

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

" CUAUTITLAN "

IMPORTANCIA DE LOS IONES Fe^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2}
 Mn^{+3} , Mo^{+3}/Mo^{+6} Y Zn^{+2} EN EL METABOLISMO

Y CRECIMIENTO BACTERIANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUINICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A N

MARIA DE LOS ANGELES CELENE BELTRAN GUERRERO

MARINA LUCIA MORALES GALICIA

REYNA JIMEREZ CARRASCO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1987.



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 está 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.

	PAGINA
TITULO	2
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCION	11
JUSTIFICACION	31
 CAPITULO I, "MECANISMO DE TRANSPORTE DE FIERRO Y MANGANESO"	
1.1 GENERALIDADES	36
1.2 SISTEMA DE TRANSPORTE DEL MANGANESO.	38
1.3 REGULACION DEL TRANSPORTE DE MANGANESO EN <i>Bacillus subtilis</i>	39
1.4 VESICULAS DE MEMBRANA SUBCELULARES	42
1.5 ANTIBIOTICOS CON ACCION INHIBIDORA	43
1.6 TRANSPORTE DE FIERRO	45
1.7 SIDEROCROMOS	46
a) Hidroxamatos	46
b) Acidos fenólicos	51
c) Biosíntesis	54
1.8 MECANISMO DE TRANSPORTE DE LOS SIDEROFOROS	56
a) <i>Bacillus megaterium</i>	57

CAPITULO II.

"SUPEROXIDO DISMUTASA"

2.1 GENERALIDADES	67
2.2 CARACTERISTICAS DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA	68
2.3 ANION SUPEROXIDO	74
2.4 TOXICIDAD DEL ANION SUPEROXIDO	76
2.5 SUPEROXIDO DISMUTASA CONTENIENDO FIERRO	78
2.6 SUPEROXIDO DISMUTASA CONTENIENDO MANGANESO	81
2.7 SUPEROXIDO DISMUTASA CONTENIENDO COBRE Y ZINC.	83
2.8 MECANISMO DE ACCION DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA CONTENIENDO COBRE Y ZINC	88

CAPITULO III.

"FOSFATASA ALCALINA"

3.1 GENERALIDADES	93
3.2 CARACTERISTICAS DE LA FOSFATASA ALCALINA	94
3.3 LOCALIZACION	95
3.4 BIOSINTESIS	96
3.5 ESTRUCTURA PRIMARIA Y SECUNDARIA DE LA FOSFATASA ALCALINA	99
3.6 ESTRUCTURA TERCIARIA Y CUATERNARIA DE LA FOSFATA SA ALCALINA	102

	PAGINA
3.7 FUNCION	103
3.8 PROPIEDADES Y SITIOS DE UNION DEL ION METALICO EN LA FOSFATASA ALCALINA	103
3.9 ESPORULACION Y FOSFATASA ALCALINA. PAPEL DEL ION MANGANESO	106
 CAPITULO IV.	
"CITOCROMOS"	
4.1 GENERALIDADES	110
4.2 MECANISMOS DE LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN PROCARIOTES	114
4.3 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES	116
4.4 DEFINICION, FUNCION Y LOCALIZACION	125
4.5 TIPOS DE CITOCROMOS	125
4.5.1 CITOCROMO c	125
4.5.2 CITOCROMO c_2	128
4.5.3 CITOCROMO c_3	132
4.5.4 CITOCROMO c' y cc'	133
4.5.5 CITOCROMO e , c_{550} , c_{551} , e_{552} , e_{555}	135
4.5.6 CITOCROMO b	136
4.5.7 CITOCROMO b_{562}	137

	PAGINA
4.5.8 CITOCROMO OXIDASA	140

CAPITULO V.

"FERREDOXINAS"

5.1 GENERALIDADES	145
5.2 CLASIFICACION Y NOMENCLATURA DE LAS FERREDOXINAS	147
5.3 CARACTERISTICAS DE LAS FERREDOXINAS	149
5.4 ESTRUCTURA, COMPOSICION Y SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LAS FERREDOXINAS	151
5.5 OTRAS PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LAS FERRE- DOXINAS	160
5.6 PAPEL DE LA FERREDOXINA EN EL METABOLISMO FERMENTA TIVO	165
5.7 PAPEL DE LA FERREDOXINA EN LA FIJACION DEL N ₂	168
5.8 PAPEL DE LA FERREDOXINA EN LA FOTOSINTESIS	170

CAPITULO VI.

"NITROGENASA"

6.1 GENERALIDADES.	174
6.2 MICROBIOLOGIA DEL SUELO	177
a) Bacterias libres (asimbióticas)	179
b) Microorganismos simbióticos	179

	PAGINA
6.3 FIJACION BIOLOGICA DEL NITROGENO	182
6.4 CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LA NITROGENASA	185
6.5 MOLIBDENO, MOLIBDOENZIMAS Y SUS CARACTERISTICAS	186
a) Cofactor fierro-molibdeno (FeMo-co)	190
b) Cofactor molibdeno (Mo-co)	190
6.6 SINTESIS DEL FeMo-Co	192
6.7 ACUMULACION DEL MOLIBDENO	193
6.8 MECANISMO DE ACCION DE LA FIJACION DEL N ₂	196
a) Nitruros	201
b) Diazina y/o hidrazina	201
 CAPITULO VII.	
"RNA-POLIMERASA-DNA-DIRIGIDA"	
7.1 GENERALIDADES	207
7.2 CARACTERISTICAS DE LA RNA POLIMERASA-DNA-DIRIGIDA	209
7.3 MECANISMO DE ACCION. SINTESIS DE DNA	211
7.4 PAPEL DEL Zn ⁺² COMO ION METALICO INTRINSECO DE LA RNA-POLIMERASA-DNA-DIRIGIDA DE <i>Escherichia coli</i>	217
CONCLUSIONES	226
BIBLIOGRAFIA	229

T I T U L O

Dadme lo que no tuve,
y es mío,
Dadme mi propia frente, mi propia altura,
que todavía busco.
Dadme mi orgullo. Y dadme mi muerte

Miguel Angel Fernández.

**"IMPORTANCIA DE LOS IONES Fe^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Mn^{+3} , Mo^{+3} /
 Mo^{+6} Y Zn^{+2} EN EL METABOLISMO Y CRECIMIENTO BACTERIANO"**

ABREVIATURAS

Las palabras no necesitan razones,
no necesitan arreos, deja los -
arreos con las bestias esclavas.
Cuando sea preciso, dí tu Palabra
Tu Palabra es tu carne y tu alma
tu Palabra es tu arma....

Miguel Angel Fernández

A	adenina
° A	amstrong
a.a.	aminoácido
ADP	adenosin difosfato
ATP	adenosin trifosfato
C	citósina
CAT.	catalasa
CCCP	m-cloro fenil carbonil cianuro hidra zona
CHO _S	carbohidratos
CN ⁻	radical cianuro
CO	monóxido de carbono
-COOH	radical carboxilo
CTP	citósina trifosfato
D	Daltons
D.C.	dicroísmo circular
D.O.R.	dispersión óptica rotatoria

DPN ⁺	difosfo piridin. nucleótido oxidado
DPNH	difosfo piridin nucleótido redu_ cido.
EXAFS	análisis de la estructura fina por absorción de rayos-X
F.A.	fósfatasa alcalina
FAD	flavin adenin dinucleótido
FADH ₂	flavin adenin dinucleótido redu_ cido.
Fd.	ferredoxinas
FLd	flavodoxinas
FMN	flavin mononucleótido
g.	gauss
G	guanina
G(+)	Gram positivos
G(-)	Gram negativo
GTP	guanosin trifosfato
H ³	tritio

H_2O_2	peróxido de hidrógeno
$HO\cdot$	ion hidróxido
HO_2	
H_1P_1P	proteína de hierro de alto potencial
Km.	constante de Michaelis menten
mV	mili-volts
N_3	azida
N_2 asa.	nitrogenasa
NAD.	nicotin-amida adenina dinucleótido.
$NADH^+$	nicotin-amida adenina dinucleótido reducido
NADPH	difosfo-piridin nucleótido (nucleótido de piridina)
NH_2-	grupo amino
nm.	nanometros
NTP	trifosfo piridin nucleótido

O_2^-	anión superóxido
O_2^{2-}	anión peróxido
OH^-	radical hidroxilo
Pi	fosfato inorgánico
P.M.	peso molecular
pO_2	presión de oxígeno
PPi	pirofosfato inorgánico
RMN	resonancia magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
RPM	resonancia paramagnética
RPE	resonancia paramagnética electr ^o nica
R-X	rayos-X
SOD	superóxido dismutasa
SOD's	superóxido dismutasas
SOD-Cu-Zn	superóxido dismutasa cobre y zinc

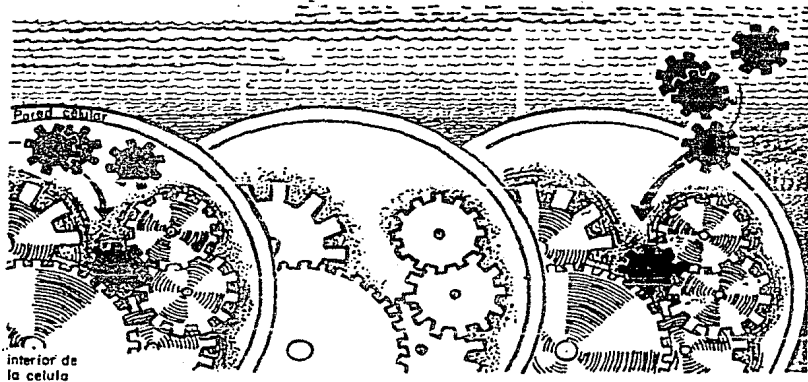
SOD-Fe	superóxido dismutasa fierro
SOD-Mn	superóxido dismutasa manganeso
T.A.	transporte activo
U.V.	luz ultra violeta
UTP	Uridin trifosfato
V.	voltios.

I N T R O D U C C I O N

The Microbe is so very small
You cannot make him out at all
But many sanguine people hope
To see him through a microscope
His jointed tongue that lies beneath
A hundred curious rows of teeth,
His seven tufted tails with lots
Of lovely pink and purple spots
On each of which a pattern stands,
Composed of forty separate bands;
His eyebrows of a tender green—
All these have never yet been seen.
But scientists who ought to know,
Assure us that they must be so,
Oh, let us never, never doubt
What nobody is sure about.

Hilaire Belloc

MEDIO DE CULTIVO



Numerosos bioquímicos durante el curso de su trabajo, llegaron a interesarse en el papel de los iones metálicos en procesos biológicos. En 1950, los químicos inorgánicos empezaron a considerar la aplicación de la Química Inorgánica a los sistemas biológicos [31].

Las últimas décadas han atestiguado un incremento explosivo en el conocimiento de los elementos químicos que son esenciales para todos los sistemas vivos [37], dicho conocimiento se encuentra comprendido en la Química Bioinorgánica [31, 37, 53, 118], la cual se dedica a estudiar la química de las reacciones que involucran a los metales esenciales y otros elementos traza en sistemas in vivo [34]. Aunque es una rama embrionaria de las Ciencias Naturales rápidamente va ganando terreno hacia un fascinante y excitante futuro [34]. La historia de la materia se remonta a los orígenes de la vida sobre la tierra, cuando la supervivencia de las especies primitivas consideraron las ventajas que ofrecían los elementos disponibles sobre la superficie de la tierra y sus propiedades respectivas [34].

Las bacterias como todo organismo vivo requieren de ciertos nutrientes para llevar a cabo su crecimiento y sus funciones normales. Estos nutrientes deben contener los elementos químicos que son constituyentes de los materiales celulares y aquéllos que son necesarios para la actividad de enzimas y sistemas de transporte, además deben proveer a los or-

ganismos con materiales para la producción de energía biológicamente utilizable [43, 80, 114]. Estos requerimientos nutricionales, de una especie, son aquellos materiales que la célula no puede sintetizar y que deben ser aportados por el medio ambiente [11, 118]. Algunos de ellos son simples sustancias inorgánicas, otros son compuestos orgánicos sencillos y en algunos casos son muy complejos. Las bacterias crecen de manera natural en ambientes con un alto contenido de agua y una amplia variedad de materiales disueltos. Los requerimientos minerales absolutos no han sido determinados y pueden variar dependiendo de la especie. Generalmente, se necesita una gran cantidad de elementos tales como: sodio, potasio, calcio, magnesio, fierro, cloro, azufre y fósforo. Todos ellos están disueltos en forma de sales. A esto se suman pequeñas cantidades de manganeso, cobre, molibdeno y otros minerales necesarios en cantidades tan ínfimas como trazas.

En la mayoría de los casos, el papel exacto de los elementos traza es aún desconocido, sin embargo, la gran mayoría de éstos sirven como componentes clave de proteínas que llevan a cabo funciones vitales. Diez de estos bioelementos y algunas de sus funciones se presentan en la tabla 1. El carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno son los constituyentes principales de compuestos orgánicos en los organismos. Los cuatro bioelementos restantes son iones metálicos que se re

quieren como cofactores para la actividad enzimática y como componentes de complejos metálicos [43].

Tabla 1 "Los 10 bioelementos principales, sus fuentes y algunas de sus funciones en microorganismos" [43].

Elemento	Fuente	Función en el metabolismo
C	compuestos orgánicos y CO ₂ .	
O	O ₂ , H ₂ O, compuestos orgánicos, CO ₂ .	constituyentes de mate
H	H ₂ , H ₂ O, compuestos orgánicos.	rial celular.
N	NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , com - puestos orgánicos.	
S	SO ₄ ⁻² , HS ⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ⁻² compuestos orgánicos sulfurados	constituyente de Cis, Met, tiamina pirofosfato, CoA, biotina y áci do α lipoico.
P	HPO ₄ ⁻²	constituyente de áci - dos nucleicos, fosfolí pidos y nucleotidos.
K	K ⁺	principal catión inor gánico en la célula, - cofactor de algunas en zimas.
Mg	Mg ⁺²	cofactor de muchas enzi mas (p.e. cinasas); pre sente en paredes celula res, membranas y fosfo esterres.

Cont.

Elemento	Fuente	Función en el metabolismo
Ca	Ca ⁺²	cofactor de enzimas, - presente en exoenzimas (amilasas, proteasas): Ca-dipicolinato es un componente importante de endosporas.
Fe	Fe ⁺² , Fe ⁺³	presente en citocromos ferredoxinas, y otras proteínas azufre-hierro, cofactor de enzimas (algunas dehidrasas).

La tabla 2 enmarca los otros elementos que la bacteria requiere en pequeñas cantidades y que arbitrariamente han sido agrupados como elementos traza o ultratrazo, debido a su baja concentración y a su resistencia a la evaluación cuantitativa. La terminología empleada para su descripción ha implicado conjeturas concernientes a su papel biológico; en otras instancias se ha basado en los problemas asociados con su concentración, detección y localización dentro de materiales biológicos, aumentando de este modo el interés para su estudio. Las designaciones de oligoelemento, micronutriente, microelemento, elemento raro y elemento menor han sido utilizadas alternativamente pero ninguna de ellas constituye una elección adecuada [11].

Tabla 2 "Elementos que la bacteria requiere en pequeñas cantidades" [43].

Elemento	Fuente	Función en el metabolismo
Zn	Zn^{+2}	presente en la alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, aldolasa, RNA y DNA polimerasas.
Mn	Mn^{+2}	presente en SOD bacteriana, cofactor de algunas enzimas (recitrato sintetasa).
Na	Na^{+}	requeridos por bacterias halofílicas.
Cl	Cl^{-}	
Mo	MoO_4^{-2}	presente en la nitrato reductasa, nitrogenasa y formato deshidrogenasa.
Se	SeO_3^{-2}	presente en la glicina reductasa y formato deshidrogenasa.
Co	Co^{+2}	presente en la CoB_{12} , contenida en enzimas (glutamato mutasa, metilmalonil-CoA mutasa).
Cu	Cu^{+2}	presente en citocromo oxidasa y oxigenasas.
W	WO_4^{-2}	presente en algunas formato deshidrogenasas.
Ni	Ni^{+2}	presente en ureasa; requeridas para el crecimiento autotrófico de bacterias hidrógeno-oxidante.

La mayoría de los elementos considerados como traza son metales de transición o bien una subdivisión de los grupos de la tabla periódica, como lo demuestra la figura I

Metales de pre-transición

Li	Be														
Na	Mg	Al	metales de transición							metales de post-transición.					
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga			
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	
Cs	Ba		Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	
Fr	Ra		104	105	106	107		109							
		La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	
		Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	

Figura 1. "Clasificación de los diferentes metales, basados en su relación a los metales de transición" [30].

Los metales de pre-transición incluyen los metales alcalinos (grupo IA), los metales alcalino-terreos (grupo IIA) y los elementos del grupo III. Los grupos más prominentes de elementos traza se observan en los metales de transición y de post-transición. Los metales de transición son aquellos cuyos subniveles d y/o f están incompletos, permitiendo una transición gradual en propiedades metálicas [53, 55, 99]. Forman complejos estables con azufre, nitrógeno, y oxígeno que son constituyentes de cadenas laterales de proteínas. El fierro, que no se considera como traza ocupa una posición -

dominante entre los metales de transición [37] como el metal de elección de numerosas enzimas en los organismos. Con excepción del titanio, todos los metales de transición del primer período (V, Cr, Mn, Fe, Co) son considerados como esenciales. Diversos metales de post-transición (Zn, Cu, Ni) son también elementos traza, ellos se caracterizan por tener sus subniveles d completamente llenos [37, 88] los cuales no participan en el enlace [20, 53, 55, 88].

Como ya se mencionó, hay un número importante de elementos traza, especialmente entre los iones metálicos de transición que han demostrado servir como cofactores requeridos para el crecimiento bacteriano a concentraciones extremadamente bajas. Se consideran esenciales porque sirven como grupos prostéticos en sitios activos y/o como coenzimas para metaloenzimas o enzimas metal-activadas. En las metaloenzimas, un número fijo de átomos metálicos específicos (generalmente fierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno, cobalto, níquel, etc.) están firmemente asociados con una proteína en particular, produciendo ambos una única función catalítica. Se ha estimado que de una cuarta a una tercera parte de todas las enzimas conocidas requieren un ion metálico como participante funcional [37, 53] y ellos se involucran en un número de diferentes tipos de reacciones biológicas.

Por el hecho de que muchos iones metálicos se encuentren enlazados a proteínas, los estudios sobre las propiedades e in

teracción ion metálico proteína adquiere importancia. De esta manera, es posible clasificar los sistemas metal-proteína bajo dos grupos [53, 34]:

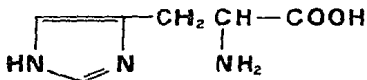
1) En un grupo, las metaloproteínas (incluyendo las metaloenzimas), en donde el metal se combina con la proteína de una forma tal, que ambos se consideran como una "entidad" - ya que se unen firmemente y el metal no puede separarse, - excepto por un ataque químico extremo. La actividad de la metaloproteína, generalmente, se pierde si el metal se reemplaza por otro [53, 34]. La utilización de métodos físicos y químicos para aislar las proteínas purificadas y homogeneizadas han permitido investigar el contenido metálico por unidad de proteína [11]. Son ejemplos, las **hierro-proteínas**, **cobre-proteínas**, **zinc-proteínas** [6], **mangano-proteínas** y **molibdo-proteínas**.

2) Un segundo grupo, en el cual la proteína se combina reversiblemente con el ion metálico [53, 11, 34], está constituido por las proteínas metal-activadas o complejos metal-proteína cuya unión con el metal es débil y diversos metales pueden activar a la misma enzima [34].

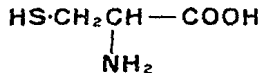
Para las metaloproteínas (y metaloenzimas) la relación del metal a la proteína tiende a ser constante conforme la pureza del sistema se incrementa, finalmente, llegando a ser independiente de purificaciones posteriores. La relación estequiométrica del metal a la molécula de proteína puede

variar desde un mol de ion metálico por mol de proteína [53].

El enlace de los metales en las metaloproteínas es una cuestión difícil de resolver con certeza, hay muchos sitios donadores alternativos: los péptidos de cadenas laterales y los grupos $-NH_2$ y $-COOH$ terminales. Por lo tanto, es razonable suponer que ciertos grupos tendrán particularmente un aumento en las propiedades básicas tendiendo a dominar la competencia entre varios sitios de enlace potencial. Dos a.a. que tienen tales propiedades de enlace son la His, a través de su anillo imidazol, y la Cys, a través de grupo tiol.



Histidina



Cisteina

Hay muchos sitios donadores potenciales. pero el catión debe unirse bastante fuerte a sitios particulares y sólo debilmente a otros sitios para evitar que se formen numerosos compuestos de coordinación [53]. Diferentes iones metálicos no necesariamente se enlazan a los mismos grupos ligantes en la proteína. La tabla 3 explica esta cuestión.

Tabla 3 "Preferencia de grupos ligantes por iones metálicos" [53].

Metal	Grupos ligantes
Mn ⁺²	carboxilato, fosfato, donadores de nitrógeno.
Fe ⁺²	-SH, -NH ₂ carboxilato.
Fe ⁺³	carboxilato, tirosina, -NH ₂ , porfirina (cuatro donadores fuertes de nitrógeno).
Zn ⁺²	imidazol, cisteína.
Mo ⁺²	-SH.
Cu ⁺	-SH (cisteína).
Cu ⁺²	aminas carboxilatos.

Por otro lado, se han realizado estudios sobre el papel del metal en los sistemas metal-proteína revelando que los iones metálicos pueden actuar de la siguiente manera [53]:

- a) Como disparadores y mecanismo de control.
- b) Como un contexto estructural, incluyendo reacciones "templadas".
- c) Como ácidos de Lewis.
- d) Como catalizadores redox.

a) Disparadores y mecanismos de control:

Los cationes sodio, potasio, magnesio, y calcio están asociados a varios mecanismos disparadores y de control. El

calcio es particularmente importante en el control de la permeabilidad de membranas, las que pasan a ser porosas en su ausencia.

b) Influencia estructural.

La formación de complejos con iones metálicos puede estabilizar ciertas configuraciones proteicas y así afectar las propiedades físicas y biológicas de la proteína. Los iones metálicos también afectan la estructura y función de los ácidos nucleicos y nucleótidos por estabilización de la estructura y por su papel en el enrollamiento y desenrollamiento de la doble hélice.

Los iones metálicos: calcio, magnesio y manganeso pueden influir en el equilibrio entre una proteína nativa y una reversiblemente desnaturalizada. La formación del complejo con un metal puede ser necesaria para mantener juntas ciertas partes de la cadena proteica, las cuales podrían estar normalmente alejadas en la proteína libre y construir así un sitio activo.

La función más simple de un ion metálico es servir de plantilla para el acoplamiento de los grupos reaccionantes en la orientación correcta para la reacción. En este caso, el metal puede ser enlazado por la proteína y el sustrato, por la proteína ó sólo por el sustrato. El uso de iones metálicos como plantillas en la síntesis de ciertos complejos orgánicos se ha demostrado.

Si los iones metálicos como cofactores en reacciones enzimáticas tienen este tipo de papel, entonces serían necesarios para comprender la especificidad del ion metálico en términos de la estequiometría de compuestos modelo no enzimáticos y la fuerza de enlace de diferentes metales por ciertos grupos químicos. La semejanza entre el magnesio y el manganeso, ambos activadores enzimáticos, puede ser comprendido sobre estas bases.

c) Comportamiento como ácido de Lewis.

Los iones metálicos pueden aceptar pares de electrones y reaccionar como ácidos de Lewis. Diferentes iones metálicos tienen varias fuerzas como ácidos de Lewis, las cuales pueden incrementarse con la carga del metal y decrecer con el radio iónico. Para los metales de transición otros factores son también importantes, y así para una serie de iones divalentes generalmente se mantiene el siguiente orden:

manganeso hierro cobalto níquel cobre zinc

este orden de actividad se observa para las reacciones de muchos compuestos modelo que involucran ácidos de Lewis catalizados por iones metálicos, pero no se mantiene completamente para los iones metálicos catalizadores de ciertas reacciones enzimáticas.

El mecanismo de acción de los iones metálicos, es el de catalizadores ácidos en general, pero difiere de la catálisis de protones en que: 1) el ion metálico puede coordinarse a

diversos ligantes simultáneamente y, 2) en que la catálisis por iones metálicos es posible en intervalos de pH donde la catálisis por protones no se llevaría a cabo.

El zinc y el cobalto son buenos ejemplos de catalizadores - como ácidos fuertes de Lewis: en la hidrólisis de fosfatos (por fosfatasa) y ésteres (por esterasa). También se sabe que el cobre y el zinc están como grupos prostéticos de - ciertos pigmentos, enzimas oxidantes y otras sustancias. - Por otra parte, el zinc es esencial en cantidades traza para el desarrollo normal de plantas, animales y microorganismos. La mayoría del trabajo sobre microorganismos se ha hecho con mohos y algas (especies *Chlorella*). En el moho, el zinc es esencial para el óptimo crecimiento de especies como *Phycomyces blakesleeanus*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus nigricans* [51, 111]. Valle y colaboradores [111], afirman - que el zinc se encuentra en ciertas deshidrogenasas. Por - otro lado, el magnesio, el calcio y el manganeso son buenos catalizadores para sustancias que involucran centros básicos débiles, tales como los polifosfatos [51, 111].

Los experimentos de Peterson y Ricker [51], concluyen que - el manganeso estimula el desarrollo de *Phytomonas tumefaciens*; y la velocidad de crecimiento de *Lactobacillus casei* para este último, el crecimiento y la producción de ácido - llegan a ser completas de 12 a 16 horas en presencia del - manganeso, pero en ausencia del metal se requieren de 40 hg

ras de incubación para obtener los mismos resultados. Las sales de manganeso en pequeñas cantidades tienen un efecto benéfico sobre el proceso de amonificación y nitrificación en el suelo. Este elemento, también, estimula el crecimiento y desarrollo de ciertas levaduras, producción de condados y la formación de color por algunas algas. La importancia del manganeso en la nutrición de plantas y animales hasta la fecha se sigue discutiendo [1].

Ahora bien, la oxidación bacteriana del manganeso ocurre tanto en el suelo como en el fondo del mar, donde la actividad microbiana ha sido implicada en la formación de nódulos de ferromanganeso. Dicho elemento es esencial para la actividad de muchas enzimas degradativas, un ejemplo prevalente, es el caso de la SOD.

d) Comportamiento redox.

En las reacciones redox el cambio de valencia en el ion metálico cataliza los cambios en los sustratos, tal como en el ciclo del nitrógeno. Aquí la especificidad de la enzima por el metal tiende a ser mucho mayor. Los iones metálicos de transición se involucran en una amplia gama de funciones catalíticas. Una característica de estas metaloenzimas redox es la irregular estereoquímica asociada con el metal. Esto es muy importante para explicar su función. Los potenciales redox de los iones metálicos en estas metaloenzimas son de interés y pueden estar relacionados a la irregularidad del entorno del metal.

Los metales más importantes en los procesos redox son el **hierro**, **cobre**, **cobalto** y el **molibdeno** involucrado en menor grado. Los procesos varían desde transportadores de electrones hasta incorporadores de hidrógeno a átomos de oxígeno y a grupos hidroxilo.

El **cobre** y el **hierro** están involucrados en procesos respiratorios. El **hierro** es un componente de varios citocromos, peroxidasas y catalasa (enzimas porfirínicas). La **ferredoxina** es una proteína con hierro no hemo de considerable importancia. Se ha encontrado que el aceptor inicial de electrones de la molécula de clorofila fotoactivada es este metal. Por otro lado, se ha confirmado que una deficiencia de hierro causa anemia en animales, clorosis en plantas y un pobre crecimiento y metabolismo de muchos microorganismos. Como consecuencia de los estudios de Reed y Rice, se sabe que el hierro es esencial para muchas bacterias, ejemplo de ellas son: *Mycobacterium tuberculosis*, *Phytomonas tumefaciens* y *Corynebacterium diphtheriae*; Jhonson y Pappenheimer, notificaron que la producción de toxina por este último es controlada por la concentración de hierro en el medio de cultivo. Bacterias heterotróficas como: *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Aerobacter indolegenes* y *Klebsiella pneumoniae* [1] requieren una concentración de hierro aproximadamente de 0.02 a 0.03 p.p.m. Para su máximo crecimiento, *Pseudomonas aeruginosa* requiere cuatro veces más esa cantidad y --

Serratia marcescens. requiere todavía mayor cantidad y la --
producción del pigmento está asociado con la concentración --
de fierro [81, 101].

Se ha observado por algunos investigadores que tanto en --
Escherichia coli como en *Aerobacter indologenes*, una defi --
ciencia de fierro en el medio de cultivo suprime la activi --
dad de la CAT, peroxidasa, hidrogenilasa fórmica, dehidroge --
nasa fórmica e hidrogenasa, y las bandas de citocromos no --
son visibles en las células deficientes de fierro.

Por otro lado, se sabe que las levaduras aparentemente re --
quieren fierro para su crecimiento normal, y este elemento --
es esencial para el crecimiento y formación de esporas de --
Aspergillus niger y otros hongos. Algunos hongos formadores
de ácido cítrico y ácido fumárico son estimulados por sales
de fierro. Varios complejos orgánicos de fierro, tales como
hemin, CAT, y citocromos, también juegan un papel importante
en el metabolismo normal de bacterias y otras células. [81, -
101].

Ahora bien, con respecto al cobre se sabe que ciertas concen --
traciones de sales de este metal alargan la fase log de *Azo --*
tobacter agilis. El desarrollo de levaduras parece ser sensi --
ble al cobre, inclusive pequeñas cantidades disminuyen su --
crecimiento. Sin embargo, en *Aspergillus niger* pequeñas can --
tidades de fierro influyen en el crecimiento y formación de

pigmento. De hecho el color de las esporas de este hongo, -- puede ser usado como un indicador para probar la presencia - de cobre en suelos y otras sustancias. Una pequeña cantidad de cobre tal como 0.66 $\mu\text{g/ml}$ de solución de nutriente permi te el color normal de la espora [81, 101, 111].

Por último el molibdeno se involucra en diferentes enzimas redox y su función se asocia con la reducción del nitrato en el ciclo del nitrógeno. También se sabe que es necesario para la fijación de nitrógeno en los nódulos de las raíces de plantas.

De acuerdo a lo anterior para algunos iones metálicos ya ha sido bien definida su función en procesos biológicos, lo cual se ilustra en la siguiente tabla.[83].

Tabla 4 "Algunos papeles de iones metálicos en procesos biológicos" [83].

Ion metálico	Papel	Fuerza de unión metálica.
Zn^{+2}	Acido fuerte de Lewis en enzimas hidrolíticas.	fuerte
Fe, Co, Cu, Mo	Catalizadores redox	muy fuerte

Debe enfatizarse que no se debe de intentar limitar el comportamiento de cualquier ion metálico a uno de estos papeles en una reacción enzimática [111].

Ventajas asociadas con la presencia de un ion metálico de transición en las proteínas.

La presencia de un ion metálico de transición en una metaloenzima, permite la aplicación de numerosas técnicas físicas. Así el zinc puede ser reemplazado por el cobalto y, el magnesio por el manganeso. En este caso, el nuevo ion metálico probablemente ocupe un sitio similar al del metal original.

La presencia de un metal de transición con orbitales d no llenos, permite que las técnicas estándar de la química de los metales de transición puedan ser aplicadas al problema de la simetría del sitio y el tipo de grupos de enlace utilizados. Estas son las técnicas de magnetoquímica (RPE, RMN y espectroscopía de Mössbauer) y espectro electrónico, junto con otras técnicas espectroscópicas especializadas: la espectrofotometría, espectrografía, polarografía, D.O.R. y D.C. Además, otras técnicas electroquímicas como los R-X, la separación por cromatografía, el intercambio iónico y los métodos de isótopos, incluyendo el análisis de activación de neutrones, son ejemplos de métodos comúnmente empleados y que se han desarrollado con un alto grado de perfección.

La espectroscopía de emisión toma un lugar especial, sin em
bargo, sus principios y aplicaciones no han recibido la -
atención meritoria como una herramienta en el estudio de -
las proteínas [111].

JUSTIFICACION

El que canta canciones al corazón
afligido,
Es como el que quita la ropa en -
tiempo de frío, ó el que sobre el
jabón echa vinagre.
Si el que te aborrece tuviere hambre
dale de comer pan;
Y si tuviere sed, dale de beber agua..

Proverbios 25 (20-21)

Una de las causas que nos motivaron a la realización del presente ejercicio bibliográfico, fué en principio, el desconocimiento de lo que es la Bioinorgánica sus perspectivas, proyectos, avances y fronteras. Si se considera que este desconocimiento proviene de la falta de difusión de dicha área en las Ciencias Químico Biológicas a nivel profesional y científico, es pues, la finalidad de este trabajo, introducir al lector en esta disciplina en desarrollo, tratando uno de los múltiples aspectos que abarca la misma como una herramienta más en las áreas de Microbiología y Bioquímica, es decir, se recopilaron todos aquéllos datos que hasta ahora se conocen referentes a la importancia e influencia de los iones metálicos en diversos caminos metabólicos de sistemas biológicos.

La mayoría de los reportes en esta área se enfocan ampliamente hacia seres humanos y poco se conoce de ello en bacterias donde se sabe su intervención también es relevante e indispensable.

Considerando lo anterior, el objetivo fundamental de esta revisión bibliográfica es el siguiente:

Analizar la importancia de algunos iones metálicos en el metabolismo y crecimiento bacteriano.

Los puntos a desarrollar se plantean a continuación:

1.- Mecanismos de transporte de iones fierro y manganeso como una necesidad de éstos para llevar a cabo procesos metabólicos de interés.

2.- Interacción de iones fierro, manganeso, cobre y zinc en la superóxido dismutasa como un mecanismo de defensa de la bacteria contra la toxicidad del ion superóxido.

3.- Importancia de los iones manganeso y zinc en la fosfatasa alcalina de algunos microorganismos.

4.- Importancia del ion fierro dentro de las ferredoxinas y citocromos, moléculas transportadoras de electrones.

5.- Interacción de los iones fierro y molibdeno en la nitrogenasa de algunas bacterias fijadoras de N_2 .

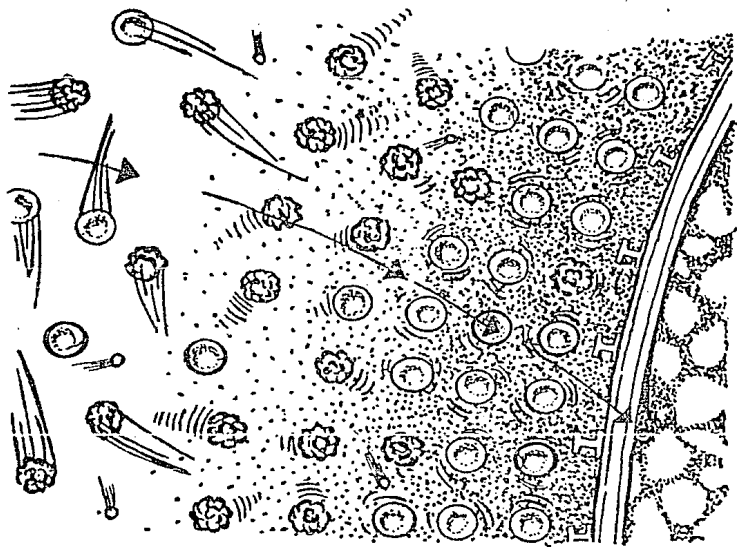
6.- Papel del zinc como ión metálico intrínseco en la RNA-polimerasa-DNA-dirigida.

CAPITULO I.

MECANISMOS DE TRANSPORTE
DE FIERRO Y MANGANESO

Time is the best appreciator of scientific work, and I know that an industrial discovery rarely bears all its fruits in the hands of its first inventor.

Louis Pasteur (1876).



I.1 GENERALIDADES

Todos los microorganismos poseen una barrera que conserva su integridad y limita la entrada y salida de solutos. A esta barrera se le denomina "barrera osmótica" y reside en la membrana plasmática lipoproteica. Sin embargo, esta membrana no constituye la única barrera para el paso de los compuestos desde el medio ambiente al interior del microorganismo ya que los solutos tienen también que atravesar la pared celular y las capas extramurales (cápsulas y capas mucosas) [84,88]

Una molécula de soluto sólo puede atravesar la membrana lipoproteica si se ejerce una fuerza impulsora sobre ella y si existe algún medio que le permita pasar a través de la membrana. La mayoría de solutos que atraviesan esta membrana microbiana lo hacen por medio de mecanismos de transporte que se clasifican en la siguiente manera:

1) Difusión facilitada:

En este caso, las sustancias cruzan la membrana plasmática, el soluto se combina reversiblemente con una proteína de transporte específica en la membrana llamada permeasa y el complejo soluto-portador oscila entre la superficie externa e interna de la misma, desprendiendo y ligando solutos en ambos lados.

