; 5,9; 6,1; 6,4; 6,7 y 7. Al bulbo lateral se añaden 0,5 ml. de glutamato sódico $6,8 \times 10^{-2}$ M. La exactitud del pH final fue comprobada mezclando previamente los componentes de la reacción y corrigiendo, en caso necesario, el pH resultante con la oportuna adición de PO_4H_3 M/15 ó PO_4HNa_2 0,5 M. Con los datos obtenidos en estas experiencias previas, se modifica el pH del tampón con el fin de que, en el momento de volcar el substrato y comenzar las lecturas, el pH sea justamente el deseado. Coincidiendo con el valor hallado en el extracto (7), el pH óptimo del purificado resultó ser 5,7.

Tampones y agentes tensoactivos. La substitución del buffer Na-K M/4 por los tampones Na-Na o K-K de igual pH y molaridad disminuye la actividad de una manera discreta — 17 % y 11 %, respectivamente — pero constante. El bromuro de cetil.trimetil.amonio no afecta el curso de la reacción, a las concentraciones ensayadas (0,1-0,3 ml. de solución al 3 por mil).

Actividad comparativa de los extractos mantenidos a la temperatura ambiente y en frío. Los extractos se obtuvieron mezclando, en disgregador Turmix, 25 grs. de harina de altramuz con 100 ml. de tampón fosfatos Na-K 0,4 M. pH 5,7. Los extractos crudos se filtran por tela antes de su uso. Una parte del extracto filtrado se centrifuga a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos y se recoge el sobrenadante. Los vasos de reacción contienen 1 ml. de los distintos preparados enzimáticos, 2,5 ml. de tampón fosfatos y 0,5 ml de glutamato sódico $6,8 \times 10^{-2}$ M. En los vasos que contienen PLP — 0,4 ml. de una solución que posee 80 μg por miligramo — se deduce este volumen de la cantidad de tampón, de tal modo que se obtenga un volumen final de 4 ml. Las lecturas que se expresan en la tabla I son los valores medios, referidos a los 4 minutos de reacción, de los μl de CO_2 desprendidos por las preparaciones enzimáticas conservadas en distintas condiciones, a la media hora, 2 horas y 4 horas después de su obtención. El extracto crudo es el que resulta directamente de la acción disgregadora del Turmix durante 3 minutos. El extracto filtrado es el que se pasa in-

mediatamente a través de tela. Partes alícuotas de estas preparaciones fueron mantenidas en estufa a 30° C y en baño de hielo-sal a 2-4° C. Como se expresa en la tabla I, la conservación en frío perjudica sensiblemente la actividad. El homogenado mantenido a 30° C — filtrado inmediatamente antes de la medida manométrica — resultó poseer la mayor potencia descarboxilante, que se mantiene en niveles prácticamente iguales a las 4 horas de su obtención. Es este mismo preparado el que presenta una mayor actividad cuando se suplementa PLP al sistema reaccionante.

TABLA I

Actividad descarboxilante de los extractos y sobrenadantes mantenidos a distintas temperaturas. Efecto de la adición de piridoxal.5.fosfato*

Preparación enzimática	Tiempo transcurrido desde su obtención		
	½ h.	2 h	4 h.
Extracto crudo, 4° C.	124	87	39
Extracto crudo, 4° C. + PLP	154	154	128
Extracto crudo, 30° C.	130	138	120
Extracto crudo, 30° C. + PLP	159	165	163
Extracto filtrado, 4° C.	100	62	18
Extracto filtrado, 4° C. + PLP	125	108	79
Extracto filtrado, 30° C.	118	102	82
Extracto filtrado, 30° C. + PLP	141	141	136
Sobrenadante 4° C.	83	35	9
Sobrenadante 4° C. + PLP	122	95	64
Sobrenadante 30° C.	108	84	51
Sobrenadante 30° C. + PLP	143	134	122

* Expresada en μ l. de CO₂ desprendidos en cuatro minutos por un ml. de preparación enzimática.

