



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"ESTUDIO DE LOS METALES DE TRANSICION
Y SU INTERACCION CON LAS ENZIMAS EN LOS
SISTEMAS BIOLOGICOS"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U I M I C O
P R E S E N T A :
JOSE FRANCISCO MUÑOZ GALLO



**ASESORES: DRA. GILDA FLORES ROSALES
O. OFELIA VEGA VAZQUEZ**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Estudio de los Metales de Transición y su Interacción con las Enzimas
en los Sistemas Biológicos".

que presenta el pasante: José Francisco Muñoz Gallo
con número de cuenta: 8604158-4 para obtener el TITULO de:
Químico

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Mex., a 3 de Febrero de 1997

PRESIDENTE	<u>Q. Elia Catalina León Arias</u>	<i>E. León Arias</i>
VOCAL	<u>Dra. Gilda Flores Rosales</u>	<i>G. Flores Rosales</i>
SECRETARIO	<u>Q. Ana Ma. Velázquez Sánchez</u>	<i>A. Velázquez Sánchez</i>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q. Victoria O. Hernández Palacios</u>	<i>V. Hernández Palacios</i>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q. Arcadia Hernández Beltrán</u>	<i>A. Hernández Beltrán</i>

En memoria de Linus Pauling (1901-1994).

En 1931, Linus Pauling escribió un artículo de 34 páginas publicado en el Journal of the American Chemical Society titulado "The Nature of the Chemical Bond" en el que se encontraba todo lo que él sabía sobre la estructura de átomos y moléculas.

Trascendente como lo fue su investigación sobre la estructura de las proteínas lo hizo merecedor del Premio Nobel de Química en Noviembre de 1954. Conocido en el mundo por su pública discusión para limitar las explosiones nucleares le valió el Premio Nobel de Paz en 1962. Además, participó directamente en la investigación que dio lugar a un tercero, el de la determinación de la estructura del ADN.

La vida de Linus Pauling terminó el 19 de Agosto de 1994. Su compromiso con la ciencia y con la sociedad es un ejemplo para todos los químicos.

AGRADECIMIENTOS:

**A mi madre, Ma. del Carmen
Como una pequeña muestra de amor y
gratitud por todo el esfuerzo que realizó
durante mi formación**

Con cariño a mis hermanos:

**GUSTAVO
HECTOR
EDUARDO
JULIETA
LILA**

**En quienes siempre he encontrado
un gran apoyo y tengo un gran motivo
e inspiración para seguir adelante.**

**A la Dra. Gilda Flores y a Q. Ofelia Vega por hacerme participe de sus conocimientos y por
los consejos brindados.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado siempre una luz de
sabiduría y esperanza.**

**A Fernando Moreno con quien he pasado momentos agradables y por haber compartido
parte de su vida conmigo.**

**UNO APRENDE Y ESPERA QUE LA NATURALEZA POSEA UN ORDEN
QUE UNO PUEDA ASPIRAR A COMPRENDER.**

CHEN NING YANG.

**A FIN DE ALCANZAR LA VERDAD, ES NECESARIO ALGUNA VEZ EN LA
VIDA PONER TODO EN DUDA -HASTA DONDE SEA POSIBLE-**

R. DESCARTES

**ES SOLO HASTA EL MOMENTO EN QUE HEMOS LOGRADO PRODUCIR
DE LAS INTUICIONES MÚLTIPLES SU UNIDAD SINTÉTICA CUANDO PODEMOS
DECIR QUE CONOCEMOS EL OBJETO.**

E. KANT.

**MARCHITAS LAS HOJAS DE ADENTRO, BROTAN NUEVAS HOJAS
DEL BANANO, EN SEGUIDA, LOS NUEVOS BROTES SE VEN
ENVUELTOS POR NUEVAS HOJAS, ¡OJALA FUERA YO COMO
UNA DE ELLAS Y, ADQUIRIENDO NUEVAS VIRTUDES
CONOCIERA MAS Y MAS EL MUNDO EN COMPAÑÍA DE
LAS NUEVAS HOJAS !**

ZHANG ZI HOU.

ÍNDICE

INTRODUCCION.

i

I. GENERALIDADES

1

A. Enzimas

1

1. Clasificación

2

2. Especificidad y Sitio Activo

3

3. Mecanismos de reacción

4

4. Cinética Enzimática

5

5. Inhibición Enzimática

6

B. Metales de Transición

7

1. Características Químicas de los Diversos Estados de Oxidación de los Metales de Transición.

7

a) Teoría de Orbitales Moleculares

8

b) pH y Potencial redox

9

c) Control Selectivo de los Estados de Oxidación en Metales.

9

2. Propiedades de los Metales de Transición en los Sistemas Biológicos.

9

II. HIERRO EN ENZIMAS

12

A. Enzimas con Fe/S

12

1. Centros activos Fe/S en enzimas

13

2. Ferredoxinas

13

a) 2Fe-2S

13

b) 4Fe-4S

15

c) Fe-4S

15

3. Rubredoxinas

15

B. Enzimas con grupo Hemo

15

1. Hemo con función transferencia de electrones

17

a) Citocromo a

17

b) Citocromo b	17
c) Citocromo c	18
2. Hemo en Oxigenasas.	22
a) Monoxigenasas	22
i) Citocromo oxidasa	22
ii) Citocromo P450	24
iii) Peroxidasa y Catalasa	25
b)Dioxigenasas	26
i) Intradiol catecol	27
ii) Extradiol catecol	28
C. Enzimas sin grupo Hemo sin grupo Fe/S	29
I. Complejos de Fe-O-Fe	29
a) Ribonucleotido reductasa	30
b) Metano oxidasa	31

III. COBRE EN ENZIMAS 33

A. Oxidasas	34
1. Oxidasas Azules	34
a) Lacasa	35
b) Ascorbato Oxidasa	37
c) Ceruloplasmina	39
2. Amino oxidasa	40
3. Citocromo oxidasa	42
4. Galactosa oxidasa	43
5. Tirosinasa	46
B. Monooxigenasas	50
1. Dopamina β -Monooxigenasa	50
C. Superoxido Dismutasa	51

IV. NIQUEL EN ENZIMAS 55

A. Ureasa	55
-----------	----

B. Hidrogenasa	58
C. M-S-Coenzima-M-Reductasa	62
D. CO Deshidrogenasa	64

V. ZINC EN ENZIMAS 68

A. Anhidrasa Carbonica	68
B. Alcohol Deshidrogenasa	71
C. Carboxipeptidasa	74
D. Fosfatasa Alcalina	77
E. DNA Polimerasa	80
F. Ácido δ -Aminolevulinico deshidratasa.	81
G. Aspartato Transcarbamilasa.	83
H. RNA Polimerasa	83
I. Leucina Aminopeptidasa.	84
J. Citocromo oxidasa.	84
K. Superoxido Dismutasa.	85

VI. COBALTO EN ENZIMAS 86

A. Cobalto y Coenzima B ₁₂	86
1. Metilmalonil-CoA Mutasa	89
2. Glutamato Mutasa	90
3. Diol Deshidrasa	91
4. Etanolamina Desaminasa.	92

5. L-β-Lisina Mutasa.	93
6. Ribonucleotido Reductasa.	94
7. Metionina Sintetasa.	95
8. Metano Sintetasa	97
9. Acetato Sintetasa.	98
B. Cobalto en Sustitución Metálica de Metaloenzimas	99
VII. OTROS METALES EN ENZIMAS	101
A. Molibdeno	101
1. Nitrogenasa	102
2. Xantin Oxidasa	105
3. Xantin Deshidrogenasa	107
4. Sulfito Oxidasa	108
5. Nitrato Reductasa	110
B. Manganeso	112
1. Piruvato Carboxilasa	113
2. Mn SOD	113
C. Tungsteno	114
1. Formato Deshidrogenasa.	115
2. Aldehido deshidrogenasa.	116
D. Vanadio.	117
1. Haloperoxidasas.	117
2. Nitrogenasas	119
VIII. DISCUSION.	123
IX. CONCLUSIONES.	127
X. BIBLIOGRAFIA.	129

INTRODUCCION

La biosfera comprende una gran cantidad de organismos vivos, los cuales están constituidos por células, un sólo organismo se encuentra estructurado por varios tipos de células y dentro de todas ellas se llevan a cabo múltiples reacciones bioquímicas. Cada reacción bioquímica que se produce es controlada por medio de una macromolécula llamada enzima, la cual cumple con una función: actuar como catalizador muy específico aumentando la velocidad de reacción, sin alterar las propiedades termodinámicas del sistema y de esta manera, el proceso se logra aproximar al equilibrio.

La enzima está formada por cadenas de aminoácidos estableciendo una estructura protéica que puede ser de tres formas: ya sea b-hoja, a-hélice o en forma de cordón (aleatoria). Además, puede llegar a contener una especie de molécula que ayude a la enzima en su papel y es llamado cofactor.

Durante mucho tiempo se manejó que las enzimas contenían algún metal; Lenhinger, en 1950, estimó que aproximadamente un tercio de las enzimas requieren la presencia de un metal como cofactor o grupo prostético y de esta manera, obtener así, la máxima actividad en el proceso catalítico.

Cuando están unidos el cofactor y la enzima se manifiesta la máxima actividad catalítica y se le nombra entonces holoenzima, cuando el componente protéico y el cofactor están libres, la actividad disminuye o es nula y entonces se le llama apoenzima a la parte proteica.

Hace millones de años, la Tierra contenía una atmósfera compuesta de metano e hidrógeno molecular por lo que sus organismo vivos tenían un metabolismo basado en éstas moléculas y auxiliados principalmente por metales de transición, por esta razón, hay un número muy grande de enzimas conteniendo algún metal aunque ahora la atmósfera es rica en oxígeno molecular.

Los metales de transición muestran propiedades diferentes a los demás elementos debido a que en su última capa pueden presentar diferentes configuraciones, de tal forma que se identifican por tener varios estados de oxidación, están unidos a varias especies a su alrededor y sobretodo, promover la catálisis de muchas reacciones.

Al observarse diferentes estados de oxidación se realizan entonces pérdida o ganancia de electrones por lo que pueden favorecer reacciones de transferencia electrónica y en los sistemas biológicos son muchos los procesos donde existe una captación de energía a través de la transferencia electrónica.

Cuando el metal está unido con la enzima lo hace de dos formas distintas: ya sea con formación de enlaces de coordinación a ligandos o por fuerzas electrostáticas ya sea puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals.

Las propiedades oxidoreductoras de los metales de transición son limitadas dentro de los sistemas biológicos debido a que las células se encuentran en medio acuoso. De esta forma, no puede llevarse una transferencia electrónica con cualquier metal y con cualquier estado de oxidación sino únicamente con los que tienen un potencial dentro del rango de oxidación y reducción del agua, y entonces aparecen en mayor proporción los metales con estados de oxidación más estables.

Por otra parte, se puede señalar que las propiedades redox no solo dependen del medio sino también de los tipos de ligando, la disposición espacial y el efecto estérico, por ejemplo, los átomos donadores suaves o con sistemas deslocalizados pi, son más rápidos de oxidarse.

Estas propiedades (oxidoreductoras) hacen al metal actuar como un interruptor teniendo éste un cambio de oxidación causando una modificación en las longitudes de enlace y afectando por lo tanto los ligandos, por lo que hay un cambio simbiótico entre el potencial redox y la estructura conformacional de la enzima.

El metal de transición presenta como una ventaja en el sitio activo, la fuerza de unión que en algunos casos es muy fuerte y en otros débil. Por otro lado, se manifiesta una velocidad de intercambio de ligandos que produce selectividad hacia los sustratos, observándose también su alta afinidad por los electrones como una guía de la fuerza ácida que se conoce comúnmente como potencial de ionización.

El metal de transición dentro del sitio activo está colocado en un espacio cubriendo ciertos aspectos muy importantes. Apareciendo frecuentemente que el sitio activo no representa

una estructura al azar sino que está bien definida y únicamente ciertos aminoácidos como son histidinas, metioninas, ácido aspártico y glutamina (donde su unión es con oxígeno, nitrógeno o azufre), esto hace pensar que el número de coordinación del metal depende también del balance entre las energías de enlace y de repulsión con los ligandos por lo que el metal llega a demostrar gran facilidad en la interconversión del número de coordinación para llevar la catálisis del sustrato.

De esta manera, el sitio activo está diseñado para favorecer una catálisis bioquímica por medio de las propiedades tanto del metal como de los ligandos, así como de la geometría del espacio provocando al mismo tiempo estabilidad a la estructura completa de la enzima.

En el momento en que se produce una reacción dentro de las enzimas, cada metal llega a desempeñar diferentes funciones, como la simple activación del sustrato en forma rápida y adecuada para reacciones posteriores o también puede introducirse completamente en el mecanismo ayudando a la transformación del sustrato a producto, en este caso, es muy común que el metal ejerza una capacidad hacia reacciones con transferencia electrónica, y de este modo, favorecer la captación de energía dentro de los sistemas biológicos. Por otra parte, existen algunos metales que proporcionan electrones no apareados (paramagnéticos) y que se identifican fácilmente por tener un especial potencial de reactividad asociado con la ocupación de orbitales sigma al igual que la capacidad de donador pi y baja simetría para originar reacciones por vía radicales libres o también metales considerados ácidos de Lewis, los cuales sustentan la formación de carbocaciones o carbaniones.

Es interesante notar que mucha de la información acerca de las metaloenzimas se encuentra publicada en diversas revistas y libros y que al mismo tiempo cada artículo o publicación presenta sólo algunos detalles sobre la interacción entre el metal y la proteína. En este sentido, el trabajo trata de reunir y conjugar todos estos datos.

Se observará que el contenido de la tesis comprende la unión de dos áreas distintas pero que se conjugan para dar lo que se llama estudios de frontera. Estos estudios abarcan a la bioquímica y la química inorgánica formando lo que se llama química bioinorgánica. La química bioinorgánica estudia las funciones que logran tener los elementos químicos aparte del carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno. Un punto esencial dentro de esta área es la biocatálisis química.

En el presente trabajo, se realiza una investigación sobre las funciones más importantes que tienen los metales de transición con las enzimas. Se observará que la identificación y caracterización de estas enzimas es amplia y cubre varios aspectos que van desde fisicoquímicos como son: formación de carbocationes, de carbaniones o radicales libres, así como de análisis conformacional, estereoquímica, aspectos analíticos como son las técnicas de espectroscopia electrón paramagnética, espectroscopia Mosbauer, rayos X, cromatografía, utilizándose para la comprobación de formación de intermediarios y/o productos; finalmente, el aspecto inorgánico como son número de coordinación, propiedades magnéticas, tipos de ligando, ángulos y longitudes de enlace, etc.

Los capítulos son presentados de acuerdo a la importancia de las reacciones y como se encuentran en los sistemas biológicos.

Se espera que este trabajo contribuya para el conocimiento tanto de la función que tienen los metales de transición y saber sobre sus propiedades en sistemas biológicos como para comprender por que las enzimas tienen cierta estructura, estabilidad y actividad.

I. GENERALIDADES

GENERALIDADES

A. Enzimas.

Las enzimas son principalmente proteínas que se encuentran en las células de los organismos vivos y tienen la función de catalizar específicamente una reacción bioquímica.

La molécula sobre la cual actúa la enzima para formar el producto se llama sustrato. La enzima puede estar temporalmente unida con el sustrato en el estado inicial y en el estado intermedio, posteriormente hay la liberación del producto y la regeneración de la estructura proteica.

Las enzimas como catalizadores tienen dos características importantes: primero, no se transforman cuando transcurre la reacción y la segunda, no modifican el valor de la constante de equilibrio de la reacción.

La actividad de algunas enzimas depende de su estructura como proteína, mientras que otras necesitan uno o mas componentes llamados cofactores, el cofactor puede ser un ion metálico o bien una molécula orgánica llamada coenzima.

Los cofactores y los grupos prostéticos son pequeñas moléculas orgánicas o inorgánicas y la diferencia entre estos dos es el tipo de unión que mantienen con la enzima, el grupo prostético esta muy fuertemente unido a la enzima, por ejemplo el grupo hemo es un grupo prostético que puede disociarse solamente con ácidos fuertes. El complejo enzima-cofactor que es catalíticamente activo recibe el nombre de holoenzima, cuando el cofactor se separa de la enzima y ésta queda inactiva catalíticamente se le designa apoenzima.

Una característica más es que tienen un alto grado de especificidad que consiste en el sitio de unión del sustrato y tienen un acomodo de grupos químicos sobre la superficie, esta unión puede ser integrada dentro del sitio activo, sin embargo, en algunos casos pueden ser sitios adyacentes formados por medio de plegados de la estructura. Los grupos químicos involucrados en la unión del sustrato y en la catálisis frecuentemente son la cadena lateral de los aminoácidos.

Existe una región dentro de la enzima llamada sitio alostérico, en esta parte se unen pequeñas moléculas que realizan un cambio conformacional y provocan mayor o menor actividad de la enzima (DEVLIN, 1992).

1. Clasificación.

La Unión Internacional de Bioquímica clasifica a las enzimas en seis clases principales de acuerdo con el tipo de reacción catalizada, después cada clase es subdividida en varias subclases y posteriormente se subdividen. A cada clase y subclases se le asignan un número hasta obtener cuatro dígitos, además, el nombre se forma mencionando primero al sustrato y luego por el tipo de reacción y con la terminación asa.

Clase 1 Oxidoreductasas.

Estas enzimas catalizan reacciones de oxidoreducción y se clasifican en las siguientes subclases

Oxidásas: Transfieren dos electrones del oxígeno molecular resultando frecuentemente en la formación de H_2O_2 .

Oxigenasas: Catalizan la incorporación de oxígeno dentro del sustrato; en el caso de dioxigenasas, ambos átomos de oxígeno (O_2) se incorporan mientras en las monoxigenasa solo un átomo de oxígeno se integra como grupo hidroxil y el otro oxígeno se reduce a H_2O .

Peroxidasas: Utilizan H_2O_2 como agente oxidante.

Catalasas: Son las únicas dentro de la célula en las que H_2O_2 funciona como donador y receptor.



Clase 2 Transferasas.

Estas enzimas se encuentran involucradas en la transferencia de un ion de algún grupo funcional, los grupos amino, acil, fosfato y carbono y glucosil son los mejores radicales transferidos.

Aminotransferasas: Transfieren al grupo amino de un aminoácido a un receptor cetoácido resultando la formación de un nuevo aminoácido y un cetoácido.

Kinasas: Son las que catalizan la transferencia de un grupo fosforil de ATP u otro nucleótido trifosfato hacia algún alcohol o grupo receptor amino.

Clase 3 Hidrolasas.

A esta clase de enzimas se puede considerar una clase especial de transferasas ya que el grupo donador se transfiere al agua o la reacción generalizada es la descomposición hidrolítica de enlaces C-O, C-N, O-P y C-S.

Clase 4 Liasas.

Estas clases de enzimas adicionan o transfieren agua, amonio y/o bióxido de carbono.

Clase 5 Isomerasas.

En esta clase realiza la isomerización tanto de tipo cis-trans como aldosa-cetosa así como de tipo R-S.

Clase 6 Ligasas.

Estas enzimas están envueltas en reacciones donde dos moléculas se unen a expensas de un "enlace fosfato de alta energía" (DEVLIN, 1992).

2. Especificidad y sitio activo.

Como se había mencionado antes, la especificidad reside precisamente en el sitio de unión del sustrato sobre la superficie de la enzima. La estructura tiene tal forma que se crea una región con dimensiones moleculares exactas y donde el alineamiento de grupos electrofilicos y regiones hidrofóbicas pueden acomodar al sustrato, de esta manera, la especificidad de la reacción depende de los aminoácidos que hay en el sitio activo y especialmente de los que participan en el reacomodo durante la catálisis.

Uno de los primeros modelos para explicar la especificidad del sustrato fue el de la "cerradura-llave" donde el sustrato se ajusta al sitio de enlace exactamente como una llave en una cerradura o también como un guante y una mano: sin embargo, plantea una estructura muy rígida de la enzima y por tanto no puede ser totalmente cierto.

Los elementos más importantes que se encuentran alrededor del sitio activo hacen que el sustrato pueda ajustarse correctamente y que halla una interacción entre éste y la enzima conduciendo a un cambio conformacional.

A partir de observaciones experimentales surge el concepto de "ajuste inducido" donde el sustrato tiende a formar el producto como resultado de un cambio conformacional inducido dentro de la enzima.

Son necesarios al menos tres diferentes sitios de unión sobre la superficie de la enzima para distinguir entre grupos idénticos de un sustrato proquiral. La inclinación presentada por las enzimas hacia ciertos sustratos se llama especificidad enzimática.

El fundamento de la especificidad enzimática es la existencia de un sitio activo con una agrupación ordenada espacialmente, es decir, que sea estructuralmente asimétrica en un número pequeño de aminoácidos, esta región se estabiliza por la conformación completa de la molécula.

Este concepto puede comprenderse claramente a partir de la anatomía de la enzima y especialmente en función de cuatro tipos de residuos de aminoácidos: 1) Residuos no esenciales, pueden ser reemplazados y en ocasiones, eliminados sin presentarse una pérdida en la función o conformación de la enzima, 2) Residuos estructurales, los cuales son esenciales en el mantenimiento de una conformación ordenada de la enzima, 3) Residuos de unión, éstos son responsables de la asociación de la enzima con el sustrato, 4) Residuos catalíticos participan en la transformación química del sustrato y que pueden o no servir como residuos de unión.

Obviamente, los residuos estructurales, los de unión y los catalíticos se consideran fundamentales y cualquier modificación de estos disminuye la actividad enzimática. El sitio activo contiene residuos de unión y catalíticos, mientras los estructurales dirigen y estabilizan los pliegues de la cadena polipeptídica.

En este sentido, la asimetría de la unión y los residuos catalíticos en el sitio activo determinan la modificación estereoespecífica de un sustrato simétrico (DEVLIN, 1992).

3. Mecanismos de reacción.

Es importante señalar que las reacciones producidas se pueden clasificar principalmente por el tipo de proceso que se lleva a cabo, por ejemplo: a) catálisis ácida ocurre que un fuerte electrófilo (H^+) ataca primero al oxígeno rico en electrones desenlazando la carga negativa y dejando al carbono con mayor carga positiva siendo susceptible a ataque por agua, b) la catálisis ácida general, el protón es donado por un grupo débilmente ácido, c) catálisis básica, un nucleófilo fuerte (OH^-) hace el ataque al grupo carbonilo y d) catálisis básica general, el hidróxido se forma en el sitio de ataque por extracción de un protón del agua, e) catálisis de un ión metálico, un cation interactúa inicialmente con el oxígeno del grupo carbonilo y promueve el desplazamiento del electrón.

Un catalizador baja la barrera de energía de una reacción, por ejemplo, a partir de $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$ se puede observar que para una gran distribución de la energía (un valor grande y positivo ΔH) o una improbable configuración en el estado de transición (un valor grande y negativo ΔS) hacen que el valor de ΔG sea considerable y positivo y entonces se tiene una reacción lenta. Aquí

ΔS refleja el factor de una orientación que guardan los reactivos y las colisiones que ocurren entre estos. Se puede pensar que el catalizador ayuda en la unión de dos moléculas de reactivos dándose una orientación propia e incrementando las oportunidades para reaccionar y conducirlos a un estado de transición aun cuando el valor de ΔS sea muy pequeño (MATHEWS, 1990).

4. Cinética Enzimática.

Una forma sencilla de describir la reacción entre un sustrato, una enzima y la formación del producto es:



Entonces suponiendo que es la reacción de primer orden, la velocidad de la reacción se define como :

$$V = K_{cat} [ES]$$

[] = Concentración.

No obstante, sería mejor expresarlo en función de las concentraciones de la enzima y el sustrato. Para hacer este cambio, se puede realizar de dos formas , la primera fue efectuada por Leonor Michaelis y Maude Menten, ellos supusieron que el valor de K_{cat} es muy lenta comparada con la velocidad de formación del complejo ES, por lo tanto se puede decir que

$$K_s = [E] [S] / [ES] = K_1 / K_{-1}$$

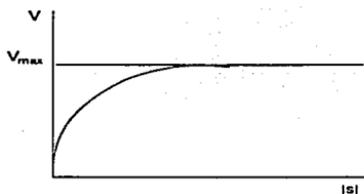
K_s es la constante de disociación del complejo ES y $[E]$ se refiere a la enzima libre. Esto significa que solo una parte de la enzima total $[E]_t$ esta reaccionando

$$[E] = [E]_t - [ES]$$

Sustituyendo estas expresiones en la primera ecuación, se tiene:

$$V = K_{cat} [E]_t [S] / [S] + K_s$$

Esta ecuación es llamada de Michaelis-Menten. La gráfica de V vs S señala que la concentración del sustrato limita la velocidad (V_m) y ésto es causado por que la enzima está saturada.



Posteriormente Briggs & Haldane presentaron un modelo más representativo; este modelo se basa en los siguientes argumentos: es mayor y más rápido el (ES) formado que el disociado. Esto significa que (ES) se formará y rápidamente tendrá un estado fijo en el cual quedará constante. En este estado permanecerá hasta que todo el sustrato haya sido consumido.

$$V = K_{cat} [E] [S] / [S] + K_m$$

$$V = V_m [S] / S + K_m$$

$$K_m = K_{-1} + K_{cat} / K_1$$

Esta es llamada ecuación de Briggs-Haldane, sin embargo se llega al mismo resultado que de Michaelis-Menten (MATHEWS, 1990).

5. Inhibición enzimática.

Muchos tipos de moléculas inhiben a la enzima actuando de forma variada. La inhibición se divide en reversible e irreversible; la reversible consiste de la unión no covalente de una molécula, disminuyendo la actividad de la enzima. En la irreversible, la molécula se une covalentemente a la enzima y la incapacita. Definitivamente, la inhibición reversible sucede como una respuesta celular mientras la inhibición irreversible produce cambios lentos y permanentes. Las sustancias tóxicas son en muchas ocasiones inhibidores irreversibles de enzimas.

Otro tipo de inhibiciones es la competitiva y la no competitiva la inhibición competitiva existe una molécula tan parecida al sustrato que la enzima la acepta en su sitio de unión. Sin embargo, es posible unirse al sitio activo pero no llevar a cabo el proceso catalítico, simplemente pasa el tiempo en el sitio activo.

La inhibición no competitiva sucede cuando una molécula o ion se une a un segundo sitio sobre la superficie de la enzima (no sobre el sitio activo), puede ser que distorsione la estructura y entonces el proceso catalítico no es eficiente (MATHEWS, 1990).

B. Metales de transición.

Existe una distribución homogénea de algunos metales de transición en los sistemas biológicos y se debe a las propiedades tan similares que tienen dentro del metabolismo.

Una parte considerable de enzimas contienen una unión débil o fuerte con algunos metales de transición y es indudablemente que el hierro es el más importante, debido a sus propiedades, tanto oxidoreductoras como hidrolíticas.

Es probable que el par redox Fe(III)/Fe(II) haya surgido como una necesidad en la descomposición de H_2O_2 , así como también en la formación de cargadores como el grupo hemo.

El problema del origen de la vida tiene una posibilidad en la química de coordinación. Algunos resultados señalan la evolución de la vida y su relación con complejos de metales de transición (SIGEL, 1986).

1. Características químicas de los diversos estados de oxidación de los metales de transición.

Cuando se examinan los estados de oxidación de la primera serie de transición, existe una tendencia general a un número pequeño en los extremos de la serie y un mayor número en la parte central. El que tenga pocos estados de oxidación en los extremos es por el hecho de poder perder o compartir muy pocos electrones tipo d . Un segundo factor que tienden a reducir la estabilidad de altos estados de oxidación hacia el final de la serie, es el constante aumento en el número atómico efectivo. Esto provoca una disminución en la energía de los orbitales d , los emerge en las capas internas de los electrones y dificulta su capacidad de enlace. Así, al inicio de una serie es difícil formar especies que no utilice electrones d . Como consecuencia de esto, los

máximos estados de oxidación dan una estabilidad razonable, equivalente a la suma de electrones s y d hasta manganeso seguido por un descenso en la estabilidad de los estados de oxidación altos.

En ocasiones una propiedad química que depende de la carga catiónica es el número de coordinación y también por el tamaño, no obstante, los cationes con cargas mayores tienden a tener número de coordinación grande. Esto es resultado de la electronegatividad de Pauling. Por otra parte, en los estados de oxidación extremadamente altos existe una tendencia a formar enlaces doble metal-oxígeno lo que provoca otro tipo de enlaces del oxígeno al metal y se presentan especies tetraédricas (HUHEEY, 1981).

a) Teoría de Orbitales Moleculares.

Esta teoría define las distribuciones espaciales de los electrones en un átomo aislado, las configuraciones electrónicas dentro de los orbitales y deduce las configuraciones electrónicas moleculares acomodando a los electrones disponibles en estos orbitales.

La combinación de los orbitales atómicos producen orbitales moleculares, de los cuales la mitad son de menor energía que los orbitales atómicos originales (Orbitales moleculares de enlace) y la otra mitad de muy alta energía (orbitales moleculares de antienlace). La situación es complicada en los metales de transición ya que poseen varios tipos de orbitales atómicos.

Cuando los orbitales se superponen sobre el eje entre dos átomos enlazados se forma un enlace sigma; esto puede ocurrir no solo en el caso de los orbitales p sino también para orbitales s+s, s+p, s+d y p+d. Para que ocurra una interacción significativa entre dos orbitales atómicos, sus energías deben ser idénticas. La combinación de orbitales de un metal y un ligando de energía excesivamente diferentes puede despreciarse.

En un complejo octaédrico de tipo ML_6 , los únicos orbitales metálicos que por lo común pueden superponerse con orbitales sigma de los ligandos son el par e_g del nivel 3d. Esto produce el diagrama de niveles energéticos de orbitales moleculares, el cual puede entenderse si se advierten los siguientes puntos.

- I. Los orbitales metálicos t_{2g} debido a su forma no se superponen con los orbitales sigma del ligando. Estos son orbitales de "no enlace" y permanecerán asociados al metal.
- II. Las formas y posiciones de los orbitales moleculares no se muestran directamente, sin embargo, un orbital molecular se asemeja más al orbital atómico de energía parecida.

III. Un enlace es puramente covalente si los orbitales moleculares, y los electrones que los ocupan, están compartidos igualmente por los átomos enlazados (COTTON, 1978).

b) pH y potencial redox.

Los sistemas biológicos mantienen una dependencia del pH y potencial redox, por lo que se encuentran limitados a ciertas condiciones. En este sentido, se conoce que a pH 7 el potencial redox del agua está restringido a un rango entre -0.4 a $+0.8V$ con respecto al electrodo de hidrógeno y corresponde al sistema H^+/H_2 y O_2/OH^- , es decir, en los términos donde el agua es reducida y oxidada respectivamente. Así también, se espera que los iones metálicos en medio acuoso queden dentro de este rango.

El único elemento de interés biológico que no cumple con estas generalizaciones es el molibdeno; este elemento del segundo periodo de los metales de transición se comporta como un no metal, tiene una amplia variedad de estados de oxidación en agua (FRAUSTO, 1991).

c) Control Selectivo de Estados de Oxidación en Metales.

Como se indicó anteriormente, los estados de oxidación se limitan al rango de oxidación y reducción del agua, esto causa un control selectivo de los estados de oxidación. Hay otras especies que ayudan al control, tal como la fuerte unión que tienen a un estado de oxidación y la geometría que posee el metal. Otro punto importante es el tipo de quelante y el tipo de reacción que lleva a cabo el metal, así como también la velocidad de intercambio de ligados (FRAUSTO, 1991).

