

UCH-FC
MAG-B
L925

BIOSINTESIS DE PIROFOSFATOS ALILICOS
EN UN SISTEMA ENZIMATICO DE CITRUS PARADISII

T E S I S

PRESENTADA A LA
UNIVERSIDAD DE CHILE
EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON MENCIÓN EN BIOQUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y FARMACÉUTICAS

POR

RAMON LOZADA DEVIA

ASESOR DE INVESTIGACION
Dr. Osvaldo Cori M.

DIRECTORA DE TESIS
Dra. Luz María Pérez R.

SANTIAGO DE CHILE
MARZO, 1981

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

UNIVERSIDAD DE CHILE

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N

T E S I S D E M A G I S T E R

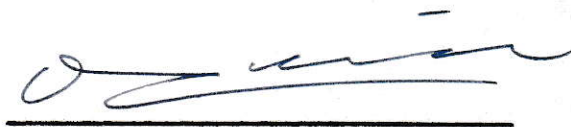
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por el candidato

RAMON LOZADA DEVIA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas.

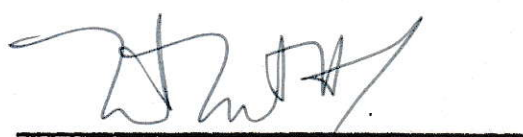
Patrocinante de Tesis

Dr. Osvaldo Cori M.

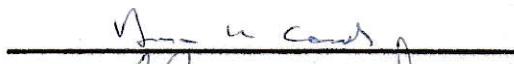


Comisión Informante de Tesis

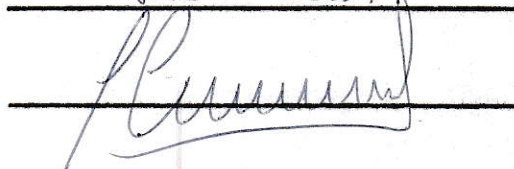
Dr. Tito Ureta



Dr. Bruce Cassels



Dr. Luis Corcuera



A MI ESPOSA Y MIS HIJAS

Quienes aportaron: Amor,
Alegría y Sacrificio.

CONTENIDO

	Pag.
LISTA DE ESQUEMAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xiii
INTRODUCCION.....	xvi
1. MATERIALES Y METODOS.....	1
1.1. REACTIVOS QUIMICOS.....	1
1.2. PREPARACION DEL GPP.....	3
1.2.1. Síntesis.....	3
1.2.2. Purificación.....	3
1.2.3. Análisis de las fracciones de sustratos...	5
1.3. TECNICAS CROMATOGRAFICAS.....	9
1.3.1. Cromatografía en capa delgada (TLC).....	9
1.3.1.1. Sílica gel H de 0,25 mm de espesor.....	9
1.3.1.2. Placa reversa: Sílica gel G de 0,5 mm de espesor.....	10
1.3.1.3. Sílica gel G de 0,25 mm de espesor.....	10
1.3.1.4. Sílica gel GF ²⁵⁴ de 0,4 mm de espesor.....	11
1.3.2. Cromatografía ²⁵⁴ en papel.....	11
1.3.3. Cromatografía en fase gaseosa (GLC).....	12
1.3.4. Cromatografía en columna de las proteínas del flavedo.....	13
1.3.4.1. Filtración disociativa.....	13
1.3.4.2. Filtración en gel.....	14
1.4. PREPARACION DEL SISTEMA ENZIMATICO.....	14
1.4.1. Incorporación de MVA.....	15
1.4.2. Actividad de la IPP-isomerasa.....	15
1.4.3. Actividad de la C ₁₅ -prenilsintetasa.....	15
1.4.4. Actividad de las ¹⁵ fosfatasa.....	15
1.5. DETERMINACION DE PROTEINAS.....	16
1.6. PURIFICACION DEL SISTEMA ENZIMATICO.....	16
1.6.1. Fraccionamiento 0/80 con sulfato de amonio	16
1.6.2. Fraccionamiento 40/70 con sulfato de amonio.....	17

1.7.	ENSAYO DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMATICAS.....	18
1.7.1.	Incorporación de MVA.....	18
1.7.2.	Actividad de la IPP-isomerasa.....	19
1.7.3.	Actividad de la C ¹⁵ -prenilsintetasa.....	20
1.7.4.	Actividad de las fosfatasas.....	20
1.7.4.1.	Actividad de la prenilfosfatasa.....	20
1.7.4.2.	Actividad de la fosfatasa inorgánica.....	21
1.8.	CUANTIFICACION DE LOS PRODUCTOS RADIOACTIVOS.....	22
1.9.	IDENTIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION.....	23
1.10.	DETERMINACION DEL PERFIL DE pH.....	23
1.11.	MODIFICACION CON REACTIVOS DE GRUPOS SH...	24
2.	RESULTADOS.....	26
2.1.	INCORPORACION DE MVA.....	26
2.1.1.	Curva de progreso.....	26
2.1.2.	Efecto de diferentes amortiguadores a distintos pH.....	28
2.1.3.	Efecto de la concentración de proteínas...	28
2.1.4.	Efecto de iones metálicos bivalentes.....	30
2.1.5.	Curvas de metales bivalentes.....	30
2.1.6.	Efecto del ATP.....	34
2.1.7.	Efecto del Fluoruro.....	36
2.1.8.	Efecto del mercaptoetanol.....	39
2.1.9.	Efecto del PCMB.....	39
2.1.10.	Efecto del DTNB.....	41
2.1.11.	Análisis de los productos de la reacción..	41
2.1.11.1.	Análisis de intermediarios fosforilados...	41
2.1.11.2.	Análisis de los alcoholes según el largo de la cadena carbonada.....	42
2.1.11.3.	Análisis de los alcoholes según la conformación E o Z.....	42
2.1.12.	Incorporación de MVA en un sistema más purificado.....	45
2.1.13.	Variación estacional.....	48
2.1.14.	Estabilidad del extracto enzimático.....	49
2.2.	IPP-ISOMERASA DE FLAVEDO DE <u>C. PARADISII</u> ..	51
2.2.1.	Condiciones de ensayo.....	51
2.2.2.	Efecto del metal bivalente.....	51
2.2.3.	Efecto del EDTA.....	53
2.2.4.	Efecto del ATP.....	54
2.2.5.	Curvas de pH.....	56
2.2.6.	Efecto del DTNB.....	58

2.3.	ACTIVIDAD DE LA C ¹⁵ -PRENILSINTETASA DEL... FLAVEDO DE <u>CITRUS</u> <u>PARADISII</u>	60
2.3.1.	Condiciones de ensayo.....	60
2.3.2.	Efecto del metal bivalente.....	60
2.3.3.	Curva de pH.....	64
2.3.4.	Efecto del DTT.....	66
2.3.5.	Efecto del DTNB.....	66
2.3.6.	Cinética de la inactivación por DTNB.....	69
2.3.7.	Cinética de la reversión de la inactivación con DTNB.....	71
2.3.8.	Análisis de los productos de la reacción..	71
2.3.9.	Purificación y estabilidad.....	73
2.4.	ACTIVIDAD DE LAS FOSFATASAS.....	81
2.4.1.	Actividad de la pirofosfatasa inorgánica..	81
2.4.1.1.	Condiciones de ensayo.....	81
2.4.1.2.	Efecto de la concentración del sustrato...	81
2.4.1.3.	Efecto del metal bivalente y del EDTA.....	84
2.4.1.4.	Efecto del Fluoruro.....	84
2.4.1.5.	Especificidad por el sustrato.....	84
2.4.1.6.	Estabilidad del sistema enzimático.....	86
2.4.2.	Actividad de la prenilfosfatasa.....	86
2.4.2.1.	Condiciones de ensayo y estabilidad.....	86
2.4.2.2.	Curva de metal bivalente.....	87
2.4.2.3.	Efecto del DTNB.....	87
2.4.2.4.	Curvas de pH.....	87
3.	DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	90
4.	BIBLIOGRAFIA.....	102

LISTA DE ESQUEMAS

	. Pag.
Esquema 1. Ruta biosintética desde MVA hasta mono y -- sesquiterpenos.....	xxii
Esquema 2. Mecanismos de las reacciones Isomerasa, Pre nilsintetasa y Carbociclasa.....	xxvii
Esquema 3. Posible mecanismo de formación de monoterpe nos en <u>Citrus</u>	xxxi
Esquema 4. Fundamento de los métodos analíticos usados para identificar distintos esteres fosfóri cos de prenoles.....	8

LISTA DE FIGURAS

	pag.
Fig. 1. Cromatografía de una mezcla de productos fosforilados en columna de DEAE-Sephadex A-25...	6
Fig. 2. Curva de progreso para la incorporación de -- [2- ¹⁴ C] MVA por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	27
Fig. 3. Efecto de la concentración de proteínas del extracto de flavedo de <u>C. paradisi</u> sobre la velocidad de incorporación de MVA.....	29
Fig. 4. Efecto de la naturaleza del metal sobre la velocidad de incorporación de MVA, por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	31
Fig. 5. Efecto de la concentración de Mn ²⁺ sobre la velocidad de incorporación de MVA, por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	32
Fig. 6. Efecto de la concentración de Co ²⁺ sobre la velocidad de incorporación de MVA, por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	33
Fig. 7. Efecto de la concentración de ATP sobre la velocidad de incorporación de MVA, por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	35
Fig. 8. Efecto del Fluoruro sobre la incorporación de MVA en presencia de Mg ²⁺ , por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	37
Fig. 9. Efecto del fluoruro sobre la incorporación de MVA en presencia de Mn ²⁺ , por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	38
Fig. 10. Efecto del mercaptoetanol sobre la velocidad de incorporación de MVA por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	40
Fig. 11. Análisis por cromatografía en papel de los -- productos de la reacción de incorporación de MVA por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	43
Fig. 12. Análisis por TLC de los productos de la reacción de incorporación de MVA por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u>	44
Fig. 13. Análisis por TLC de los productos de la reacción de incorporación de MVA por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u> , según su conformación.....	46

Fig. 14.	Análisis por TLC de los productos de la reacción de incorporación de MVA por un extracto acuoso del flavedo de <u>C. paradisi</u> , según su conformación E o Z y su largo de cadena.....	47
Fig. 15.	Estabilidad en el tiempo del extracto enzimático del flavedo de <u>C. paradisi</u> , respecto a la incorporación de MVA en prenifosfatos....	50
Fig. 16.	Efecto de la concentración de proteínas del extracto de flavedo de <u>C. paradisi</u> , sobre su actividad IPP-isomerásica.....	52
Fig. 17.	Efecto del EDTA sobre la actividad IPP-isomerásica del flavedo de <u>C. paradisi</u>	55
Fig. 18.	Efecto del pH sobre la actividad IPP-isomerásica del flavedo de <u>C. paradisi</u>	57
Fig. 19.	Inactivación de la IPP-isomerasa de flavedo de <u>C. paradisi</u> por DTNB.....	59
Fig. 20.	Efecto de la concentración de proteínas del extracto de flavedo de <u>C. paradisi</u> , sobre su actividad C ₁₅ -prenilsintetásica.....	61
Fig. 21.	Curva de progreso para la actividad de la C ₁₅ prenilsintetasa del flavedo de <u>C. paradisi</u> ..	62
Fig. 22.	Efecto del metal bivalente sobre la actividad de la C ₁₅ -prenilsintetasa del flavedo de <u>C. paradisi</u>	63
Fig. 23.	Efecto del pH sobre la actividad de la C ₁₅ -prenilsintetasa del flavedo de <u>C. paradisi</u> ..	65
Fig. 24.	Efecto del DTT sobre la actividad de la C ₁₅ -prenilsintetasa del flavedo de <u>C. paradisi</u> ..	67
Fig. 25.	Efecto del DTNB sobre la actividad de la C ₁₅ -prenilsintetasa del flavedo de <u>C. paradisi</u> ..	68
Fig. 26.	Inactivación de la C ₁₅ -prenilsintetasa del flavedo de <u>C. paradisi</u>	70
Fig. 27.	Efecto del DTT sobre la reacción de inactivación de la C ₁₅ -prenilsintetasa del flavedo de <u>C. paradisi</u> , con DTNB.....	72
Fig. 28.	Análisis por TLC de los productos de la reacción en presencia de Mg ²⁺ , de la C ₁₅ -prenilsintetasa del flavedo de <u>C. paradisi</u>	74
Fig. 29.	Análisis por TLC de los productos de la reacción, en presencia de Mg ²⁺ de la C ₁₅ -prenilsintetasa del flavedo de <u>C. paradisi</u>	75

Fig. 30.	Análisis por TLC de los productos de la reacción, en presencia de Mn^{2+} , de la C_{15} -prenil sintetasa del flavedo de <u>C. paradisii</u>	76
Fig. 31.	Análisis por TLC de los productos de la reacción, en presencia de Mn^{2+} , de la C_{15} -prenil sintetasa del flavedo de <u>C. paradisii</u>	77
Fig. 32.	Análisis por GLC de los productos de la reacción, en presencia de Mg^{2+} , de la C_{15} -prenil sintetasa del flavedo de <u>C. paradisii</u>	78
Fig. 33.	Actividad de la pirofosfatasa inorgánica del flavedo de <u>C. paradisii</u>	82
Fig. 34.	Efecto de la concentración del sustrato, sobre la actividad de la pirofosfatasa inorgánica del flavedo de <u>C. paradisii</u>	83
Fig. 35.	Efecto del fluoruro sobre la actividad de la pirofosfatasa inorgánica del flavedo de <u>C. paradisii</u>	85
Fig. 36.	Efecto del pH sobre la actividad de la prenil fosfatasa del flavedo de <u>C. paradisii</u>	88

ABREVIATURAS

AA	: Fosfatos alílicos
AMP	: Adenosín-5'-monofosfato
at	: Atomo o átomos
ATP	: Adenosín-5'-trifosfato
DEAE	: Dietil, aminoetil
DMAPP	: 3,3'-Dimetilalil-pirofosfato
DTNB	: 5,5'-Ditio-bis-(2-nitro benzoato)
DTT	: Ditiotreitól
EDTA	: Acido etilendiamino-tetraacético
EGA	: Etilen, glicol-adipato
FOH	: Farnesol
E-FOH	: 2,6-di-trans-Farnesol
Z-FOH	: 2-cis,6-trans-Farnesol
FPP	: Farnesil-pirofosfato
E-FPP	: 2,6-di-trans-Farnesil-pirofosfato
Z-FPP	: 2-cis,6-trans-Farnesil-pirofosfato
g	: Campo gravitacional
GGPP	: Geranilgeranil-pirofosfato
GLC	: Cromatografía en fase gaseosa
GOH	: Geraniol
GPP	: Geranil-pirofosfato
IpOH	: Isopentenol
[1- ¹⁴ C]IPP	: [1- ¹⁴ C]Isopentenil-pirofosfato
LL	: Lípidos libres

MES	: Acido 2(N-morfolino), etanosulfónico
3(RS)[2- ¹⁴ C]MVA	: 3(RS)[2- ¹⁴ C]Acido mevalónico
NOH	: Nerol
NPP	: Neril-pirofosfato
PCMB	: p-Cloro,mercuri-benzoato
POPOP	: 2,2'-p-fenilen-bis-(feniloxazol)
PMVA	: Acido fosfomevalónico
PPi	: Pirofosfato inorgánico
PP	: Prenol fosfatos
PPMVA	: Acido pirofosfomevalónico
PPO	: 2,5-Difeniloxazol
TES	: Acido N-Tris(hidroximetil)metil-2-amino- etano-sulfónico
TLC	: Cromatografía en capa delgada
Tris	: Tris-hidroxi,metil,amino-etano
Vc	: Volumen de columna

RESUMEN

Un extracto acuoso crudo de flavedo de Citrus paradisii - incorpora 25% de la radiactividad proveniente del (3R) MVA, para formar isoprenoides de 5, 10 y 15 at de C, en presencia de ATP. La incorporación más eficiente se obtiene en presencia de Mn^{2+} 1 mM y ATP 2 mM; Mg^{2+} y Co^{2+} son menos efectivos.

El fluoruro 50 mM inhibe la formación de prenilfosfatos y a las fosfatasas en presencia de Mg^{2+} . Con Mn^{2+} presenta efecto inhibitorio únicamente sobre las fosfatasas y se estimula la formación de los prenilfosfatos.

El DTNB 5 μM inhibe al sistema en un 50%. El PCMB tiene una $I_{0,5}$ del orden de 40 μM .

El sistema forma los mismos intermediarios fosforilados - que se han identificado en Pinus radiata: Fosfo y Pirofosfo mevalonato (PMVA y PPMVA) e Isopentenil pirofosfato (IPP). - En presencia de Mn^{2+} y a partir de MVA produce los compuestos E-C₁₀ (GPP), Z-C₁₀ (NPP) y E-C₁₅ (E-FPP).

La isopentenil pirofosfato isomerasa (IPP-isomerasa) de - C. paradisii no requiere metal bivalente para su actividad. EDTA 1 mM estimula en un 15% su actividad y a concentraciones mayores a 2 mM actúa como inhibidor. La enzima requiere de la presencia de grupos SH, no es inhibida por DTNB hasta 200 μM ; pero es inactivada a 30° por 200 μM DTNB en ausencia

de sustrato, con un $t_{0,5}$ mayor a 15 min.

La C_{15} -prenilsintetasa de C. paradisi forma en presencia de Mg^{2+} los productos E-FPP y Z-FPP, en una proporción de 3 a 1; mientras que con Mn^{2+} solamente sintetiza el E-FPP. No utiliza NPP como sustrato, pero en la incorporación de MVA - este compuesto se acumula.

Requiere de Mg^{2+} 6 mM para su máxima actividad; el Mn^{2+} - es menos efectivo, y requiere de la presencia de grupos SH para su actividad. El DTNB tiene una $I_{0,5}$ de 32 μM . Entre 25 y 100 μM inactiva la enzima reversiblemente en ausencia - de sustratos a 0° con $t_{0,5}$ entre 37 y 6 min. La reacción de modificación de los grupos SH libres de la enzima sigue un - patrón cinético monofásico y de pseudoprimer orden con res- pecto al DTNB.

El extracto acuoso del flavedo de C. paradisi tiene una actividad fosfatásica, que hidroliza PPI, ATP, AMP, p-nitro- fenil fosfato y GPP. Las enzimas no requieren metal bivalen- te para su completa actividad. Son inhibidas por F^{-} y muy - poco por reactivos de grupos SH.

De acuerdo a los resultados de inactivación con DTNB y - del perfil de pH de la C_{15} -prenilsintetasa se infiere la po- sible participación de un residuo de Cisteína en la reacción enzimática.

La prenilsintetasa presenta dos actividades cuya estereoespecificidad por el producto depende de la naturaleza del metal usado como cofactor.

De todos los resultados anteriores se concluye que la biosíntesis de isoprenoides, a partir de MVA por enzimas del flavado de C. paradisi, sigue el mismo patrón observado en otros sistemas vegetales.

SUMMARY

A cell free extract from Citrus paradisi flavedo incorporates 25% of the radioactivity from (3R)[2-¹⁴C]MVA into C₅, - C₁₀ and C₁₅ isoprenoids, in presence of ATP. The optimal incorporation is obtained with 1 mM Mn²⁺ and 2 mM ATP; Mg²⁺ or Co²⁺ can replace Mn²⁺.

50 mM Fluoride inhibits the prenylphosphates formation - and phosphatase activities in presence of Mg²⁺. With Mn²⁺ - the inhibitory effect is shown only on the phosphatases -- since prenylphosphate formation is stimulated.

The system is inhibited about 50% by 5 μM DTNB. I_{0,5} for PCMB was about 40 μM.

The system forms the same phosphorilated intermediates - that have been identified in Pinus radiata: PMVA, PPMVA and IPP. The compounds E-C₁₀ (GPP), Z-C₁₀ (NPP) and E-C₁₅ (E-FPP) are produced, in presence of Mn²⁺, from MVA.

IPP-isomerase activity from C. paradisi does not require divalent metal. It is stimulated about 15% by 1 mM EDTA and higher concentrations that 2 mM EDTA is inhibited. The enzyme requires the presence of SH groups, it is not inhibited by concentration until 200 μM DTNB but, in absence of substrate, is inactivated at 30° by 200 μM DTNB, with t_{0,5} longer than 15 min.

C_{15} -prenylsynthetase from C. paradisi forms E-FPP and Z-FPP in a ratio of 3 to 1, in presence of Mg^{2+} but with Mn^{2+} synthetizes only E-FPP. NPP is not substrate of the enzyme, but it is accumulated when MVA was the substrate.

The system requires 6 mM Mg^{2+} and SH groups for optimal activity. With Mn^{2+} has about 50% of the activity of Mg^{2+} . $I_{0,5}$ for DTNB is 32 μM . In absence of substrates the enzyme is inactivated at 0° by 25 to 100 μM DTNB with $t_{0,5}$ of 37 to 6 min. The reaction of SH groups modification shows a kinetic monophasic pattern. The reaction was pseudofirst order in relation to DTNB.

An aqueous extract from C. paradisi flavedo presents a phosphatase activity that splits PPI, ATP, AMP, p-Nitrophenylphosphate and GPP. The enzymes do not require divalent metals for full activity. They are inhibited by fluoride -- and very weakly by SH groups reagents.

C_{15} -prenylsynthetase probable requires the presence of a Cysteine residue for enzymatic reaction. This hypothesis -- was deduced from the inactivation experiments with DTNB and of the pH profile.

C_{15} -prenylsynthetase shows two activities with stereospecificity for the synthesis of E and Z products dependent of the nature of bivalent metal.

We conclude that isoprenoid biosynthesis from MVA by enzymes from C. paradisi flavedo shows the same pattern that has been observed in others plant systems.