Efecto del FNa sobre la actividad enzimática de los extractos. La extracción de la enzima se verifica en las condiciones habituales, empleando tampón fosfatos M/4 pH 5,7 con FNa a una concentración final 0,24 M y $4,8 \times 10^{-2}$ M. Veinticinco gramos de harina de altramuz se extraen con 175 ml. de tampón con FNa $4,8 \times 10^{-2}$ M (extracto 2), se filtra por tela, y una parte del filtrado se mantiene a 30° C (2 b) y otra en baño de hielo-sal a 4° C (2 a). Del mismo modo y en las mismas proporciones se obtienen los extractos realizados con tampón FNa 0,24 M (extracto 3) y tampón fosfatos sin adición de fluoruro (extracto 1),

de los cuales resultan los preparados 3 a y 3 b y 1a y 1 b, respectivamente. La reacción se realiza con 1 ml. de los distintos preparados, adicionados o no de 30 μg de PLP, en las condiciones habituales. Las concentraciones de FNa en el vaso de reacción son, aproximadamente, 6×10^{-2} M en el extracto 3 y $1,2 \times 10^{-2}$ M en las preparaciones enzimáticas correspondientes al extracto 2. En la tabla II se consignan los resultados obtenidos que indican el favorable efecto que en todos los casos ejerce la presencia de FNa a la concentración $4,8 \times 10^{-2}$ M para la conservación de la actividad enzimática.

TABLA II

Efecto del NFA en la conservación de la actividad enzimática de los extratos.

	$\mu\text{l CO}_2$, 10 min.	
	2 $\frac{1}{2}$ h.	4 $\frac{1}{2}$ h.
Extracto 1a	39	14
Extracto 1a + PLP	127	78
Extracto 1b	133	100
Extracto 1b + PLP	206	165
Extracto 2a	79	36
Extracto 2a + PLP	185	160
Extracto 2b	155	112
Extracto 2b + PLP	230	198
Extracto 3a	43	21
Extracto 3a + PLP	120	93
Extracto 3b	84	68
Extracto 3b + PLP	152	142

Activación de la enzima purificada por el glutation. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando 0,4 ml. (equivalentes a 0,2 de enzima) de un purificado enzimático recién preparado. Se añaden al compartimento central del vaso 2,4 ml. de tampón fosfatos Na-K 0,5 M pH 5,7; 0,3 ml. de PLP (80 μg ml.) y 0,4 ml. de solución de glutation a la concentración conveniente para obtener la molaridad expresada en la tabla III. En el primer vaso se substituyen los 0,4 ml. de la solución de glutation por igual volumen de agua bidestilada. En el vaso que no contiene PLP se adicionan 0,3 ml. de solución amortiguadora. La representación gráfica de los resultados hallados (fig. 1) expresa la notable activación producida por este compuesto a concentraciones del orden. 10^{-4} M.

TABLA III

Efecto del glutation (G-SH) sobre la L.glutamato descarboxilasa parcialmente purificada.

	$\mu\text{l CO}_2, 6 \text{ min.}$	% Actividad
Enzima	130	100
Enzima + G-SH $9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	184	142
Enzima + G-SH $1,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	197	151
Enzima + G-SH $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	205	158
Enzima + G-SH $3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	222	170
Enzima + G-SH $6,8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	230	177
Enzima + G-SH $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	255	196
Residual (enzima sin PLP)	28	21

El tiempo transcurrido desde el llenado de los vasos hasta la lectura es de media hora.