2. Propiedades de los metales de transición en los sistemas biológicos.

Varios metales de transición presentan algunas propiedades que favorecen los procesos de que se llevan en los sistemas biológicos. El zinc se caracteriza por tener una carga altamente concentrada, ya que es un ion pequeño (1.65 \AA de radio). Una carga electrostática de dos y un pequeño tamaño da una moderada unión a aniones tales como carboxilato y fosfato. El potencial de ionización es una guía de la fuerza ácida de Lewis y debido a que el zinc tiene una alta afinidad electrónica, esto lo hace un ácido fuerte de Lewis..

A continuación se describen algunas propiedades del zinc en sistemas biológicos:

- * El zinc es el metal catalítico más común en el citoplasma celular.
- * Las enzimas digestivas que contienen zinc son activas tanto dentro como fuera de la célula.
- * El zinc tiene un papel estructural, que se extiende desde filamentos hasta en la organización de cromosomas.
- * Con un papel regulador el zinc se encuentra en el DNA de células procariontes (FRAUSTO, 1991).

El hierro no sólo está en la catálisis de oxidoreducción y bioenergética, sino también, en sistemas de control y en varias reacciones de tipo ácido-base. Las principales funciones del hierro son 1) síntesis de desoxirribosa 2) transporte de oxígeno 3) activación de oxígeno 4) hidrólisis de fosfoester y 5) depósito y transporte de fósforo.

Se consideran tres grupos de proteínas que contienen hierro y que están basados en el grupo funcional presente en cada proteína: proteínas sin hemo, hemo proteínas y proteínas Fe/S (KENDRICK, 1992).

El manganeso presenta gran interés debido a que se encuentra relacionado en la liberación de oxígeno molecular por el sistema de la fotosíntesis II. La forma más estable del manganeso en solución acuosa es Mn(II) mientras que en solución básica y en presencia de oxígeno se encuentra como MnO_2 . Los complejos de Mn(II) son hexa coordinados y octaédricos pero hay algunos ejemplos de complejos irregulares de número de coordinación siete (KENDRICK, 1992).

Las propiedades redox del cobre dependen ampliamente de los tipos de ligandos, de la disposición espacial y el solvente. El cobre dentro de las proteínas no tiene una alta simetría mas bien es totalmente variable.

El Cu(I) es un ácido extremadamente suave debido a que sus complejos son más fuertes con halógenos y la coordinación tetraédrica domina (SIGEL, 1986).

El Ni(II) es el estado de oxidación más estable en solución acuosa. Este ion forma complejos simples con número de coordinación 4, 5 y 6 (SIGEL, 1986).

El cobalto no sólo es rico en electrones sino también posee bajos estados de oxidación. Sus electrones 3d pueden formar orbitales sigma o pi en estados de bajo espín. El ion d^8 bajo espín es expuesto a un doble orbital ocupado d_{z^2} lo cual lo hace una base muy fuerte de Lewis. El ion tetragonal bajo espín d^7 es un radial libre. El cobalto usado en biología se encuentra en un estado estable (bajo espín) (FRAUSTO, 1991).

El molibdeno generalmente forma complejos uniéndose a O ó N y teniendo una geometría octaédrica, la coordinación que tienen el molibdeno en algunas enzimas es de cinco debido a que se une al azufre formando especies $M=S$ o teniendo ligandos tiolatos. Aunque también hay muchas estructuras no conocidas ya que el molibdeno demuestra gran posibilidad en la química estructural (FRAUSTO, 1991).

El vanadio tiene asociado una actividad catalítica, este elemento tiene una química muy rica con el oxígeno llegando a formar oxianiones y oxicationes VO_4^{2-} , VO_2^+ y VO_2^{2+} . También se presenta una química con el azufre así por ejemplo hay VS_4^{3-} y centros catiónicos como VS^{2+} y $VSSH^+$ y agrupaciones de Fe/S lo cual está asociado con la fijación de nitrógeno. A pH neutro el estado predominante es la especie vanadato, sin embargo, hay complejos con estado de oxidación mas bajos que también se encuentran comúnmente. El número de coordinación de vanadio (II) y (III) es octaédrico (CHASTEEN, 1990).

El tungsteno forma oxianiones tetraédricos (WO_4^{2-}) cuyas sales alcalinas son solubles en agua. Estos aniones se polimerizan por acidificación dando lugar a la formación de una especie de isopolianiones muy complejos.

La reducción de compuestos de tungsteno conduce a la formación de oxo especies de tungsteno, con enlaces $W=O$ y/o $W-O-W$ lo que constituye una propiedad característica de este elemento (FRAUSTO, 1991).

II. HIERRO EN ENZIMAS

HIERRO EN ENZIMAS

Una catálisis en medio ácido reduce la estabilidad de la unión del ión divalente a la proteína, por ésto se utilizan metales dentro de la enzima para lograr gran estabilidad en un ambiente ácido y quizá también para que la conformación M-O-M (M=Fe) ayude a mantener el estado de oxidación.

El hierro es un metal con ciertas características que permite la facilidad de algunos procesos bioquímicos; como se mencionó, el hierro actúa en reacciones tanto ácido-base como de oxidoreducción, sus estados de oxidación y configuración electrónica lo hace ser un metal necesario en el transporte de oxígeno, así como también en la formación de complejos de Fe/S.

A. Enzimas con Fe/S

Estas enzimas se caracterizan por tener hierro unido a una especie de azufre. El azufre actúa como un ligando en forma de tiolato o simplemente un átomo de azufre.

En las estructuras de la mayoría de las enzimas el hierro forma un tetraedro con RS^- (Rubredoxinas) o con S^{2-} (ferrodoxinas). El doblez que tienen estas proteínas es sobre la estructura tipo β -hoja, el hierro se encuentra coordinado y saturado debido a este doblez. Estas enzimas tienen una función sencilla y la estructura favorece la transferencia de electrones. El cambio de Fe(II)/Fe(III) alto espín modifica la longitud de enlace del complejo de azufre y en consecuencia produce una tensión conformacional inducida de la proteína doblada.

Muchas proteínas Fe/S tienen potenciales redox muy negativos siendo el rango de 0.00 a -0.5 V.

Las proteínas con propiedades de oxidoreducción de bajo peso molecular tienen alguno de los tres tipos de sitios activos, los cuales son $[Fe(S-Cis)_4]$, $[Fe_4S^*_4(S-Cis)_4]$ y $[Fe_2S_2(S-Cis)_4]$ donde S^* es S^{2-} de cisteinato. los átomos de Fe están coordinados en un acomodo aparentemente tetraédrico.

La enzima de *Clostridium pasterianum* cataliza la oxidación de ferrodoxinas reducidas por protones y contiene complejos tipo $4Fe/4S$. ésta ha sido aislada y caracterizada conteniendo de 1 a 3 cúmulos por molécula (BEINERT, 1989).

1. Centros activos Fe/S en enzimas.

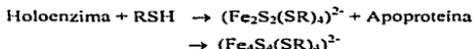
Recientemente se ha visto que los complejos Fe/S no sólo llevan a cabo la transferencia electrónica sino también unen al sustrato, estos complejos se caracterizan por su unión protéica, por la geometría del sitio y en la exposición de al menos un hierro para intercambiar con el medio; La coordinación incluye un enlace histidina y un carboxilato de la proteína; el complejo reactivo Fe_4S_4 es capaz de perder un átomo de hierro y formar entonces Fe_3S_4 .

2. Ferredoxinas.

Las ferredoxinas son pequeñas proteínas que tienen entre 35 a 120 aminoácidos y catalizan reacciones de oxidoreducción con potenciales entre +350 a -600 mV. (HIRAZAWA, 1993). Los sitios activos de estas enzimas pueden ser extraídos intactos de la proteína en presencia de ligandos y solventes apropiados (MOULIS, 1995).

En la secuencia de aminoácidos, las posiciones que tienen las cisteínas son muy diferentes sin embargo, el medio ambiente del complejo no varía en diversas clases de ferredoxinas, las posiciones de los aminoácidos han sido útiles en el estudio de la evolución química de ferredoxinas. (YAKUNIN, 1993).

Las reacciones rápidas de sustitución de tiolato debido a centros Fe tetraédricos no permite la reconstitución protéica de la apoenzima y entonces se forman complejos de Fe/S (MOURA, 1990).



a) 2Fe/2S

Esta enzima transfiere solo un electrón en un rango de potencial entre +250 y -400 mV dependiendo de las especies. Las soluciones de ferredoxinas tipo 2Fe/2S tienen un color rojo en el estado oxidado y rosa en el estado reducido.

El complejo $(\text{Fe}_2\text{S}_2(\text{SR})_4)^{2-}$ es una especie isoelectrónica e isoestructural que participa como un grupo prostético en la enzima (Fig 2.1)

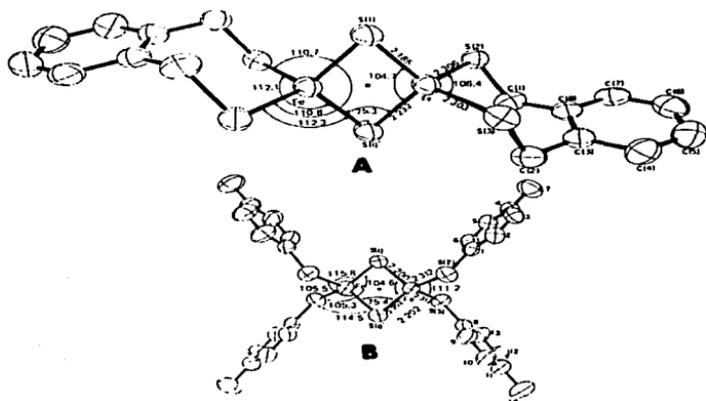


Figura 2.1 Ferredoxina tipo 2Fe/2S (SIGEL, 1986).

El complejo 2Fe/2S tiene varias observaciones: 1) Los resultados indican que los átomos de Hierro en 2Fe-Fd_{red} no son equivalentes sino corresponden a un Fe(III) y un Fe(II) 2) Los potenciales de la primera y segunda reducción están separados por solo 0.24 V, esto señala que el complejo 2Fe-Fd_{red} no es capaz de aceptar un segundo electrón.

Se puede observar entonces que la cadena polipeptídica controla la afinidad electrónica de los dos iones de hierro y la transferencia de electrones depende en gran medida de un solo hierro. Es posible conocer cuales de los dos átomos de hierro tienen el papel catalítico al adicionar un quinto ligando, éste se unirá al hierro catalítico, sin embargo, el complejo 2Fe/2S aparentemente tiene poca afinidad para ligandos adicionales.

b) 4Fe/4S.

Hay mayor variedad en este grupo que en el anterior y una razón es que los complejos 2Fe/2S tienen una carga neta de 2- y 3- mientras que los complejos 4Fe/4S aparecen al menos con tres (1-, 2-, 3-)(WERST, 1990).

El potencial redox de estos complejos tiene un rango +350 a -400 mV cuando tiene un carga neta de 1- y 2- mientras que en el caso de 2- y 3- el rango va de -350 a -500 mV. Las soluciones de estas ferredoxinas tienen una coloración amarillo-verde (MORENO, 1994).

La geometría esencialmente es un tetrámero de cuatro átomos de hierro penetrando un segundo más grande y con cuatro átomos de azufre provocando algunas distorsiones. Estas distorsiones toman la forma de una reducción de longitud de enlace entre átomos de dos faces opuestas de un cubo. (WATT, 1994).

c) Fe/4S.

Estos complejos demuestran grandes desviaciones del tetraedro en ángulos de enlace y distancia, provocadas por tensiones ejercidas por la proteína. Las dimensiones del complejo Fe/4S por medio de rayos x indican un incremento de alrededor de 0.5 Å en la longitud del enlace Fe-S.

El complejo oxidado consiste de un Fe(III) alto espín, mientras que el reducido, de un hierro (II) alto espín. El potencial redox para este sistema se encuentra entre -400 a -600 mV.

3. Rubredoxinas.

Estas enzimas (frecuentemente abreviadas Rd) tienen un color rojo en estado oxidado, contienen al menos cuatro residuos de cisteína por molécula y su función en la célula no se conoce, aunque se encuentra en células anaeróbicas. Las rubredoxinas dan un espectro Mosbauer característico del hierro alto espín y complejos ferrosos en el estado oxidado y reducido de la proteína.

B. Enzimas con grupo hemo.

El grupo hemo es una porfirina que contiene ligandos macrocíclicos que coordinan al hierro (Fig. 2.2), la porfirina no protonada sirve como un donador de dos electrones al hierro.

Los tipos de ligandos en la posición axial del grupo hemo pueden ser variados y frecuentemente un enlace largo del hierro-ligando resulta en un alto espín, mientras los nitrógenos de la porfirina ocupen 4 posiciones ecuatoriales.

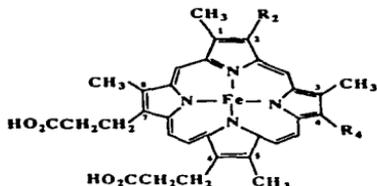


Figura 2.2 Estructura del grupo Hemo (KENDRICK, 1992).

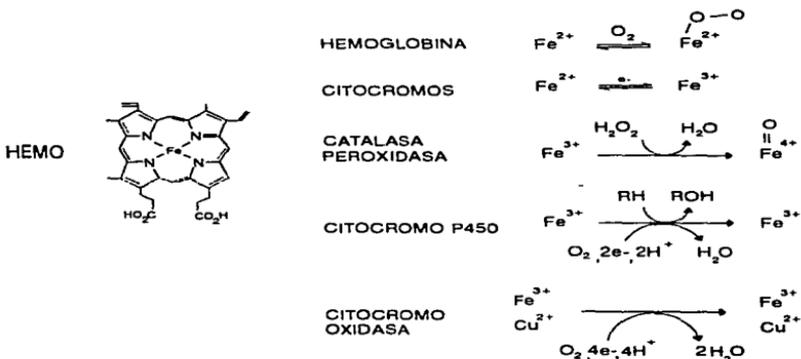


Figura 2.3 Principales proteínas que contienen el grupo hemo (KENDRICK, 1992)

Las enzimas con grupo hemo presentan las siguientes funciones 1) transferencia electrónica (citocromos); 2) unión y transporte de oxígeno; 3) insertar átomos de oxígeno en sustancias orgánicas (Fig. 2.3).

1. Hemo con función de transferencia de electrones.

La principal función del grupo hemo es la transferencia electrónica, frecuentemente a potenciales redox mayores de 0.00 V. Un aspecto interesante es la relación entre las reacciones redox y la acción energética de los protones. Por lo tanto la importancia de la unidad hemo y la asociación con estructuras de hélice tienen un gran significado, estas estructuras tienen la fuerza para actuar como bombas o puertas para el flujo de electrones.

a). Citocromo a.

Este citocromo presenta dos histidinas coordinadas con el grupo hemo. Además de este citocromo, el tipo b y c tienen al hierro en un estado de bajo espín, en estos, el grupo hemo además se encuentra en un ambiente hidrofóbico constituido por cadenas de aminoácidos comúnmente en forma de hélice. El potencial que cubre Fe(III)/Fe(II) tiene un rango de -300 a +400mV por lo que es más alto que en los complejos Fe/S.

En muchas ocasiones el quinto ligando del hierro alto espín es una histidina, un tiolato o un carboxilato. Casi siempre las proteínas no se unen covalentemente al grupo hemo, sin embargo parece estar en una cavidad hidrofóbica. El citocromo tipo a₃ está en la membrana y probablemente utiliza un mecanismo de acción de hélices para funcionar como una bomba de protones.

b) Citocromo b.

En este citocromo, el grupo hemo se une a la proteína por medio de dos histidinas, y su función es también la transferencia electrónica; está situado en la membrana plasmática. (HUANG, 1995). Un punto de interés en bioenergética es la unión del flujo electrónico y el protónico en la membrana mitocondrial, aquí se observa (Fig 2.4) como el citocromo b se relaciona con movimientos de protones por reajustes que existen dentro de su conformación de hélice.

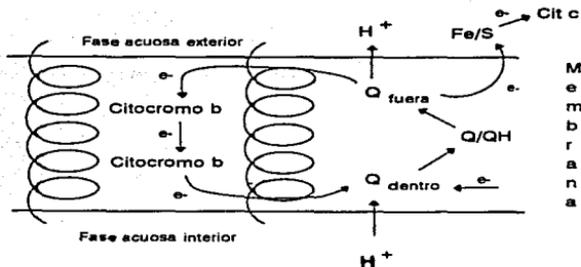


Figura 2.4 Descripción de la transferencia electrónica del citocromo b dentro de la membrana (FRAUSTO, 1991).

c) Citocromo c.

Se distingue de los demás citocromos por el hecho de que el grupo hemo se une a través de tioéteres en forma covalente a la proteína, en la Fig 2.5 se muestra el punto de ataque del grupo hemo a la base proteica.

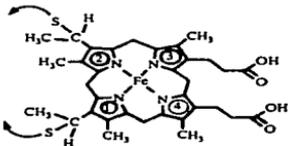


Figura 2.5 Ataque del grupo Hemo a la proteína en el citocromo c (WILLIAMS, 1991)

La función de los citocromos tipo c es la de proporcionar electrones a través de la siguiente reacción: $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^-$ posteriormente, el citocromo es reducido por transportadores de electrones (WILLIAMS, 1991). Haciendo una caracterización de la estructura del citocromo, se observan alrededor de 103 aminoácidos con una secuencia ya determinada, mientras el potencial redox a pH neutro es de alrededor 260 mV.

Algunas de las condiciones que controlan la reacción de transferencia electrónica son la fuerza iónica, el pH y la temperatura. Se descubrió que en la reducción del citocromo c hay un anillo aromático que funciona como un canal y se encuentra en la parte inferior del grupo hemo (Fig 2.6) mientras en la oxidación, el grupo hemo esta expuesto en la superficie de la proteína (ASCENZI, 1994). La proteína misma no se dobla si no tiene al grupo hemo.

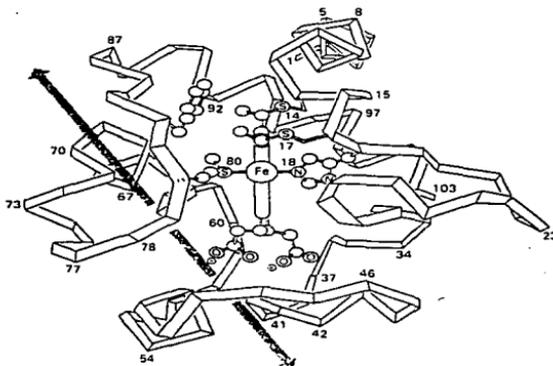


Figura 2.6 Estructura del citocromo c y la unión con el grupo hemo (WILLIAMS, 1991)

Algunas bacterias contienen varios grupos hemo (citocromo c₃, c₇) frecuentemente entre 3 a 8 unidades, aunque no se sabe perfectamente su función, una hipótesis es que se crean depósitos electrónicos como condensadores en los circuitos eléctricos.

A continuación se describe la estructura del citocromo c:

1. Un hierro está unido a un azufre de Met-80 y a nitrógeno de His-18. (SHAO, 1995).
2. Existen dos largas hélices conformadas por los residuos 1-12 y 87-102, la primera hélice está rígidamente fijada por los residuos cisteína 14 y 17 los cuales a la vez forman puentes covalentes con el grupo vinil del anillo porfirina.
3. A partir del residuo 18 hay varios grupos que se asocian al grupo hemo, precisamente el residuo 38 es una arginina que se une al ácido propiónico.
4. Después de los residuos 38 parecen conformarse varias hélices, sobre todo de 50 a 55, de 60 a 69 y de 70 a 76, posteriormente, otra vez se vuelve a unir a el grupo hemo a través de la Met-80 y después otra hélice que consiste en los residuos 87-102.
5. El grupo hemo presenta varios puentes de hidrógeno a su alrededor y en ocasiones incluye moléculas de agua.

Es importante observar las hélices y los puentes hidrógeno que hay entre los residuos 38 y 86. Durante la transferencia electrónica en el proceso de Fe(II)/Fe(III) no solo se altera el ligando a Met-80 y la estructura primaria que hay entre los residuos 79 a 85 sino también hay un reacondo de los puentes hidrógeno (BRAUN, 1995) (Fig 2.7)

2. Hemo en oxigenasas

Las oxigenasas se dividen en mono y dioxigenasas dependiendo del número de oxígenos incorporados en la molécula, estas enzimas tienen la función de oxidar moléculas orgánicas; iniciándose en la sustracción de hidrógeno y hasta la reacción con oxígeno molecular controlando la cadena respiratoria.

a) Monooxidasas.

En las monooxidasas, el oxígeno molecular reacciona directamente con el sustrato orgánico; las monooxigenasas, realizan la reducción del oxígeno molecular perdiendo dos electrones y adicionando un átomo de oxígeno del átomo de carbono del sustrato, la reacción general es:



i) Citocromo oxidasa

Parte del oxígeno molecular absorbido por organismo aeróbicos es consumido en la reacción catalizada por la citocromo oxidasa:



Donde C^{2+} y C^{3+} representa a la forma reducida y oxidada del citocromo c respectivamente y los subíndices significan matriz y citosol, la importancia de este proceso de captación de oxígeno molecular es que constituye la reacción terminal de la cadena respiratoria.

Se ha establecido que hay dos citocromos separados en la oxidasa, así también dos átomos de cobre con propiedades diferentes cada uno, Cu_A y Cu_B .

Las diferentes propiedades de los citocromos tipo a y a_3 dependen de la unión con la parte proteica de la enzima. El citocromo a tiene un átomo de hierro en un estado de bajo espín y probablemente dos ligandos proteicos axiales. El citocromo a_3 interactúa con oxígeno molecular y el átomo de hierro presenta un estado de alto espín.

La estructura del citocromo tiene una larga cadena lateral la cual une al grupo prostético a la proteína por medio de interacción hidrofóbica; es posible que los dobles enlaces participen en la transferencia electrónica.

Se ha propuesto un mecanismo para la reducción del citocromo en donde los electrones pasan de un residuo aromático a otro, siendo posible por cambios conformacionales.

La enzima consiste de siete subunidades en una proporción 1:1 y tiene un peso molecular de alrededor de 140,000 Daltons.

Las subunidades I, III, V, VI se dice que contiene a los citocromos y las subunidades II, V, VII contienen a los átomos de cobre, en forma mas precisa, la unida VI e II contienen a los citocromos y la subunidad III al cobre (SOULIMANE, 1995).

El mecanismo comprende un centro bimetalico de Fe y Cu, apareciendo en la reducción algunos intermediarios como superóxido (O_2^-) peróxido (H_2O_2) y el ion hidroxilo (OH^-), por otra parte, todos los intermediarios han sido identificados y esto lleva a un mecanismo propuesto donde existen dos fases. La fase de potencia y la fase de entrada electrónica; en el primer paso, el oxígeno forma un oxicomplejo con Fe(II) y Cu(I), en el segundo paso el cobre se oxida y forma un peroxicomplejo, luego entran dos protones y un electrón y el hierro se oxida (FeIV) (complejo ferril, después entra otro electrón y aparece la especie ferrihidroxido, el hierro se reduce y posteriormente libera agua (Fig 2.8)

La fase de entrada de protones y electrones se llama fase de potencia y la fase de recuperación de los sitios metálicos fase de entrada electrónica (WIKSTRÖM, 1990).

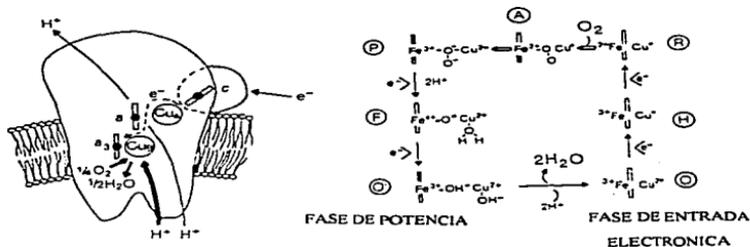


Figura 2.8 Estructura y mecanismo de citocromo c oxidasa (WIKSTRÖM, 1990).

ii) Citocromo P450

En las oxidasas tipo citocromo P450 las reacciones son 1) unión del sustrato orgánico, 2) reducción del Fe(III) a Fe(II) alto espín, 3) Unión del oxígeno molecular a Fe(II) bajo espín 4) formación de superóxido con Fe(III) bajo espín 5) Oxidación de $(\text{FeO}_2)^+$ a $(\text{FeO})^{3+}$ y 6) ataque de oxígeno sobre RH por dar ROH probablemente mediante intermediarios radicales (Fig 2.9), la adición de electrones es en el paso 2 y 4.

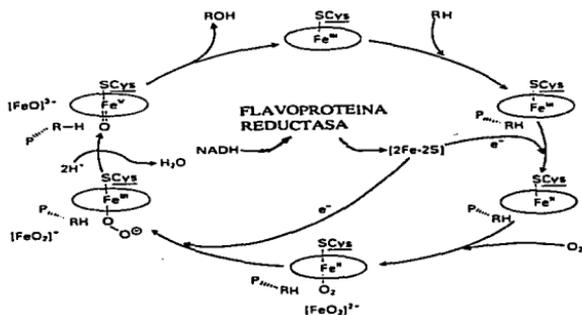


Figura 2.9 Ciclo catalítico del citocromo P450 (FRAUSTO, 1991).

Los sustratos del citocromo P450 son moléculas hidrofóbicas no polares, como el ciclohexano; mientras sustancias polares tales como el alcohol tienen menos afinidad por el mismo sitio activo (KASTNER, 1994), a continuación se indica con detalle cada paso:

Primera Reducción: Este es el segundo paso descrito anteriormente y se presenta la entrada de un electrón que tiene como origen NADH, el potencial para el par Fe(III)/Fe(II) es -326 mV pero se incrementa a -150 mV en presencia de CO (ATKINS, 1990).

Unión de oxígeno molecular: Este es parte del tercer paso y se ha comprobado por la formación de un complejo ferroso de oxígeno molecular, este complejo es diamagnético.

Segunda reducción: En este paso entra un segundo electrón derivado de NADH y uno de los átomos de oxígeno (el que no está unido al hierro) que tiene una carga negativa .

Rompimiento del enlace oxígeno-oxígeno: El oxígeno con carga negativa forma agua (hidrólisis) y se produce un complejo de Fe^{V} mejor expresado en la forma $(\text{FeO})^{3+}$ pareciendo que el oxígeno tiene un rompimiento heterolítico y después se produce la protonación (IMAI, 1994).

Sustracción de hidrógeno: Se espera una especie de Fe-oxenoide con propiedades electrofílicas y muy reactivas hacia moléculas orgánicas oxidables. sin embargo, no está completamente bien establecido este último paso, tal vez el enlace carbono-hidrógeno reacciona en cualquiera de las siguientes formas a) como un paso radical (homolíticamente), b) como carbanion y protón (heterolíticamente), c) como carbocatión y ion hidruro (heterolíticamente) o, d) con adición directa de oxígeno (concertadamente); cabe señalar que la hidroxilación es más favorable en posiciones terciaria que secundaria.

El último paso es la liberación del alcohol, en este proceso, el grupo hidroxilo está coordinado al hierro inmediatamente después de su formación y podría ser para no permitir una segunda hidroxilación.

iii) Peroxidasas y catalasa.

Las peroxidasas están relacionadas con el metabolismo hormonal de las plantas, también proporcionan algunas formas para la polimerización por radicales libres; sus reacciones demuestran muy baja selectividad y los fenoles e indoles pueden ser atacados (KANG, 1993), a continuación se observan varias reacciones donde participa la peroxidasa (Fig 2.10)

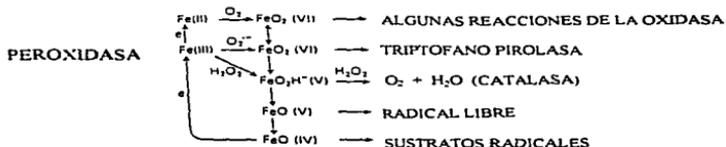


Figura 2.10 Intermediarios en las reacciones de peroxidasa (FRAUSTO, 1991)

Las catalasas al igual que las peroxidasas tienen el papel de neutralizar al H_2O_2 formando O_2 y H_2O , la estructura de la catalasa demuestra un grupo hemo muy escondido, presumiblemente para prevenir el escape de algún intermediario como OH^\cdot y O_2^\cdot (MARCINKEVICIENE, 1995).

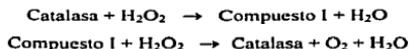
Su peso molecular varía entre $2.4-2.5 \times 10^5$ Da y contiene varios grupos prostéticos hemo por molécula, la catalasa consta de cuatro subunidades equivalentes por molécula y cada subunidad tiene un grupo hemo; se ha encontrado que tiene 50% de la estructura en forma de hélice y no se señala algún puente disulfuro.

El hierro del grupo hemo en catalasa muestra un estado $Fe(III)$ alto espín y puede ser que el ligando en posición axial sea una histidina mientras la sexta posición se presume es una molécula de agua (YOUN, 1995).

Algunos factores que influyen en la descomposición de H_2O_2 son:

- 1) La alta especificidad de la enzima.
- 2) Desnaturalización de la enzima por falta de un sustrato.

La formación de un intermediario (compuesto I) no está muy bien establecido por que aparece muy rápido en el proceso catalítico.



b) Dioxigenasas

Las enzimas que catalizan la adición de oxígeno molecular dentro de sustratos orgánicos se llaman dioxigenasas.

La pirocatecasa produce la descomposición de catecol con la incorporación directa de oxígeno molecular para dar ácido *cis,cis* mucónico.

El sitio activo en estas enzimas conduce a reacciones vía radicales libres obteniendo solo uno y no una mezcla de productos. (NANJO, 1995).

i) Intradiol dioxigenasa.

La catecol 1,2 Dioxigenasa (CTD) y protocatecato 3,4 dioxigenasa (PCD) son las mejores caracterizadas, la CTD tiene una composición alfa beta mientras las PCD consisten de 4,5 y hasta 12 unidades $\alpha\beta$.

El sitio activo de intradiol dioxigenasa consiste de un centro coordinado férrico Fe(III) alto espín con dos tirosinas, dos histidinas y una molécula de agua produciendo un complejo pentacoordinado (Fig 2.11).

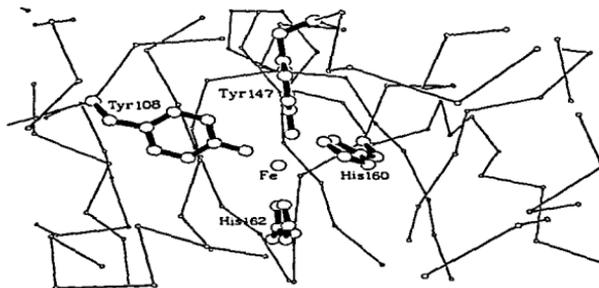


Figura 2.11 Sitio activo de la PCD (LOHER, 1989).

La holoenzima de la PCD tiene una estequiometría $(\alpha\beta\text{Fe})_{12}$ y el sitio de unión del hierro son Tyr-108, Tyr-147, His-160 y His-162 dentro de una subunidad β ; la coordinación geométrica del centro férrico se ha descrito como trigonal bipiramidal con una histidina y tirosina axiales.

El hierro mantiene su estado de oxidación férrico y alto espín durante la formación del complejo dioxigenasa-sustrato y estudios cinéticos indican un mecanismo bimolecular con la unión inicial del sustrato



ii) Extradiol dioxigenasa

Estas son menos específicas, siendo generalmente dos sustratos aromáticos y se ejemplifican con catecol 2,3 dioxigenasas y protocatecuato 4,5 dioxigenasa. Estas enzimas forman parte del metabolismo del triptofano, de la tirosina y en la síntesis de piridin nucleotidos, sin embargo, debido a la gran inestabilidad de la enzima, no se conoce perfectamente la estructura y el papel del metal.