INTRODUCCION

En la naturaleza y en especial en los tejidos vegetales, existe una gran variedad de compuestos orgánicos de muy diversa estructura, sobre cuya función y biosíntesis se conoce relativamente poco, y que por ello se han designado con el término genérico de "Productos secundarios" (48,93). Dentro de esta gran clase podemos mencionar a los alcaloides, antocianinas, flavonoides, isoprenoides, taninos, polifenoles, ubiquinonas, etc.

El estudio de los productos extraídos de fuentes naturales se remonta a la antigüedad, donde los alquimistas tratando de encontrar la "Quinta esencia", extrajeron fracciones volátiles de diversos tejidos vegetales, por destilación con arrastre de vapor de agua, y a los cuales denominaron "Aceites esenciales".

En 1887, Otto Wallach, ayudante de Kekulé, estableció que los distintos productos que componían los aceites esenciales, tenían algunas características en común. Todos ellos poseían la misma fórmula global $C_{10}H_{16}$ (hoy llamados monoterpenos), y sus estructuras se podían derivar de un origen común, el Isopreno de fórmula C_5H_8 , conocido en aquel entonces como producto de pirólisis del caucho. Recientemente se ha demostrado que es producido por hojas de plantas del género Quercus y otras (90).

Además de los aceites esenciales, existen también en los tejidos vegetales, compuestos que se obtienen en fracciones de puntos de ebullición más alto o por diferentes técnicas - de extracción, como los que hoy llamamos sesquiterpenos, fitohormonas, carotenos, giberelinas, etc.

El estudio de la determinación de las estructuras de todos los compuestos extraídos de tejidos vegetales, culminó en 1953 con la aparición de la "Regla del Isopreno" enunciada por Ruzicka (96). Esta regla establecía que numerosos - productos naturales como los monoterpenos, esteroides, caucho y otros derivaban de una molécula simple, el Isopreno.

Con el descubrimiento del Acido Mevalónico en 1956 por - Folkers y Wright (120), se inició una nueva etapa en la química de los Terpenoides. En el mismo año Tavornina y sus co laboradores (109) encontraron que el MVA era un excelente - precursor del colesterol. Más tarde también demostraron que este mismo compuesto era utilizado en la biosíntesis de una gran variedad de isoprenoides, por lo que llegaron a postular que la incorporación de MVA en un determinado compuesto, era criterio suficiente para afirmar que dicho producto era un terpenoide (45). Recientemente Popják (39) ha encontrado excepciones a este criterio.

A pesar de todo, la regla del isopreno de Ruzicka no encontró apoyo experimental directo en sistemas biológicos, -

hasta el descubrimiento en 1958 del Isopentenil pirofosfato (IPP) (71). Este es el primer compuesto de la ruta biosintética de isoprenoides en el que la estructura isoprénica se reconoce directamente y desde donde se originan los monoterpenos hasta los poliprenoides, a través de diferentes reacciones catalizadas enzimáticamente. Debido a que el IPP es el precursor de los isoprenoides en sistemas biológicos se le ha llamado el "Isopreno biológicamente activo" (24).

Alrededor de 2000 especies de plantas superiores producen aceites esenciales. Los componentes de estos son principalmente hidrocarburos, alcoholes, aldehidos, esterés, éteres y cetonas de estructura aromática, alifática o carbocíclica. Una fracción importante de estos compuestos tiene estructura isoprénica de 10 y 15 at de C (mono y sesquiterpenos). En general, estos compuestos son sintetizados en tejidos especializados de hojas, tallos, frutos o pétalos de flores, conocidos con el nombre de glándulas de aceite o como tubos resiníferos (67,68).

Entre las plantas que producen aceites esenciales, pueden destacarse las de los géneros Pinus y Abies, cuyo aceite recibe el nombre de "Esencia de trementina", los de Mentha, Citrus, Eucaliptus, Rosa, Salvia, etc. Estos aceites son utilizados en cosmética, perfumería, repostería, pintura, farmacia e industria en general. Debido a la limitación de la industria petroquímica, estos recursos renovables cobrarían

una destacada importancia económica.

Desde el punto de vista ecológico, se piensa que los terpenoides de los aceites esenciales cumplen una función insecticida, herbicida, etc. (9,48). No obstante hay datos para pensar también que algunos de ellos recambian activamente y podrían constituir una reserva de carbono (68).

La estructura isoprenoide de muchos componentes de los aceites esenciales indicaba que podían ser biosintetizados - por la vía del MVA, pero sólo en 1958 Stanley (106) estableció que dicho precursor se incorporaba en un 0,05% al α -pineno en agujas (hojas) de Pinus nigra. Hasta 1966 todos los experimentos realizados para estudiar biosíntesis de terpenoides fueron hechos en plantas u órganos enteros (9). En todos estos casos la incorporación de MVA a hidrocarburos terpénicos (9) parecía tener el límite de 0,05%. Esta baja utilización se atribuyó a problemas de compartimentalización y a barreras de permeabilidad (9,68,69). Por estas razones resultaba casi imposible un estudio del mecanismo químico de la biosíntesis de los hidrocarburos terpénicos.

En este laboratorio se ha tratado desde 1964 de evitar - por dos caminos los problemas de compartimentalización y permeabilidad: a) Obtención de sistemas enzimáticos libres de células, o de enzimas aisladas que permitan estudiar las reacciones sin el problema de las barreras de la permeabilidad;

y b) Síntesis química de precursores marcados isotópicamente, que permita analizar la formación de los productos finales - de esta vía metabólica, en sistemas con menos etapas enzimáticas que a partir de MVA.

En 1966, Valenzuela et al (114) demuestran que un extracto libre de células, obtenido de plántulas de Pinus radiata, forma a partir de [2-¹⁴C]MVA tres de los intermediarios conocidos como parte de la vía isoprenoide: Acido fosfomevalónico, Acido pirofosfomevalónico e Isopentenil pirofosfato, compuesto que había sido descrito por Lynen (71) y denominado - "Isopreno Activo". Actualmente se sabe que todos los terpenoides se forman a partir de este compuesto (68).

La biosíntesis de IPP se demostró a partir de MVA en levadura (94), bacterias (81), plantas superiores (5,14) y mamíferos (119). El proceso ocurre a través de tres reacciones que usan ATP; las dos primeras generan secuencialmente el grupo pirofosfato y en la última el carboxilo y el OH del MVA se eliminan concertadamente, para generar el metileno terminal del IPP.

Las enzimas que catalizan estas reacciones son la quinasa mevalónica, la quinasa fosfomevalónica y la descarboxilasa pirofosfomevalónica. Estas han sido estudiadas en hígado (15,51,64,68), levadura (17,53,110,111), Cucurbita pepo (66), Pinus (99,107,114), suero de Hevea brasiliensis (101,102,118)

y Citrus (88).

Posteriormente en 1969, Beytía et al (14) demuestran en P. radiata la formación de Dimetilalil pirofosfato (DMAPP), Geranil pirofosfato (GPP) y de un intermediario hasta entonces no descrito el Neril pirofosfato (NPP), isómero Z[#] del GPP. Con esto queda establecido que también en este organismo la vía biosintética es la que se describe en el esquema 1.

El paso de IPP a hidrocarburos monoterpénicos es catalizado por tres enzimas o grupos de enzimas: La IPP-isomerasa, la o las prenilsintetasas y la o las carbociclasas.

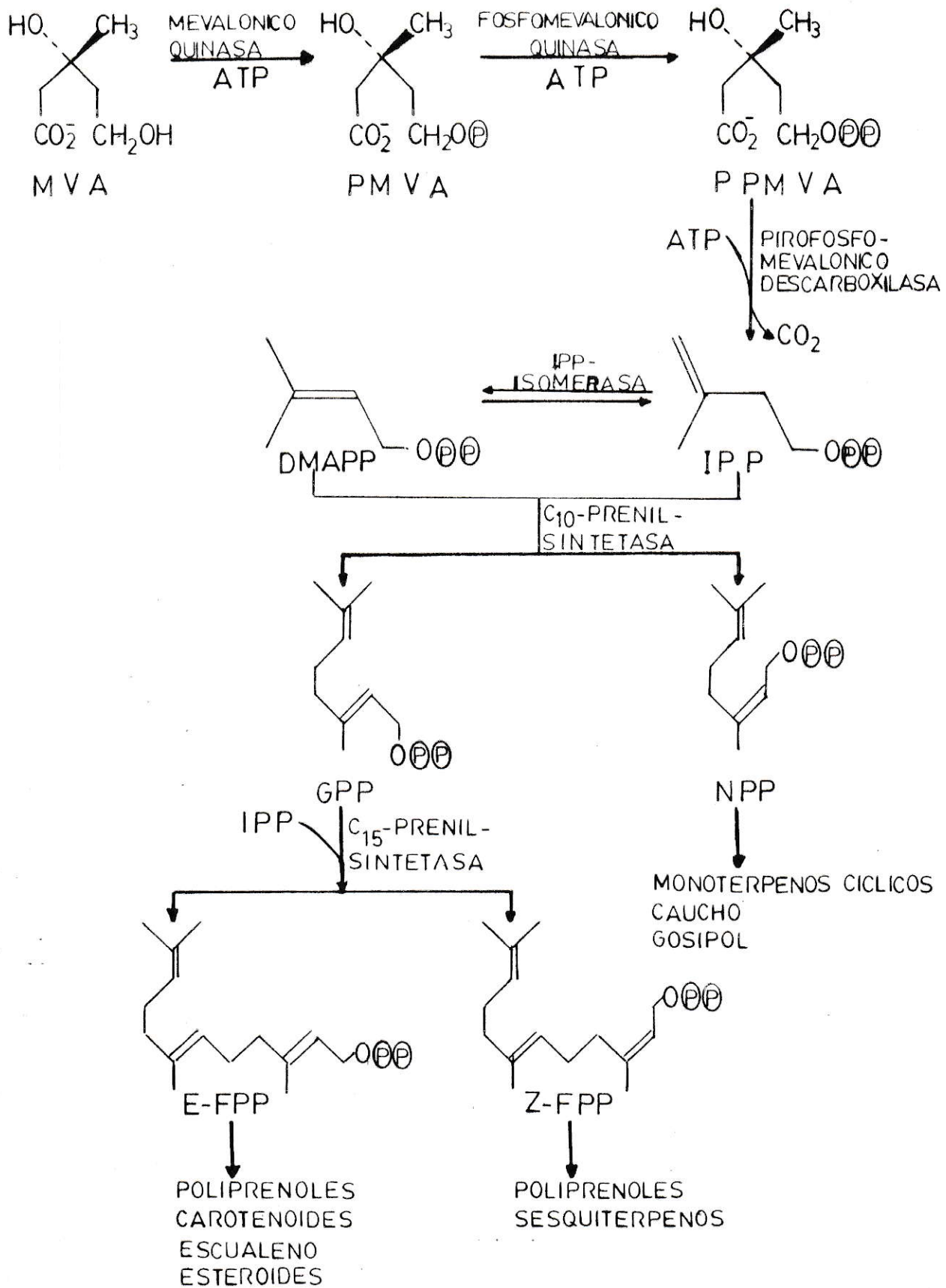
La IPP-isomerasa transforma el IPP en su isómero alílico el DMAPP y ha sido estudiada en hígado (11,55,100), levadura (2), zapallo (77), Pinus (40) y Citrus (40,44). El mecanismo de la reacción enzimática consiste en la adición de un protón al doble enlace metilénico, con lo cual se forma un carbocatión, que se estabiliza por la pérdida del protón pro R del C₂. Este mecanismo ha sido estudiado en enzimas de hígado (55,100), de levadura (2), de Pinus y Citrus (60) y se

- / -

Los isómeros Z(cis) y E(trans) se refieren a "diastereoisómeros"(a) que difieren en "conformación", de acuerdo a las especificaciones de la IUPAC (b).

- a) Mislow, K.
Introduction to Stereochemistry, pag. 51, W.A. Benjamin, New York, 1966.
- b) IUPAC
J. Org. Chem., 35, 2849 (1970).

ESQUEMA 1. Ruta biosintética desde MVA hasta mono y sesquiterpenoides



ha establecido que la estereoquímica es siempre la misma. - Las IPP-isomerasas descritas son muy sensibles a reactivos electrofílicos y de grupos SH (2,55,56,60,100).

La o las prenilsintetasas son las enzimas que alargan la cadena isoprenica, a partir del IPP y de un intermediario alílico de 5, 10, 15 o más at de C. Químicamente, estas reacciones de polimerización pueden considerarse como el producto del ataque nucleofílico del metileno del IPP sobre el C₁ del carbocatión alílico generado por pérdida del grupo pirofosfato desde un intermediario como DMAPP, GPP u otro. El resultado de la reacción es la formación de un nuevo pirofosfato alílico que contiene una unidad isoprenica más y un nuevo doble enlace. Dependiendo de la especie o tejido, el número de condensaciones paralelas puede ser una o dos como en la biosíntesis de GPP o FPP (72), puede ser de 10 a 20 como en la síntesis de poliprenoles (52), o llegar a varios miles como en la formación del caucho o la gutapercha (7). Muchos estudios con prenilsintetasas de diversas fuentes han llevado a obtener una FPP-sintetasa como una proteína homogénea a partir de hígado de cerdo (121), de hígado de ave (91) y de levadura (38). Otras prenilsintetasas han sido parcialmente purificadas de Ricinus comunis (50) y de C. pepo (77). Estas últimas catalizan la síntesis de GPP y FPP. Además algunas prenilsintetasas incluyen una actividad GGPP-sintetasa - como la purificada de Micrococcus lysodeikticus (62) y la de

tectada en semillas de C. pepo (79) y de R. communis (95). - Se ha descrito también una undecaprenil pirofosfato sintetasa parcialmente purificada de Lactobacillus plantarum (63) y una C₃₅ a C₄₀ prenilpirofosfato-sintetasa de M. lysodeikticus (3). Estas últimas enzimas catalizan la síntesis de prenilpirofosfatos de 55 y de 35 a 40 at de C respectivamente, usando como sustratos IPP y FPP. Ya que las prenilsintetasas son las enzimas que definen el tamaño y la geometría de los prenilpirofosfatos, se puede prever que deben existir muchos tipos de enzimas que presentarán especificidad respecto a dos variables; estas son el largo de cadena del sustrato alílico y por ende del producto, y la conformación en torno a cada doble enlace generado. Bajo ciertas condiciones, la FPP-sintetasa de hígado de pollo puede catalizar la formación de GGPP a partir de IPP y FPP (91), pero la velocidad de esta reacción es demasiado baja para ser considerada de importancia fisiológica. Por otro lado, una preparación bastante pura de GGPP-sintetasa de M. lysodeikticus cataliza la formación de GPP, FPP y GGPP (68), y una preparación de la misma enzima obtenida de C. pepo exhibe también las tres actividades (79). Por lo tanto, la porción del sitio activo que acomoda la cadena alquímica del sustrato alílico debe ser relativamente poco específica. Esta suposición ha sido demostrada experimentalmente, ya que la FPP-sintetasa es capaz de condensar una serie de homólogos de GPP modificados en la región del doble enlace C₆-C₇ (76,79,86). La unión -

del IPP a su sitio tiene requerimientos estructurales mucho más estrictos (80). La única modificación que se puede introducir es el reemplazo del metilo por un grupo etilo (78). Con excepción de los poliprenoles, los intermediarios prenil pirofosfatos tienen, en animales, estructura E en torno a los dobles enlaces. En tejidos vegetales, en cambio, que poseen un metabolismo isoprénico más diversificado, se ha encontrado NPP, el isómero Z del GPP (14), y se conocen muchos productos con dobles enlaces de conformación Z, como el Ácido abscísico (28), ciertos poliprenoles (52) y el caucho (7). Sin embargo, todas prenilsintetasas descritas, generan productos E y usan sustratos E. La excepción es una enzima de algodón que participa en la biosíntesis de gossypol, ésta utiliza NPP como sustrato alílico (1), y sintetiza el E-FPP. Además se ha descrito un sistema enzimático de Pinus (14) -- que genera el NPP, y otro de Citrus sinensis (34) que aunque utiliza solamente sustratos de conformación E, genera productos de conformación E y Z, tales como el GPP, NPP, Z-FPP y el E-FPP. La geometría del doble enlace C₂-C₃ es definida durante la reacción: después de la adición del metileno del IPP al C₁ del sustrato alílico, se produce un carbocatión terciario que se transforma en el producto, por la eliminación de uno de los protones del C₂ (31). Popják (6) y Hemming (49) postularon que de la eliminación del protón 2 pro-S del IPP se obtendrían productos de conformación Z, y al eliminarse el protón 2 pro-R del IPP, se obtendrían productos

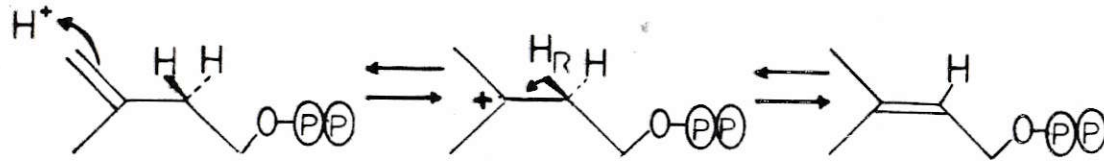
de conformación E. Estas conclusiones fueron extraídas basándose solamente en datos obtenidos sobre la estereoquímica de la biosíntesis de FPP, escualeno, caucho, betulaprenol y dolicol. Los experimentos realizados en nuestro laboratorio con enzimas de Pinus y Citrus (14,21,59,60), demostraron que tanto la biosíntesis de compuestos E como Z está siempre asociada con la eliminación del protón 2 pro-R del IPP, resultados obtenidos también por Banthorpe en otras especies (10). Estos últimos resultados apuntan hacia la existencia de prenilsintetasas estereoespecíficas, las que eliminando el mismo protón (2 pro-R del IPP) originan compuestos de conformación opuesta.

Los hidrocarburos cíclicos se formarían por la acción de enzimas denominadas colectivamente carbociclasas (23). Estas catalizarían la adición intramolecular del doble enlace C₆-C₇ al C₁ de un carbocatión alílico. El carbocatión cíclico se estabilizaría por nuevas adiciones de dobles enlaces, reordenamientos y finalmente eliminación regioselectiva del protón (23,29).

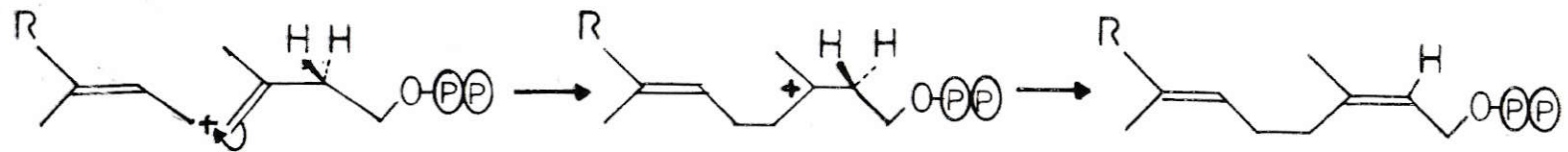
Puede decirse que las tres enzimas mencionadas tienen un mecanismo común (29): Adición de un electrófilo a un doble enlace, con formación de un carbocatión y estabilización de éste por eliminación regio o estereoselectiva de un protón, tal como se muestra en el esquema 2. El electrófilo puede ser un protón (IPP-isomerasa), un carbocatión alílico deriva

ESQUEMA 2

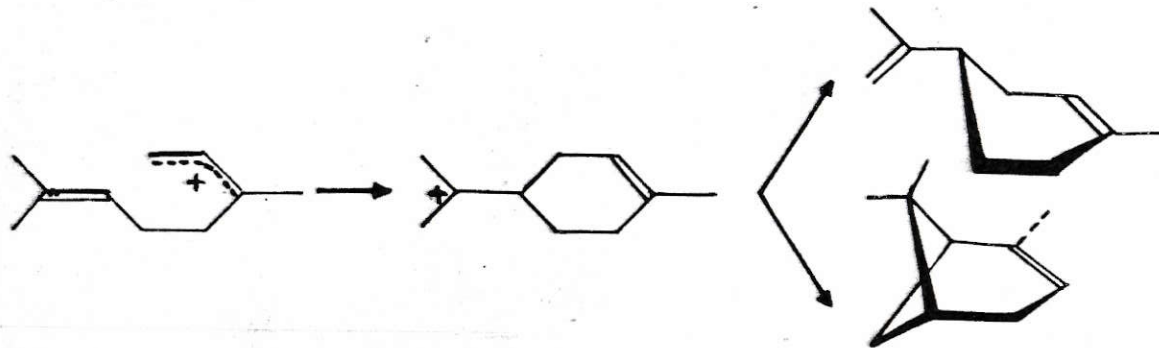
1. REACCION DE LA ISOMERASA



2. REACCION DE LA PRENILSINTETASA



3. REACCION DE LA CARBOCICLASA



do de otra molécula (Prenilsintetasa) o un carbono catiónico de la misma molécula (Carbociclasa).

Por influencia de los hechos establecidos para la biosíntesis de colesterol, se pensó durante mucho tiempo que los monoterpenos cíclicos se formaban a partir del GPP (18,93). En 1966, este grupo propuso que el precursor inmediato de dichos terpenos fuese el NPP (14,114), basándose en la inspección de modelos moleculares. Más adelante esta hipótesis halló apoyo en experimentos de solvólisis no enzimática (115) y en el haber demostrado que un sistema enzimático de P. radiata formaba NPP a partir de [2-¹⁴C]MVA (14).