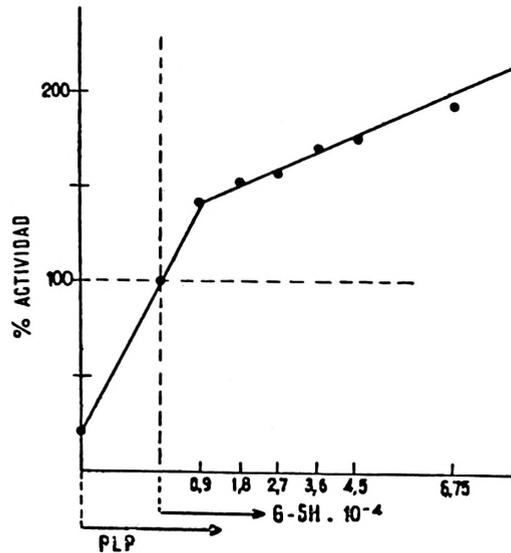


FIGURA I. — Efecto del glutation sobre la enzima parcialmente purificada.

Efecto del alfa-cetoglutarato sobre la actividad enzimática. Utilizando distintas concentraciones de alfa-cetoglutarato frente a glutamato sódico $6,8 \times 10^{-2} \text{ M}$, hallamos los resultados expresados en la tabla IV, que sugerían, dada la sucesiva disminución del porcentaje de inhibición a medida que varía la relación S/I, que se trataba de una inhibición de tipo competitivo. Los datos

obtenidos en las experiencias realizadas con este fin se resumen en la tabla V, cuya representación gráfica (fig. 2) por el método de LINEWEAVER y BURK (5), confirmó que se trataba de una inhibición de tipo competitivo, tal como podía preverse por la estrecha analogía estructural entre sustrato e inhibidor. La

TABLA IV

Efecto del α -cetoglutarato sobre la L.(+).glutamato descarboxilasa parcialmente purificada.

Enzima	$\mu\text{l CO}_2$, 20 min.		% Actividad	
	Preincubación enzima + α -CG	Enzima en el bulbo lateral (sin incubación previa)	A	B
+ glutamato $6,8 \cdot 10^{-2}$ M	256		100	
Glutamato + α -CG $4,25 \cdot 10^{-3}$ M	240	250	94	98
Glutamato + α -CG $8,5 \cdot 10^{-3}$ M	235		92	
Glutamato + α -CG $1,7 \cdot 10^{-2}$ M	199	220	78	86
Glutamato + α -CG $2,5 \cdot 10^{-2}$ M	166		65	
Glutamato + α -CG $3,4 \cdot 10^{-2}$ M	140	167	55	65
Glutamato + α -CG $5,1 \cdot 10^{-2}$ M	103		40	
Glutamato + α -CG $6,8 \cdot 10^{-2}$ M	83	119	35	47

El tiempo transcurrido desde la mezcla de los componentes hasta la lectura a tiempo cero fue de 1 h.

α -CG = α -cetoglutarato.

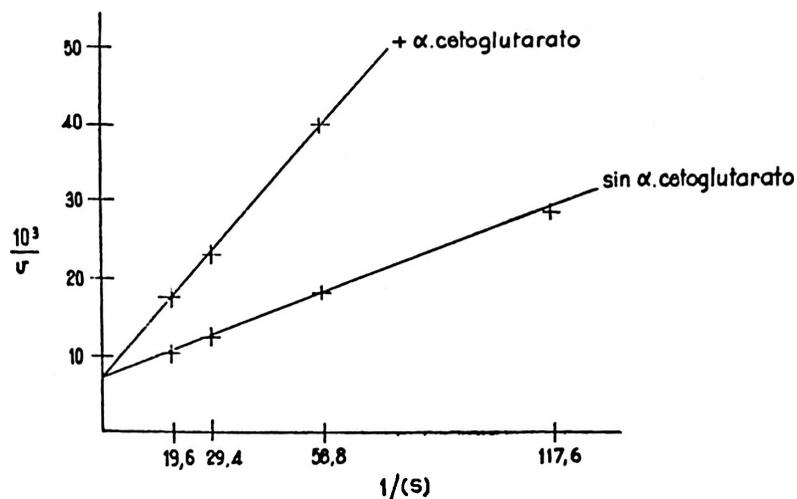


FIGURA 2. — Inhibición de tipo competitivo producida por el α -cetoglutarato.

constante de inhibición (K_i) se determinó aplicando la fórmula :

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

y resultó ser de $1,4 \times 10^{-2}$ M. (Tabla V)

TABLA V

Constante de inhibición del α -cetoglutarato sobre la L-glutamato descarboxilasa.