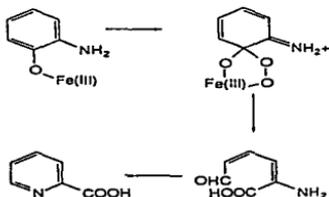


Figura 2.12 Un ejemplo donde actúa la extradiol dioxigenasa (LOHER, 1989)

Parece ser que algunas tienen una estructura con subunidades tipo $(\alpha\text{Fe})_4$, mientras que otras se distinguen por una composición $(\alpha_2\beta_2\text{Fe})$, ambas contienen centros ferrosos alto espín así como un medio ambiente con coordinación de oxígeno y nitrógeno.

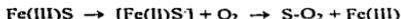
La coordinación del sustrato al centro ferrico ocurre por medio de oxígeno y tal vez este (oxígeno) es el que ataca al carbono formando un intermediario peroxido, mientras en el reacomodo del peróxido se rompe la unión del C-C (Fig 2.12)

Hay una debilidad por conservar el centro ferrico y los ligandos endógenos del hierro son principalmente nitrógeno; en el mecanismo, el sustrato desplaza al agua y quelatos para llegar al hierro, la formación de tales complejos de hierro disminuye el potencial Fe(III)/Fe(II) y entonces se produce una modificación al O_2 , el oxígeno molecular puede por lo tanto unirse al complejo ES resultando un complejo tipo terciario ESO_2

C. Enzimas sin hemo y sin Fe/S

Aunque estas proteínas no contienen el ligando porfirina, el hierro presenta sitios coordinados con aminoácidos; dentro de este tipo de enzimas se incluyen algunas que actúan fuera de la célula y en ocasiones sin tener un cambio de estado de oxidación.

La función principal del hierro es activar al sustrato S para un sencillo ataque del oxígeno molecular:

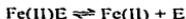


El complejo Fe(II)S muestra una transferencia de carga parcial, el hierro estando libremente disociado en el citoplasma así como otros iones metálicos activan el oxígeno molecular de la siguiente forma:



Los tres componentes centrales son potentes agentes oxidantes y existe el riesgo de reacciones no muy comunes al estar contenidas. De esta forma, los pasos intermediarios son manejados con mucha precaución en células procariontes.

Ya sea en complejos tipo Fe-O-Fe o en simples moléculas de hierro, el sitio de unión esta coordinado con varias histidinas y carboxilatos y la geometría tiende a ser octaédrica, esta disposición de los ligandos así como también la longitud de unión hacen que el sitio no favorezca ni al zinc ni al cobre dentro de la proteína, los centros metálicos con un estado de oxidación bajo o en estado reducido provoca una unión mas fuerte con el sitio y entonces el equilibrio es:



Permitiendo un control de la reacción que depende de la concentración de Fe(II) libre, la estructura secundaria de estas enzimas no solo incluye α -hélices sino también β -hojas como parte característica de tales enzimas.

1. Complejos Fe-O-Fe

Se había pensado que los complejos Fe₂O servían como transportadores de oxígeno molecular formando un anión peróxido O₂²⁻; el Fe(II) forma un puente oxo con el oxígeno y cambia a Fe(III) durante la captación de oxígeno molecular.

Estas enzimas tienen un pliegue que une a cuatro α hélices y se cree que ayudan para el cambio de estado de oxidación de Fe(II) alto espín a Fe(III) alto espín.

a) Ribonucleotido reductasa.

La ribonucleotido reductasa es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 115,000 Da, está relacionada con el transporte electrónico análogamente con las enzimas con grupo hemo como citocromo oxidasa; el catión Mg^{2+} , Mn^{2+} o Ca^{2+} es necesario para la reacción donde se lleva el cambio de ribonucleotido a 2-desoxiribonucleotido (CHAUDHURI, 1992), también requiere una coenzima como cobamida

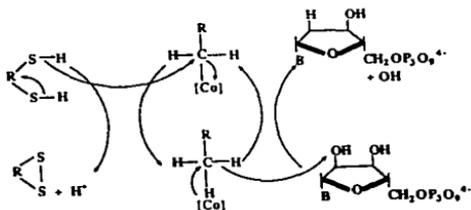


Figura 2.13 Mecanismo propuesto para la enzima ribonucleotido reductasa (KENDRICK, 1991).

En el mecanismo, se necesita primero un átomo de hidrógeno para la separación y la formación de un intermediario como radical libre (Fig 2.13) (NORDLUND, 1990).

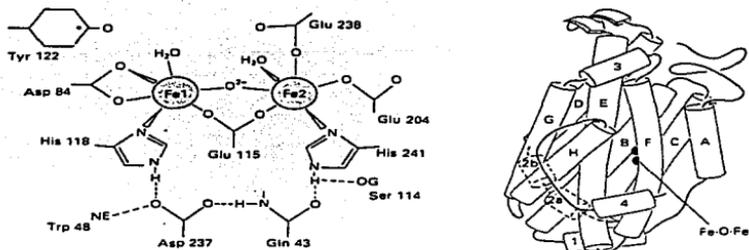
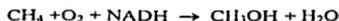


Figura 2.14 Estructura del sitio activo de la Ribonucleotido reductasa (NORLUND, 1990).

Una característica de esta enzima es que una tirosina radical libre mantiene la estabilidad dentro de la proteína (Fig 2.14) y podría suponerse que el papel del y hierro es contribuir en la formación de este radical.

b) Metano monoxigenasa.

La metano monoxigenasa (MMO) es una proteína no hemo la cual cataliza la reacción:



La enzima esta compuesta de tres proteínas: proteína A, proteína B y proteína C, la proteína A tiene un peso molecular de alrededor de 250,000, la proteína B tiene 15,700 y C tiene un complejo Fe-S y tienen 42,000 Daltons (JIANG, 1993); la proteína A produce una mezcla de estados de oxidación Fe(III) y Fe(II). Se ha demostrado que la distancia Fe-Fe en esta parte de la proteína es de 3.5 Å.

Además de reducir el oxígeno molecular, es capaz de oxidar sustratos similares a los del citocromo P450.

El sitio dinuclear de hierro tiene ligandos de nitrógeno y de oxígeno, los cuales ayudan a la estabilidad del puente oxo (FRONLAND; 1994).

PRINCIPALES REACCIONES DE ENZIMAS CON HIERRO

Ferredoxinas	Catalizan reacciones de oxido-reducción con potenciales entre -600 mV y +350 mV.
Citocromo a	Catalizan reacciones de oxido-reducción con potenciales entre -300 mV y +400 mV.
Citocromo a ₃	Promueven la transferencia electrónica.
Citocromo b	Regulan el flujo protónico y electrónico en la membrana mitocondrial.
Citocromo c	Catalizan reacciones de oxido-reducción con potencial de +260 mV.
Citocromo P450	$RH + O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightleftharpoons ROH + H_2O$
Peroxidasa y Catalasa	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$
Dioxigenasas	Adición de los dos átomos de oxígeno molecular al sustrato.
Ribonucleotido oxidasa	Eliminación de un hidroxilo de un Ribonucleotido para dar un 2-Desoxiribonucleotido.
Metano monooxigenasa	$H^+ + CH_4 + O_2 + NADH \rightarrow CH_3OH + H_2O + NAD^+$

III. COBRE EN ENZIMAS

COBRE EN ENZIMAS

Quizá el papel mas notable de las enzimas conteniendo cobre sea la transferencia electrónica y especialmente relacionado a procesos oxidativos y de captación de energía. Estos sistemas de transferencia electrónica consiste de pequeñas proteínas "azules" situadas no en el citoplasma sino en la superficie externa de membranas citoplasmáticas, el cobre en estas enzimas se encuentra con una geometría tetraédrica distorsionada y dentro de un pliegue o doblez de una estructura β -hoja.

Algunas de las reacciones que participan dentro de estas enzimas tienen potenciales redox altos, por lo que el sitio está diseñado para llevar reacciones rápidas.

La distorsión de la geometría tetraédrica tiene como efecto estabilizar al paso de cobre (I) a cobre (II), de hecho, la función y estructura del cobre en proteínas azules están formadas con parte de Cu(I) y parte de Cu(II).

La mayoría de las oxidasas consisten de una mezcla de un cobre (Tipo I), un par de cobres (Tipo III) y otro cobre (Tipo II), este último se encuentra asociado con los de tipo III, el sustrato esta unido a 10 Å del tipo I y es aquí donde se lleva la transferencia electrónica



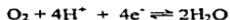
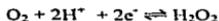
El sustrato se libera como radical libre, el oxígeno molecular se mantiene unido y es reducido en varios pasos hasta $2\text{H}_2\text{O}$; las oxidasas también están diseñadas para retener O_2 , O_2^- , O_2^{2-} y O^- .

Por otra parte las enzimas conteniendo cobre de tipo "no azules" tienen un sitio activo coordinado con histidinas y se observa una conformación tipo β -hoja no llegan a tener cambios conformacionales; algunas enzimas con cobre requieren de una quinona tricarboxilada, coenzima PQQ o un compuesto similar dihidroxiaromático.

A partir de estudios espectroscopicos y electroquímicos, el sitio del cobre Tipo I fue determinado inicialmente como un tetraedro, siendo característico del estado Cu^+ más que de Cu^{2+} . Se ha postulado que la geometría de Cu^+ y Cu^{2+} han sido forzadas a ser similares en orden a transferir electrones. Uno de los ligandos del cobre está a gran distancia del metal, la distancia de Met-Cu^{2+} es muy larga comparado a las otras distancias de Cu^{2+} -ligando, esto provoca que tal unión sea muy débil y permite grandes cambios estéricos y de tamaño cuando se produce el cambio a Cu^+ .

A. Oxidasas.

La reacción catalizada es la reducción de oxígeno molecular a H_2O_2 y a H_2O sin incorporación de oxígeno dentro del sustrato orgánico.



Donde el hidrógeno proviene del grupo hidroxil, amino o sulfhidril y parece ser esencial en este tipo de reacción. El primer paso es la desprotonación del sustrato y los catalizadores utilizados no solo tienen potenciales redox altos, sino también son fuertemente básicos.

Además de la desprotonación del sustrato, el metal de transición como catalizador tiene varias funciones 1) unión y activación del sustrato orgánico 2) activación de oxígeno molecular 3) formación de complejos terciarios sustrato-oxígeno molecular-metal 4) participación directa en los procesos redox.

El paso más importante es la oxidación del sustrato por un complejo cúprico el cual es entonces reducido a Cu^+ , el oxígeno molecular es necesario para reoxidar al ion metálico.

1. Oxidasas azules.

El ciclo catalítico de estas oxidasas comprende la captación de electrones de sus sustratos, así como la reducción de oxígeno molecular para la formación de agua, en este ciclo las oxidasas azules emplean tres diferentes tipos de sitios con cobre.

Las tres enzimas que forman el grupo de oxidasas azules son: Lacasa, Ascorbato oxidasa y Ceruloplasmina.

Las oxidasas azules demuestran gran especificidad hacia sus oxidantes y esto lleva a la cuestión de cual de los tres sitios tienen la captación de electrones, mientras el tipo II y III pueden interactuar con ligandos de bajo peso molecular, el tipo I carece de este hecho, sin embargo la transferencia electrónica del sustrato al Cu(II) tipo I está ampliamente soportado por estudios cinéticos logrando una velocidad de reducción proporcional al tipo y concentración del sustrato.

Aunque recientemente se ha probado que el Cu(II) tipo II puede servir como entrada paralela para la captación de electrones ésta posibilidad también ocurre para el tipo III.

Se piensa que el Cu(II) tipo I y el tipo II tienen un receptor de electrones cada uno, mientras que el Cu(II) tipo III actúa como receptor de dos electrones (MESSERSCHMIDT, 1990).

a) Lacasa.

La lacasa tiene baja especificidad al sustrato y en consecuencia un gran número de diferentes sustancias pueden ser oxidadas, los mejores sustratos son diferentes fenoles tanto mono como di y polifenoles; dentro de los difenoles la forma "para" es la mas rápidamente oxidada mientras que el catecol y resorcinol son oxidadas con menor velocidad.

La lacasa esta presente en plantas superiores y los estudios experimentales se enfocan en arboles japoneses (especie *Rhus*). Hay una gran variedad de lacasas, sin embargo, el peso molecular oscila entre 65,000 a 140,000 y es probable que la diferencia se debe al contenido de carbohidratos; la composición consiste de una cadena polipeptídica sencilla de alrededor de 500 aminoácidos siendo una parte con carbohidratos los cuales constituyen cerca del 45% del peso molecular, sin embargo, no se ha señalado su posible función.

Esta enzima contiene seis iones cobre, cuatro de ellos son Cu(II) y los otros dos Cu(I), a través de estudios de EPR la enzima indica cantidades equimolares de dos cobres paramagnéticos en diferentes medios ambientes y entonces el concepto de tres diferentes tipos de cobre en lacasa se observa a través de uno tipo I, uno tipo II y dos tipo III.

Cuatro iones en la lacasa *Rhus* se encuentran en forma oxidada como Cu(II) y el 50% del total del cobre no fue detectado por EPR y entonces se consideró como Cu(I), detrás de los iones Cu(II) tipo I y II, hay dos aceptores adicionales de electrones los cuales están reducidos y de una manera ayudando al Cu(II) tipo I.

Como la estructura de la enzima no se conoce, se representará como una caja, los iones cobre tipo I y II se fijan arriba y abajo del lado izquierdo respectivamente, y el tipo III del lado derecho indicando un par el cual puede aceptar dos electrones.

Durante la reoxidación el sitio tipo III tiene cinco diferentes estados: el totalmente reducido $(Cu_2)^{2+}$ y oxidado $(Cu_2)^{4+}$ y algunos intermediarios como $(Cu_2O)^{3+}$, un peroxocomplejo $(Cu_2O_2)^{2+}$ y un par medio reducido $(Cu_2O)^{3+}$ (Fig 3.1)

En la reoxidación el oxígeno molecular oxida al cobre tipo I y tipo III y libera dos moléculas de H_2O (Fig 3.1)

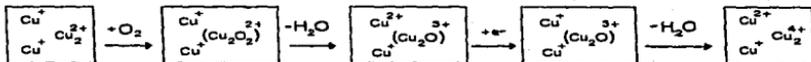


Figura 3.1 Mecanismo para los tres sitios de cobre en la reoxidación de la Lacasa (LONTIE, 1984).

Existen dos formas catalíticamente distintas, una activa y otra inactiva, la enzima se convierte en activa a pH alto.

La forma inactiva tiene un OH⁻ unido al Cu(II) tipo II y la forma activa esta unido a H₂O en lugar de OH⁻.

En la reducción, los Cu(II) tipo I y II son reducidos casi simultáneamente debido a una interacción conformacional entre estos sitios metálicos, el primer electrón del sustrato reduce Cu(II) tipo II el cual parece ser reducido por un segundo sustrato y no por transferencia electrónica del Cu(II) tipo I, el cobre tipo II esta coordinando a dos residuos histidina mientras el tipo I tiene un ligando cisteína; si esto es así, la reducción del Cu(II) tipo I causa una alteración conformacional sobre el Cu(II) tipo II afectando la reducción de este metal, una vez reducidos los tipos I y II, estos donan simultáneamente un electrón a cada cobre tipo III.

De esta manera el cobre tipo II interviene en el rompimiento del enlace O-O del peróxido el cual es un intermediario, este peróxido podría estar unido entre los sitios cobre tipo II y III, se sugiere que una unión del peróxido al tipo III oxidado y al tipo II reducido conduce a un descenso en la energía de activación para el rompimiento del enlace O-O (Fig 3.2).

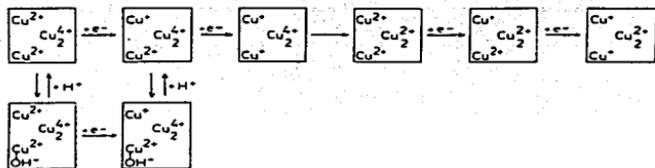


Figura 3.2 Mecanismo para los tres sitios del cobre en la reducción de la Lacasa (LONTIE, 1984).

Como dato importante podemos mencionar que el máximo de velocidad de transferencia electrónica es de 560 electrones por segundo (LUNDELL, 1994).

b) Ascorbato oxidasa.

Esta enzima demuestra propiedades espectrales muy similares a la anterior. Esto es, presenta al menos cuatro átomos de cobre por molécula de proteína (SAKURAI, 1993).

Como su nombre lo dice, cataliza eficientemente la oxidación de L-ascorbato (vitamina C) de acuerdo a la siguiente reacción (Fig 3.3)

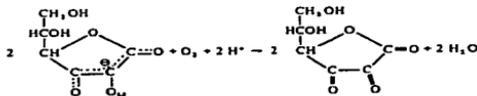


Figura 3.3 Reacción catalizada por Ascorbato Oxidasa (WIMALASENA, 1994).

Esta enzima se encuentra principalmente en plantas, sin embargo, su localización y función biológica no es muy conocida, se sugiere que está asociada con la pared celular y ayuda al crecimiento de las plantas.

Tienen un peso molecular de aproximadamente 140,000 Da y seis átomos de cobre, la reducción completa de la enzima se logró con cuatro equivalentes de L-ascorbato, el proceso envuelve una transferencia electrónica intramolecular entre Cu(II) tipo I y Cu(II) tipo II, además el Cu(II) tipo I esta muy cercano al sustrato y el cobre tipo III al oxígeno (HAZZARD, 1994). La ascorbato oxidasa es muy activa ya que tiene un número de transferencia de 500,000 electrones por minuto a 25° C.

El mecanismo de reacción de esta enzima indica que el cobre tipo I es el sitio primario para la captación electrónica, el tipo II esta implicado en la unión de ascorbato y el tipo III en la unión de oxígeno (FARVAR; 1994).

Un mecanismo que se puede proponer es el siguiente:

Iniciación:



Propagación:



Terminación:



Otro mecanismo propone el paso de un electrón, y propagadores de cadena



Sin embargo, algunos investigadores asumen la formación de un complejo

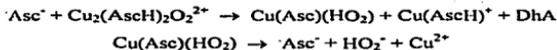


Donde los pasos del mecanismo son:

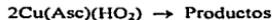
Iniciación:



Propagación:

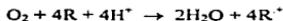


Terminación:



c) Ceruloplasmina.

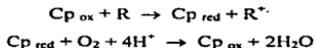
Esta enzima reacciona con dos sustratos: oxígeno y el sustrato reductor, y es una de las únicas que reduce el oxígeno molecular a agua a través de transferencia electrónica, teniendo cuatro o más receptores de electrones; el sustrato reductor pierde un electrón a la vez que la enzima viene a dar un radical libre, la reacción neta es (R es el sustrato reductor)



Entre la gran variedad de sustratos tanto orgánicos como inorgánicos están el catecol, aminofenoles, dopa adrenalina y serotonina. También derivados del indol y 64 compuestos de tipo biológico como anfetamina, adrenalina, dopamina, fenilalquilaminas y aminas; todos estos sustratos se caracterizan por una alta energía de sus orbitales moleculares.

La fuerza catalítica de la enzima podría ser causada principalmente por el alto potencial redox del cobre tipo I (receptor de electrones) y a la fuerte y específica interacción con oxígeno molecular mas que al sitio de unión del sustrato.

El mecanismo es sencillo y de dos pasos:



Los electrones entran en la Cp al cobre tipo I a través de un residuo histidina, sin embargo, otro método sugiere el par cobre tipo III recibiendo dos electrones y vienen a ser reducidos; finalmente los cobres tipo I y II aceptan dos electrones más del sustrato para formar la completa reducción de la enzima.

La unión del oxígeno a la enzima reducida podría dar la unión con peróxido como un intermediario, sin embargo, los tres electrones son transferidos casi simultáneamente para formar un radical $O^{\cdot -}$, el tercer electrón podría venir del cobre Tipo I, el último cobre puede ser reoxidado y ser entonces el tipo II y la reacción podría completar el ciclo como se muestra en la Fig 3.4.

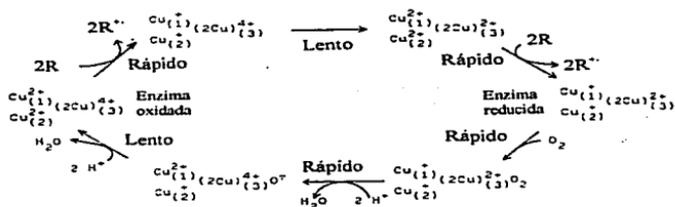


Figura 3.4 Ciclo catalítico del sitio activo de Ceruloplasmina (LONTIE, 1984).

Por lo tanto la ceruloplasmina contienen dos cobre tipo I un cobre tipo II y cuatro cobres tipo III.

En resumen, el Cu(II) tipo I es el responsable del intenso color azul, los grupos SH de cisteína y los nitrógenos de histidina son los grupos estratégicos de la proteína, cuatro de los seis iones son necesarios en el sitio activo.

2. Amino oxidasa.

La amino oxidasa cataliza la desaminación oxidativa de mono, di y poliaminas con la formación estequiometrica de aldehído, peróxido de hidrógeno y amoníaco, (CAI, 1994), de acuerdo a la siguiente ecuación:



Esta enzima se ha encontrado en un amplio tipo de células eucariotes, plantas y tejido animal; el papel fisiológico de las amino oxidasas se divide en dos partes, una como catalizador para el rompimiento de un número de aminas biológicamente activas y otra como catalizador de reacciones en el tejido conectivo (AGOSTINELLI, 1994).

Su peso molecular es de alrededor de 170,000 Da, y presenta una unión N-acetil glucosamina, conteniendo un 10% de carbohidratos, no obstante, su función y estructura no ha sido investigado.

La función del cobre es ayudar a mantener una estructura terciaria de la proteína y tal vez tenga también un desempeño catalítico, esto parte de una intuición, donde se sugiere que el cobre juega un papel redox, es decir, el sustrato amina podría llegar a reducir Cu(II) a Cu(I) mientras que el oxígeno permitiría restaurar el cobre al estado oxidativo; no obstante, estudios de EPR señalan que el cobre mantiene su divalencia a través de la reacción con el sustrato amina (WARNCKE, 1994).

La enzima tiene dos subunidades, y cada subunidad contienen un cobre, estos dos cobres tienen sitios idénticos con una geometría tetragonal y dos posiciones de coordinación que corresponden a histidinas.

La enzima realiza un mecanismo de doble desplazamiento (Fig 3.5).

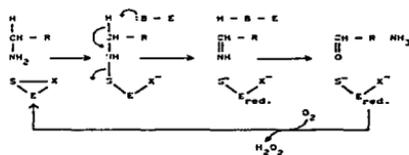


Figura 3.5 Mecanismo propuesto para Amino oxidasa (LONTIE, 1984).

Los principales aspectos de este mecanismo son: 1) tanto un amoniaco como el aldehído pueden ser liberados anaerobicamente y en el mismo paso catalítico 2) la enzima reducida podría contener un grupo SH libre y un grupo no identificado X (SILVERMAN, 1994).

Además, los sitios con cobre son accesibles al solvente (Agua) y están localizados en la superficie de la proteína, posiblemente en la interfase de las subunidades; las estructuras de los sitios no se conocen exactamente, sin embargo, estudios indican que hay 2 ó 3 ligandos de nitrógeno (de la cadena polipeptídica, histidinas) y dos ligandos de oxígeno (del agua).

3. Citocromo oxidasa.

La citocromo oxidasa tiene dos átomos de cobre que están ampliamente separados, se observa que uno es cobre (Cu_A) y puede servir para transferencia electrónica mientras que el otro átomo (Cu_B) está directamente asociado con el citocromo tipo a_3 que es el sitio de captación de oxígeno molecular.

Teniendo un peso aproximado de 140,000 Da, el complejo tiene la forma de Y desequilibrada de 1 nm de longitud con tres partes principales, dos del lado de la membrana con longitud de 4 y 5 nm y otra parte larga y sencilla de alrededor de 5.5 del lado citoplasmático (SHINZAWA-ITOH, 1992). (Fig 3.6).

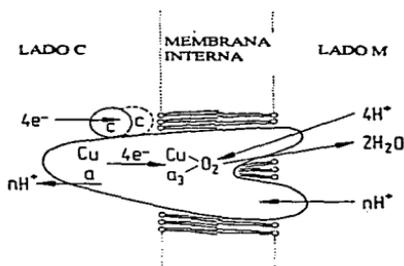


Figura 3.6 Posición del citocromo c oxidasa en la membrana mitocondrial (CHAN, 1990).

La subunidad II se ha sido identificado como un sitio de unión y es propone para la reducción de oxígeno molecular y por lo tanto un sitio de transferencia electrónica.

Para la reducción de oxígeno molecular se acepta el centro binuclear $Cu_B/Fe(\text{citocromo } a_3)$ con un puente imidazol axial desprotonado.

El mecanismo se inicia con la unión de oxígeno molecular al $Fe(II)$ citocromo a_3 y con un imidazol cercano, el siguiente paso es la formación de un enlace μ -peroxo a el $Cu(I)_B$ con cambio de valencia a $Fe(III)$ y $Cu(II)$ y sin coordinación del imidazol, consumiéndose $2e^-$ y $2H^+$ después liberando el primero una molécula de H_2O , el estado μ -peroxo entonces cambia a un complejo μ -oxo $Fe(III)-O-Cu(II)$ con unión antiferromagnética de los dos centros.

Posteriormente, suceden reducciones y adición de $2H^+$ formándose los intermediarios $Fe(II)$ alto espín (citocromo a_3) y $Cu(I)_B$ con alta afinidad por oxígeno (CHAN, 1990).

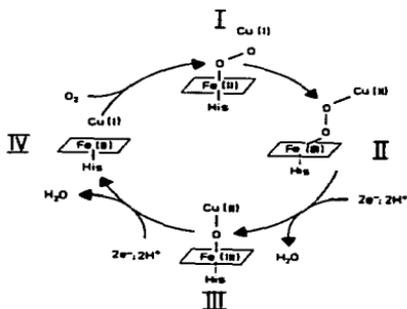
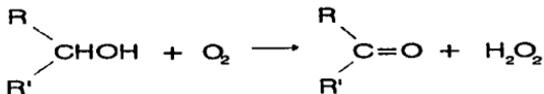


Figura 3.7 Mecanismo de activación de O_2 en la Citocromo oxidasa (KENDRICK, 1991).

4. Galactosa oxidasa.

La galactosa oxidasa es una proteína mononuclear con $Cu(II)$ de tipo no azul, esta clase incluye glucosa oxidasa, una flavoproteína, y otra aun no caracterizada; todas (PALESTINI, 1994) catalizan la reacción:



Estas enzimas tienen una amplia especificidad con los sustratos, ya sean alcoholes primarios, secundarios, alifáticos aromáticos o insaturados; la galactosa oxidasa es la mejor conocida de este grupo.

El peso molecular relativo está en un rango de 38,000 a 75,000 siendo más exacto de 68,000 Da y conteniendo un átomo de Cu(II) por molécula de enzima; la apo y holoenzima son conformacionalmente similares y se distinguen por cantidades pequeñas de α -hélice y β -hoja.

Contiene 5 residuos de cisteína, cuatro de los cuales están en los puentes disulfuros de la proteína. El único grupo sulfhidril puede estar en el sitio activo de la enzima pero no es propiamente parte del quelato de Cu(II).

Se puede señalar que el Cu(II) tiene una geometría pseudotetraplanar uniéndose a nitrógeno, oxígeno y tiolato, sin embargo, en ausencia de ellos puede aparecer el agua.

El mecanismo es secuencial y comprende la unión del alcohol antes del oxígeno molecular. La reacción química se lleva dentro del complejo E-Alcohol-O₂. El producto aldehído se une a la enzima después de ser el segundo producto liberado (ITO, 1991).

Un modelo sugiere, primero, la relajación del sitio axial provocado por la galactosa, los procesos de transferencia electrónica requieren una interacción de la "esfera interna" del complejo Cu(II)-O₂ y que es necesaria para la transferencia directa entre el alcohol y el oxígeno molecular (ITO, 1994).

Aunque no son ligandos, hay dos aminoácidos que tienen un papel importante en el mantenimiento y función del sitio activo, estos son un triptófano y una histidina, la entrada al sitio de coordinación de tipo axial se pierde y entonces el alcohol se une axialmente, apareciendo también una tirosina como cuarto ligando ecuatorial (Fig 3. 8)

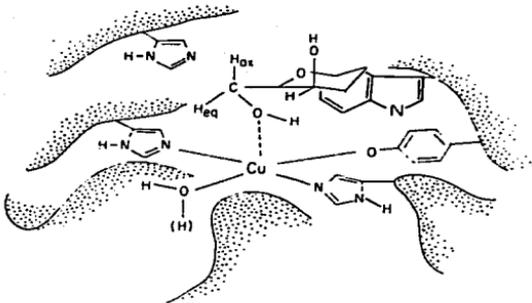
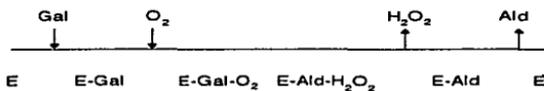


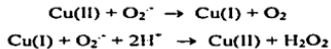
Figura 3.8 Sitio activo de la Galactosa Oxidasa (ITO, 1994).

La reacción de galactosa oxidasa puede describirse como ordenada y de tipo secuencial:



Los elementos básicos en este mecanismo son 1) la coordinación de los sustratos a el Cu(II), 2) transferencia de H^+ y e^- en forma independiente y, 3) el papel redox del Cu(II) (BARON, 1994).

Las dos reacciones más importantes son:



y el mecanismo es el siguiente (Fig 3.9):

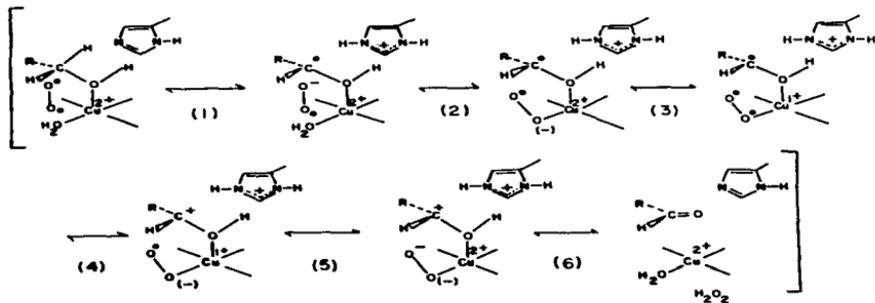
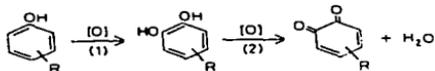


Figura 3.9 Mecanismo propuesto para galactosa oxidasa (LONTIE, 1984).

5. Tirosinasa.

La tirosinasa reacciona con los fenoles y produce la conversión metabólica a quinonas; en esta reacción se distinguen dos pasos: primero la hidroxilación y oxidación a quinona, y como segundo paso, la enzima actúa como una oxidasa, reduciendo oxígeno molecular a agua por medio del grupo prostético cobre.



La tirosinasa es más específica con "orto" fenoles que con "para" fenoles o monofenoles; además puede oxidar tirosina y dopa para producir melanina (JIMENEZ-CERVANTES, 1994).

Un modelo para el sitio activo, indica un átomo de cobre (I) y donde (E,Cu⁺) posiblemente actúa como un donador de dos electrones para formar Cu(III). un segundo modelo señala un sitio binuclear de Cu(II), tal como (E(Cu²⁺)₂).

Las evidencias para el modelo mononuclear (E,Cu⁺) son:

- 1) En muchas tirosinas el peso molecular mínimo calculado es de 30,000 Da.
- 2) Determinación de cobre unido a monóxido de carbono y benzoato.