La conformación E del doble enlace C₂-C₃ del GPP no permite que se produzca la ciclación por ataque del doble enlace C₆-C₇ al C₁, a menos que se pudiera producir una rotación en torno al enlace C₂-C₃. Esta hipótesis se comprobó por la incorporación de [2-¹⁴C]NPP a α y β -pineno por un extracto de plántulas de P. radiata (27). El porcentaje de radiactividad incorporado a hidrocarburos fué diez veces superior a la tasa habitual obtenido a partir de MVA. En cambio, no hubo incorporación apreciable de radiactividad a partir de GPP. Cuando se exploraron estas actividades en flavedo de Citrus sinensis (47) y de Citrus limonunm (23), se encontró que NPP y GPP fueron igualmente efectivos como precursores de hidrocarburos monoterpénicos cíclicos.

Cabe preguntarse si la o las prenilsintetasas forman estos dos isómeros por síntesis estereoespecífica a partir de DMAPP + IPP o bien por una isomerización E-Z que transforme GPP en NPP. Esta última alternativa no parecía probable en Pinus, ya que sólo este último era precursor de hidrocarburos cíclicos. Además, en numerosos experimentos (23,27,47) se ha demostrado que ni en Pinus ni en Citrus ocurre dicha isomerización. Recientemente Banthorpe (12) ha reportado un resultado similar en otras especies.

El objetivo principal de las investigaciones de este laboratorio es llegar a conocer los mecanismos de las reacciones de prenilsintetasas y de carbociclasas. Para ello es indispensable contar con preparados enzimáticos más o menos purificados, ya que son muchas las reacciones que pueden drenar sustratos o productos. Para elaborar un procedimiento que permita obtener cantidades adecuadas de enzimas, es necesario disponer de un material biológico que sea abundante, de fácil obtención, relativamente estable y del cual se sepa que lleva a cabo las reacciones que interesa estudiar.

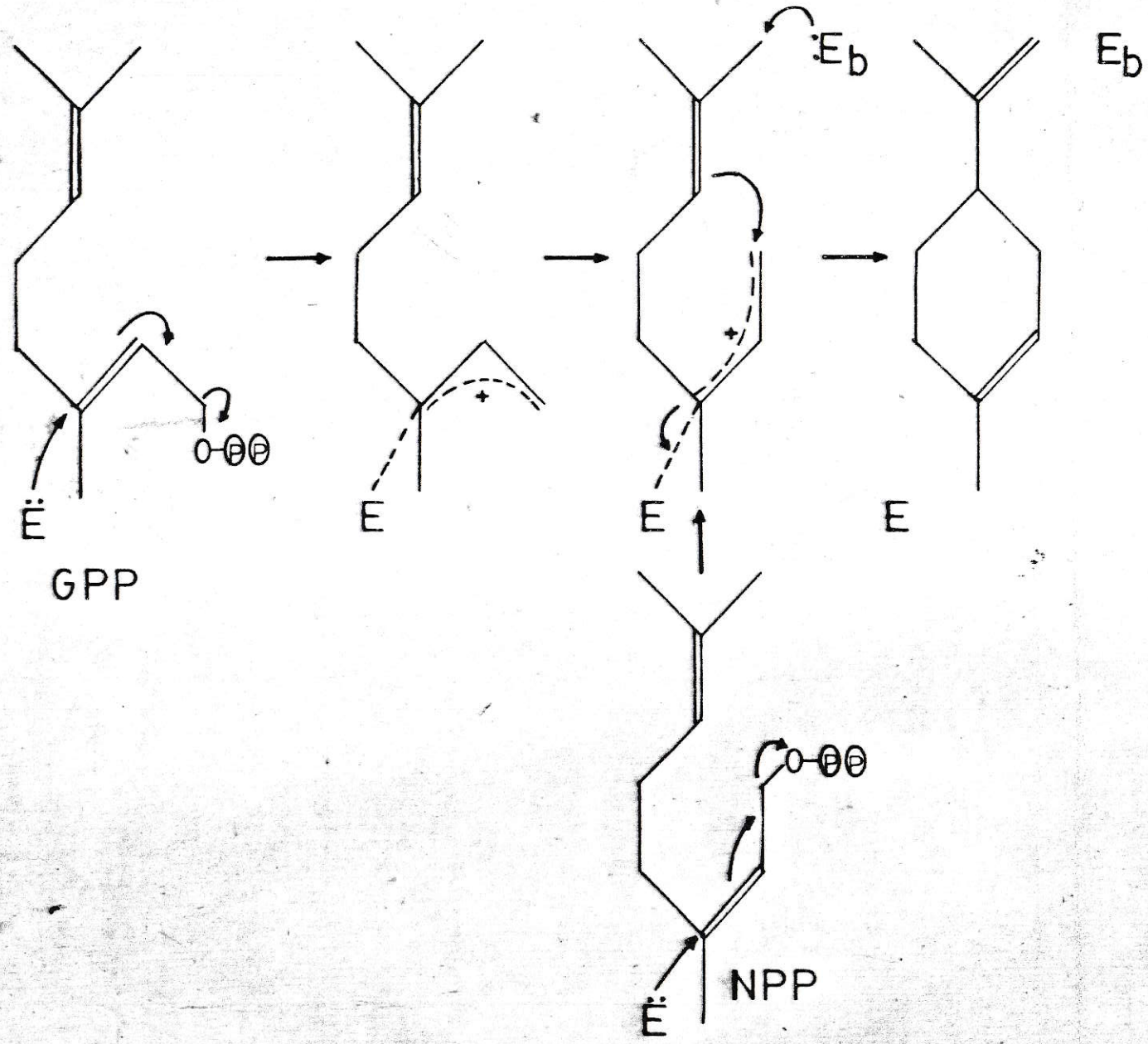
Los experimentos de biosíntesis de hidrocarburos terpénicos a partir de intermediarios radiactivos se iniciaron con extractos de plántulas de P. radiata. El material de Pinus, si bien daba resultados muy reproducibles, era muy escaso. Cada plántula de Pinus pesa unos 100 mg y habría sido necesario contar con varias decenas de miles de plántulas para una

purificación enzimática. Por esta razón se pensó estudiar la biosíntesis de isoprenoides en flavedo de Citrus. Estos suministran 10 o más gramos de tejido fresco por fruto, y la composición química de sus aceites esenciales es bastante conocida (8).

El estudio se inició en C. sinensis y en C. limonum. Extractos crudos de flavedo de estos frutos formaban los hidrocarburos cíclicos α -pineno, β -pineno y limoneno (23,47), tanto a partir de GPP como de NPP, contrariamente a lo descrito en Pinus, en el que sólo este último es sustrato de las carbociclasas. Como se demostró también que en estos sistemas no hay interconversión entre estos dos pirofosfatos (23,47) se propuso una hipótesis que explica la rotación en torno al enlace C_2-C_3 , por deslocalización de la carga de un carbocación alílico ligado a la enzima (23,116). Esquema 3.

Al estudiar extractos o preparaciones parcialmente purificadas de C. sinensis (47), se observó que formaban predominantemente pirofosfatos alílicos de 15 at de C de conformación E o Z en el doble enlace C_2-C_3 , predominando los primeros en una proporción de 12:1. Se formaron sólo cantidades muy pequeñas de compuestos de 10 at de C. Al igual que en otras preparaciones, se demostró la ausencia de isomerización E-Z de estos sesquiterpenoides. Con esto se demuestra que la síntesis de ambos diastereoisómeros es un proceso estereoselectivo, que puede ser catalizado por una o dos prenil-

ESQUEMA 3. Posible mecanismo de formación de monoterpenos en Citrus



sintetasas. La inactivación selectiva y la disociación parcial de las dos actividades durante el proceso de purificación de estas enzimas, sugiere que se trata de dos prenilsintetasas. Hasta ahora ha sido posible obtener una preparación enzimática que sintetiza sólo E-FPP, pues parecería que la actividad Z-FPP es más lábil y no se ha podido aislar de flavedo de C. sinensis.

Estudios preliminares de incorporación de $[2-^{14}\text{C}]$ MVA en prenoles de distinto largo de cadena, demostraron que extractos de flavedo de Citrus paradisi (Pomelo) incorporaban hasta un 25% de la radiactividad, comparadas con preparaciones análogas de otros Citrus, que incorporaban sólo un 15%.

En consecuencia, se pensó explorar las características de las enzimas de C. paradisi. El objetivo fué buscar un material que por una parte pudiera generar, en estado estacionario, una cantidad mayor de GPP y NPP que las preparaciones de C. sinensis, y por otra parte, obtener prenilsintetasas que formaran una mayor cantidad de productos de conformación Z. Se eligió esta especie por la facilidad de obtenerla de fuentes comerciales y porque se obtiene de un sólo fruto una cantidad mayor de flavedo tres veces mayor que de una naranja. Además se observó que el fruto se puede conservar a 4° sin deterioro, por más tiempo que otros Citrus.

La exploración de los sistemas enzimáticos se dividió en

cuatro etapas:

- a. Estudio de la transformación de MVA en otros intermedios de la vía isoprenoide
- b. Estudio de la IPP-isomerasa
- c. Estudio de la C₁₅-prenilsintetasa
- d. Estudio de la o las actividades fosfatásicas.

1. MATERIALES Y METODOS

1.1. REACTIVOS QUIMICOS

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se obtuvieron de las firmas comerciales mencionadas en cada caso.

- Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee Wis, USA:
Ciclohexilamina, E y Z Farnesol, Geraniol, Isopentanol, Tricloroacetoniitrilo, Trietilamina.
- Amershan/Searle Co., Illinois, USA: $[1-^{14}\text{C}]$ IPP, de radiactividad específica 57 Ci/mol.
- Coleman Bell: CoCl_2
- Merck A.G., Darmstadt, Alemania: Acetato de sodio, Acetonitrilo, Acetona, Acido fórmico, AgNO_3 , Amoníaco, n-Butanol, CaCl_2 , Eter de petróleo (40° - 60°), Eter etílico, FeCl_3 , Glicina, HCl , I_2 , KF , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , LiCl , MgCl_2 , MnCl_2 , Molibdato de amonio, NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Pirofosfato de Sodio, n-Propanol, Sílica gel G, Sílica gel GF₂₅₄, Sílica gel H, SnCl_2 .
- New England Nuclear, Boston, Mass., USA:
 $(\text{RS})[2-^{14}\text{C}]$ MVA, de radiactividad específica 27,3 Ci/mol.

- Pfaltz and Bauer, Inc.: Nerol
- Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA: Acido succínico, AMP, ATP, DEAE Sephadex A-25, DTNB, DTT, EDTA, Fosfatasa alcalina de E. coli, Fosfatasa alcalina de intestino de ternero, 2-Mercaptoetanol, p-Nitrofenilfosfato, PCMB, POPOP, PPO, Sephadex G-25, -TES, Tris, Tritón X-100.
- + Varian Aerograph, Walnut Creek, California, USA: EGA
- Apirasa: Preparada según el método descrito en la referencia 113.
- [1-³H]GPP: Donado gentilmente por la Dra. Luz María Pérez R. (83)
- IPP: Gentilmente donado por Gustavo Loyola G. (70).
- [2-¹⁴C]PMVA y [2-¹⁴C]PPMVA: Gentilmente donados por el Dr. Emilio Cardemil (13).

1.2. PREPARACION DEL GPP

1.2.1. Síntesis

El sustrato GPP se sintetizó por pirofosforilación del geraniol con fosfato de bis-trietilamonio - en presencia de CCl_3CN , de acuerdo al método descrito por Cramer y Böhm modificado (33,54,85,87). Todos los reactivos usados en la síntesis fueron previamente destilados a presión normal. Los reactivos oxigenados fueron además calentados a reflujo con SnCl_2 durante 1 h (103).

El geraniol utilizado fué destilado en una columna anular de banda rotatoria y posteriormente analizado por cromatografía gaseosa (57) y por espectroscopía infrarroja y de resonancia magnética nuclear. Los productos de la reacción de fosforilación fueron separados por cristalización fraccionada (41) y por cromatografía de intercambio aniónico en DEAE Sephadex A-25 (116).

1.2.2. Purificación

La reacción de fosforilación se detuvo agregando 50 ml de agua amoniacal (NH_3 al 0,5%), luego los alcoholes que no reaccionaron y otros subproductos se

extrajeron con tres porciones de 80 ml c/u de éter -
etílico. La fase etérea se lavó con 20 ml de agua -
amoniacal. La fracción acuosa total (70 ml) se con-
centró en evaporador rotatorio a 40° hasta un volu-
men de 20 ml manteniendo el pH alcalino con NH₄OH. -
Para tratar de separar GP de GPP (33) se adicionaron
5 ml de LiCl 10 M y se dejó reposar durante 24 h a -
4°. El precipitado obtenido se separó por centrifu-
gación a 10.000xg durante 10 min, luego se le lavó -
con tres porciones de 8 ml c/u de acetona a -20°, -
centrifugando a -7° después de cada lavado. Final-
mente se lavó de la misma manera con tres porciones
de 8 ml c/u de éter etílico a -20° y se evaporó el -
éter a temperatura ambiente. El precipitado se redi-
solvió en NH₄HCO₃ 50 mM pH 7,0 y se le adicionaron 2
ml de ciclhexilamina seguidos de 30 ml de acetona -
(26) y se dejó reposar 24 h a 4°. El precipitado -
que debía contener GP (33) se separó por centrifuga-
ción a 10.000xg durante 15 min, y se le lavó siguien-
do el procedimiento descrito anteriormente. Este -
precipitado se guardó a 4°. Al sobrenadante se le a-
gregó LiCl 10 M hasta tener precipitación completa y
se dejó reposar 24 h a 4°. El precipitado que debía
contener el GPP (33) se separó por el proceso ya des-
crito y se guardó a 4°.

Los análisis por TLC de los dos precipitados, mostraron que la separación del GP de GPP no fué completa, pues ambos contenían compuestos mono y pirofosforilados. Para lograr una mejor separación se disolvieron en agua amoniacal hasta obtener una conductividad de 1,2 mMHO. La muestra fué aplicada en una columna de vidrio de 2,2x67 cm, rellena con DEAE Sephadex A-25 previamente equilibrada con amortiguador de trietilamina bicarbonato 50 mM pH 7,5 (103,116). Una vez adsorbida la muestra se lavó la columna con 5 Vc del mismo amortiguador. Finalmente se eluyó con 5 Vc y con una gradiente líneal entre 50 mM y 610 mM de trietilamina bicarbonato pH 7,5.

1.2.3. Análisis de las fracciones de sustratos

En la figura 1 se presenta el perfil de elución de los sustratos, con trietilamina bicarbonato. El eluido de la columna se analizó midiendo la cantidad aparente de fósforo inorgánico ("P directo")[#](43) y

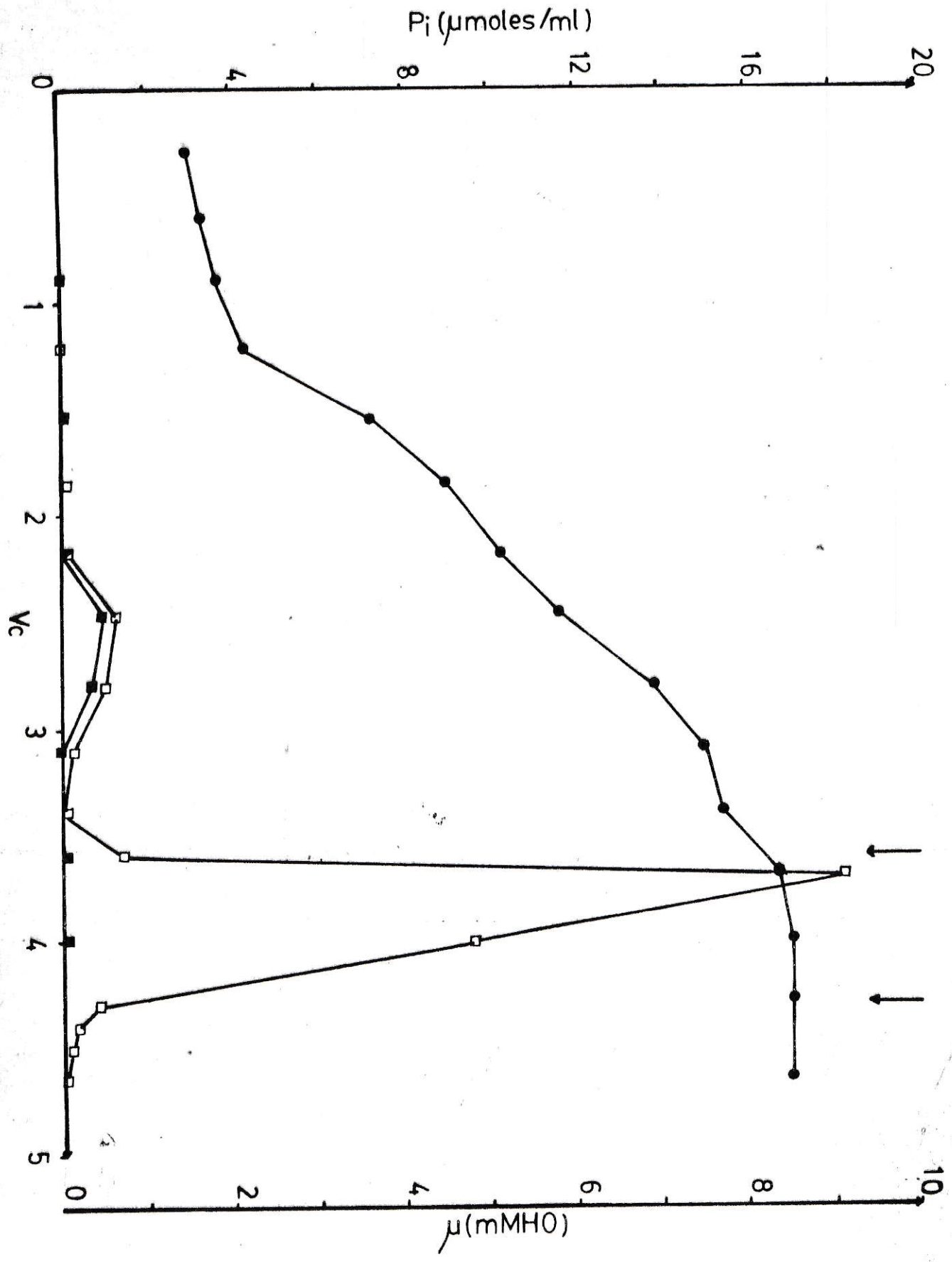
- / -

Los esterfosfóricos de alcoholes alílicos o terciarios son bastante ácido-lábiles. En consecuencia, con el reactivo de Fiske y Subba Row (43) que contiene H_2SO_4 1N, se rompe el enlace C-O y se libera un alcohol terciario y orto o pirofosfato inorgánico. Por esto los fosfomonoesteres dan, como la N-fosforilcreatina (19) o el acetilfosfato una reacción positiva de ortofosfato inorgánico, que llamamos "Fósforo directo". Según lo anterior, no es posible diferenciar, en técnicas separativas, el ester fosfórico del ortofosfato.

FIGURA 1

CROMATOGRAFIA DE UNA MEZCLA DE PRODUCTOS FOSFORILADOS EN COLUMNA DE DEAE-SEPHADEX A-25

La columna se equilibró con amortiguador de Trisetilamina-bicarbonato 50 mM pH 7,5. La muestra se eluyó con una gradiente lineal del mismo amortiguador entre 50 mM y 610 mM. Volumen de la columna (Vc) 200 ml. Las fracciones se analizaron para "P directo" (■—■) y "P de 7 min" (□—□). ●—● representa la conductividad medida en mMHO. El GPP eluyó entre 3,6 y 4,3 Vc, indicado entre las dos flechas.

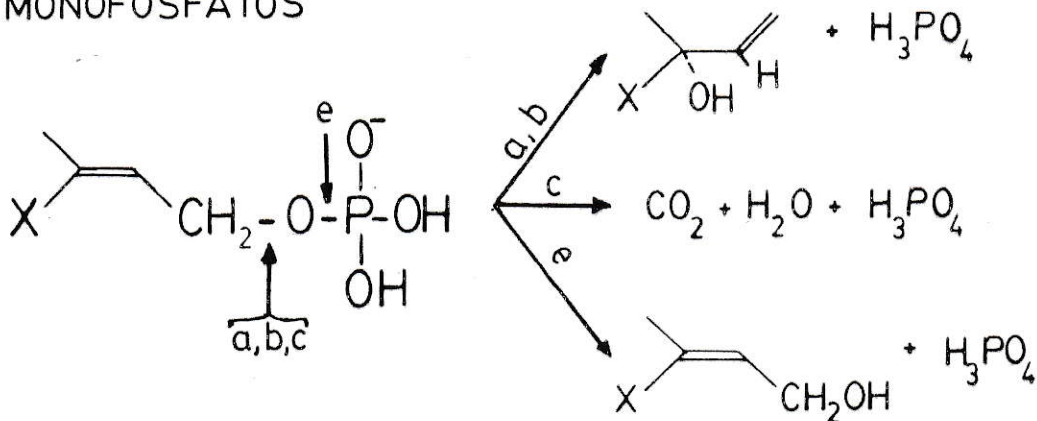


la cantidad de fósforo liberado por previa hidrólisis ácida en HCl 2N durante 7 min a 100° ("P de 7 min")(112). Las fracciones que dieron reacción positiva para "P de 7 min" se analizaron además por TLC (Sección 1.3.1.1) y se les determinó la cantidad de fósforo total ("P total")(4). La fracción obtenida entre 3,6 y 4,3 Vc que reveló una sola mancha para materia orgánica y para fósforo (Sección 1.3.1.1), se dividió en tres porciones. Estas se guardaron en diferentes condiciones, con la finalidad de estudiar la estabilidad del GPP: a) la primera se liofilizó b) la segunda se dejó como tal y c) la tercera se concentró hasta 20 ml en evaporador rotatorio a 40°. A esta última fracción se le agregó LiCl 10 M hasta una precipitación completa y se procesó igual como se indicó anteriormente. Los cristales obtenidos se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron a 4°. Esta última fracción co-cromatografió con [1-³H]GPP con un R_F de 0,42, no dió reacción de "P directo" y la razón "P de 7 min"/"P total" fué igual a 1, valor que corresponde a un pirofosfato alílico (Ver esquema 4).