2) Difusión pasiva o simple:

En este proceso el soluto cruza la membrana como resultado

de un movimiento al azar de las moléculas y no interactúa específicamente con algunas sustancias moleculares en la membrana [80].

3) Transporte activo:

El soluto se acumula frente a un gradiente osmótico o electromecánico a expensas de energía metabólica, las moléculas del soluto no se alteran en el transcurso de uno a otro lado de la membrana [84, 80].

4) Translocación de grupos:

Este transporte se diferencia de la difusión facilitada y del transporte activo en que el soluto se modifica químicamente durante el proceso de transporte. Las moléculas transportadoras se comportan como enzimas catalizando las reacciones de transferencia de grupos y utilizando el soluto como un sustrato [84].

En realidad la mayoría de solutos como azúcares, a.a., péptidos, iones y nucleósidos, no penetran en la célula bacteriana por el mecanismo de difusión pasiva, sino por el transporte activo que se localiza en la membrana plasmática. [8, 80, 88]

I.2 SISTEMAS DE TRANSPORTE DE MANGANESO

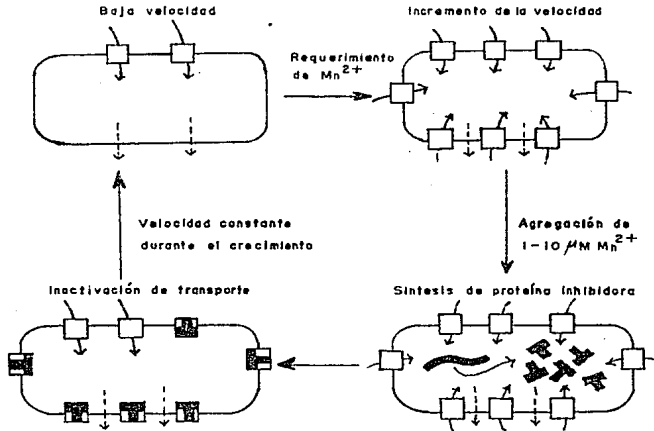
Investigaciones realizadas en 1970, afirman que el sistema de transporte de Mn en algunos microorganismos tales como: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Rhodospseudomona capsulata*, *Staphylococcus aureus* y *Euglena gracilis* es altamente específico, ya que dicho sistema fa cilita la entrada del Mn [7,8,9,10]. Es decir el sistema de transporte de *Escherichia coli* presenta alta afinidad y espe cificidad por el Mn, por lo tanto la presencia de iones tales como: Mg^{+2} , Ca^{+2} , Li^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{+2} no le afectan, debido a que no son sustratos de alta afinidad para su trans porte. Por el contrario, el Fe^{+2} y el Co^{+2} son inhibidores competitivos de la captación del Mn, por lo que seguramente son sustratos para el mismo sistema [8,9,10] se sabe también que este sistema de transporte es dependiente de energía y se inhibe por desacoplantes como el dinitrofenol y CCCP. Así mismo el formaldehído es un agente que sella la superficie celular e inactiva el sistema de transporte, de tal manera que ya no puede haber un intercambio con Mn [7,8,9,10].

Por otro lado algunos investigadores demostraron la presen cia de sistemas de co-transporte (citrato inducible) [10] como: citrato-Mn el cual puede quelarse con la tetraciclina y de este modo ser una posible ruta para la acumulación de Mn bacteriano. Para que se lleve a cabo la captación de este antibiótico se requiere la presencia de cationes tales como el Mg^{+2} e inclusive el mismo Mn [10].

I.3 REGULACION DEL TRANSPORTE DEL MANGANESO EN *Bacillus subtilis*

En un estudio enfocado al sistema que regula el transporte del Mn en *Bacillus subtilis* se observó que la captación de este ion es dependiente de la temperatura y no se afecta en presencia de Mg^{+2} y Ca^{+2} [8,88,90].

La velocidad máxima del transporte de Mn^{+2} intracelular, se incrementa durante el requerimiento de éste sin que haya algún cambio en la K_m , lo cual se debe al transporte adicional del Mn extracelular a la membrana como se demuestra en el siguiente esquema (I.3.a.):



Esquema I.3.a. "Modelo para la regulación del transporte de Mn^{+2} , durante el ciclo de requerimiento del Mn^{+2} seguido de una adición del Mn extracelular" [90].

De acuerdo al esquema anterior, se llegaron a proponer las siguientes posibilidades para la relación entre el sistema de captación y salida del Mn^{+2} :

- 1) Probablemente la captación del Mn^{+2} y la salida de éste ocurre por sistemas físicamente diferentes.
- 2) Si el mismo sistema está funcionando en ambas direcciones, y si la velocidad máxima disminuye en proporción al cambio de la velocidad de entrada, entonces la K_m de salida debe reducirse para dar valores constantes en un ciclo regulador.
- 3) La última posibilidad, es que sea un simple sistema operativo en ambas direcciones por lo cual se propone la presencia de una proteína que regule la entrada del Mn^{+2} , lo cual implica una disminución en la velocidad máxima para la captación durante el ciclo regulador.

Por otra parte se observó que, tanto los inhibidores de síntesis de RNA, como de proteínas, impidieron la reducción en la velocidad máxima para el transporte del Mn^{+2} ya que éstos fueron agregados durante el ciclo de acumulación y liberación del mismo, dando como consecuencia el bloqueo total del Mn^{+2} intracelular [89,90] también hay un inhibidor específico de la proteína para la traslación del Mn^{+2} , para lo cual se proponen dos alternativas:

- 1) Puede ser que éste se una a la proteasa, destruyendo parte del sistema de transporte del Mn^{+2} .
- 2) También se propone, que el inhibidor específico se pudie

ra unir al sistema de transporte de Mn^{+2} en relación 1:1 de tal manera que se logre inactivar la función del transporte.

Estudios recientes de Clark y Scribner [89] indicaron que existe un estimulador para el transporte del Mn^{+2} , cuyas características se enlistan a continuación:

- A) Polipéptido
- B) P.M. aproximadamente de 1500 D.
- C) Altamente específico para el Mn^{+2}
- D) Termoestable
- E) Se sintetiza bajo condiciones tanto esporulantes como no esporulantes.

I.4 VESICULAS DE MEMBRANA SUBCELULARES

Se idearon técnicas sencillas para la obtención de vesículas de membrana de las bacterias quedando éstas desprovistas de los constituyentes citoplásmicos de la célula intacta y sus actividades metabólicas restringidas a las que proporcionan enzimas de membrana [87,88]. Ahora bien, en estos estudios se encontró que la energía requerida para la acumulación del Mn^{+2} por vesículas de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* no la proporciona ni el ATP ni el proceso de fosforilación oxidativa, sino que dicha energía la reciben por medio del ascorbato, D-lactato, fenazinmetasulfato y $NADH^{+}$ [7,8,88,89] suponiendo entonces que esta energía es necesaria para que se lleven a cabo tanto los procesos de acumulación como los de captación del Mn^{+2} . En el primer caso, el Mn^{+2} que se acumula se puede liberar de las vesículas por agentes lipoactivos (p. ej. tolueno) y por lo tanto ocurre un intercambio con el Mn^{+2} extracelular [7]. Este proceso se inhibe por la acción de algunos venenos como son: Dinitrofenol, CCCP, nigericina y valinomicina. En cuanto a la captación del Mn^{+2} y para que el sistema sea más específico se requiere de la presencia del Ca^{+2} y Mg^{+2} [7,8,88] ya que estos iones actúan como estabilizadores en las vesículas, sin embargo, dicho sistema se inhibe por la acción del CN^{-} , CCCP, p-hidroximercurilbenzoato y algunos antibióticos como la valinomicina y gramicidina.

I.5 ANTIBIOTICOS CON ACCION INHIBIDORA

Se aislaron e identificaron un gran número de sustancias antibióticas que son capaces de inducir el paso de iones específicos a través de las membranas [70]. Una de las primeras en las que se reconoció esta propiedad fue la gramicidina, que impulsa el transporte de K^+ , Na^+ y otros iones monovalentes a través de las membranas y bicapas fosfolipídicas sintéticas, otro caso fue el de la valinomicina, que muestra un alto grado de especificidad para inducir el transporte de K^+ a través de las membranas. Como muchos otros ionóforos, este antibiótico es un compuesto anular, con un gran anillo cerrado, que posee un exterior hidrofóbico y un interior hidrofílico en el que se encaja precisamente el ion K^+ mediante enlaces coordinados. El exterior hidrofóbico de la valinomicina permite que el complejo valinomicina- K^+ se disuelva y pase a través del estrato hidrocarbonado no polar de la estructura de la membrana. De ahí el nombre ionóforo que se da a estos antibióticos [40, 70]

Otro ionóforo específico para el K^+ es la nigericina, que difiere de la valinomicina en que posee una sola carga negativa; el compuesto nigericina- K^+ no posee carga eléctrica neta alguna. La nigericina indica el intercambio de K^+ por el H^+ mientras que la valinomicina promueve el paso de K^+ sólo.

Otros ionóforos tales como el polipéptido de gramicidina, son moléculas lineales y se cree que envuelven al catión monovalente formando una estructura anular semejante a la de la valinomicina. Algunos ionóforos son muy activos en el transporte de cationes divalentes especialmente del Ca^{+2} [70].

Una gran desventaja que presentaron estos ionóforos frente a estudios que se realizaron en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* fue que inhibieron tanto la captación como la acumulación del Mn^{+2} y de acuerdo a lo anterior y a las conclusiones que se obtuvieron en aquéllos estudios fue que la valinomicina, nigericina y gramicidina tuvieron su acción alterando la permeabilidad de la membrana por la presencia de los iones H^+ , K^+ y Na^+ o bien ejercieron su efecto sobre las vesículas de membrana por un incremento de protones [7,8].

I. 6 TRANSPORTE DE FIERRO

Hace mucho tiempo los microorganismos procarióticos se desarrollaban, bajo una atmósfera reducida, en donde el ion hierro se encontraba en estado ferroso. Los iones ferrosos libres son relativamente de baja solubilidad; se sabe que la utilización de este metal se basaba en la disponibilidad del ion hierro en su estado ferroso. Ahora bien la presencia de O_2 libre cambia al ion hierro a su estado férrico y origina una rápida remoción de aquél del medio ambiente y por lo tanto el metal presenta una respuesta evasiva.

De acuerdo a las alteraciones del ion hierro por el oxígeno libre y considerando el metabolismo del hierro se propusieron tres posibilidades en relación a la sobrevivencia de las células:

- 1) Las células podrían continuar su existencia en el nicho anaeróbico (existen en la actualidad anaerobios estrictos)
- 2) Las células podrían evitar sus requerimientos del ion hierro usando otros cofactores para estas reacciones.
- 3) Las células podrían desarrollar un medio eficiente para solubilizar y transportar el hierro en estado férrico causando un aumento en el flujo del mismo dentro de las células [10].

Por otro lado las investigaciones acerca del transporte del ion hierro microbiano, revelaron que la evolución produjo un sistema de transporte en el cual las células liberan ion férrico de alta afinidad uniéndose a moléculas formando quelatos, los que posteriormente cruzan el límite lipoproteico por sistemas de transporte específicos unidos a la membrana y así el ion hierro se elimina del quelato para el uso metabólico de enzimas especiales.

I. 7 TRANSPORTE DE FIERRO MICROBIANO. SIDEROCROMOS [00]

El ion fierro se encuentra en células microbianas en combinación con ciertos átomos donadores electronegativos tales como el oxígeno, nitrógeno y azufre. Los compuestos que fungen como cofactores en el transporte de fierro comunmente son ligantes con el oxígeno, en los cuales el ion fierro se coordina a través de un átomo de oxígeno; el hecho de que estos compuestos quelen selectivamente al ion fierro en estado férrico no es asombroso, ya que se sabe que los microorganismos producen por lo menos dos tipos de ligantes químicos con el oxígeno: los ácidos hidroxámicos y los ácidos fenólicos (derivados del 2,3-dihidroxi benzoico) hay evidencias de que ambas categorías químicas participen directamente en el transporte de fierro. Neilands propuso que el término siderocromo incluya los cofactores de transporte de fierro tales como hidroxamatos y fenolatos.

A) HIDROXAMATOS

La química general de los ácidos hidroxámicos fue revisada por Emery y Neilands, la propiedad más sobresaliente de estos compuestos, radica en su capacidad de quelar Fe^{+3} (el Fe^{+2} se liga debilmente). Esto presenta una importante propiedad química, en términos de remover el Fe del quelato por una posible reducción enzimática, una vez que el transporte del quelato férrico al interior de la bacteria se ha llevado a cabo. El Hidroxamato forma un anillo estable de cinco miembros con un átomo de Fe. A pH neutro tres ligantes de hidroxamato se unen con Fe trivalente para producir un quelato neutro.

Los ácidos hidroxámicos contienen tres grupos hidroxamato/molécula,

creando un quelato marcadamente estable.

Un breve estudio de las diversas familias de hidroxamatos microbianos con la estructura representativa de cada una de ellas se plantea a continuación.

1) Tipos de ferricromos: Están constituidos por una serie de hidroxamatos con estructura relacionada. Se han aislado de diversas especies de hongos. La estructura de ferricromo se muestra en la siguiente figura.

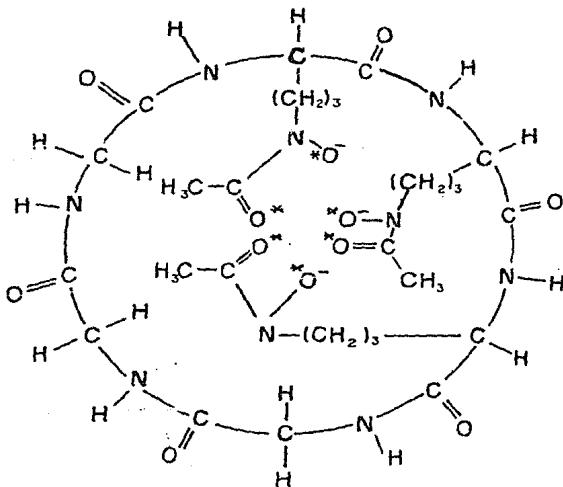


Figura No.1.7.a. "Estructura del Ferricromo (Diferri)" los sitios de quelación están indicados con un asterisco [••].

La molécula de ferricromo contiene tres residuos de N-hidroxi-L-ornitina que le confiere el carácter básico a la estructura. La acetilación de los tres grupos hidroxiamino producen la función del ácido hidroxámico; la molécula está constituida para producir un anillo de estructura estable, en el cual tres ligantes hidroxámicos se pueden orientar alrededor de un átomo de Fe en estado férrico (véase figura 1.7.a.).

La albomicina es un antibiótico, que se incluye en la familia de los ferricromos motivo por el cual no tiene una aplicación clínica contra bacterias G(+) y G(-). Su actividad puede antagonizarse por la presencia de otros siderocromos.

2) Tipos de Ferrioxamina: En contraste a la clase de los ferricromos de ácidos trihidroxámicos, las clases de compuestos de ferrioxamina, contienen tres grupos hidroxamato insertados en una cadena. Un ejemplo típico es la ferrioxamina B que se muestra en la siguiente figura.

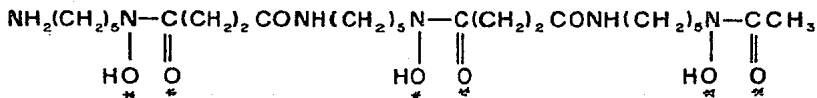


Figura No. 1.7.b. "Ferrioxamira B" [90]

Las ferrioxaminas se identificaron en algunas especies de *Streptomyces* y *Nocardia*. Los nueve átomos que separan los grupos hidroxamatos en la ferrioxamina E permiten fácilmente que la molécula se doble alrededor de un átomo de hierro acomodándose para la quelación.

Diversos hidroxamatos (relacionados estructuralmente a las ferrioxaminas) con actividad de antibiótico compiten con ciertos siderocromos para el transporte. Muchas mutantes resistentes a la actividad de estos antibióticos tienen dañados sus mecanismos de transporte.

3) Derivados de citrato: Estos compuestos se identificaron de bacterias tales como: *Aerobacter aerogenes*, *Arthrobacter pascens* y *Bacillus megaterium*. La estructura de dichos derivados se muestra en la siguiente figura.

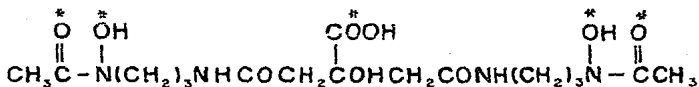


Figura No. 1.7.c. "Derivados de citrato" [00].

Puesto que las moléculas contienen solamente dos grupos hidroxamato, el COOH central libre y los grupos OH de citrato pueden participar en la formación del quelato férrico.

4) Micobactinas: Una serie de compuestos de dihidroxamatos se aislaron de las micobacterias. La estructura general de las micobactinas se muestra en la siguiente figura.

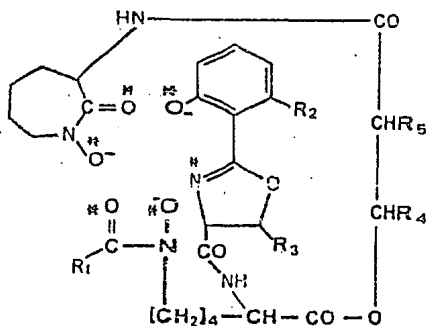


Figura No. 1.7.d. " Micobactinas" [90].

Una de las propiedades más significativas de dichas micobactinas es su solubilidad en lípidos (en contraste con la mayoría de los hidroxamatos) y gran selectividad por el ion hierro en su estado férrico.

5) Acido rhodotorúlico: Se ha identificado en varias levaduras y su estructura se muestra en la siguiente figura.

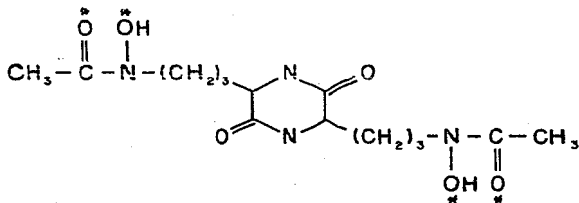


Figura No. 1.7.e. " Acido Rhodotorúlico" [90].

Este ácido es un dipéptido cíclico de N-actil-N-hidroxiornitina (que constituye una subunidad de ferricromo); las dos funciones hidroxamato de este compuesto no pueden quelar el mismo átomo de Fe; por razones estéricas. El ácido rhodotorúlico forma complejos polinucleares con el metal.

B) ACIDOS FENOLICOS

La segunda categoría química de ligantes totales de oxígeno que se utilizaron como cofactores del transporte de Fe por

microorganismos, son los α.a. conjugados del 2,3-ácido dihidroxibenzoico. El triéster cíclico del 2,3-dihidroxibenzoilserina:(enterobactina o enteroquelina) se aisló de *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli* y algunas especies de *Salmonella* encontrándose que cada molécula de enteroquelina forma complejo con un átomo de fierro en estado férrico. Un complejo hexadentado se forma entre el átomo férrico y los seis grupos hidroxifenólicos de enteroquelina esta estructura se muestra en la figura 1.7.f.

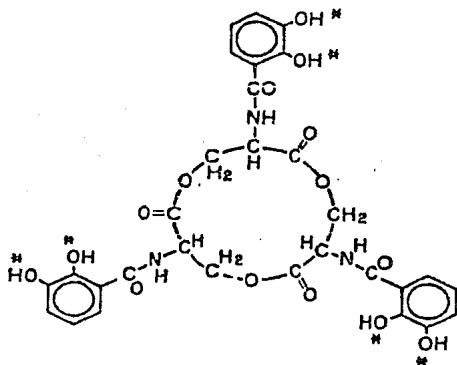


Figura No.1.7.f. "Enteroquelina" [90].

En cultivos de *Klebsiella* y *Escherichia coli*, se ha]llo una Tre conjugada del ácido 2,3-dihidroxiberzoico. La 2,3-dihidroxibenzoilglicina se aisló de cultivos de *Bacillus subtilis*

sin embargo, a causa de su estructura este a.a. conjugado no puede formar un triéster cíclico análogo a la enteroque-
lina. Por último un conjugado del ácido difenólico de Lis se descubrió en cultivos de *Azotobacter vinelandii* bajos en concentración de Fé.

C) BIOSINTESIS

Los esfuerzos para definir la biosíntesis de los ácidos hidroxámicos son numerosos, particularmente, la función del hidroxamato. Las evidencias sugieren que antes de la incorporación del a.a. a péptidos o ésteres, ocurre la la formación enzimática del grupo hidroxiamino a nivel de dicho a.a. La biosíntesis del hidroxamato se controla por la cantidad de Fe presente en la célula, su deficiencia conduce a una exagerada producción de hidroxamatos; algunos autores sugieren que la síntesis de éstos solamente ocurre cuando los organismos están deficientes en Fe. Sin embargo *Bacillus megaterium* sintetiza bajos niveles de hidroxamato schizokinen a pesar de la gran cantidad de Fe presente en el medio de cultivo. Se sabe que probablemente la síntesis del hidroxamato ocurre casi continuamente, y que el agotamiento del Fe celular almacenado, conduce a la completa liberación de los mecanismos de control que gobiernan la síntesis de hidroxamatos. Las enzimas involucradas con la biosíntesis de los hidroxamatos aún no han sido purificadas. Se desconoce como el Fe reprime la síntesis de una o más de las enzimas que intervienen en las rutas biosintéticas, o si el metal ejerce una inhibición por retroalimentación en uno de los dos pasos.

La biosíntesis de los ferolatos y el camino que conlleva al 2,3-dihidroxibenzoato, se estudiaron cuidadosamente y

están bien establecidos. La síntesis de este último en ciertos microorganismos como: *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* representa una ramificación del ácido corísmico.

La enteroquelina fue sintetizada a partir del 2,3-dihidroxibenzoato y L-serina por extractos celulares de *Escherichia coli*. Se identificaron tres proteínas y tres enzimas que se involucran en la ruta biosintética ya mencionada. Los genes que codifican para las enzimas de la enteroquelina se agrupan juntos en el cromosoma de *Escherichia coli* a su vez evidencias sugieren que éste funciona como un operón.

Se sabe que la síntesis de los fenoles es similar a la de los hidroxamatos, ya que ésta se regula por el Fe. El crecimiento de los organismos en medios de cultivo con gran cantidad de Fe permite la represión de la síntesis de las enzimas que se involucran en la producción de la enteroquelina. Del mismo modo las enzimas que convierten el ácido corísmico a 2,3-dihidroxibenzoato en *Bacillus subtilis* se reprimen por concentraciones elevadas de Fe en un medio de cultivo. Por último, algunas investigaciones aseguran que la naturaleza de los co-represores se desconoce aún.

[11,00].

I.8 MECANISMOS DE TRANSPORTE

En esta sección se van a revisar algunas investigaciones importantes que se hicieron con varios microorganismos que tienen establecido un papel directo para los siderocromos en el transporte de Fe. El proceso de transporte se desarrolla como un mecanismo de multietapas que involucran más de un producto genético. Se sabe también que cualquier microorganismo puede ser capaz de usar no sólo su propio siderocromo producido endógenamente, sino que también puede usar el de otros microorganismos. Varios siderocromos pueden transportarse por sistemas independientes dentro de una bacteria sencilla. Ello es interesante, pues un microorganismo debería poseer la capacidad para utilizar siderocromos de otras bacterias removiendo y transportando el Fe de esos siderocromos exógenos. La conservación de esta capacidad debe ser una ventaja de sobrevivida.

La historia del transporte para los siderocromos aún no es completa y las diferentes moléculas presentes dentro de la membrana celular y dentro del citoplasma responsable del movimiento de los quelatos y la liberación subsecuente de Fe están aún siendo estudiadas.

En la siguiente sección, se resume el transporte de Fe para las especies de *Bacillus* fundamentado por Neilands.

A) *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium, produce un hidroxamato secundario al que se le denomina "schizokinen" (véase figura 1.7.c.). Por otro lado Arcenau y Lankford [90], aislaron una serie de mutantes incapaces de producir "schizokinen" pero que conservan sus capacidades normales de transporte de siderocromos aunque la utilización de otros de ellos como el desferal es defectuosa, lo cual se corroboró con estudios de transporte y asimilación de Fe. Se sabe que la pérdida de la capacidad para producir "schizokinen" no elimina la captación de Fe del medio de cultivo en las cepas mutantes de *Bacillus megaterium* (SK-11 y SK-300). En estas dos cepas se observó una captación rápida de Fe iónico ($^{59}\text{FeCl}_3$); sin embargo, la ausencia de la síntesis de "schizokinen" previno a la cepa SK-11 de la competencia del Fe por sistemas que tienden a precipitar éste.

Más adelante se hicieron estudios con concentraciones de aluminio, de tal manera que la adición de bajas concentraciones de éste bloquean la captación de Fe radiactivo ($^{59}\text{FeCl}_3$) en la cepa SK-11. La evidencia sugiere que el aluminio inhibe la captación de Fe iónico por medio de la formación de complejos externos con metal removiéndolo del sistema. La quelación del Fe radiactivo por "schizokinen" (Fe-schizokinen) previno la inhibición de la captación del Fe por el aluminio, estimulando cerca de cuatro veces la captación total de Fe en la cepa SK-11. El trans

porte del complejo fué rápido, logrando la saturación aproximadamente en dos minutos. En ausencia de "schizokinen", tanto la cepa SK-11 como la cepa SK-300 no presentan un proceso ensamblador de Fe de suficiente afinidad para la adquisición del metal complejado por otros sistemas. Estos resultados revelan la importancia de la producción de siderocromos en situaciones naturales, aunque la cepa SK-11 puede crecer in vitro en un medio simple que contiene sólo Fe como única fuente de éste. De manera interesante la adición de aluminio a cultivos de *Bacillus megaterium* (ATCC 12213), productor de hidroxamatos, causa un incremento en la síntesis de "schizokinen".

Claramente el "schizokinen" es esencial para el transporte de Fe en *Bacillus megaterium*. Sin embargo, se cuestiona si el "schizokinen" funciona simplemente para solubilizar Fe externo y lo entrega a un sitio de la membrana o si el quelato "schizokinen"-Fe penetra a través de ésta. Para resolver esta pregunta se empleó el transporte simultáneo de H^3 y Fe^{59} en un quelato doblemente marcado. H^3 -"schizokinen"- Fe^{59} en *Bacillus megaterium*. Los resultados cinéticos demostraron que a bajas concentraciones del quelato doblemente marcado los picomoles de Fe radiactivo transportado fueron casi equivalentes a los picomoles de "schizokinen"- H^3 captado por las células. Estos resultados se esperarían si el quelato se trasladara como una unidad intacta. Cuando se probaron altas concentraciones, la captación de ambos com _

ponentes del quelato fué rápida. Sin embargo, la liberación de "schizokinen"- H^3 de las células después de treinta segundos de la captación fue evidente. La captación total de Fe radiactivo durante un período de exposición de diez minutos del "schizokinen"- H^3 excedió la captación de éste cerca de tres veces. Estos resultados se interpretaron pensando que el quelato cruzó la membrana celular como unidad simple, pero el Fe se liberó rápidamente del complejo y el "schizokinen"- H^3 resultante se descargó de la célula. Las porciones del quelato doblemente marcado pueden permanecer como un almacén de Fe disponible. La liberación de "schizokinen" radiactivo fué un proceso dependiente de la temperatura, sugiriendo una enzima mediadora para la eliminación del Fe del quelato. Las pruebas cromatográficas del material marcado con H^3 se liberó de las células durante los 2 primeros minutos del ensayo, e indicaron que éste era todavía "schizokinen", por lo tanto, el ligante orgánico no se hidrolizó durante el proceso y remoción del Fe.

La evidencia para un sistema de transporte específico para "schizokinen", se obtuvo en *Bacillus megaterium* que al igual que otros microorganismos, es capaz de usar no solamente su hidroxamato sino algunos otros hidroxamatos producidos por otros microorganismos dentro de los cuales se encuentra el desferal (la forma de Fe libre de la ferrioxamina B). Sin embargo, cultivos de *Bacillus megaterium*

SK-11 constituyen una excepción ya que no pueden utilizar la aerobactina que es un hidroxamato producido por *Aerobacter aerogenes*.

La determinación de la cinética de transporte en *Bacillus megaterium* SK-11 a diferentes concentraciones de Fe manifiesta que la velocidad de transporte del metal aumenta a medida que la concentración de "schizokinen"-Fe⁵⁹ se incrementa. Estudios similares que se llevaron a cabo con el quelato desferal-Fe demostraron una diferencia en la respuesta de captación para esta fuente de Fe. Concentraciones altas de desferal-Fe⁵⁹ liberaron únicamente alrededor de 1/5 del nivel máximo de Fe transportado en forma de "schizokinen"-Fe⁵⁹, así *Bacillus megaterium* SK-11 parece tener un reconocimiento en la capacidad para el transporte y utilización de hidroxamatos basado en la estructura química de su molécula esto probablemente se deba a la afinidad de un sistema de transporte simple de hidroxamato, o bien a un sistema de transporte que separa a diferentes hidroxamatos secundarios.

Estudios cuidadosos del transporte de desferal-Fe en *Bacillus megaterium*, indicó un sistema de difusión facilitada, sugiriendo que los hidroxamatos férricos no se transportan activamente. Estos aspectos de transporte de hidroxamato férrico, se incluyen en un modelo tentativo (véase figura 1.3.a.)

Las vesículas de membrana preparadas por ruptura osmótica de los protoplastos de *Bacillus megaterium* acumularon hidroxamatos férricos tanto de "schizokinen" como de desferal. Esta acumulación no dependió de la temperatura y no cambió por la adición de varias fuentes de energía. Esto puede representar solamente la unión para posibles receptores de hidroxamatos férricos sobre las membranas. Tal unión fue rápida y dependiente de la concentración. Estudios de la capacidad de un número de diferentes hidroxamatos férricos naturales para causar disociación de la unión de "schizokinen"-Fe o desferal-Fe de las membranas así como el cálculo de constantes de unión-afinidad y capacidad de unión máxima, revelaron que los dos quelatos probablemente se unieron por sitios específicos independientes. Los receptores "schizokinen"-Fe pueden explicar el incremento en la velocidad de la captación de Fe de este quelato a altas concentraciones. *Bacillus megaterium* puede tener procesos de transporte independientes para esos dos hidroxamatos férricos y para otros que también puede usar.

Receptores no específicos para aerobactina-Fe se identificaron en esas vesículas, implicando que no hay sistemas de transporte para este quelato, explicando así la carencia de utilización de aerobactina por *Bacillus megaterium*. Además los estudios de la interacción entre vesículas de membrana de *Bacillus megaterium* y "schizokinen"-Fe⁵⁹ reve-

laron la presencia de una sustancia de unión para el complejo marcado presente en el interior de la membrana, esta sustancia aún no se identifica químicamente, sin embargo su P.M. está alrededor de 50 000- 60 000 D y no hay evidencia directa del enlace de esta sustancia con el transportador del quelato, aunque este componente puede ser parte de un sitio receptor o servir para la unión subsecuente del quelato receptor.

La captación del desferal se examinó en una cepa mutante ardl que es incapaz de crecer en presencia de desferal, esta cepa se aisló sobre las bases de su resistencia al antibiótico del tipo de ferrioxamina A 22765. Un trabajo con *Staphylococcus aureus* indicó que mutantes resistentes al antibiótico A 22765 tenían dañado el transporte de Ferrioxamina B (desferal-Fe). Durante la captación de desferal-Fe⁵⁹ por los protoplastos de *Bacillus megaterium* ardl se observó que el quelato intacto se localiza en la fracción citoplasmática y no hay transferencia de Fe⁵⁹ a componentes macromoleculares. Los experimentos de control utilizando "schizokinen"-Fe revelaron que en treinta segundos de ensayo una cantidad significativa de Fe⁵⁹ se transfirió a especies macromoleculares presentes en la fracción citoplasmática indicando la remoción del metal del "schizokinen". Así la cepa ardl de *Bacillus megaterium* parece ser capaz de transportar desferal-Fe e incapaz de remover el Fe del quelato para su uso metabólico subsecuente.

Bacillus subtilis, un productor de fenolato, también es útil en estudios de transporte de Fe que proviene tanto de compuestos del fenolato como de hidroxamatos férricos. Esta bacteria excreta el 2,3-dihidroxibenzoato y el 2,3-dihidroxibenzoilglicina; en presencia del segundo compuesto se observó un incremento en la captación total de Fe, proceso que fue sensible a la temperatura. Cuando las células se trataron con azida de sodio la captación de Fe se redujo totalmente, este resultado sugiere que el transporte es un proceso que consume energía más no se comprobó que el movimiento del quelato a través de la membrana sea termodinámicamente activo. Todavía no es claro como es que la 2,3-dihidroxibenzoilglicina puede aumentar el transporte de Fe en *Bacillus subtilis*.

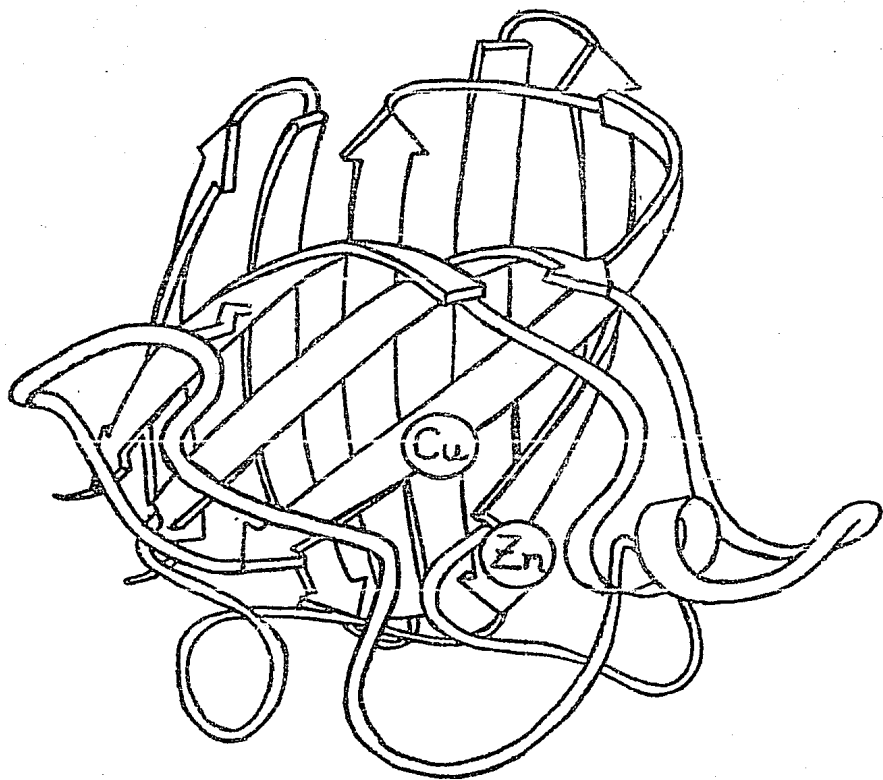
Se requieren trabajos adicionales para esclarecer la participación del fenolato en el transporte de Fe en *Bacillus subtilis*, se sabe que los dos hidroxamatos férricos; el desferal-Fe y "schizokinen"-Fe aumentan la captación del ion metálico, la bacteria y el siderocromo también puede ser un cofactor funcional en el transporte del metal. Por último, se concluye que *Bacillus subtilis* al igual que *Bacillus megaterium* son capaces de utilizar diferentes siderocromos.

CAPITULO II.

SUPEROXIDO DISMUTASA

The past, the infinite greatness of
the past!
For what is the present, after all,
but a growth out of the past?

Walt Whitman.



2.1 GENERALIDADES.

Durante el proceso de transporte de electrones al oxígeno molecular a través de la cadena respiratoria mitocondrial de organismos eucarióticos y la membrana citoplasmática de las bacterias, así como en diversas reacciones de hidroxilación y de oxigenación se pueden formar productos tóxicos en la reducción parcial del oxígeno, probablemente como intermediarios sobre los centros activos de algunas enzimas que se involucran en esas reacciones. Los intermediarios más importantes son: el O_2^- y el H_2O_2 , ambos son altamente reactivos y capaces de lesionar irreversiblemente a diversas biomoléculas de mamíferos y bacterias de respiración aeróbica [70].

Además, ciertos microorganismos son protegidos de la toxicidad del oxígeno de células fagocíticas por su habilidad para sintetizar la SOD y CAT [24, 46]. La primera funciona como una defensa primaria contra la citotoxicidad potencial del O_2^- cuya formación es un evento común en sistemas biológicos. [3, 10, 11, 22, 24, 27, 39, 45, 47, 48, 49, 50, 87, 96, 119]. La segunda, una hemoenzima que descompone el H_2O_2 (en una molécula de oxígeno y otra de agua) que se forma durante la reacción que cataliza la SOD.