(S)	v	V_i^*	Inh. %	K_i
0,068	105	67	36	$1,4 \times 10^{-2}$
0,051	96	57	40	$1,4 \times 10^{-2}$
0,034	80	43	46	$1,5 \times 10^{-2}$
0,017	55	25	60	$1,4 \times 10^{-2}$
0,0085	35	8	77	$1,1 \times 10^{-2}$

* Velocidad con α -cetoglutarato $3,4 \times 10^{-2}$ M.

Efecto de diversas sustancias sobre la actividad descarboxilante. Utilizando enzima parcialmente purificada, hemos determinado el efecto producido por diversas sustancias sobre la actividad enzimática. Las condiciones de ensayo fueron las habituales (substrato $6,8 \times 10^{-2}$ M y 30 μ g de PLP), realizando previamente la mezcla de los componentes de cada vaso con el fin de determinar los tampones y soluciones apropiados para conseguir que el pH inicial de la reacción fuera 5,7. Los efectos observados se expresan por el porcentaje de actividad obtenido frente a las experiencias sin inhibidor llevadas a cabo simultáneamente.

En presencia de N_2 , la actividad se incrementa en un 7 %, disminuyendo en un 21 % cuando el CO_2 constituye la fase gaseosa ; el γ -aminobutírico a la misma concentración que el substrato ($6,8 \times 10^{-2}$ M) no afecta en absoluto el curso de la reacción. Cuando esta adición se verifica en presencia de CO_2 , no se aumenta el porcentaje de inhibición producido por este último. El aspartato y la β -alanina a la concentración $6,8 \times 10^{-2}$ M no ejercen la menor influencia. En las mismas condiciones, el D-glutamato inhibe la reacción en un 47 %.

La cisteína inactiva progresivamente la reacción descarboxilante. La inhibición es prácticamente total a una concentración

de $1,25 \cdot 10^{-2}$ M. También la adrenalina y el ácido indolacético actúan como potentes inhibidores del proceso (70 % a 7×10^{-4} M y 55 % a $2,8 \times 10^{-3}$ M, respectivamente).

El ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) inhibe claramente a concentraciones superiores a 1×10^{-2} M. El Cu^{++} ($\text{SO}_4 \cdot \text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) es un potentísimo inhibidor de la reacción. De todos los metales ensayados — Mg^{++} , Zn^{++} , Fe^{+++} , Ni^{++} , Mn^{++} y Co^{++} — únicamente el Mn^{++} mostró un ligerísimo efecto favorable (106 % a $5,6 \times 10^{-4}$ M). Los demás cationes disminuyen, en mayor o menor grado, la actividad enzimática. Con el fin de obtener resultados totalmente concordantes sobre el efecto de los cationes intentamos la preparación, a partir de la enzima purificada, de una apoenzima carente de actividad residual, realizando el proceso en presencia de EDTA. La actividad residual de la enzima purificada es muy pequeña (15 a 25 %), pero la obtención de un preparado totalmente exento de actividad sería muy conveniente para el estudio del efecto del EDTA y de la posible reactivación por metales. El tratamiento con EDTA 0.1N se realizó a pH 7,8, durante 10 minutos, pasados los cuales se precipitó con sulfato amónico hasta el 40 % de saturación y se centrifugó a -5°C . El precipitado obtenido se redisolvió en tampón fosfatos pH 5,7. En presencia de PLP, la actividad del preparado obtenido fue únicamente del 12 % en relación a la cantidad correspondiente de enzima purificada. La adición de metales no incrementó esta escasa actividad. El análisis espectrográfico (*) de las muestras sometidas a este tratamiento dio altas concentraciones de metales, siendo especialmente ricas en Mn y Zn. En proporción menor se hallaron Al, Mg, Fe, etc.