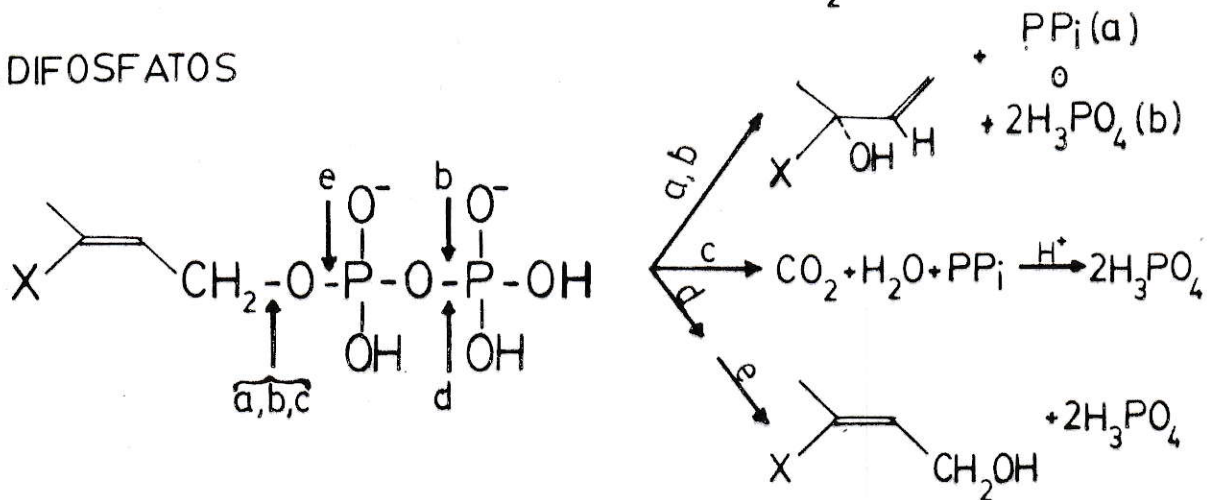
Una alícuota de la misma muestra se hidrolizó enzimáticamente (14) con apirasa y fosfatasa alcalina de E. coli. El alcohol producido se extrajo con he-

ESQUEMA 4. Fundamento de los métodos analíticos usados para identificar distintos esteres fosfóricos de preñoles

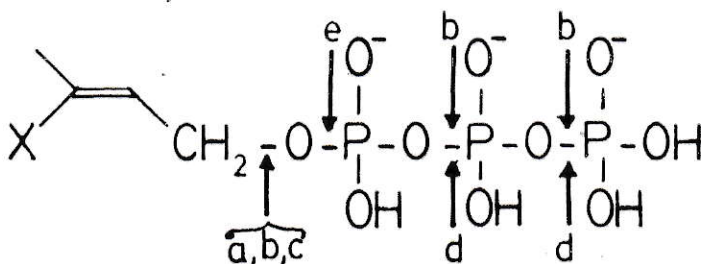
1. MONOFOSFATOS



2. DIFOSFATOS



3. TRIFOSFATOS



ENSAYOS

- a. REACTIVO DE F&S ("Pdirecto")
- b. HCl 2N A 100° POR 7 min ("P de 7 min")
- c. COMBUSTION HUMEDA ("Ptotal")
- d. APIRASA
- e. FOSFATASA ALCALINA

xano y se identificó por GLC (Sección 1.3.3), este análisis reveló únicamente la presencia de geraniol, por lo tanto la muestra analizada no contenía contaminación de NPP ni de cualquier otro compuesto fosforilado; además el fósforo presente en la fase acuosa se cuantificó para determinar la razón "P directo"/geraniol dando un valor de 2, por lo cual se dedujo que por cada 2 moles de fósforo se produjo un mol de geraniol. Todos los resultados indicaron que el compuesto sintetizado correspondía al GPP.

1.3. TECNICAS CROMATOGRAFICAS

1.3.1. Cromatografía en capa delgada (TLC)

Como criterio analítico y de pureza se usó la cromatografía en capa fina. Se utilizaron los siguientes sistemas:

1.3.1.1. Sílica gel H de 0,25 mm de espesor

Este sistema se usó para la identificación de compuestos fosforilados, utilizando como solvente de desarrollo n-propanol:amoníaco:agua=6:3:1. Las placas se revelaron con vapores de yodo para visualizar materia orgánica y con pulverizado de FeCl_3

al 1% en etanol al 80% mas ácido sulfosalicílico - al 1% en etanol al 60% (89) para reconocer el fósforo. La radiactividad se localizó raspando la sílice cada 1 cm y recogiénola en frascos que contenían 3 ml de una solución fosforescente y se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos (Sección 1.8).

1.3.1.2. Placa reversa: Sílica gel G de 0,5 mm de espesor

El sistema se usó para separar e identificar prenoles de 5, 10 y 15 at de C, utilizando como solvente de desarrollo metanol:agua=7:3 con 2 gotas de vaselina (105). La masa orgánica y la radiactividad se localizaron en forma semejante a la descrita en la sección anterior.

1.3.1.3. Sílica gel G de 0,25 mm de espesor

Este sistema se usó para separar e identificar prenil alconoles de conformación E y Z de 10 o 15 at de C. El método sólo distingue conformación y no largo de cadena. Las placas se prepararon y se sumergieron durante 1 min en una solución de EGA - al 2% en acetona. El solvente de desarrollo fué hexano:acetato de etilo=8:2. La masa orgánica y la radiactividad se localizaron de la forma descriri

ta en la sección 1.3.1.1.

1.3.1.4. Sílica gel GF₂₅₄ de 0,4 mm de espesor

Las placas se prepararon con sílica gel GF₂₅₄ - en solución de AgNO₃ al 12,5% en proporción de 1:2 (19). Este sistema se usó para separar e identificar prenoles de conformación E y Z de 10 y 15 at - de C, utilizando como solvente de desarrollo acetato de etilo. La masa orgánica se visualizó con una lámpara UV de 260 nm y la radiactividad se localizó de la manera descrita en la sección 1.3.1.1.

1.3.2. Cromatografía en papel

Para identificar los intermediarios fosforilados de la reacción de incorporación de MVA se usó cromatografía en papel Whatman N^o1 lavado con HCl, utilizando como solvente de desarrollo butanol:ácido fórmico:agua=73:10:13 (25). La ubicación de los compuestos se hizo cortando el papel cada 1 cm y cuantificando la radiactividad por espectrometría de centelleo en 10 ml de la solución fosforescente. Los productos se identificaron por comparación con los R_f - de los respectivos estándares, determinados en las mismas condiciones experimentales.

1.3.3. Cromatografía en fase gaseosa (GLC)

Los análisis de cromatografía en fase gaseosa se llevaron a cabo en un cromatógrafo Varian 1800, con detector de conductividad térmica e inscriptor de doble registro varian A-25. Para el análisis de muestras radiactivas el instrumento se acopló a un contador Geiger para fase gaseosa Nuclear Chicago N^o4998. Los productos analizados se identificaron por co-cromatografía con muestras estándares y en caso de muestras radiactivas por co-cromatografía de la radiactividad con la masa de los respectivos estándares. Dependiendo del tipo de compuestos analizados se usaron las condiciones experimentales que se resumen en la tabla I.

TABLA I

CARACTERISTICAS	TIPO DE COMPUESTO	
	C ₁₀ (GOH)	C ₁₅ (FOH)
Material de la columna	acero inox.	acero inox.
Largo de la columna	3 mt	1,6 mt
Diámetro de la columna	6,25 mm	6,25 mm
Soporte inerte	Chrom G-AW DMCS	Veraport #30
Malla del soporte	60/70	100/120
Fase líquida	EGA 0,83%(P/P)	SE-30 3%(P/P)
Flujo de He	40 ml/min	40 ml/min
Flujo de Butano	--	40 ml/min
Corriente del detector	150 mA	150 mA
T del horno	120 grados	137 grados
T del inyector	210 "	195 "
T del detector de masa	220 "	195 "
T del detector de radiact.	---	195 "
Voltaje en el contador Geiger	---	2150 vols
Velocidad de la carta	6,25 dm/h	6,25 dm/h

1.3.4. Cromatografía en columna de las proteínas de flavedo

1.3.4.1. Filtración disociativa

Una columna de vidrio (1,5x21 cm) se rellenoó con Sephadex G-25 (malla 40/120). La matriz se preparó según las instrucciones del fabricante (46) y se equilibró con 5 Vc de solución que contenía: amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4, 2-mercaptoetanol 100 mM y EDTA 2 mM.

La pella que precipitó entre 0 y 80% de saturación $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se disolvió en 5 ml de la solución de equilibrio y se aplicó en la columna en forma continua y homogénea; cuando la muestra penetró totalmente en el gel, se agregaron 5 ml de la solución de equilibrio para asegurar su completa penetración. Las proteínas se eluyeron con una solución igual a la de equilibrio pero saturada al 70% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El eluido se analizó determinando las proteínas por su absorbilidad a 280 nm y los colorantes a 310 nm. En esta zona se obtiene el mayor Δ entre proteínas y flavonoides. Además algunas fracciones se les ensayó actividad enzimática. Las fracciones que contenían la actividad se juntaron, se guardaron a 4° y se las usó como fuente de enzimas.

1.3.4.2. Filtración en gel

Con el fin de eliminar el 2-mercaptoetanol presente en el extracto enzimático, éste se filtró en una columna que se preparó igual que en la sección anterior, pero la solución de equilibrio contenía: amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4 y EDTA 2 mM. Una alícuota del extracto enzimático preparado en la sección 1.4, se aplicó en la columna y se la dejó eluir sola hasta sequedad. A la fracción que salió en el primer Vc se le determinó por turbidimetría la concentración de proteínas y se la guardó a 4° para ser usada como fuente de enzimas.

1.4. PREPARACIÓN DEL SISTEMA ENZIMATICO

Los pomelos se adquirieron de diversas fuentes comerciales y se lavaron con agua corriente y luego con agua destilada. El flavedo (exocarpium) se retiró de la fruta, se le recogió a 0° y se le mezcló con solución de extracción en proporción 2:3 (P/V). La composición de dicha solución varió según el objetivo para el cual se usaría el extracto. La extracción se realizó en un Omnimixer en un baño de hielo a 3000 rpm durante 2 min con interrupciones cada 30 seg; la temperatura final del homogenizado fué en promedio 10°. Pos-

teriormente el homogenizado fué filtrado a través de tela de nylon y se le centrifugó a 25.000xg durante 30 min a -5° . El sobrenadante se guardó a 4° y se le usó como fuente de enzimas.

Los siguientes tipos de solución de extracción se prepararon, según la clase de reacción enzimática que se deseaba estudiar (ver sección 1.7).

1.4.1. Incorporación de MVA

Tris-HCl 100 mM pH 7,8, 2-mercaptoetanol 100 mM y EDTA 2 mM.

1.4.2. Actividad de la IPP-isomerasa

Tris-HCl 100 mM pH 7,0, 2-mercaptoetanol 5 mM y EDTA 100 mM o 1 mM.

1.4.3. Actividad de la C_{15} -prenilsintetasa

Fosfato de potasio 100 mM pH 7,4, 2-mercaptoetanol 100 mM y EDTA 2 mM.

1.4.4. Actividad de fosfatasas

Succinato de sodio 100 mM pH 6,0.

En los experimentos en los cuales se estudió el efecto de reactivos de grupos sulfhidrilo, se usó extracto preparado sin 2-mercaptoetanol, y cuando se estudió el efecto de metales bivalentes el extracto se preparó en ausencia de EDTA.

1.5. DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas en los diferentes extractos se determinó por el método turbidimétrico(104)

1.6. PURIFICACION DEL SISTEMA ENZIMATICO

Con el fin de purificar el sistema enzimático extraído del flavedo de Citrus paradisi el extracto preparado según la sección 1.4 se sometió a un fraccionamiento salino (36) para obtener las fracciones denominadas 0/80 o 40/70, que corresponden a las proteínas que precipitan en un medio de 80% de saturación o entre 40 y 70% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

1.6.1. Fraccionamiento 0/80 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Al sobrenadante proveniente de la sección 1.4 se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta un 80% de saturación, agi-

tando continua y homogéneamente en un baño a 0° durante 15 min y controlando el pH entre 7,0 y 8,0 con NH_4OH . Una vez agregado todo el sulfato de amonio - el sistema se dejó estabilizar con agitación durante 30 min, luego se centrifugó por 30 min a 10.000xg y a 0° en una centrífuga Sorvall. El precipitado se disolvió en la misma solución de extracción en un volumen tal que la concentración de proteínas fué de - 10 mg/ml. Esta solución se guardó a 4° y se usó como fuente de enzimas.

1.6.2. Fraccionamiento 40/70 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

A un extracto enzimático preparado como se indicó en la sección 1.4 se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta un - 40% de saturación en la misma forma descrita en la - sección anterior. Al sobrenadante obtenido después de centrifugar se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta un 70% - de saturación de igual manera a la descrita anteriormente. El precipitado se disolvió y se le guardó a 4° para ser usado como fuente de enzimas.

1.7. ENSAYO DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMATICAS

1.7.1. Incorporación de 3(RS)[2-¹⁴C]MVA

La incorporación se determinó cuantificando la cantidad de ¹⁴C en tres fracciones que denominamos "Lípidos libres" (LL), "Fosfatos alílicos" (AA) o "Prenol fosfatos" (PP). Se la expresó como % de incorporación de ¹⁴C, referido siempre al isómero R en experimentos realizados en equilibrio, y en $k_{cat}(26)$ para los realizados en velocidades iniciales.

La incubación se realizó a 37° durante 45 min en un medio que contenía: Amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8, 2-mercaptoetanol 20 mM, MgCl₂ 1 mM o MnCl₂ 2 mM, ATP/M²⁺ = 2, 3(RS)[2-¹⁴C]MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^7 dpm/ μ mol) y 0,7 mg de proteínas en un volumen final de 1 ml. La reacción se detuvo hirviendo los tubos. Los productos de la reacción se determinaron de acuerdo al siguiente procedimiento (47,14)

a) Extracción directa con 1,5 ml de hexano; la fracción extraída en la fase hexánica se denominó LL y contiene hidrocarburos y alcoholes; b) Hidrólisis ácida durante 7 min a 37° en HCl 2N y sucesiva extracción con hexano como en a, la fracción extraída en la fase hexánica se denominó AA y contiene los alcoholes alílicos reordenados, producto de la hidrólisis

sis ácida de los correspondientes compuestos fosforilados alílicos y c) Hidrólisis enzimática con fosfatasa alcalina de intestino de ternero, durante 2h a 37° y posterior extracción con hexano igual que en a, la fracción hexánica se denominó PP y contiene los alcoholes alílicos no reordenados, producto de la hidrólisis enzimática de los respectivos compuestos fosforilados alílicos.

1.7.2. Actividad de la IPP-isomerasa

Se determinó cuantificando la transformación del [1-¹⁴C]IPP en [1-¹⁴C]DMAPP, midiendo la radiactividad en la fracción AA y se expresó como nkat/mg de proteínas.

La incubación se realizó a 30° durante 5 min en un medio que contenía: Amortiguador de succinato de sodio 150 mM pH 6,0, 2-mercaptoetanol 20 mM, [1-¹⁴C]IPP 50 μ M (radiact. esp. $2,4 \times 10^7$ dpm/ μ mol) y 0,05 mg de proteínas en un volumen final de 0,5 ml. La reacción se detuvo enfriando los tubos en un baño de hielo y agregando HCl hasta una concentración final de 2N. Luego los tubos se incubaron durante 20 min a 30° y los productos de la reacción se extrajeron con 1,5 ml de hexano.

1.7.3. Actividad de la C₁₅-prenilsintetasa

Se determinó cuantificando la incorporación de ¹⁴C proveniente de la condensación de un sustrato alílico como el GPP con [¹⁻¹⁴C]IPP en la fracción AA descontando la respectiva actividad isomérica del sistema. La actividad se expresó como los nkat/mg de proteínas.

La incubación se realizó a 37° durante 30 min en un medio que contenía: Amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 7,4, MgCl₂ 6 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM, GPP 10 μM, [¹⁻¹⁴C]IPP 50 μM (radiact. esp. - 2,4x10⁶ dpm/μmol) y 0,03 mg de proteínas en un volumen final de 0,5 ml. La reacción se detuvo enfriando los tubos en un baño de hielo y los productos de la reacción se determinaron igual que en la sección 1.7.1.

1.7.4. Actividad de las fosfatasas

1.7.4.1. Actividad de la prenilfosfatasa

Se determinó cuantificando la radiactividad presente en la fracción LL debido a la hidrólisis enzimática de [¹⁻³H]GPP. La actividad se expresó como los nkat de [¹⁻³H]GPP hidrolizados por mg de -

proteínas.

La incubación se realizó a 37° durante 10 min - en un medio que contenía: Amortiguador de succinato de sodio 100 mM pH 6,0, $[1-^3\text{H}]$ GPP 0,2 mM (radiact. esp. $2,9 \times 10^4$ dpm/ μmol) y 0,03 mg de proteínas en un volumen final de 0,5 ml. La reacción se detuvo agregando 1,5 ml de hexano y enfriando los tubos a 0° , y se midieron los alconoles radiactivos extraídos en la fase hexánica.

1.7.4.2. Actividad de la fosfatasa inorgánica

Se determinó cuantificando el fósforo liberado por la hidrólisis enzimática del PPI o cualquier otro sustrato que libere fósforo por el método de Fiske y Subba Row (43). Las actividades se expresaron como los μkat de P liberados por mg de proteínas.

La incubación se realizó a 37° durante 10 min - en un medio que contenía: Amortiguador de succinato de sodio 100 mM pH 6,0, PPI 10 mM y 0,03 mg de proteínas en un volumen final de 1 ml. La reacción se detuvo agregando 1 ml de molibdato ácido, y se midió el fósforo inorgánico liberado, por el método de Fiske y Subba Row (43).

En el experimento para determinar la especificidad por el sustrato, se usaron además del PPI, el ATP, AMP o p-Nitrofenilfosfato a la misma concentración de 10 mM. En estos casos se mide es la actividad de la fosfomonoesterasa.

En los experimentos en los cuales se pretendía acumular productos para su identificación y análisis, las incubaciones se realizaron durante 3 h.

En todos los experimentos se hicieron controles con enzima hervida, que se restaron de los respectivos valores.

1.8. CUANTIFICACION DE LOS PRODUCTOS RADIATIVOS

Alícuotas de 1 ml de las respectivas fases hexánicas se usaron para cuantificar su radiactividad, usando 3 ml de una solución centelleante. Esta solución contenía 0,05 g de POPOP y 4 g de PPO por litro de tolueno (116). Para muestras hidrosolubles se usó una alícuota de 1 ml en 10 ml de la mezcla centelleante, preparada con 0,125 g de POPOP, 4 g de PPO, 500 ml de Tritón X-100 por litro de tolueno (116). La radiactividad se midió en un espectrómetro de centelleo para líquidos modelo 6801 Nuclear Chicago con 85% de efici-

ciencia para ^{14}C y 40% para ^3H , y en un Delta 300 con 95% de eficiencia para ^{14}C .

1.9. IDENTIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION

Los productos de la reacción de incorporación del -MVA, extraídos en la fracción PP se analizaron por TLC en los sistemas descritos en las secciones 1.3.1.2, - 1.3.1.3 y 1.3.1.4 y además los intermediarios fosforilados desde MVA hasta IPP se analizaron por cromatografía en papel (sección 1.3.2).

Los productos de la reacción de la C_{15} -prenilsintetasa, extraídos en la fracción PP, se analizaron por -TLC en los sistemas descritos en las secciones 1.3.1.3 y 1.3.1.4 y además por GLC (sección 1.3.3).

1.10. DETERMINACION DEL PERFIL DE pH

Los perfiles de pH se determinaron para las actividades de la IPP-isomerasa en ausencia y en presencia de Mg^{2+} 2,5 mM, de la C_{15} -prenilsintetasa en presencia de Mg^{2+} 6 mM y de la Prenilfosfatasa en ausencia de metal. Las condiciones experimentales fueron las mismas descritas en la sección 1.7 para cada activi-

dad en particular pero usando los siguientes amortiguadores a diferentes pH: Formiato o acetato pH 4,0; acetato o succinato pH 4,5-5,0 o 5,5; succinato o MES pH 6,0 o 6,5; fosfato o TES pH 7,0 o 7,5; Tris-HCl o TES pH 8,0; Tris-HCl o Glicina-NaOH pH 8,5 o 9,0. se hicieron controles de superposición de amortiguadores para detectar efectos de anión.

1.11. MODIFICACION CON REACTIVOS DE GRUPOS SH

Con el fin de determinar el requerimiento de grupos SH en las reacciones de la IPP-isomerasa y de la C₁₅-prenilsintetasa, se hicieron experimentos de inactivación con DTNB.

La inactivación de la IPP-isomerasa se determinó - midiendo a diferentes intervalos de tiempo la actividad remanente en un extracto acuoso incubado con DTNB 200 μ M a 30^o en ausencia de sustrato. La inactivación se expresó como el % de la actividad remanente - con respecto a la actividad inicial de la enzima.

La inactivación de la C₁₅-prenilsintetasa se determinó midiendo la actividad remanente en un extracto - acuoso incubado por diferentes intervalos de tiempo a 0^o con DTNB 25, 50, 75 o 100 μ M en ausencia de sustra

tos. La inactivación se expresó como el % de actividad remanente en el extracto con respecto al valor inicial de la actividad.