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA.

Hallazgos en bacterias, plantas y animales suponen que la SOD juega un papel importante en la protección de las células contra los efectos destructivos del O_2^- . Su importancia radica en su carácter esencial para la supervivencia de las células aeróbicas. Su sustrato es un radical inestable (O_2^-) que se presenta en cantidades minúsculas en cualquier momento, procediendo la reacción a una velocidad rápida. La SOD elimina catalíticamente al O_2^- mediante la siguiente reacción [95,96].



Las enzimas observadas para catalizar la dismutación del O_2^- se clasifican de acuerdo a la naturaleza de los iones metálicos contenidos en su molécula, éstas son: SOD-Fe, SOD-Mn y por último la SOD-Cu-Zn. La primera de ellas se encuentra en el espacio periplásmico [36,45,47]. Aunque investigaciones recientes afirman que esta enzima en *Escherichia coli* no se localiza en ese espacio, sino que su SOD se encuentra en la matriz [10]. La segunda, denominada manganoenzima, cuya localización ha sido bien definida en la matriz [36,45,47,96]. La tercera y última, generalmente se halla en el citosol de las células eucarióticas [87,119] y su estructura molecular difiere totalmente de las otras dos que ya se mencionaron [36]. Cabe mencionar que la SOD-Cu-Zn también se ha encontra

do en *Photobacterium leiognathi*, sin embargo, muy poco se sabe acerca de ella [30].

Ahora bien, otros investigadores han hecho hincapié en que especies aerotolerantes [3] y anaerobios facultativos como *Escherichia coli* [4, 10, 23, 27, 45, 50] contienen SOD mientras que los anaerobios obligados carecen de ella, un ejemplo de esto se demuestra en la tabla 2.2.a. [53, 54].

Irwin Fridovich en 1973, había demostrado que *Escherichia coli* tipo B, contenía dos formas de SOD electroforéticamente identificadas, ambas diferían con respecto a su localización dentro de la célula, en la naturaleza de sus metales, en su respuesta a cambios de pO_2 , en su P.M. y en el número de las subunidades que las componían [45]. Se trataba de una ferrozima y una manganoenzima, que guardaban una estrecha relación en la secuencia de a.a. [23, 45].

Posteriormente, Fridovich y otros investigadores demostraron al estudiar una gran variedad de microorganismos entre los cuales se encontraban *Escherichia coli* K-12 y *Escherichia coli* B, que estas dos cepas específicamente contenían tres SOD diferentes [10, 24]. Las enzimas fueron purificadas y se detectó que una de ellas es constitutiva encontrándose presente cuando las células crecen en condiciones de anaerobiosis, tratándose de una SOD-Fe. Las otras dos aparecen solamente durante el crecimiento aeróbico, siendo una de

Tabla No. 2.2.a. "Contenido de SOD
y CAT en diferentes microorganismos"

[83, '87].

Microorganismo	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)
Aerobios y anaerobios facultativos:		
<i>Escherichia coli</i>	1.8	6.1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.4	2.4
<i>Halobacterium salinarum</i>	2.1	3.4
<i>Rhizobium japonicum</i>	2.6	0.7
<i>Micrococcus radiodurans</i>	7.0	289.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.7	13.5
<i>Mycobacterium sp.</i>	2.9	2.7
<i>Pseudomona sp.</i>	2.0	22.5
Anaerobios estrictos:		
<i>Vionella alcalescens</i>	0	0
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0	0
<i>Sticklandii lentoputrescens</i>	0	0
<i>Cellobiopharum barkei</i>	0	0
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	0	0
<i>Clostridium sp.</i>	0	0
<i>Butyrifibrio fibrisolvens</i>	0	0
Anaerobio aerotolerante:		
<i>Butyrilbacterium rettgeri</i>	1.6	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.8	0
<i>Streptococcus mutans</i>	0.5	0
<i>Streptococcus bovis</i>	0.3	0
<i>Streptococcus mitis</i>	0.2	0
<i>Streptococcus lactis</i>	1.4	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	0

ellas una SOD-"nueva", que al parecer está compuesta de una subunidad de cada una de las otras dos [10], lo que hace pensar que se trata de una enzima híbrida llamada **Ferroperoxido dismutasa híbrida** [27].

Investigaciones previas reportaron que *Lactobacillus plantarum* carece de una SOD verdadera y la defensa contra el O_2^- la obtiene del Mn^{+2} intracelular, de hecho el género *Lactobacilliae* exhibe un alto requerimiento por el Mn^{+2} . En un experimento realizado con buffer de pirofosfato a pH 7.8, el O_2^- oxidó al Mn^{+2} obteniéndose un complejo estable de Mn^{+3} -pirofosfato y en ausencia de queladores estabilizantes el producto fué MnO_2^- , por esta razón parece probable que la eliminación del O_2^- por el Mn^{+2} depende de la reducción del producto, Mn^{+3} , por algunos componentes de la mezcla de reacción como lo sugiere el experimento [3].

También se han llegado a realizar investigaciones en algunos microorganismos con respecto a su conducta frente al O_2 y al contenido de la SOD, por ejemplo *Vibrio parahemolyticus* 27519 y otros vibrios halofílicos poseen dos SOD's diferentes que se presentan a bajos niveles en condiciones anaerobias y aparecen a niveles elevados en condiciones aeróbicas, esto sugiere que bajo dichas condiciones a los vibrios les es permitido sobrevivir en tejidos aeróbicos el tiempo suficiente para reducir el medio y crear así focos de infec

ción, incrementando de esta manera su virulencia [24].

Estudios realizados con cepas bacterianas indican que existe una diferencia en el contenido de SOD's presentes en las bacterias G (+) y G (-), es claro que no existe una regla que confirme esta distinción debido a la rapidez con la cual los microorganismos pueden evolucionar; sin embargo, en estudios realizados por Larry Briton y colaboradores [11], se demostró que las bacterias G (-) tendieron a contener SOD-Fe y que más de la mitad de las bacterias G (+) contuvieron solamente SOD-Mn como lo demuestra la tabla 2.2.b.

En su oportunidad se tratarán con más detalle las características correspondientes a cada una de las variantes de las SOD's.

Tabla No. 2.2.b. "Contenido de SOD en bacterias
G (+) y G (-)" [11].

Bacterias	Gram	SOD (U/mg)
<i>S. faecalis</i>	+	8.0
<i>S. pyogenes</i>	+	11.9
<i>S. pneumoniae</i>	+	1.3
<i>S. lactis</i>	+	33.3
<i>S. aureus</i>	+	10.5
<i>S. epidermidis</i>	+	8.7
<i>Micrococcus luteus</i>	+	3.3
<i>M. radiodurans</i>	+	18.9
<i>B. cereus</i>	+	58.8
<i>B. megaterium</i>	+	21.1
<i>B. subtilis</i>	+	5.2
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	30.8
<i>C. diphtheriae</i>	+	4.2
<i>N. farcinica</i>	+	8.4
<i>E. coli</i>	-	21.4
<i>E. cloacae</i>	-	25.6
<i>S. marcescens</i>	-	9.1
<i>A. faecalis</i>	-	20.0
<i>P. vulgaris</i>	-	13.6
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	15.7
<i>S. typhimurium</i>	-	32.0
<i>K. pneumoniae</i>	-	27.0
<i>N. subflava</i>	-	13.7

2.3 ANION SUPEROXIDO.

El O_2^- es un intermediario común en la reducción parcial del O_2 . Los radicales libres superóxido se generan en el curso de la interacción con el oxígeno molecular de varios constituyentes celulares, incluyendo flavinas reducidas, flavoproteínas, quinonas, tioles, leucoflavinas, catecolaminas, tetrahidropteridinas, ferredoxinas, rubredoxinas y hemoproteínas [30]. El O_2^- también se forma durante la acción catalítica de las siguientes enzimas: xantino-oxidasa, aldehído-oxidasa, dihidro-orótico-dehidrogenasa y un grupo de flavoproteínas deshidrogenasas. Se sabe además, que hay varias hidroxilasas y oxidasas que se inhiben por la SOD, lo cual sugiere que el O_2^- es un intermediario en sus ciclos catalíticos. Aquéllas incluyen hidroxilasas solubles de *Aspergillus niger*, triptofano-dioxigenasa y galactosa oxidasa.

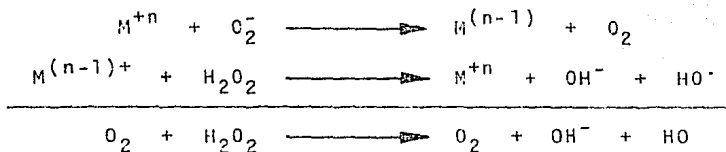
Los granulocitos intactos producen también O_2^- durante el acto de fagocitosis [31]. Independientemente del proceso de ingestión, ocurre el estallido respiratorio de los neutrófilos (primera línea de defensa del sistema inmunológico) con cualquier perturbación de su membrana celular, este evento se lleva a cabo con la formación de H_2O_2 y O_2^- . El mecanismo del estallido se desarrolla como se demuestra en el esquema

2.3.a. [30, 40].

2.4 TOXICIDAD DEL ANION SUPEROXIDO.

El mecanismo de la toxicidad del O_2^- permanece sin ser elucidado hasta el momento, sin embargo, se han propuesto dos mecanismos que no son del todo satisfactorios [67].

El más comunmente aceptado es la llamada reacción "metal catalizada de Haber Weiss":



En el primer paso de este esquema el O_2^- reacciona con los iones metálicos (M), tales como Cu^{+2} ó Fe^{+3} , presentes en la célula en cantidades traza, para formar los correspondientes iones metálicos reducidos. El segundo paso de la reacción es la reducción del H_2O_2 por el ion metálico reducido $M^{(n-1)+}$ para dar el ion hidróxido (OH^-) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$). El $HO\cdot$ es deficiente en electrones y consecuentemente un poderoso oxidante sin distinción así como un iniciador de reacciones de radicales libres. Ciertamente, la formación de este radical en una célula debe evitarse de alguna manera. Este mecanismo no explica satisfactoriamente la toxicidad del O_2^- ya que el papel que juega en este mecanismo es el de actuar como un agente reductor de iones metálicos traza. El interior de la célula es de por sí un medio altamente

reductor. El O_2^- no parece tener alguna propiedad especial o inusual como agente reductor cuando se compara con otros agentes de este tipo que generalmente están presentes dentro de la célula (p.e. el ascorbato) por lo tanto, se especularía que otros agentes biológicos reducidos dentro de la célula también serían altamente tóxicos porque ellos se sustituirían por el O_2^- en el esquema de la reacción. Entonces, las SOD's no serían de utilidad en la protección contra la formación del O_2^- en este mecanismo de reacción.

Otra posibilidad es que el O_2^- se protone de alguna manera, y que las especies no cargadas de HO_2 disueltas en la membrana actúen como un promotor en la peroxidación de lípidos. El O_2^- podría causar daño por este mecanismo, sin embargo, algunas SOD's son citosólicas (disueltas en la porción acuosa de la célula) y por lo tanto, el único camino que ellas protegerían contra tales reacciones sería eliminando el O_2^- antes de que éste se introduzca a la membrana. Dado que el O_2^- es la base conjugada del HO_2 cuyo pKa es 4.8, muy pequeño en comparación al pKa del O_2^- que se protona a pH fisiológico, por lo tanto este mecanismo no explica la toxicidad del O_2^- .

Seguramente puede haber otros mecanismos por los cuales el O_2^- ejerza un efecto tóxico. Por ejemplo, sería difícil discutir si el O_2^- se enlaza a un sitio específico de alguna enzima esencial y de este modo inhibir su acción.

2.5 SUPEROXIDO DISMUTASA CONTENIENDO FIERRO.

La SOD-Fe tiene un P.M. de aproximadamente 38 700 D. Está - compuesta de dos subunidades de igual tamaño, las cuales no se unen covalentemente [23,27] y puede ser removida por choques osmóticos [10,36,49]. Generalmente, la mayoría de las - ferroenzimas son dímeros, pero *Methanobacterium bryantii* - constituiría una excepción ya que se ha demostrado que su - SOD-Fe tiene la estructura de un tetrámero [96].

La estructura de la SOD-Fe de *Escherichia coli* se determinó a una resolución de 3.1 Å. En la molécula dimerica el -NH₂ - terminal se compone de dos hélices que se superponen antiparalelamente y el -COOH terminal es una estructura de triple estrato caracterizada por una mezcla de estructuras α y β secundarias [95]. El átomo de Fe⁺³ se une a cuatro residuos de a.a., el primer ligante, es la His 26 situada en el do - blez de la hélice A; el segundo de ellos se origina de la - hélice B; el tercero, viene del final del tercer filamento - de la lámina- β -plegada, el cuarto y último viene del final del tercer ligante, tal como se demuestra en la figura 2.5.a [95].

Estudios que se realizaron con bacterias que crecen bajo con diciones de anaerobiosis demostraron que los niveles enzimáticos de la SOD-Fe se elevan en comparación con los niveles de la SOD-Mn cuyos niveles permanecen bajos en estas mismas

condiciones [96].

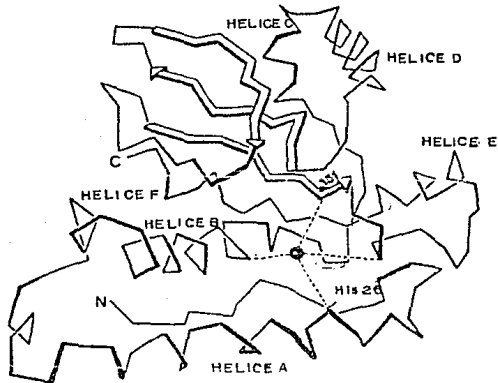


Figura No. 2.5.a. "Estructura tridimensional de una subunidad de la SOD-Fe de *Escherichia coli*" [95].

De acuerdo a su localización en el espacio periplásmico de las células bacterianas, la SOD-Fe juega un papel importante en la defensa contra el O_2^- exógeno [36, 45].

Esta ferrosuperóxido dismutasa, ha sido purificada y aislada de diversas fuentes bacterianas, entre las cuales se incluyen: *Escherichia coli* [10, 23, 27, 45, 47, 50], *Bacillus stearothermophilus* [110], *Pseudomona ovalis* [39, 110], *Plectonema boryanum*, *Photobacterium leiognathi* y *Photobacterium sepia* [38]. En todas estas bacterias el estado de oxidación del

fierro contenido en la SOD es +3 [96].

Electroforéticamente se observaron tres SOD's diferentes en *Pseudomona ovalis*. Se había reportado que una de ellas, la SOD-Fe, contenía dos átomos del metal por mol de la enzima - en estado natural, parecía que uno de los dos fierros era removido fácilmente, pero el otro permanecía unido firmemente a la molécula de la enzima [39]. Posteriormente, este dato - se confirma encontrándose además que se podía tratar de un - dímero de dos subunidades idénticas, con un P.M. total de - cerca de 44 000 D. Su contenido de fierro varía, con un límite superior a un átomo de fierro por subunidad [110].

2.6 SUPEROXIDO DISMUTASA CONTENIENDO MANGANESO.

La SOD-Mn tiene un P.M. aproximadamente de 40 000 D. Se trata de un dímero con subunidades de igual medida. Estudios de RMN demostraron que el ion Mn contenido en la enzima de *Escherichia coli* es trivalente [35]. La manganoenzima no se solubiliza por choque osmótico como la ferroenzima, aquélla sólo se libera por rompimiento sónico [10, 45, 49] y se encuentra en grandes cantidades en las células bacterianas cuando éstas crecen en elevadas presiones de O₂, presentando además resistencia a la influencia de la estreptonigrina [45, 47, 48]

La acción protectora de la manganoenzima depende sobre todo de su disponibilidad para eliminar totalmente el O₂⁻ endógeno [45] ya que su localización en la matriz de las células bacterianas así lo ha sugerido.

La estructura de la SOD-Mn puede ser dimérica y tetramérica tanto en células eucarióticas como en procarióticas, un ejemplo de esta aseveración lo constituyen *Thermus thermophilus* HB-8 y *Thermus aquaticus* Yt-1 [36], procariotas que contienen una manganoenzima con estructura tetramérica. Sin embargo, otros estudios revelaron que las células eucarióticas generalmente contienen esta enzima en forma de un tetrámero y las células procarióticas en forma de un dímero, situación que no siempre se confirma.

La estructura cristalina de la SOD-Mn tetramérica de *Thermus thermophilus* HB-8 se determinó a una resolución de 4.4 Å por mapas de densidad electrónica, las posiciones de los metales son equivalentes a las de la estructura de la SOD-Fe y los mapas indican que los ligantes contribuyen al cruce de las hélices -NH₂ y -COOH terminales como se muestra en la siguiente figura (2.6.a.).

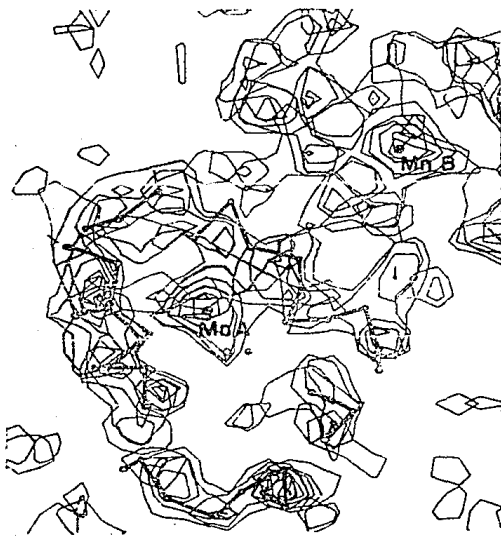


Figura No. 2.6.a. "Representación de una mapa de densidad electrónica de una molécula de SOD-Mn" [96].

2.7 SUPEROXIDO DISMUTASA CONTENIENDO COBRE Y ZINC.

La SOD-Cu,Zn es una metaloproteína abundante en casi todas - las células eucarióticas con un P.M. aproximadamente de - 32 000 D [87], es relativamente fácil de aislar, presenta al - ta solubilidad y enlaza a los iones Cu^{+2} y Zn^{+2} en una inte - resante configuración (véase figura 2.7.b.). Puede aceptar - otros iones metálicos en lugar de aquéllos que la conforman. Estos iones metálicos no nativos actúan como pruebas espec - troscópicas de la región de "unión metálica" [87].

Richardson y colaboradores [87], determinaron la estructura cristalina de la SOD-Cu,Zn en forma oxidada por difracción - de R-X, es decir, conteniendo Cu^{+2} (procedente de eritrociti - tos de bovino). Se cree que las SOD's-Cu,Zn de otros oríge - nes eucarióticos tienen esencialmente la misma estructura, - ya que la secuencia de a.a. se conserva especialmente en la región de la "unión metálica" y las propiedades espectroscó - picas son muy similares. Este tipo de SOD's invariablemente son diméricas. Los estudios de difracción de R-X demuestran que la enzima consiste de dos subunidades idénticas, unidas por interacciones hidrofóbicas. Cada subunidad consiste de - un barril cilíndrico aplanado de láminas- β -plegadas que se constituyen de ocho cadenas antiparalelas de las cuales se - extienden tres lazos externos de estructura irregular. Un di - bujo esquemático de ésta se da en la figura 2.7.a.

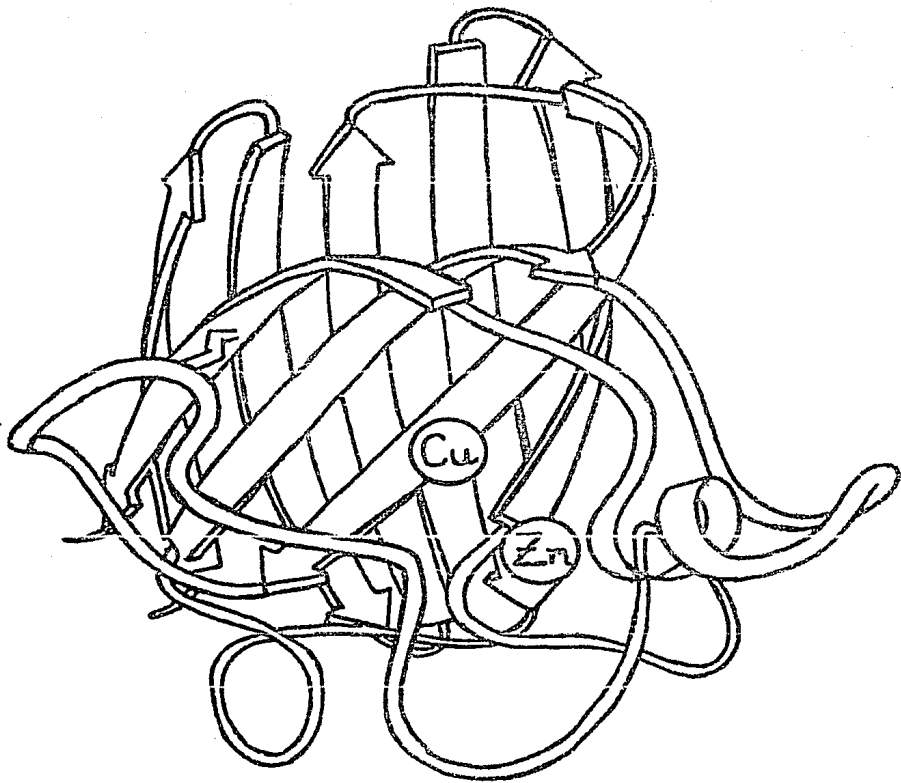


Figura No. 2.7.a. "Representación esquemática de una subunidad de SOD-Cu,Zn. Los β -filamentos se muestran como flechas y el puente disulfuro como un zig-zag" [87].

La SOD-Cu,Zn, se reportó por primera vez en 1938, por Mann y Keillin, quienes la observaron durante el fraccionamiento de preparaciones de glóbulos rojos de bovino. El color azul-verde pálido de la enzima facilitó su purificación y sugirió que esta enzima contenía Cu^{+2} (la presencia de los iones Zn^{+2} incoloros no fué descubierta sino hasta 1970). Años más tarde, Mc.Card y Fridovich reportaron el descubrimiento de la actividad enzimática para la SOD-Cu,Zn (entonces llamada eritrocupreína) que al igual que las otras SOD's, sirve como agente protector contra los efectos tóxicos del O_2^- .

La figura 2.7.b. es una representación esquemática de los sitios de unión Cu^{+2} y Zn^{+2} . El ión Cu^{+2} se coordina a cuatro átomos de nitrógeno de los imidazoles que vienen de las His 44, 46, 61 y 110, además una molécula de H_2O se coordina al Cu^{+2} para darle a este ion una geometría cuadrado piramidal distorsionada. El Zn^{+2} se coordina a los nitrógenos de los imidazoles de las His 61, 69 y 78, así como al grupo $-\text{COOH}$ de la Asp 81 en una geometría tetrahédrica. Los iones Cu^{+2} y Zn^{+2} participan de un ligante común, el anillo imidazol de la His 61, el cual está en forma de anión imidazolato desprotonado enlazando a los dos iones y alejándolos uno del otro a una distancia de 6.3 \AA .

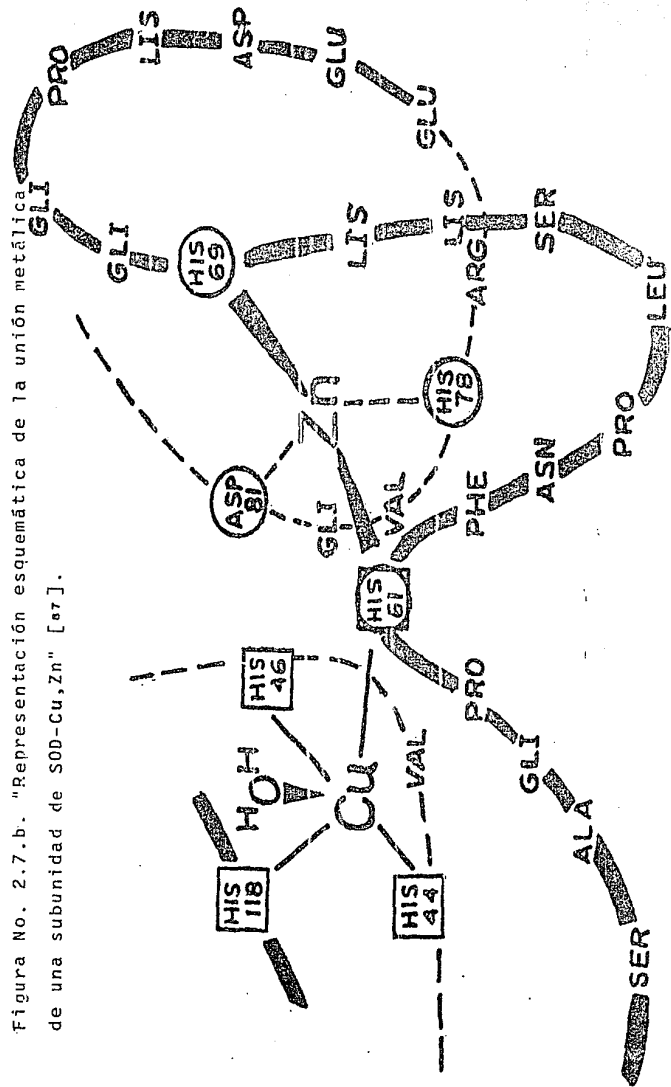


Figura No. 2.7.b. "Representación esquemática de la unión metálica de una subunidad de SOD-Cu,Zn" [57].

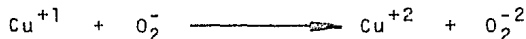
No hay evidencia de alguna posición de coordinación accesible sobre el Zn^{+2} y se cree que este ión juega un papel predominantemente estructural en la proteína; el ion Cu^{+2} por el contrario, se une a una variedad de ligantes, casi todos ellos son pequeños aniones como CN^- , N_3^- , o bien haluros. Las cadenas laterales positivas sobre la proteína aparentemente juegan un papel importante para facilitar el enlace de los iones Cu^{+2} y Zn^{+2} a la proteína y también para la orientación del sustrato aniónico superóxido hacia el sitio Cu^{+2} .

Los estudios de difracción de R-X indican que en las cadenas laterales cargadas positivamente, la Arg 141, Lis 120 y Lis 134, se localizan a una distancia de 5, 12 y 13 Å, respectivamente del ion Cu^{+2} . Aunque la Arg 141 no se coordina directamente con el ion Cu^{+2} se localiza más cerca de él, que del ion Zn^{+2} y su H^+ se une a los aniones incluyendo al O_2^- cuando éstos se coordinan al ion Cu^{+2} .

Los resultados estructurales a partir de la difracción de R-X descritos, son únicamente para la proteína en forma oxidada (Cu^{+2}). La proteína reducida (Cu^{+1}) es igualmente importante en el mecanismo catalítico de la eliminación del O_2^- , pero desafortunadamente, los resultados estructurales de R-X no son disponibles para esta forma.

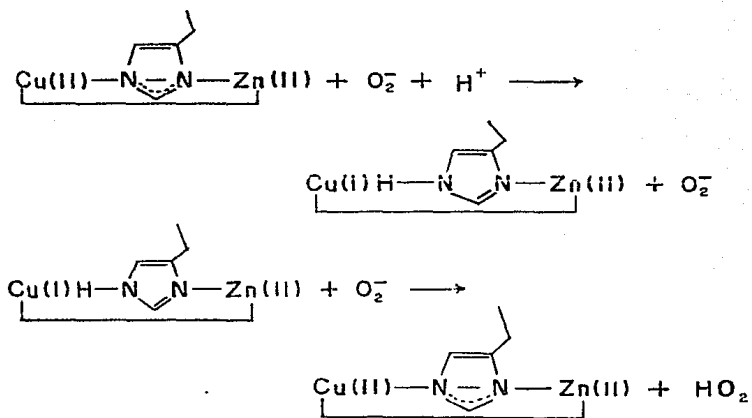
2.3 MECANISMO DE ACCION DE LA SOD-Cu,Zn [87].

El mecanismo de eliminación del O_2^- para la SOD-Cu,Zn implica una alternativa entre los estados de oxidación del Cu^{+1} y del Cu^{+2} de la proteína; la reducción de la proteína oxidada por agentes reductores diferentes al O_2^- se acompaña de la captación de un protón por cada subunidad. Existen evidencias de que el enlace imidazolato es el sitio de protonación ya que el anión peróxido (O_2^{-2}) que se forma durante la reacción del Cu^{+1} de la enzima con el O_2^- es extremadamente básico y debe adquirir un protón antes de que pueda disociarse de la vecindad del ion Cu^{+2} :



se ha propuesto que el puente imidazol de la His 61 en forma oxidada, es el origen de ese protón.

La reacción que ejemplifica lo anterior se demuestra en el siguiente esquema:

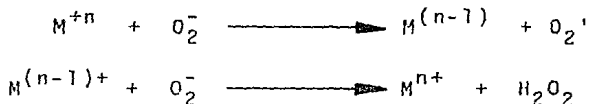


Esquema No. 2.8.a. "Mecanismo de reacción propues-
to para la desprotonación del imidazol" [57].

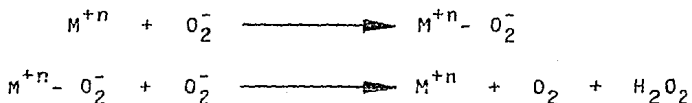
La elucidación de este mecanismo y la consideración de la -
cercana proximidad del ion Zn^{+2} al sitio del Cu^{+2} conduce a
suponer que el Zn^{+2} juega un papel importante en la enzima.
Sin embargo, la separación del Zn^{+2} da un derivado con casi
todos los sitios activos. De aquí que el Zn^{+2} funge como un
estabilizador de la estructura proteica más que como un agen
te catalítico de la enzima.

Una variedad de metales complejos también pueden actuar como
las SOD's. Se han propuesto otros dos mecanismos para este -
tipo de reacciones. El primero de ellos se asemeja al meca -

nismo que opera en el caso de la SOD-Cu,Zn; por ejemplo, la reducción de un electrón de un ion metálico por el O_2^- seguido por la reoxidación de un ion también metálico pero reducido por otro O_2^- .



El otro mecanismo involucra la formación de un complejo superóxido que se reduce por el otro O_2^- , formando H_2O_2 :



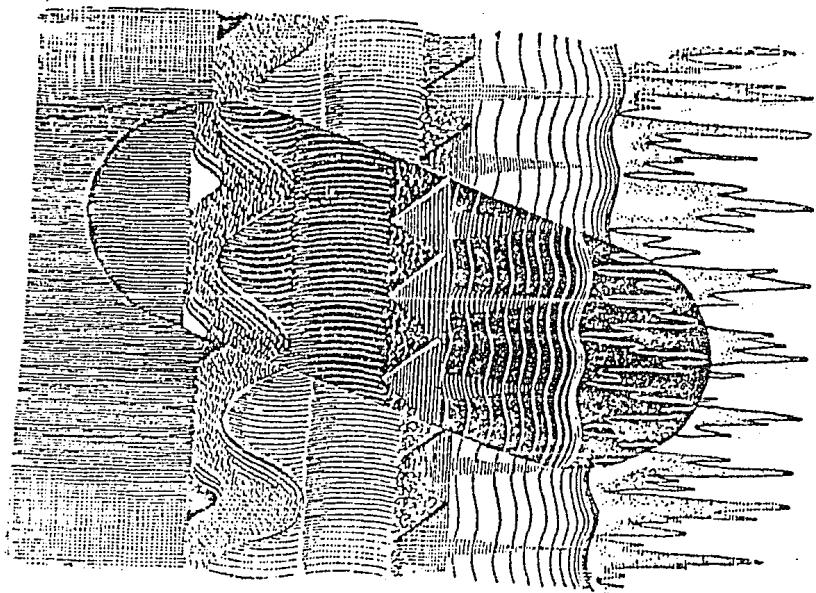
Si un complejo metálico se reduce por el O_2^- en una cantidad razonable y si la forma reducida de aquél se oxida por el otro O_2^- también en una cantidad razonable, entonces es probable que el complejo actúe como una SOD para el primer mecanismo que se describe arriba. Existe un número de complejos metálicos que quizá caen dentro de esta categoría, especialmente el ion acuoso Cu^{+2} . El segundo mecanismo, opera en el caso de diversos iones metálicos activos no redox, como el Zn^{+2} .

CAPITULO III.

FOSFATASA ALCALINA

Sólo con el corazón se puede ver bien, lo esencial es invisible para los ojos.

Antoine de Saint Exupery.



3.1 GENERALIDADES

Uno de los atributos más sobresalientes de las enzimas es su especificidad de reaccionar, de manera que tan sólo ciertos sustratos experimentan su acción y únicamente tiene lugar un tipo de reacción sin que se produzcan reacciones laterales o subproductos. Sin embargo, su grado de especificidad puede ser muy variado. Algunas poseen una especificidad absoluta respecto a un sustrato determinado y no atacarán a moléculas aunque estén muy relacionadas estructuralmente, mientras que otras enzimas atacan a toda una clase de moléculas con un común denominador estructural aunque lo hagan a velocidades ampliamente diferenciadas [70].

Por otro lado, se sabe que muchos microorganismos producen F.A. entre los cuales se incluyen: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Bacillus licheniformis* [31, 64], *Escherichia coli* [42, 104], *Bacillus s.p.* [84, 102], *Rhizobium leguminosarum* [42]. En *Bacillus s.p.* se ha asociado la producción de F.A. con el proceso de esporulación observándose que ninguno de estos eventos ocurre en ausencia del Mn [102] sin embargo, se vio que la actividad de la enzima, se incrementa durante el periodo de desarrollo de esporas de este microorganismo [50, 93].

3.2 CARACTERISTICAS DE LA FOSFATASA ALCALINA

La F.A. cuyo nombre químico es ortofosfórico monoéster fosfohidrolasa [4, 106], es una enzima que se emplea en laboratorios clínicos en el análisis de la secuencia de a.a. y experimentos en la clonación de genes [4, 106]. Su P.M. en *Rhizobium leguminosarum* WU 235 es de 78 500 D y por subunidad es de 39 400 D aproximadamente. En la tabla 3.2.a. se enlistan otras propiedades con más detalle de la F.A. de dicho microorganismo [42].

Tabla 3.2.a. "Propiedades de la Fosfatasa Alcalina de *Rhizobium leguminosarum* WU 235" [42].

1. Peso molecular sobre sefadex G-150.	78 500
2. Peso molecular / subunidad sobre geles SDS	39 400
3. Punto Isoeléctrico	pH 5.8
4. Km. para p-nitrofenil fosfato	4.5×10^5 M
5. Utilización de sustrato	fosfomonoesterasa no específica
p-nitrofenil fosfato	100
Adenosin monofosfato	78
Adenosin difosfato	56
Adenosin trifosfato	29
3-Ciclo adenosin monofosfato	0
Citidina trifosfato	8
Piridoxamina fosfato	67
Piridoxal fosfato	62
Glucosa 6-fosfato	56
Fructuosa 1,6 difosfato	36
6- fosfogluconato	60
Pirofosfato	20

3.3 LOCALIZACION

En *Escherichia coli* la desrepresión de las células para la síntesis de la F.A. resulta por la acumulación de cantidades sustanciales de la enzima en el espacio periplásmico, dicho espacio se demostró por el tratamiento de las células con lizosima, choques osmóticos, remoción y daño a la membrana exterior, sin embargo, la membrana plasmática permanece intacta por lo que resulta, la liberación de la F.A. al medio [84, 93]. Métodos inmunológicos más sofisticados también se emplearon para la localización de la enzima que parece estar uniformemente distribuida a lo largo del borde de las células y no está presente en el citoplasma. En los microorganismos G(+) como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* la F.A. se une a la membrana [102]. Estudios in-vivo en *Salmonella typhimurium* y *Pseudomona aeruginosa* indican que la F.A. de estas especies se asocia con el lipopolisacárido de la membrana externa [31].

3.4 BIOSINTESIS

El mecanismo inicialmente propuesto para la síntesis de F.A. bacteriana puede explicarse debido a la transferencia de proteínas por transmembrana como ocurre en las células eucarióticas. La F.A. se sintetiza en el citoplasma como monómero inactivo que cruza la membrana interna para formar un dímero en el espacio periplásmico y dar así origen a la enzima activa por el mecanismo que se sugiere a continuación [4]: El péptido "señal" es un residuo de a.a. NH₂-terminal, predominantemente hidrofóbico, el cual efectúa la interacción de la proteína con la membrana. Las interacciones con proteínas de membrana pueden generar un poro de transmembrana que permite la penetración directa de la proteína naciente desde el citoplasma. Siguiendo el pasaje a través de la membrana el péptido "señal" se separa de la forma de pre-enzima elongada en la proteína madre por una proteasa. El aislamiento de una proteína cuyas propiedades corresponden a las características que se postulan para una pre-enzima in-vitro sugieren fuertemente que el gene estructural responsable de la síntesis de F.A. es el pho A, que se localiza en el mapa de unión 8' de *Escherichia coli* [31] cuyo producto sólo se sintetiza en células bajo condiciones limitantes de fosfato.