Discusión

Los resultados obtenidos con los extractos sometidos a distintas condiciones de preparación, indican que la enzima se conserva mejor — durante un corto intervalo de tiempo — a 30°C que en baño de hielo-sal (4°C). Es muy probable que este fenómeno se deba a que, en el primer caso, la mayor solubilización de la enzima compensa sobradamente la desnaturalización simultánea. La temperatura ambiente permitiría reacciones favorables a la actividad enzimática, que no se producirían a 4°C . Estos datos coinciden con los de SHUKUYA y SCHWERT (11), quienes, en un reciente trabajo, indicaban la anormal inactivación de la enzima de *E. Coli* a bajas temperaturas, siendo más

(*) Realizado amablemente por el doctor Francisco Alvarez.

estable a la temperatura ambiente. Según estos autores, el efecto observado es debido a la disociación que tiene lugar a 4° C. Nosotros observamos un fenómeno similar, puesto que la reactivación por PLP de los extractos mantenidos a la temperatura ambiente, da valores mayores que los de las muestras alícuotas conservadas a 2-4° C durante el período de ensayo. Los datos hallados parecen indicar que la desnaturalización proteica es escasa y que el decrecimiento de la actividad debe explicarse principalmente a nivel de la unión enzima-coenzima. Las bajas temperaturas podrían impedir las reacciones fosfocinásicas de la coenzima y/o modificar la configuración apoenzimática de tal modo que se favoreciera la liberación del PLP.

El fluoruro sódico incrementa la actividad de los extractos a la concentración de $4,8 \times 10^{-2}$ M. A mayores concentraciones inhibe sensiblemente la actividad, si bien en los extractos mantenidos a 4° C refuerza, incluso, la pobre actividad inicial. La concordancia de estos resultados con los anteriores corrobora el antagonismo existente entre el frío y la integridad holoenzimática. El FNa impediría, en parte, la inactivación del PLP.

El glutatión ejerce una acción muy favorable a la actividad de la enzima purificada. Este resultado es muy representativo, puesto que supone la existencia de grupos tiólicos activos bloqueados al estado de puente disulfuro. En cambio, como hemos indicado, la cisteína inhibe sensiblemente la reacción (10). El 2.3-dimercaptopropanol presenta, asimismo, un efecto negativo (2). Ambas acciones son debidas a la fuerte incompatibilidad de estos compuestos azufrados con el piridoxal-5-fosfato. Las características estructurales del glutatión impiden, seguramente, el acoplamiento que origina la inhibición en el caso de los otros compuestos reductores de menor tamaño molecular.

La inhibición producida por el α -cetoglutarato es de tipo claramente competitivo. La analogía estructural entre sustrato e inhibidor confirma totalmente los hallazgos experimentales. La enzima posee una notable afinidad por el inhibidor, siendo la K_i del mismo orden que la K_m del sustrato.

Los resultados obtenidos en el tratamiento con EDTA son difícilmente reproducibles. Se trabaja a pH de captación subóptimos, obligados por los pH de estabilidad enzimática y, si bien no cabe duda de la notable inhibición que producen concentraciones de 10^{-2} M, los porcentajes obtenidos no coinciden totalmente en las distintas y numerosas experiencias que hemos realizado. Concentraciones menores a 10^{-3} M producen incluso un pequeño incremento de la actividad debido, seguramente, a la captación de metales pesados interferentes. La inhibición se incrementa al aumentar el tiempo de incubación apoenzima-EDTA. El resultado de los análisis espectrográficos nos de-