Con el propósito de determinar si la inactivación de la C₁₅-prenilsintetasa era reversible o no, se inactivó el extracto con DTNB 50 μ M en la manera descrita anteriormente. A los 20 min de inactivación se adicionó DTT hasta 1 mM final y se determinó la actividad remanente del extracto a diferentes intervalos de tiempo. La recuperación se expresó como el % de actividad remanente con respecto a un experimento control realizado en las mismas condiciones y en presencia de DTT.

2. RESULTADOS

2.1. INCORPORACION DEL [2-¹⁴C]MVA

Un extracto de flavedo de Citrus paradisi transforma el [2-¹⁴C]MVA en diversos prenoles e intermediarios fosforilados (sección 2.1.11).

Los productos formados en la reacción de incorporación de MVA, se cuantificaron en tres fracciones hexánicas previamente descritas (sección 1.7.1). La fracción LL contiene hidrocarburos y alcoholes prenílicos y no prenílicos, productos de prenilsintetasas, ciclasas y fosfatasas (14) presentes en el extracto, sobre los intermediarios fosforilados. La fracción AA contiene los alcoholes reordenados, producto de la hidrólisis ácida de los intermediarios fosforilados alílicos. La fracción PP contiene todos los alcoholes solubles - en hexano, obtenidos por hidrólisis enzimática de sus respectivos esteres fosfóricos y pirofosfóricos (14).

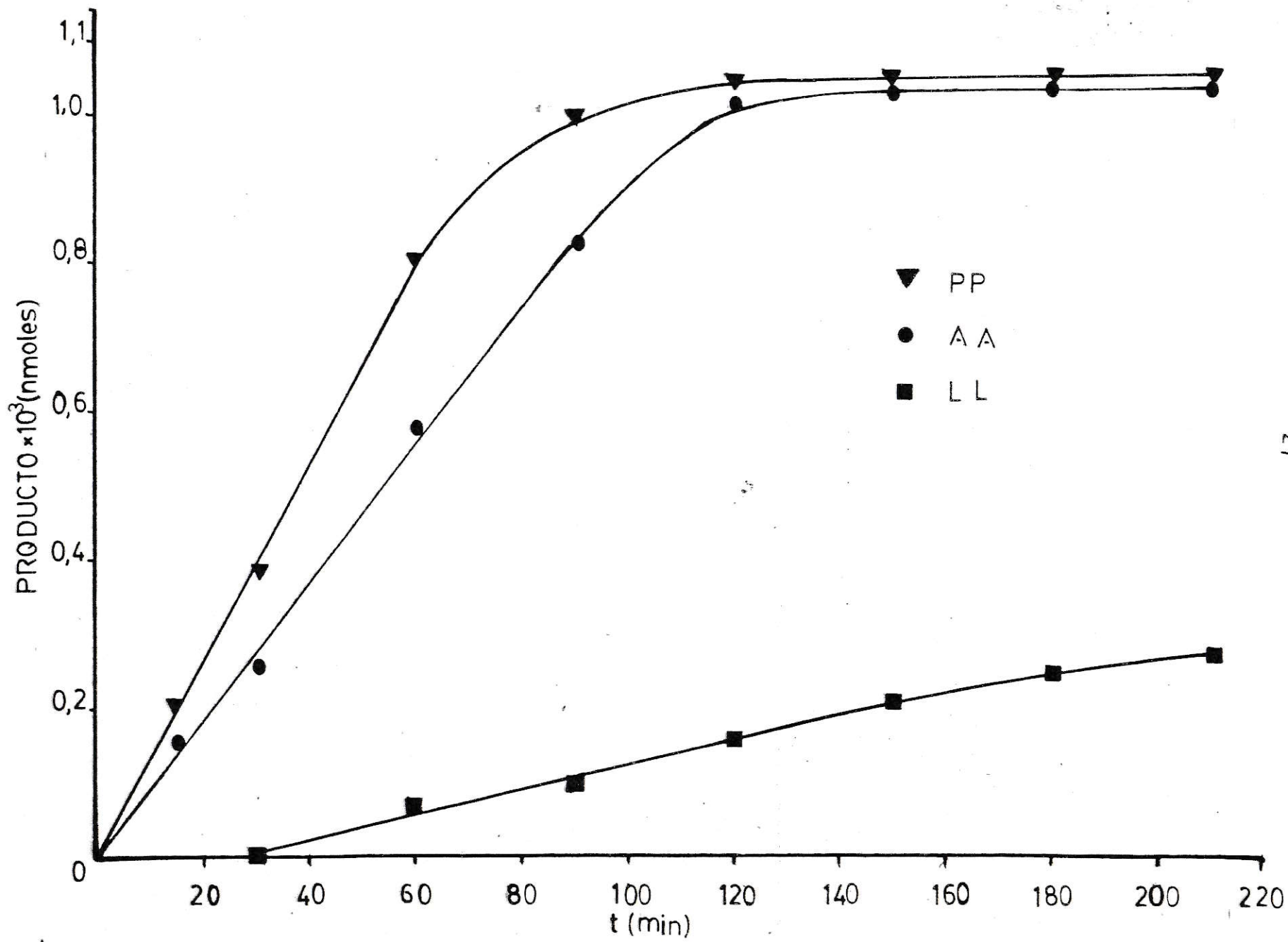
2.1.1. Curva de progreso

La cantidad de productos radiactivos formados por un extracto de flavedo de C. paradisi a partir del 3(RS)[2-¹⁴C]MVA, es función líneal del tiempo hasta los 60 min, en presencia de Mn²⁺ 2 mM (Fig 2). Re-

FIGURA 2

CURVA DE PROGRESO PARA LA INCORPORACION DE $[2-^{14}\text{C}]$ MVA POR UN
EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

El extracto acuoso (0,7 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° y a varios intervalos de tiempo, en un medio que contenía amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8; 2-mercaptoetanol 20 mM; MnCl_2 2 mM; ATP 4 mM y 3(RS) $[2-^{14}\text{C}]$ MVA 0,016 mM (radiact esp. 6×10^7 dpm/ μmol). Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la cantidad de productos formados a partir del 3(R) $[2-^{14}\text{C}]$ MVA, en las tres fracciones: LL (■—■), AA (●—●) y PP (▼—▼).



sultados análogos se obtuvieron con Mg^{2+} o Co^{2+} 1 mM.

2.1.2. Efecto de distintos amortiguadores a diferentes pH

En la tabla II se resumen los resultados obtenidos al incorporar MVA a diferentes pH en distintos - amortiguadores.

TABLA II

VARIACION EN LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DEL $[2-^{14}C]$ MVA - POR UN SISTEMA ENZIMATICO DE FLAVEDO DE C. PARADISII, A DIFERENTES pH Y DISTINTOS AMORTIGUADORES

AMORTIGUADOR (14,47)	pH	VELOCIDAD ($nkat \times 10^4$)	
		en LL	en AA
Succinato	6,0	0,01	0,27
MES	6,0	0,02	0,42
Tris-HCl	7,8	0,81	3,49
Fosfato	7,8	0,03	0,59

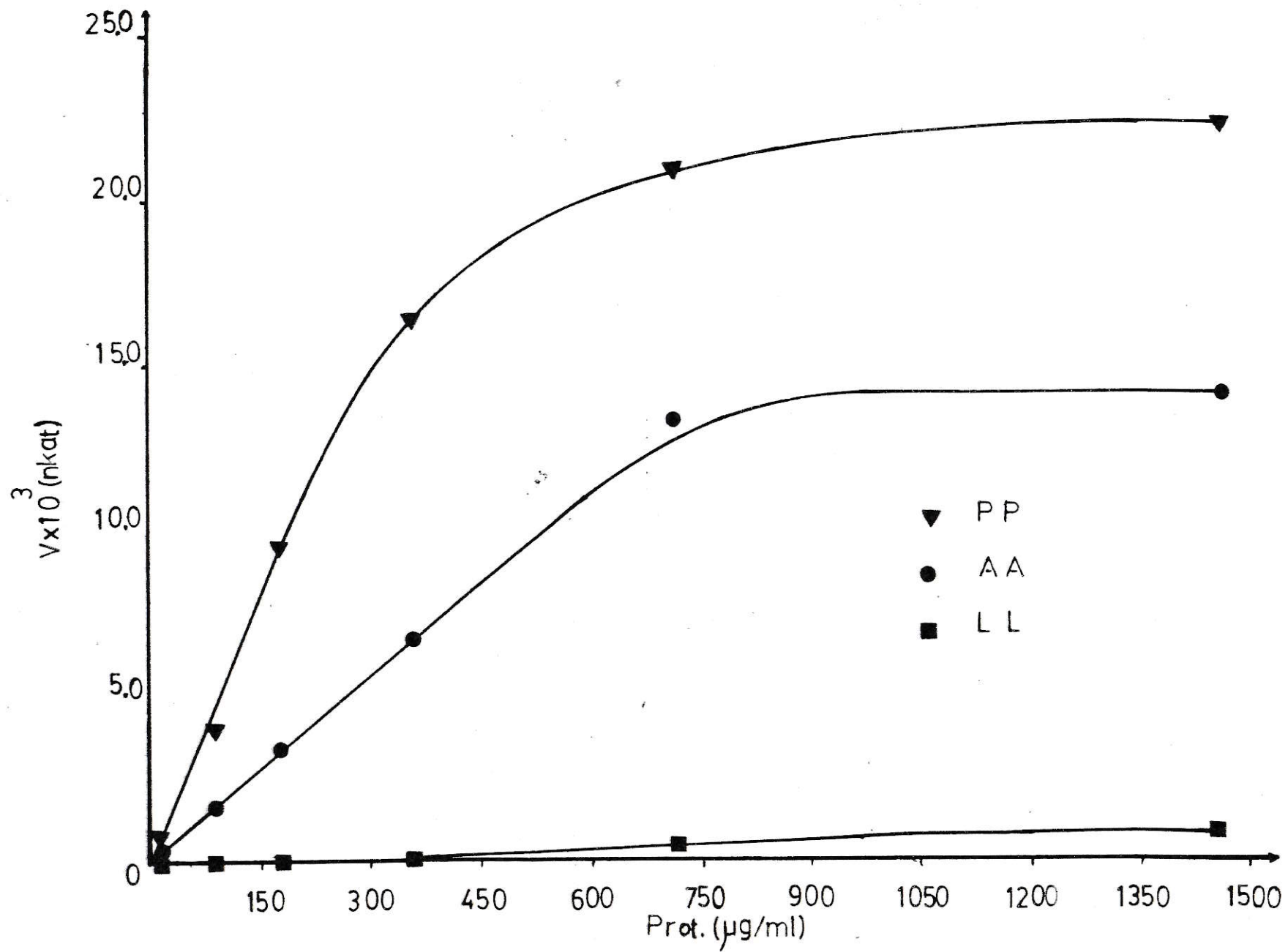
2.1.3. Efecto de la concentración de proteínas

La velocidad de utilización de MVA en 45 min fué función líneal de la concentración de proteínas hasta 0,72 mg/ml (Fig 3).

FIGURA 3

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS DEL EXTRACTO DE FLAVEDO DE C. PARADISII SOBRE LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DEL $[2-^{14}\text{C}]$ MVA

La incubación se realizó a 37° durante 45 min, en un medio que contenía amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8; 2-mercaptoetanol 20 mM; MnCl_2 2 mM; ATP 4mM y 3(RS) $[2-^{14}\text{C}]$ MVA -- 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^7 dpm/ μmol). Se ensayó el efecto producido por las proteínas entre 0 y 1,5 mg/ml. Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la velocidad de incorporación de 3(R) $[2-^{14}\text{C}]$ MVA en tres fracciones: LL (■—■), AA (●—●) y PP (▼—▼).



2.1.4. Efecto de iones metálicos bivalentes

Como se han descrito requerimientos de distintos metales para la biosíntesis de prenifosfatos (14,32, 35), se hicieron experimentos de incorporación de MVA con enzimas de C. paradisii cambiando el Mn^{2+} - que se tomó como referencia por Mg^{2+} , Ca^{2+} o Co^{2+} - 1 mM (Fig 4). Con Ca^{2+} no hubo incorporación, excep to en la fracción PP.

2.1.5. Curvas de metales bivalentes

En las figuras 5 y 6 se muestra que la velocidad de incorporación de MVA fué función de la concentración de Mn^{2+} o Co^{2+} . La máxima incorporación se logró a concentraciones de 1 mM Mn^{2+} o 0,5 mM Co^{2+} , - tanto en la fracción AA como en PP. A concentraciones altas de metal hubo inhibición de la incorporación.

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de incorporación de MVA, para acumular compuestos ra diactivos y realizar los análisis de productos se re alizaron experimentos dejando que las reacciones de incorporación alcanzaran el equilibrio en 3 h. También en estas condiciones el porcentaje de incorporaci ón fué función líneal de las concentraciones de -

FIGURA 4

EFEECTO DE LA NATURALEZA DEL METAL SOBRE LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DE [2-¹⁴C]MVA, POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

0,7 mg/ml de proteínas del extracto acuoso del flavedo de C. paradisi se incubaron a 37° y durante 45 min, en un medio que contenía amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8; - 2-mercapto etanol 20 mM; ATP 2 mM; 3(RS) [2-¹⁴C]MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^7 dpm/ μ mol) con 1 mM Ca²⁺, Co²⁺ o Mn²⁺. - Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la velocidad de incorporación de 3(R) [2-¹⁴C]MVA en las tres fracciones: - LL, AA y PP para c/u de los metales y se expresó como porcentaje con respecto a los resultados obtenidos con Mn²⁺.

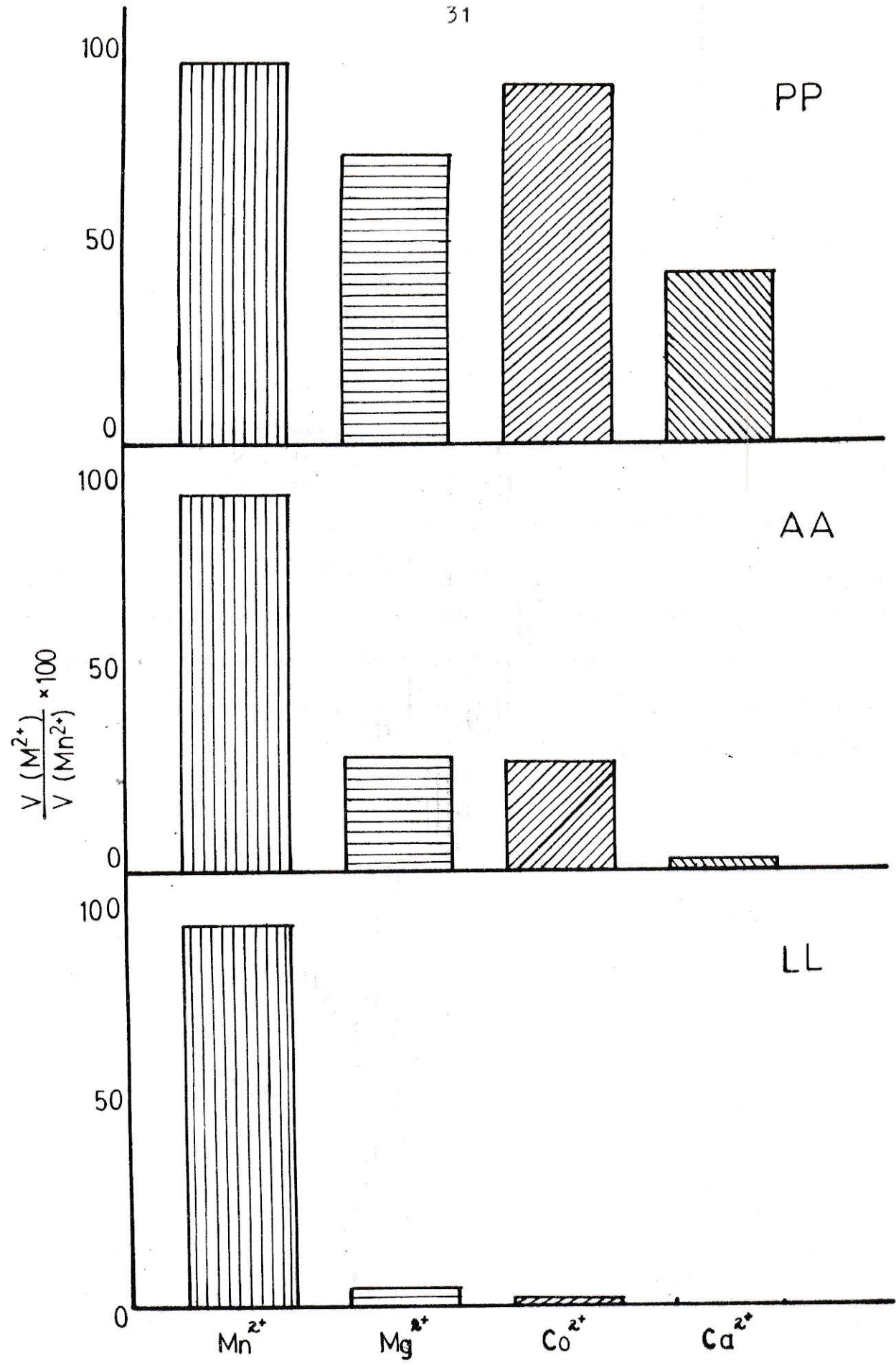


FIGURA 5

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE Mn^{2+} SOBRE LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DE $[2-^{14}C]$ MVA, POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLA
VEDO DE C. PARADISII

El extracto acuoso (0,7 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° durante 45 min con concentraciones crecientes de $MnCl_2$ - (0-20 mM), en un medio que contenía amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8; 2-mercaptoetanol 20 mM; $ATP/Mn^{2+}=2$ y $3(RS)[2-^{14}C]$ MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^7 dpm/ μ mol). Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la velocidad de incorporación de $3(R)[2-^{14}C]$ MVA en las tres fracciones: LL (■—■) AA (●—●) y PP (▼—▼).

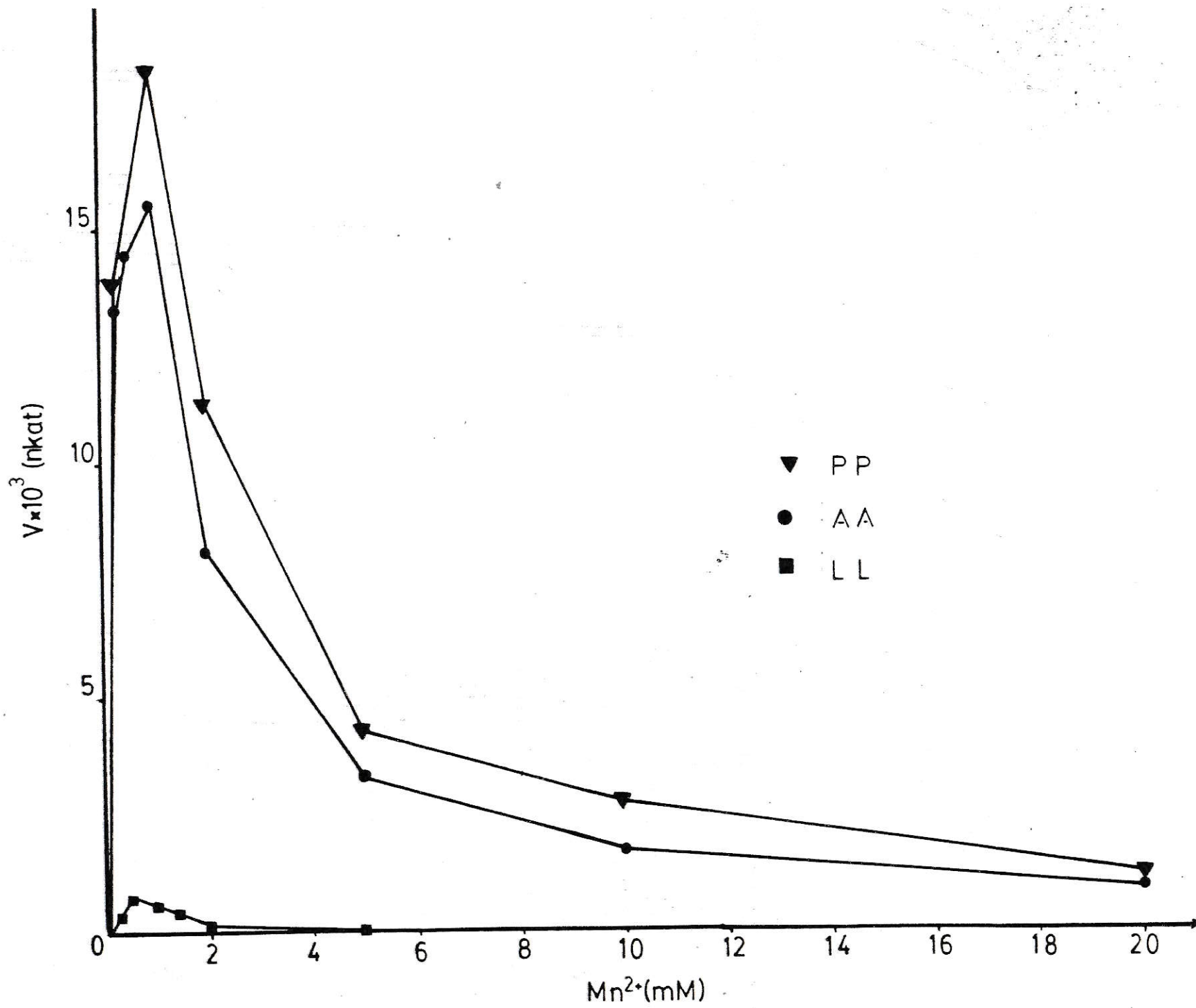
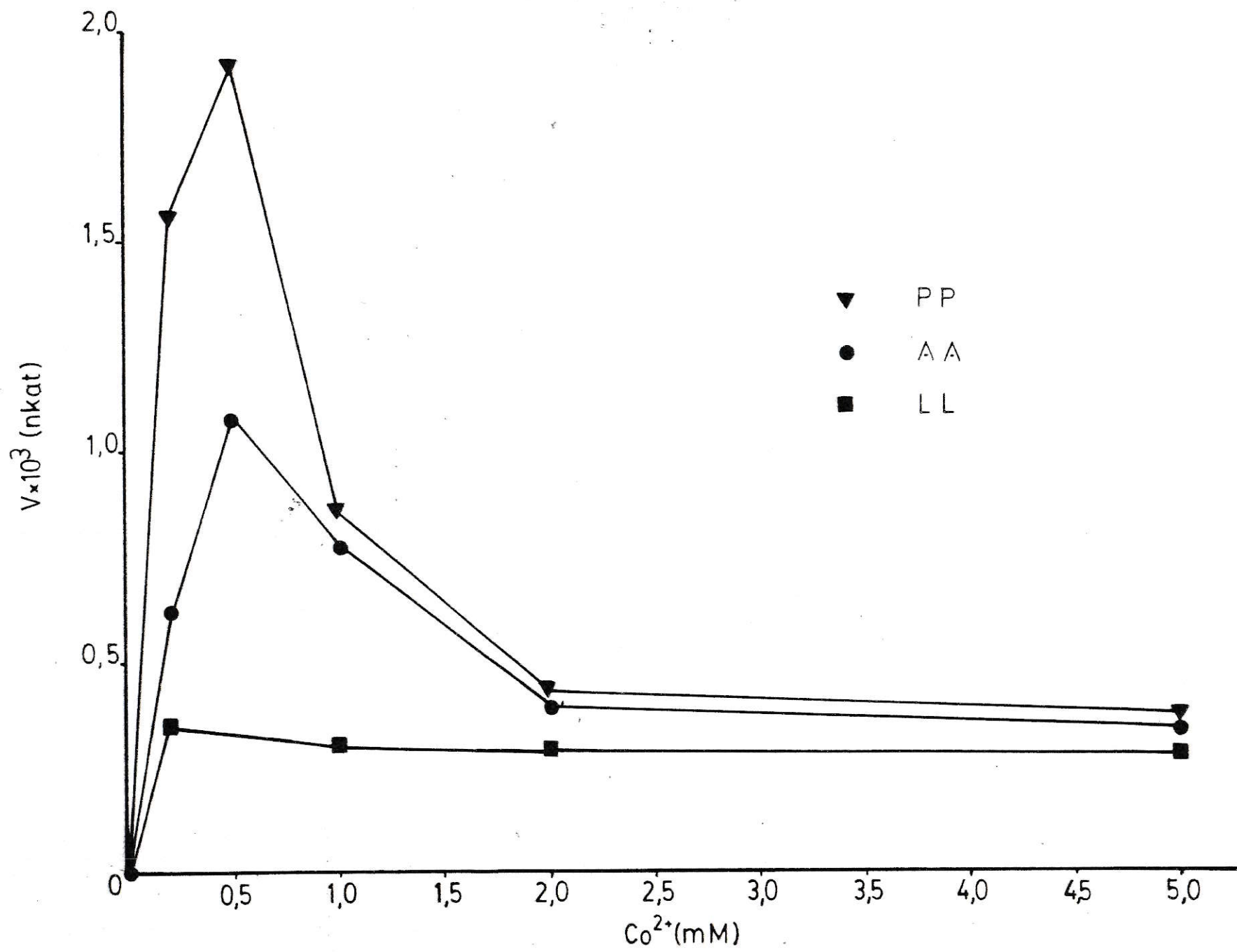