La regulación de esta biosíntesis es compleja y aún no bien esclarecida, pero se sabe que intervienen dos genes reguladores positivos pho B y pho M y un tercero, el pho R, que tam

bién es regulador, ejerciendo un control tanto positivo como negativo sobre la expresión del gene *pho A* de acuerdo a la concentración de fosfato disponible en el medio de crecimiento. Otros genes que también se involucran en el transporte de P_i son *pho S*, *pho T*, *pho U* y *pst* ejerciendo un control negativo indirecto sobre la síntesis de F.A. [4, 31, 37].

La existencia del péptido "señal" proporciona las bases para la integración coherente de una variedad de observaciones experimentales relacionadas a la biosíntesis de F.A. La secreción de la enzima dentro del espacio periplásmico depende del estado físico de la membrana. La secuencia de eventos, como el procesamiento de la pre-enzima seguida por la dimerización y el subsecuente secuestro del ion metálico para que aquélla aparezca en el espacio periplásmico, todavía no se definen [31].

La F.A. se forma solamente cuando la concentración de P_i es limitante en el medio (10 mM P_i /mol o menos) [105]. Este es de gran importancia porque es el punto preciso (también llamada señal precisa) para que la enzima empiece a sintetizarse en cantidades sustanciales a una velocidad máxima. Por el contrario, si el P_i presente en cantidades excesivas en el medio de cultivo y el crecimiento ocurre a pH= 7.0 o por arriba de éste, la F.A. no llega a sintetizarse, aunque en algunos microorganismos como *Bacillus subtilis* esta enzima si se produce en el proceso de formación de esporas

a pesar de la presencia de Pi [64].

Por otra parte, su síntesis en *Bacillus s.p* se inhibe totalmente por la presencia de Pi, glucosa [105] y ortofosfato [65] y para *Bacillus subtilis* la privación de Pi en el medio de crecimiento deprime la síntesis de esta enzima [57].

Se sugiere que el metabolismo de los CHOs regulan la síntesis de F.A., ya que esta enzima tiene entre otras, algunas funciones significativas en el metabolismo de aquéllos en las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. El efecto que ejercen las fuentes de carbono en la síntesis de esta enzima es específico. Según resultados experimentales indican que el lactato causa una represión sobre la F.A. y la glucosa conduce a la depresión de la síntesis de ésta.

Investigaciones recientes, sugieren que la enzima no se produce en ausencia del ion manganeso y tampoco el proceso de esporulación [66], sin embargo, si al medio de cultivo después de 24 horas de la inoculación se le adiciona Mn sólo se obtiene el 15% de la actividad máxima de la enzima [102].

3.5 ESTRUCTURA PRIMARIA Y SECUNDARIA DE LA FOSFATASA ALCALINA

La secuencia de a.a. del monómero de la F.A., todavía no se esclarece totalmente, por lo tanto dicha secuencia y composición de a.a. muestra que cada monómero contiene aproximadamente 425 residuos. El P.M. que se calculó para esta secuencia es aproximadamente de 40 000 a 43 000 D por lo que el P.M./dímero fluctúa en un intervalo de 30 000 a 86 000 D [9]. La composición de a.a. de la enzima se determinó de la siguiente manera: Gli y Ala, corresponden aproximadamente al 25% de los 425 residuos de a.a. de la subunidad. La fracción de residuos acídicos esta compuesta por Asp y Glu. Estos cuatro residuos de a.a. (Asp, Glu, Ala y Gli) constituyen el 40% de los a.a. de la enzima. También se demostró que el número de residuos de Pro es de 20/subunidad. Los tres a.a. que se localizan en las vueltas β : Pro, Asp y Gli, constituyen el 30% de la secuencia de la F.A.. La subunidad contiene cuatro residuos de Cys, que forman dos intrasubunidades entrelazadas y así contribuyen a mantener la estructura terciaria. El Trp 4, la Tir 1 y la His 8 son residuos que se emplean como pruebas espectroscópicas de RMN de la enzima.

La estructura secundaria de la enzima, basada en el análisis del espectro de D.C. de la F.A. nativa, corresponde a una gran estructura β con poca contribución de componentes α - helicoidales (10%) pocos elementos de la estructura secundaria pueden detectarse en el mapa de densidad electrónica más

reciente de la enzima a una resolución de 3 Å como se muestra en la siguiente figura

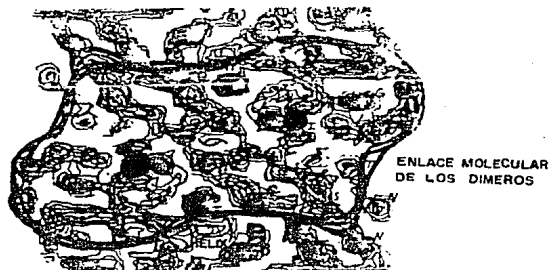


Figura 3.5.a. "Mapa de densidad electrónica de la fosfatasa alcalina a 3 Å. Las secciones mostradas son perpendiculares al doblez de la rotación axial (o) y aproximadamente paralelo a la longitud axial de la estructura elipsoidal. El contorno del mapa muestra el enlace molecular a su máxima extensión en dos dimensiones en un plano fudido quedando justamente abajo las posiciones del Zn^{+2} [22].

La estructura no está eficientemente determinada para permitir un cambio continuo en el esqueleto del polipéptido. La estructura cristalina sugiere que la enzima se compone de bandas y regiones "irregulares".

No ha sido posible determinar completamente la estructura de la vuelta β de la proteína en el D.C.. El elemento tetrapéptido de la vuelta β se conoce como el principal contribuyente de la estructura secundaria del promedio de proteínas.

La elevada proporción de a.a. en la F.A. conduce a adoptar la conformación de la vuelta β . Es posible que los componentes estructurales ordenados estén presentes en las cantidades estimadas, pero no los continuos estiramientos α -helicoidales o β -laminares. Si los elementos estructurales se interrumpen periódicamente por las vueltas β o por remiendos de la estructura irregular, el mapa de densidad electrónica sería difícil de interpretar.

3.6 ESTRUCTURA TERCIARIA Y CUATERNARIA DE LA FOSFATASA ALCALINA

El dímero de F.A. en estado nativo es elipsoidal con dimensiones moleculares aproximadas a 50 Å por 60 Å por 100 Å. La cristalografía de R-X de la enzima a resoluciones de 3 y 6 Å indican que las subunidades de las enzimas no ligadas están dispuestas simétricamente en una doble rotación axial lo que indica que en el dímero, los monómeros son idénticos química y topológicamente.

La estructura terciaria que se examinó por D.C. de la región aromática es relativamente insensible a cambios en la concentración de iones hidrógeno, sufriendo sólo perturbaciones mínimas a pH de 4.0 y 9.0. Abajo de pH 4.0 el dímero de la enzima se disocia y se desdobra adoptando una conformación enrollada al azar. La disociación del dímero parece requerir la liberación de iones metálicos indicando que estos iones juegan un papel importante en la conservación de la integridad de la estructura cuaternaria. La remoción de los iones metálicos a pH neutro no altera mayormente la estructura terciaria de la enzima.

3.7 FUNCION

Es una fosfomonoesterasa no específica con actividad de pirofosfatasa [42], la función de la F.A. es suministrar a las células Pi liberado a partir de la hidrólisis de compuestos orgánicos fosforilados disponibles bajo condiciones de escases de fosfato [4].

3.8 PROPIEDADES Y SITIOS DE UNION DEL ION METALICO EN LA FOSFATASA ALCALINA

La F.A. es una metaloenzima que se encarga de transferir grupos fosfato y en su estructura molecular contiene un ion metálico (Zn^{+2}) el cual se une estrechamente a ella. El número de iones que se unen a la enzima nativa parece variar entre 2 y 4/dímero; sin embargo, se sabe que sólo dos iones Zn^{+2} se involucran en la actividad catalítica de la enzima. Aunque a pH neutro y por arriba de éste, la enzima puede unir hasta 6 iones Zn^{+2} /dímero [31, 32]. Por otro lado se sabe que los iones metálicos por lo regular se disocian y si se excluyen rigurosamente de la preparación de la enzima, su actividad cesa. Sin embargo, esta enzima puede restaurarse por la readición del ion metálico [31].

A través de estudios estructurales de la enzima se vió que los sitios de unión Zn^{+2} pueden ser reemplazados por iones metálicos divalentes del grupo II B (Cd^{+2} y Hg^{+2}), II A

(Mg^{+2} y Ca^{+2}) y por último los iones divalentes de la primera fila de transición en los que se incluyen: Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} y Mn^{+2} (principalmente) [31, 33]. Por evidencias estructurales, se cree que tanto el Mg^{+2} como el Ca^{+2} están involucrados en su función biológica, sin embargo, las enzimas muestran una variación en su respuesta a los iones metálicos, pues a menudo el Mg^{+2} proporciona una actividad mayor y el Mn^{+2} se puede sustituir fácilmente en algunos niveles de actividad más bajos, pero también se confirmó que bajo estas condiciones el Ca^{+2} puede inhibir la actividad y si éste en algunos casos puede llegar a activarla, entonces el Mg^{+2} la inhibe. En cualquier caso los requerimientos del ion metálico es apto en cualquier disturbio.

Por otro lado, la influencia de los iones metálicos sobre la actividad puede ser enmascarada por interacciones con el sustrato o con las impurezas en la preparación de la enzima o con sitios de unión secundarios sobre la misma enzima, generalmente hay una concentración óptima después de la cual los iones metálicos tienen un efecto inhibitorio y éste es diferente para diversos iones metálicos [31, 33].

Los iones Zn^{+2} [32] pueden ser removidos con agentes quelantes entre los cuales podemos mencionar: resina, CHELEX, EDTA, 1,10-fenántrina, 8-hidroxiquinolina, ácido sulfónico y nitrilotriacético. La acción de dichos agentes van a generar a la apoenzima, la cual por determinaciones estructurales se

vió que puede unir una serie de iones divalentes tales como : Mn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} y Hg^{+2} la fuerza de unión del ion metálico hacia los sitios más lábiles decrecen en el siguiente orden: $Cd^{+2} = Mn^{+2} > Zn^{+2} > Co^{+2} > Ni^{+2}$.

Ahora bien la F.A. presenta algunas propiedades tales como su estabilidad, la cual se refiere a la capacidad de la proteína para mantener la estructura tridimensional nativa sobre perturbaciones físicas o químicas [31]. Otra de sus propiedades es la resistencia a la desnaturalización química ya que a altas concentraciones de sulfato de dodecil de sodio no se observa pérdida de la actividad y no hay evidencia de una alteración estructural. Por último es resistente al calor puesto que soporta hasta $80^{\circ}C$ durante 50 minutos.

Por otra parte, también se observó que los iones metálicos Zn^{+2} y Mg^{+2} contribuyen a la estabilidad de la F.A. y se sugiere que el Mg^{+2} retarda la pérdida de la actividad a temperaturas altas y que el Zn^{+2} estabiliza a la proteína de la desnaturalización química. El mayor grado de estabilización en este caso se debe a las dos uniones catalíticas de los iones Zn^{+2} .

3.9 ESPORULACION Y FOSFATASA ALCALINA, PAPEL DEL ION Mn

Reporte previos, de estudios de RMN indican que cantidades traza de ciertos iones metálicos son indispensables para la esporulación de varias bacterias formadoras de esporas [117]. Por ejemplo, el Fe^{+2} y el Zn^{+2} incrementan la esporulación de *Bacillus coagulans* variedad *thermoacidurans* [88], mientras que el Mn^{+2} tiene dos funciones importantes tanto en el crecimiento como en el proceso de esporulación. Durante el crecimiento logarítmico, *Bacillus subtilis* mantiene un contenido relativamente constante de Mn^{+2} intracelular que está en función de la concentración de Mn^{+2} extracelular; una segunda fase de la acumulación de este ion metálico, empieza casi al mismo tiempo que se inicia la esporulación [32] de varios microorganismos tales como: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* [32, 34, 64, 78], *Bacillus marinus* SG-1 [85, 85], *Bacillus* s.p RK-11 [102], *Bacillus* s.p [84], *Bacillus coagulans*, *Bacillus fastidiosus* y *Bacillus megaterium* [2, 32, 85]. Las tres últimas especies requieren mayor cantidad de Mn^{+2} para producir esporas muy resistentes al calor [2, 85]. Aunque en un estudio se realizó con *Bacillus marinus* SG-1 se demostró que dicho microorganismo, puede formar esporas en ausencia del ion metálico (Mn^{+2}) [85] y sólo se lleva a cabo este proceso cuando se encuentra en contacto con superficies sólidas como arcilla y sílica [85]. Todas las demás especies requieren más Mn^{+2} para el proceso de esporulación que para el crecimiento vegetativo [85]. Además durante la

esporulación el Mn^{+2} intracelular se une de tal manera que no se libera ni por la acción de tolueno ni por la lisozima (agentes químicos).

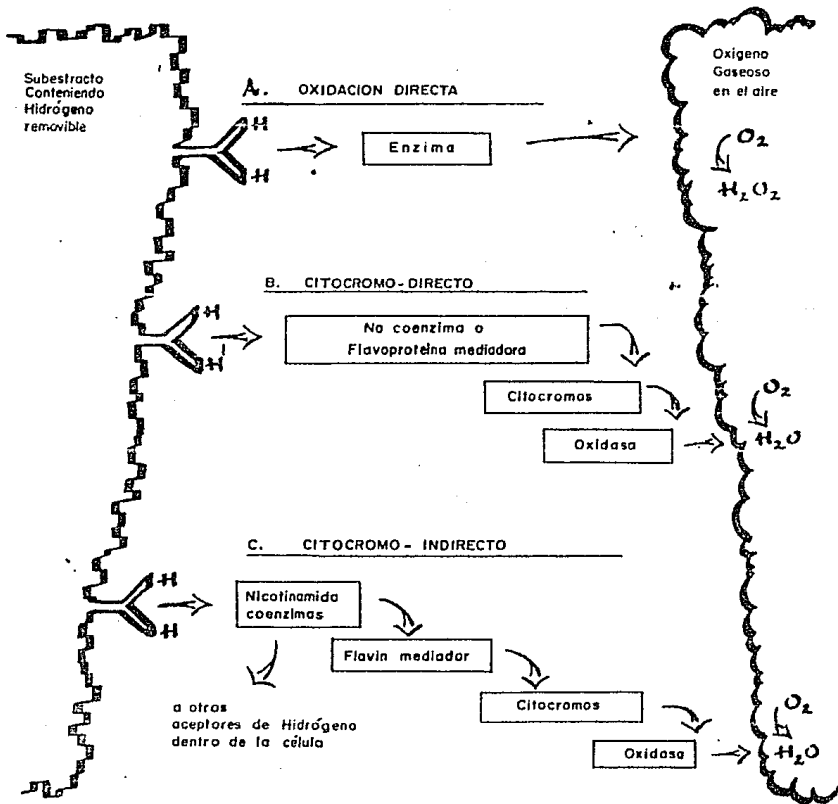
Por otra parte, Kelly y colaboradores [83, 84] demostraron recientemente que la producción de F.A. de *Bacillus s.p* RK-11, se asocia con el proceso de esporulación y que ninguno de esos eventos ocurren en ausencia del Mn^{+2} , aunque la producción de F.A. y esporulación no siempre es directa, se cree que los tres factores: (acumulación del Mn, producción de F.A. y esporulación) generalmente se unen. Sin embargo, la regulación de la producción de la F.A. es muy compleja y todavía no se establece si esta enzima se requiere para el proceso de esporulación o si es un subproducto del mismo [58, 102].

CAPITULO IV.

CITOCROMOS

"Creo en Dios como el ciego
cree en el sol, no porque lo ve -
sino porque lo siente"

Hellen Keller.



4.1 GENERALIDADES

Las reacciones de óxido-reducción son de las más características del metabolismo. Muchos de los cambios de estructura molecular necesarios para la formación de materiales celulares tienen lugar al oxidarse y reducirse enzimáticamente los compuestos de que se nutre la célula o los productos de su metabolismo intermediario [43].

Todas las oxidaciones biológicas consisten fundamentalmente en una pérdida de dos electrones y de dos protones simultáneamente por parte del sustrato, y la reducción de un compuesto orgánico en la adición de dos electrones y de dos protones (es decir, dos átomos de hidrógeno). Así las óxido-reducciones biológicas son de hecho reacciones acopladas de hidrogenación-deshidrogenación en las que el sustrato oxidable es el donador de hidrógeno y el agente oxidante es el aceptor de éste [43, 88].

Los organismos aerobios y anaerobios facultativos tienen su principal fuente de energía en la respiración, desarrollando un sistema completo de transporte de electrones; para el primer caso, aquéllos circulan desde el DPNH (o directamente desde algunos sustratos tales como el lactato o succinato) a una flavoproteína y de aquí, a través de algunos citocromos, se dirigen al oxígeno molecular (O_2), que queda reducido y se convierte en agua. En el segundo caso, el aceptor final es una sustancia inorgánica diferente al oxígeno, como el

nitrato, sulfato o carbonato. Un ejemplo que ilustra lo anterior se muestra en la siguiente figura [43].

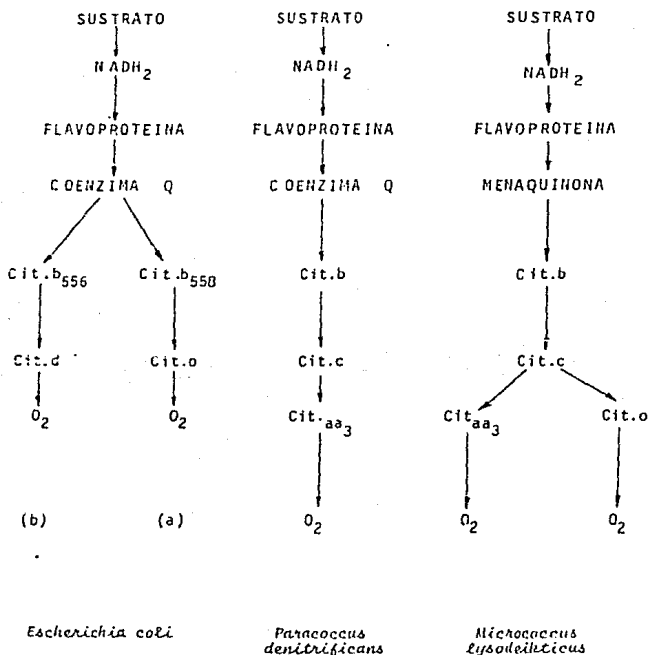


Figura No. 4.1.a. "Componentes de la cadena respiratoria de tres bacterias. La cadena de *Escherichia coli* se ramifica para esta bacteria cuando: (a) crece en condiciones aeróbicas y (b) bajo condiciones limitadas de O₂. "Las cadenas de *Paracoccus denitrificans* y *Micrococcus lysodeikticus* contienen citocromos del tipo α , b y c [43].

Los sistemas de transporte de electrones tienen dos funciones básicas:

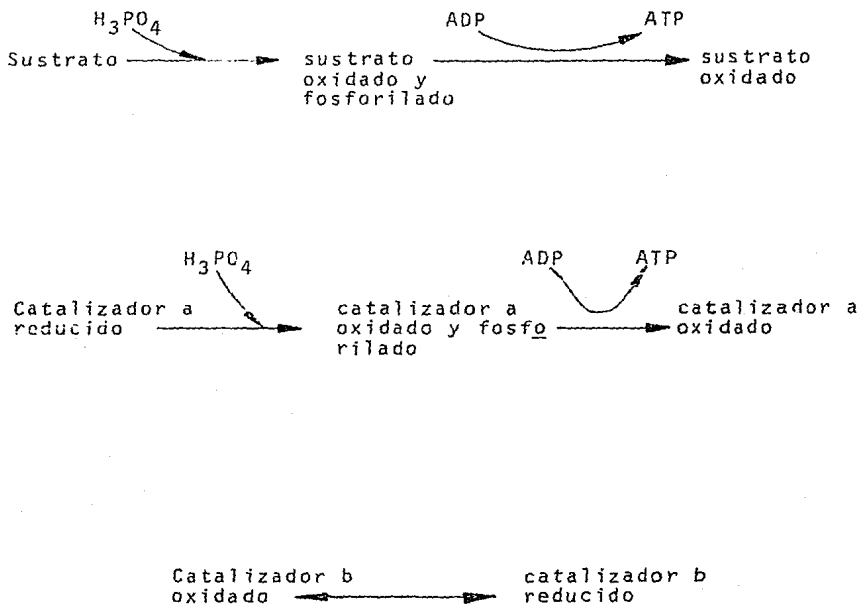
1. aceptar electrones del donador y transferirlos al aceptor (O_2).
2. Conservar parte de la energía que se libera durante la transferencia electrónica realizando la síntesis de ATP.

Los componentes fundamentales de estos sistemas son las flavoproteínas y los citocromos que actúan como transportadores de protones y electrones respectivamente. Las flavoproteínas son proteínas que contienen un derivado de la riboflavina; la porción flavínica, que está unida a una proteína, es el grupo prostético, que queda alternativamente reducido al aceptar electrones y oxidado cuando los cede. Los citocromos son anillos de porfirina con hierro unidos a proteínas, sufren oxidación y reducción a través de la pérdida o ganancia de un electrón por átomo de hierro que se sitúa en el centro del citocromo [12].

El traspaso de electrones a lo largo de la cadena de citocromos sería un proceso innecesariamente complicado si se tratara solamente de permitir su aceptación final por el O_2 , por el contrario sirve a otra función en donde esta transferencia está acoplada o ligada con la producción de enlaces fosfato de alta energía, de lo que resulta la fosforilación oxidativa [14].

Se presume que un catalizador, asociado con el sistema

transportador de electrones, se fosforila y transfiere el grupo fosfato a ADP. El catalizador, así renovado, puede entonces reaccionar nuevamente con el Pi. Este mecanismo sería análogo al de la fosforilación a nivel de sustrato, como puede verse en el siguiente esquema:

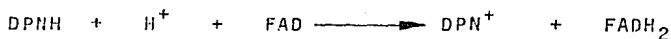


Esquema No. 4.1.a. "Comparación entre las fosforilaciones a nivel de sustrato y catalizador" [4].

Se sabe que algunos de los sistemas de transporte que intervienen en la oxidación del DPNH por el oxígeno molecular puede producir tres moles de ATP/ cada par de electrones transferidos [43].

4.2 MECANISMOS DE LA TRANSFERENCIA DE ELECTRONES EN PROCARIOTAS

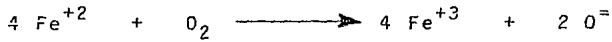
En primer lugar, la oxidación del sustrato se lleva a cabo por medio de una enzima llamada deshidrogenasa que contiene a la coenzima DPN o NAD la cual se reduce a DPNH o NADH. El DPNH se reoxida por la acción de una flavoproteína que contiene el grupo prostético FAD, que puede oxidarse y reducirse reversiblemente. El FAD de la flavoproteína se reduce al mismo tiempo que se oxida el DPNH, de acuerdo a la ecuación:



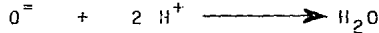
El FADH_2 de la flavoproteína se reoxida al transferir sus electrones al sistema de los citocromos. Un tipo de citocromos acepta, uno a uno, los electrones del FAD reducido. Como la oxidación del FADH_2 es una deshidrogenación, la transferencia de cada electrón se acompaña de la liberación de un ion hidrógeno:



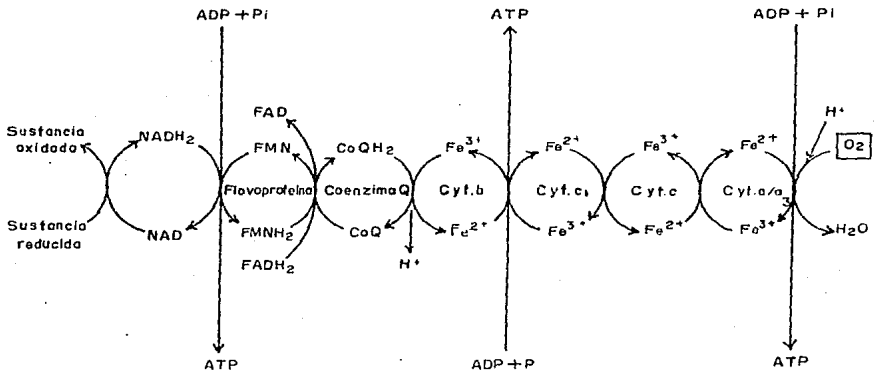
Los electrones se transfieren posteriormente de este citocromo a los componentes siguientes de la cadena, hasta que el último de ellos, la enzima especial llamada citocromo oxidasa, los cede al oxígeno. El ion Fe^{+2} de esta enzima se reoxida por el oxígeno molecular, que se reduce durante el proceso de acuerdo a la siguiente ecuación:



Los átomos de oxígeno reducido reaccionan con los protones (H^+) para formar agua:



La figura 4.2.a. muestra esquemáticamente el funcionamiento de un sistema de transporte de electrones.



4.3 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

El sistema de citocromos está compuesto por una serie de proteínas conjugadas, cada una de las cuales tiene firmemente unido un grupo ferro-porfirina llamado hemo y que constituye el centro activo de éstos (véase figura 4.3.a.)

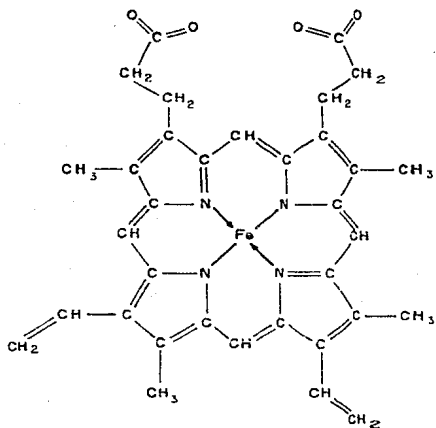
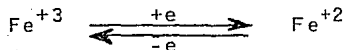


Figura 4.3.a. "Estructura del grupo hemo" [55].

El estado de oxidación del hierro puede ser +2 ó +3 pudiendo oxidarse o reducirse reversiblemente si se pierde o acepta electrones [12,43,55], como se observa en la siguiente

reacción:



de aquí que la importancia de los citocromos radica en su capacidad para actuar como intermediarios redox en la transferencia electrónica.

En el grupo hemo los cuatro ligantes de la porfirina forman un complejo de cuadrado plano con el fierro como se demues_ tra en la siguiente figura:

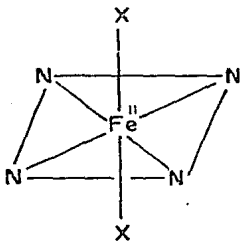


Figura 4.3.b. [70].

Si las posiciones quinta y sexta de coordinación del metal perpendiculares al plano del anillo de porfirina se encuen_ tran ocupadas por restos de a.a. específicos de las porfi_

rinas, la estructura resultante es un citocromo, lo cual se demuestra con la siguiente figura.

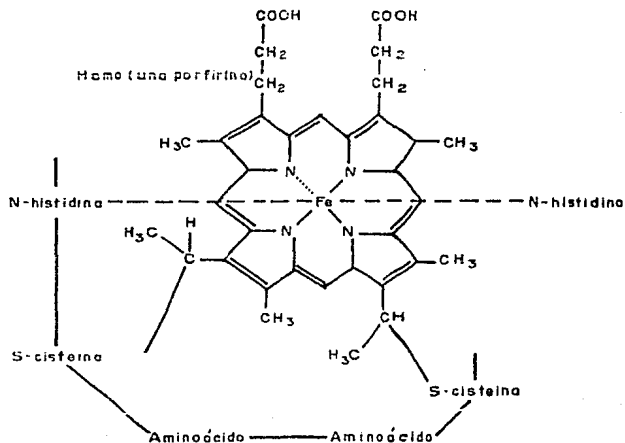


Figura No. 4.3.c. "Estructura del grupo prostético (porfirina) hemo del citocromo-c, indicando el modo en que se conecta el grupo prostético a la apoproteína" [12].

Y por lo tanto este tipo de citocromos no pueden unirse a ligantes tales como el oxígeno, CO o CN⁻; sin embargo, una excepción a ésto lo constituyen los citocromos a₃ de *Bacillus subtilis*; a₁ de *Acetobacter pasteurianum*, a₂ de *Proteus vulgaris*, c₃ de *Desulfovibrio desulfuricans* y/o *Acetobacter suboxidans* que debido a su función biológica se unen normalmente al oxígeno [70, 88, 110].

David Kellin en 1930 trabajando con levaduras [12] y con músculos intactos de insectos [70, 116], descubrió espectroscópicamente que los citocromos estaban constituidos por tres componentes diferentes a los cuales designó como a , b y c [12, 88, 103, 116] de acuerdo a sus bandas de máxima absorción. Así el citocromo a absorbe a una longitud de onda mayor y el citocromo c a una menor [70]. Cada tipo de citocromo en estado reducido exhibe tres bandas de absorción características en el espectro visible: α , β , y γ , también llamadas bandas de Soret, ello da lugar a una serie de diferencias en el espectro de absorción, que se identificaron en forma arbitraria como a_1 , a_2 , etc., lo cual se ejemplifica en la tabla 4.3.a. o también según su punto máximo de absorción por ejemplo c_{551} [25].

Tabla 4.3.a. " Algunos citocromos de bacterias "

CITOCROMO	ORIGEN	MAXIMOS REDUCIDOS DE ABSORCION		
		α	β	γ
a_1	<i>Escherichia coli</i>	590
a_2	<i>Azotobacter vinelandi</i> <i>Pseudomonas</i>	652	629	460
b_1	<i>Escherichia coli</i> <i>Azotobacter</i>	560	530	426
b_{562}	<i>Escherichia coli</i>	562	532	427
o	<i>Escherichia coli</i> <i>Acetobacter</i>	568
c_2	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	550	521	416
c_3	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	552	522	418
c_4	<i>Azotobacter</i>	551	522	418
c_5	<i>Azotobacter</i>	555	524	418
c_{551}	<i>Pseudomonas</i>	551	521	416
c_{552}	<i>Chromatium</i>	552	523	416
Citocromoide c	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	568	...	424
Citocromoide c	<i>Chromatium</i>	565	...	426
b_4	<i>Hemophilus micrococcus</i>	554	521	418

Aparte de sus espectros, se conoce poco acerca de las propiedades de la mayor parte de los citocromos bacterianos, ya que hasta la fecha algunos citocromos del tipo c y a se han logrado obtener con suficiente grado de pureza para poder determinar su potencial de óxido-reducción (véase tabla 4.3.b.). Se conocen varios citocromos que difieren en sus potenciales como lo muestra la siguiente figura :

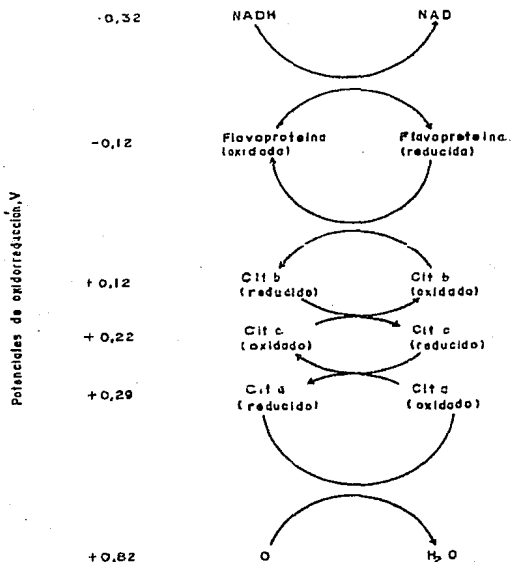


Figura 4.3.d. "El sistema integrado de citocromos que conduce a la oxidación del NADH por el O_2 . Los electrones son pasados de los componentes más electronegativos a los menos electronegativos, quedando cada uno sucesivamente reducido al aceptar electrones y oxidado al pasarlos al componente siguiente. [12]

Tabla 4.3.b. "Propiedades de los citocromos bacterianos"

Citocromos	Organismos	E'° (V)
a	<i>Bacillus subtilis</i>	+ 0.28 (?)
a ₁	<i>Acetobacter pasteurianum</i> <i>Proteus vulgaris</i> , etc.	?
a ₂	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Aerobacter aerogenes</i> , etc.	?
a ₃	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Sarcina lutea</i>	- 0.3 (?)
b	<i>Thiobacillus sp.</i>	?
b ₁	<i>Micrococcus denitrificans</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i>	?
b ₄	<i>Bacterias halotolerantes</i>	?
c	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+ 0.25
c	<i>Chromatium D</i>	+ 0.01
c ₁	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+ 0.23
c ₂	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	+ 0.32
c ₃	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	- 0.21
c ₄	<i>Azotobacter vinelandii</i>	+ 0.32
c ₅	<i>Azotobacter vinelandii</i>	+ 0.30
o	<i>Acetobacter suboxydans</i> <i>Micrococcus pyogenes</i>	?

Un citocromo puede transferir electrones a otro que tiene mayor potencial de óxido-reducción, y puede aceptar electrones de un citocromo más reducido [12], por ejemplo *Haerophilus parainfluenzae* tiene varios citocromos que actúan como una cadena de transporte de electrones en virtud de sus diferencias de potencial [13].

Los sistemas citocrómicos de las bacterias son de una diversidad extraordinaria; comprenden tanto citocromos semejantes a los de las eucariotas como citocromos típicamente bacterianos, los cuales pueden incluirse en los tres grupos clásicos (a, b y c); dichos sistemas se asocian formando una gran variedad de combinaciones, como se demuestra en la tabla 4.3.c. [es].

Tabla 4.3.c. "Citocromos bacterianos" [88]

Bacterias	Componentes citocrómicos
I. Aerobias estrictas o facultativas	
<i>Bacillus subtilis</i>	a, a ₃ , b, c, c ₁
<i>Sarcina lutea</i>	a, a ₃ , b, c
<i>Micrococcus pyogenes</i>	a, b, c, o
<i>Micrococcus denitrificans</i>	b ₁ , c
<i>Acetobacter suboxydans</i>	b, c, c ₁ , o
<i>Acetobacter pasteurianum</i>	a ₁ , b, c, c ₁
<i>Acetobacter peroxydans</i>	a ₁ , a ₂ , a ₄ , b, c, c ₁
<i>Azotobacter vinelandii</i>	a ₁ , a ₂ , b ₁ , c ₄ , c ₅ , o
<i>Aerobacter aerogenes</i>	a ₁ , a ₂ , b ₁ , o
<i>Escherichia coli</i>	a ₁ , a ₂ , b ₁ , o
<i>Pseudomona fluorescens</i>	a ₁ , a ₂ , b ₁ , c, c ₁
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	a ₃ , c
<i>Thiobacillus X</i>	b, c ₅₅₀ , c ₅₅₃ , c ₅₅₇
<i>Nitrobacter</i>	a, c
<i>Nitrosomonas europea</i>	b, c
<i>Hydrogenomonas cutropha</i>	c
<i>Zymomonas mobilis</i>	a ₂ , b, c
<i>Streptococcus faecalis</i>	nada de citocromos
II. Anaerobias estrictas	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	c ₃
<i>Chromatium D</i>	c
<i>Chlorobium limicola</i>	c

proteínas que tienen pequeñas similitudes además de uno o más grupos prostéticos hemo covalentemente unidos.

A través de métodos cristalográficos de alta resolución, los citocromos se limitan a una subclase de moléculas que generalmente se clasifican como:

- a) las que consisten de una sola cadena polipeptídica de 85 a 135 residuos conteniendo un grupo prostético hemo covalentemente unido cerca del NH_2 terminal.
- b) Las que tienen His y Met como ligantes de hierro hemo axial.
- c) Las que poseen potenciales relativamente altos de óxido-reducción en el rango de + 150 a + 380 mV [66].

La tabla 4.5.a. muestra las propiedades de los citocromos tipos c bacterianos que caen dentro de estas tres clasificaciones. El potencial tiene un intervalo de + 0.38 a - 0.22 V. y hay marcadas diferencias en las posiciones de las características de los máximos de la banda (α). Algunas de las preparaciones de los citocromos tienen puntos isoeléctricos ácidos o neutros y otros son básicos. Los P.M. se encuentran en un intervalo de 9 000 a 72 000, la mayoría de las moléculas tienen un sólo grupo hemo, pero algunas contienen 2 ó 3 hemos y en diversos casos también hay un grupo flavín presente. Todos los citocromos del tipo c absorben a una longitud de onda en un intervalo de 550 a 560 nm [31].