Mientras las evidencias para el modelo binuclear son:

- 1) La posibilidad de reducir tirosina, añadiendo un electrón por cada cobre presente
- 2) La distancia entre átomos fue calculada en 0.6 nm
- 3) La reconstrucción de la holoenzima demuestra una cinética compleja con la formación de un par cobre.
- 4) El oxígeno está presente como un peroxicomplejo.
- 5) Las razones entre CO:Cu benzoato:Cu y H₂O₂:Cu son 1:2.

Varios estudios coinciden con la actuación de histidina como un ligando al cobre, mientras por espectroscopia Laser-Raman se ha comprobado un puente peróxido y otro ligando R.

Un análisis de las reacciones de la tirosina es difícil por las actividades que tienen la hidroxilasa y oxidasa. Sin embargo la reacción de la oxidasa tiene un mecanismo Ping-Pong:



El ciclo inicia con la desoxitirosinasa (A) la cual se acompleja fácilmente con oxígeno molecular para dar un complejo enzima-sustrato (no demostrado) y dar por transferencia interna electrónica oxitirosinasa (B). La oxitirosinasa entonces reacciona con un difenol para dar un intermediario el cual se descompone a quinona, 2OH^- y metirosinasa (D). La metirosinasa podría llevar una reducción con una segunda molécula de difenol (E) con liberación de 2H^+ para completar el ciclo y regenerar el ligando desoxitirosinasa, al entrar un monofenol al ciclo, este se hidroxila de una manera similar a la del citocromo P450 y surgiendo como un intermediario un epóxido (G).

Los cobres están unidos a 4 histidinas que son His-188, His-289, His-193 y His-306.

La estructura del sitio activo de la metirosinasa se propone a continuación, donde N= ligando proteico L= ligando oxígeno R= puente proteico (Fig 3.11)

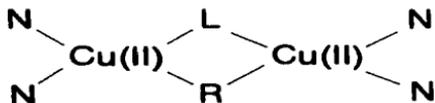


Figura 3.11 estructura del sitio activo de la metirosinasa (SIGEL, 1987).

El siguiente es un modelo estructural del sitio activo de la oxitirosinasa (Fig 3.12)

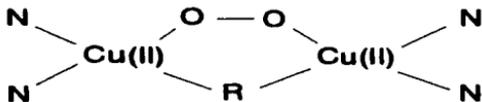
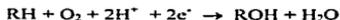


Figura 3.12 Estructura del sitio activo de oxitirosinasa (SIGEL, 1987).

B. Monooxigenasa.

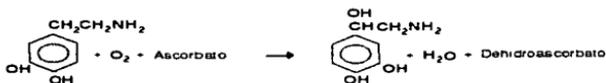
Generalmente se ha reconocido que mucho del oxígeno consumido por organismo aeróbicos se reduce a agua por la oxidasa terminal de la cadena respiratoria, sin embargo, una cantidad es utilizada en una clase de enzimas llamadas monooxigenasas, la reacción de una monooxigenasa esta descrita como



Recientes investigaciones manifiestan a cuatro grupos asociados con las monooxigenasa: Cobre, hierro hemo, hierro no hemo y flavín, el grupo conteniendo cobre es muy pequeño en comparación con los otros tres.

I. Dopamina β -monooxigenasa.

La dopamina β -monooxigenasa (3,4. dihidroxifeniletamina, ascorbato: oxígeno oxidoreductasa, β -hidroxilación) es una enzima que contiene cobre y cataliza el último paso en la biosíntesis de neurotransmisores (norepinefrina).



Esta enzima es una glicoproteína (5% de carbohidratos) con un peso molecular de 290,000 Da que consiste de cuatro subunidades de igual tamaño unidas por puentes disulfuros.

El contenido de cobre es de uno por tetramero y solo es Cu(II), (WIMALASENA; 1994).

El sitio activo no ha sido establecido, no obstante, diferentes mecanismos de reacción coinciden en un sitio mononuclear o binuclear del cobre. Un análisis cinético de la β -hidroxilación parece conducir con un mecanismo de tipo ping pong, donde la reducción del cobre por ascorbato lleva a la reacción de dopamina y oxígeno molecular, varios datos indican además la formación de un complejo ternario de cobre reducido, oxígeno y dopamina, antes que el producto sea liberado.

Tiene un peso molecular de 31,500 Da. consiste de dos subunidades iguales y no covalentemente asociadas.

La estructura de la molécula se aproxima a un cilindro con 5.3 nm de altura y 2.7 nm de diámetro, los sitios de enlace del metal se encuentran casi al final del "cilindro", donde particularmente son acomodados Cu y Zn (Fig 3.14)

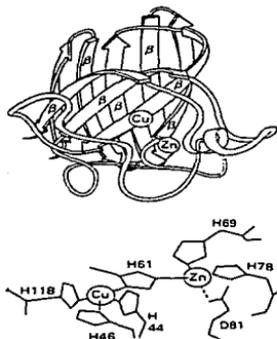


Figura 3.14 Estructura de la SOD (ROE, 1988).

El Cu(II) está coordinado a la cadena lateral de cuatro histidinas a través de los nitrógenos (His-44, His-46, His-118, y His-61) y éste último actúa también como ligando del Zn(II).

El zinc entonces está coordinado a His-61 y a His-69, His-78 y Asp-81 con una simetría aproximadamente tetraédrica (ROE, 1988)(Fig 3.15).

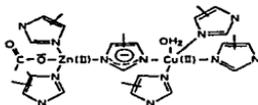
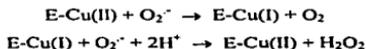


Figura 3.15 Sitio activo de SOD (CASANOVA, 1994).

El ciclo se caracteriza por las propiedades redox de cobre:



El valor de la razón (E-Cu(II))/(E-Cu(I)) podría ser igual a 1 en vista de la misma velocidad de reducción de E-Cu(II) por O_2^- y de oxidación de E-Cu(I) por otro O_2^- . La naturaleza del sitio con cobre favorece un mecanismo tipo Ping-pong para el proceso de transferencia de electrones entre O_2^- y la SOD (LIAO, 1994).

Durante la catálisis, el puente imidazolato libera y une al cobre al mismo tiempo que realiza su reducción y reoxidación por O_2^- , de igual forma, el zinc unido a imidazolato se protona y desprotona. A continuación se observa este mecanismo (Fig 3.16) (CASANOVA, 1994).

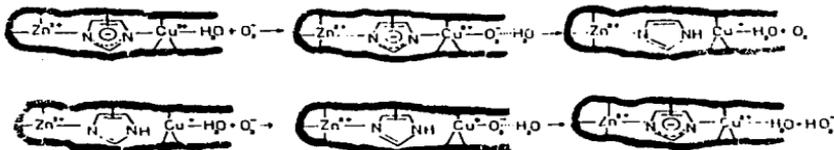


Figura 3.16 Mecanismo propuesto para SOD (LONTIE, 1984).

Hay dos puntos importantes en el mecanismo anterior: 1) el origen de los protones es del dianión peróxido (O_2^{2-}) saliente, producido en el segundo paso de la catálisis 2) el cambio de número de coordinación del cobre durante la catálisis.

El cobre cambia de número de coordinación cinco en el estado oxidado a cuatro en la forma reducida. Los cuatro ligandos del cobre reducido podría ser aproximadamente de geometría tetraédrica.

PRINCIPALES REACCIONES DE ENZIMAS CON COBRE

Oxidasa	$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O_2$ $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftharpoons 2H_2O$
Lacasa	Oxidación de Fenoles
Ascorbato oxidasa	Oxidación de L-ascorbato (Vitamina C)
Ceruloplasmina	$O_2 + 4R + 4H^+ \rightarrow 2H_2O + 4R^+$ R= catecol, aminofenoles, dopaadrenalina, serotonina etc.
Amino oxidasa	$R-CH_2-NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow RCHO + H_2O_2 + NH_3$
Galactosa oxidasa	Oxidación de alcoholes primarios y secundarios para producir cetonas utilizando oxígeno molecular.
Tirosinasa	Oxidación de fenoles para producir quinonas utilizando oxígeno molecular.
Dopamina β -monooxigenasa	Hidroxilación de 3,4-Dihidroxifeniletilamina para dar norepinefrina.
Superoxido Dismutasa	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$

IV. NIQUEL EN ENZIMAS

NIQUEL EN ENZIMAS.

Este metal de transición es relativamente abundante, y se encuentra en aproximadamente 8% del centro de la tierra y 0.01% de la corteza terrestre. Parece ser que el níquel fue muy utilizado cuando el metabolismo estaba basado sobre químicos como CH_4 y H_2 , sin embargo su valor disminuyó cuando apareció el oxígeno molecular.

Se han estudiado los ligandos del níquel (II) presentes en varias proteínas sustituidas. Estos ligandos comprenden aminoácidos como histidina, ácido aspártico, glutamina, cisteína, metionina, así como tirosina.

Se han caracterizado derivados del níquel con estado de oxidación formal de -1 a +4, el Ni(II) es el estado de oxidación más estable en solución acuosa y además el más importante en enzimología. El Ni(II) es un ion con configuración electrónica d^8 y sus complejos forman número de coordinación 4, 5 y 6. La geometría de los complejos es básicamente planar cuadrada, piramidal cuadrada, tetraédrica, trigonal bipiramidal u octaédrica. Las distancias del enlace Ni(II)-O son 2.05 y 2.09 Å con dos moléculas axiales de agua y 2.22 y 2.48 Å para el enlace del Ni(II) con oxígeno del grupo carbonilo. La distancia del enlace Ni(II)-N es 2.06 Å.

Los complejos del Ni(II) pueden tener dos electrones no apareados o ninguno y sus propiedades magnéticas son útiles en ocasiones. Con momento magnético de 3-4 BM a 25°C se han generalmente observados formas paramagnéticas ("alto espín"). Las propiedades magnéticas de Ni(II) son:

Paramagnético: tetraédrica, pentacoordinado (algunas veces octaédrico)

Diamagnético: planar cuadrado.

Las enzimas que contienen Níquel son: 1) Ureasa, 2) Hidrogenasa, 3) Metil coenzima M-reductasa y, 4) Carbonil deshidrogenasa (WALSH, 1987).

A. Ureasa:

La urea puede ser degradada por dos enzimas diferentes. La clásica ureasa (urea aminohidrolasa), ampliamente distribuida en bacterias, plantas y algunos invertebrados, cataliza la hidrólisis de urea de acuerdo a la siguiente reacción:



La segunda enzima, una ATP-hidrolasa de ureasa (ureasa carboxilasa):



La enzima más investigada es la ureasa de Jackbean (*Canavalia ensiformis*) donde el carbamato se estableció como el primer producto de reacción. Estudios cinéticos comprueban la rápida formación del carbamato y posteriormente una descomposición lenta y espontánea para producir bióxido de carbono, finalmente aumenta el pH y se hidrata el bióxido de carbono originándose el bicarbonato, este hecho puntualiza el papel de ácido de Lewis del Ni(II) (LYANKINA, 1991).

El Níquel se encuentra ajustadamente dentro de la estructura protéica y el contenido de este metal corresponde a 2 ± 0.12 g por cada 96,000 g de enzima.

Se ha reportado un peso molecular de alrededor de 483,000 Da. En la secuencia de aminoácidos se presenta un residuo esencial dentro del sitio activo, este residuo es cisteína (Cis-592). Por otro lado, se demuestra que 13 de los 25 residuos de histidina están entre los residuos 479 y 607, se sugiere que esta región podría contener el sitio de unión del metal.

La ureasa de Jackbean comprende un hexámero con un peso molecular de 545,445 Daltons donde cada subunidad tiene un peso molecular de 93,500 Da. por medio de microscopia el complejo parece ser mas bien dos trimeros formando una estructura como de un prisma trigonal (TOOD, 1989).

Hay 15 grupos tiol en cada subunidad los cuales producen un "sitio activo tiol", estos grupos corresponden a los residuos histidina 592, 585, 593 y 607 entre otros más.

Aunque el mecanismo no esta bien establecido, se señala que el estado de oxidación del metal no cambia, por lo que la enzima no lleva a cabo una reacción de oxidoreducción sino únicamente hidróliza y sustituye al sustrato.

La catálisis del ion metálico podría ser descrita como un tipo de catálisis superácida en un medio ambiente neutro (la solución es neutra) ésto marca la capacidad del metal de proporcionar carga positiva al transcurrir la reacción.

Algunas evidencias demuestran la presencia de un tiol y una carga negativa en el sitio activo. Basándose en este análisis y en experimentos, se desarrolló un mecanismo para la ureasa, no obstante, no hay pruebas de la disposición que tienen los dos átomos de Níquel, ya sea que se encuentren juntos o separados.

El mecanismo se presenta a continuación (Fig 4.1).

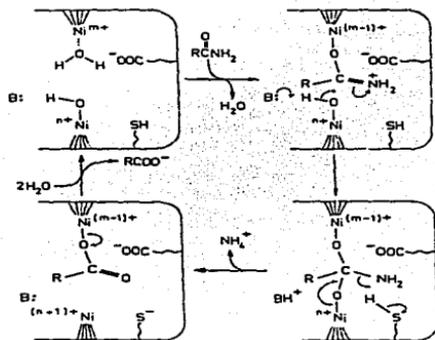


Figura 4.1 Mecanismo propuesto para la ureasa (LANCASTER, 1988).

Hay otro mecanismo propuesto en el cual el níquel parece tener nitrógeno u oxígeno como ligando y se piensa que cada níquel tiene un papel diferente: un átomo de níquel incrementa la nucleofilicidad de una molécula de agua coordinada (Fig 4.2).

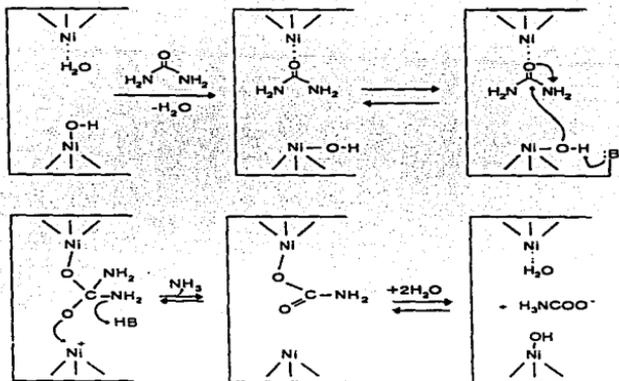


Figura 4.2 Mecanismo alternativo para la ureasa (LANCASTER, 1988).

B. Hidrogenasa.

Esta enzima se caracteriza por tener tres sitios activos. De una forma práctica se puede representar a la proteína como se muestra en la Figura 4.3.

El sitio H constituye el punto inicial para la conversión de H^+ a H_2 y de otras reacciones involucrando al hidrógeno, este sitio está presente en cualquier hidrogenasa, siempre y cuando contenga el complejo Fe-S, por lo que este complejo, se activa en el proceso al igual que el Níquel.

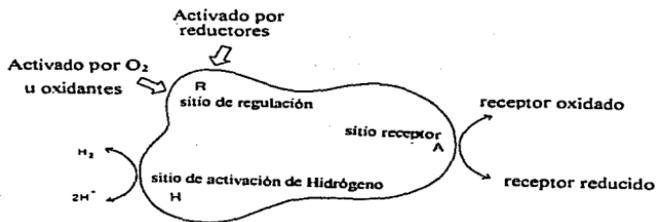


Figura 4.3 Un modelo general de la hidrogenasa (LANCASTER, 1988).

El sitio A es un punto de transferencia electrónica con el exterior y el sitio R o regulador, llamado así por que muchas hidrogenasas que contienen níquel son inactivas en captación de hidrógeno y tiene la función específica de proteger al oxígeno.

La hidrogenasa cataliza la reducción de sulfato y la oxidación de hidrógeno, la composición mínima consiste de subunidades conteniendo un complejo (4Fe-4S) y un átomo de níquel. Una de las hidrogenasas más investigadas es la enzima de la *Nocardia opaca*, en la cual, la estructura de la subunidad se mantiene por la unión del átomo de níquel y al separarse este metal se observa la disociación de los dos dímeros.

En este sentido, un dímero consiste de dos subunidades de 56 y 27 kDa y contiene aproximadamente 4Fe-4S-2Ni. Por otra parte, el segundo dímero está compuesto de dos subunidades de 64 y 31 kDa teniendo un NAD con actividad de receptor y con una composición de 9Fe-10S-1FMN.

De esta forma, los sitios H y A son fácilmente disociados y la más grande de las dos subunidades de la hidrogenasa contiene al sitio H.

Existen tres estados considerados para describir la activación de la hidrogenasa, la forma predominante (el 90%) es la enzima oxidada (y se nombra estado inicial), en este estado es completamente inactiva con el hidrógeno. Se puede decir que la enzima inactiva se distingue por un estado de oxidación alto y una conformación incorrecta. El resto de la proteína (10%) se encuentra en estado "no inicial". En esta forma sigue siendo inactiva, manteniendo el estado de

oxidación alto pero en una conformación correcta. El estado activo representa a la enzima en su forma reducida y con la conformación correcta.

El proceso de reducción del estado "inicial" es muy rápido mientras que en el estado "no inicial" es lento. Al estado "no inicial" se le llama señal Ni-A y al "inicial" señal Ni-B, ambos contienen al Níquel con estado de oxidación tres. Una tercera señal, llamada Ni-C aparece durante la activación lenta del estado "no inicial" pero sin ningún cambio del complejo Fe/S. Por otro lado, los espectros EPR no detectan una interacción entre las señales Ni-A, Ni-B y Ni-C con nitrógeno sino mas bien con un núcleo de azufre, esto significa que un átomo de azufre esta coordinado con el Níquel y una unión Ni-C en el estado activo de la hidrogenasa (Fig 4.4).

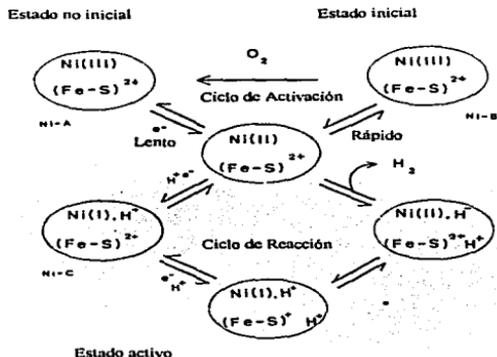


Figura 4.4 Estados de oxidación del Níquel durante la activación y reacción de la hidrogenasa (LANCASTER, 1988).

En el mecanismo de catálisis se ha generalmente aceptado el rompimiento heterolítico del hidrógeno molecular para dar un protón, el cual se combina con una base de la enzima, y el otro hidrógeno se une al centro metálico.

El níquel en la hidrogenasa de *C. vinosum* se reduce de Ni(III) a Ni(II) y posteriormente de Ni(II) a Ni(I). Aunque los estados de Ni(III) y Ni(II) deben ser estabilizados por ligandos electronegativos como amidas, oximas, óxidos o halogenuros.

La eliminación de hidrógeno molecular a partir de un complejo ditioleno diprotonado asegura que los protones ataquen a los átomos de azufre, con posterior formación de H-H, mientras la unión SH es rota en un paso concertado.

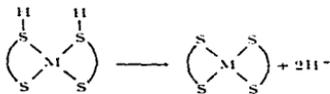


Figura 4.5 Reacciones de Hidrógeno con el complejo $M-S_4$ (LANCASTER, 1988).

Esta reacción cíclica comprende la formación de un hidruro seguida por eliminación heterolítica de hidrógeno molecular, el cual puede ser un ligando auxiliar (por un protón localizado en el átomo de azufre) (A) o por un ataque electrofílico de otro protón a el ligando hidruro(B).

El paso intermediario B tiene preferencia porque el enlace H-H debilita al enlace M-H. El mecanismo A requiere una sustancial energía de activación para romper los enlaces S-H y H-H (ALBRACHT, 1994).

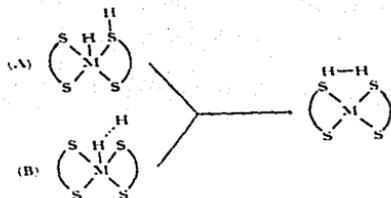


Figura 4.6 Reacciones del Hidrógeno con el complejo $M-S_4$ (LANCASTER, 1988).

C. M-S-Coenzima-M-Reductasa.

La bacteria que produce el metano utiliza una enzima que contiene níquel, (metil coenzima M-reductasa). Las reacciones catalizadas por esta enzima envuelven la descomposición del tioéter dimetil 2,2-ditiobis(etano sulfato)-(metil-CoM) a CH_4 y coenzima M-SH.

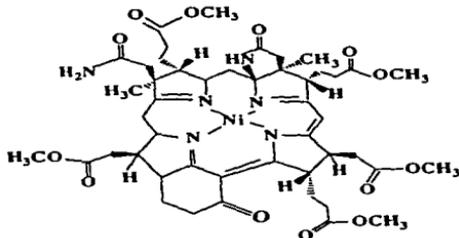


Figura 4.7 Estructura del tetrahidrocórfinoide de Níquel (cofactor F430) (KENDRICK, 1992).

La metil-Co-M-reductasa es una proteína celular soluble con un peso molecular de 300,000 Daltons y de color amarillo, este color amarillo es causado por la unión de dos moléculas del complejo tetrahidrocorfinoide (con níquel como metal central). El complejo se llama cofactor F430 debido a su absorción máxima a 430 nm (Fig 4.7); además, es un compuesto muy polar, soluble en agua y solventes orgánicos altamente polares como metanol.

El enlace de Ni-N en el cofactor tiene una distancia de 2.08 Å mientras que en otras enzimas conteniendo Níquel es de 1.91 Å.

El cofactor F430 tiene un papel importante dentro del sitio activo ocasionando un sitio de reducción, la coordinación del níquel al cofactor y en la unión del cofactor en la proteína. Aunque el Níquel contenido en el complejo tetrafenilporfirina tiene una geometría cuadrado planar y axialmente no reactiva, demuestra actividad frecuentemente con agua en la posición axial, también es posible sustituir esta molécula de agua por algún oxígeno o nitrógeno de aminoácido.

El complejo F430 actúa probablemente como nucleófilo y podría romper el enlace $\text{CH}_3\text{-S-CoM}$ para dar $\text{CH}_3\text{-Ni(II)-F430}$ y un producto tiolato, la descomposición del $\text{CH}_3\text{-Ni-F430}$ sucede a través de una protonólisis para producir CH_4 y Ni(II)-F430 (Fig 4.8)

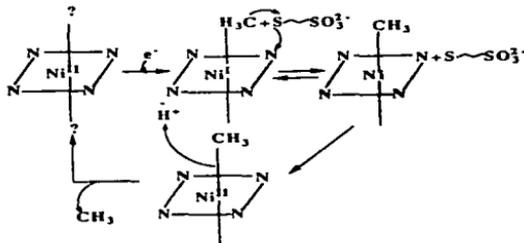


Figura 4.8 Posible mecanismo para Metil-CoA M Reductasa (KENDRIK, 1992).

Entre sus sustratos más comunes están los sulfonatos sustituidos, heteroátomos y alquenilderivados.

Desde un punto de vista general la S-metil-Coenzima reductasa cataliza la reducción de S-metilcoenzima por transferencia de dos electrones:



D. CO Deshidrogenasa.

Las enzimas que convierten monóxido de carbono en bióxido de carbono y contienen níquel se llaman carbonil(CO) deshidrogenasas, una de las más caracterizadas es la aislada de *Clostridium thermoaceticus* (KUMAR, 1994); esta proteína tiene un peso molecular de 400,000 Daltons y presenta tres iones níquel, 32-40 moléculas del complejo Fe/S y tres iones zinc. El mecanismo propuesto para la descarboxilación reversible de acetilCoA por la enzima CO deshidrogenasa se da a continuación (Fig 4.9).

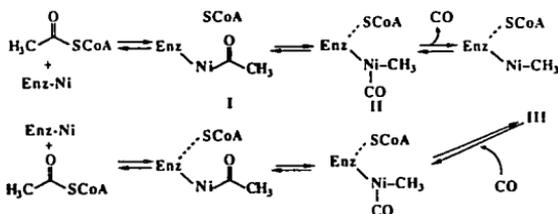


Figura 4.9 Mecanismo propuesto para descarboxilación de acetilCoA por CO deshidrogenasa (QIU, 1994).

Las CO deshidrogenasas tienen no solo la función de oxidar CO sino también reducir CO_2 para formar el grupo carboxilo del acetato.

Estudios de EPR señalan que el CO esta unido a níquel y probablemente además al hierro. Por otro lado, se presenta una reducción del Ni(II) a Ni(I). Algunos resultados experimentales indican que el Níquel podría estar unido dentro de un complejo de Fe/S sustituyendo a un átomo de Hierro.

La enzima esta compuesta por dos subunidades (80,000 y 68,000 Daltons) en una estequiometría 1:1 y por lo tanto un peso molecular de aproximadamente 290,000 con una conformación $\alpha_2\beta_2$ (ANDERSON, 1994).

La bacteria acetogénica produce la síntesis total de acetato a partir de dos moléculas de CO₂ en su captación de energía metabólica, esta síntesis está acoplada con la de ATP:



La enzima presenta tres sitios de unión: uno para el metil, otro para la CoA y otro para el grupo C-1 de acetil CoA, por lo tanto, se requiere de una reducción por medio de la transferencia de ocho electrones para el CO₂ y un H₂ como donador electrónico. La síntesis consiste de tres pasos 1) formación del precursor del carboxilo de acetilcoenzima 2) formación del precursor metil y 3) condensación de estos grupos con CoA para producir acetil-CoA.

En el primer paso, el hidrógeno molecular proporciona electrones para la reducción de CO₂ y obtener C-1 del carbonil de acetilCoA (Y-CO). Estudios de EPR señalan que Y-CO consiste de un centro Níquel, hierro y un carbono derivado de CO. El segundo paso es la formación de un metilo unido en el sitio X (X-CH₃), este metilo es precursor del C-2 de acetilCoA, el CO₂ primero es reducido a formato por la formato deshidrogenasa.

El formato se transforma a 10-formil tetrahidrofolato (10-formil-H₄-folato) y reducido a 5-metil-H₄-folato, una metiltransferasa entonces cataliza la transferencia del metil de metil-H₄-folato a una enzima corrinóide formando la enzima el complejo (CH₃-(CO)-ENZ), parece que un intermediario acetil es transferido a CO deshidrogenasa de una metilación de Y-CO o por una carbonilación del X-CH₃. En el tercer paso, La CoA es añadida en una reacción catalizada por CO-deshidrogenasa disulfuro reductasa. Entonces se cataliza el paso final de la síntesis de condensación del metil, CoA y C-1.

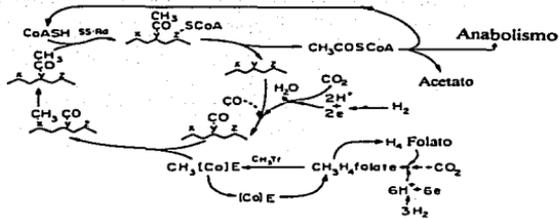


Figura 4.10 Síntesis de Acetil-CoA a partir de CO o H_2CO_2 (LANCASTER, 1988)

De esta manera, la función de la CO deshidrogenasa no es solo la conversión de CO a CO_2 sino además unir y condensar el metil, C-1 y CoA para la formación de Acetil-CoA.

Se ha comprobado la unión al sitio Z de la coenzima A. Sin embargo, en presencia de acetilCoA, la geometría del sitio Y se altera y podría indicar que los sitios Y y Z están muy cercanos. Este sitio de interacción tiene el papel de condensar CoA y el grupo metil y es posible que el centro metálico además de unir al CO este asociado en la condensación (Fig 4.10)

Se han observado algunos centros Fe/S en la CO deshidrogenasa apareciendo en forma de $(4\text{Fe-4S})^{1+/2+}$. La geometría del Níquel en el sitio activo puede ser piramidal cuadrada o tetraédrica distorsionada. La distancia entre el Níquel y el Hierro en un modelo del complejo Fe_3NiS_4 parece ser de 2.7 Å.

Probablemente la función del níquel es ayudar a la unión de CO en la enzima y formar un centro Ni-Fe-Carbono. Esto se debe a la afinidad del Níquel y el Hierro por tener grupos carbonilos no obstante el estado de oxidación del Ni no se conoce (KUMAR, 1994).

PRINCIPALES REACCIONES DE ENZIMAS CON NIQUEL

Ureasa	$\text{H}_2\text{CONH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{NCOO}^- + \text{NH}_4^+ \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$
M-S-Coenzima-M-Reductasa	$\text{H}_3\text{CSCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{CH}_4 + \text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$
CO Deshidrogenasa	$2\text{CO}_2 + 8(\text{H}) \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$
Hidrogenasa	$2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2$

V. ZINC EN ENZIMAS

ZINC EN ENZIMAS.

A pH neutro, toda la catálisis de tipo ácido base en sistemas biológicos, promovida por iones metálicos, se lleva a cabo por el Zn(II); éste es un ion de configuración d^{10} en la última capa, por lo que es un buen ácido de Lewis y no es posible que maneje reacciones de tipo redox.

Una característica importante de este elemento es su carga altamente concentrada, es un ion pequeño (0.65Å de radio). Esta propiedad causa una afinidad considerable por electrones y entonces se comporta como un ácido fuerte de Lewis.

El zinc (II) como catalizador en metalobiomoléculas se encuentra en sitios de baja simetría uniéndose a la cadena lateral de aminoácidos a través de nitrógeno, azufre u oxígeno. Aunque uno de los mejores ligandos es H_2O/OH . La geometría que tiene el Zinc(II) en este ambiente es tetraédrico. Los ligandos de nitrógeno son proporcionados del residuo histidina mientras los oxígenos vienen a ser de agua o del sustrato. Algunas funciones que el zinc desempeña dentro de la enzima son: 1) para atacar pequeños sustratos los cuales no pueden ser manejados como grupos orgánicos de adherencia multipuntual y, 2) realizar un ataque rápido aunque éste no sea específico produciendo una débil unión del sustrato (KIMURA, 1988).

En forma generalizada, los papeles que desempeña el zinc son: como catalizador ácido, en control de iones y como un ion de apoyo en la estructura peptídica (proteína). Este metal depende de varios factores en el sitio: a) tipo de ligandos, b) distribución de los ligandos, c) distancias de enlace, d) tipo de grupo saliente y, el ambiente que rodea al metal.

A. Anhidrasa Carbónica.

El máximo número de transferencia del bióxido de carbono (número de moléculas de sustrato transformadas por unidad de tiempo) es de $10^4 s^{-1}$. El ataque catalizado por agua sobre el bióxido de carbono puede ser favorecido por los dos hidrógenos del agua, uno de los cuales activa al carbono a través de puentes de hidrógeno sobre un oxígeno terminal del bióxido de carbono (KIMURA; 1990).

Esta enzima tiene un peso molecular de 30 kDa y un ion Zinc por molécula; tiene una forma de huevo con una hendidura de 16 Å en la parte baja, al final de esta abertura está fijado el

ion zinc unido a tres nitrógenos de histidina (HIS-94, 96 y 119) y expuesto al solvente (BERTINI, 1992).

Se han identificado tres sitios de enlace, el sitio A, proporciona una geometría tetraédrica alrededor del ion metálico por medio de una molécula de OH^- .

La histidina 119 mantiene una unión con un hidrógeno de un residuo glutamato, el cual parece controlar la basicidad del metal y los ligandos. Una molécula de solvente unida al zinc forma un enlace entre el metal y Thr-199, al mismo tiempo que un hidrógeno de Thr-199 se une a Glu-106.

Los residuos Thr-199 y Thr-200 junto con sus vecinos identifican a una región hidrofílica. Hay otra parte de la enzima que contiene Val-143, Leu-198 y Trp-209 los cuales forman una región hidrofóbica llamada B, aunque estudios de rayos x señalan una molécula de agua coordinada. Esta molécula de agua podría cambiar su posición y alterar entonces los grupos coordinados, esta nueva posición se llama región C (Fig 5.1) (FIERKE, 1991).