FIGURA 5

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE Mn^{2+} SOBRE LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DE $[2-^{14}C]$ MVA, POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEO DE C. PARADISII

El extracto acuoso (0,7 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° durante 45 min con concentraciones crecientes de $MnCl_2$ (0-20 mM), en un medio que contenía amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8; 2-mercaptoetanol 20 mM; $ATP/Mn^{2+}=2$ y 3(RS)[$2-^{14}C$]MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^7 dpm/ μ mol). Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la velocidad de incorporación de 3(R)[$2-^{14}C$]MVA en las tres fracciones: LL (■—■) AA (●—●) y PP (▼—▼).



Mn^{2+} o Mg^{2+} , obteniéndose la máxima incorporación a Mn^{2+} 2 mM o Mg^{2+} 1 mM, y se observó también una inhibición a concentraciones altas de metal. Estos resultados se resumen en la tabla III.

TABLA III

CONCENTRACIONES DE M^{2+} PARA OBTENER EL MAXIMO DE INCORPORACION DE $[2-^{14}C]$ MVA

FRACCION	VELOCIDAD INICIAL		EQUILIBRIO	
	Mn^{2+} (mM)	Co^{2+} (mM)	Mn^{2+} (mM)	Mg^{2+} (mM)
LL	0,5	0,2	0,5	0,2
AA	1,0	0,5	2,0	1,0
PP	1,0	0,5	2,0	1,0

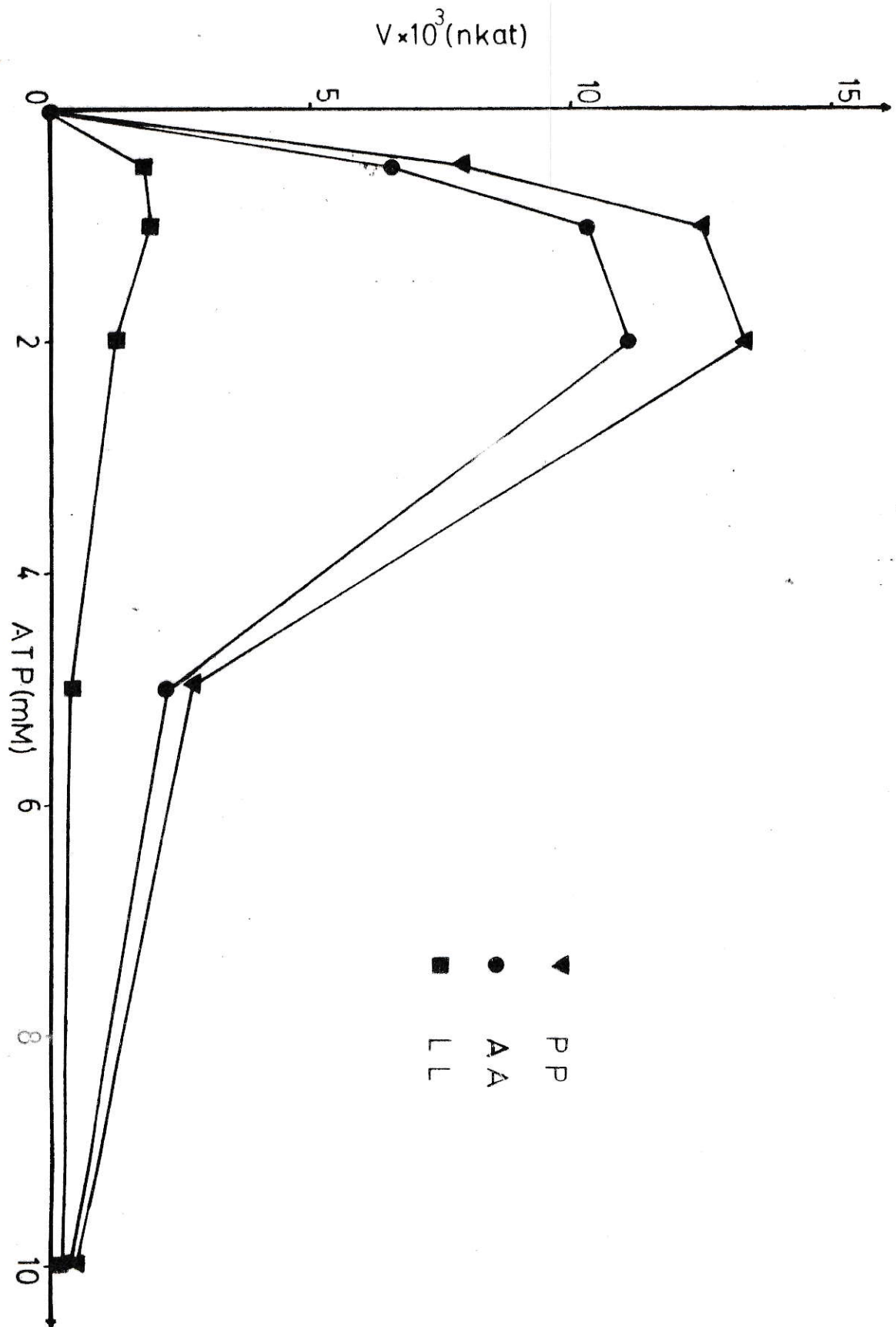
2.1.6. Efecto del ATP

En la figura 7 se muestra la variación en la velocidad de incorporación de MVA en función de la concentración de ATP, en presencia de Mn^{2+} 1 mM. Se obtuvo la máxima velocidad de incorporación cuando la concentración de ATP en el medio fué de 2 mM (razón $ATP/Mn^{2+}=2$). En condiciones de equilibrio el máximo de incorporación se obtuvo con la misma relación ATP a M^{2+} . El anterior resultado se repitió al usar Mg^{2+} en lugar de Mn^{2+} , en cambio en presencia de Co^{2+} la máxima incorporación se logró cuando el cociente --

FIGURA 7

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ATP SOBRE LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DE $[2-^{14}\text{C}]$ MVA, POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

El extracto acuoso (0,7 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° durante 45 min con concentraciones creciente de ATP (0-10 mM) en un medio que contenía amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8; 2-mercaptoetanol 20 mM; MnCl_2 1 mM y 3(RS) $[2-^{14}\text{C}]$ MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^4 d pm/ μmol). Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la velocidad de incorporación de 3(R) $[2-^{14}\text{C}]$ MVA en las tres fracciones: LL (■—■), -AA (●—●) y PP (▼—▼).



ATP/M²⁺ fué de 1.

2.1.7. Efecto del Fluoruro (F⁻)

La velocidad de incorporación de MVA en presencia de Mn²⁺ 1 mM o Co²⁺ 0,5 mM, fué retardada por fluoruro a nivel de las fracciones AA y PP. La velocidad de incorporación de MVA en la fracción LL fué inhibida por el fluoruro solamente en presencia de Mn²⁺, - ya que en presencia de Co²⁺ no hubo un efecto apreciable sobre esta fracción. La incorporación del MVA en presencia de Co²⁺ fué 7 veces menor que la alcanzada en presencia de Mn²⁺.

Las figuras 8 y 9 muestran que en equilibrio y en presencia de Mg²⁺, el F⁻ innibe la incorporación de MVA en todas las fracciones, mientras que en presencia de Mn²⁺ hay una disociación, pues este anión innibe sólo la formación de LL, en tanto que aumenta alílicos y prenilfosfatos.

En la tabla IV se consignan los valores de la concentración de KF necesarios para innibir en un 50% - (I_{0,5}) la velocidad de incorporación del MVA, en las tres fracciones en donde este compuesto actuó como - innibidor de la incorporación.

FIGURA 8

EFFECTO DEL FLUORURO (F^-) SOBRE LA INCORPORACION DE $[2-^{14}C]$ MVA EN PRESENCIA DE Mg^{2+} , POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE CITRUS PARADISII

0,7 mg/ml de proteínas del extracto acuoso de flavedo de C. paradisii se incubaron a 37° durante 3 h en un medio que tenía amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8; 2-mercaptoetanol 20 mM; $MgCl_2$ 2 mM; ATP 4 mM y 3(RS) $[2-^{14}C]$ MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^7 dpm/ μ mol), con concentraciones crecientes de KF (0-100 mM). Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó el % de incorporación del 3(R) $[2-^{14}C]$ MVA en las tres fracciones: LL (■—■), AA (●—●) y PP (▼—▼).

% INCORPORACION DE ^{14}C -MVA

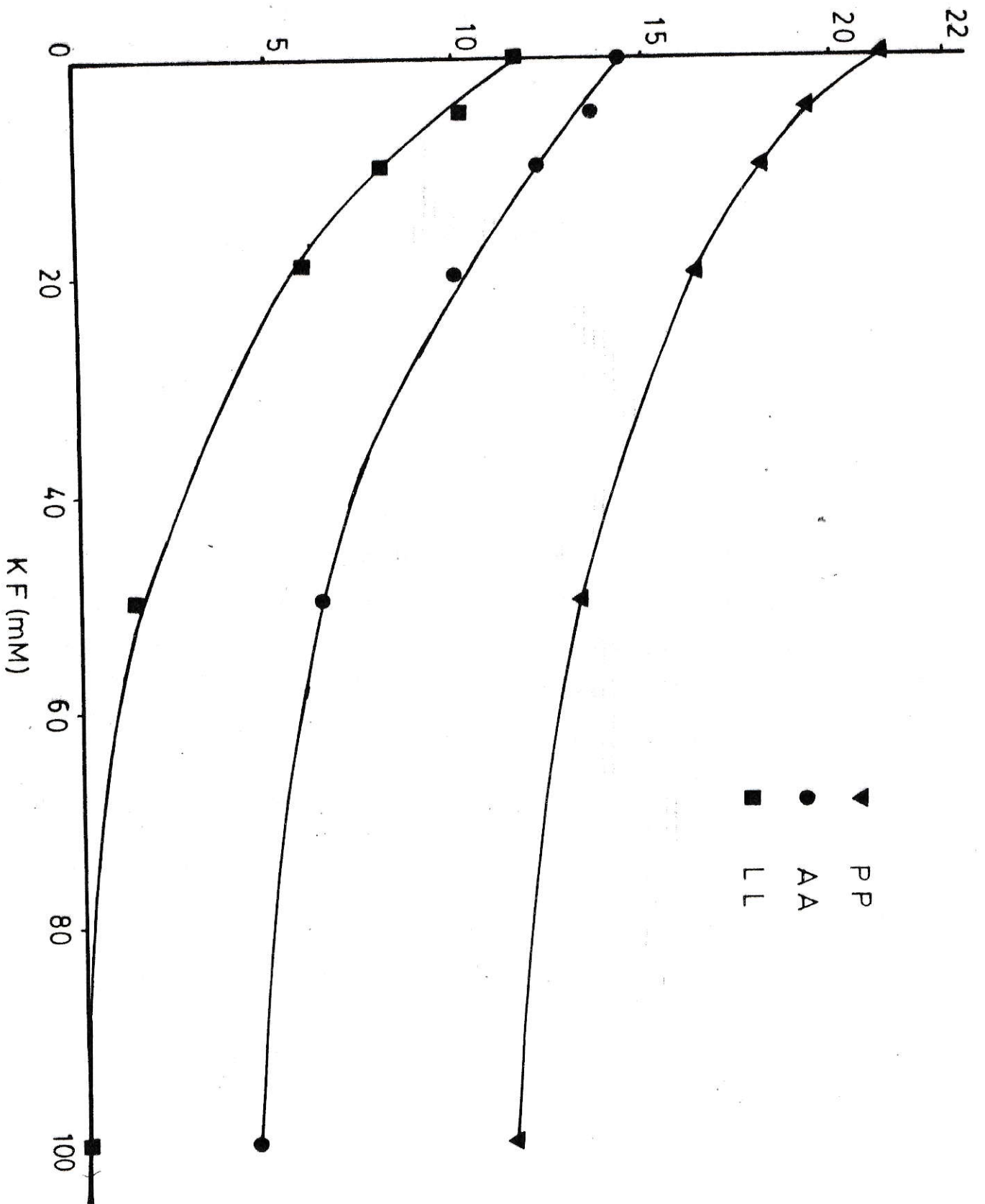


FIGURA 8

EFFECTO DEL FLUORURO (F^-) SOBRE LA INCORPORACION DE $[2-^{14}C]$ MVA EN PRESENCIA DE Mg^{2+} , POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE CITRUS PARADISII

0,7 mg/ml de proteínas del extracto acuoso de flavedo de C. paradisi se incubaron a 37° durante 3 h en un medio que contenía amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8; 2-mercaptoetanol 20 mM; $MgCl_2$ 2 mM; ATP 4 mM y 3(RS) $[2-^{14}C]$ MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^7 dpm/ μ mol), con concentraciones crecientes de KF (0-100 mM). Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó el % de incorporación del 3(R) $[2-^{14}C]$ MVA en las tres fracciones: LL (■—■), AA (●—●) y PP (▼—▼).

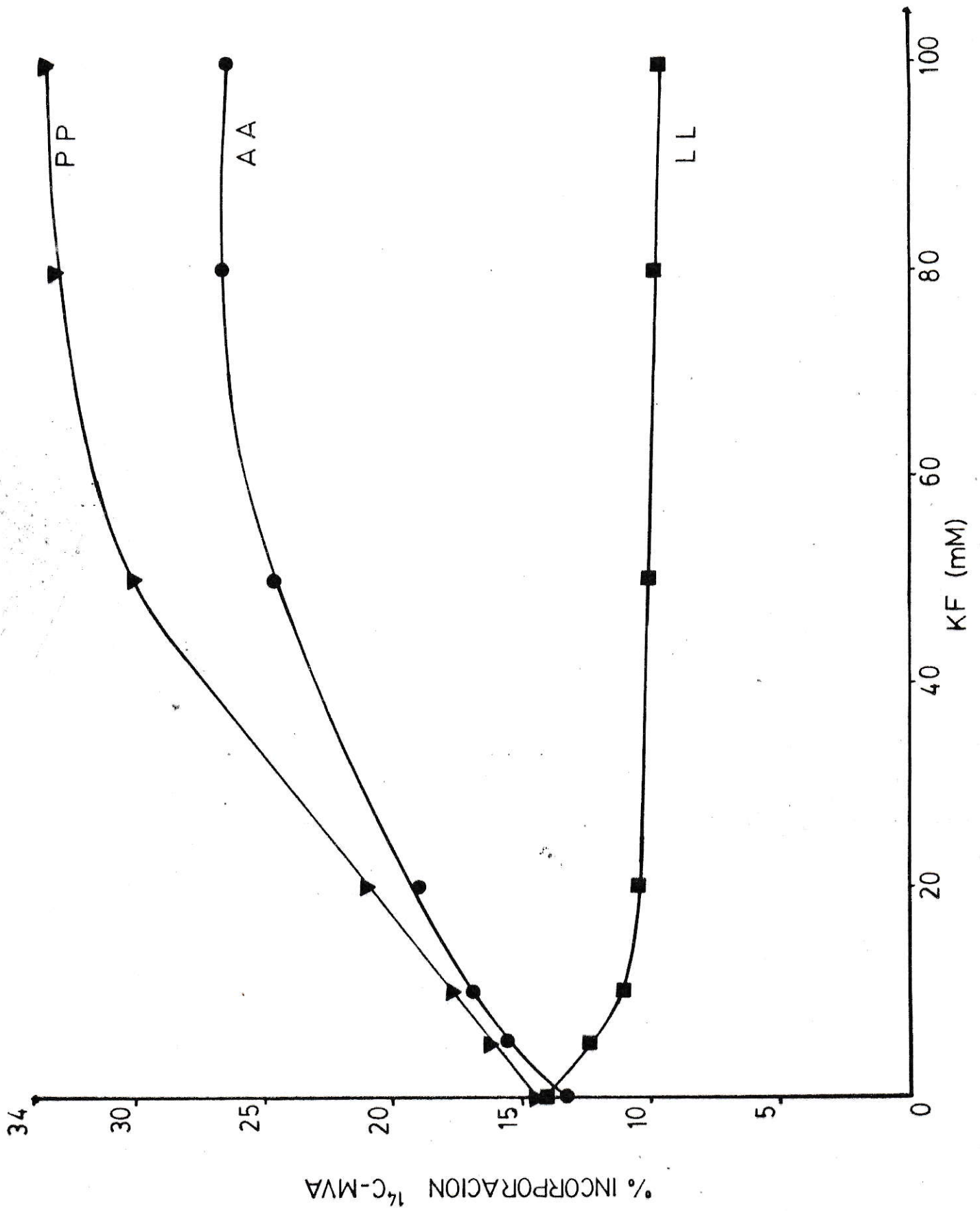


TABLA IV

CONCENTRACION DE KF NECESARIA PARA INHIBIR 50% ($I_{0,5}$) LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DEL MVA POR ENZIMAS DEL FLAVEDO DE CITRUS PARADISII

FRACCION	Mn ²⁺ (mM)	Co ²⁺ (mM)	Mg ²⁺ (mM)
LL	50,0	(#)	18,0
AA	94,0	20,0	40,0
PP	74,5	44,0	130,0

(#) El KF no tiene efecto

2.1.8. Efecto del mercaptoetanol

La figura 10 indica que el 2-mercaptoetanol tuvo un efecto activador de la reacción de incorporación del MVA en presencia de Mn²⁺ 1 mM.