4.4 DEFINICION, FUNCION Y LOCALIZACION.

Los citocromos son un conjunto de compuestos que se distribuyen ampliamente en las células que consumen oxígeno y su función es la de transportar electrones [10]. Todas las bacterias aerobias estrictas y anaerobias facultativas poseen cadenas respiratorias de citocromos que aseguran la reoxidación de las enzimas flavínicas y piridínicas por el oxígeno. En los procariotes el sistema de transporte de electrones está unido a la membrana o bien son una parte integral de ella, ya que cuando se aíslan membranas completas, todos los citocromos se encuentran en esta fracción [12, 11]. Sin embargo, recientemente se demostró la presencia de tres citocromos en el espacio periplásmico de *Paracoccus denitrificans* [16].

4.5 TIPOS DE CITOCROMOS.

4.5.1. CITOCROMO c.

Un citocromo tipo c se define como una proteína que tiene uno o más grupos prostéticos protohemo IX covalentemente unidos a la cadena polipeptídica por ligantes tioéter resultado de la condensación de los grupos vinílicos hemo con los grupos sulfhidrilo polipeptídicos de la Cys. Estudios extensivos acerca de la secuencia de a.a. de los citocromos c procarióticos muestran que hay algunas subclases de estas

Tabla No. 4.5.a. "Propiedades de algunos citocromos c de procarriotes" [31]

Citocromo	Fuente	P.M.	pI	max.nm	No.gpos. hemo	Es/7 (v)
c	<i>Nitrobacter</i>			550		0.28
	<i>Rhodospirillum melischianum</i>	10 000	9.4	550	1	0.38
c ₂	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	13 000	6.1-6.4	550	1	0.32
	<i>Rhodospseudomonas sphaeroides</i>	13 000	7.9	550	1	0.35
	<i>Rhodospseudomonas potulensis</i>	20 000	9.0	552	1	0.35
	<i>Rhodospirillum melischianum</i>	13 400	9.4	550	1	0.29
	<i>Rhodospirillum vannielii</i>		7.0	550		0.30
c ₃	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	13 000	7.2	552-553	3	-0.20
	<i>Desulfovibrio gigas</i>		5.2	553		-0.22
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	13 000	10.0	552-553	3	
	<i>Desulfovibrio sulfatigenes</i>	14 000	10.8	552	3	-0.21
c ₄	<i>Azotobacter vineyardii</i>	24 000	4.5	551	2	0.30
c ₅₅₀	<i>Bacillus subtilis</i>	12 500	8.65	550	1	0.21
	<i>Spirillum litorale</i>	11 000	9.86	550	1	0.30
c ₅₅₁	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9 000	4.7	551	1	0.29
	<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	45 000- 60 000	6.0	551	2	0.14
c ₅₅₂	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (I)	8 400	4.0-6.6	552	1	0.28
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (III)	20 000	4.0-6.6	552	2	0.28
	<i>Escherichia coli</i>	12 000	4.1-4.7	552	1	-0.2
	<i>Chromatium</i>	72 000	5.1	552	2	0.01
c ₅₅₃	<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	50 000	6.7	553	1	0.10
	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	45 000		553	2	-0.10
	<i>Pseudomonas sphaeroides</i>	25 000		553	1	0.12
c ₅₅₄	<i>Bacillus subtilis</i>	14 000	4.4	554	1	-0.08
	<i>Azotobacter vineyardii</i>	24 000	4.3	554	2	0.32
c ₅₅₅	<i>Chlorobium thiosulfatophilum</i>	10 000	10.5	555	1	0.14
	<i>Catithidia fasciculata</i>	12 000	9.9	555	1	0.28
c ₅₅₀₋₅₅₃	<i>Chromatium</i>	13 000	4.38	550-553		0.33
c ₅₅₂₋₅₅₈	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	70 000				
c [*]	<i>Rhodospseudomonas potulensis</i>	20 000	9.0	550-560	1	0.10
cc [*]	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	27 000	5.5	550-560	2	0.00
	<i>Chromatium</i>	27 000	5.5	550-560	2	0.00
	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	28 000		550-560	2	0.12

4.5.2. CITOCROMO c_2

Los P.M. son del orden de 13 000 D, el punto isoeléctrico varía considerablemente y los valores de potencial son apreciablemente altos [21]. Estudios extensivos acerca del citocromo c_2 de *Rhodospirillum rubrum* afirman que el Fe del grupo hemo forma uniones coordinadas axialmente con dos fuertes campos ligantes: Un nitrógeno del imidazol de la His. y un $S^=$ de la Met resultando un complejo de hierro hemo de bajo spin que permanece plano tanto en estado oxidado como reducido (véase figura 4.5.b.).

Hay una serie de interacciones covalentes y de enlaces hidrógeno que sirven para impedir la rigidez del hemo cuando un extremo hidrofóbico se expone al disolvente; algunas de estas interacciones son notables ya que las secuencias de a.a. que se involucran son similares entre los citocromos c. Para *Rhodospirillum rubrum* esto incluye dos uniones de hidrógeno que se forman entre el trp 62 y la tir 48, y el propionato del hemo con un enlace de hidrógeno que se forma entre el quinto ligante hemo del imidazol de la His y el esqueleto carbonílico de la Pro 30, lo cual se ilustra en la figura 4.5.a.

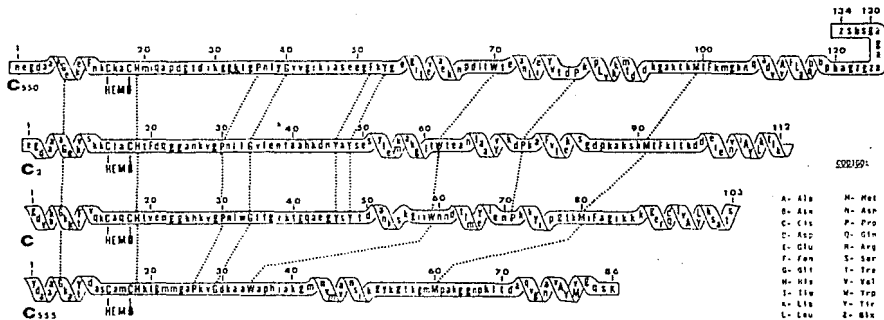


Figura No. 4.5.a.

El enlace hidrógeno que se forma entre el último propionato del hemo y el Trp 62 son de importancia particular en el mantenimiento de la integridad de la estructura molecular oxidada ya que estudios en la modificación química, indican que la interacción estructural de este residuo se acompaña de la pérdida del ligante de la Met del grupo hemo. Además de las interacciones hemo covalentes que ya se mencionaron, hay un

gran número de interacciones hemo hidrofóbicas no unidas que surgen de la serie de cadenas laterales de a.a. alifáticos y aromáticos internos. Los residuos aromáticos que se muestran en la figura 4.5.b, corresponden a *Rhodospirillum rubrum* Fen 20, Tir 46, 48, 60 y 107 Trp 62 y 93 y conservan su aromaticidad en todos los citocromos c de secuencia conocida. En contraste, la Tir 52 es única para citocromo c de *Rhodospirillum rubrum* esta posición secuencial la ocupan una variedad de a.a. en el citocromo c afín.

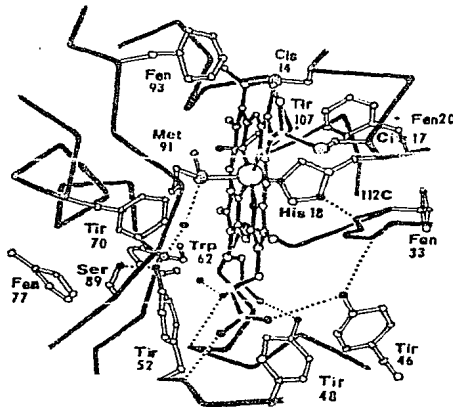


Figura No.4.5.b. "Citocromo c de *Rhodospirillum rubrum*" [88].

La serie de a.a. aromáticos y alifáticos al lado de las cadenas adyacentes al hemo son un medio muy hidrofóbico. Esta condición, junto con la naturaleza del ligante de hierro probablemente explique el alto potencial de óxido-reducción del citocromo c. Se cree que estos potenciales reflejan la dificultad del acomodo de una carga positiva en el hemo del ferricitocromo el cual consecuentemente tiende a incrementar su afinidad por un electrón reducido [**].

4.5.3. CITOCROMO c_3 .

Postgate en 1954 encontró en *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris* y *Desulfovibrio salixigenes* (bacterias sulfatoreductoras) un citocromo al que denominó c_3 , el cual se reoxida rápidamente por el aire y cuyo potencial es sumamente electronegativo. Este citocromo posee tres grupos hemo/ molécula de apoproteína [31, 32]. El P.M. es del orden de 13 000 a 14 000 D y sus máximos de la banda (α) están entre 552-553 nm. a pH neutro. Los estudios de Ambler demostraron que la secuencia de a.a. de las proteínas de *Desulfovibrio vulgaris* contienen solamente dos regiones correspondientes a aquéllas que comúnmente proveen los puentes de Cis y los residuos de His coordinados de los citocromos c: Cis-A-B-Cis-His-; sin embargo, también hay dos regiones del tipo -Cis-A-B-C-D-Cis-His- en la cadena. Estudios de D.C. de esta proteína así como de las moléculas de *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio salixigenes*, sugieren que los grupos hemo se localizan, en cada caso, en medios sustancialmente equivalentes. Se supone que a pH neutro cada uno de los hemo tiene una cadena lateral de His unida al átomo de Fe, pero poco se sabe acerca de la naturaleza del grupo en la posición trans. En vista de los potenciales de óxido-reducción bajos, este ligante podría ser diferente a un grupo tioéter y en efecto, se encontró que al menos uno de los citocromos c_3 no tiene residuos de Met presentes. Posiblemente el complejo corresponda al arreglo -His-hemo-His [31].

4.5.4. CITOCROMO c' y cc'.

Algunas de las proteínas de tipo c más atípicas, son aquellas designadas como c' y cc' dichas moléculas tienen grupos hemo unidos covalentemente, pero carecen de las propiedades del hemocromo familiar de los citocromos c.

Mucho de lo que se conoce acerca de este sistema viene del trabajo de Kamen y Horio. Los citocromos c' son proteínas de una sola cadena con un grupo hemo/molécula [31]. La preparación de *Rhodopseudomonas palustris*, la cual se examinó extensivamente, tiene un P.M. de menos de 20 000, un punto isoeléctrico alcalino y un valor de $E_o' = 0.1$ V.

Los citocromos cc' son también proteínas de cadena simple, pero contienen dos grupos hemo cada uno. Ellos tienen un P.M. entre 27 000 y 30 000 D.; puntos isoeléctricos cercanos a pH 5.5 y valores de E_o' de aproximadamente 0 a 0.1 V. Los estudios de la secuencia de un péptido dihemo de 27 residuos del citocromo cc' de *Chromatium*, sugiere que los grupos hemo se unen a la cadena de péptidos muy cercanos uno del otro. Se cree que un sitio de unión involucra la secuencia Cis-A-B-Cis-His en la posición 5-9 del péptido. El otro puede involucrar la secuencia -Lis-Cis-His- en las posiciones 19-21. Ningún otro residuo de Cis está disponible, y se sugiere que el segundo grupo hemo puede unirse al péptido a través de una unión simple tioéter o quizá un puente tioéter y una unión éter involucrando a la cadena lateral de la Tre.

Es claro que la localización de los grupos hemo en términos de posiciones de secuencia no implican necesariamente proximidad espacial. En efecto los estudios de D.C. y D.O.R. no dan evidencia de interacción hemo-hemo.

Los citocromos c' y cc' difieren en mucho de sus propiedades, pero exhiben una absorción similar en los espectros D.C. y D.O.R.. Las curvas de absorción de las formas reducidas carecen de carácter hemocromo y tienen una banda que se divide en la región de Soret. Las especies oxidadas dan espectros indicativos de un carácter mixto de alto y bajo spin. El carácter de alto spin de los ferricitocromos cc' disminuye con el incremento de la temperatura. Los resultados de la espectroscopía de Mössbauer sugieren que los dos grupos hemo de los citocromos cc' de *Chromatium* y *Rhodospirillum rubrum*, están cada uno de ellos sujetos a efectos ligantes similares y que las especies oxidadas de alto spin tienen una configuración electrónica altamente distorsionada [31].

Un estudio reciente sobre la unión de CO al ferricitocromo c' de *Chromatium vinosum*, por medio de métodos de equilibrio de alta precisión demostraron que estas propiedades de unión son diferentes a las que exhibe el citocromo c' de *Rhodospirillum rubrum* [12].

4.5.5. CITOCROMO c_{550} , c_{551} , c_{552} , c_{555}

Paracoccus denitrificans cuando crece sobre metanol o metilamina sintetiza tres citocromos tipo c solubles periplásmicos: c_{550} , c_{551} , c_{553} [53]. Las propiedades físicas de estos tres se resumen en la tabla 4.5.b.

Tabla No. 4.5.b. "Propiedades de los citocromos tipo c periplasmicos" [53].

Citocromo	P.M.	pI	$\lambda_{max.}$		unión CO
			forma reducida	forma oxidada	
			nm (mM cm)		
c_{550}	15 000	4.5	550(30.2) 521(17.7) 415(148.4)	410(122.4)	No
c_{551}	22 000	3.5	551(23.3) 521(15.3) 416(138.2)	409(102.0)	No
c_{553}	30 000	3.8	553(22.2) 523(15.7) 418(134.0)	413(116.0)	Si

La estructura molecular del citocromo c_{550} de esta bacteria es muy similar a la de *Rhodospirillum rubrum* (véase figura

4.5.b.].

Por otra parte, el citocromo c_{550} que se aisló de *Thiocapsa roseopersicina*; se caracteriza por ser termoestable y reducir al sulfuro a temperaturas de 80°C a 100°C. El citocromo c_{552} aislado de *Thermus thermophilus* es también termoestable [s].

Estudios cristalográficos de baja resolución y análisis basados en la secuencia de a.a. para el citocromo c_{551} de las *Pseudomonas* y citocromo c_{555} de *Chlorobium thiosulphatophilum*, revelaron que estas moléculas están compuestas de una cadena polipeptídica con estructura secundaria (α) helicoidal que involucra al grupo prostético hemo. Una comparación total de la secuencia entre estos citocromos c se da en la figura 4.5.a..

4.5.6. CITOCROMO b.

Los citocromos b se caracterizan por:

- A) Un grupo prostético protohemo (figura 4.5.c.) el cual no se unió covalentemente a la proteína vía cadenas laterales de porfirina.
- B) Presenta un máximo en la banda α en 556-558nm cuando el espectro de la forma reducida se determina en presencia de piridina a un pH alcalino. Los miembros de este grupo se distribuyen ampliamente y, en el caso de bacterias, varían en estructura y propiedades. Muchos de ellos se encuentran

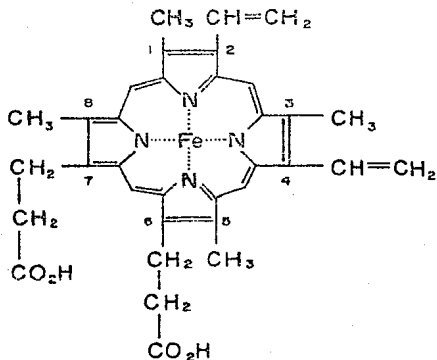


Figura No.4.5.c. "Estructura. del Protohemo" [31].

firmemente unidos y son difíciles de disolver en medios acuosos. [31].

4.5.7. CITOCROMO b_{562} .

La fracción soluble que se obtiene de las células respiratorias de *Escherichia coli*, contiene al citocromo b_{562} el cual tiene un potencial de óxido-reducción de 0.11 V. a pH 7.0 cuyo valor es más elevado que la mayoría del grupo b. Las posiciones de las bandas de absorción en las regiones de Soret y visible se indican en la tabla 4.5.c.

Tabla No. 4.5.c. "Máxima absorción de algunos citocromos b" [31].

Citocromo	λ				
	Forma reducida		Forma oxidada		
	visible	soret	visible	soret	
b	562	532	429	538	418
b ₅₆₂	562	531	427	531	418
b ₅	556	526	423	530	413
b ₅₅₅	555	528	424	530	414
b ₂	556	528	424	530-560	413

El grupo prostético puede removerse por medio de un procedimiento acetona-ácida y cuando el protohemo se vuelve agregar a la apoproteína en una proporción 1:1 se obtiene un producto con propiedades similares a aquéllas de la molécula b₅₆₂ original.

La secuencia de a.a. se muestra en la figura 4.5.d. son similares a las de la hemoglobina y mioglobina. Especialmente en la vecindad de los residuos de His del citocromo y se sugiere que ellos pueden ser los grupos coordinados al átomo de hierro en el grupo hemo [31].

Ala. Asp. Leu. Glu. Asp. Asp. Met. Gln. Tre. Leu. Asp. Asp. Asn. Leu. Ile. Val. Ile. Glu. Lis. 10
5 15

Ala. (Asx. Asx. Glx.) - Lis. Ala. Asn. Asp. Ala. Ala. Gln. Val. Lis. Leu. Lis. Met. Arg. Ala. 25
20 30 35

Ala. Ala. Leu. Asn. Ala. Gln. Lis. Lis. Ala. Tre. Pro. Pro. Lis. Leu. Glu. Asp. Lis. Ser. Pro. 40
45 50 55

Asn. Ser. Gln. Pro. Met. Lis. Asp. Fen. Arg. His. Gln. Fen. Asp. Ile. Leu. Val. Gln. Glu. Ile. 60
65 70 75

Asp. Asp. Ala. Leu. Lis. Leu. Ala. Asn. Glu. Gln. Lis. Val. Lis. Glu. Ala. Gln. Ala. Ala. Glu. 80
85 90

Ala. Gln. Leu. Lis. Tre. Tre. Arg. Asn. Ala. Tyr. Lis. His. Gln. Lis. Tyr. Arg. 95
100 105 110

Figura No. 4.5.d. "Secuencia de aminoácidos del citocromo b₅₆₂ de *Escherichia coli*"
{ 31 }.

4.5.8. CITOCROMO OXIDASA.

Dentro de los citocromos oxidasa bacterianos que hasta hoy se conocen se encuentran el a , a_2 , a_3 , aa_3 , d y o ; éstos los sintetizan las bacterias de acuerdo a las diferentes condiciones de crecimiento. Como se sabe, estos citocromos son los últimos miembros de la cadena respiratoria que ceden los electrones al O_2 [25].

Investigaciones recientes demostraron la presencia de dos complejos tipo $b-d$, que actúan también como oxidases terminales. El primer complejo $b_{558}-d$ se localizó en el interior de la membrana de *Escherichia coli* y se determinó por métodos cromatográficos, y el segundo complejo $b_{560}-d$, se aisló de *Photobacterium phophreum* y se caracterizó por electroforesis [69].

El citocromo oxidasa más común en las bacterias es el citocromo o , éste tiene la propiedad de combinarse reversiblemente con el CO . Sin embargo, no pertenece al grupo de los citocromos a , ya que posee un grupo prostético protohemínico análogo al de los citocromos c . Los citocromos d y o transfieren los electrones al O_2 de una manera diferente al citocromo aa_3 , ya que estudios de resonancia Raman confirman que los primeros forman un intermediario estable con el O_2 que impide que la transferencia electrónica sea tan rápida como sucede con el citocromo aa_3 quien no forma un intermediario [25, 54].

Durante muchos años se creyó que los citocromos α y α_3 constituirían dos unidades separadas, ya que sus hemo reaccionan de modo diferente con el CN^- y con el CO y poseen diferentes espectros. Sin embargo, se tiene ya por cierto, que los citocromos α y α_3 se hallan combinados en una gran molécula proteica oligomérica cuyos hemo son químicamente idénticos, pero difieren en su reactividad hacia ciertos ligantes. Este complejo se conoce como citocromo $\alpha\alpha_3$. Su P.M. es de cerca de 200 000 y contiene cierto número de subunidades, de diferente tamaño molecular. La enzima posee dos moléculas de hemo A y dos átomos de cobre, se cree que estos dos átomos de cobre dan señales de resonancia de espín electrónico características y experimentan transiciones de Cu^{+2} a Cu^{+1} durante el transporte electrónico; catalizan la transferencia de electrones desde el hemo α_3 al oxígeno. En contraste se llevo a cabo un experimento con *Paracoccus denitrificans* con el cual se confirmó la ausencia de Cu^{+2} en el citocromo $\alpha\alpha_3$ y la necesidad del Mn^{+2} para la síntesis de éste [54, 70].

Por último se conocen varias sustancias químicas y antibióticos que inhiben el transporte de electrones entre las que se encuentran CO, N_3^- , CN^- , antimicina A y oligomicina, que reaccionan de la siguiente manera:

- CO, se combina directamente con el citocromo terminal o impide la unión del oxígeno.
- CN^- y N_3^- , se unen estrechamente al fierro del anillo porfirínico de los citocromos e impiden su función redox.

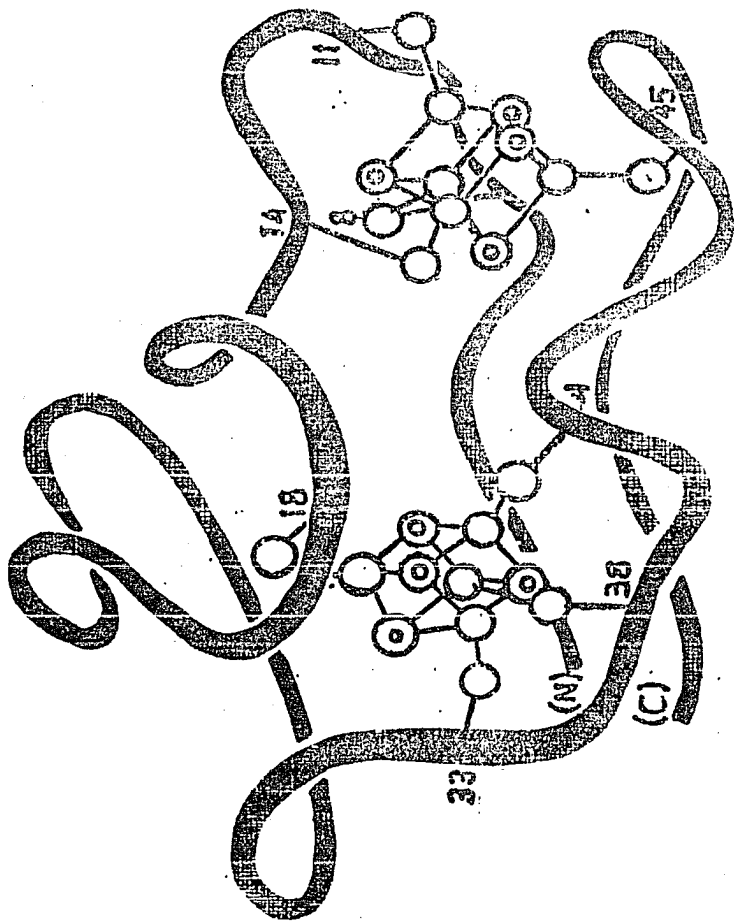
- Antimicina A, inhibe el transporte de electrones entre el citocromo b y c.
- Oligomicina, inhibe el transporte de electrones entre cito cromos específicos [12].

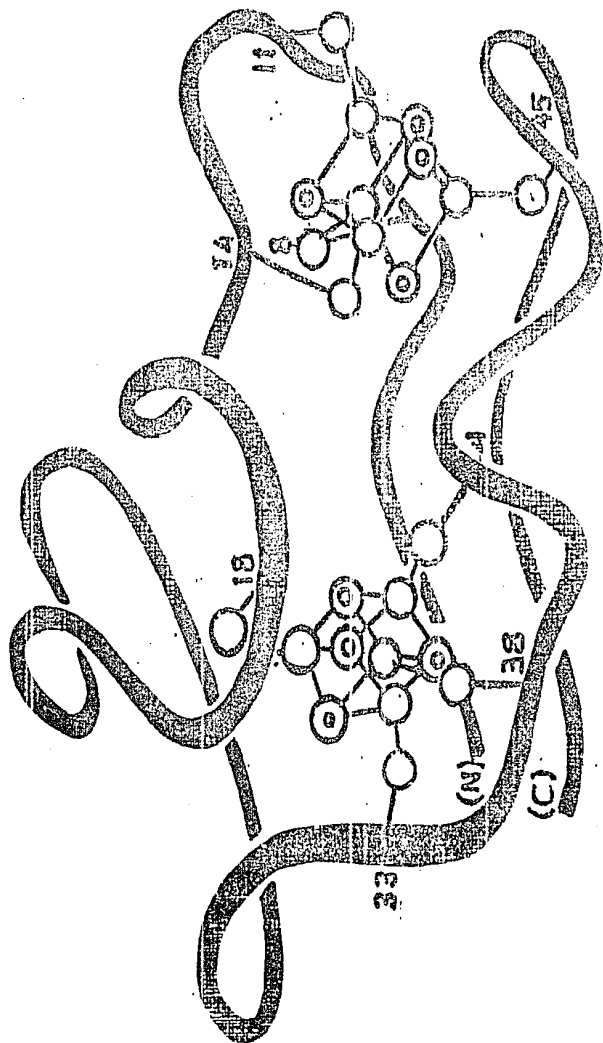
CAPITULO V.

F E R R E D O X I N A S

Si tus proyectos son para un año, siembra grano,
Si son para diez años, planta un árbol,
Si son para cien años, instruye al pueblo.
Sembrando grano una vez, recogerás una vez
Plantando un árbol, recogerás diez veces
Instruyendo a un pueblo, recogerás cien veces

Kuan Tsu.





5.1 GENERALIDADES.

Las proteínas fierro-azufre están involucradas en una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo transferencia de electrones en fotosíntesis, reducción de nitritos, hidroxilación de esteroides y fosforilación oxidativa en mitocondria. Se encuentran en bacterias, plantas y animales [**].

Estas proteínas han sido clasificadas en cuatro tipos: las rubredoxinas, las ferredoxinas "tipo planta", las ferredoxinas "tipo bacteriano" y las proteínas fierro de alto potencial (HiPiP). Véase tabla 5.1.a. [v].

Tabla 5.1.a. "Proteínas azufre-fierro"

Proteína	Fuente	P.M.
Rubredoxina (1 Fe)	<i>C. pasteurianum</i>	6 000
Ferredoxina planta (2Fe-2S)	Espinaca	10 600
Ferredoxina bacteriana (más de 2 átom. de Fe-S)	<i>C. pasteurianum</i>	6 000
	<i>Desulfovibrio gigas</i>	6 000
	<i>Chromatium</i>	10 000
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	13 000
	<i>Bacillus</i>	
	<i>Peptococcus aerogenes</i>	6 000
HiPiP (8Fe-8S)	<i>Chromatium</i>	9 600

Las rubredoxinas son la clase más simple de estas proteínas, contienen un átomo de Fe/mol de proteína, éste se encuentra unido a cuatro átomos de Cis [53].

A la ferredoxina "tipo planta", llamada así por el hecho de que este tipo de ferredoxina fué aislada originalmente de - cloroplastos, pero su propiedad distintiva es la presencia - de 2 átomos de Fe y 2 de S/molécula de proteína.

Las ferredoxinas "tipo bacteriano" contienen más de 2 átomos de Fe y S/molécula de proteína, así como azufre lábil, el - cual es inestable cuando el pH es ácido, dando H₂S.

Las proteínas hierro de alto potencial, también contienen - azufre lábil, pero es un poco más estable que el de las fe - rredoxinas en presencia de ácido, un ejemplo de estas proteí - nas lo constituye la HiPiP de *Chromatium*, que tiene un poten - cial redox de +350 mV; es diamagnética cuando está reducida y paramagnética cuando está oxidada, teniendo un valor de - g de aproximadamente 2 [5].

5.2 CLASIFICACION Y NOMENCLATURA DE LAS FERREDOXINAS.

Buchanan y Arnon [13], proponen por analogía con los citocromos, designar a cada tipo de ferredoxina con una letra, modificada por un número subscripto para denotar propiedades distintas dentro de un tipo dado.

Como se muestra en la tabla 5.2.a., la ferredoxina tipo clostridial, se designó como ferredoxina a. La ferredoxina de *Chromatium*, una variante dentro de este tipo, se le considera a₁. La segunda clase de ferredoxinas son las de tipo cloroplasto, que se designaron ferredoxinas b y la más reciente adición, la del tipo *Azotobacter*, la cual no está completamente caracterizada, podría denominarse ferredoxina c, ya que tiene diversas propiedades que justifican que sea designada provisionalmente como un tercer tipo de ferredoxina. Esta última, puede ser el tipo de ferredoxina presente en todos los aerobios fijadores de nitrógeno [13].

Las propiedades de las ferredoxina a, b y c se resumen en la tabla 5.2.a.

Tabla No. 5.2.a. "Sistema de nomenclatura para las ferredoxinas"
[19].

Clase	Localización	Tipo representativo	Características
Ferredoxina α	Bacterias anaeróbicas verdes fotosintéticas y fermentativas (no fotosintéticas).	<i>Clostridium pasteurianum</i>	Máximo de absorción a 390, 290 $m\mu$; P.M. 6 000; contiene más de dos grupos de hierro y azufre por molécula.
Ferredoxina α_1	Bacterias anaeróbicas azufre púrpura fotosintéticas.	<i>Cytromatium</i>	Máximo de absorción a 385, 280 $m\mu$; P.M. 10 000 contiene de siete a ocho grupos de hierro y azufre por molécula.
Ferredoxina β	Algas y plantas superiores.	Cloroplastos de espinacas	Máximo de absorción a 465, 425, 325, 280 $m\mu$; P.M. 12 000; contiene dos grupos hierro y azufre por molécula.
Ferredoxina γ	Bacterias anaeróbicas fijadoras de nitrógeno.	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Máximo de absorción a 400 $m\mu$; P.M. provisional 20 000; contiene seis grupos de hierro y azufre por molécula.

5.3 CARACTERISTICAS DE LAS FERREDOXINAS.

Las propiedades que distinguen a las ferredoxinas de otras proteínas Fe-S incluyen una composición y secuencia de a.a. característica, un P.M. bajo; un potencial de óxido-reducción cercano al del gas hidrógeno, y el hecho de que pueden sustituir a los cloroplastos lavados en la función de foto-reducir al NADP. Esta habilidad es una prueba útil en la identificación de las ferredoxinas. Todas las ferredoxinas aisladas hasta ahora, exhiben estas propiedades [13].

Las ferredoxinas han sido identificadas en diversas bacterias anaerobias que poseen una hidrogenasa y son capaces de desprender o consumir H_2 durante su metabolismo fermentativo, así como en bacterias fotosintéticas y en bacterias aerobias o anaerobias fijadoras de nitrógeno [13, 70, 110, 120]. Todas las ferredoxinas son paramagnéticas cuando están reducidas y dan una señal de RPE de $g=1.94$ a 1.96 , mientras que en la forma oxidada es diamagnética y el espectro de RPE es inactivo. Todas en la forma reducida, son agentes reductores de un electrón [9].

Tienen un potencial redox (-250 a -450 mV) menor al de todos los compuestos biológicos aceptores de electrones conocidos hasta la fecha [117].

Son proteínas que se requieren para las reacciones de transporte de electrones. Entre los procesos en que participan se encuentra la fotosíntesis, fijación de nitrógeno y en ciertas fases del metabolismo fermentativo [13, 70].

5.4 ESTRUCTURA, COMPOSICION Y SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LAS FERREDOXINAS.

Las ferredoxinas son proteínas no hemo que contienen agrupaciones de hierro y iones sulfuro en igual proporción. El sulfuro es conocido también como azufre lábil y designado S^* para distinguirlo del γ -tiolato de la Cis unido covalentemente [46]. Las agrupaciones FeS constituyen el centro activo de estas proteínas. Estos centros se unen a la proteína a través del ligante Cis para formar lo que se conoce como grupo cromóforo, ver figura 5.4.a. [46, 53].

El grupo cromóforo hallado en las ferredoxinas bacterianas es $Fe_4S_4^*-4Cis$ (ver tabla 5.4.a). Se sabe que éste transfiere sólo un electrón [46].

El ligante Cis que se une al metal en el grupo cromóforo, se expone parcialmente al medio y podría proveer un camino para el acceso de electrones [46].

Estudios realizados en la ferredoxina de *Clostridium pasteurianum* han aportado datos importantes sobre esta proteína. Contiene 8 átomos gramo de Fe^{+3} , 8 átomos gramo de S^* /mol de proteína; además contiene 8 residuos de Cis agrupados en dos series de cuatro y cada residuo está separado por dos y tres residuos de a.a. en cada serie [13, 46].

Tabla 5.4.a. "Propiedades moleculares de algunas proteínas acarreadoras de electrones" [46].

Proteína	P.M.	Cofactores
Citocromos		
c (eucariótico)	13 000	1 hemo b
b ₅ (eucariótico)	11-12 000	1 hemo b
c ₃ (<i>Desulfovibrio vulgaris</i>)	14 000	4 hemo b
Proteínas azul-cobre		
Estelacianina (árbol de laca)	20 000	1 Cu
Plastocianina (espinaca)	21 000	2 Cu
(haba francesa)	11 000	1 Cu
Azurin (<i>Pseudomonas</i> , <i>Bordetella</i>)	16 000	1 Cu
Proteínas Hierro-Azufre		
Ferredoxina "tipo planta"	10 050	1 Fe ₂ S ₂ * ₄ Cis
Adrenoxina (adrenal complejo P450)	13 090	1 Fe ₂ S ₂ * ₄ Cis
Putidaredoxina (<i>Pseudomonas putida</i>)	12 000	1 Fe ₂ S ₂ * ₄ Cis
Ferredoxinas bacterianas (<i>Clostridium pasteurianum</i>)	6 000	2 Fe ₄ S ₄ * ₄ Cis
(<i>Desulfovibrio gigas</i>)	6 000	1 Fe ₄ S ₄ * ₄ Cis
HiPiP (<i>Chromatium</i> (<i>Chromatium</i>))	9 600	1 Fe ₄ S ₄ * ₄ Cis
Rubredoxina (<i>Micrococcus aerogenes</i>)	6 380	1 Fe ₄ Cis
(<i>Pseudomonas oleovorans</i>)	19 000	2 Fe ₄ Cis

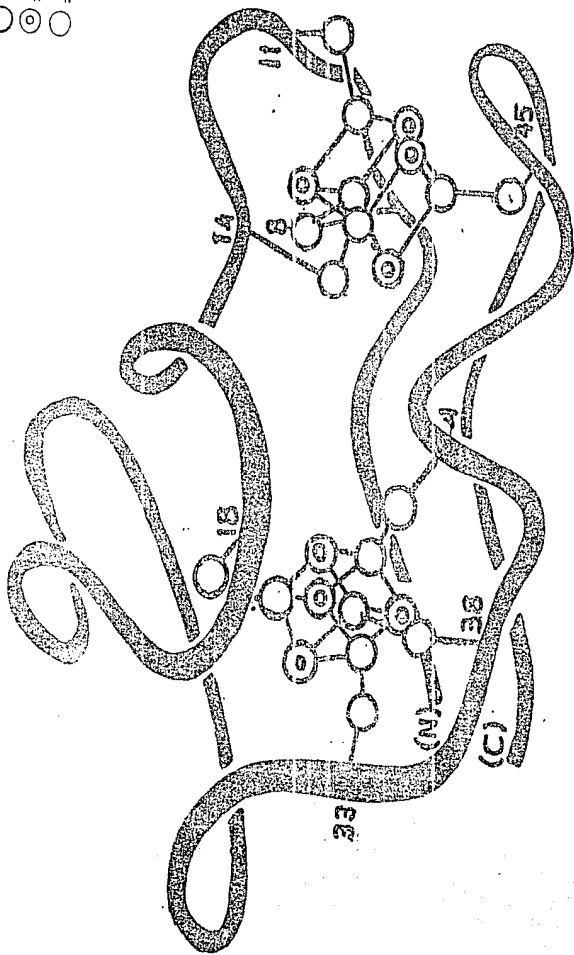
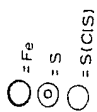


Figura No. 5.4.a. "Estructura cristalina del cromóforo de la ferredoxina de *Micrococcus aerogenes*, mostrando dos agrupaciones Fe-S^x unidas a 6 ligantes de Cys" [10].

Por otro lado, estudios realizados en la ferredoxina de *Peptococcus aerogenes*, indican que esta proteína se caracteriza por su bajo potencial redox cerca de -0.4 V y por la presencia de 8 átomos de Fe, 8 de S^* y 8 Cis/molécula [62]. Los resultados obtenidos de estudios de R-X y de mapas de densidad electrónica indicaron que esta ferredoxina muestra dos centros $4Fe-4S^*$ separados uno del otro por 12 \AA (ver siguiente figura).