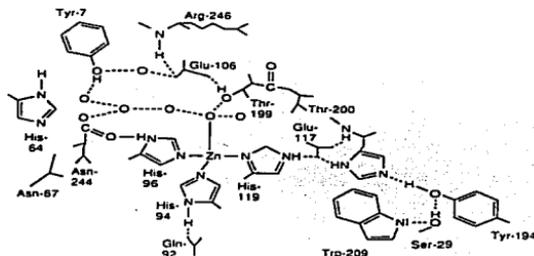


Figura 5.1 Sitio activo de Anhidrasa Carbónica (BERTINI, 1992).

El ciclo catalítico propuesto para la anhidrasa carbónica depende del pH. Es decir, a pH fisiológico, el metal se encuentra como Zn-OH (paso A, Fig. 5.2). Una parte del Zn-OH es relativamente buen nucleofílico y por lo tanto se produce un ataque al sustrato bióxido de

carbono. En éste instante, la concentración de bióxido de carbono es mayor en el sitio activo que en la solución (paso B).

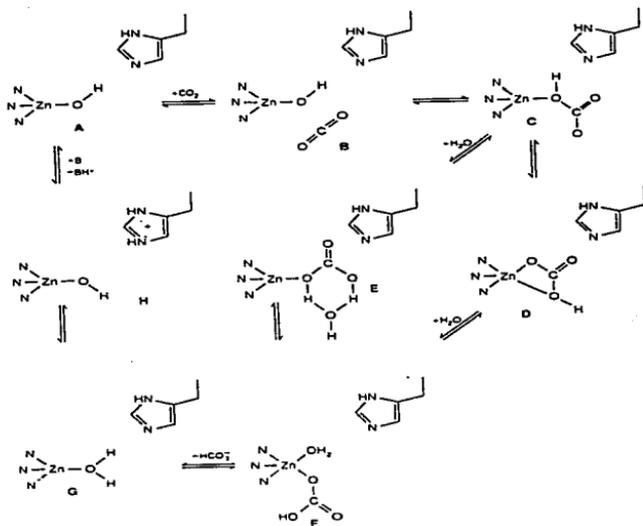


Figura 5.2 Ciclo catalítico propuesto para anhidrasa carbónica (BERTINI, 1994).

Tal vez la carga positiva alrededor del zinc y del NH de Thr-199 representan dos puntos de atracción electrostática para activar al bióxido de carbono. Al formarse el bicarbonato (Paso C) el protón se tiene que transferir a un átomo de oxígeno terminal, ya sea a través de un intermediario donde el bicarbonato es bidentado (D) o por medio de puentes de hidrógeno (E), el bicarbonato está en equilibrio con el zinc tetra y pentacoordinado (F), este equilibrio proporciona

una barrera baja, resultando en la liberación del bicarbonato (G), este paso, se distingue por tener el sitio B, a la molécula de bicarbonato y el sitio C, a una molécula de agua, después de esta etapa, un protón es liberado (H) y captado comúnmente por la histidina, luego por el solvente (ALEXANDER, 1991).

El zinc tiene varias funciones 1) influye en la unión de los dos reactivos (H_2O y CO_2), 2) se comporta como un ácido de Lewis produciendo un nucleófilo (OH^-) y activa al electrófilo (CO_2) (BERTINI, 1987).

La estructura de la enzima contiene ampliamente distribuida una β -hoja (Fig 5.3), la ranura que tiene desde la superficie hasta el sitio activo posee varios imidazoles y es diseñado como conductor protéico para la incorporación de los sustratos.

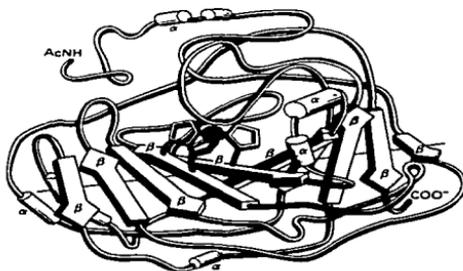


Figura 5.3 Estructura de la anhidrasa carbónica (FRAUSTO, 1991).

B. Alcohol Deshidrogenasa.

La transferencia de hidruro es un proceso elemental encontrado en muchas reacciones enzimáticas; aunque la transferencia de hidruro implica una reacción redox, se manifiesta además un ataque nucleofílico sobre el sustrato.

La alcohol deshidrogenasa es una enzima dimérica de 80 kDa, utiliza NADH/NAD⁺ como coenzima (o mas bien como cosustrato), su función es catalizar la deshidrogenación reversible de alcoholes primarios, secundarios para obtener aldehídos o cetonas respectivamente.

Cada subunidad de la alcohol deshidrogenasa contiene dos iones zinc; uno de ellos está coordinado a cuatro átomos de azufre de cisteínas y el otro metal esta coordinado a dos azufre de cisteínas, un nitrógeno de histidina y a una molécula de agua. Mientras el primero no tiene aparentemente un papel en la catálisis, el segundo es esencial para la actividad de la reacción. (Fig 5.4)



Figura 5.4 Ligandos del sitio activo catalítico (Izq) y no catalítico (Der) de alcohol deshidrogenasa (ANANDA, 1993).

La enzima tiene la propiedad de girar libremente sus dos subunidades, y describirlas por una conformación abierta y cerrada. En la abierta, la unión de la coenzima NADH provoca la rotación, resultando la conformación cerrada.

El ion metálico actúa principalmente en la polarización del sustrato en forma geométrica y polarizando el enlace carbono-oxígeno (POUPLANA, 1994).

El zinc permite el acceso al solvente en conformación abierta, mientras no tanto en la conformación cerrada cuando la enzima reducida está unida y totalmente inaccesible cuando el sustrato está coordinado al metal en el complejo, liberando todas las moléculas de agua del sitio activo.

De esta forma, las especies reactivas son atrapadas en un medio ambiente absolutamente anhidro. Se han observado muchos valores de pKa bajo diferentes condiciones. La enzima con zinc coordinado y agua indica un pKa=9.2 en la forma abierta mientras la unión de NADH incrementa el pKa a 11.2. El anillo no polar de nicotinamida de NADH disminuye las interacciones electrostáticas totales del agua, mientras la carga positiva de NAD⁺ la incrementa drásticamente (SARTORIUS, 1987). En este sentido, NADH proporciona una autoregulación ambiental que esta diseñada para disminuir el pKa de un alcohol coordinado.

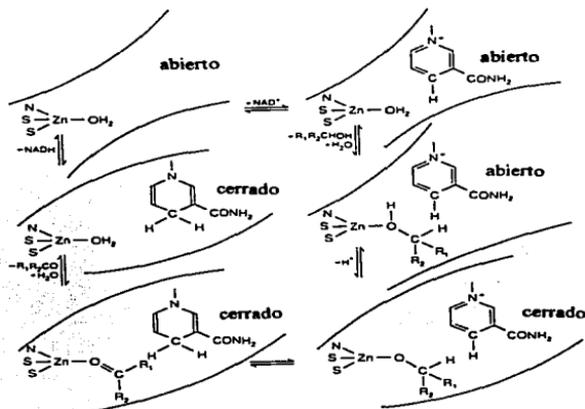


Figura 5.5 Posible ciclo catalítico de la Alcohol Deshidrogenasa (BERTINI, 1994).

El ciclo catalítico total para la reacción de deshidrogenación a pH=7 puede ser resumido a continuación Fig 5.5

1) El NAD⁺ se une a la forma abierta de la enzima conteniendo agua, el pK_a del agua disminuye a 7.6 y no está ionizada.

- 2) Una molécula neutra del alcohol entra al sitio sustituyendo a una molécula de agua coordinada al zinc, la proteína está en forma abierta todavía.
- 3) La subunidad gira llevando a la proteína a la conformación cerrada y liberando todas las moléculas de agua del sitio activo. La carga positiva tanto del metal como del anillo nicotinamida disminuye el pKa por debajo de 7. Se libera un protón de la cavidad por medio de los residuos de la proteína.
- 4) La transferencia directa de hidruro del alcohol a la posición cuatro del anillo de nicotinamida resulta en un complejo ternario de NADH-Aldehído-Metal. La polaridad del sitio activo cae drásticamente.
- 5) El producto aldehído se libera y es reemplazado por una molécula de agua (su pK es ahora 11.2). Pueden entrar moléculas de agua en la hendidura favoreciendo la abertura parcial de la estructura.
- 6) La pérdida de contacto entre las dos mitades favorece la conformación abierta y entonces la liberación de NADH. Esta etapa demuestra la velocidad de disociación máxima y depende del pH.

C. Carboxipeptidasa.

La hidrólisis no catalizada de péptidos es un proceso lento con una constante de velocidad tan baja (10^{-11} s^{-1}). La misma reacción catalizada por la carboxipeptidasa, tiene una constante de velocidad de 10^4 s^{-1} (AULD, 1992).

El zinc presente en la enzima está coordinado a dos residuos histidina (His-69, His-196) y a un residuo glutamato que actúa como un ligando bidentado (Glu-72) y a una molécula de agua. El metal permite la entrada fácil del solvente y de esta forma, provocar la desprotonación de una molécula de agua para producir un ion hidróxido o polarizar el oxígeno carbonílico del sustrato por coordinación, o ambas, si existe alguna flexibilidad de la esfera de coordinación (KIM, 1990).

El ácido glutámico (Glu-270) esta cerca del metal y si el papel del zinc es polarizar al carbono carbonílico, este residuo en su forma desprotonada podría realizar un ataque nucleofílico sobre el carbono obteniéndose un intermediario anhídrido. Alternativamente, el metal podría proporcionar un ion hidróxido coordinado que a su vez atacaría al carbono carbonílico, de esta

manera, el Glu-270 ayuda a formar al Zn-OH, transfiriendo el protón a el grupo carboxilato (CHRISTIANSON, 1989) (Fig 5.6).

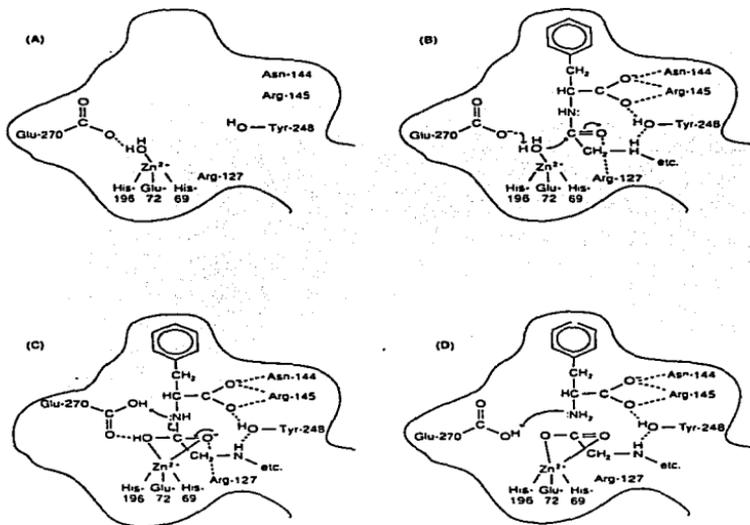


Figura 5.6 Posible ciclo catalítico de Carboxipeptidasa (BERTINI, 1994).

Del lado opuesto a la cavidad se encuentra un residuo tirosina que es bastante móvil, el cual, se aprovecha en el proceso catalítico; la cavidad presenta un ambiente hidrofóbico favoreciendo el acomodo de la cadena lateral de los aminoácidos no polares que van a tener la hidrólisis. Finalmente una Asp-144 y Arg-145 interactúan a través de puentes de hidrógeno con el grupo terminal carboxílico (MOCK, 1988).

Con base en estos datos y en muchos experimentos se ha propuesto un mecanismo. El péptido ingresado interactúa con residuos arginina por medio de su grupo carboxilato terminal; la interacción podría inicialmente envolver a Arg-71 y entonces el péptido se acomoda hasta su punto final Arg-145.

El oxígeno carbonílico forma un fuerte enlace con un hidrógeno de Arg-127. Una mayor estabilización la da una unión de Tir-248 al NH del penúltimo aminoácido.



Figura 5.7 Estructura de la carboxipeptidasa (FRAUSTO, 1991).

Durante esta etapa, el metal se encuentra unido con un hidróxido. la unión es auxiliada por Glu-270, el cual además efectúa un ataque nucleofílico sobre el carbón carbonílico activado por Arg-127. El grupo carbonilo del aminoácido se une en forma bidentada al metal al mismo

tiempo que el Glu-270 funciona como un regulador para mantener el número de coordinación cinco en el metal.

Se produce el rompimiento del enlace C-N causado por la adición de un protón al nitrógeno del grupo amino. Este protón podría venir de Glu-270 el cual regresa al estado ionizado. El segundo protón necesario para transformar el nitrógeno del grupo amino en NH_3^+ podría surgir del exceso de protones del grupo carboxílico coordinado con el sustrato.

Finalmente el metal retrocede para recuperar al ligando bidentado de Glu-72 y la descomposición de péptidos lo libera mientras mas moléculas de agua se unen al metal y se separa del grupo carboxilato libre de Glu-270.

Una vez que la hidrólisis se ha desarrollado, la descomposición del aminoácido sigue interactuando con Arg-145 y con la cavidad hidrofóbica, y otra vez el grupo carboxilato de un nuevo aminoácido terminal reacciona con zinc (SCHEPARTZ, 1987).

D. Fosfatasa Alcalina.

La hidrólisis de ésteres fosfóricos catalizada por metaloenzimas se ejemplifica con la fosfatasa alcalina. La proteína es un dímero de 94 kDa conteniendo dos átomos de Zn(II) y uno de Mg(II) por cada monómero. La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis no específicamente de una variedad de monoésteres de fosfato al igual que reacciones de transfosforilación. Por medio de rayos x se ha indicado la estructura con resolución de 2.4 Å demostrando tres metales en cada subunidad (Fig 5.8)

Los sitios M1 y M2 son ocupados por zinc y M3 por magnesio. M1 está coordinado a dos residuos histidina (His-331 y His-412) y a una Asp-327. Los ligandos proteicos al sitio M2 son Asp-369, His-370 y Asp-51, este último posiblemente uniendo a M2 y M3 con el oxígeno de carboxilo. El sitio M3 esta coordinado a Asp-51, Asp-153, Thr-155 y Glu-322.

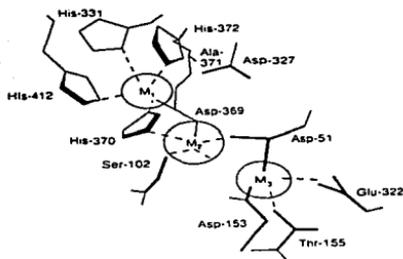


Figura 5.8 Sitio activo de fosfatasa alcalina (BERTINI, 1994).

Investigaciones espectroscópicas indican una coordinación de cinco para el sitio M1 mientras que para M2 y M3 una coordinación de seis completada por moléculas de agua. El sitio M1 es esencial para la actividad sin embargo, toda la eficiencia catalítica es encontrada cuando los tres iones metálicos están presentes (BANCI, 1987).

Algunos aspectos claves del sitio activo son: la presencia de un residuo serina (Ser-102), un átomo de oxígeno cercano al par M1-M2 y el incremento de actividad catalítica con el pH.

El posible mecanismo para la hidrólisis de éster fosfórico catalizado por la fosfatasa alcalina podría incluir los siguientes pasos:

- 1) Unión del sitio M1 de los oxígenos no protonados y la activación del átomo de fósforo para un ataque nucleofílico. La unión del sustrato parece estar favorecida por la interacción del residuo Arg-166 positivamente cargado.

El cambio estérico en el sitio activo causa movimiento del Ser-102 hacia el sitio M2.

- 2) El ataque nucleofílico sobre fósforo por una molécula de alcóxido coordinada a serina realiza el rompimiento del enlace éster y libera el alcohol.
- 3) La formación del intermediario fosfoseril con rompimiento del enlace M1 fosfato, disminuye el pK_a debido a una segunda molécula de agua y el protón se libera por el alcohol saliente.
- 4) El hidróxido coordinado al metal realiza un ataque sobre el derivado fosforil posiblemente con M2 otra vez polarizando el oxígeno seril, produciendo un ion fosfato libre coordinado a M1. Una molécula de agua ayudaría en la liberación del fosfato vía un mecanismo asociado (Fig 5.9).

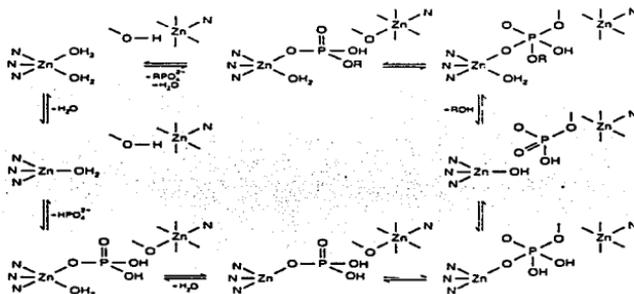


Figura 5.9 Posible ciclo catalítico de Fosfatasa Alcalina (BERTNI, 1994).

El ion magnesio tal vez actúa en la enzima sólo para orientar al sustrato, por lo tanto el zinc es el grupo atacante. La constante de hidrólisis de zinc en la enzima es 10^3 mas grande que el zinc libre, sin embargo, el sitio activo contiene varias propiedades catalíticas extras (BERTNI, 1989).

ESTA LEVA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

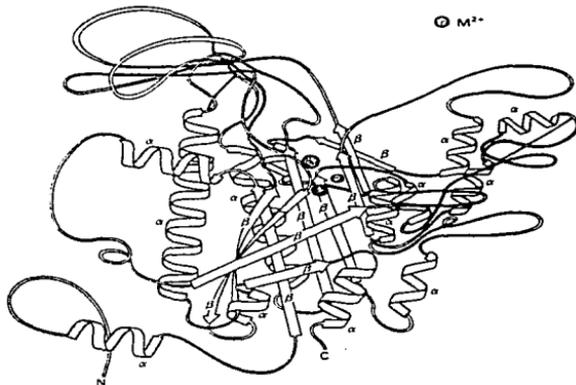


Figura 5.10 Estructura de fosfatasa alcalina (FRAUSTO, 1991).

E. DNA polimerasa.

Esta enzima cataliza la adición de un mononucleótido a un extremo libre de la cadena de ácido desoxiribonucleico(DNA). La DNA polimerasa obtenida de *E. coli* es un polipéptido sencillo con un ion zinc (II) unido por cada mol de enzima y con un peso molecular de 190,000 Da. Además de necesitar al zinc requiere de otros metales divalentes como Mg^{2+} o Mn^{2+} para la catálisis (ABBOTTS, 1988).

El mecanismo comprende una nucleotidil transferencia catalizada por Zn^{2+} (Fig 5.11). El zinc se coordina con el primer término 3-OH facilitando su desprotonación y preparándolo para un ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo del nucleótido atrapado (PANDEY, 1994).

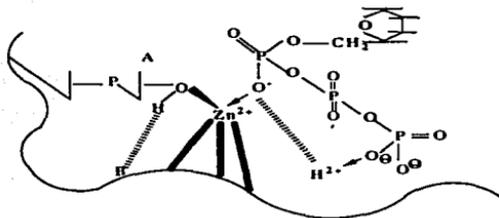


Figura 5.11 Mecanismo de DNA polimerasa (KENDRICK, 1992).

El zinc por lo tanto tiene al menos tres funciones en las polimerasas: 1) un papel catalítico en la unión del primer sustrato, 2) un papel estructural en el mantenimiento de la configuración propia de la polimerasa, 3) Un papel regulador en la replicación genética (LIN, 1994).

F. Acido δ aminolevulinico deshidratasa.

Muchas proteínas biológicamente importantes contiene grupos tiol y en el caso de enzimas con zinc, el metal evita la oxidación de estos grupos.

La ácido δ -aminolevulinico deshidratasa (δ -ALD) es un ejemplo de enzima donde el papel del zinc parece ser la protección de grupo tiol de estas proteínas. La δ -ALD cataliza la condensación de dos moléculas de aminolevulinato para formar porfobilinógeno, el segundo paso en la síntesis del grupo hemo (Fig 5.12).

G. Aspartato transcarbamilasa.

Esta enzima esta en muchos organismos catalizando la condensación de carbamil fosfato con L-aspartato para dar carbamil aspartato (Fig 5.13), este es el precursor clave en la biosíntesis de piridinas.



Figura 5.13 Reacción catalizada por Aspartato transcarbamilasa (ANANDA, 1993).

El peso molecular de la aspartato transcarbamilasa de la *E. coli* es de 310,000 Da, su actividad es inhibida por piridín nucleotidos tales como citosina trifosfato (CTP) mientras que su actividad se ve mejorada por purin nucleotidos como por ejemplo adenosin trifosfato (ATP). La enzima contiene seis átomos de zinc por mol de proteína. Uno de estos átomos se encuentra unido a la cadena lateral de residuos y no es necesario para la actividad catalítica, sino más bien parece ser esencial para el mantenimiento de la estructura cuaternaria de la holoenzima. El zinc que tiene propiedad catalítica esta unido por cuatro residuos cisteína en una geometría de coordinación tetraédrica (TSURUTA; 1994); sin embargo, el papel del zinc en la enzima sigue siendo desconocida.

H. RNA polimerasa.

El zinc es un ion metálico imprescindible en la RNA polimerasa, de tal forma que su ausencia provoca la pérdida de actividad enzimática. El zinc además juega indirectamente un papel estructural en el mantenimiento propio de la conformación (BONNER, 1994).

El movimiento y renovación del ion metálico es más difícil para una polimerasa con multisubunidades que una enzima de cadena sencilla sugiriendo que algunos metales en las

enzimas con multisubunidades pueden afectar la estructura cuaternaria de la polimerasa. La función estructural del metal es muy distinta en RNA polimerasa de eucariontes, la cual contiene un mayor número de subunidades que la enzima de procariontes (LIU, 1994).

I. Leucina aminopeptidasa.

Esta enzima cataliza la hidrólisis de aminoácidos N-terminales de proteínas, péptidos y amidas, generalmente requiriendo de un grupo amino libre (grupo α -amino) en configuración L; por otro lado, su especificidad con el sustrato es amplia, particularmente aquellas con aminoácidos hidrofóbicos; estas enzimas contienen dos átomos de zinc por mol de subunidad y su peso molecular es mayor de 200,000 Da (PLAKIDOU-DYMOCK, 1993). En aminopeptidasa bovina, el zinc no tiene una función estructural, los dos átomos están unidos a leucina y entonces trabajan en la aminopeptidasa de dos distintas formas: uno de ellos tiene una función catalítica mientras que el otro regula la actividad inducida por el átomo de zinc del primer sitio (WU, 1995).

J. Citocromo oxidasa.

En recientes estudios la citocromo oxidasa del músculo de corazón de bovino demostró tener un átomo de zinc y dos de hierro. Otras pruebas indican un contenido de iones Cu, Fe y Zinc. El promedio de los radios atómicos de Cu/Fe, Fe/Zn y Cu/Zn son 1:3, 2:1 y 1:8 respectivamente.

Se sugiere que el zinc tiene un papel tanto catalítico como estructural en la reducción de oxígeno molecular. Las cargas positivas del zinc se consideran importantes para estas funciones. También se señala que un ligando unido a Zinc(II) (por ejemplo, imidazol o agua) pueden promover la catálisis por medio de la donación de un protón a un átomo de oxígeno durante la reducción.

K) SOD.

Al extraer el Zn(II) y Cu(II) de la superóxido dismutasa se produce una apoproteína estable; así mismo, varios metales pueden ser sustituidos por cobre dentro del sitio catalítico, por ejemplo Cd^{2+} , Co^{2+} y Ag^{2+} y también en el centro estructural, sustituyendo al Zn(II). Una mayor información acerca de esta enzima se comentó en el capítulo del cobre.

PRINCIPALES REACCIONES DE ENZIMAS CON ZINC

Anhidrasa carbonica	$\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
Alcohol Deshidrogenasa	Alcoholes Primarios \rightarrow Aldehidos Alcoholes Secundarios \rightarrow Cetonas
Carboxipeptidasa	Hidrólisis de Péptidos por la parte carboxilo terminal.
Fosfatasa alcalina	$\text{RPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{HPO}_4^{2-}$
DNA Polimerasa	Adición de Mononucleotidos al DNA
Acido δ -aminolevulinico deshidratasa	Promover la deshidratación y la condensación de dos moles de aminolevulinato para formar una mol de porfobilinógeno.
Aspartato transcarbamilasa	Carbamilfosfato + Aspartato \rightarrow Carbamilaspartato
Leucina aminopeptidasa	Hidrólisis de Péptidos por la parte amino terminal.

VI. COBALTO EN ENZIMAS

COBALTO EN ENZIMAS.

El cobalto utilizado en sistemas biológicos se presenta en una forma estable de bajo espín y su configuración electrónica, caracterizada por un electrón no apareado, lo hace adecuado para reacciones vía radicales libres.

Este metal se encuentra formando un complejo cobalto-corrina dentro de la naturaleza. La química del cobalto y la del carbono, están asociadas por el fácil desarrollo de carbocationes, carbaniones y radicales libres, lo cual significa que la fisión del enlace cobalto-carbono puede tomar lugar tanto homo como heterolíticamente.

El cobalto logra complejos con oxígeno en estados de oxidación por debajo de tres y su tipo de estructura electrónica demuestra diamagnetismo del complejo; esto conduce a una alta estabilidad del complejo con oxígeno, incrementándose de igual manera la interacción con el ligando.

A. Cobalto y coenzima B₁₂.

La vitamina de más baja concentración en el cuerpo humano es el complejo cobalto-corrina. Hay alrededor de once reacciones de los sistemas biológicos donde necesitan del complejo B₁₂ estas se identifican por ser reacciones orgánicas extremadamente sensibles. El uso de este metal es importante para llevar una catálisis por radicales libres al mismo tiempo que mantiene un control. El control en este sentido significa que los radicales libres no deben ser tan reactivos como para hacer un daño fisiológico al tejido (MEALLI, 1987).

La coenzima B₁₂ (S-desoxiadenosil cobalamina) participa como cofactor en un número de reacciones enzimáticas donde hay un total reacomodo del sustrato y frecuentemente un átomo de hidrógeno se intercambia por un grupo funcional sobre un carbono adyacente (Fig 6.1)(GENO, 1987).

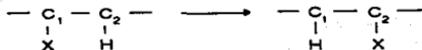


Figura 6.1 Reacción catalizada por la coenzima B₁₂ (GENO, 1987).

Donde X puede ser -OH, -NH₂, =O, -SCoA, -CH₂CH₂COOH.

Hay cuatro reacciones importantes de la coenzima B₁₂

- 1) La reducción de ribosa a desoxiribosa
- 2) El reacomodo de dioles y moléculas similares
- 3) El reacomodo de malonil a succinil
- 4) La transferencia de grupos metilo.

Un punto significativo en todas éstas reacciones, es la necesidad de un acceso bastante amplio para los sustratos grandes así como para la transferencia metálica.

Se ha establecido un intermediario tipo Co(II) en las reacciones 1, 2 y 3 mientras en la 4 aparece Co(I). En un análisis del mecanismo, el rompimiento del enlace Co-C en la enzima requiere de una pequeña cantidad de energía (10 Kcal) comparada con la necesaria en solución (20 Kcal), de esta forma se describe la potencia que tiene la proteína.

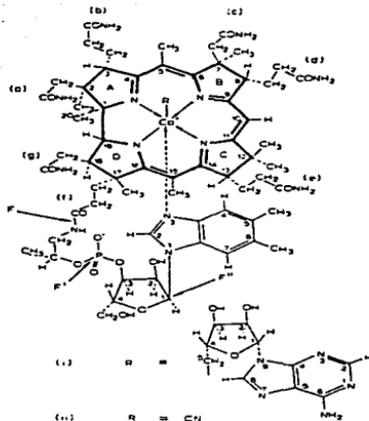


Figura 6.2 Estructura de la vitamina(i) y coenzima B₁₂ (ii)(KENDRICK, 1991).

La estructura de la vitamina y coenzima se muestran en la Fig 6.2, el átomo de cobalto yace aproximadamente en un plano con cuatro nitrógenos como ligandos del complejo corrina, este ligando macrocíclico monoaniónico puede ser considerado un tetrapirrol reducido.

Una diferencia sorprendente con las porfirinas se presenta en la unión directa entre los anillos A y D. La conjugación se extiende solo sobre los trece átomos excluyendo al Cobalto.

2. Glutamato mutasa.

El estudio de la fermentación del ácido glutámico por *Clostridium tetanomorphum* condujo a la separación de la coenzima de forma de α -(adenil)-cobamida, esta enzima cataliza la conversión reversible de L-glutamato a L-treo- β -metilaspártato con un equilibrio favorecido hacia glutamato.

La enzima se divide en dos partes, la más grande es el componente E (peso molecular 128,000 Da) que une al glutamato y en ausencia del componente mas pequeño S, se une una molécula de coenzima B₁₂, sin embargo, en exceso del componente S se unen dos moléculas de coenzima, el componente S (peso molecular 17,000 Da) se inhibe por grupos sulfhidrilo ya que contiene de 6 a 7 de estos grupos, dos de los cuales están expuestos. Entre la enzima libre y la unida hay un pequeño cambio que consiste en la modificación del grupo 5'-desoxiadenosil provocando una pérdida completa de actividad.

La reacción comprende la transferencia de una parte de glicina y un átomo de hidrógeno, la glicina libre, el ion amonio, el acrilato y el α -cetoglutarato no son intermediarios; además de que ningún hidrógeno del solvente es incorporado. La isomerización de R-metilmalonilCoA a succinil-CoA ocurre con retención de configuración del carbono 2, la isomerización de 2S-3S-3-metil aspártato (Fig 6.4a) a glutamato (Fig 6.4b) se distingue por inversión de configuración del carbono 3 de metil aspártato.



Figura 6.4 Reacción catalizada por glutamato mutasa.

De esta manera, se puede decir que el hidrógeno migra desde el grupo metil, de metil aspartato, atacando al carbono 3 en una dirección opuesta a la salida del grupo $-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, esta transferencia del nitrógeno se logra a través de la unión 5'-desoxiadenosilcobalamina actuando como transportador del hidrógeno (HOLLOWAY, 1994).

3. Diol deshidrasa.

Algunas especies de *Aerobacterias* y *Escherichias* son capaces de formar grandes cantidades de 1,3-propanediol a partir de glicerol. Precisamente la *Aerobacterogenes* ATCC8724 crece anaeróbicamente sobre el glicerol convirtiendo etilenglicol a acetaldehído y también 1,2-propanediol a propanaldehído en forma irreversible (Fig 6.5).

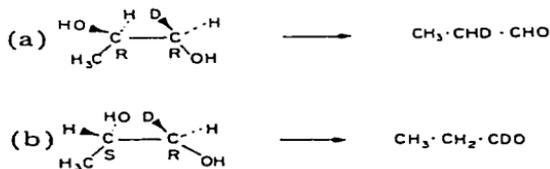


Figura 6.5 Propanediol dehidrasa catalizando la reacción de 1-R-1D-2R propano-1,2diol (a) y de 1-R-1-D-2-S-propano-1,2-diol (b).

La enzima 1,2-propanediol dehidrasa requiere de un catión monovalente como K^+ , NH_4^+ , Tl^+ o Rb^+ y también de un derivado de la coenzima B_{12} . Sin embargo la vitamina misma, cianocobalamina y la hidroxocobalamina actúan como inhibidores.

La coenzima es sensible a cambios en muchas partes de la molécula, por ejemplo, una modificación del grupo $\text{Co-C}'5$ -desoxiadenosil afecta a la actividad, aunque la fotólisis de la enzima puede incrementarla.