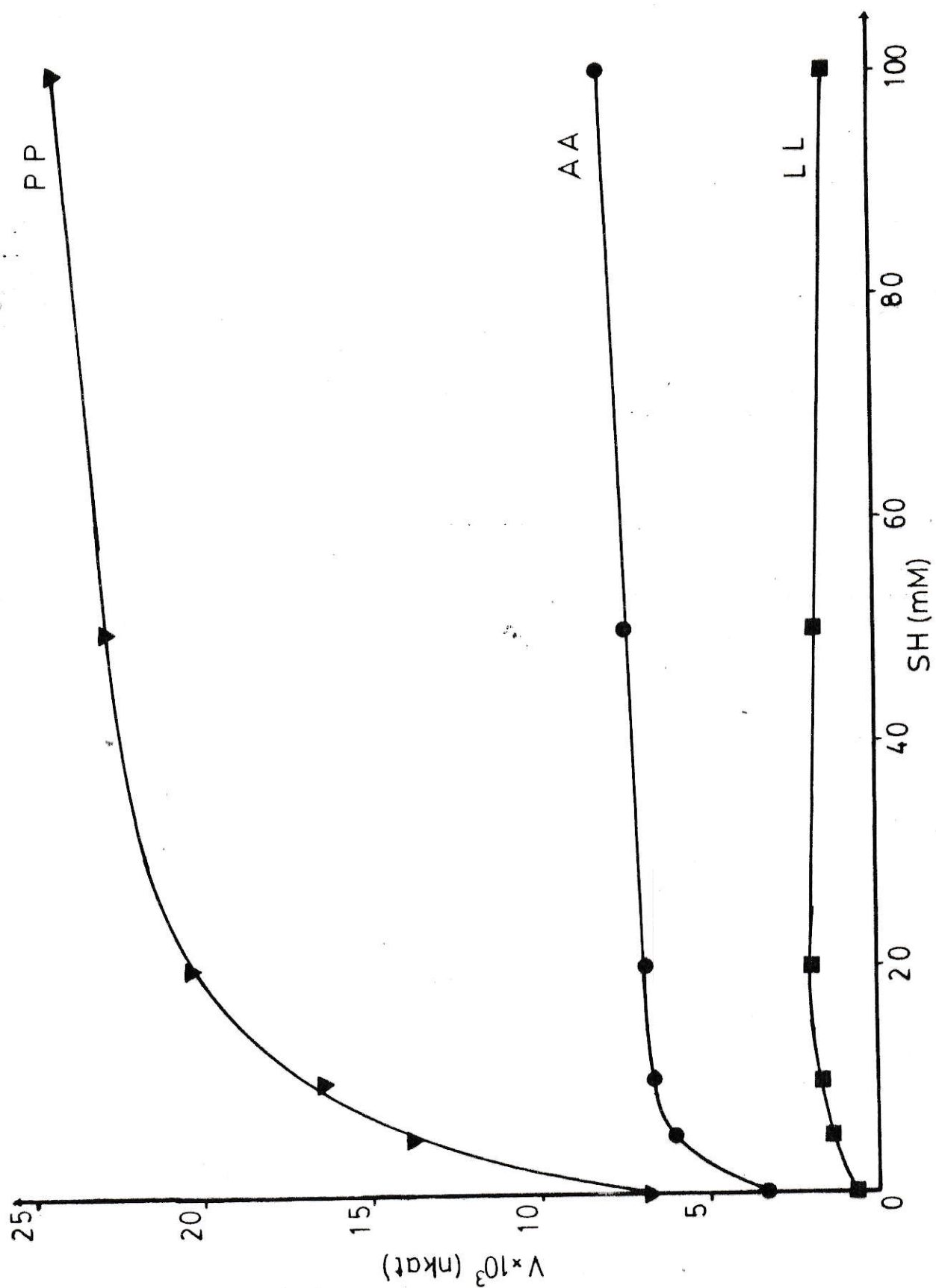
2.1.9. Efecto del PCMB

La velocidad de incorporación de MVA, en presencia de Mn²⁺ 1 mM disminuyó al agregar PCMB. La $I_{0,5}$ fué de 40,0; 60,0 y 90,0 μ M para las fracciones LL, AA y PP respectivamente. La inhibición de la incorporación llegó hasta casi un 100% en las tres fracciones a una concentración de 500 μ M del reactivo.

FIGURA 10

EFFECTO DEL MERCAPTOETANOL SOBRE LA VELOCIDAD DE INCORPORACION DE [2-¹⁴C] MVA POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE CITRUS PARADISII

Se incubaron 0,7 mg/ml de proteínas del extracto acuoso del flavedo de C. paradisi a 37° y durante 45 min con concentraciones crecientes de 2-mercaptoetanol (0-100 mM) en un medio que contenía amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8; - MnCl₂ 1 mM; ATP 2 mM y 3(RS) [2-¹⁴C] MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6x10⁷ dpm/μmol). Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la velocidad de incorporación del 3(R) [2-¹⁴C] MVA - en las tres fracciones: LL (■—■), AA (●—●) y PP (▼—▼).



2.1.10. Efecto del DTNB

Una concentración de alrededor de 5 μM del DTNB innibió en 50% la incorporación de MVA en las tres fracciones de productos.

2.1.11. Análisis de los productos de la reacción

La formación de los isoprenoides a partir del MVA en C. paradisi sigue el patrón que se muestra en el esquema 1. Los productos de las transformaciones del MVA, por enzimas del flavado de pomelo - se clasificaron de acuerdo a tres criterios: a) Intermediarios fosforilados, productos de las reacciones comprendidas entre MVA e IPP; b) Alcoholes de 5, 10 o 15 at de C, productos de la hidrólisis ácida - de los intermediarios fosforilados alílicos entre DMAPP y FPP y c) Alcoholes producidos por la hidrólisis enzimática de los mismos intermediarios fosforilados, permitiendo definir si su conformación es E o Z.

2.1.11.1. Análisis de intermediarios fosforilados

Estos productos fueron analizados por cromatografía en papel (sección 1.3.2).

La hidrólisis ácida seguida de extracción con hexano elimina de la fase acuosa, proveniente del incubado enzimático, todos los compuestos alílicos. La comparación de los compuestos fosforilados de esta fase con muestras de estándares se indica en la figura 11. Aunque no se poseía el estándar del IP, se supuso que el compuesto III correspondía al IP, basándose en los datos de R_f de Chesterton y Kekwick (25).

2.1.11.2. Análisis de alcoholes según el largo de cadena

Los alcoholes terciarios provenientes de la hidrólisis ácida de los productos de la reacción, fueron analizados por TLC, en el sistema en placa reversa (sección 1.3.1.2). Este sistema separa los alcoholes según el largo de la cadena carbonada. El análisis mostró la predominancia de compuestos de 15 at de C por sobre los de 10 y las trazas de 5 at de C, en la muestra estudiada (Fig 12).

2.1.11.3. Análisis de alcoholes según la conformación E o Z

Como las reacciones de incorporación de MVA produjeron compuestos de 10 y 15 at de C, fué necesario determinar presencia e identidad de dias-

FIGURA 11

ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN PAPEL DE LOS PRODUCTOS DE LA - REACCION DE INCORPORACION DE [2-¹⁴C]MVA POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

La preparación enzimática (0,7 mg/ml de proteínas) se incubó en amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8 a 37° durante 3 h, con 3(RS)[2-¹⁴C]MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^7 dpm/ μ mol); 2-mercaptoetanol 20 mM; MnCl₂ 1 mM y ATP 2 mM. Los productos de la reacción remanentes en la fase acuosa, después de hidrólisis ácida y subsiguiente extracción con hexano, se separaron por cromatografía ascendente en papel Whatman #1 lavado con ácido, usando como solvente de desarrollo butanol: ácido fórmico:agua=73:10:13. Los intermediarios fosforilados se identificaron por correspondencia de sus R_f con los de los respectivos estándares. El compuesto I correspondió al PPMVA, el II a una mezcla de PMVA + IPP, el III a IP y el IV al MVA. La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos.

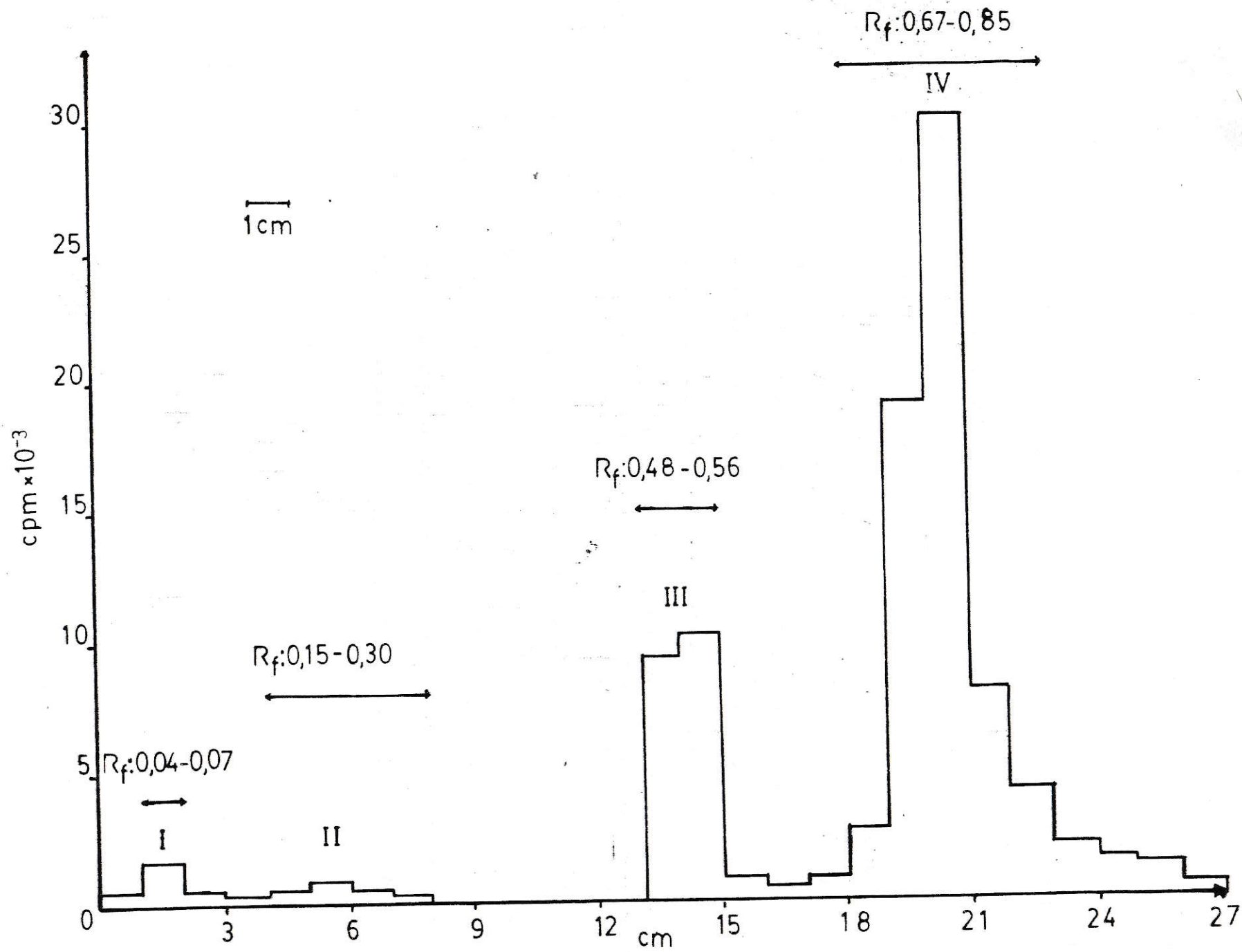
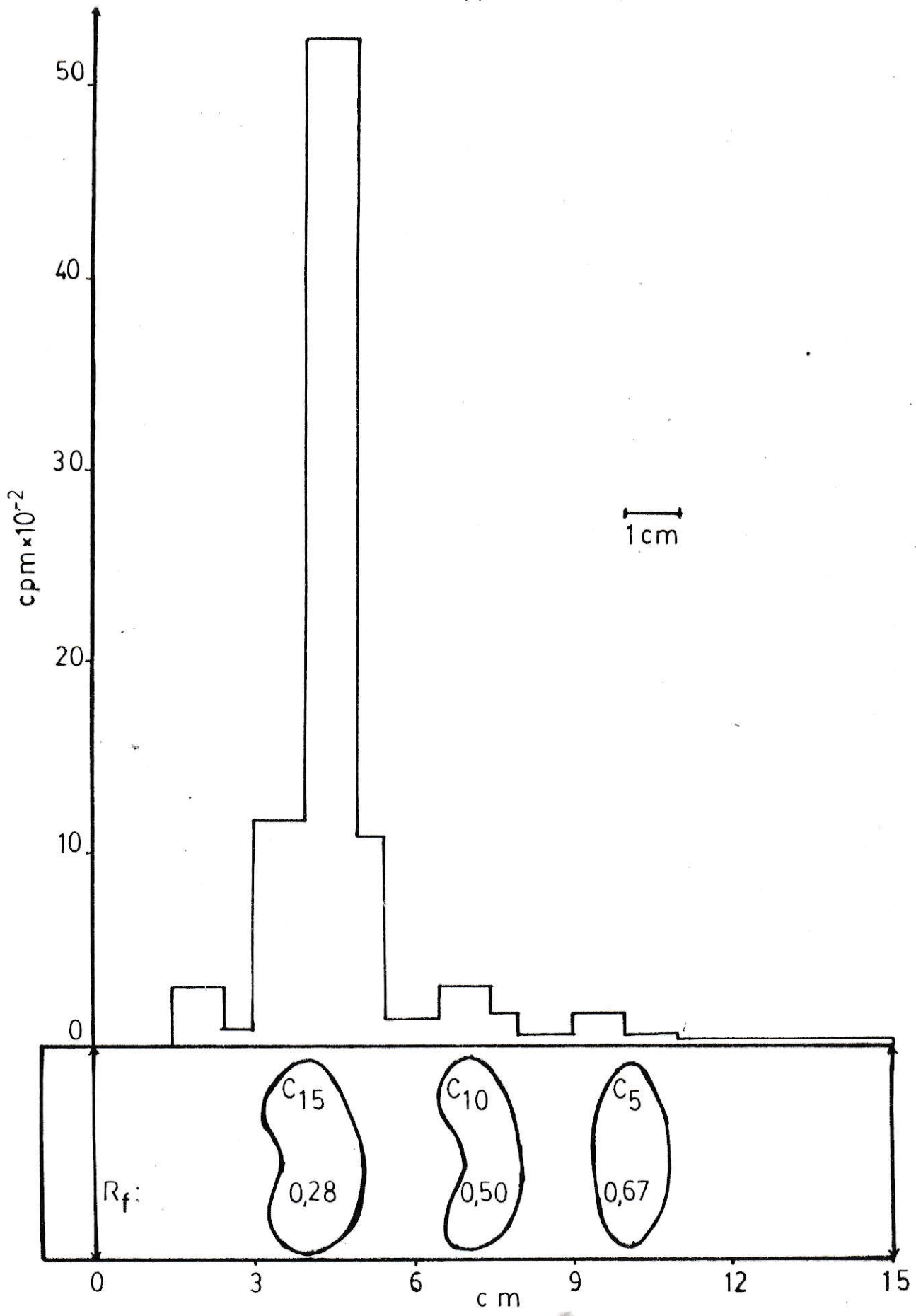


FIGURA 12

ANALISIS POR TLC DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION DE INCORPORACION DE [2-¹⁴C] MVA POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE C. PARADISII, SEGUN SU LARGO DE CADENA

La preparación enzimática (0,7 mg/ml de proteínas) se incubó en amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8 a 37° durante 3h - con 3(RS)[2-¹⁴C] MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^4 dpm/ μ mol); 2-mercaptoetanol 20 mM; MnCl₂ 1 mM y ATP 2 mM. Los productos de las fosfatasas se retiraron por extracción con hexano. La fase acuosa remanente se hidrolizó con fosfatasa alcalina de intestino de ternero a 37° durante 2h. Los productos se extrajeron con hexano y se analizaron por cromatografía en placa reversa, usando como solvente de desarrollo metanol:agua=7:3 con 2 gotas de vaselina. La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. Se encontró radiactividad asociada a los estándares de 5, 10 y 15 at de C con R_f de 0,67; 0,50 y 0,28 respectivamente.



teroisómeros E y Z. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos al analizar por TLC los productos de la reacción (sección 1.3.1.3). En la figura se observan cantidades semejantes de radiactividad asociada a los estándares de conformación E y Z.

En la figura 14 se muestran los resultados del análisis de los alconoles obtenidos por hidrólisis enzimática de los productos fosforilados de la reacción de incorporación de MVA, en presencia de una mezcla de estándares de conformación E o Z (NOH, GOH, E-FOH y Z-FOH). Se encontró radiactividad asociada a NOH y E-FOH y no así en GOH y Z-FOH.

2.1.12. Incorporación de MVA en un sistema más purificado

Los intentos realizados para concentrar las proteínas del sistema enzimático extraído del flavedo de C. paradisii, fueron infructuosos, ya que se obtuvo con el sistema concentrado con sulfato de amonio un porcentaje de incorporación mucho más bajo que con el extracto crudo. En la tabla V se resumen los resultados obtenidos.

FIGURA 13

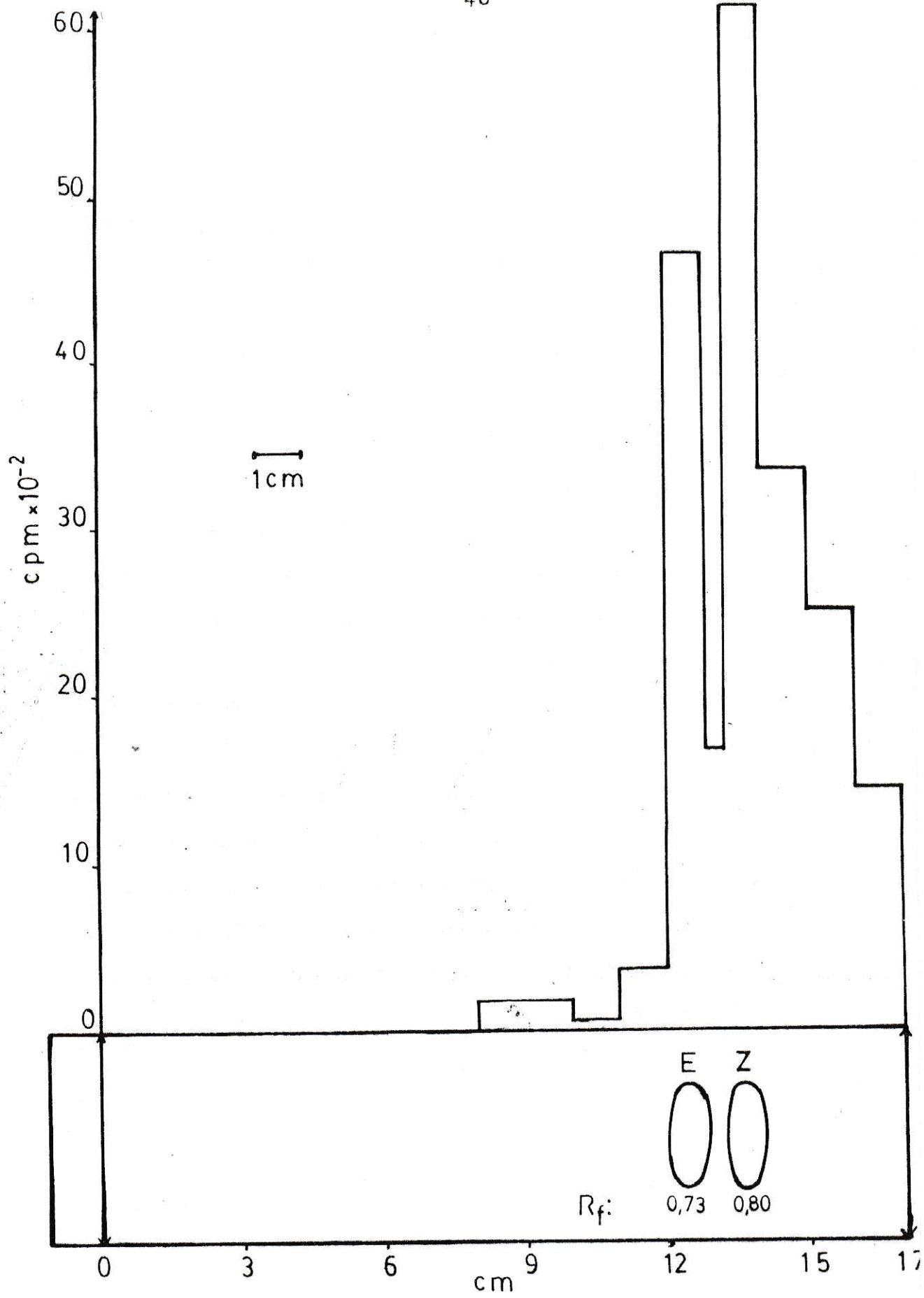
ANALISIS POR TLC DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION DE INCORPORACION DE [2-¹⁴C]MVA POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE C. PARADISII, SEGUN SU CONFORMACION

La preparación enzimática (0,7 mg/ml de proteínas) se incubó en amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8 a 37° durante 3h - con 3(RS) [2-¹⁴C]MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^7 dpm/ μ mol); 2-mercaptoetanol 20 mM; MnCl₂ 1 mM y ATP 2 mM. Los productos de las fosfatasas se retiraron por extracción con hexano. La fase acuosa remanente se hidrolizó con fosfatasa alcalina de intestino de ternero a 37° durante 2h. Los productos se extrajeron con hexano y se analizaron por cromatografía en placas de sílica gel G impregnadas en EGA al 2% en acetona, usando como solvente de desarrollo hexano:acetato de etilo= 8:2. La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. Se encontró radiactividad asociada a los estándares de conformación E y Z con R_F de 0,73 y 0,80 respectivamente. Este análisis distingue sólo conformación y no largo de cadena.

FIGURA 14

ANALISIS POR TLC DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION DE INCORPORACION DE [2-¹⁴C] MVA POR UN EXTRACTO ACUOSO DEL FLAVEDO DE C. PARADISII SEGUN SU CONFORMACION E O Z Y SU LARGO DE CADENA

La preparación enzimática (0,7 mg/ml de proteínas) se incubó en amortiguador de Tris-HCl 100 mM pH 7,8 a 37° durante 3h con 3(RS) [2-¹⁴C] MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6×10^4 dpm/ μ mol); 2-mercaptoetanol 20 mM; MnCl₂ 1 mM y ATP 2 mM. Los productos de las fosfatasas se retiraron por extracción con hexano. La fase acuosa remanente se hidrolizó con fosfatasa alcalina de intestino de ternero a 37° durante 2h. Los productos se extrajeron con hexano y se analizaron por cromatografía en placas de sílica gel GF₂₅₄, preparada con solución acuosa de AgNO₃ al 12,5%, usando como solvente de desarrollo acetato de etilo. La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. Se encontró radiactividad asociada a los estándares E-FOH y NOH con R_f de 0,45 y 0,85 respectivamente. Esta técnica permite distinguir tanto largo de cadena como conformación.