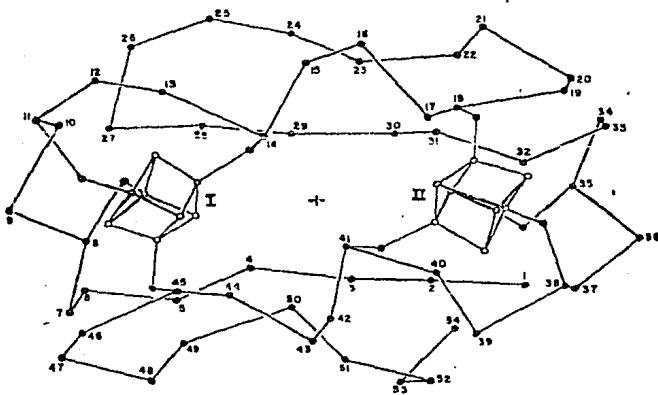


Figura No. 5.4.b. "Posiciones de los puntos Car -
bón \odot , azufre-cisteína \otimes ; hierro \odot , y azu -
fre inorgánico \circ , mostrando aproximadamente la
doble simetría de la ferredoxina bacteriana" [62].

Los 8 átomos de cada centro se localizan, aproximadamente, en las esquinas de un cubo, cada Fe se une con tres S* contiguos; esta estructura aproximadamente cúbica se completa por un enlace entre cada átomo de Fe y S* de un residuo de Cis. Así la coordinación entre el Fe y el átomo de S* es un tetraedro. La figura 5.4.c. demuestra esta relación.

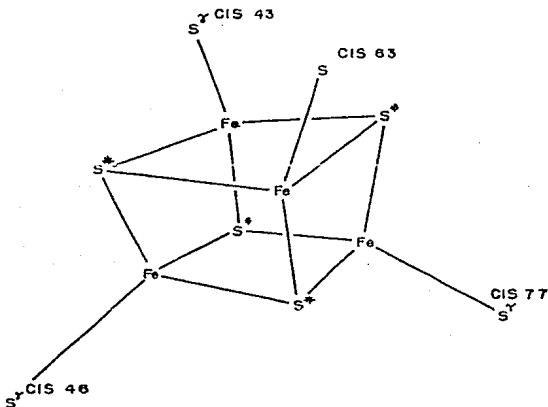


Figura No. 5.4.c.

El tamaño pequeño y la relativa facilidad de purificación y cristalización de las ferredoxinas hacen más adecuado el trabajo sobre la composición y secuencia de a.a. de estas proteínas.

Muchas ferredoxinas bacterianas son similares en su contenido de a.a. La composición de éstos para las ferredoxinas de

Tabla No. 5.4.b. "Composición de aminoácidos de ferredoxinas bacterianas" [13].

Aminoácidos	Bacterias anaeróbicas fermentativas ^a										Bacterias fotosintéticas ^b			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Lisina	1	0	0	1	0	2	3	2	1	2	0	0	0	2
Histidina	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2
Arginina	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
Triptofano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Acido Aspártico	8	8	9	5	7	3	5	4	8	11	3	3	6-7	8
Treonina	1	1	3	1	2	1	3	3	0	0	4	3	4	6
Serina	5	4	3	4	4	2	1	1	5	3	2	3	2	4
Acido glutámico	4	4	5	7	6	5	7	7	4	10	7-8	9	9	16
Prolina	3	4	3	3	3	2	2	3	5	4	4	4	3	5
Glicina	4	4	5	4	4	6	5	5	4	2	4	4	4	5
Alanina	8	8	7	7	7	14	8	9	7	6	11	9	8	3
1/2 Cistina	8	8	8	6	7	(5)	8	8	8	5	7-8	7-8	8	3
Valina	6	6	6	5	4	5	4	4	4	6	3	4	5	6
Metionina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1
Isoleucina	5	4	4	5	5	0	4	4	5	6	4	4	4	6
Leucina	0	0	0	1	1	0	1	1	1	2	1	2	2	3
Tirosina	1	2	0	1	1	2	1	1	2	0	2	3	3	3
Fenilalanina	1	0	2	2	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	55	55	55	52	52	47	55	55	54	61	53-56	55-56	58-59	81

^aOrganismos: 1 *C. pasteurianum*; 2, *C. acidi urici*; 3, *C. butylicum*; 4, *C. cylindrosporum*; 5, *C. tetanomorphum*; 6, *Methanobacillus omeiensis*; 7, *C. toxtaxovorum*; 8, *C. thiosulfatophilum*; 9, *Micrococcus aerogenes*; 10, *Desulfotributatio gigas*.

^bOrganismos: 11, *C. thiosulfatophilum*; 12, *C. thiosulfatophilum*, cepa 8327; 13, *Chloropsseudomonas ethylicum*; 14, *Chromatium*, cepa D.

Tabla No. 5.4.c. "Comparación de la secuencia de aminoácidos de ferredoxinas bacterianas, usando la ferredoxina de *Clostridium pasteurianum* como estándar" [19].

(7)	(10)	(20)							
I. Ala-Tir-Lis-Ile---Ala-Asp-Ser-Cis-Val-Ser-Cis-Gli-Ala-Gis-Ala-Ser-Glu-Cis-Pro-Val-Asn-Ala-Ile-Ser-Gln-Gli-Asp-Ser.									
II. Pen-Val	Asn			Gli		Ser	Treo	Treo	
III. Val	Asn	Ile-Ala	Lis-Pro				Gln		
IV. Val	Asn-Glu-Ala	Ile	Asp-Pro		Asp				
(30)	(40)	(50)							
I. Ile-Pen-Val-Ile-Asp-Ala-Asp-Treo-Cis-Ile-Asp-Cis-Gli-Asn-Cis-Ala-Asn-Val-Cis-Pro-Val-Gli-Ala-Pro-Val-Gli-Glu-COOH-									
II. Gln								Asn	
III. Tir-Ala	Ser	Ser	Ser	Ser				Asn-Pro	
IV. Arg-Tir			Ala	Gli		Asp			Gln-Ala

La secuencia completa para la ferredoxina de *C. pasteurianum* es dada. Para las otras, sólo los diferentes a.a. para el loci correspondiente son mostradas. I, Ferredoxina de *C. pasteurianum*; II, Ferredoxina de *C. butylcum*; III, Ferredoxina de *Micobacterium neoaurum*; IV, Ferredoxina de *C. acidithiobacillus*.

a la orilla de la superficie de la molécula, se sugiere que los grupos R se puedan involucrar en la transferencia de dos electrones para este tipo de molécula [62].

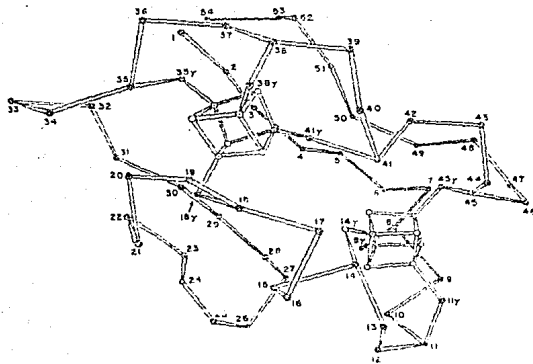


Figura No. 5.4.d. "Posiciones de los puntos del C^{α} , Fe y S en la molécula de ferredoxina de *P. aerogenes*; Fe, \bigcirc ; Azufre labil, \otimes ; Cis-S \bigcirc y C^{α} \odot [62].

5.5 OTRAS PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DE LAS FERREDOXINAS.

En el estado oxidado, todas las **ferredoxinas** son proteínas coloreadas. La figura 5.5.a., muestra el espectro de absorción U.V. y visible de las **ferredoxinas** de *Clostridium pasteurianum* y *Chromatium*.

Las **ferredoxinas** de estas bacterias muestran un sólo pico en la región visible a 390 ó 385 nm y un pico en la región U.V. cerca de los 280 nm. Del mismo modo que las **ferredoxinas** de las bacterias anaérobicas mencionadas arriba, la **ferredoxina** de la bacteria aeróbica *Azotobacter vinelandii* muestra un máximo en la región visible alrededor de 400 nm (figura 5.5.a).

Las **ferredoxinas** de cinco especies clostridiales tienen esencialmente las mismas propiedades químicas y catalíticas incluyendo un máximo de absorción a 390 nm como se muestra en la figura 5.5.b.

El pico a 390 nm se anula cuando la **ferredoxina** se reduce. Estas cinco **ferredoxinas** clostridiales (*C. pasteurianum*, *C. tetanomorphum*, *C. cylindrosporum*, *C. acidurici* y *C. butyricum*) exhibieron distinta absorción específica de cada especie en las regiones U.V. a 280 y 300 nm (figura 5.5.b), lo cual indicó ciertas diferencias estructurales en las **ferredoxinas** de las diferentes especies bacterianas [110].

Figura No. 5.5.a.

ESPECTROS DE ABSORCION

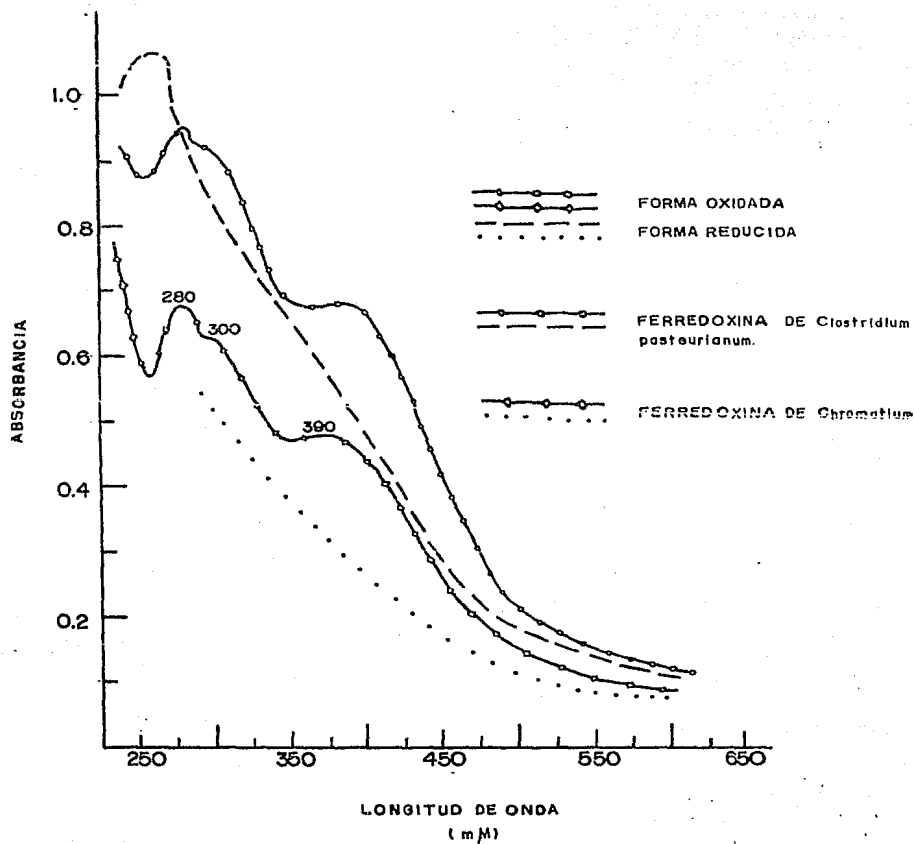
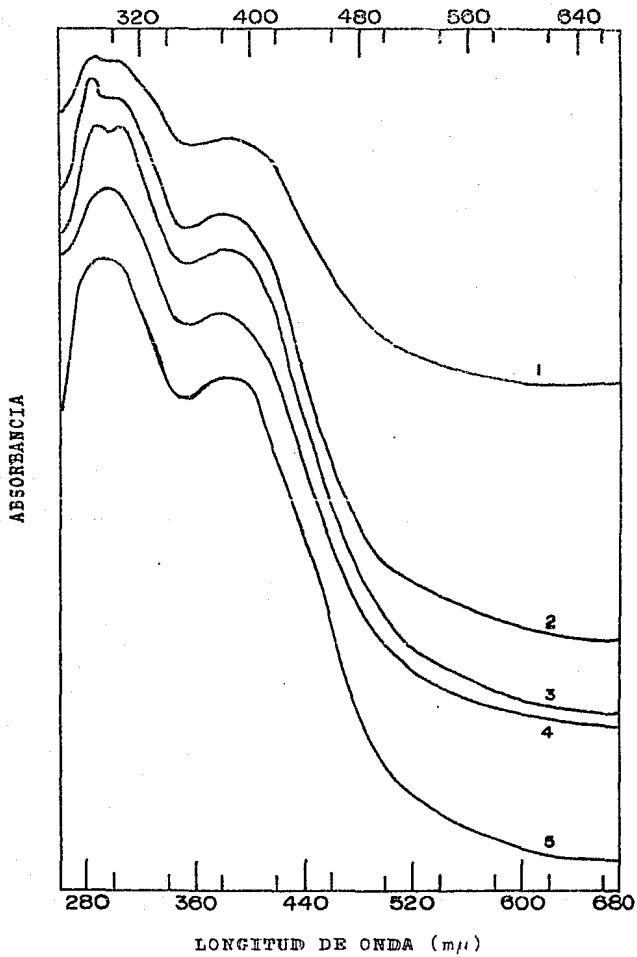


Figura No. 5.5.b



Una de las propiedades más sobresalientes de las ferredoxinas es su potencial de óxido-reducción muy bajo, el cual se debe a la unión del Fe a un grupo fuertemente reductor como lo es el azufre [25].

Otras propiedades generales de las ferredoxinas son su D.O.R y su espectro de D.C. Los cromóforos de éstas dan efectos dispersos en ambos, pero son compatibles con los cambios vistos en el medio ambiente del grupo cromóforo ocurrido en la reducción de la proteína, aunque la naturaleza de estos cambios no ha sido elucidada. Los pequeños efectos de D.O.R. en la región U.V. observados con ferredoxinas bacterianas pueden reflejar un bajo grado de heliticidad en estas proteínas, lo cual es compatible con su bajo P.M. La tabla 5.5.a. muestra el contenido de S y Fe, P.M. y otras propiedades de las ferredoxinas bacterianas [13].

Tabla No. 5.5.a. "Algunas propiedades químicas de las ferredoxinas" [13].

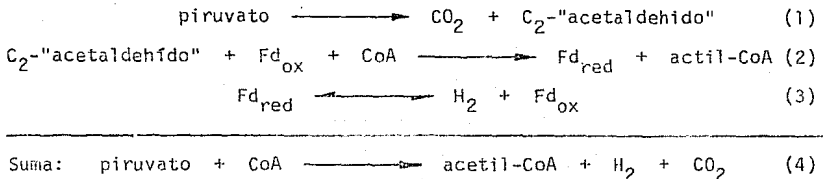
Propiedad química	<i>Clostridium pasteurianum</i>	<i>Chromatium</i> cepa D	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Color	café	café	café
P.M.	6 000	10 000	20 000
Potencial redox (mV a pH 7)	-390	-490	-390(?)
Hierro (átomos/molécula)	8	8	6
Azufre lábil (átomos/molécula)	8	8	6
Punto Isoeléctrico	3.7	-	-
Electrones por molécula transferida en óxido-reducción.	1 6 2	1 6 2	-

5.6 PAPEL DE LA FERREDOXINA EN EL METABOLISMO FERMENTATIVO.

Las reacciones de las fermentaciones bacterianas y de la respiración emplean una gran variedad de cofactores. Entre éstos se incluyen: la Co-A, para la transferencia de acilos; - el pirofosfato de tiamina, para la transferencia de grupos - derivados de una cetona; la biotina, para la transferencia - de CO₂; el ácido lipoico, DPN, TPN, derivados de la riboflavina y citocromos, para la transferencia de hidrógeno y electrones.

La presencia de estos factores no es suficiente para explicar las reacciones que se desarrollan a un potencial de óxido-reducción muy bajo, por ejemplo, el desprendimiento de - gas H₂ por ciertos anaerobios (clostridios) ó la utilización de éste combustible para la respiración de otras bacterias - (metabolismo autotrófico). Estos procesos necesitan evidentemente la catálisis biológica de un cofactor que posee un potencial redox muy bajo, semejante al del electrodo de hidrógeno. Esta condición la reúnen las ferredoxinas [25], de tal manera que hacen posible la transferencia de electrones de - donadores de bajo potencial a compuestos aceptores de electrones, como los nucleótidos de piridina [13].

El papel de la ferredoxina en la bacteria fermentativa se - asocia, primero, con el desdoblamiento del piruvato, por una serie de reacciones que se presentan en las siguientes ecuaciones:

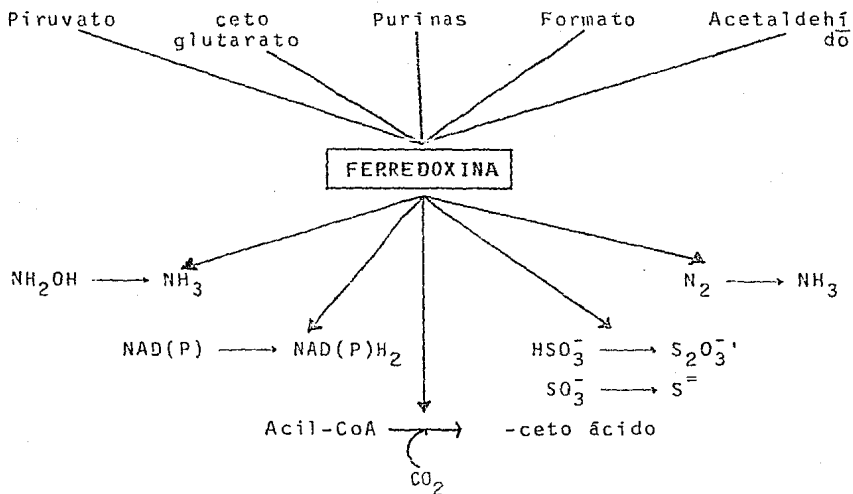


La reacción general (ecuación 4), depende de la ferredoxina sobre la pirúvico deshidrogenasa, catalizando las reacciones 1 y 2, mientras que la hidrogenasa cataliza la reacción 3.

Ocurre con frecuencia que un ceto-ácido, como el ácido pirúvico, sirva como un precursor de H₂, ya que es un buen donador electrónico. Se sabe que la hipoxantina, α-cetoglutarato, formato y acetaldehído, pueden ser también donadores electrónicos en la formación de H₂ [13, 110]. Como en el caso del piruvato, la formación de H₂ por estos compuestos requiere de ferredoxinas y una hidrogenasa específica que acopla la oxidación de cada compuesto para la reducción de la ferredoxina [13].

Aparte de la formación de hidrógeno, la ferredoxina reducida puede donar electrones a caminos biosintéticos alternativos en la bacteria fermentativa. La ferredoxina reducida puede servir como el donador de electrones para la reducción de NAD⁺, de hidroxilamina a NH₃, para la asimilación de CO₂ por medio de varias carboxilaciones reductoras: actil-CoA a piruvato, succinil-CoA a α-cetobutirato e isobutiril-CoA a

α -cetoisovalerato. La ferredoxina reducida también cede electrones para la reducción de sulfito a sulfuro y biosulfito a tiosulfato. El papel de las ferredoxinas, en estas reacciones, así como en las reacciones oxidativas de degradación, discutidas arriba, se resumen en el siguiente esquema:



Esquema No. 5.6.a. "Papel de la ferredoxina en el metabolismo fermentativo" [13].

5.7 PAPEL DE LA FERREDOXINA EN LA FIJACION DE NITROGENO.

Experimentos realizados por Mortenson y colaboradores [70], demostraron que la ferredoxina aislada de *Clostridium pasteurianum* era esencial para la fijación de nitrógeno por funcionar como transportador de electrones hacia la nitrogenasa.

El modo de acción de la ferredoxina hacia el sistema nitrogenasa se encuentra todavía bajo investigación, pero un mecanismo hipotético se muestra en la figura que se señala a continuación:

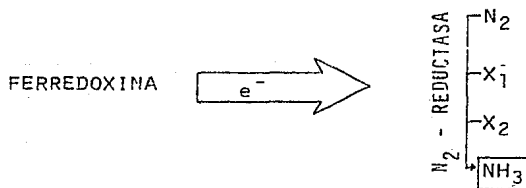


Figura No. 5.7.a. "Esquema hipotético para la fijación de nitrógeno involucrando la ferredoxina y la N₂-reductasa" [110].

ción de carga en el centro de reacción de ésta y al cargarse positivamente sirva como trampa de electrones o como agente oxidante fuerte.

El electrón, en este caso la fuente de energía, es transferido a la ferredoxina; en seguida pasa sucesivamente a ubiquinona, citocromo *b* y citocromo *f* y de este último vuelve a la bacterioclorofila cargado positivamente.

Durante el paso entre el citocromo *b* y el citocromo *f*, ocurre la fosforilación con la generación de ATP a partir de ADP y Pi. Esencialmente, el electrón ha hecho un recorrido circular que empieza en la clorofila y retorna a ésta. El proceso completo se llama fosforilación cíclica (ver figura) [80].

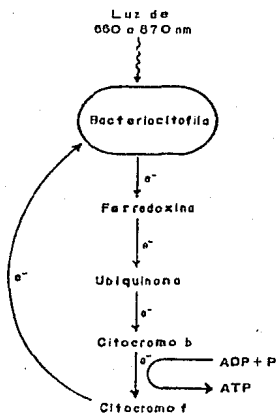


Figura No. 5.7.b. "

CAPITULO VI.

NITROGENASA

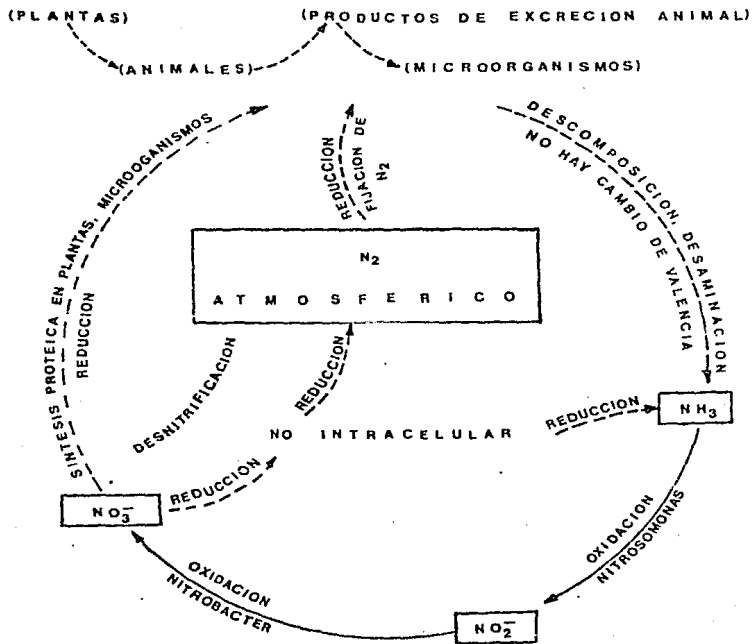
All the nitrogen in the world found in different nitrogenous compounds has its origin in the atmosphere, and ... by far the greater part of it has been formed - through the activity of microorganisms.

A. I. Virtanen (1947)

NITROGENO ORGANICO REDUCIDO EN

LA SUSTANCIA VIVA

(por ejemplo: grupos-NH- de las proteínas)



6.1 GENERALIDADES.

El nitrógeno es un constituyente de muchos compuestos naturales; experimenta transformaciones biológicas que indican una serie de cambios químicos efectuados por diversos organismos para formar así un patrón cíclico. El "ciclo del nitrógeno" representa la transformación del N_2 inorgánico a N_2 orgánico. En este ciclo las sales de amonio se convierten en nitratos (NO_3^-) vía un número de intermediarios por acción de los microorganismos en el proceso de la nitrificación, en el cual el NO_3^- se asimila por las plantas para construir moléculas orgánicas. Las especies superiores se alimentan de estas plantas y convierten tales moléculas en compuestos más complejos. Dentro de este ciclo ocurre también el proceso de desnitrificación cuando los NO_3^- se reducen por acción de los microorganismos, así cierta cantidad de N_2 se pierde en la atmósfera y cuando regresa se fija y se convierte en amoníaco por la acción de varias bacterias.

El "ciclo del nitrógeno" es de vital importancia en la agricultura para el suministro de NO_3^- solubles. Aunque el N_2 se puede fijar industrialmente por numerosas vías (de las cuales el proceso Haber es el más importante), es de gran interés investigar el mecanismo de la fijación biológica del N_2 , en parte con la esperanza de establecer nuevos procesos comercialmente viables y también para aumentar el conocimiento

de los procesos químicos y bioquímicos fundamentales que involucra [13].

Cabe mencionar que los estudios sobre el proceso de la fijación del nitrógeno se iniciaron cuando la enzima bacteriana nitrogenasa se extrajo en forma activa y el primer complejo, dinitrógeno-metal de transición fué aislado y caracterizado [14].

NITRÓGENO ORGÁNICO REDUCIDO EN
 LA SUSTANCIA VIVA
 (por ejemplo: grupos-NH- de las proteínas)

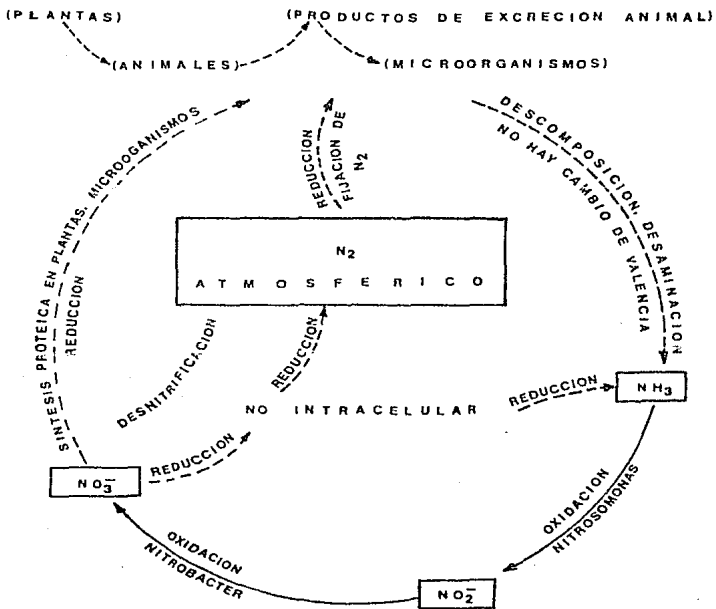


Figura 6.1.a. "Ciclo del Nitrógeno" [81]

6.2 MICROBIOLOGIA DEL SUELO.

Pocos ambientes tienen una gran variedad de microorganismos como el suelo, ya que es una mezcla microscópica formada por miles de millones de bacterias, hongos, algas, protozoos y virus en cada gramo de suelo. Las tablas 6.2.a. y 6.2.b. ejemplifican la diversidad de la microbiota en el suelo.

Tabla No. 6.2.a. "Población microbiana en un suelo agrícola fértil" [%].

Tipo	Número/gr.
Bacteria	
Cuenta directa	2 500 000 000
Cuenta en placa por dilución	15 000 000
Actinomicetos	700 000
Hongos	400 000
Algas	50 000
Protozoos	30 000

Tabla No. 6.2.b. "Grupos fisiológicos de bacterias en varios tipos de suelo (número de bacterias por gramo de suelo)" [10].

	Tipo de suelo		
	Jardin	Campo	Pradera
Bacterias metabolizadoras de urea	37 000	8 500	5 200
Bacterias desnitrificantes	830	400	850
Bacterias metabolizadoras de pectina	535 000	70 000	235 000
Bacterias anaerobias ácido butíricas	368 000	50 300	83 500
Bacterias anaerobias metabolizadoras de proteínas.	35 000	22 000	36 800
Bacterias anaerobias metabolizadoras de celulosa	367	350	367
Bacterias anaerobias fijadoras de nitrógeno	5 500	700	370 000
Bacterias aerobias fijadoras de nitrógeno	2 350	1 885	18
Bacterias nitrificantes	880	1 701	37

Martin Beijerinck y Sergio Winogradsky, microbiólogos del suelo, dirigieron sus investigaciones a los procesos naturales; el último descubrió el tipo autotrófico de vida entre las bacterias y dilucidó el papel de éstas como transformadoras de los compuestos nitrogenados y azufrados que hay en el suelo, mientras que Beijerinck aisló bacterias de los nodu -

los de las leguminosas y demostró que ellas eran capaces de producir éstos, él llamó a estas bacterias *Bacillus radicola* actualmente se les conoce como especies de *Rhizobium* [10].

Los microorganismos fijadores de nitrógeno se clasifican en dos grupos principales:

(1) Bacterias libres (asimbióticas).

Un ejemplo bien conocido es *Azotobacter*, pero ésta es atípica, en el sentido de que es un microorganismo aeróbico y por lo tanto requiere de oxígeno. Hay una gran variedad de especies anaerobias que fijan N_2 en ausencia de O_2 , entre las que se incluye *Clostridium pasteurianum*, en la que se realizaron los primeros estudios de fijación de N_2 . Un tercer tipo de bacterias pertenecientes a este grupo, lo constituyen las facultativas, que sólo fijan N_2 cuando crecen en ausencia de O_2 , así que la bioquímica de este grupo dependerá de estas condiciones. La dependencia general de la ausencia de O_2 parece intuitivamente razonable, ya que el proceso es altamente reductor.

(2) Microorganismos simbióticos.

Estos fijan N_2 en asociación con plantas; por ejemplo, *Rhizobium* se asocia con los nódulos que se encuentran sobre las raíces de plantas leguminosas. En este caso, las bacterias invaden las raíces y estimulan en las mismas la formación de nódulos, que son una especie de tumor benigno (figura 6.2.a).

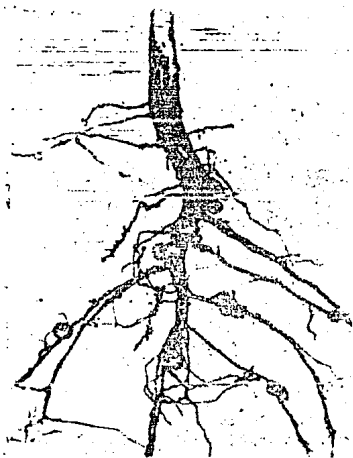


Figura No. 6.2.a. "Raíces de soja con nódulos formados por bacterias fijadoras de N_2 "

La combinación de las células de la leguminosa y las bacterias puede fijar el nitrógeno atmosférico (cosa que no puede ser realizada por ninguno de los dos componentes aislados). Los líquenes constituyen otro ejemplo, ya que hay una combinación de un hongo y una alga azul-verde fijadora de N_2 . En general, se tienen menos progresos en este proceso con bacterias simbióticas. Una característica común de estos sistemas de nódulos radiculares es la presencia de una proteína que se denomina leghemoglobina (es parecida a la hemoglobina y posee un átomo de Fe^{+2} /mol). Parece que hay una correlación entre la presencia de ésta y las propiedades fijadoras de N_2 se cree que su función es atrapar cualquier molécula de O_2 que se encuentre presente en el medio, y de ese modo, prote-

ge a la **nitrogenasa**, la cual no puede operar en presencia de O_2 . Por otra parte, permite tener una reserva de O_2 a fin de que se realice la respiración y se suministre energía para - que continúe el proceso de fijación [55].

La siguiente tabla resume algunos sistemas biológicos fijadores de N_2 .

Tabla No. 6.2.c. "Algunos sistemas biológicos fijadores de N_2 " [55].

Asimbióticos	Simbióticas
(a) Anaeróbicas <i>C. pasteurianum</i> <i>Chromatium</i> <i>Chlorobium</i> (fotosintética) <i>Methanobacterium</i> <i>Desulfovibrio sp.</i>	(a) Nódulos radiculares leguminosas, <i>Rhizobium</i> y leguminosas. Microorganismos y árboles o arbustos.
(b) Aeróbicas <i>Azotobacter</i> Anabena (fotosintética) <i>Azotomonas</i> <i>Nocardia</i> <i>Pseudomonas</i>	(b) Nódulos de hojas bacterias y hojas de <i>Psychotria emetica</i> .
(c) Facultativas <i>Klebsiella sp.</i> , <i>B. polymyxa</i> <i>Rhodospirillum</i> (fotosintética)	(c) Liqueenes Anabena, <i>Tolypothrix</i> y hongos.
	(d) Micorriza de pinos, hongos y árboles.

6.3 FIJACION BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO.

La fijación biológica del dinitrógeno corresponde a una reducción biológica del mismo; se trata específicamente de la conversión del N_2 a $2NH_3$. El catalizador biológico de la reacción se conoce como nitrogenasa [9, 14, 15, 16, 31, 38, 51, 52, 53, 59, 60, 66, 67, 79, 108, 109] y la evolución de este proceso se concibe como una respuesta biológica a una necesidad para el reciclaje biosférico del N_2 [31].

Los conocimientos actuales sobre las nitrogenasas de diversos orígenes, permite la siguiente definición general:

"Las nitrogenasas son complejos de proteínas Fe-Mo y Fe cuyas síntesis se reprimen por la presencia de N_2 fijado y sus actividades acoplan la hidrólisis del ATP a la transferencia de electrones para la reducción del N_2 , siendo el H_2 un inhibidor competitivo para la reacción de este último y el CO un inhibidor de todas las demás reducciones excepto la del H_3O^+ " [31]. La siguiente figura muestra las diversas reacciones catalizadas por la enzima. El ATP es un requerimiento absoluto para la reducción y éste se hidroliza a ADP y PPI.

De una amplia gama de agentes fijadores de N_2 en la naturaleza, los organismos más fuertemente investigados a nivel molecular son: *Clostridium pasteurianum* [51, 52] y *Azotobacter vinelandii* [14, 79]; ambos representan los extremos aeróbico y anaeróbico y por lo tanto proveen una fuente de información

importante acerca de esta enzima.

Estudios con otros microorganismos aerobios como *Micobacterium flavum*; anaerobios facultativos como *Klebsiella pneumoniae* [59, 60, 108, 109] y *Escherichia coli* [66, 67]; bacterias fotosintéticas como *Chromatium* y *Rhodospirillum rubrum* y ultimamente algas azul-verde (*Anabaena cylindrica*) ofrecen un gran apoyo a las investigaciones que se realizan.

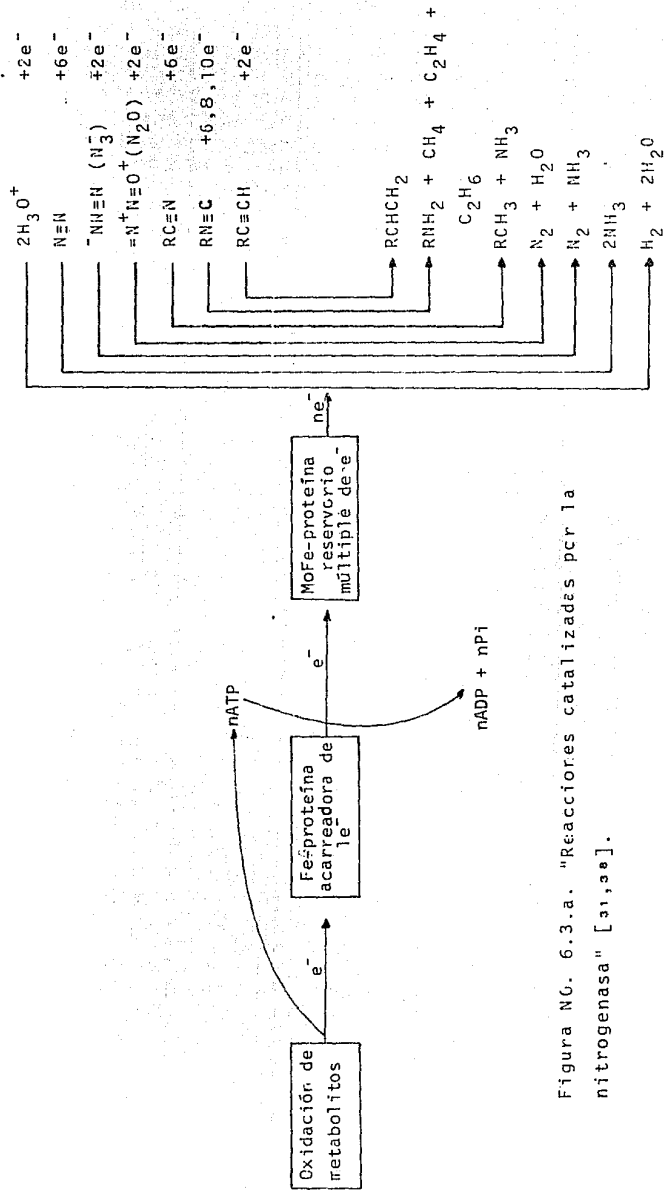


Figura NG. 6.3.a. "Reacciones catalizadas por la nitrogenasa" [31,33].