La glicerol dehidrasa purificada de *A. aerogenes* tiene un peso molecular de 188,000 Da y forma un complejo inactivo estable con hidroxocobalamina. No obstante, el Na^+ , el pH bajo y el EDTA promueven la disociación de la apoenzima. En cierta forma la hidroxocobalamina protege a la apoenzima contra un ataque por reactivos, por ejemplo grupos sulfhidrilos e incrementa la estabilidad térmica enzimática. En presencia de Mg^{2+} y SO_3^{2-} la hidroxocobalamina puede ser sustituida por 5'-desoxiadenosilcobalamina para dar la holoenzima.

Al investigar la molécula reactiva de propano 1,2-diol se observa que ningún hidrógeno del solvente es incorporado ya sea al sustrato o al producto. Así también se indica que no hay intermediarios; mas bien hay evidencias convincentes de migración del hidrógeno entre la unión del sustrato y la enzima.

Se ha concluido que la migración del hidrógeno del carbono 1 al carbono 2 se lleva con inversión de configuración del carbono 2. Esto sugiere que el enlace Co-CH_2 podría actuar como receptor de hidrógeno. Durante el proceso la holoenzima es reducida por glicerol aldehído dando 5'-desoxiadenosilcobalamina, de hecho, los dos hidrógenos de C^5 son equivalentes por lo tanto no hay prueba para manifestar la relación de hidrógenos del C^4 en la reacción.

4. Etanolamina deaminasa.

Esta enzima extraída de *Clostridium* utiliza colina o etanolamina como sustrato y requiere de coenzima cobamida y un catión monovalente, tiene un peso molecular de 520,000 Da y presenta de 8 a 10 subunidades. En ausencia de oxígeno, la coenzima inactiva a la enzima. La proteína contiene dos moléculas de coenzima, cada una separada e independiente del sitio activo.

Como en la diol dehidrasa, existe la transferencia de hidrógeno a la coenzima y entonces el átomo de carbono del grupo amino se activa perdiendo amonio para dar como producto acetaldehído. La enzima puede distinguir el hidrógeno del alcohol, y por otro lado, mantiene el oxígeno en la molécula. Hay pruebas de una disociación homolítica reversible del enlace carbono-cobalto, es decir, que se han detectado especies conteniendo electrones no apareados durante la catálisis.

5. L-β-lisina Mutasa.

La descomposición anaeróbica de lisina por varias *Clostridium* produce un ácido carboxílico y amonio (Fig 6.6).

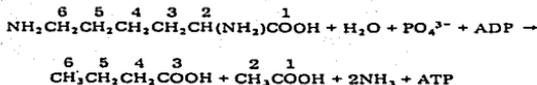


Figura 6.6 Reacción catalizada por L-β-lisina Mutasa.

Se requiere una coenzima cobamida como catalizador; el primer intermediario en el proceso es el grupo amino que se transfiere del carbono 2 al carbono 3 para dar β-lisina (3,6-diaminohexanolato), el paso reversible depende de cobamida y produce 3,5-diaminohexanoato.

La β-lisina mutasa de *C. sticklandii* ha sido purificada y dividida en dos proteínas, una de las cuales contiene muy unida una cobinamida α-(adenil)-5'-desoxiadenosilcobamida (peso molecular 160,000) mientras que la otra parte es una proteína con grupos sulfhidrilos (peso molecular 60,000), ambas proteínas y un catión monovalente (K⁺, Rb⁺, NH₄⁺) son esenciales para la actividad.

El sistema incompletamente purificado requiere de ATP, tiol, FAD, Mg²⁺ y piruvato, aunque todo esto excepto el piruvato están relacionados en la síntesis de una 5'-desoxiadenosilcobamida, la coenzima cobamida funciona con un transportador de hidrógeno, el cual migra del C'5 de β-lisina a C'5 de la coenzima. Otras dos enzimas dependientes de cobamida han sido aisladas de *C. sticklandii*. Tanto la D-α-lisina mutasa (cataliza la formación de 2,5-diaminohexanoato) como la ornitina mutasa dan el mismo producto. Estas dos enzimas son bastante similares a β-lisina mutasa consistiendo de una proteína unida a cobamida (peso molecular de 60,000); la D-α-lisina mutasa requiere además un catión monovalente y un metal divalente con ATP y fosfato piridoxal para su actividad. La segunda enzima quizá reacciona con

el grupo 6-amino, haciéndolo más fácil de migrar al carbono 5, el ATP incrementa la afinidad de D- α -Lisina mutasa por el sustrato.

6. Ribonucleotido reductasa.

Un derivado de la vitamina B₁₂ se encuentra relacionado en la transformación de ribonucleótidos a 2-desoxiribonucleótidos. Los ribonucleótidos trifosfatos GTP, ITP, ATP, CTP y UTP son los sustratos de la enzima. En *E. coli* los ribonucleosidos difosfatos se utilizan como sustratos, sin embargo, no requiere de una cobamida con coenzima. La ribonucleotido reductasa tiene un peso molecular de aproximadamente 115,000 Da.

En la reacción de la reductasa, los azufres unidos a los hidrógenos se intercambian rápidamente por hidrógenos del solvente. La reacción se demuestra en la Fig 6.7

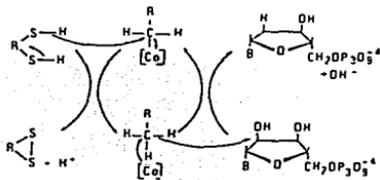


Figura 6.7 Mecanismo de acción de la Ribonucleotido Reductasa.

Para la reducción de citosina trifosfato es necesario α -(5,6-dimetilbenzimidazolil) 5-desoxiadenosilcobamida, ATP, un ditiol reductor y en ocasiones también de Mg²⁺. El ditiol debe

ser capaz de formar un ciclo intramolecular en la oxidación, por ejemplo, dihidrolipoato, la oxidación de dihidrolipoato esta estequiométricamente relacionado a la reducción del nucleotido.

Un punto interesante es que los 2-desoxiribosidos trifosfatos actúan como productores alostéricos positivos, siendo la reducción de cada trifosfato está ampliamente estimulada por diferentes 2-desoxiribonucleotidos trifosfatos, por ejemplo, dATP por CTP, dCTP por UTP, dGTP por ATP y dTTP por GTP, de todas formas, en ausencia del sustrato siempre se requiere la presencia de estos 2-desoxiribonucleosidos.

El ditiol reduce Co-5'-desoxiadensilcobalamina para dar 5'-desoxiadensina como un intermediario, la reacción es reversible aunque la velocidad es más rápida que en la de transferencia de hidrógeno del complejo 5'-desoxiadensina a el ribonucleotido.

Aunque el complejo Co(II) cobamida en presencia de dihidrolipoato y un nucleosido trifosfato ha sido demostrado en la holoenzima, se ha concluido que éste solo se forma por degradación oxidativa de Co(I) cobalamina, ya que la velocidad de formación fue mucho mas lenta que la velocidad de transferencia de hidrógeno con el solvente o la reducción del ribonucleotido (DAVIS, 1994).

7. Metionina sintetasa.

La enzima purificada de *E. coli* tiene un peso molecular de 140,000 Da. La biosíntesis de metionina comprende la transferencia de un metil de N-metiltetrahidrofolato (5-CH₃-H₄-folato) a monocisteína (Fig 6.8)

Es esencial una cobalamina y tiene como cofactor S-adenosilmetionina (SAM) un reductor flavina y 1,4-ditiotriteritol (DTT).. La metilcobalamina forma un intermediario en la reacción de metilación aunque es posible que un tiol-cobalamina este presente en la apoenzima. La función de los dos agentes metilados, 5-CH₃-H₄-folato y SAM han sido resueltos gradualmente.

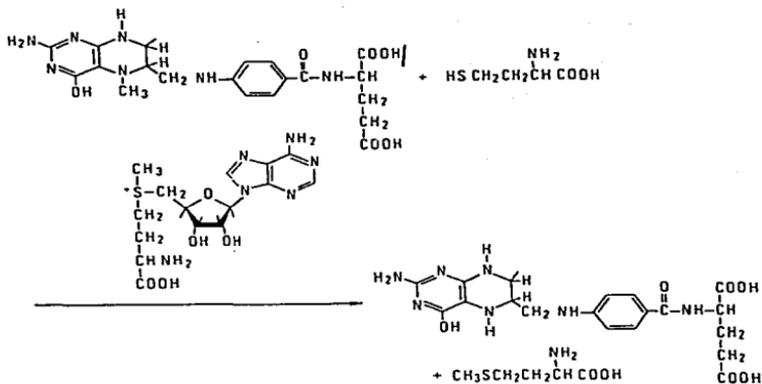


Figura 6.8 Reacción catalizada por Metionina sintetasa.

Solo cantidades catalíticas de SAM son importantes para llevar la reacción de transmetilasa y aunque se ha descrito una enzima independiente de SAM, ésta es restablecida por reacción con homocisteína en ausencia de 5-CH₃-H₄-folato o por una proteína "desmetilada".

Quizá existe una transferencia de grupos metil a la cobalamina en presencia de flavín reducida a DTT. SAM produce una metilcobalamina, la cual reacciona con la homocisteína para dar metionina y una cobalamina reducida activa. El proceso cíclico continua a menos que el intermediario activo, tal vez Co(I) cobalamina sea bloqueado por propilación o inactivado por oxidación. SAM y los reductores son necesarios para compensar esta inactivación durante la catálisis (Fig 6.9).

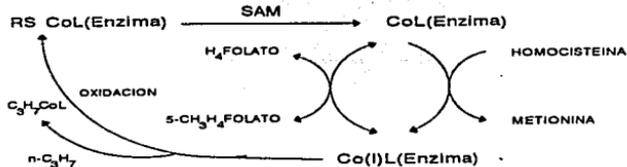


Figura 6.9 Mecanismo de acción de Metionina Sintetasa.

Algunos detalles no están claros todavía, por ejemplo, ni SAM ni $5-CH_3-H_4$ -folato reaccionan con hidroxocobalamina en presencia del sistema reductor flavin, sino en ausencia de la apoenzima. La enzima, sin embargo, se parece a la holoenzima conteniendo metilcobalamina y la velocidad de reacción se incrementa por $5-CH_3-H_4$ -folato.

8. Metano sintetasa y metil transferasa.

Algunas bacterias forman metano a partir de la descomposición anaeróbica de ciertos compuestos orgánicos como metanol y acetato. La *Methano sarcina barkeri* y la *Methanobacillus omelianskii* demuestran la formación de metano utilizando bióxido de carbono, formato, formaldehído, metanol y piruvato.

Una gran variedad de complejos caracterizados por Co-metil son convertidos en metano incluyendo metilcobalamina y α -(5-hidroxibenzimidazolil)-metil cobamida. En presencia de cantidades catalíticas de Co(II)-cobalamina algunos complejos Co-metil actúan como donadores de metilos siendo transferidos primero a la cobalamina.

Como un intermediario unido a la enzima se ha señalado a un derivado de Co-metil.

La fotólisis del corrinóide logra un producto que en EPR da una forma parecida a Co(II)cobalamina.

Comúnmente la reacción en presencia de una reductasa tal como piruvato deshidrogenasa produce la formación de metano. Sin presencia de un grupo reductor, el grupo metil puede ser transferido a Co(I)cobalamina.

El mecanismo de reducción o de transferencia no es conocido aún. Recientes evidencias sugieren que el grupo metilo es transferido a una pequeña molécula, coenzima M y entonces la reducción toma lugar.

9. Acetato sintetasa.

La reacción del bióxido de carbono para producir acetato en la *Clostridium thermoaceticum* requiere de un corrinóide, esta enzima cataliza la síntesis de complejos Co-metil corrinóides a partir de bióxido de carbono llevando a la formación de acetato. Ambos átomos de carbono del acetato provienen del bióxido de carbono. Hay pruebas que expresan un intermediario clave: α -(5-metoxibenzimidazolil)-Co-metilcobamida. Dos fracciones proteicas han sido obtenidas de la célula libre. La coenzima A, piruvato y una ferredoxina transforman metilcobalamina a acetato aunque también uno de ellos convierte carboximetil-cobalamina a acetato.

Parece que una molécula de bióxido de carbono en un derivado del H₄-folato es capaz de transferir el grupo metilo a una cobamida reducida. Esta metilcobamida podría ser carboxilada y entonces se obtiene un carboximetilcobamida la cual se reduciría para formar el acetato (Fig 6.10).

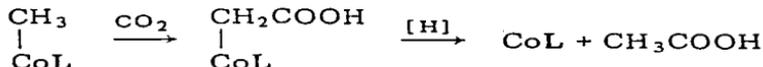


Figura 6.10 Reacción catalizada por Acetato sintetasa.

En este caso, solo dos de los hidrógenos del grupo metilo aparecerían en el acetato, solo que el hidrógeno perdido en la carboxilación fuera retenido por la proteína y usado en la reducción del complejo carboximetil.

Otra alternativa es el rompimiento heterolítico del enlace carbono-cobalto obteniendo un intermediario $\text{Co(III)}\cdots\text{CH}_3^-$. Este intermediario reacciona para dar $\text{CH}_3\text{CO-O-CoL}$ y posteriormente acetato. Es posible que en la reducción anterior, el intermediario Co metil sea un mejor donador de CH_3^- para el bióxido de carbono.

B. Cobalto en sustitución metálica de metaloenzimas.

Hay una considerable cantidad de investigaciones relacionadas con metaloenzimas sustituidas con cobalto, la principal razón de esta sustitución, por ejemplo, en enzimas que contienen Zinc, es que el cobalto es paramagnético y presenta gran sensibilidad a cambios en su geometría de coordinación, de esta manera, es frecuente encontrar algunas ventajas al remplazar el Zinc por cobalto para estudiar al sitio metálico (BERTINI, 1989).

Muchos investigadores han preparado modelos estructurales y electrónicos del sitio activo en metaloenzimas sustituidas. Tanto espectros visibles como de MCD son muy similares mientras que las estructuras por rayos x señalan pequeñas diferencias en las enzimas conteniendo Zinc y las sustituidas.

Algunas de las enzimas sustituidas con cobalto incluyen a alcohol deshidrogenasa, SOD, carboxipeptidasa y algunas otras más (SKJELDAL, 1988), inclusive se han obtenido pruebas de la unión de Cobalto (II) en el sitio de proteínas conteniendo cobre. Trabajos recientes habían sido restringidos a mediciones de UV-Vis, donde la interpretación espectral era limitada sobretodo por el espín permitido y por excitaciones de transferencia de carga. Por otra parte, estudios en CD y MCD son capaces de envolver bandas para verificar el sitio de unión del metal.

Espectroscópicamente se han caracterizado a oxidasas azules sustituidas. A partir de estos espectros es como fue obtenida la información estructural y el centro de coordinación del cobre.

PRINCIPALES REACCIONES DE ENZIMAS CON COBALTO

Metilmalonil-CoA mutasa	Transposición intramolecular de un metilo.
Glutamato mutasa	Transposición intramolecular de un metilo.
Diol deshidrasa	Transposición intramolecular de un hidroximetilo.
Etanol deaminasa	Pérdida del grupo amino y oxidación del alcohol.
L-β-Lisina mutasa	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{HPO}_4^{3-} + \text{ADP} \rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH} + \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{NH}_3 + \text{ATP}$
Metionina sintetasa	Transferecia de un grupo metilo de 5-CH ₃ -H ₄ -Folato a la monocisteína para formar metionina
Metano sintetasa y metil transferasa	Formación de metano a partir de CH ₃ OH, CH ₃ COOH o CO ₂
Acetato sintetasa	Formación de CH ₃ COO ⁻ a partir de CO ₂

VII. OTROS METALES EN ENZIMAS

OTROS METALES EN ENZIMAS.

Hoy en día el molibdeno es un metal de transición asociado ampliamente con las reacciones de NO_3^- , SO_4^{2-} , aldehídos y nitrógeno molecular dentro de los sistemas biológicos. Es aquí donde surge la hipótesis sobre la presencia de grandes cantidades de este metal en un periodo anterior, en el que el oxígeno molecular se presenta en la atmósfera. El molibdeno quizá participa en las enzimas para atacar al sustrato desde hace más de 10^9 años. Una segunda forma de encontrar molibdeno en la vida corresponde al cambio en la bioquímica del mar, es decir, en una etapa cercana a la evolución de la vida en una atmósfera reductora; este metal se encuentra en forma soluble como algunos aniones solubles de Mo/S en un estado de oxidación menor de seis.

Lo mismo sucedió con el vanadio y el tungsteno, sin embargo el primer metal podría haber estado como sólido (V_5S_4 y VS_4) o formando complejos solubles como VS^{2+} , VSSH^+ . Posteriormente, como resultado de la oxigenación progresiva de la atmósfera, los tres metales pasaron a ser oxidados y aparecen ahora en el agua salada como molibdato, vanadato y tungstato.

Cuando la vida consideró la capacidad de utilizar la luz, el nacimiento de reductores sobre la membrana se hizo necesario. La captación de luz ocurrió y el sulfuro de hidrógeno podría ser ideal debido a la reacción $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{S}^- + 2\text{H}^+ + \text{e}^-$ demostrando ser el manganeso(II) un metal necesario, sin embargo el vanadio también podría ser usado para intervenir en reacciones similares. Esta es la razón de acumulación de vanadio por especies fotosintéticas primitivas.

A). Molibdeno.

La mayoría de las enzimas que contienen molibdeno utilizan como cofactor a complejos Fe/S. Dentro de estas proteínas la xantina oxidasa, aldehído oxidasa, sulfato oxidasa y nitrato reductasa llevan a cabo la transferencia de oxígeno:



Esta reacción se logra por medio de radicales libres y de ahí la razón de usar al molibdeno; este elemento se caracteriza por el fácil rompimiento del enlace $\text{M}=\text{O}$ para dar $\text{M} + \text{O}$ produciéndose fuera del citoplasma celular. Otra propiedad es cambiar de estado de oxidación en

forma sencilla, por ejemplo de Mo(III) a Mo(IV), esto conduce a tener fuertes grupos salientes y también a que la diferencia entre los potenciales redox del metal sean muy pequeños, por ejemplo en Mo(III)/Mo(IV) hasta Mo(V)/Mo(VI) además de que los valores de estos potenciales son bajos.

Todas las enzimas que tienen molibdeno son muy grandes y complejas. Se distinguen múltiples subunidades, varios sitios de depósito, centros Fe/S y cofactores aparte del molibdeno para controlar varias reacciones, otras más necesitan de flavin adenina dinucleótido (FAD) como cofactor, las flavinas tal vez llevan reducciones ganando uno o dos electrones para formar semiquinonas y quinonas.

Los estados de oxidación del molibdeno biológicamente importantes son Mo(VI), Mo(V) y Mo(IV) mientras que los números de coordinación son para Mo(V) 5 y 6 y para Mo(VI), 4 y 6

El Mo(V) es paramagnético en sus especies y los complejos de Mo(V) son regularmente aniónicos, teniendo oxígeno, halógeno, tiocianato o cianuro como ligandos. Las especies oxo son particularmente importantes y la dimerización casi siempre ocurre a través de éstos (puentes oxo).

El Mo(VI) forma complejos aniónicos con oxígeno al mismo tiempo que hidroxocomplejos orgánicos son conocidos. El tetraedro del oxo anión MoO_4^{2-} está bien definido, sin embargo, en solución ácida se realiza la polimerización obteniéndose iones molibdato con cierta complejidad.

En los sistemas biológicos, el molibdeno está unido por medio de grupos carboxilato o hidroxilícos de los residuos tirosina o serina aunque algunos estudios indican la unión de SH de cisteína con el ion metálico (MASON, 1989).

1. Nitrogenasa.

La nitrogenasa consiste de dos proteínas llamadas componente I y componente II. El primero de ellos contiene un complejo Mo-Fe (molibdenoferrodoxina) mientras que el segundo representa una ferroproteína (azoferrodoxina). Se han propuesto los términos nitrogenasa y nitrógeno reductasa para ser usados en lugar del componente I y II respectivamente; sin embargo la nomenclatura será usada en cualquiera de las dos formas.

El componente I tiene un peso molecular de aproximadamente 220,000 Daltons y está conformado por un tetrámero con dos pares de subunidades diferentes. Hay dos átomos de

molibdeno, de 32-33 átomos de hierro no hemo y de 27-32 átomos de azufre por tetrámero. El componente II es un dímero con subunidades idénticas y con un peso molecular de alrededor de 60,000 Da. conteniendo un complejo de 4Fe-4S.

Los dos componentes son extremadamente sensibles al oxígeno, el cual los inactiva irreversiblemente y ni siquiera agentes reductores los pueden recuperar.

Estudios de EPR indican que el molibdeno es el sitio de unión del sustrato así como de la reducción. Por otra lado, se señala que tanto hierro como azufre están muy cercanos al Molibdeno en el componente I. Para la reducción de nitrógeno molecular a amoníaco se requiere como cofactores una fuente de energía tal como ATP y una fuente de electrones con bajo potencial redox.

La nitrogenasa contiene como cofactores tanto Fe/S como ATP. El centro de reacción tiene un peso molecular de 1,500 Da, demostrando un isocitrato y una composición inorgánica Fe_2MoS_8 . Aquí el hierro está unido al azufre y algunos enlaces del molibdeno son hacia el azufre. Este complejo ha conducido a varios modelos (Fig 7.1) (MILLER, 1993).

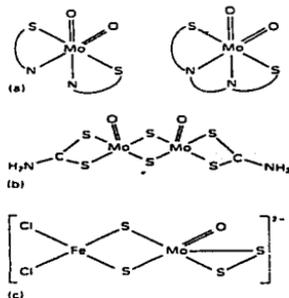
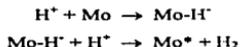


Figura 7.1 Algunos modelos del complejo (FRAUSTO, 1991).

El complejo como se mencionó anteriormente tiene al molibdeno unido a grupos tiolato, algunos de los cuales son sustituidos por oxígeno durante la reacción.

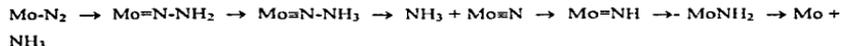
Con todos estos datos se puede creer que el sitio de reacción del nitrógeno molecular es el sitio de molibdeno. La activación de este metal es a través de la formación de un hidruro (Mo-H⁺), en la reducción del nitrógeno se observa inicialmente que una mol de hidrógeno molecular se libera:



Mo* es el estado con el que se forma la unión de nitrógeno molecular



La reacción del hidrógeno puede ser una forma de mantener la enzima libre de oxígeno molecular. La reducción de nitrógeno molecular es vista como una manera de regular los estados de oxidación del molibdeno.



Se observa también la hidrólisis de varias moléculas de ATP, parte de la energía es utilizada en mantener a las dos proteínas unidas así como para generar el estado especial Mo* y posiblemente también en la protonación y en la transferencia electrónica. Todo esto lo hace una reacción bastante compleja. Sin embargo, la fijación de nitrógeno se coloca junto con la fotosíntesis como uno de los procesos más importantes de la vida en la tierra.

Los complejos Fe/S conforman la cadena de transferencia electrónica; mientras que dos moles de ATP son consumido por cada transferencia electrónica del sustrato (MOTTNER, 1993).

Se piensa que la Ferroproteína (componente II) actúa como depósito de electrones y de ATP y que la MoFeproteína (componente I) une al nitrógeno molecular; son necesarios además cationes divalentes como Mg²⁺ para el ATP (Fig 7.2).

La reacción general es:



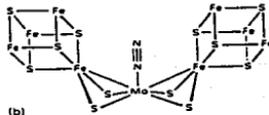
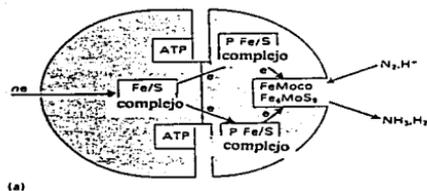


Figura 7.2 Reacciones de la nitrogenasa y estructura del complejo (FRAUSTO, 1991).

2. Xantin oxidasa

La oxidación de xantina para dar ácido úrico es catalizada por xantin oxidasa. El oxígeno adicional no proviene del oxígeno molecular sino mas bien del agua. Esta enzima es extraída de leche de vaca y contiene dos átomos de Molibdeno, dos grupos FAD y dos diferentes tipos de complejos Fe_2S_2 .

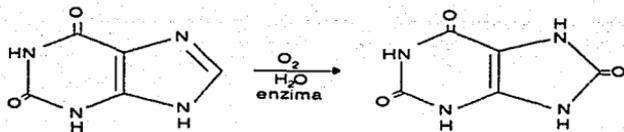


Figura 7.3 Reacción catalizada por xantina oxidasa.

La enzima está compuesta por dos subunidades, cada una presenta un átomo de molibdeno, por lo que estos dos están muy separados; está totalmente comprobado el papel del molibdeno como sitio de unión y reducción de xantina.

Durante la reacción, la enzima podría perder molibdeno o azufre espontáneamente y entonces se piensa que el molibdeno está unido por un ligando persulfuro (-S-S'). El otro molibdeno es reducido de Mo(VI) a Mo(IV) pasando por Mo(V). La reoxidación para volver a obtener Mo(VI) ocurre a través de la transferencia de dos electrones (MORIWAKI, 1993). La transferencia electrónica atraviesa por varias etapas:



En forma general, se puede observar como hay una dependencia en el pH y se señala un valor de pK de 5.8. Algunas investigaciones han sugerido que el Mo(V) (el intermediario) tiene dos protones, uno fuerte y otro débilmente unido. A partir de estos datos se puede concluir que en la reacción se ven involucrados dos electrones y al menos un protón. Por otro lado, aparecen como intermediarios especies como E-Mo=S y E-Mo=O mientras que al realizarse la protonación surgen especies E-Mo-SH y E-Mo-OH. Esto significa que el protón transferido de la posición ocho es aceptado por el complejo Mo=S.

El mecanismo propone la transferencia tanto de un protón como de un electrón al mismo tiempo que un ataque nucleofílico de unión hidróxido sobre el C-8. Los sitios redox de xantina

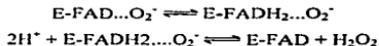
oxidasa pueden llevar simultáneamente la transferencia de seis electrones por lo que tres moles de sustrato son necesarios para la reducción completa.

Se describen por lo tanto tres etapas: adición del sustrato, transferencia electrónica y liberación del producto.

La reoxidación implica la reacción de oxígeno con FADH₂:



y la formación del superóxido; sin embargo, la cantidad de superóxido es muy pequeño y entonces:



Por lo tanto, la regeneración rápida de la enzima depende de la oxidación de FADH₂. Mientras que la reacción del oxígeno con flavina para producir el intermediario es bastante desfavorable y el potencial O₂/H₂O₂ es muy positivo y extremadamente espontáneo.

3. Xantin deshidrogenasa.

La xantin deshidrogenasa contiene el mismo número de centros redox que la xantin oxidasa. Algunos aspectos importantes de esta enzima son 1) utiliza NAD⁺ en lugar de O₂ como receptor primario oxidante 2) cantidades substanciales del radical flavina se han observado en la enzima parcialmente reducida (la producción de radical es más del doble del obtenido con oxidasa).

Los valores de los potenciales redox también son muy similares a los de xantin oxidasa, no obstante, en la xantin deshidrogenasa el potencial para la semirreacción FAD/FADH₂ es de -366 mV comparado con el valor de -245 mV de la oxidasa; esta diferencia en el potencial conduce a varios cambios. En primer lugar, la concentración de radical flavina es muy grande en la enzima parcialmente reducida por lo que los potenciales de primera y segunda adición

electrónica son iguales. por otra parte, la presencia de intermediarios es relativa. Por cada cuatro electrones ganados por la deshidrogenasa (reducción) la cantidad de molibdeno en el sitio activo como Mo(VI) es cerca del 20% del total de este metal presente en la proteína.

La incapacidad de la proteína de usar O_2 como receptor electrónico parece ser causado por la disminución del potencial $FAD/FADH_2$, particularmente si el ácido úrico permanece unido. Por lo tanto, en estas condiciones $FADH_2$ no es adecuado para reaccionar con O_2 por lo que la única especie que contiene bastantes cantidades de $FADH_2$ es la enzima totalmente reducida. Sin embargo, NAD^+ reacciona más rápidamente con la flavina totalmente reducida, y de esta forma, la actividad reductora con oxígeno podría ser expresada como reactividad reducida con NAD^+ (KARRASCH, 1990).

4. Sulfito oxidasa.

La sulfito oxidasa es muy específica para el sustrato (sulfito) pero puede reaccionar con una amplia variedad de receptores electrónicos. Con oxígeno como receptor, la desaparición del sustrato y el consumo de oxígeno molecular demuestra una cinética de segundo orden.

Se ha encontrado que la oxidación de sulfito en la mitocondria se realiza exclusivamente a través de la cadena respiratoria con una estequiometría sulfito/oxígeno de una unidad. Por consiguiente, el sulfito depende del consumo de oxígeno molecular.

Se ha propuesto la existencia de sitios de unión separados e independientes para sulfito y citocromo c sobre la enzima oxidada y conteniendo un mecanismo de tipo ping-pong.

La transformación de sulfito a sulfato es una oxidación con transferencia de dos electrones y señalando al citocromo c como el receptor fisiológico de un electrón. En consecuencia, no hay evidencia de la formación del radical sulfito en el proceso de oxidación y parece razonable concluir que la oxidación ocurre en el centro molibdeno y la reducción del citocromo c en el grupo hemo. Basado en estos datos, un ciclo de oxidación-reducción está en la Fig 7.4

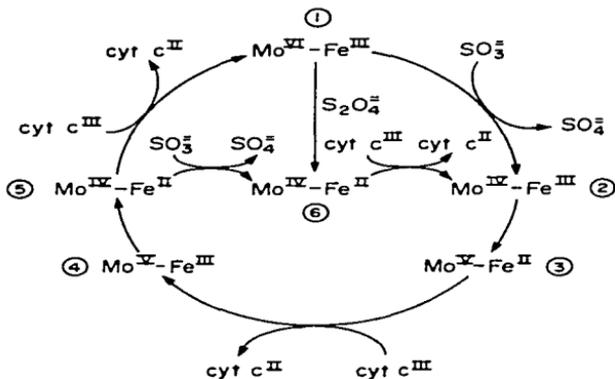


Figura 7.4 Mecanismo catalítico propuesto para sulfito oxidasa (SULLIVAN, 1993).

La reacción inicial es la conversión de sulfito o bisulfito a sulfato en el sitio hexavalente del molibdeno con átomos de oxígeno provenientes de la molécula de agua. El molibdeno es reducido al estado tetravalente. Solo el Mo(VI) es capaz de aceptar electrones del sulfito; la transferencia electrónica interna resulta de la reducción del citocromo y la formación de Mo(V). Esta transferencia se presenta del citocromo III al citocromo II e permitiendo transferir el segundo electrón desde el Mo(V) al citocromo y formándose un Mo(VI) y citocromo reducido. La enzima es oxidada totalmente por transferencia electrónica al citocromo c al mismo tiempo que podría reaccionar con otra molécula del sulfito lográndose la enzima completamente

reducida conteniendo Mo(IV) y citocromo reducido. La oxidación por citocromo c podría generar la forma dos y entonces se completa el ciclo.

El mecanismo anterior asume que la enzima dimerica contiene dos sitios reactivos independientes e idénticos; de acuerdo a este mecanismo, la sulfito oxidasa es tratada con exceso de sulfito en presencia de oxígeno molecular, conduciendo a la acumulación de la enzima reducida con especies (3) y (6), tal que el hemo esta reducido y el centro tiene los estados Mo(V) y Mo(IV). Aunque la adición anaeróbica de sulfito a la enzima podría convertir todo el molibdeno a el estado Mo(V) (SULLIVAN, 1993).

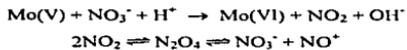
5. Nitrato reductasa.