mostró la escasa capacidad quelante del EDTA en las condiciones experimentales. Siempre ha sido el Mn^{++} el catión presente en mayor proporción en los purificados analizados, coincidiendo en que es el único metal cuya adición, en altas concentraciones, a los vasos de reacción, no afecta sensiblemente la actividad enzimática (1). Nuestros resultados coinciden con los de EGGLESTON (4) en el sentido de que la actividad no es estimulada aparentemente por cationes, pero no en cuanto al efecto del EDTA, puesto que dicho autor no halló efecto inhibitorio, seguramente por las bajas concentraciones de agente quelante empleadas. De acuerdo con los datos espectrográficos, consideramos que es preciso obtener, en presencia de secuestranos, una preparación apoenzimática totalmente desprovista de metales para poder llegar a resultados concluyentes. La enzima retiene a los cationes con una fuerza que contrasta con la labilidad de la unión apoenzima-coenzima. STEENSHOLT y cols. (12) han sugerido que la descarboxilasa glutámica de zanahoria precisa Zn^{++} para su actividad. La intervención de metales en las reacciones de descarboxilación se acopla perfectamente al mecanismo de descarboxilación propuesto por METZLER y cols. (9) sobre la base de modelos no enzimáticos. Sin embargo, hasta el momento, ningún trabajo puede considerarse definitivo en este aspecto.

Los datos consignados nos ilustran sobre la labilidad general de la enzima, que hemos podido confirmar en el estudio detallado de la inhibición causada por los antibióticos sobre la *L. glutamato* descarboxilasa purificada (3, 6).

Resumen

Se ha estudiado el comportamiento de la enzima *L. glutamato* descarboxilasa frente a numerosos compuestos y en distintas condiciones experimentales. La enzima del extracto crudo presenta mayor actividad, en un corto intervalo de tiempo, mantenida a 30° C que conservada a 4° C. Este fenómeno poco frecuente puede interpretarse como el resultado de una mayor disociación de la coenzima a bajas temperaturas, afectándose parcialmente, al mismo tiempo, las posibilidades de recombinación. Se considera la acción del fluoruro sódico sobre el proceso observado.

El glutation ejerce un potente efecto activador y el α -cetoglutarato inhibe competitivamente. El resultado de estas experiencias y los de las realizadas con EDTA y metales se discuten especialmente.

Summary

Studies on decarboxylating enzymes. XIX. L-glutamate decarboxylase from *L. albus*. New data.

The influence of several compounds and experimental conditions on L-glutamic acid decarboxylase of *Lupinus albus* has been studied. Unusually, the enzyme in the crude extract exhibits more activity when stored — only few hours — at 30° C, whereas at 4° C the enzymatic activity is strongly damaged. The effect of fluoride is considered. The data obtained suggests an extensive disociation of coenzyme at 4° C and the partial inability for recombination when the enzyme is returned at room temperature.

Glutathion is a high effective activator and α -ketoglutarate inhibits competitively. The results of these experiments and those obtained in the research about EDTA and metals action on this enzyme are specially discussed.

Bibliografía

- (1) AXELROD, J. and colab. : *J. of Agricultural and Food. Chem.*, **3**, 1039 (1955).
- (2) DAVISON, A. N. : *Biochem. Biophys. Acta*, **19**, 66 (1956).
- (3) DIEZ TALADRIZ, A. y colab. (en prensa).
- (4) EGGLESTON, L. V. : *Biochem. J.*, **68**, 557 (1958).
- (5) LINEWEAVER, H. and BURK, D. : *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
- (6) MARCOS, P. y colab. (en prensa).
- (7) MAYOR, F. : *An. Real. Acad. Farm.*, **25/3**, 219 (1959).
- (8) MAYOR, F. y colab. : *R. Esp. Fisiol.* **18**, 77 (1962).
- (9) METZLER, D. E. and colab. : *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 648 (1954).
- (10) ROBERTS, E. : *J. Biol. Chem.*, **190**, 505 (1951).
- (11) SHUKUYA, R. and SCHWERT, G. W. : *J. Biol. Chem.*, **235/6**, 1649 1653 y 1658 (1960).
- (12) STEENSHOLT, G. et colab. : *Congr. Intern. Biochem. Resumés com.*, p. 38. Bruselas (1955).