6.4 CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS DE LA NITROGENASA.

La enzima es un complejo de dos proteínas no hemo diferentes [10], una de ellas contiene Mo y Fe y la otra Fe y S. En su estructura completa hay dos átomos de Mo, de 30 a 32 átomos de Fe y un número aproximadamente igual de iones S^{-2} [10].

La proteína Mo-Fe, componente I ó dinitrogenasa como también se le conoce, [50, 100], contiene el cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co) [51, 50, 100]. Es la más grande ya que su P.M. de 220 000-245 000 D así lo demuestra. Posee una estructura $\alpha_2\beta_2$, cuyas subunidades son ligeramente diferentes en tamaño [10, 37]. El FeMo-co es un grupo que contiene 1 átomo de Mo, 1 átomo de Fe y 6 átomos de S [14, 30, 51, 70] y se propone como el sitio activo para la reducción del N_2 [10, 53, 50]. El cofactor es capaz de activar extractos crudos de células mutantes UW45 de *Azotobacter vinelandii*. La RPE y la espectrofotometría de Mössbauer indican que el FeMo-co es idéntico en todos los microorganismos que fijan N_2 [14].

La Fe-proteína, componente II ó dinitrógeno reductasa [100], tiene un P.M. de 60 000 a 67 000 D [10, 30]. Contiene dos subunidades y un grupo Fe_4-S_4 acomodado cúbicamente semejanado una jaula; actúa como un acarreador específico de electrones así como en el almacenamiento de ellos para la reducción.

Tanto el componente I, como el componente II son extremada -

mente sensibles al O_2 , especialmente la más pequeña y junto con el Mg-ATP (sal de monomagnesio de ATP) son necesarias para la actividad de la **nitrogenasa**. El pH para la actividad máxima varía, aunque generalmente es de 6 a 8.

Ni la FeMo-proteína ni la Fe-proteína poseen por sí solas actividad biológica. La contribución de ambas proteínas con fieren actividad a la **nitrogenasa**, aquélla se calcula a partir de la reacción en la que una de las proteínas es limitante y la otra se satura; así la actividad específica se expresa como la actividad del complejo de la **nitrogenasa**/min.mg. de proteína. Las actividades específicas de las **nitrogenasas** de *Azotobacter vinelandii* y clostridiales son de 225 y 175-225 μ moles de N_2 reducido/min.mg. de proteína respectivamente [11].

En los resultados que se obtuvieron por el estudio de la estructura fina por absorción de R-X de la proteína Fe-Mo sustituida, se considera que el Mo se rodea de 3 a 4 átomos de S a una distancia de 2.35 \AA , probablemente 1 ó 2 ó más S a 2.49 \AA y tal vez 2 átomos de Fe alojados del Mo a una distancia de 2.72 \AA . El dato de EXAFS reveló además de que no hay una interacción Mo=O en la enzima activa [18, 76]. La siguiente figura demuestra el acomodamiento del Mo entre los átomos de Fe y S..

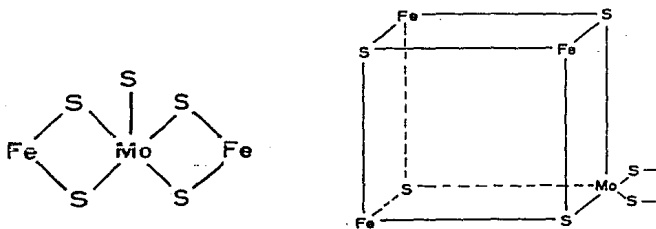


Figura No. 6.4.a. "Posición del Molibdeno en la proteína Fe-Mo"

6.5 MOLIBDENO, MOLIBDOENZIMAS Y SUS CARACTERISTICAS.

Numerosos estudios bioquímicos y genéticos [14, 66] establecen que las molibdoenzimas contienen el metal Mo fuertemente asociado. El Mo iónico, ya sea como catión o como molibdato, no exhibe o promueve alguna actividad catalítica o reguladora a los niveles en que se encuentra en las células [38]. Un listado de las molibdoenzimas que hasta hoy se conocen y las reacciones que ellas catalizan se presentan en la tabla 6.5.a.

De éstas, la xantino deshidrogenasa, aldehído oxidasa, purina hidroxilasa y piridoxal oxidasa se consideran molibdohidroxilasas [38]. Ellas se caracterizan por contener un cofactor molibdeno [51], que difiere del FeMo-co de la nitrogenasa [66] la cual expresa propiedades catalíticas y físicas diferentes a los Mo-cofactores de las otras molibdoenzimas [67].

Se reconoce en el campo de la agricultura la importancia biológica del Mo, ya que trazas de este metal son necesarias para la fijación del N_2 inorgánico en las plantas. Específicamente las enzimas responsables para el primer paso.

De la "fijación del nitrógeno" y asimilación de nitratos", contienen átomos de Mo como parte de sus sitios activos [11, 18]. Muchos animales superiores dependen de cantidades traza

Tabla No. 6.5.a. "Enzimas de diversos orígenes -
que contienen molibdeno" [38].

Enzima	Origen	Reacción catalizada	Otros grupos prostéticos
Sulfito oxidasa	bacterias animales	$\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{SO}_3 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$	hemo, MPT
CO-deshidrogenasa	bacterias	$\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+$	FAD, Fe/S, MPT
Nitrato-reductasa asimilatoria	microorganismos	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	FAD, hemo, MPT
nitrato-reductasa respiratoria	bacterias	$\text{NO}_3^- + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	Fe/S, MPT
Formato-deshidro- genasa.	bacterias	$\text{HCOOH} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	Se, Fe/S, MPT
Nitrogenasa	microorganismos	$\text{N}_2 + 6\text{e}^- + 8\text{H}^+ \longrightarrow 2\text{NH}_4^+$	Fe/S

de Mo formando parte intrínseca de metaloenzimas que catalizan conversiones metabólicas importantes [15,73]. Normalmente, su concentración es baja y en el humano se encuentra en concentraciones relativamente altas tanto en hígado como en riñón.

En las molibdoenzimas el metal está presente en una asociación no directa con la proteína, pero si forma parte de una estructura compleja que contiene además otros componentes. La nitrogenasa es la única entre este tipo de enzimas donde el Mo se localiza formando parte de un complejo agrupamiento metálico que contiene también Fe y S como ya se mencionó. En las demás molibdoenzimas que se conocen, sea el que fuere el origen, el metal se presenta como parte del universo del cofactor Mo.

El Mo se encuentra en estas enzimas como parte de cofactores de bajo P.M. Los dos cofactores diferentes que contienen este metal se describen como: [15,60,109]

(a) Cofactor fierro-molibdeno (FeMo-co), el cual se encuentra solamente en la nitrogenasa y,

(b) Cofactor Molibdeno (Mo-co), que se encuentra en otras molibdoenzimas. Aquí el Mo se une a un pteridín sustituido que no contiene Fe [51].

El molibdato (MoO_4^{-2}) puede emplearse por las bacterias como origen de Mo para la síntesis de estos cofactores. Poco se -

conoce acerca de las reacciones que se requieren para la transformación del MoO_4^{2-} dentro de un cofactor activo [109].

Los dos cofactores Mo-co y FeMo-co se distinguen por su composición y por su comportamiento en sistemas específicos que se basan en ensayos genéticos y bioquímicos. Los ensayos para los dos cofactores implican mutantes que de otro modo, el "tipo silvestre" de los microorganismos serían incapaces para metabolizar un sustrato particular de una molibdoenzima. Ciertos mutantes poseen la habilidad para manufacturar la apoenzima. El cofactor se aísla de cualquier origen bacteriano y se inserta dentro de las apoenzimas de los organismos mutantes, restableciendo así el total de la actividad química. Este proceso se llama "complementación" y provee un examen estricto para demostrar la presencia de un cofactor en particular [11]. *Azotobacter vinelandii* UW45 fue el primer mutante carente de FeMo-co.

La técnica que se emplea con más frecuencia para comprobar los sitios Mo de las diversas enzimas es la RPE. Recientemente, el análisis de la estructura fina por absorción de R-X (EXAFS) se aplica al estudio de las molibdoenzimas, considerando el número y la naturaleza química de los átomos ligantes en el campo de coordinación de las diversas enzimas [11, 38].

6.6 SINTESIS DEL COFACTOR FIERRO MOLIBDENO.

La fijación del N_2 en *Klebsiella pneumoniae* requiere de la expresión coordinada de al menos 15 genes que se disponen en 7 operones que constituyen el grupo *ni_g*. El producto de 13 de estos genes ya se identificaron y su función corresponde a proteínas estructurales, reguladoras, transportadoras de electrones y enzimas para el procesamiento de la nitrogenasa [50].

Las dos subunidades del componente I son codificadas por los genes *ni_g K* y *ni_g D*, los cuales comparten un operón con el gene del componente II, el *ni_g H*.

Muy poco se conoce acerca del camino biosintético del FeMo-co y su inserción dentro del componente I de la enzima [50, 100]. Tres genes *ni_g* (*ni_g B*, *ni_g N*, *ni_g E*) [50, 100] se proponen como parte de este proceso, ya que extractos de células mutantes (*Ni_g⁻*) [100] con lesiones en estos genes sintetizan el componente I de la nitrogenasa sin cofactor, la cual puede activarse in vitro por la adición de FeMo-co purificado [50, 100].

Por otra parte, estudios recientes [50, 100, 100], proponen que el gene *ni_g Q* juega un papel en la fijación del N_2 y que la esencialidad de su función depende de la concentración de Mo [50]. Los mutantes *ni_g Q⁻* requieren grandes cantidades de MoO_4^{2-} en el medio de cultivo para suprimir el fenotipo de la mutación [100].

6.7 ACUMULACION DE MOLIBDENO.

La acumulación de Mo parece ser un fenómeno regulado y su control se correlaciona con la expresión de los genes que se involucran en el sistema fijador de N_2 . Las propiedades de acumulación de Mo de *Clostridium pasteurianum* y *Klebsiella pneumoniae* parece ser bastante diferente. Sin embargo, las cinéticas de acumulación de Mo y la síntesis de la **nitrogenasa** en ambos microorganismos se correlacionan.

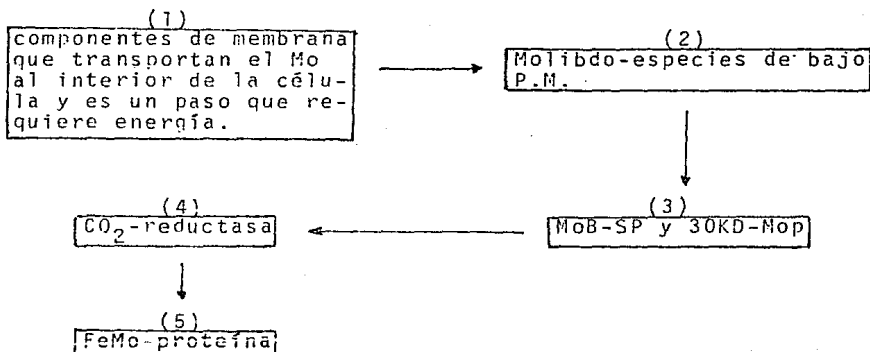
Se ha propuesto que *Klebsiella pneumoniae* contiene los cuatro productos de los genes *nif* necesarios para la síntesis del único cofactor Fe-Mo de la **nitrogenasa**. En contraste, el proceso de acumulación de Mo en *Azotobacter vinelandii* parece ser completamente no regulada. Aquí niveles altos de Mo se acumulan ya sea que las células crezcan sobre N_2 o bien NH_3 . Este microorganismo posee también una proteína que almacena Mo (y W) que permite almacenar tanto metal como se requiera para la síntesis de la **nitrogenasa**. Se propone que que esta proteína almacenadora de Mo en *Azotobacter vinelandii* es el primer paso en el camino metabólico del mismo y juega un papel regulador en la síntesis de la proteína Fe-Mo de la **nitrogenasa**.

Recientemente se reportó [51] que el incremento de la acumulación de Mo por *Clostridium pasteurianum* bajo condiciones -

fijadoras de N_2 , es el resultado de la incorporación del metal dentro de seis molibdoproteínas. Dos de ellas corresponden a molibdoenzimas, la FeMo-proteína (que contiene el FeMo-co) y la formato-deshidrogenasa (que contiene el Mo-cc). Las otras cuatro molibdoespecies son: la proteína que almacena Mo unido (MoB-SP); la molibdoproteína de 30 Kilo-Dalton (Mop-30KD); especies Mo de bajo P.M. y especies Mo de elevado P.M. que se encuentran suspendidas en la membrana. Se sospecha que cada una se relaciona con el procesamiento del Mo [s_1, s_2] como MoO_4^{-2} para su eventual inserción dentro de las molibdoenzimas (nitrogenasa y formato-deshidrogenasa).

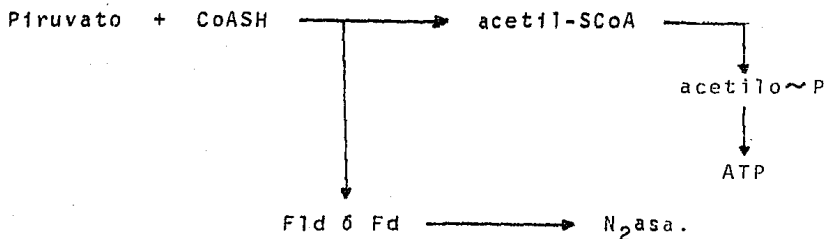
La observación de que el hacinamiento de Mo en *Clostridium pasteurianum* se incrementa antes de que se detecte la actividad de la nitrogenasa permite proponer la siguiente hipótesis: "el procesamiento del Mo puede tener intermediarios estables que posiblemente sean "molibdoproteínas" [s_1]. Estudios de este microorganismo durante el estado de crecimiento constante sobre NH_3 indican que la bacteria acumula la mayor parte de Mo que proviene como MoO_4^{-2} y lo distribuye entre las molibdoespecies de bajo P.M. que se localizan en la membrana. El aumento en la acumulación del Mo, probablemente representa el inicio de la desrepresión de la nitrogenasa. Los niveles de CO_2 reductasa (o formato-deshidrogenasa) se incrementan justo antes de la desrepresión de la enzima, pero la razón de su incremento se desconoce.

Los resultados que ofrecen los procedimientos que emplean -- pulsos radioactivos con la incorporación de $^{99}\text{MoO}_4^{-2}$ indican que el Mo se acumula durante la desrepresión de la nitrogenosa y parece que se incorpora dentro de las molibdoproteínas en la siguiente secuencia:



La segunda y tercera de estas proteínas son los candidatos más probables para involucrarse en el procesamiento del MoO_4^{-2} para su eventual incorporación a las molibdo-proteínas.

Por otra parte, bajo condiciones de crecimiento limitante en Mo, las células prefieren desviar el metal a la síntesis de la proteína FeMo a expensas de las otras molibdo-proteínas. Una vez que se sintetiza aquella, el Mo disponible determina el nivel de las otras molibdo-proteínas [52].



Es únicamente en este sistema, en donde el piruvato es la fuente natural de transferencia de electrones para la fijación del N_2 que se ha definido hasta ahora, aunque también el NADH funciona como tal [70].

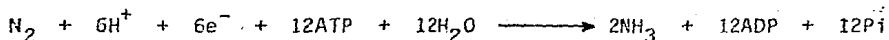
La utilización del ATP por la nitrogenasa depende de la transferencia electrónica [31]. Las funciones para el ATP incluyen:

- (1) Activación de electrones,
- (2) Activación de Fd,
- (3) cambio conformacional del sitio dinuclear de la nitrogenasa para acomodarse a la molécula N-N,
- (4) Deshidratación de un sitio nitrogenasa que involucra una reacción sensible al H_2O .

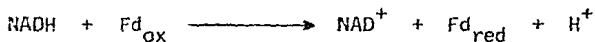
El siguiente esquema muestra los pasos que probablemente se involucran en la actividad de la nitrogenasa, pero la secuencia aún no se establece con firmeza.

combinen en una relación 2:1 en la reacción fijadora de N_2 , así los dos átomos de Mo utilizando sus estados de oxidación +3/+6, podrían, en principio, suministrar los seis electrones rápidamente al N_2 [3]. Para cada electrón que se transfiere se requiere por lo menos de una molécula de ATP. De hecho, ya se demostró experimentalmente que hacen falta dos moléculas de ATP por cada electrón transferido.

Finalmente, el MgADP, el Pi, el amoníaco y el hidrógeno se producen mientras que las proteínas regeneran sus niveles de oxidación originales [18]. Por lo tanto, la reacción global es la siguiente:



La regeneración de la Fd reducida tiene efecto gracias a la enzima NADH-ferredoxina-reductasa.

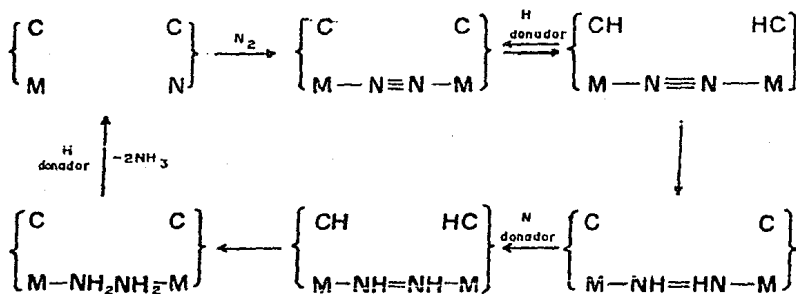


ó bien por el sistema de la piruvato-deshidrogenasa.

El mecanismo de acción para el centro FeMo-co en la nitrogenasa aún se investiga [21], sin embargo, se proponen modelos cinéticos que involucran la reducción del FeMo-co por transferencias sucesivas de electrones desde el grupo Fe-S. Estas "bombas de electrones" deben reducir al FeMo-co en un cierto nivel antes de que se una al N_2 y proceda la reducción del -

mismo [15].

Se sugieren rutas tanto oxidativas como reductivas para la fijación biológica del N_2 . Algunos de ellos involucran un sitio dinuclear con varios modos de enlace para el N_2 (figura 6.8.a). Los átomos ligantes facilitan la transferencia de átomos de hidrógeno a la molécula de N_2 , con la consecuente liberación de amoniaco y la regeneración del sitio activo [].



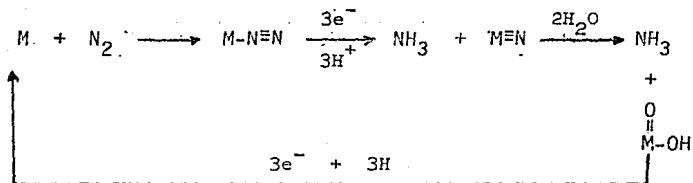
M=metal; N=nitrógeno; C=carbono; H=protones.

Figura No. 6.8.a. "Un esquema para la actividad de la nitrogenasa" [53].

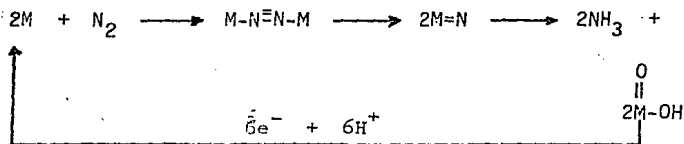
Solamente, dos mecanismos básicos, ambos reductores, se consideran como probables. Una ruta involucra la reducción biológica de N_2 a NH_3 vía un nitruro intermediario, mientras que el otro involucra intermediarios hidrazina y/o diazina. Las propuestas específicas para cada ruta se presentan a continuación [31]:

(1) Nitruro.

El mecanismo más simple que se propone para la fijación del N_2 asume nitruros metálicos como intermediarios. En una variante el N_2 se coordina a un único átomo metálico y seis electrones se introducen en este paso.



Otro mecanismo propuesto involucra seis electrones que son suministrados simultáneamente a partir de dos átomos metálicos:



(2) Diazina y/o hidrazina.

El mecanismo propone los siguientes requerimientos para la nitrogenasa:

- (a) Un sitio dinuclear en un medio acuoso,
- (b) Dos átomos metálicos que puedan formar los dos enlaces -

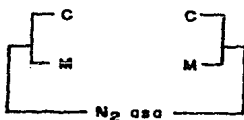
covalentes o un único enlace covalente al nitrógeno;

(c) Un medio de transferencia de átomos de H al N_2 ;

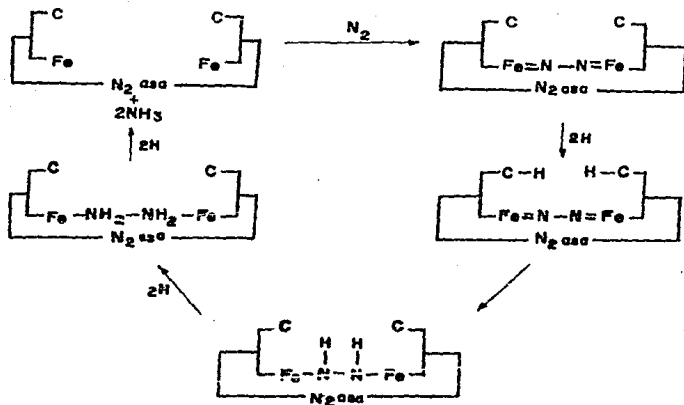
(d) Un suministro de átomos de H a un nivel de energía al menos igual al del hidrógeno; y

(e) Protección de la catálisis contra el O_2 , CN^- , CO, etc.

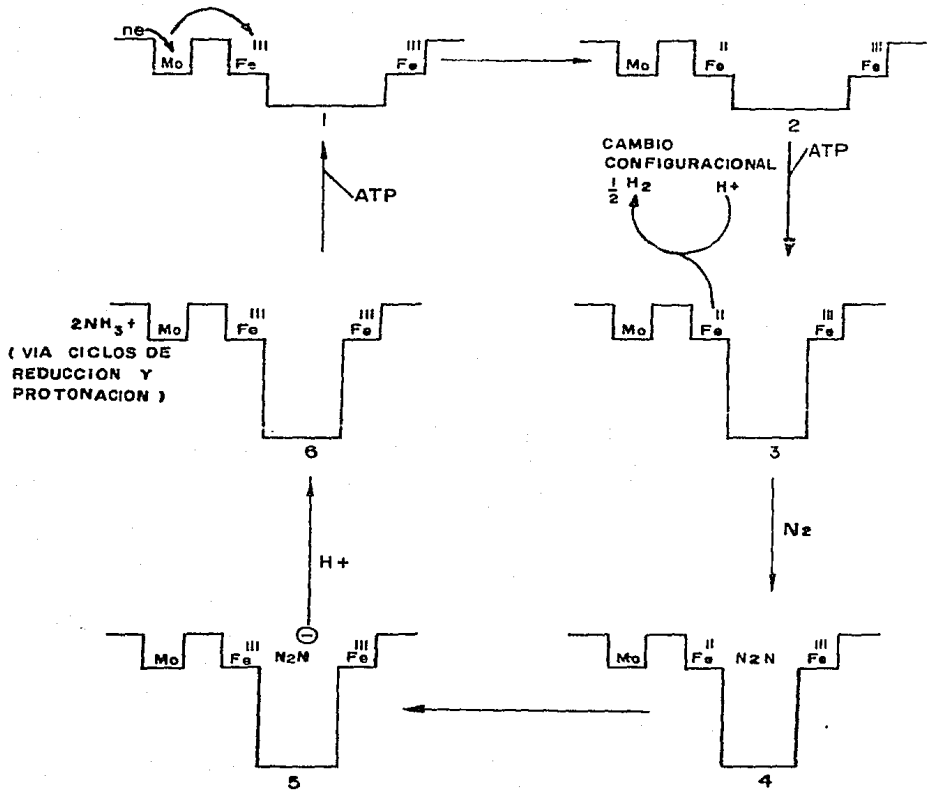
El mecanismo específico propone dos grupos prostéticos hidrogenasa mononucleares yuxtapuestos teóricos sobre la nitrógenasa, alejados a una distancia de 3-4 Å.



El C y el M (metal) son átomos aproximadamente planares y paralelos a los grupos prostéticos. El metal es Co^{+2} ó Fe^{+2} . Basándose en la termodinámica de la quimioabsorción del N_2 sobre el Fe, se sugiere la siguiente reacción favorable:



El siguiente esquema ilustra un mecanismo sugerido por cambios en la configuración de la enzima por la acción del ATP. Se propone un sitio dinuclear otra vez, en este caso, involucrando dos átomos de Fe. El Mo tiene asignado el papel de agente transferidor de electrones permitiendo la formación de especies Fe⁺².

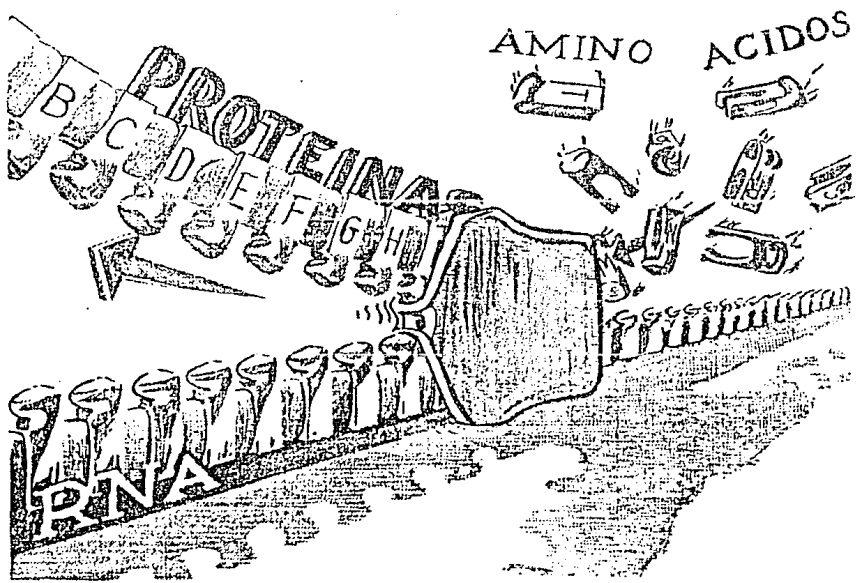


CAPITULO VII.

R. N. A. - POLIMERASA - D. N. A. - DIRIGIDA

The gene is like nothing known to the inorganic world. It possesses the unique property of being able to direct the synthesis of replicas of itself from a large array of building blocks. The message that is coded within it is capable of being translated into the complex processes that are development and function... It is the occasional mistakes that presumably occur in the replication of genes that provide the genetic variability from which all organic evolution is believed to come.

George W. Beadle (1955).



7.1 GENERALIDADES

Las enzimas y otras proteínas que participan en la replicación y en la transcripción del DNA constituyen unos de los catalizadores biológicos más notables hasta hoy conocidos. La descripción completa de su acción explica no sólo la formación de los enlaces internucleotídicos fosfodiéster sino que también explica la transmisión exacta de la información genética, desde la hebra patrón hasta la nueva hebra, en forma de una secuencia nucleotídica exactamente complementaria. Por otra parte, proporciona una explicación de los problemas geométricos, mecánicos y cinéticos, que presenta el desenrollamiento del DNA duplex progenitor, indispensable para exponerlo a las acciones de las enzimas de replicación y transcripción, la información contenida en el código de la secuencia de bases del interior del dúplex. Estas enzimas inician y terminan sus acciones en puntos específicos del cromosoma como respuesta a ciertas señales moleculares. En contraste con la mayoría de las otras enzimas responsables de la replicación del DNA, ejercen funciones muy complejas [70]. Los mecanismos enzimáticos por los que se produce la replicación del DNA, descubiertos por Arthur Kornberg y colaboradores (1956), involucran una serie de enzimas denominadas: DNA-polimerasa I, II y III. Ellas se involucran en el proceso de la replicación; la primera tiene una función reparadora del material genético además de tener propiedades catalíticas como la segunda; la tercera y última, aparente

mente inicia el crecimiento de una cadena de DNA. Ninguna de las DNA polimerasas pueden utilizar al DNA de doble cadena como patrón cebador y sin embargo, la replicación en el cromosoma bacteriano de doble hebra en células intactas debe llevarse a cabo.

El aislamiento y purificación de la enzima RNA-polimerasa-DNA dirigida resolvió el enigma; esta enzima participa en la transcripción y replicación del DNA y del RNA, formando un cebador de RNA y un RNA complementario respectivamente, transcribiendo a partir del DNA duplex y reconociendo los puntos de iniciación específicos en el cromosoma.

7.2 CARACTERISTICAS DE LA RNA-POLIMERASA-DNA-DIRIGIDA

Se cree que las bacterias, a diferencia de las células eucarióticas, tienen una enzima única para la síntesis de todas las clases de RNA [70], además de que aquélla sirve como patrón cebador para la síntesis de DNA. Esta RNA-polimerasa (como mejor se le conoce) se ha aislado de numerosos organismos entre los cuales se encuentran *Euglena gracilis*, *Sacharomyces cerevisiae* [33], *Escherichia coli* [10, 20, 21, 33, 41, 71, 91, 92, 118] *Lactobacillus curvatus* [41] y *Bacillus subtilis*.

La RNA-polimerasa de *Escherichia coli* se ha purificado y aislado extensivamente y es la más conocida gracias a los trabajos de R.R. Burges [70]. Al parecer las polimerasas de las demás bacterias tienen una constitución semejante [84]. Se trata de una nucleotidil transferasa, enzima oligomérica [89] con un P.M. total de 40 000 D, se compone de cinco subunidades: dos cadenas α , cada una con un P.M. de aproximadamente 41 000 D; una cadena β con un P.M. de 155 000 D, una cadena β' de P.M. aproximado a 165 000 D y un polipéptido adicional llamado factor σ , con un P.M. de 86 000 D [71]. Así la relación de las subunidades presentes en la holoenzima intacta es $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ [19, 91]. Contiene también dos átomos de Zn por molécula de enzima. Uno de los dos iones se localiza en la subunidad β , la cual contiene el sitio que enlaza al sustrato, mientras que el otro, se encuentra en la subunidad β' , quién posee el sitio que se enlaza al template [91].

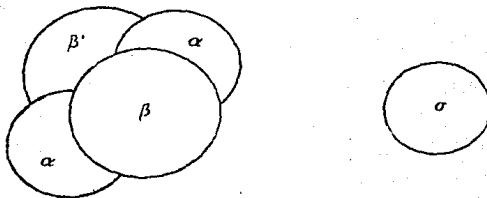


Figura 7.2.a. "Representación diagramática de la estructura de la subunidad $\alpha_2\beta\beta'$ de la RNA-polimerasa y el factor σ . [73].

Respecto a sus propiedades, los sustratos son ribonucleósidos 5' trifosfatos (ATP,GTP,CTP,UTP) y no requiere de la presencia de un cebador en el caso de la síntesis del RNA; ya que en la duplicación del material genético aquella cataliza la reacción para la formación de un cebador. El RNA cebador que se produce es complementario del patrón DNA. La enzima también requiere de iones metálicos Mn^{+2} o Mg^{+2} [41,70,71] y produce ppi. Recientemente se reportó que los requerimientos óptimos del Mn^{+2} en esta reacción son 10 veces más bajos que los niveles de Mg^{+2} , por ejemplo, la RNA-polimerasa de *Lactobacillus curvatus* funciona 6 veces mejor con Mn^{+2} y la RNA-polimerasa de *Escherichia coli* aumenta 3 veces su activi

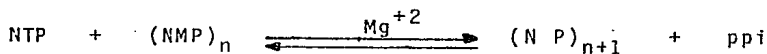
dad específica con Mg^{+2} [41]. A la forma activa se le conoce como core-enzima. In vitro, la RNA-polimerasa puede usar DNA de doble filamento o de un filamento como template, aunque la core-polimerasa tiene una actividad débil hacia la primera forma, probablemente porque se enfrenta con muescas al azar o discontinuidades que impiden tener puntos de iniciación, dando origen a un RNA de elevado P.M. que después se libera del template de DNA. En el caso de templates de una sola hebra, el producto inicial es un híbrido de bases apareadas DNA-RNA. El hecho de que el producto no se una covalentemente al polinucleótido pre-existente demuestra que no hay necesidad de la primera forma [7].

7.3 MECANISMO DE ACCION. SINTESIS DE DNA

La replicación de cromosomas bacterianos comienza en un punto de origen específico o punto de iniciación del DNA. Se requiere de una proteína iniciadora específica para reconocer el punto de iniciación y tal vez para la señal de partida a la RNA-polimerasa-DNA-dirigida para que comience a generar el cebador de las nuevas cadenas de DNA. Se tienen datos experimentales referentes a que el punto de iniciación está anclado a la membrana celular. Este anclaje puede que sea necesario para ayudar a hacer frente a las fuerzas de torción cuando el cromosoma se desenrolla. Antes que las enzimas replicadoras entren en acción, las proteínas "desen

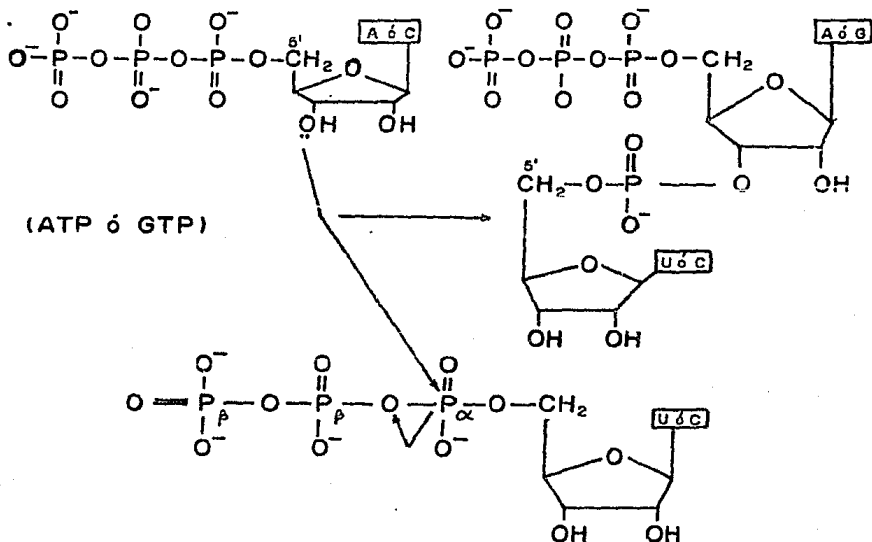
rolladoras" se unen a una hebra del cromosoma y abren un lazo, y forman una burbuja en el dúplex, haciendo que ambas hebras resulten accesibles a la replicación. En este punto se forman hebras cebadoras de RNA gracias a la acción de la RNA-polimerasa-DNA-dirigida que utiliza ribonucleósidos-5'-trifosfato como precursores de los restos ribonucleotídicos. Las hebras cebadoras de RNA son complementarias de las dos hebras del cromosoma [10].

La RNA-polimerasa cataliza la siguiente reacción:



La holoenzima es capaz de reconocer y de unirse al DNA en sitios de iniciación específicos, que son estructuras de 10 o más restos, ricos en bases pirimidicas. Tales sitios de iniciación están muy separados en el DNA patrón. Cuando la polimerasa se une a su patrón ocurre la separación de hebras del DNA y un cambio en la conformación de la holoenzima. El primer nucleósido-5'-trifosfato o nucleósido iniciador generalmente es el ATP ó el GTP y se fija a la polimerasa para formar el complejo de iniciación. El primer enlace internucleotídico se forma después de la captación del segundo nucleósido-5'-trifosfato, que generalmente es un nucleósido pirimidínico (UTP o CTP). Entonces se forma el primer enlace fosfodiéster, por ataque nucleofílico del grupo 3'-hidroxilo de la purina-nucleósido-5'-trifosfato sobre el átomo de fós

foro α del segundo nucleósido trifosfato y se elimina ppi procedente del segundo NTP. El primer nucleósido-5'-trifosfato retiene su grupo 5'-trifosfato aún después de que se han incorporado el segundo y los subsecuentes restos nucleotídicos. Este grupo es precisamente el que permite reconocer el extremo de iniciación (o 5'-terminal) de la molécula de RNA cebadora. La siguiente reacción esquematiza lo arriba expuesto.



De esta manera se siguen uniendc ribonucleósidos hasta formar un RNA cebador de 50 a 100 restos. Una vez construida la hebra del RNA cebador, la DNA-polimerasa comienza a incorporar a su extremo 3' unidades de desoxirribonucleótidos formadas a partir de los desoxirribonucleósidos-5'-trifos_

factos. Después de que un tramo largo de DNA se ha replicado, la pequeña hebra cebadora de RNA se escinde y se separa por la acción de una exonucleasa. Okasaki observó pequeños fragmentos de DNA generados durante la replicación de *Escherichia coli*, ellos contienen tramos cortos de RNA en sus extremos 5', lo cual es un indicio de que cada uno de los segmentos cortos que se producen en la síntesis por etapas del DNA comienza por un segmento de RNA. Por lo tanto, la iniciación de la replicación del DNA sobre cebadores de RNA tiene efecto no solamente al comienzo de una onda de replicación, sino también durante la formación repetida de los segmentos cortos de Okasaki [70].