Varias hipótesis y modelos químicos son resumidos a continuación:

a) reducción a bióxido de nitrógeno.

En este modelo, los complejos molibdeno con trifenilfosfina en un medio ambiente hidrofóbico (diclorometano) conducen a reacciones redox entre Mo(IV) y un monomérico Mo(V) (AUGIER, 1993).

El proceso conduce a la formación de NO₂ como intermediario y obteniéndose un ion nitrosonio:



El ion nitrosonio (NO⁺) reacciona extremadamente rápido oxidando a Mo(V):

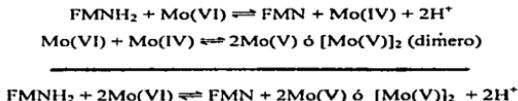


Entonces el producto final viene a ser el óxido de nitrógeno aunque también el ion nitrosonio puede reaccionar con agua o iones hidróxidos para formar nitrito

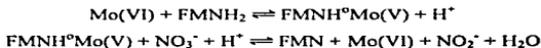


b) Modelo Molibdeno-flavina.

Esta basado en la interacción directa entre Mo y flavina, lográndose la formación de complejos. El mecanismo demuestra la transferencia de dos electrones y una reacción desproporcional:



Lo más probable es que Mo(V) se encuentre como dímero $[\text{Mo(V)}]_2$; sin embargo, se postula el monomérico debido a que se obtiene un complejo Mo(V)-FMNH^o; esta asociación entre Mo(V) y FMNH^o se presenta en presencia del citocromo b₅₅₇



En este mecanismo se observa al monomérico Mo(V), y el reparto de dos electrones entre el metal y la flavina semiquinona (AUGIER, 1993).

c) Sistema ligando nitrato-molibdeno.

El nitrato como ligando al molibdeno antes de las reacciones redox proporciona una posible base para este mecanismo; se propone un complejo bidentado de nitrato-molibdeno y para saber cual átomo de oxígeno podría ser transferido se diseñó un modelo de diferentes longitudes de enlace (Fig 7.5)

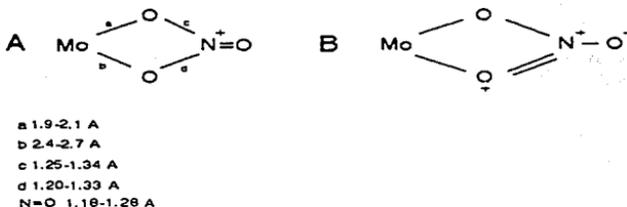


Figura 7.5 Modelo para el complejo Nitrato/Molibdeno.

La estabilidad de enlace provoca una tendencia de transición tautomérica hacia la estructura (B). La estructura B se estabiliza con la unión de oxígeno y entonces se logra obtener al complejo nitrito unidentado. El molibdeno monomérico en este mecanismo tiene un estado de oxidación de V y es más eficiente que el Mo(VI) (SILVESTRINI, 1995).

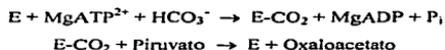
B. Manganese.

Durante el origen de la vida en la tierra, la concentración de Mn(II) fue una de las más altas en los mares, siendo de aproximadamente 50mM; por lo tanto el hierro y manganeso eran los dos metales más importantes en los procesos redox primitivos. La incorporación de hierro dentro de las porfirinas condujo a hemoproteínas y en el caso del manganeso, éste se dirigió a componentes necesarios para la fotosíntesis de algas (KHANGULOV, 1990).

Estas algas contienen más de 12 átomos de manganeso por centro de reacción. El Mn(II) es un ion con configuración electrónica de d^5 , considerándose un oxidante fuerte, aún cuando es acomplejado; debido a su poder oxidante los complejos se descomponen lentamente; no obstante, demuestra estabilidad en solución ácida como Mn^{2+} mientras que en medio alcalino se encuentra estable como MnO_2 (KHUN, 1991).

1. Piruvato carboxilasa.

La piruvato carboxilasa tiene un peso molecular de 500,000 Da y consiste de cuatro subunidades. Cada subunidad contiene un átomo de Mn^{2+} ; la reacción catalizada por esta enzima es:



E= Piruvato carboxilasa (ATWOOD, 1993).

2. SOD de manganeso.

La descripción del sitio activo de la superóxido dismutasa se muestra en la Fig 7.6

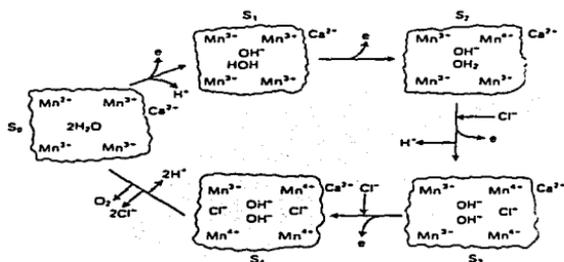


Figura 7.6 Producción de oxígeno molecular en un complejo de manganeso (FRAUSTO, 1991).

En este modelo se distinguen cuatro átomos de manganeso y una dependencia de calcio y cloro, los cuales parecen ejercer una función de control y provocar un cambio conformacional.

Aunque no se sabe con exactitud la unión del manganeso, si se pueden conocer los pasos del ciclo y por lo tanto, las reacciones en donde esta envuelto este metal.

Otra forma de control depende de la estabilidad de la unión de Mn(II) a la proteína. Cuando este metal se disocia se pierde la capacidad de captación de energía solar (STALLINGS 1985).

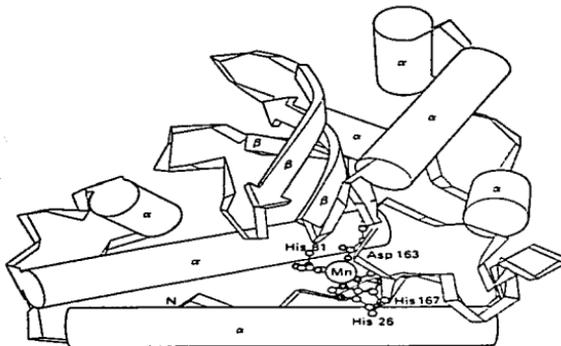


Figura 7.7 Estructura de la SOD de manganeso (FRAUSTO, 1991).

C) Tungsteno.

El tungsteno se ha reconocido como un metal biológicamente activo por varios años, aunque no se considera como uno de los 25 a 30 elementos esenciales para los organismos.

Dos enzimas de origen bacteriano se purificó y caracterizado, éstas son formato deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa.

Naturalmente el tungsteno es muy parecido al molibdeno, ambos tienen propiedades redox y químicas muy similares y en consecuencia también funciones biológicas. Los dos elementos tienden a un carácter no metálico, pueden ser retenidos por solo dos enlaces covalentes y cambian fácilmente de MO_4^{2-} al estado $\text{M}(\text{OH})_6$ a través de intermediarios pentacoordinados, a potenciales cercanos a cero viene a presentar varios estados de oxidación. La diferencia principal reside en sus tamaños, $\text{WO}_4^{2-} > \text{MoO}_4^{2-}$ y la cinética de reacción es más lenta para tungsteno, frecuentemente como un polianión.

1. Formato deshidrogenasa.

El tungsteno es un metal de transición interesante debido al papel que juega en el metabolismo anaeróbico.

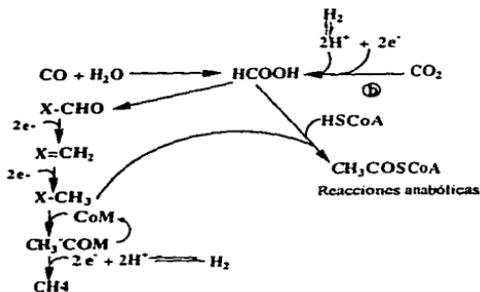


Figura 7.8 Ejemplo de una reacción con enzima conteniendo tungsteno (KENDRICK, 1992).

La formato deshidrogenasa cataliza la deshidrogenación de ácido fórmico (HCOOH) o la reducción de CO_2 , estas enzimas varían ampliamente a causa del tipo de sustrato reductor (NAD , NADP , ferredoxina, y citocromo) y al peso molecular.

Esta enzima ha sido purificada y caracterizada de la bacteria *Clostridium thermoaceticum* y *formicoaceticum*.

La formación de NADPH dentro de la formato deshidrogenasa se incrementa al contener tungsteno.

La formato deshidrogenasa dependiente de NADP contiene W/Se/Fe no hemo/S operando a muy bajos potenciales redox, cercano al potencial redox de H^+/H_2 . Aunque el molibdeno puede reemplazar al tungsteno, la actividad enzimática disminuye. Los datos experimentales proponen la posibilidad de un complejo WFeS. Donde el selenio, parece estar incorporado dentro de la subunidad α de la estructura $\alpha_2\beta_2$ de la enzima en forma de un ácido lábil selenocisteína y siendo esencial para la actividad.

La reacción catalizada parece ser:



Aunque el equilibrio está desplazado hacia CO_2 y NADPH, el CO_2 modifica las condiciones y entonces se favorece la reducción y la formación del formato (LAMZIN, 1994).

2. Aldehído deshidrogenasa.

La aldehído deshidrogenasa tiene un peso molecular de alrededor de 240 kDa y está compuesta de cuatro subunidades equivalentes. El contenido más alto de tungsteno que se ha determinado fue de 2.3 mol por mol de enzima. El metal no se encuentra fuertemente unido y puede ser liberado con pérdida de actividad (WHITE, 1989).

La reacción catalizada parece ser



lo cual no puede ser logrado químicamente en agua. Es necesario un potencial redox alto y negativo ($E^0 = -560$ mV) sin embargo, a pH 7 es de -300 mV por lo que esta dentro del rango del agua (BAKER, 1994).

D. Vanadio.

Tanto el vanadio como el molibdeno tiene muy diferentes funciones biológicas, no obstante, ambos elementos demuestran una química asociada con el oxígeno: VO_4^{2-} (MoO_4^{2-}), VO_2^+ y VO_2^+ (MoO_2^+ , MoO_2^+ y MoO_2^{2+}); estas especies son agentes oxidantes capaces de

reaccionar a través de una transferencia electrónica y actuando como donadores de oxígeno (TRACEY, 1988).

Otro punto en común es la formación de complejos con azufre como centros aniónicos: VS_4^{3-} (MoS_4^{2-}) o como centros catiónicos VS^{2+} y $VSSH^+$ ($MoOS^{2+}$) o cúmulos de tipo FeMS asociado en biología con la fijación de nitrógeno (BRAND, 1987).

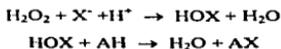
La química del vanadio es compleja y comprende estados de oxidación en un rango de -1 a +5, pero sólo el tetravalente y pentavalente son de importancia biológica. La importancia biológica de los estados de oxidación +4 y +5 viene de su relación con Mg^{2+} y con el ion fosfato. El radio iónico de VO^{2+} (estado de oxidación +4) es de 0.60 Å y se parece al Mg^{2+} (0.65 Å). El complejo pentavalente de VO^{3+} (estado de oxidación +5) es análogo al ion fosfato (KOVACS, 1987).

1. Haloperoxidasas.

En primer lugar, las peroxidasas catalizan la oxidación de una variedad de donadores, tanto orgánicos como inorgánicos con peróxido de hidrógeno y la reacción general es:



Donde AH_2 es el donador electrónico y AH^0 es el producto oxidado. Como se mencionó, las peroxidasas son capaces de oxidar donadores inorgánicos tales como haluros. El mecanismo difiere del anterior, ya que aquí, la oxidación se presenta en dos partes:



El intermediario es un ácido hipohaluro si un receptor nucleofílico está presente (AH). Los compuestos halogenados se producen (AX). A las enzimas capaces de llevar a cabo esta reacción se les nombra haloperoxidasas (MANTHEY, 1989).

Algunas haloperoxidasas son muy específicas, siendo capaces de oxidar únicamente bromo o iodo. Las bromoperoxidasas conteniendo vanadio han sido detectadas y aisladas de un número de algas de color café (*Phacophytae*) y color rojo (*Rhodophytae*). Su peso molecular es de aproximadamente 90 kDa y presenta uno o dos átomos de vanadio y una composición mayor

de ácido glutámico y aspártico; esta enzima es bastante termoestable y no reacciona fácilmente (ITOH, 1987).

Se sugiere que el sitio activo en las bromoperoxidasas consiste de un vanadato con una valencia del metal de +5 ($3d^0$) esto significa que el vanadato contiene cuatro átomos de oxígeno funcionando como donadores.

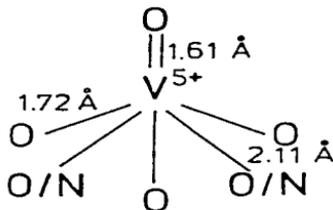


Figura 7.9 Estructura del centro activo en bromoperoxidasas con vanadio (CHASTEEN, 1992).

De esta manera, el medio ambiente del vanadio tiene ligandos oxígeno y nitrógeno; éste último elemento, se señala está en el plano ecuatorial del catión vanadio (KRENN, 1989).

Sobre bases espectrales, la enzima reducida expresa una geometría octaédrica distorsionada con dos imidazoles a 2.11 \AA en posición ecuatorial, un oxígeno a una distancia corta de 1.61 \AA y tres oxígenos a 1.72 \AA (ARBER, 1989).

Estudios cinéticos han indicado que un grupo funcional con un $pK_a=5.7$ está controlando la unión de H_2O_2 y éste fue adscrito al residuo histidina. Se ha propuesto un mecanismo en el cual H_2O_2 se une al vanadio (V) y entonces se activa formando un complejo que reacciona posteriormente con bromo para dar ácido hipobromoso. Se ha comprobado, que si el bromo reacciona primero con la enzima, resulta en una inhibición (BOER, 1988).

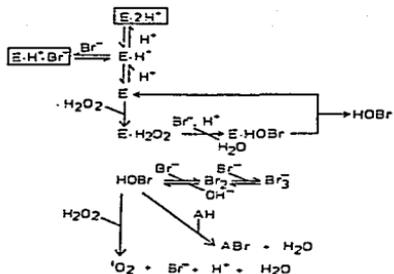


Figura 7.10 Mecanismo de acción de bromoperoxidasas con vanadio (CHASTEEN, 1992).

La Fig 7.10 indica el esquema de reacción de la brominación y la reacción competitiva de HOBr con H₂O₂ (BOER, 1988).

2. Nitrogenasa.

La transformación de nitrógeno molecular atmosférico para ser utilizado por las plantas es catalizado por la nitrogenasa. En los últimos cinco años se ha observado el papel del vanadio en la fijación del nitrógeno (DILWORTH, 1987).

Las proteínas compuestas de vanadio y hierro de la *A. chroococum* y *A. vinelandii* han sido purificadas y caracterizadas, sus propiedades son muy similares a proteínas que contienen MoFe, presentando las mismas subunidades α y β (ROBINSON, 1987).

Estudios de rayos x señalan que el vanadio es parte de un complejo VFeS, siendo constituido por 3 ± 1 átomos de azufre a 2.31 \AA , 3 ± 1 átomos de hierro a 2.75 \AA y tres átomos ligeros (oxígeno, nitrógeno) a 2.15 \AA lo cual es muy similar al molibdeno en proteínas de tipo MoFe (LINDAHL, 1987).

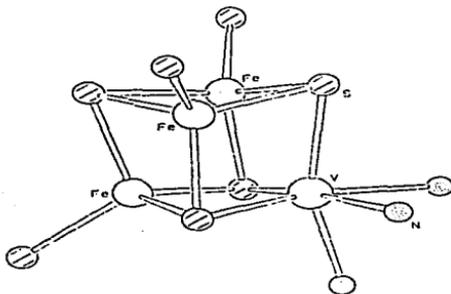


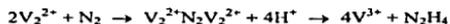
Figura 7.11 Estructura del complejo del sitio activo en nitrogenasa (KOVACS, 1986).

La enzima necesita del complejo MgATP y de un reductor de bajo potencial ($S_2O_4^{2-}$) para reducir el nitrógeno molecular, la reacción es:



El nitrógeno molecular se une al metal de transición formando un complejo estable. El sistema V(III)/V(II) es una pareja fuerte ($E^\circ = -255 \text{ mV}$) y en presencia de Mg^{2+} se forma un complejo V(II)Mg(II) que cataliza la reducción estequiométrica de nitrógeno molecular a N_2H_4 y amoníaco. Ha sido propuesto que el nitrógeno molecular se une en una forma puentecada a dos

átomos de vanadio y que el N_2H_4 aparece como un intermediario en la ruta a la formación de amoniaco.



La reducción se realiza a presión y temperatura ambiente y los productos de reducción N_2H_4 y amoniaco dependen de la cantidad de nitrógeno molecular y de la proporción de V/Mg (MORNINGSTAR, 1987).

La nitrogenasa con vanadio de la *Azobacter vienlandii*, se caracterizó hasta 1986, esta nitrogenasa contiene dos proteínas, una de las cuales demuestra un complejo MoFe y con un peso molecular de 60,000 Da, la otra proteína consiste de dos polipéptidos con un peso molecular de alrededor de 200,000 Da, (GEORGE, 1988).

La proteína mas grande muestra vanadio y hierro en una estequiometría 1:13 más precisamente dos átomos de vanadio, 23 átomos de hierro y 20 átomos lábiles de azufre por mol (ARBER, 1987).

PRINCIPALES REACCIONES DE ENZIMAS CON OTROS METALES

MOLIBDENO	
Nitrogenasa	$N_2 + 6e^- + 6H^+ \rightarrow 2NH_3$
Xantin oxidasa	Oxidación de Xantina para dar ácido úrico (Utiliza O_2)
Xantin deshidrogenasa	Oxidación de Xantina para dar ácido úrico (Utiliza NAD^+)
Sulfito oxidasa	Formación de sulfato a partir de sulfito
Nitrato reductasa	Formación de nitrato o bióxido de nitrógeno a partir de nitrato.
MANGANESO	
Piruvato carboxilasa	Piruvato \rightarrow Oxaloacetato
Superoxido dismutasa	$2O_2^{2-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
TUNGSTENO	
Formato deshidrogenasa	$HCOOH \rightarrow CO_2 + 2H^+ + 2e^-$
	$CO + H_2O \rightarrow HCOOH$
Aldehído deshidrogenasa	$RCOOH + 2H^+ \rightarrow RCHO + H_2O$
VANADIO	
Haloperoxidasas	$H_2O_2 + X^- + H^+ \rightarrow HOX + H_2O$ $HOX + AH \rightarrow H_2O + AX$ A= Compuesto orgánico X= I, Br, Cl ó F.
Nitrogenasa	$N_2 + 6e^- + 6H^+ \rightarrow 2NH_3$

VIII. DISCUSSION

DISCUSION

Los detalles de las interacciones entre los metales de transición y las enzimas han tenido muy poca atención; sin embargo, recientes investigaciones en el campo de la química bioinorgánica hace de ésta un área muy interesante y que abarca muchas disciplinas. Es importante señalar que hasta la mitad de este siglo, aproximadamente, se comprobó el contenido de los metales dentro de la enzima y ha sido en los últimos diez años cuando se conoce acerca de la estructura y los mecanismos de la metaloenzimas.

Las propiedades que tienen los metales ayudan en varias formas a la actividad de la enzima como: en la adición de sustratos a la estructura protéica, facilitan la unión al centro activo, dan estabilidad a la enzima y llegan hasta ser parte de la reacción que se produce en el sitio activo.

Como se observó en este trabajo, las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de sustrato y de reacción, de tal manera que pueden existir ciertas enzimas en diferentes sistemas biológicos como son bacterias, plantas o animales, pero su función es la misma, ya sea oxidar, transferir o hidrolizar. Esto significa que en algunas ocasiones la estructura de la enzima no cambia notoriamente de una especie a otra y por lo tanto reacciona con el mismo sustrato y produce la misma reacción.

Es importante discutir sobre la forma activa de la enzima que logra su estabilización de los sitios activos y de adición por interacción de fuerzas electrostáticas entre los diferentes residuos y el metal. De esta manera, se puede presentar la unión entre el sustrato y la enzima; ésta depende de la presencia del metal, el cual además, tiene la función de conducir la reacción enzimática.

Generalmente hay un cambio estructural a causa de los residuos que promueven la transferencia electrónica y protónica durante la catálisis; no obstante, el medio también puede

participar. El agua funciona como ácido o base, provocando el rompimiento y/o formación de enlaces con hidrógeno durante la catálisis.

Quizá el propósito de que la enzima conforme una estructura con b-hoja sea prevenir cambios estructurales muy fuertes, mientras que la estructura de a-hélice favorece la transferencia electrónica- En ocasiones, la enzima puede tener superficies hidrofóbicas y/o hidrofílicas. Estas colaboran para dar una orientación al sustrato y obtener su unión a la superficie del sitio activo.

Acerca del sitio activo, se puede mencionar que es común que se encuentre en la parte interior de la proteína, de manera que se protege de agentes (moléculas) que puedan reaccionar e inhibir a este. Por otra parte, la ventaja de tener un sitio interno mantiene la estabilidad de intermediarios o especies muy reactivas, las cuales posteriormente pasan a ser productos. El metal forma un complejo con la estructura protéica; sin embargo, estos ligandos naturales pueden facilitar el cambio de número de coordinación.

El equilibrio entre el metal y los ligandos se interpreta a través de las energías de disociación y se pueden observar que estas diferencias son muy pequeñas, por lo tanto hay una oportunidad de intercambiar los ligandos.

Los ángulos y distancias que se presentan entre el metal y sus ligandos favorecen las diferentes sutituciones y en consecuencia pueden cambiar la geometría del sitio activo. Esto significa que el sitio activo tiene cierta especificidad hacia el sustrato.

Otro punto esencial es que en general, la enzima demuestra una configuración abierta y cerrada. Esta conformación depende de varios factores como son el medio (solvente, residuos, estructura, etc.) o de las condiciones físicas (pH, temperatura, fuerza iónica). Estos factores y condiciones reflejan también en cierta forma la especificidad y actividad enzimática.

Sobre los residuos también se puede discutir y se puede decir que la sustitución de algún aminoácido contribuye a una pérdida parcial o total de la actividad de la enzima debido a que el

tamaño o volumen que ocupaba el residuo original se hace más grande o pequeño y entonces se provoca un cambio conformacional, o hasta puede haber la pérdida de especificidad por parte de la enzima.

Por lo tanto, se puede decir que el papel del metal es mantener el sitio activo con una conformación adecuada para que ocurra la reacción.

En el sitio activo de algunas enzimas se puede producir la deslocalización de carga debido a los complejos formados entre el metal y los ligandos de la proteína promoviendo básicamente la catálisis. Esto significa que la actividad biológica expresada a través de las propiedades cinéticas depende de factores como composición, número, proporción y distribución de los aminoácidos.

Otro factor importante dentro de la catálisis es el pH. El cambio de pH puede provocar la descomposición o formación de otros tipos de intermediarios. De cualquier forma, cuando la reacción tiene como condición mantenerse a un pH constante, la enzima produce una estabilidad a través del aumento o disminución de iones dentro de su medio ambiente. Otra forma de regular el pH es por medio de la presencia de residuos que tiene por objeto captar protones. A partir de esta información se puede señalar que existe un equilibrio entre el medio y la enzima, este equilibrio influye por lo tanto en la reacción enzimática.

Hasta cierto punto, la enzima mantiene mucha relación con el medio. En muchas de ellas el medio influye dentro del sitio activo, por ejemplo, es muy común que el metal tenga como ligando a una molécula de agua; esta molécula tiene una unión muy débil con el metal, sin embargo, cumple con dos funciones: 1) no permite la unión de alguna molécula que pueda causar inhibición del sitio activo y 2) estabiliza al metal. Esta molécula de agua es común encontrarla formando una unión axial con el metal.

Los diferentes números de coordinación del metal de transición lo hace una especie muy versátil sobretodo con ligandos naturales como cisteína. Cuando el número de coordinación cambia se altera su geometría y entonces contribuye a la rápida y reversible transformación del sustrato. Esto conduce a que la energía necesaria para llevar a cabo la reacción disminuya y se

favorezca la formación del producto. Cuando se produce la reacción, puede haber un cambio de geometría y hasta de su unión con el metal, por ejemplo, por un cambio de pH, por un cambio de la fuerza iónica o con variación de la temperatura, también puede encontrarse un cambio en el número de electrones debido a la pérdida o ganancia de éstos por el metal.

Frecuentemente es el quinto ligando el que actúa dentro de la catálisis de la enzima, como se mencionó anteriormente, este ligando puede ser agua o un residuo unido débilmente. Una función que además se observa con el metal es el papel de polarizar a la molécula de sustrato o incrementar la capacidad nucleofílica para que ocurra en los procesos.

Por otra parte, la temperatura es un factor muy importante, puede favorecer hasta cierto límite la actividad, esto depende de la termoestabilidad de la estructura protéica.

Dentro de la estructura protéica, algunos residuos cooperan en la reacción y no únicamente el metal. Los residuos actúan como receptores de grupos que participan al inicio, durante o al final del proceso catalítico.

La capacidad de unión entre el metal y el sustrato se ve favorecido por los valores de las constantes de equilibrio de disociación que son muy grandes y negativos.

Finalmente, se puede asegurar que los metales de transición mantienen una interacción con las enzimas a través de sus propiedades físicas y químicas. Los metales de transición llegan a controlar la reactividad e influir en las propiedades termodinámicas y cinéticas de las enzimas.

IX. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- * Algunas enzimas utilizan metales de transición como cofactor o grupo prostético activando a la enzima para llevar a cabo una reacción química dentro de los sistemas biológicos, aumentando la velocidad de reacción sin alterar el aspecto termodinámico del proceso.

- * El metal de transición no sólo actúa directamente en la reacción sino que también puede tener un papel estructural dentro del sitio activo, ayudando a estabilizar a la molécula.

- * El enlace del metal con los ligandos facilita la activación del sustrato para realizar su transformación a producto.

- * Las propiedades tanto oxidantes como reductoras de los metales favorecen los procesos de transferencia electrónica de la enzima.

- * La enzima mantiene su estabilidad gracias a los tipos de ligandos, la disposición espacial y el efecto estérico que produce el metal dentro del sitio activo.

* Cuando sucede una reacción en la enzima el metal llega a tener cambios en la longitud del enlace, en los estados de oxidación y en el número de coordinación, lo cual provoca una rápida, fácil y adecuada catálisis del sustrato.

* Los metales de transición promueven: reacciones de oxidoreducción, por radicales libres y ácido-base debido a su carácter de ácido de Lewis.

X. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

ABBOTTS, J. , SENGUPTA, D. , ZMUDZKA, B. , WIDEN, S. , NOTARIO, V. y WILSON, S. 1988. Expression of Human DNA Polymerase β in *Escherichia coli* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Biochem.* 27 (3): 901-909.

AGOSTINELLI, E. , MORPURGO, L. , WANG, C. , GIARTOSIO, A. y MONDOVI, B. 1994. Properties of Cobalt-substituted Bovine Serum Amine Oxidase. *Eur. J. Biochem.* 222: 727-732.

ALBRACHT, S. 1994. Nickel Hydrogenases: In Search of the Active Site. *Biochim. Biophys. Acta* 1188: 167-204.

ALEXANDER, R. , NAIR, S. y CHRISTIANSON, D. 1991. Engineering the Hydrophobic Pocket of Carbonic Anhydrase II. *Biochem.* 30 (46): 11064-11072.

ANANDA, P. 1993. "Biochemistry of the Elements" Vol 11 (Biochemistry of Zinc). Plenum Press, USA.

ANDERSON, M. y LINDAHL, P. 1994. Organization of Clusters and Internal Electron Pathways in CO Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*: Relevance to the Mechanism of Catalysis and Cyanide Inhibition. *Biochem.* 33 (29): 8702-8711.

ARBER, J. , DOBSON, B. , EADY, R. , STEVENS, P. , HASNAIN, S. , GARNER, C. y SMITH, B. 1987. Vanadium K-edge X-ray Absorption Spectrum of the Vfe Protein of the Vanadium Nitrogenase of *Azotobacter chroococum*. *Nature* 325: 372-374.

ARBER, J. , BOER, E. , GARNER, C. , HASNAIN, S. y WEVER, R. 1989. Vanadium K-Edge X-ray Absorption Spectroscopy of Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Biochem.* 28 (19): 7968-7973.

ASCENZI, P. , COLETTA, M. , SANTUCCI, R. , POLIZIO, F. y DESIDERI, A. 1994. Nitric oxide Binding to Ferrous Native Horse Heart Cytochrome c and to its Carboxymethylated Derivative: A Spectroscopic and Thermodynamic Study. *J. Inorg. Biochem.* 53: 273-280.

ATKINS, W. y SLIGAR, S. 1990. Tyrosine-96 as a Natural Spectroscopic Probe of the Cytochrome P-450_{cam}. *Biochem.* 29 (5): 1271-1275.

ATTWOOD, P. 1993. Locus of Action of Acetyl CoA in the Biotin-Carboxylation reaction of Pyruvate Carboxylase. *Biochem.* 32 (47): 12736-12742.

AUGIER, V. , GUIGLIARELLI, B. , ASSO, M. , BERTRAND, P. , FRIXON, C. , GIORDANO, G. , CHIPPAUX, M. y BLASCO, F. 1993. Site-Directed Mutagenesis of Conserved Cysteine residues within the β Subunit of *Escherichia coli* Nitrate Reductase. Physiological, Biochemical, and EPR Characterization of the Mutated Enzymes. *Biochem.* 32 (8): 2013-2023.

AUGIER, V. , ASSO, M. , GUIGLIARELLI, B. , MORE, C. , BERTRAND, P. , SANTINI, C. , BLASCO, F. , CHIPPAUX, M. y GIORDANO, G. 1993. Removal of the High-Potential [4Fe-4S] Center of the β -Subunit from *Escherichia coli* Nitrate Reductase. Physiological, Biochemical, and EPR Characterization of Site-Directed Mutated Enzymes. *Biochem.* 32 (19): 5099-5108.

AULD, D. , BERTINI, I. , DONAIRE, A. , MESSORI, L. y MORATAL, J. 1992. pH-Dependent Properties of Cobalt(II) Carboxypeptidase A -Inhibitor Complexes. *Biochem.* 31 (15): 3840-3846.

BAKER, H. , BROWN, R. , DOBBS, A. , BLACKWELL, L. , BUCKLEY, P. , HARDMAN, M. , HILL, J. , KITSON, K. , KITSON, T. y BAKER, E. 1994. Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Studies on Cytosolic (Class I) Aldehyde Dehydrogenase from Sheep Liver. *J. Mol. Biol.* 241: 263-264.

BANCI, L. , BERTINI, I. , GALLORI, E. , LUCHINAT, C. , PAOLETTI, F. , POLSINELLI, M. y VIEZZOLI, M. 1987. A Spectroscopic Investigation of Cobalt(II) Substituted Alkaline Phosphatase. *J. Inorg. Biochem.* 30: 77-85.

BANERJEE, R. , HARDER, S. , RAGSDALE, S. y MATTHEWS, R. 1990. Mechanism of Reductive Activation of Cobalamin-Dependent Methionine Synthase: An Electron Paramagnetic Resonance Spectroelectrochemical Study. *Biochem.* 29 (5): 1129-1135.

BARON, A. , STEVENS, C. , WILMOT, C. , SENEVIRATNES, K. , BLAKELEY, V. , DOOLEY, D. , PHILLIPS, S. , KNOWLES, P. y McPHERSON, M. 1994. Structure and Mechanism of Galactose Oxidase. *J. Biol. Chem.* 269 (40): 25095-25105.

BARR, D. y MASON, R. 1995. Mechanism of Radical Production from the reaction of Cytochrome c with Organic Hydroperoxides. *J. Biol. Chem.* **270** (21): 12709-12715.

BEINERT, H. y KENNEDY, M. 1989. Engineering of Protein Bound Iron-Sulfur Clusters. *Eur. J. Biochem.* **186**: 5-15.

BERTINI, I., LUCHINAT, C. y MONNANNI, R., ROELENS, S. y MORATAL, J. 1987. Interaction of CO₂ and Copper(II) Carbonic Anhydrase. *J. Am. Chem. Soc.* **109** (25): 7855-7856.

BERTINI, I., HIROSE, J., MESSORI, L. y MONNANNI, R. 1989. A ¹H NMR Study of Cobalt(II) Arsanilazocarboxypeptidase A. *J. Inorg. Biochem.* **35**: 225-230.

BERTINI, I., LUCHINAT, C., VIEZZOLI, M., BANCI, L., KOENIG, S., LEUNG, H. y COLEMAN, J. 1989. Copper(II) as a Probe of the Active Centers of Alkaline Phosphatase. *Inorg. Chem.* **28** (2): 352-358.

BERTINI, I., LUCHINAT, C., ROSI, M., SGAMELLOTTI, A. y TARANTELLI, F. 1990. pK_a of Zinc-Bound Water and Nucleophilicity of Hydroxo-Containing Species. Ab Initio Calculations on Model for Zinc Enzymes. *Inorg. Chem.* **29** (8): 1460-1463.

BERTINI, I., LUCHINAT, C., PIERATTELLI, R. y VILA, A. 1992. A Multinuclear Ligand NMR Investigation of Cyanide, Cyanate, and Thiocyanate Binding to Zinc and Cobalt Carbonic Anhydrase. *Inorg. Chem.* **31** (19): 3975-3979.

BERTINI, I., GRAY, M. y LIPPARD, W. 1994. "Bioinorganic Chemistry" University Science Books, USA:

BICKNELL, R., SCHÄFFER, A., BERTINI, I., LUCHINAT, C., VALLEE, B. y AULD, D. 1988. Interaction of Anions with the Active Site of Carboxipeptidase A. *Biochem.* **27** (3): 1050-1057.

BIENVENUE, E. , CHOUA, S. , LOBO-RECIO, M. , MARZIN, C. , PACHECO, P. , SETA, P. y TARRAGO, G. 1995. Structure and Superoxide Dismutase Activity of Ru(II), Cu(II), and Mn(II) Macrocyclic Complexes. *J. Inorg. Biochem.* 57: 157-168.

BOER, E. , BOON, K. y WEVER, R. 1988. Electron Paramagnetic Resonance Studies on Conformational States and Metal Ion Exchange Properties of Vanadium Bromoperoxidase. *Biochem.* 27 (5): 1629-1635.

BOER, E. y WEVER, R. 1988. The Reaction Mechanism of the Novel vanadium-Bromoperoxidase. *J. Biol. Chem.* 263 (25): 12326-12332.

BONNER, G. , LAFER, E. y SOUSA, R. 1994. Characterization of a Set of T7 RNA Polymerase Active Site Mutants. *J. Biol. Chem.* 269 (40): 25120-25127.

BRAND, S. , HAWKINS, C. y PARRY, D. 1987. Acidity and Vanadium Coordination in Vanadocytes. *Inorg. Chem.* 26 (5): 627-629.

BRAUN, H. y SCHMITZ, U. 1995. Molecular Structure of the 8 kDa Subunit of Cytochrome-c Reductase from potato and its $\Delta\psi$ -dependent Import into Isolated Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1229: 181-186.

CAI, D. y KLINMAN, J. 1994. Copper Amine Oxidase: Heterologous Expression, Purification, and Characterization of An Active Enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.* 33 (24): 7647-7653.

CASANOVA, J. , ALZUET, G. , BORRÁS, J. , TIMONEDA, J. GARCÍA-GRANDA, S. y CÁNDANO-GONZÁLEZ, I. 1994. Coordination Behavior of Sulfathiazole. Crystal Structure of Dichloro-Disulfathiazole Ethanol Cu(II) Complex. Superoxide dismutase Activity. *J. Inorg. Biochem.* 56: 65-76.

CHAN, S. y LI, P. 1990. Cytochrome c Oxidase: Understanding Nature's Design of a Proton Pump. *Biochem.* 29 (1): 1-12.

CHASTEEN, N. 1990. "Vanadium in Biological Systems" Kluwer, Netherlands.

- CHAUDHURI, M. , TONIN, P. y SRINIVASAN, P. 1992. cDNA sequence of the Small Subunit of the Hamster Ribonucleotide Reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1171: 117-121.
- CHRISTIANSON, D. , MANGANI, S. y SHOHAM, G. 1989. Binding of D-Phenylalanine and D-Tyrosine to Carboxypeptidase A. *J. Biol. Chem.* 264 (22): 12849-12852.
- COTTON, A. y WILKINSON, G. 1978. "Química Inorgánica Avanzada" Limusa, México.
- COUGHLAN, M. 1980. "Molybdenum and Molybdenum-containing Enzymes" Pergamon Press, England.
- DAVIS, R. , THELANDER, M. , MANN, G. , MANN, J. , BEHAVAN, G. , SOUCY, F. , BEAULIEU, P. LAVALLÉE, P. , GRÄSLUND, A. y THELANDER, L. 1994. Purification, Characterization, and Localization of Subunit Interaction Area of Recombinant Mouse Ribonucleotide Reductase R1 Subunit *J. Biol. Chem.* 269 (37): 23171-23176.
- DE POUPLANA, L. y FRATHERGILL-GILMORE, L. 1994. The Active Site Architecture of a Short-Chain Dehydrogenase Defined by Site-Directed Mutagenesis and Structure Modeling. *Biochem.* 33 (23): 7047-7055.
- DEVLIN, T. M. 1992. "Textbook of Biochemistry" Benjamin Cummings Pub., England.
- DILWORTH, M. , EADY, R. y ROBSON, R. 1987. Ethane Formation from Acetylene as a Potential Test for Vanadium Nitrogenase in vivo. *Nature* 327: 167-168.
- DUTTON, J. , FALLON, G. y MURRAY, K. 1988. Synthesis, Structure, ESR Spectra, and Redox Properties of (N,N'-Ethylenebis(thiosalicylideneamino)) oxovanadium(IV) and of related {S,N} Chelates of Vanadium (IV). *Inorg. Chem.* 27 (1): 34-38.
- EICHHORN, G. 1973. "Inorganic Biochemistry" Vol. I, II, III Elsevier Sci., India.
- FARVER, O. , WHERLAND, S. y PECHT, I. 1994. Intramolecular Electron Transfer in Ascorbate Oxidase Is Enhanced in the Presence of Oxygen. *J. Biol. Chem.* 269 (37): 22933-22936.

FIERKE, C. , CALDERONE, T. y KREBS, J. 1991. Functional Consequences of Engineering the Hydrophobic Pocket of Carbonic Anhydrase II. *Biochem.* 30 (46): 11054-11063.

FRANCO, R. , MOURA, Y. , LeGALL, J. , PECK, H. , HUYNH, B. y MOURA, J. 1993. Characterization of *D. desulfuricans* (ATCC27774) [NiFe] Hydrogenase EPR and Redox Properties of the Native and the Dihydrogen Reacted. *Biochim. Biophys. Acta* 1144: 302-308.

FRAUSTO DA SILVA, y J. WILLIAMS, R. 1991. "Biological Chemistry of the Elements" Clarendon Press, USA.

FROLAND, W. , DYER, D. , RADHAKRISHNAN, R. , EARHART, C. , LIPSCOMB, J. y OHLENDORF, D. 1994. Preliminary Crystallographic Analysis of Methane Mono-oxygenase Hydroxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. Mol. Biol.* 236: 379-381.

GENO, M. y HALPERN, J. 1987. Why Does Nature Not use the Porphyrin Ligand in Vitamin B₁₂. *J. Am. Chem. Soc.* 109 (4): 1238-1240.

GEORGE, G. y COYLE, C. 1988. X-ray Absorption of *Azotobacter vinelandii* Vanadium Nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* 110 (12): 4057-4059.

GUPTA, B. , KUMAR, M. y ROY, S. 1989. Halogenation of Benzyl- and (Heteroaromatic Methyl) Cobaloximes: Direct Competition between Ring Halogenation and Cobalt-Carbon Bond Cleavage. *Inorg. Chem.* 28 (1): 11-18.

HALES, B. , TRUE, A. y HOFFMAN, B. 1989. Detection of a New Signal in the EPR Spectrum of Vanadium Nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8519-8520.

HAY, B. y FINKE, R. 1987. Thermolysis of the Co-C bond in Adenosylcobins. 3. Quantification of the Axial Base Effect in Adenosylcobalamin by the Synthesis and Thermolysis of Axial Base-Free Adenosylcobinamide. Insights into the Energetics of Enzyme-Assisted Cobalt-Carbon Bond Homolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 109 (26): 8012-8018.

- HAZZARD, J. , MARCHESINI, A. , CURIR, P. y TOLLIN, G. 1994. Direct Measurement by Laser Flash Photolysis of Intramolecular Electron Transfer in the Three-electron Reduced Form of Ascorbate Oxidase from Zucchini. *Biochim. Biophys. Acta* 1208: 166-170.
- HIRASAWA, M. y KNAFF, D. 1993. The Role of Lysine and Arginine Residues at the Ferredoxin-binding Site of Spinach Glutamate Synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1144: 85-91.
- HOLLOWAY, D. y MARSH, N. 1994. Adenosylcobalamin-dependent Glutamate Mutase from *Clostridium tetanomorphum*. *J. Biol. Chem.* 269 (32): 20425-20430.
- HOWARD, J. , DAVIS, R. , MOLDENHAUER, B. , CASH, V. y DEAN, D. 1989. Fe:S Cluster Ligands Are the Only Cysteines Required for Nitrogenase Fe-Protein Activities. *J. Biol. Chem.* 264 (19): 11270-11274.
- HUANG, J. , HITT, N. y KLEINBERG, M. 1995. Stoichiometry of p22-*phox* and gp91-*phox* in Phagocyte Cytochrome b₅₅₈. *Biochem.* 34 (51): 16753-16757.
- HUHEEY, J. 1981. "Química Inorgánica" 2ª Ed. Harla, México.
- HUGHES, M. 1981. "The Inorganic Chemistry of Biological Process" John Wiley, USA.
- IMAI, Y. , FUKUDA, T. , KOMORI, M. y NAKAMURA, M. 1994. Comparison of Heme Environment at the Putative Distal region of P-450s Utilizing their External and Internal Nitrogenous Ligand Bound Forms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1207: 49-57.
- ITOH, N. , IZUMI, Y. y YAMADA, H. 1987. Characterization of Nonheme Iron and Reaction Mechanism of Bromoperoxidase in *Corallina pilulifera*. *J. Biol. Chem.* 262 (65): 11982-11985.
- ITO, N. , PHILLIPS, S. , STEVENS, C. , OGEL, Z. McPHERSON, M. , KEEN, J. , YADAV, K. y KNOWLES, P. 1991. Novel Thioether Bond Revealed by a 1.7 Å Crystal Structure of Galactose Oxidase. *Nature*, 350: 87-90.
- ITO, N. , PHILLIPS, S. , YADAV, K. y KNOWLES, P. 1994. Crystal Structure of a Free Radical Enzyme, Galactose Oxidase. *J. Mol. Biol.* 238: 794-814.

- JABRI, E. , LEE, M. , HAUSINGER, R. y KARPLUS, A. 1992. Preliminary Crystallographic Studies of Urease from Jack Bean and from *Klebsiella aerogenes*. J. Mol. Bio. 227: 934-937.
- JIANG, Y. , WILKINS, C. y DALTON, H. 1993. Activation of the Hydrolase of sMMO from *Methylococcus capsulatus* (Bath) by Hydrogen Peroxide. Biochim. Biophys. Acta 1163: 105-112.
- JIMENEZ-CERVANTES, C. , SOLANO, F. , KOBAYASHI, T. , URABE, K. , HEARING, V. , LOZANO, J. y GARCIA-BORRON, J. 1994. A New Enzymatic Function in the Melanogenic Pathway. J. Biol. Chem. 269 (27): 17993-18001.
- KALMAN, B. 1990. "Biocoordination Chemistry, Coordination Equilibria in Biologically Active Systems" Ellis Horwood, Great Britain.
- KANG, S. , SHIN, K. , HAN, Y. , YOUN, H. y HAH, Y. 1993. Purification and Characterization of an Extracellular Peroxidase from White-rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. Biochim. Biophys. Acta 1163: 158-164.
- KARRASCH, M. , BÖRNER, G. y THAUER, R. 1990. The Molybdenum cofactor of Formylmethanofuran Dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri* is a Molybdopterin Guanine Dinucleotide. FEBS Letter 274 (1): 48-52.
- KASTNER, M. y NEUBERT, D. 1994. Characterization of Cytochromes P-450 Purified from Untreated and 14C-2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin - treated Marmoset Monkeys: Identification of the Major Form as a Possible Orthologue of P-450 1A2. Biochim. Biophys. Acta 1200: 7-10.
- KENDRICK, M. , PLISHKA, M. y MAY, M. 1992. "Metals in Biological Systems" Ellis Horwood, England.
- KHANGULOV, S. , BARYNIN, V. , VOEVODSKAYA, N. y GREBENKO, A. 1990. ESR Spectroscopy of the Binuclear Clusters of Manganese Ions in the Active Center of Mn-Catalase from *Thermus thermophilus*. Biochim. Biophys. Acta 1020: 305-310.

KIM, H. y LIPSCOMB, W. 1990. Crystal Structure of the Complex of Carboxypeptidase A with a Strongly Bound Phosphonate in a New Crystalline Form: Comparison with Structure of Other Complexes. *Biochem.* 29 (23): 5546-5555.

KIM, J. y HILLE, R. 1994. Studies of the Substrate Binding to Xanthine Oxidase Using a spin-Labeled Analog. *J. Inorg. Biochem.* 55: 295-303.

KIMURA, E. , KOIKE, T. y TORIUMI, K. 1988. A Trigonal-Bipyramidal Zinc(II) Complex of a Phenol-Pendant Macrocyclic Triamine. *Inorg. Chem.* 27 (20): 3687-3688.

KIMURA, E. ,SHIOTA, T. , KOIKE, T. , SHIRO, M. y KODAMA, M. 1990. A Zinc(II) Complex of 1,5,9-Triazacyclododecane ([12]aneN₃) as a Model for Carbonic Anhydrase. *J. Am. Chem. Soc.* 112 (15): 5805-5811.

KOVACS, J. y HOLM, R. 1987. Structural Chemistry of Vanadium-Iron-Sulfur Clusters Containing the Cubane-Type [VFe₃S₄]²⁺ Core. *Inorg. Chem.* 26 (5): 711-718.

KREBS, J. y FIERKE, C. 1991. Conformational Mobility of His-64 in the Thr-200 → Ser Mutant of Human Carbonic Anhydrase II. *Biochem.* 30 (38): 9153-9159.

KRENN, B. , IZUMI, Y. , YAMADA, H. y WEVER, R. 1989. A Comparison of Different (Vanadium) Bromoperoxidases; The Bromoperoxidases from *Corallina Ptilifera* is also a Vanadium Enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 998: 63-63.

KUHN, N. , WARD, S. y LEONG, W. 1991. Sunmicromolar Manganese Dependence of Golgi Vesicular Galactosyltransferase (lactose synthetase). *Eur. J. Biochem.* 195: 243-250.

KUMAR, M. , LU, W. y RAGSDALE, W. 1994. Binding of Carbon Disulfide to the Site of Acetyl-CoA Synthesis by the Nickel-Iron-Sulfur Protein, Carbon Monoxide Dehydrogenase, from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochem.* 33 (32): 9769-9777.

LAMZIN, V. , DAUTER, Z. , POPOV, V. , HARUTYUNYAN, E. WISON, K. 1994. High Resolution Structures of Holo and Apo Formate Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* 236: 759-785.

LANCASTER, R. 1988. "The Bioinorganic Chemistry of Nickel" VCH, USA.

LED, J. y NEESGAARD, E. 1987. Paramagnetic Carbon-13 NMR Relaxation Studies on the Kinetics and Mechanism of the $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ Exchange Catalyzed by Manganese(II) Human Carbonic Anhydrase. *Biochem.* 26(1): 183-192.

LEE, D. 1977. "Biochemical Effects of Environmental Pollutants" Ann Arbor Science, USA.

LEHNINGER, A. , NELSON, D. L. y COX, M. M. 1993. "Principles of Biochemistry" Worth Publishers, USA.

LIAO, Z. , LIU, W. , LIU, J. , JIANG, Y. , SHI, J. y LIU, C. 1994. A Study on Superoxide Dismutase Activity of Some Model Compounds. *J. Inorg. Biochem.* 55: 165-174.

LIN, T. , KARAM, G. y KONIGSBERG W. 1994. Isolation, Characterization, and Kinetic Properties of Truncated Forms of T14 DNA Polymerase That Exhibit 3'-5' Exonuclease Activity *J. Biol. Chem.* 269 (30): 19286-19294.

LINDAHL, P. , TEO, B. y ORME-JOHNSON, W. 1987. EXAFS Studies of the Nitrogenase Iron Protein From *Azobacter vinelandii* *Inorg. Chem.* 26 (23): 3912-3916.

LIU, Z. y JACOB, S. 1994. Characterization of a Protein That Interacts with the Rat Ribosomal Gene Promoter and Modulates RNA Polymerase γ Transcription. *J. Biol. Chem.* 269 (24): 16618-16625.

LOEHR, T. 1989. "Physical Bioinorganic Chemistry" Vol 5 (Iron Carriers and Iron Proteins) VCH, USA.

LONTIE, R. 1984. "Copper Proteins and Copper Enzymes" Vol. I, II, III CRC, USA.

LORÖSCH, J. y HAASE, W. 1986. Cobalt(II)-Hemocyanin: A Model for the Cuprous Deoxy Protein Giving Evidence for a Bridging Ligand in the Active Site. *Biochem.* 25 (20): 5850-5857.

LUCHINAT, C. , MONNANNI, R. , ROELEN, S. , ROELEN, S. , VALLEE, B. y AULD, D. 1988. ¹³C NMR Studies of D- and L- Phenylalanine Binding to Cobalt(II) Carboxypeptidase A. *J. Inorg. Biochem.* **32**: 1-6.

LUNDELL, T. y HATAKKA, A. 1994. Participation of Mn(II) in the Catalysis of Laccase, Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase from *Phlebia radiata*. *FEBS Letter* **348**: 291-296.

LYAKINA, V. , GLEMZHA, A. , BARATOVA, L. y CHERNYAK, V. 1991. Molecular Weight, Molecular Structure, and Kinetics Characteristics of Urease from *Staphylococcus saprophyticus*. *Biochem. USSR* **56** (1): 63-69.

MATHEWS, C. K. y VAN HOLDE, K. E. 1990. "Biochemistry" Benjamin Cummings Pub., England.

MANTHEY, J. y HAGER, L. 1989. Characterization of the Catalytic Properties of Bromoperoxidase. *Biochem.* **28** (7): 3052-3057.

MARCINKEVICIENE, J. y BLANCHARD, J. 1995. Quinone Reductase Reaction Catalyzed by *Streptococcus faecalis* NADH Peroxidase. *Biochem.* **34** (20): 6621-6627.

MARTIN, P. y HAUSINGER, R. 1992. Site-directed Mutagenesis of the Active Site Cysteine in *Klebsiella aerogenes* Urease. *J. Biol. Chem.* **267** (28): 20024-20027.

MASON, J. , MULRYAN, G. , LAMAND, M. y LaFARGE, C. 1989. Behavior of (¹⁸⁵W)thioingstates Injected into Sheep and Influence of Copper: Their Fate and the Effect of the Compounds upon Plasma Copper. *J. Inorg. Biochem.* **35**: 115-126.

MEALLI, C. , SABAT, M. y MARZILLI, G. 1987. Coenzyme B₁₂ Co-C Bond Homolysis: Insights from Qualitative Molecular Orbital Theory. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 1593-1594.

MESSERSCHMIDT, A. y HUBER, R. 1990. The Blue Oxidases, Ascorbate Oxidase, Laccase and Ceruloplasmin. *Eur. J. Biochem.* **187**: 341-352.

MILLER, R. , YU, Z. y ZARKADAS, C. 1993. The Nitrogenase Proteins of *Rhizobium meliloti*: Purification and Properties of the MoFe and Fe Components. *Biochim. Biophys. Acta* 1163: 31-41.

MOCK, W. y JIU-TSAIR, T. 1988. pK Values for Active Site Residues of Carboxypeptidase A. *J. Biol. Chem.* 263 (18): 8635-8641.

MORENO, C. , MACEDO, A. , MOURA, I. , LeGALL, J. y MOURA, J. 1994. Redox Properties of *Desulfovibrio Gigas* [Fe_3S_4] and [Fe_4S_4] ferredoxins and Heterometal cubane-Type Clusters Formed Within the [Fe_3S_4] Core. Square Wave Voltammetric Studies. *J. Inorg. Biochem.* 53: 219-234.

MORIWAKI, Y. , YAMAMOTO, T. , SUDA, M. , NASAKO, Y. , TAKAHASHI, S. , AGBEDANA, O. , HADA, T. y HIGASHINO, K. 1993. Purification and Immunohistochemical Tissue Localization of Human Xanthine Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1164: 327-330.

MORNINGSTAR, J. y HALES, B. 1987. Electron Paramagnetic Resonance Study of the Vanadium-Iron Protein of Nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 6854-6855.

MOTTNER, P. , BUTZ, T. , LERF, A. , ERFKAMP, J. , SCHNEIDER, K. y MÜLLER, A. 1993. The in-vivo Identification of the MoFe Protein (FeMo cofactor) of Nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae* and of the Mo-storage Protein in *Azotobacter vinelandii* via the Nuclear Quadrupole Interaction of $^{99}Mo(\beta)^{99}Tc$. *Biochim. Biophysic. Acta* 1164: 311-318.

MOULIS, J. y DAVASSE, V. 1995. Probing the Role of Electrostatic Forces in the Interaction of *Clostridium pasterianum* Ferredoxin with Its Redox Partners. *Biochem.* 34 (51): 16781-16788.

MOURA, I. , TAVARES, P. , MOURA, J. , RAVI, N. , HUYNH, B. , LIU, M. y LeGALL, J. 1990. Purification and Characterization of Desulfoferredoxin. *J. Biol. Chem.* 265 (35): 21596-21601.

NANJO, H. , ADACHI, H. , MORIHANA, S. , MIZOGUCHI, T. , NISHIHARA, T. y TEREDA, T. 1995. Enzymatic Characterization of a Novel Bovine Liver dihydrodiol Dehydrogenase - Reaction Mechanism and Bile Acid Dehydrogenase Activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1244: 53-61.

NORDLUND, P. , SJÖBERG, B. y EKLUND, H. 1990. Three-dimensional Structure of the Free Radical Protein of Ribonucleotide Reductase. *Nature* 345: 593-598.

PALESTINI, P. , MASSERINI, M. y TETTAMANTI, G. 1994. Exposure to Galactose Oxidase of GM1 Ganglioside Molecular Species Embedded into Phospholipid Vesicles. *FEBS Letter* 350: 219-222.

PANDEY, V. , KAUSHIK N. y MODAK, M. 1994. Role of Lysine 758 of *Escherichia coli* DNA Polymerase I as Assessed by Site-directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269 (18): 13259-13265.

PLAKIDOU-DYMOCK, S. y McGIVAN, J. 1993. The Oligomeric Structure of Renal Amino-peptidase N from Bovine Brush-border Membrane Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1145: 105-112.

POUPLANA de, L. y FOTHERGILL-GILMORE, L. 1994. The Active Site Architecture of a Short-Chain Dehydrogenase Defined by Site-Directed Mutagenesis and Structure Modeling. *Biochem.* 33 (23): 7047-7055.

PURDY, D. y PARK, S. 1994. Cloning, Nucleotide Sequence and Characterization of a Gene Encoding Superoxide Dismutase from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microbiology* 140: 1203-1208.

QIU, D. , KUMAR, M. , RAGSDALE, S. y SPIRO, T. 1994. Nature's Carbonylation Catalyst: Raman Spectroscopic Evidence That Carbon Monoxide Binds to Iron, Not Nickel, in CO Dehydrogenase. *Science* 264: 817- 819.

REHDER, D. 1988. Interaction of Vanadate ($H_2VO_4^-$) with Dipeptides Investigated by ^{51}V NMR Spectroscopy. *Inorg. Chem.* 27 (23): 4312-4316.

ROBINSON, A. , DEAN, D. y BURGESS, B. 1987. Iron-Molybdenum Cofactor Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* Requires the Iron Protein of Nitrogenase. *J. Biol. Chem.* 262 (29): 14327-14332.

ROE, J. , BUTLER, A. , SCHOLLER, D. y VALENTINE, J. 1988. Differential Scanning Calorimetry of Cu,Zn-Superoxide Dismutase, the Apoprotein, and Its Zinc-Substituted Derivatives. *Biochem.* 27 (3): 950-958.

SAKURAI, T. 1993. Electron-Transfer from Cytochrome c to Ascorbate Oxidase and Its Type 2 Copper-Depleted Derivatives. *J. Inorg. Biochem.* 55: 193-202.

SARTORIUS, C. , GERBER, M. , ZEPPEZAUER, M. y DUNN, M. 1987. Active-Site Cobalt(II) Horse Liver Alcohol Dehydrogenase: Characterization of Intermediates in the Oxidation and Reduction Processes as a Function of pH. *Biochem.* 26 (3): 871-882.

SCHEPARTZ, A. y BRESLOW, R. 1987. Hydrolysis of an Amide in a Carboxypeptidase Model Using Co(III) and Bifunctional Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 109 (6): 1814-1826.

SHAO, W. , LIU, G. y TANG, W. 1995. ¹H NMR Studies of 1-Methylimidazole Complex of Cytochrome c. *J. Inorg. Biochem.* 57: 103-113.

SHINZAWA-ITOH, K. , YAMASHITA, H. y YOSHIKAWA, S. 1992. Single Crystals of Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at Fully Oxidized Resting, Fully Reduced and CO-bound Fully Reduced States Are Isomorphous with Each Other. *J. Mol. Biol.* 228: 987-990.

SIGEL, H. 1986,1987. "Metal Ions in Biological Systems" Vol. 7, 11, 12, 13 Marcel Dekker, USA.

SILVERMAN, R. y LU, X. 1994. Evidence against a Nucleophilic Mechanism for Monoamine Oxidase-Catalyzed Amine Oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 116 (9): 4129-4130.

SILVESTRINI, M. , TORDI, M. , CITRO, G. VECCHINI, P. y BRUNORI, M. 1995. Monomeric Pseudomonas aeruginosa Nitrite Reductase: Preparation, Characterization, and Kinetics Properties. *J. Inorg. Biochem.* 57: 169-181.

SKJELDAL, L. y LJONES, T. 1988. Ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*: Preparation and Properties of the Cobalt Derivative. *J. Inorg. Biochem.* 33: 227-235.

SOULIMANE, T. , GOHLKE, U. , HUBER, R. y BUSE, G. 1995. Three-dimensional Crystals of Cytochrome-c Oxidase from *Thermus thermophilus* diffracting to 3.8 Å Resolution. FEBS Letter 368: 132-134.

SPIRO, T. 1980. "Metal ion in Biology" Vol. II (Metal Ion Activation of Dioxygen) John Wiley and Sons, USA:

STALLINGS, W. , PATTRIDGE, K. , STRONG, R. y LUDWIG, M. 1985. The Structure of Manganese Superoxide Dismutase from *Thermus thermophilus* HB8 at 2.4 Å Resolution. J. Biol. Chem. 260 (30): 16424-16432.

SULLIVAN, E. , HAZZARD, J. , TOLLIN, G. y ENEMARK, J. 1993. Electron Transfer in Sulfite Oxidase: Effects of pH and Anions on Transient Kinetics. Biochem. 32 (46): 12465-12470.

SUZUKI, S. , SAKURAI, T. , SHIDARA, S. y IWASAKI, H. 1989. Spectroscopic Characterization of Cobalt(II)-Substituted *Achromobacter Pseudoazurin*: Similarity of the Metal Center in Co(II)-Pseudoazurin to those in Co(II)-Plastocyanin and Co(II)-Plantacyanin. Inorg. Chem. 28 (4): 802-804.

TOOD, M. y HAUSINGER, R. 1989. Competitive Inhibitors of *Klebsiella aerogenes* Urease. J. Biol. Chem. 264 (27): 15835-15842.

TRACEY, A. y GRESSER, M. 1988. Vanadium(V) Oxyanions. Interactions of Vanadate with Cyclic Diols and Monosaccharides. Inorg. Chem. 27 (15): 2695-2702.

TSURUTA, H. , VACHETTE, P. , SANO, T. , MOODY, M. , AMEMIYA, Y. , WAKABAYASHI, K. y KIHARA, H. 1994. Kinetics of the Quaternary Structure Change of Aspartate Transcarbamylase Triggered by Succinate, a Competitive Inhibitor. Biochem. 33 (33): 10007-10012.

WALSH, C. y ORME-JOHNSON, W. 1987. Nickel enzymes. Biochem. 26 (16): 4901-4905.

WARNCKE, K. , BABCOCK, G. , DOOLEY, D. , McGUIRL, M. y McCRACKEN, J. 1994. Structure of the Topa-semiquinone Catalytic Intermediate of Amine Oxidase as Revealed by

Magnetic Interactions with Exchangeable ^2H and ^1H Nuclei. J. Am. Chem. Soc. 116 (9): 4028-4037.

WATT, G. y REDDY, K. 1994. Formation of an all Ferrous Fe_4S_4 Cluster in the Iron Protein component of *Azotobacter vinelandii* Nitrogenase. J. Inorg. Biochem. 53: 281-294.

WERST, M. , KENNEDY, M. , BEINERT, H. , HOFFMAN, B. 1990. ^{17}O , ^1H , and ^2H Electron Nuclear Double Resonance Characterization of Solvent, Substrate, and Inhibitor Binding to the $(4\text{Fe}-4\text{S})^+$ Cluster of Aconitase. Biochem. 29 (46): 10526-10532.

WHITE, H. , STROBOL, G. , FEICH, H. y SIMON, H. 1989. Carboxylic Acid Reductase: A New Tungsten Enzyme Catalyses the Reduction of Non-activated Carboxylic Acids to Aldehydes. Eur. J. Biochem. 184: 89-96.

WIKSTRÖM, M. y BABCOCK, G. 1990. Catalytic Intermediates. Nature 348: 16-17.

WILLIAMS, R. 1991. Uncoupled and Coupled Electron Transfer Reactions. Biochim. Biophys. Acta 1058: 71-74.

WIMALASENA, K. y DHARMASENA, S. 1994. Substrate Specificity of Ascorbate Oxidase: Unexpected Similarity to the Reduction Site of Dopamine β -Monooxygenase. Biochim. Biophys. Acta 203 (3): 1471-1476.

WU, C. y LIN, W. 1995. Effects of Metal Ions on the Catalytic and Thermodynamics Properties of the Aminopeptidase Isolated from Pronase. J. Inorg. Biochem. 57: 79-89.

XAVIER, A. 1986. "Frontiers in Bioinorganic Chemistry" VCH, Germany.

YAKUNIN, A. , HALLENBECK, P. , TROSHINA, O. y GOGOTOV, I. 1993. Purification and Properties of a Bacterial-type Ferredoxin from the Nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC29413. Biochim. and Biophys. Acta 1163: 124-130.

YOUN, H. , YIM, Y. , KIM, K. , HAH, Y. y KANG, S. 1995. Spectral Characterization and Chemical Modification of Catalase-Peroxidase from *Streptomyces sp.*. J. Biol. Chem. 270 (23): 13740-13746.