La RNA-polimerasa-DNA-dirigida, también es la enzima que sintetiza RNA a partir de una plantilla de DNA; este proceso constituye la transcripción. Es la única enzima en los organismos procariotes que fabrica todas las clases de RNA (mensajero, ribosomal y de transferencia). La RNA-polimerasa central ($\alpha_2\beta\beta'$) utiliza el factor proteínico específico σ que ayuda a la enzima central a reconocer la hebra correcta y a fijarse fuertemente a la secuencia específica de desoxinucleósidos de la región promotora (o sitio específico de unión) [71]. Esta enzima u holoenzima (polimerasa central + factor σ) en presencia de los cuatro ribonucleósidos trifosfato (ATP,CTP,GTP,UTP) comienza el movimiento a lo largo de la "tira con sentido" hacia su extremo de terminación 5'. La enzima polimeriza los ribonucleótidos en una secuencia

específica que dicta la "tira-plantilla" y de acuerdo a las reglas de apareamiento de bases. En la reacción también se libera ppi. Un ribonucleótido purínico es el primero que se polimeriza en la molécula de RNA.

El inicio de la formación de la molécula de RNA en su extremo 5' se continúa con la liberación del factor σ , mientras el alargamiento de la molécula de RNA desde el extremo 5' a su extremo 3' continúa antiparalelamente a su plantilla. La terminación de la síntesis de la molécula de RNA se señala por una secuencia específica en la "tira con sentido" de la molécula de DNA, señal que se reconoce por la proteína de terminación.

Hay dos tipos de señales de terminación:

1. una secuencia terminal de poli A que lee la misma RNA-polimerasa.
2. Una secuencia palindrómica a la que se le une la proteína ρ .

Después de que termina la síntesis de la molécula de RNA la enzima central se separa de la plantilla de DNA. Con la ayuda de otro factor la enzima central reconoce otro promotor para sintetizar otra nueva molécula de RNA, (véase la siguiente figura)..

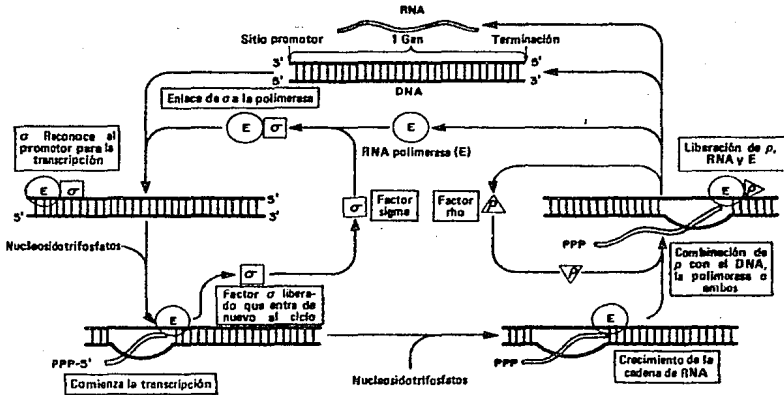
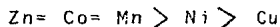


Figura No. 7.3.b. "El proceso de la síntesis de RNA. Comienza en la porción superior izquierda de la figura con la unión de σ a la polimerasa para formar un complejo que reconoce el promotor para la transcripción. El proceso se completa cuando la RNA transcriptasa se libera del gen y todos los componentes catalíticos están listos para reciclarse" [7a].

7.4 PAPEL DEL Zn^{+2} COMO ION METALICO INTRINSECO DE LA RNA-POLI-MERASA-DNA-DIRIGIDA DE *Escherichia coli*.

Mucho se especula acerca del papel del Zn^{+2} en la conformación de la enzima RNA-polimerasa. La mayoría de los estudios que se realizan se llevan a cabo con *Escherichia coli* y con la sustitución del ion metálico por otros iones con propiedades ópticas y magnéticas semejantes al Zn^{+2} [10]. Los metales que sustituyen al Zn^{+2} decrecen en el siguiente orden:



[10, 21, 01, 02] en función de sus actividades enzimáticas [10].

Los estudios se iniciaron buscando la localización de los átomos de Zn^{+2} en las subunidades de la holoenzima. Los resultados de la sustitución del ion metálico por Cu^{+2} [19, 20, 01, 110] ofrecieron fuertes evidencias de que los átomos de Zn^{+2} que se unen fuertemente a la RNA-polimerasa, juegan un papel estructural y funcional en la transcripción y replicación de genes [110]. Por otra parte, los resultados de la sustitución con Co^{+2} (Co-RNA-polimerasa) demostraron que la enzima es tan activa como la enzima nativa, las propiedades físicas y bioquímicas de ambas son muy similares (para esta última, tienen especificidad sobre una gran variedad de tem pletes), pero difieren en su espectro de absorción. La función precisa de los iones metálicos intrínsecos en la RNA-polimerasa aún no se establece. Sin embargo, un número de funciones han podido visualizarse para los iones Zn^{+2} duran

te la transcripción.

- a) Un posible papel catalítico en el templete y el sustrato enlazado o bien, en la formación del enlace fosfodiéster subsecuente .
- b) Un posible papel regulador en el reconocimiento del pro-motor o iniciación específica.
- c) Un papel estructural en el mantenimiento de la propia con formación de la enzima que ya se demostró por la remoción y readición de Zn^{+2} con la concomitante inactivación y reacti vación de la enzima [91].

Las conclusiones anteriores se basan en numerosos estudios de sustitución metálica, de los que quizá uno de los aspec tos más interesantes de la Co-RNA-polimerasa concierne al proceso de la síntesis de RNA; hasta 1979 se sabía en forma indirecta que el ion intrínseco tenía un papel en la cadena de iniciación del RNA. Ya que la Co-RNA-polimerasa es menos eficiente que la Zn-RNA-polimerasa en captar GTP sobre un DNA T7 como templete, se sugirió que el ion metálico intrín seco se involucra en la iniciación específica. Además, el ha llazgo de que la Cu-RNA-polimerasa presenta dos picos de ab sorción permitió saber que uno de los dos iones se localiza en el sitio en que enlaza al sustrato, y el otro, en la re gión que es responsable de unirse al templete de DNA, o sea en la subunidad β' [92, 110].

Solamente la sustitución selectiva de uno de los iones es

necesaria para la asignación de un papel específico de la enzima, así como para elucidar la relación espacial entre el sitio de enlace metálico y otros sitios activos de la enzima. A pesar de la dificultad para separar uno de los iones, y debido a que el Zn^{+2} se une fuertemente a la enzima, se lo gró que uno de ellos se reemplazara, obteniéndose varias enzimas híbridas: Co-Zn, Mn-Zn, Ni-Zn y Cu-Zn-RNA polimerasa. De aquí se desprende que un ion Zn^{+2} se halla en la subunidad β [11]. Hallazgos en *Bacillus subtilis* de que uno de los dos iones metálicos se localizan en la misma subunidad confirmó que esta se involucra directamente en la formación del enlace fosfodiéster [11].

También se propuso que el Zn^{+2} puede participar directamente en la catálisis actuando como un ácido de Lewis que facilita la desprotonación del grupo 3'-OH, que es el ataque nucleofílico necesario sobre el fósforo α de los nucleósidos trifosfato que ingresan para formar el enlace fosfodiéster (véase reacción página No. 213). Sin embargo la RNA-polimerasa no requiere de un primordio o sitios específicos de unión en el caso de síntesis de RNA, por lo que se propuso que la exposición del Zn^{+2} al grupo 3'-OH de la cadena de RNA en crecimiento, funciona catalíticamente como otras nucleotidil transferasas [20, 11a]. Estudios de paramagnetismo que realizaron Dipankar y Wu (1983) revelaron que las distancias entre el Cu^{+2} y el grupo 3'-OH podría ser de 7 Å, demasiado lejano para que sea probable que el metal participe directa

mente en la catálisis.

Una característica muy particular de la Zn^{+2} -RNA-polimerasa es su espectro de absorción en la región del visible: Cuando se adiciona nucleósido trifosfato o un template análogo, $d(pt)_{10}$, el espectro se perturba, sugiriendo que el ion metálico intrínseco (uro o ambcs) está involucrado en el enlace del sustrato o en el enlace del template hacia la enzima.

Permanecía la incógnita acerca del papel del Zn^{+2} en la enzima; ¿ El ion metálico participa directamente en el enlace del sustrato o template ? o bien, el efecto es indirecto: ¿ Los cambios conformacionales de la enzima inducidos por el sustrato o el template a los sitios de enlace, ocurren lejos del ion metálico intrínseco ?. Estudios anteriores ya habían demostrado que la subunidad β contiene el sitio de iniciación [20], lo cual se demostró por el descubrimiento de dos sitios enlazantes en la RNA-polimerasa de *Escherichia coli*: el sitio de iniciación y el sitio de elongación. El primero, enlaza nucleótidos de purina (A o G) en ausencia de templates; el segundo, requiere del catión Mg^{+2} para el enlace de un nucleótido; el sitio de iniciación no. El hecho de que la perturbación del espectro visible de la Ni-RNA-polimerasa se lleva a cabo en ausencia de iones Mg^{+2} extrínsecos y de templates de DNA es indicativo de que la sustitución metálica se lleva a cabo en el sitio de iniciación [19, 20]. Así el ion metálico intrínseco localizado en la subunidad puede ju

gar un papel regulador en el reconocimiento del nucleótido de iniciación y puede orientar al nucleótido en una posición estereoespecífica para promover la reacción de iniciación [20].

El empleo de la RMN y de la RPE determinan las distancias entre el metal y el sustrato en los sitios de enlace de la enzima. Las medidas de los efectos paramagnéticos de la Co-Zn-RNA-polimerasa sobre velocidades de relajación del H^1 y del P^{31} del núcleo de ATP, indicaron que las distancias del ion Co^{+2} intrínseco de la subunidad β a los átomos H_2 , H_8 y H_1 fueron: 4.1 ± 0.6 , 3.6 ± 0.5 y 6.8 ± 0.8 Å respectivamente y para los átomos de P_{α} , P_{β} , y γ fueron: 10.5 ± 0.7 , 15.1 ± 1.1 y 14.1 ± 0.8 Å respectivamente. Esta relación espacial demuestra que el ion Co^{+2} se coordina directamente a la mitad de la base del ATP que se une al sitio de iniciación y por lo tanto, el ATP se localiza en el interior de la esfera de coordinación, posiblemente a través de electrones no apareados del N_7 y/o otros átomos de N cercanos o bien por formación de un complejo tipo π [20, 21]. La figura 7.4.a. ilustra lo anterior para una mayor comprensión de las distancias entre el Co^{+2} , protones y fósforos.

Los detalles de información estructural acerca del complejo enzima-sustrato se mejoraría con un estudio cristalográfico de R-X, pero en la actualidad es aún imposible para la RNA-polimerasa ya que se carece de una forma cristalina adecuada

da. Hasta la fecha, la función del otro metal en la subunidad β se investiga [21].

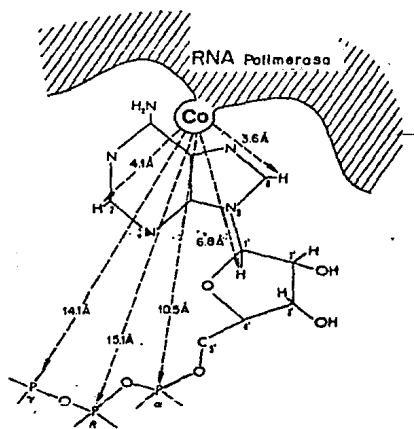


Figura 7.4.a. "Distancias de Co^{+2} intrínseco a varios protones y fósforos del núcleo de ATP sobre la Co- Zn-RNA-polimerasa" [20].

Por otra parte, se encontró que existe una gran diferencia en la relación espacial, entre el ion metálico y el ATP que se une al sitio de iniciación de la RNA-polimerasa en ausencia y presencia del templete de DNA. Una representación esquemática de estas diferencias se dan en la figura 7.4.b.

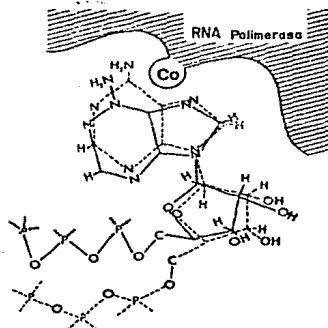


Figura 7.4.b. " Representación esquemática del ATP unido al sitio de iniciación de la RNA-polimerasa de *Escherichia coli* en presencia (—) y en ausencia (-----) de DNA " [21].

Ya que los átomos H_8 y H_2 son casi equidistantes al metal (4.0 y 4.5 Å respectivamente) en ausencia del DNA, se postuló que un posible modo de la coordinación del metal a la mitad de la base del ATP se debe a la formación del complejo π entre el metal y la base del anillo. En presencia del DNA, aquellas distancias no son iguales, el átomo H_2 se mueve lejos del metal (6.7 Å) mientras que la proximidad del átomo H_8 y el metal permanece constante (4.1 Å). De esta manera es probable que la coordinación ocurra a través de los pares de electrones no compartidos del N_7 y/o otros átomos

de nitrógeno) cercanos (p.ej., el grupo NH_2 de la posición 6) y no por la formación de complejos tipo π . También los tres átomos de fósforo se mueven aproximadamente 3 Å más cerca del metal en el complejo enzima-DNA. Tales movimientos pueden ser los responsables del incremento en la afinidad del ATP por la enzima en presencia de DNA [21].

CONCLUSIONES

Con base a la revisión bibliográfica se concluye lo siguiente:

- (1) Los iones metálicos aunque en cantidades traza, son requeridos como cofactores o coenzimas activando los sistemas enzimáticos para el logro del ciclo vital de diferentes microorganismos.
- (2) El fierro, el metal de transición más abundante y probablemente el más estudiado en los sistemas procarióticos, no se considera un elemento traza.
- (3) Todos los iones, al igual que otros solutos, penetran a la célula bacteriana por medio de transporte activo, como los mecanismos de transporte desarrollados por bacterias para los iones fierro y manganeso.
- (4) Entre los iones metálicos traza se encuentran el manganeso, molibdeno y zinc. El papel del primero en relación a la SOD, aún no ha sido dilucidado. Para el segundo, su papel dentro de las molibdoenzimas, es el de actuar como catalizador redox. El último de ellos, el zinc, funciona como ion metálico intrínseco en la RNA-polimerasa-DNA-dirigida, para mantener la conformación estructural de la misma.
- (5) Finalmente, se desprende la estrecha relación que guarda la Química Inorgánica con la Microbiología y la Bioquímica dados los aspectos tratados en el presente trabajo.

Se espera que esta tesis sea un cimiento para posteriores -
proyectos bibliográficos o de investigación y con ésto pro-
fundizar en aspectos relacionados con la Bioinorgánica.

B I B L I O G R A F I A

Yo no puedo tenerte ni dejarte,
ni sé por qué, al dejarte o al tenerte,
se encuentra un no sé qué para quererte
y muchos si sé qué para olvidarte....

Sor Juana Inés de la Cruz.

- 1 Anderson, D.A. : Fundamentals of microbiology chap.15:158-176 Mosby company 1976
- 2 Aoki, H. and Sleepcky, A. : Inducement of heat-shock requirement for germination and production of increased heat resistance in *Bacillus fastidiosus* spores by manganese ions. Journal of Bacteriology 114(1):137-143 Apr.1973
- 3 Archibald, S.F. and Fridovich, I. : Manganese and defense against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum* Journal of Bacteriology 145(1):442-451 Jun 1981
- 4 Atlan, D. and Portalier, R. : Optimized extracellular production of alkaline phosphatase by lky mutants of *Escherichia coli* K-12, Appl. Microbiol. Biotechnol 19: 5-12 1984
- 5 Barra, D. Schinina, M.E., Bcssa, F. and Barnister, J.V. : Identity of the metal ligands in the manganese- and iron-containing superoxide dismutases, Febs letters 179(2): 329-331 Jan. 1985
- 6 Bertini, I. Luchinat, C. and Monranri, R. : Zinc enzymes Journal Chemical Education 62(11): 924-927; Nov. 1985
- 7 Bhattacharyya, P. : Active transport of manganese in isolated membranes of *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology 104(3): 1307-1311, Dec. 1970
- 8 Bhattacharyya, P. : Active transport of manganese in isolated membrane vesicles of *Bacillus subtilis* Journal of Bacteriology, 123(1): 123-127, July 1975
- 9 Brill, A.S. : Molecular biology, biochemistry and biophysics chap.3:6-39; chap.5:116-125
- 10 Britton, L. and Fridovich, I. : Intracellular localization of the superoxide dismutases of *Escherichia coli* a reevaluation, Journal of Bacteriology, 131(3):815-820, Sept. 1977

- 11 Britton, L. Malinowski, P.D. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase and oxygen metabolism in *Streptococcus faecalis* and comparisons with other organisms, Journal of Bacteriology 134(1):229-236 Apr. 1978
- 12 Brock, T.D. : *Biología de los microorganismos*; cap. 4 106-113, Barcelona, España 1973 Omega, S.A.
- 13 Buchanan, B.B. and Arnon, D.I. : Ferredoxins: Chemistry and functions in photosynthesis, Nitrogen fixation and fermentative metabolism, Advances in enzymology 33:119-177 1970
- 14 Burgess, B.K. Stiefel, E.I. and Newton, W.E. : Oxidation reduction properties and complexation reactions of the iron molybdenum cofactor of nitrogenase, The Journal of Biological Chemistry 225(2):353-356 Jan. 1980
- 15 Burgmayer, S.J.N. and Stiefel, E.I. : Molybdenum enzymes cofactors and model systems, Journal Chemical Education 62(11) 943-953 Nov. 1985
- 16 Byers, R.B. and Arceraux, J.E.L. : Chap.5:216-244 University of Mississippi
- 17 Carnahan, J.E. and Castle, J.E. : Some requirements of biological nitrogen fixation, Journal of Bacteriology 75:121-124, 1958
- 18 Chatt. : *Transition metal Chemistry*; chap.6:207-219 Ed.1981 Verlag chemie
- 19 Chatterji, D. and Wu, Y.F. : Selective substitution in vitro of an intrinsic zinc of *Escherichia coli* RNA-polymerase with various divalent metals, Biochemistry 21:4651-4656 1982
- 20 Chatterji, D. and Wu, Y.F. : Direct coordination of nucleotide with the intrinsic metal in *Escherichia coli* RNA-polymerase. A nuclear magnetic resonance study with cobalt substituted enzyme, Biochemistry 21:4657-4664, 1982

- 21 Chatterji, D. Wu, C.H. and Wu, Y.F. : Nuclear magnetic resonance studies on the role of intrinsic metals in *Escherichia coli* RNA-polymerase, The Journal of Biological Chemistry 259(1): 284-289, Jan 1984
- 22 Coleman, J.E. and Cwilewski, J.F. : Molecular properties and mechanism of Alkaline Phosphatase Advances in Inorganic Biochemistry; Cap.1:2-60 Elsevier North-Holland New York, Amsterdam Oxford 1979
- 23 Dagmar, R. Petsko, G.A. Yakamura, F. Suzuki, K and Otmori, D.: Structure of iron superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis* at 2.9 Å resolution, Proc. Natl. Acad. Sci. 80:3879-3883, July 1983
- 24 Daily, P. Otis DeBell, R.M. Joseph, S.W. : Superoxide dismutase and catalase levels in halophilic vibrios, Journal of Bacteriology 134(2):375-380 May, 1978
- 25 Davis, B.D. DeBecco, R. Eisen, H.N. : Tratado de Microbiología cap.3:49-77 Barcelona, España 1977 Salvat editores, S.A.
- 26 Dillard, C.R. and Goldberg, D. : Química, reacciones, estructuras y propiedades. cap.23:554-587 1977 Fcndo educativo interamericano, S.A.
- 27 Doughtery, H.W., Sadowsky, S.J. and Baker, E.E. : A new iron containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*, The Journal of Biological Chemistry 253(14):5220-5223 July, 1978
- 28 Doyle, M.L. and Stanley, G.J. : Ligand-controlled dissociation of *Chromatium vinosum* cytochrome c, Biochemistry 25:2509-2516, 1986
- 29 Dunn, G.M. and Bull, R.T. : Bioaccumulation of copper by a defined community of activated sludge bacteria, European Journal Appl. Microbiol Biotechnol. 17(1):30-34 1983
- 30 Eady, R.R. and Postgate, J.R. : Nitrogenase, Nature 249(5460): 80E-80G Jun. 1974

- 31 Eichron, G. Marzell, L. : Advances in Inorganic Biochemistry Chap. 23:745-787 Vol.1 y2 New York U.S.A. 1979
- 32 Eisenstadt, E. Fisher, S. Der, Ch. and Silver, S. : Manganese transport in *Bacillus subtilis* W-23 during growth and sporulation, Journal of Bacteriology 133(3):1363-1372, Mar 1973
- 33 Faila, M.L. : Zinc functions and transport in microorganisms and minerals Chap.4:151-213 Marcel Dekker S.A. New York 1979
- 34 Fisher, S.L. and Buxbaum, K. : Regulation of the rate of manganese accumulation and exchange in *Bacillus subtilis* W-23 Journal of Bacteriology 113:1373-1380 May 1980
- * 34' Ver pagina No. 240
- 35 Fortnagel, P. and Freese, E. : Inhibition of ascorbate oxidase by chelation of transition metal causing inhibition of sporulation in *Bacillus subtilis*, Journal of Biological Chemistry 243(20):5289-5295, Oct 1968
- 36 Fridovich, I. : Molecular Mechanism of oxygen activation chap.453-477 New York, Academic
- 37 Frieden, E. : New perspectives on the essential trace element, Journal Chemical Education 62(11):917-923 Nov. 1985
- 38 Frieden, E. : Biochemistry of the essential elements, Vol 3 chap.7:151-167 New York, N.Y. 1984
- 39 Fumiyuki, Y. : Purification, crystallization and properties of iron-containing superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*, Biochimica et Biophysica Acta 422(1):280-294 Sept. 1976
- 40 Fundentberg, H.H. Stites, D.P. and Kcaldwell, J.L. : Inmunología clínica cap.21:265-267 Ed.3ra. Mex. D.F. El Maruel moderno, S.A. de C.V.

- 41 Ghiorse, W.C. : Biology of iron and manganese-depositing bacteria, Ann. Rev. Microbiol. 38: 515-550 1984
- 42 Glenn, A.R. and Dilworth, M.J. : The effect of metal ions on the alkaline phosphatase of *Rhizobium leguminosarum*, archives of Microbiology 126:251-256, 1980
- 43 Gottschalk, G. : Metabolism bacterial; Chap. 2:22-31, 5:106-111, 6:113-141. 7:142-166 New York N.Y. 1980 Springer-verlag
- 44 Greer, G.H. Lorence, R.M. and Genris, R.B. : Specific over production and purification of the cytochrome c complex from *Escherichia coli*, Biochemistry 25:2309-2314, 1986
- 45 Gregory, E.M. Yost, F.J. and Fridovich, I. : Superoxide Dismutase of *Escherichia coli*: Intracellular localization and functions, Journal of Bacteriology 115(3): 987-991 1973
- 46 Harrison, P.M. and Hoare, R.J. : Metals in Biochemistry chap. 3:32-41 London N.Y. 1980 Chapman and Hall
- 47 Hassan, H.M. and Fridovich, I. : Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology 129(3):1574-1583 Mar. 1977
- 48 Hassan, H.M. and Fridovich, I. : Physiological function of superoxide dismutase in glucose limited chemostat cultures of *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology 130(2): 805-811 May. 1977
- 49 Hassan, H.M. and Fridovich, I. : Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Escherichia coli*: Glucose effect Journal of Bacteriology 132(2):505-510 Nov. 1977
- 50 Hassan, H.M. and Fridovich, I. : Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli* Journal of Bacteriology 252(21):7667-7672 Nov. 1977

- 51 Hinton, S.M. and Mortenson, L.E. : Identification of molybdoproteins in *Clostridium pasteurianum*, Journal of Bacteriology 162(2):477-484, May 1985
- 52 Hinton, S.M. and Mortenson, L.E. : Regulation and order of involvement of molybdoproteins during synthesis of molybdoenzymes in *Clostridium pasteurianum*, Journal of bacteriology 162(2):485-493, May 1985
- 53 Hughes, M.M. : The Inorganic Chemistry of Biological processes, Chap. 3:64-103; 35:146-163; 6:200-229 Ed. 2nd., U.S.A. 1972, John Wiley and sons
- 54 Hughes, M.N. : Comunicacion personal 1986 Dec.
- 55 Huheey, J.E. : Química inorgánica. principios de estructura y reactividad, cap. 18:792-823 Ed. 2da. Méx. D.F. harla.
- 56 Husan, M. and Davidson, V.L. : Characterization of two inducible periplasmic c-type cytochromes from *Panacoccus denitrificans*, The Journal of Biological Chemistry 261(19):8577-8580, July. 1986
- 57 Hydrean, C., Ghosh, A., Mallin, M. and Ghosh, B.K. : Interrelationship of Carbohydrate metabolism and alkaline Phosphatase synthesis in *Escherichia coli*, Journal of Biological Chemistry 259(19):6806-6812 Oct. 1977
- 58 Ichikawa, D. and Fréese, E. : Alkaline phosphatase production of *Bacillus subtilis*, Biochim. et Biophys. Acta 388:473-479, 1978
- 59 Imperial, J. Ugalde, R.A. : Role of the Q gene product in the incorporation of the Molybdenum into Nitrogenase in *Klebsiella pneumoniae*, Journal of bacteriology 158(1):187-194, Apr. 1984
- 60 Imperial, J. Ugalde, R.A. : Mol⁻ mutants of *Klebsiella pneumoniae* requiring high levels of molybdate for nitrogenase activity, Journal of Bacteriology 163(3):1285-1287, Sept. 1985

- 61 Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. : Microbiología Médica; cap:8:103,104, Edic.10a., Méx.D.F.; 1983, El Manual Moderno
- 62 Jersen, L.H. : X-Ray structural studies of Ferredoxin and related electron carriers, Annual reviews Biochemistry 143:461-474, 1974
- 63 Jernelör, A. and Martin, A.L. : Ecological Implications of metal metabolism by microorganisms, Annual Review of Microbiology 29: 61-66, 1975
- 64 Kelly, C.T. Nash, A.M., Fogarty, W.M. : Effect of manganese on Alkaline phosphatase production in *Bacillus s.p.* RK-11 Appl. Microbiol Biotechnol. 19(1):61-66, 1984
- 65 Kepkay, P. and Kenneth, N. : Surface entrancement of sporulation and manganese oxidation by a *Marine Bacillus*, Journal of Bacteriology 151(2):1022-1026, Aug. 1982
- 66 Klein, A.N. and Rajagopalan, K.V. : Characterization of Molybdenum cofactor from *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology 140(1):114-124, Oct. 1979
- 67 Klein, A.N. : Identification of the molybdenum cofactor in chlorate resistant of *Escherichia coli*, Journal of Bacteriology 148(1): 273-282, Oct. 1980
- 68 Kolodziej, B.J. and Slepecky, R.A. : Trace metal requirements for sporulation of *Bacillus megaterium*, Journal of Bacteriology 88(4):821-830 Oct. 1964
- 69 Konishi, K., Ouchi, M., Kita, K., Horikoshi, I. : Purification and properties of cytochrome b_5 50-d complex a terminal oxidase of the aerobic respiratory chain of *Photobacterium phosphoreum*, Journal of Bacteriology 99:1227-1236 1986
- 70 Lentinger, A.L. : Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular, cap.18:487,503; 22:617,618 25:733-735; 28:812-814; Ed.2da. Barcelona, 1985 Ediciores Omega.

- 71 Mandelstam, J. and Dawes, I. : Biochemistry of bacterial growth; Chap.3:125-158; 5:231-236; 9:377-384. Ed.3rd. 1982 Blackwell scientific publications.
- 72 Manky, G.S. : Principios de química Inorgánica ; cap.3:99-101 Ed.ira., 1983
- 73 Martín, D.W.; Mayes, D.A., Radwell, V.W. : Bioquímica de Harper cap.8:52-64 Ed.10ma. Méx.D.F. 1984 Edit.El Manual Moderno
- 74 Martínez, S.M.E. : Metaloproteínas I.P.N. E.N.C.B. Méx.D.F. 1985
- 75 Moady, S.C. and Hasson, H.M. : Anaerobic Biosynthesis of the manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 259(20):12821-12825, June 1984
- 76 Müller, A. and Dieman, E. : Transition metal Chemistry; cap.6: 221-238, 1961 Verlag Chemie.
- 77 Oginsky, E.L. and Vinbreit, W.W. : An introduction to bacterial physiology; cap.2:31-33 Ed.2da. 1961, W.H. Freeman and company Sn. Fco. Texas.
- 78 Oh, J.K., Freese, E. : Manganese requirement of phosphoglycerate phosphomutase and its consequences for growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. Journal of bacteriology 127(2):739-746 Aug. 1976
- 79 Page, W.J. and Tigerstrom, V.M. : Iron and molybdenum repressible outer membrane proteins in competent *Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology 151(1):237-232 July 1982
- 80 Pelczar, M.J., Reed, R.D., Chen, E.C.S. : Microbiología cap.10:161-163 Ed.2da, Méx.D.F. 1985 Mc.Graw-Hill

- 81 Porter, J.R. : Bacterial Chemistry and Physiology cap.7:615-621;624-629;654-657. Ed.1a. New York, 1961, John Wiley and sons.
- 82 Rainnie, D.J. and Bragg, P.D. : The effect of iron deficiency or respiration and energy-coupling in *Escherichia coli* Journal of General Microbiology 77:339-349 1973
- 83 Rose, A.H. : Advances in Microbial Physiology; Chap.5:189-221 London New York 1975 Academic Press.
- 84 Rose, A.H. : Microbiología química Cap.6:238-240; 7:326-333 10:469-478 Barcelona España, 1976 Alhambra
- 85 Rosson, R.A. and Nealson, K.H. : Manganese binding and oxidation by spores of marine *Bacillus*. Journal of Bacteriology 151(2):1027-1034 1982
- 86 Salemme, F.R. : Structure and function of cytochrome c Ann.Rev.Biochem 46:299-329 1977
- 87 Selverstone, J.V., Mota, D.F. : Copper-Zinc superoxide dismutase. Journal Chemical Education 20(11):950-996 Nov. 1985
- 88 Serez, J.C. : Microbiología General cap.6:289-293 Ed.1a. España Madrid, 1976 Alhambra
- 89 Silver, S., Johnseine, P. and King, K. : Manganese active transport in *Escherichia coli* Journal of Bacteriology 104(3):1299-1306 Dec. 1970
- 90 Silver, S. and Jasper, P. : Manganese Transport in microorganisms and Minerals Cap.3, Vol.3:105-140 Marcel Dekker, Inc. N.Y.U.S.A. 1977

- 91 Solaiman, D. and Ying-Hsiueh, F.W. : Intrinsic Zinc is essential for proper conformation of active *Escherichia coli* RNA-polymerase. Biochemistry 23:6365-6377 Dec. 1984
- 92 Speckhard, D.C., Wu, Y.H.F. and Wu, W.C.H : Role of the intrinsic metal in RNA-polymerase from *Escherichia coli* in vivo substitution of tightly bound Zinc with cobalt. Biochemistry 16(24):5228-5234 1977
- 93 Spiro, T.G. : Metal ion activation of dioxygen Chap.17:548-551 Ed.1a. New York, N.Y. 1980 John Willett,
- 94 Stainer, R.Y. and Doudoroff, M. : El mundo de los microbios cap.11:227-248; 12:249-271; 13:274-279; 15:306-309 Ed.2da. Méx. D.F. 1963 Aguilar.
- 95 Stallings, W.C., Powers, T.B., Patridge, K.A. and Ludwig, M.L. Iron Superoxide dismutase from *Escherichia coli* at 3 Å resolution: A structure unlike that of Copper/Zinc protein at both monomer and dimer levels Proc.Natl.Acad. 80:3884-3888 July 1983
- 96 Stallings, W.C., Patridge, K.A., Strong, R.K. and Ludwig, M.L.: Manganese and Iron superoxide dismutase are structural homologs The Journal Of Biological Chemistry 259(17):10695-10699 Sept 1984
- 97 Stainer, R.Y., Adelberg, E.A. and Ingraham, J.L. : The microbial world, cap.10:310-313 Ed.4a New Jersey 1976 Prentice Hall International.
- 98 Stanfield, W.D. : Genética Cap.14:296-318 Serie schaum Ed.2a 1984 Mc. Graw Hill.
- 99 Steele, D.B.S.C. : Química de los elementos metálicos Cap.1: 97-136; 8:137-165 Ed.1a. 1971 Alhambra, S.A.
- 100 Trachan, R.C., Aranha, H., Lodge, J.S. : Teflon chemostat for studies of trace metal metabolism in *Streptococcus mutans* and other bacteria Appl.and Envir.Microbiol. 43(1):257-260 Jun. 1982

- 101 Summer and Silver : Bio-transformations of non toxic metal cations, Ann. Rev. of Microbiol. 32:658-661 1979
- 102 Tchikawa, T. and Freese, E. : Alkaline phosphatase production of *Bacillus subtilis*. Biochim. Biophys. Acta 338(1):473-479 1974
- 103 Thorpe, V.W., Bray, G.B. and James, S.P. : Biochimica cap.13: 196-203, Méx.D.F. 1984 Continental, S.A.
- 104 Tissieres, A. : A study of the cytochrome system and some other aspects of the respiration of *Aerobacter aerogenes* Biochem. Journal 50:279-287 1951
- 105 Torriani, A. : Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli* Biochim. Biophys. Acta. 38:447-460
- 106 Trotman, C.N.A. and Greenwood, C. : Effects of Zinc and other metal ions on the stability and activity of *Escherichia coli* Alkaline phosphatase Biochim. Journal 124:25-30 1971
- 107 Trutko, S.M., Medenstev, A.G. and Akimenko, V.K. : Effect of deficiency of sulfur, copper and iron on cyanide-resistant respiration and cytochrome composition in *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida lipolytica* 1981-
- 108 Ugalde, R.A., Imperial, J., Shan, V.K., Brill, W.J. : Biosynthesis of iron-molybdenum cofactor in the absence of nitro-genase Journal of Bacteriology 159(3):888-893 Sept. 1984.
- 109 Ugalde, R.A., Imperial, J., Shan, V.K. and Brill, W.J. : Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor and the molybdenum cofactor in *Klebsiella pneumoniae*: Effect of sulfur source Journal of Bacteriology 164(3):1081-1087 Dec. 1985
- 110 Valentine, R.C. : Bacterial Ferredoxin Bacteriological Reviews 28(4): 497-517 Dec. 1964

- 111 Vallee, B.R. : zinc and metallenzymes. Advar Protein.Chem.
10:317-384 1985
- 112 Vallee, B.L. : Transition metal Chemistry Cap.6:173-177
1981, Verlag Chemie.
- 113 Walter, K.A. : Microbiology of metal transformations
Chap.8:317-334 Department of Microbiology Indiana Univer
sity Bloomington, Indiana.
- 114 Walter, W.G., Mc.Bee, R.H. and Temple, K : Introducci3n a la
Microbiologfa cap.10:121-138; 25:372-388. C.E.C.S.A Ed.3a
Nov. 1984.
- 115 Weinberg, E.D. : Mineral element control of microbial
secondary metabclism Chap.7:289-315
- 116 White, H., Handler, P. and Smith, E.L. : Principios de Bioquf
mica Cap.17:373-376 Ed.1a. MEx. 1977 Mc. Graw-Hill
- 117 Windle, J.J. and Sack, L.E. : Electron paramagnetic resonan
ce of Manganese and copper in spores Biochim. Biphys. Acta
66:173-179 1973
- 118 We, W.Ch.; Wo. Felicia, Y.H., Speckhard, D : Suburit location
of intrinsic divalent metal ions in RNA pclimerasa from
Escherichia coli Biochemistry 16(25):5449 July 1977
- 119 Yost, F.J., and Fridovich, I. : An Iron- containg superoxi
de dismutase from *Escherichia ccoli* Journal of Biological
Chemistry 248(14):4905-4908 July 1973
- 120 Zinsser, Wolfgang, K., Joklik., Hida, P., Willett : Microbiolo
gfa Ed.18a. Cap.1:55-85 M6dico panamericana 1986.
- *34' Fiabane, A.M., Williams, T.R. : The principles of bio-inor
ganic Chemistry. The Chemical society monographs for tea
chers 31, 1977