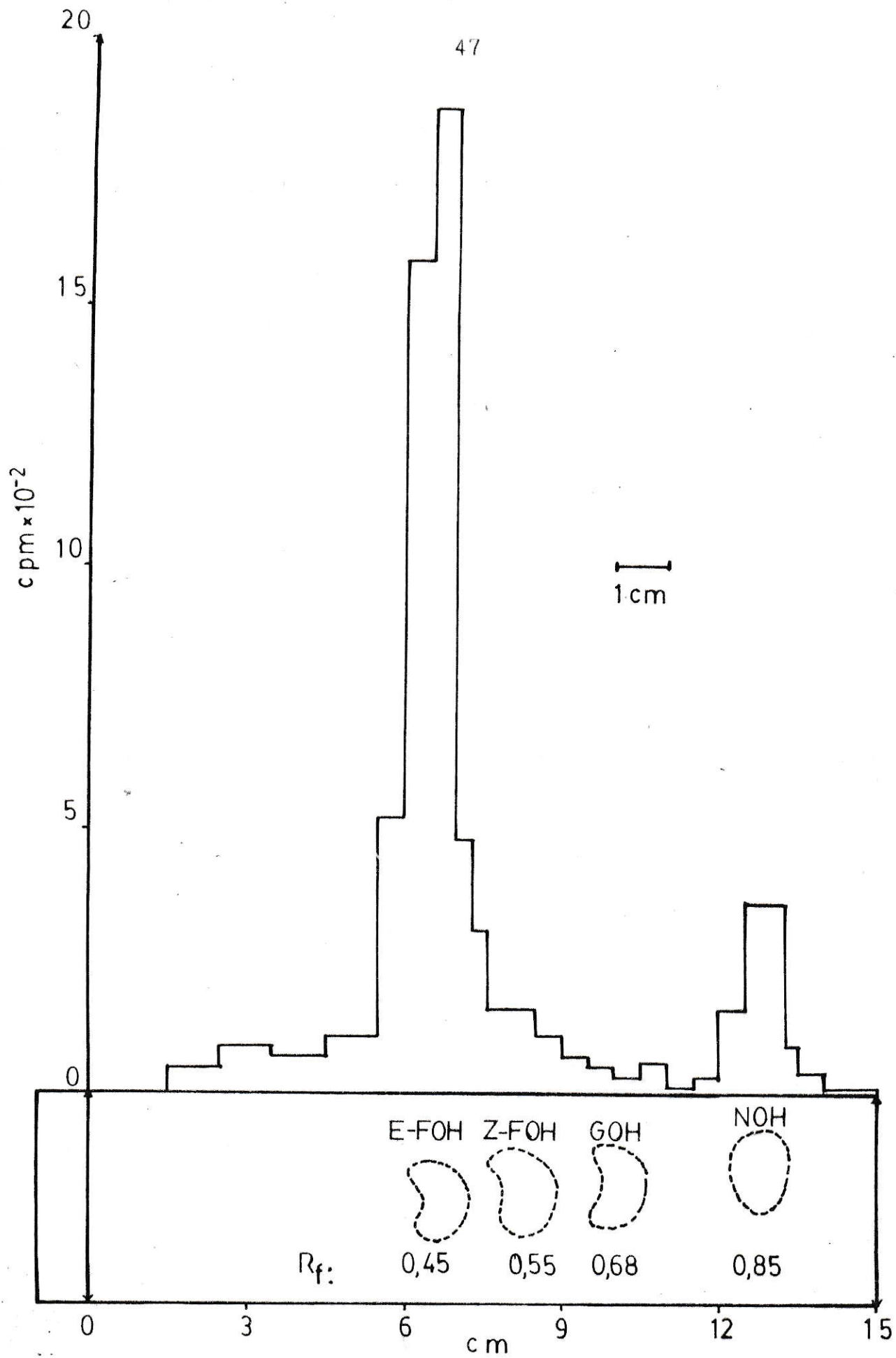


TABLA V

INCORPORACION DE MVA POR UN SISTEMA ENZIMATICO EXTRAIDO DEL FLAVEDO DE C. PARADISII EN DIFERENTES ETAPAS DE TRATAMIENTO

	% INCORPORACION DE ¹⁴ C-MVA		
	LL	AA	TOTAL
Extracto fresco	7,6	28,5	36,1
Fracción 0/80 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,7	4,6	5,3
Fracción 0/80 (NH ₄) ₂ SO ₄ liofil.	2,8	5,9	8,7

2.1.13. Variación estacional

Debido a que los pomelos se adquirieron de fuentes comerciales, es poco probable que sean de una misma variedad, por lo tanto cada preparación enzimática tuvo una actividad diferente.

En la tabla VI se resumen los resultados de algunas preparaciones realizadas en el año 1979 y 1980 como prueba de la variación en la incorporación, dependiente de la época en que se realizaron los experimentos.

TABLA VI

INCORPORACION DE MVA POR ENZIMAS DEL FLAVEDO DE C. PARADISII
OBTENIDOS EN DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO

TIEMPO ESTACIONAL	% INCORPORACION TOTAL ^a DE MVA
Mayo de 1979	39,5
Septiembre de 1979	18,0
Mayo de 1980	25,0
Septiembre de 1980	15,0

a) LL + AA

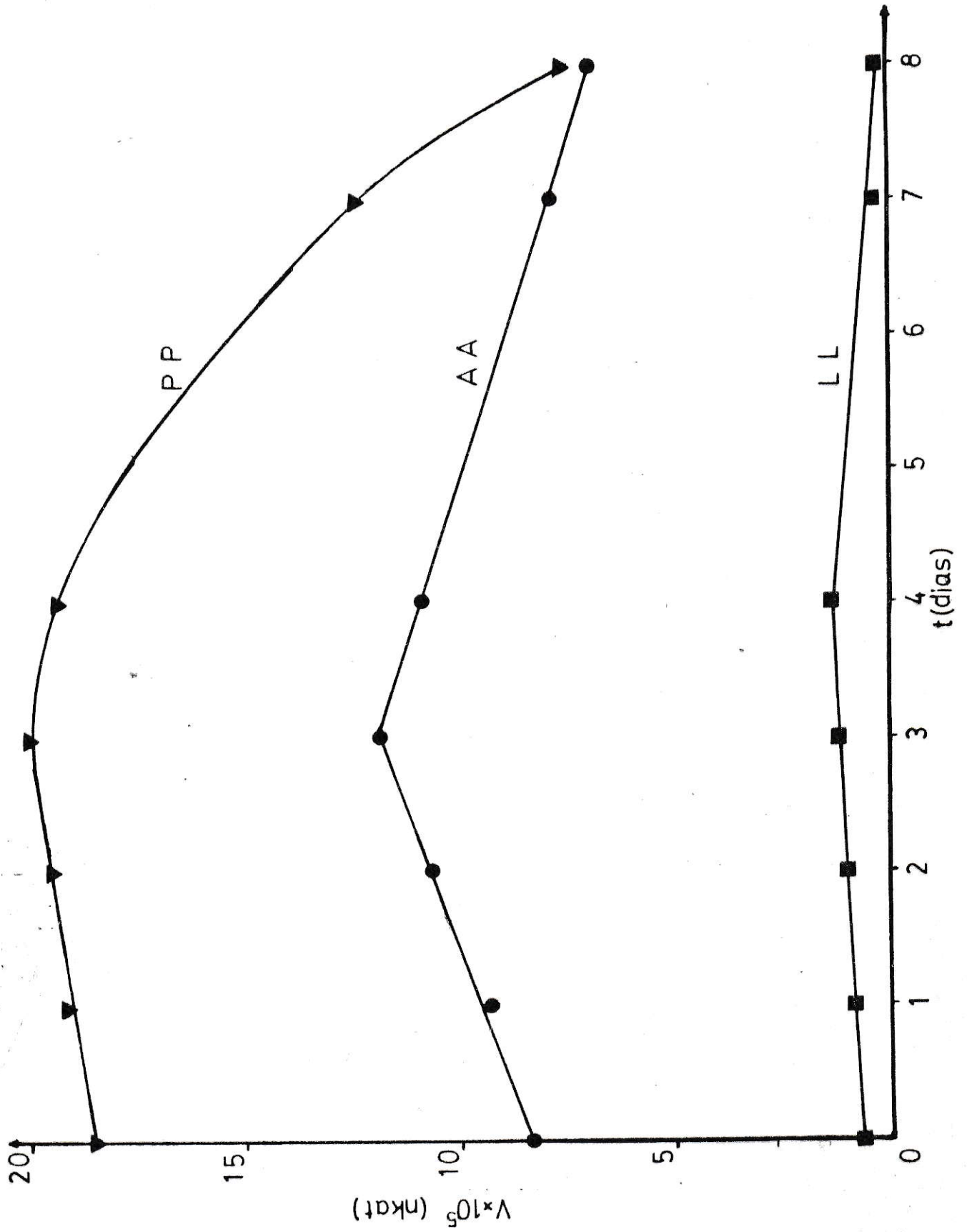
2.1.14. Estabilidad del extracto enzimático

El extracto acuoso presentó un comportamiento - muy particular en cuanto a su estabilidad con respecto al tiempo. En la figura 15 se muestra la variación que sufrió la incorporación con un mismo extracto guardado a 4°. Es importante anotar que la incorporación aumentó en un 40% durante los tres - primeros días de guardado a 4°, para luego dismi- - nuír.

FIGURA 15

ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DEL EXTRACTO ENZIMATICO DEL FLAVEDO DE C. PARADISII, RESPECTO A LA INCORPORACION DE [2-¹⁴C] MVA - EN PRENILFOSFATOS

Un extracto acuoso (0,07 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° durante 45 min en un medio que contenía amortiguador de Tris HCl 100 mM pH 7,8; 2-mercaptoetanol 20 mM; MnCl₂ 1 mM; ATP - 2 mM y 3(RS) [2-¹⁴C] MVA 0,016 mM (radiact. esp. 6x10⁷ dpm/ - μmol). El ensayo se realizó diariamente por un período de 8 días. Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la velocidad de incorporación del 3(R) [2-¹⁴C] MVA en las tres fracciones; LL (■—■), AA (●—●) y PP (▼—▼).



2.2. IPP-ISOMERASA DE FLAVEDO DE C. PARADISII

En vista de que el PCMB y el DTNB tuvieron efecto sobre la incorporación del [2-¹⁴C] MVA, y teniendo presente que todas las IPP-isomerasas hasta ahora descritas requieren de grupos SH para su actividad (2,11,60,100), se hizo un estudio de las propiedades de esta enzima en un extracto de flavedo de pomelo.

2.2.1. Condiciones de ensayo

La velocidad de transformación del IPP en DMAPP por enzimas del flavedo de C. paradisii, fué función líneal de la concentración de proteínas hasta los 0,15 mg/ml (Fig 16).

El tiempo de reacción de 5 min como también la concentración del sustrato IPP de 50 μ M, se escogieron por analogía con los resultados obtenidos para la isomerasa de C. limonum (44). Estas condiciones cumplen con los requisitos de velocidad inicial.

El extracto guardado a 4^o mantuvo el 50% de su actividad al cabo de 5 días.

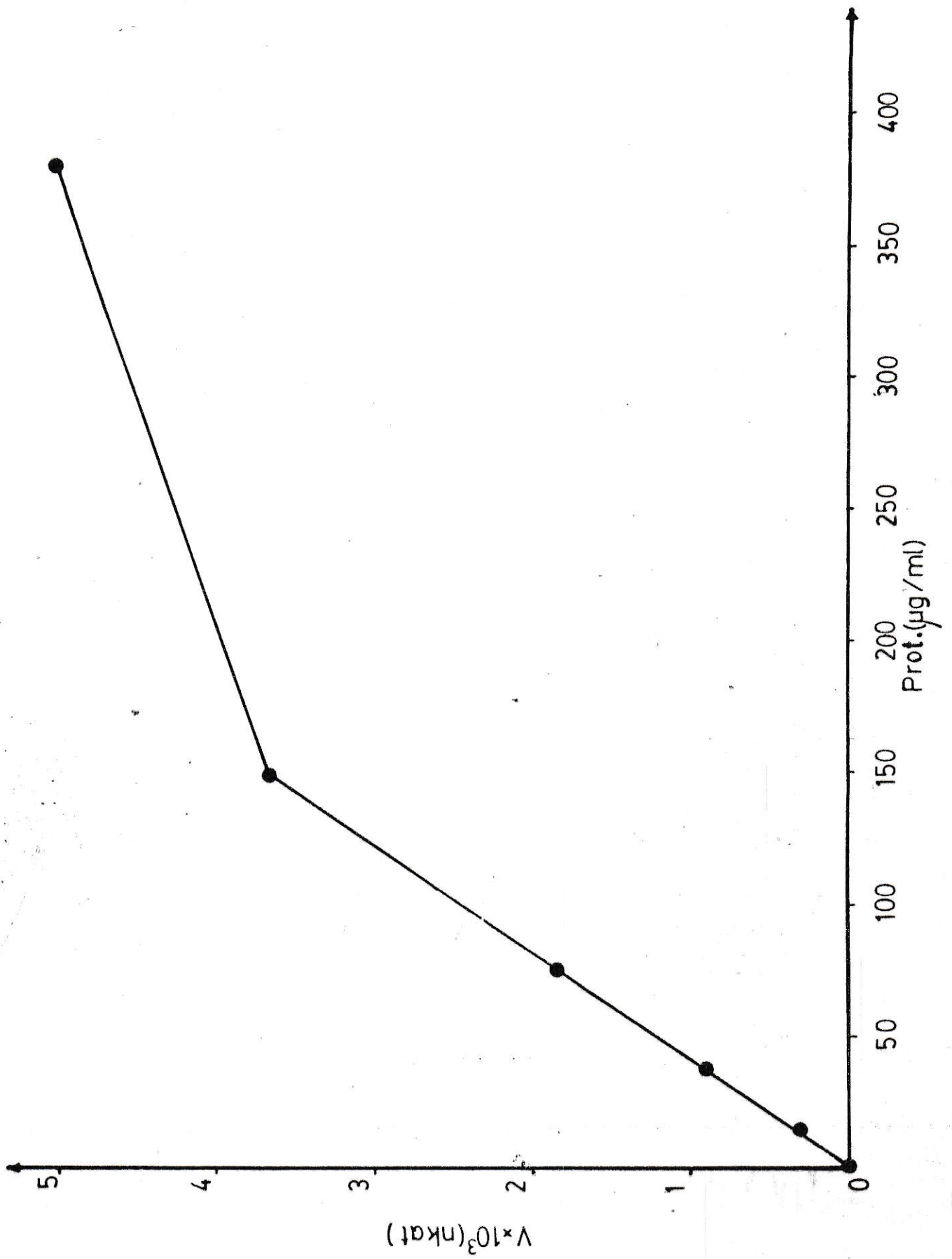
2.2.2. Efecto del metal bivalente

Los metales bivalentes como Mg²⁺ o Mn²⁺ en un ran

FIGURA 16

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS DEL EXTRACTO DEL FLA
VEDO DE C. PARADISII, SOBRE SU ACTIVIDAD IPP-ISOMERASICA

Un extracto enzimático se incubó a 30° durante 5 min en un medio que contenía amortiguador de succinato 150 mM pH 6,0; 2-mercaptoetanol 20 mM; [1-¹⁴C]IPP 50 μM (radiact. esp. 2,4x 10⁷ dpm/μmol) y concentraciones de proteínas del extracto entre 0 y 0,38 mg/ml. Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la velocidad de transformación de [1-¹⁴C]IPP en los alcoholes alílicos reordenados de 5 at de C.



go de concentración de 0,5 a 10,0 mM no afectaron en un grado apreciable la actividad de la IPP-isomerasa. Un extracto filtrado por una columna de Sephadex G-25 u otro equilibrado con Chellex 100, tanto en ausencia como en presencia de Mg^{2+} 2,5 mM, tuvieron la misma actividad que la de los extractos no tratados. Otro extracto preparado en presencia de 1 mM EDTA tuvo actividad independientemente de la presencia o ausencia del metal. Los resultados se resumen en la tabla VII.

TABLA VII

ACTIVIDAD DE IPP-ISOMERASA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII EN -
 FUNCION DEL METAL BIVALENTE

PROCEDENCIA DE ENZIMA	ACTIVIDAD DE IPP-ISOMERASA (nkat/mg)	
	Sin metal	Mg^{2+} 2,5 mM
Extracto crudo	0,041	0,037
Eluido columna G-25	0,037	0,036
Sobrenadante Chellex 100	0,040	0,038
Preparado en EDTA	0,038	0,037

2.2.3. Efecto del EDTA

El EDTA 1 mM incrementó en un 15% la actividad de la IPP-isomerasa. Concentraciones mayores inhibieron la actividad enzimática, necesitándose una concentración de 10,8 mM EDTA para inhibir en un 50% di-

cha actividad (Fig 17).

2.2.4. Efecto del ATP

En vista de que la actividad fosfatásica del flavedo de C. paradisi fué detectada, se pensó que esto podía ocasionar un consumo del IPP, afectando la actividad de la isomerasa. Además se había descrito un efecto activador del ATP sobre la IPP-isomerasa - de C. limonum (40) e interpretado como un desvío de la actividad fosfatásica hacia este compuesto. Por lo tanto se decidió analizar el efecto del ATP sobre la actividad isomérica del pomelo. La tabla VIII contiene los resultados que demuestran que este compuesto no tuvo efecto sobre dicha actividad.

TABLA VIII

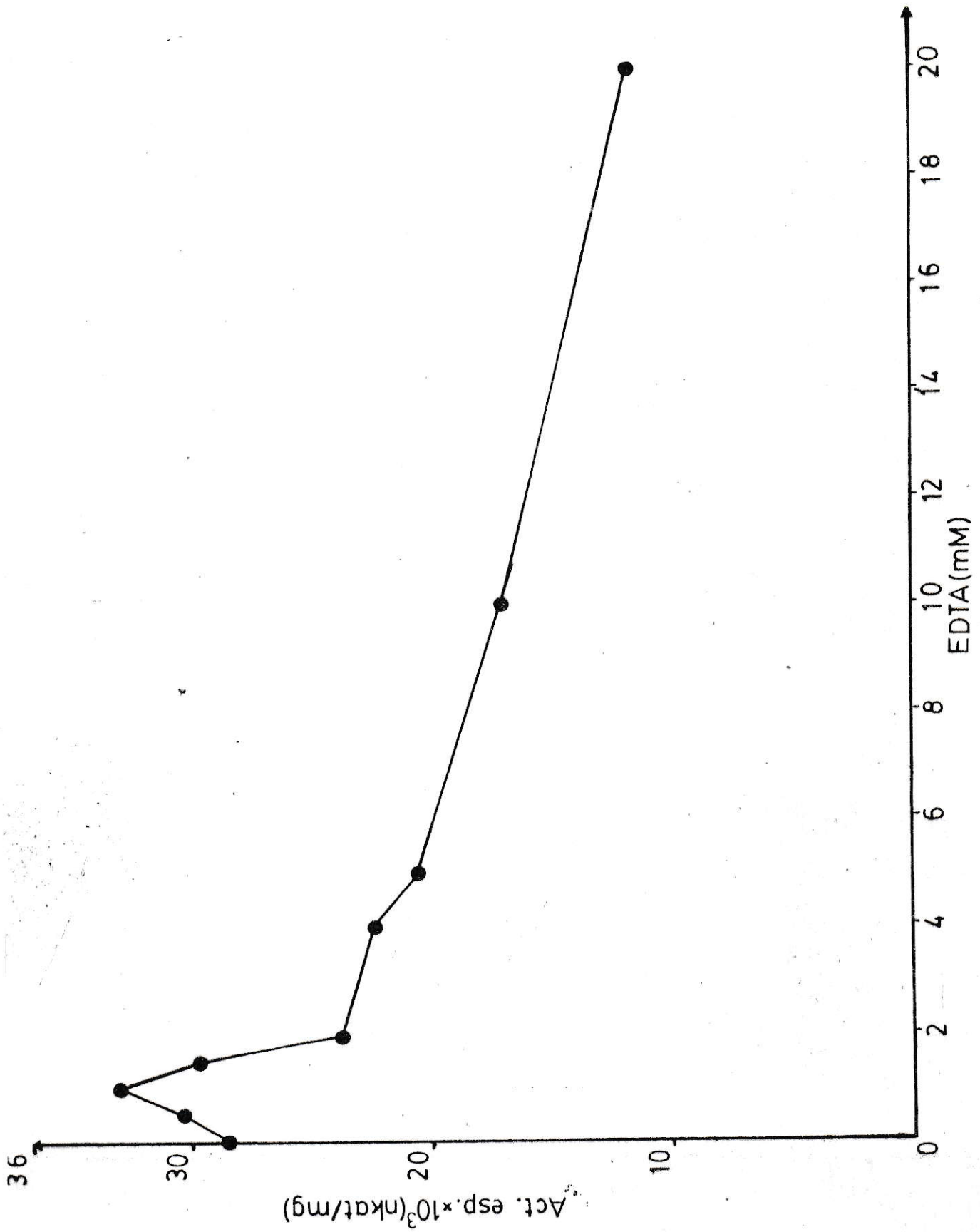
ACTIVIDAD DE LA IPP-ISOMERASA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE ATP

ATP	ACT. FOSFATASICA (nkat/mg)	ACT. IPP-ISOMERASICA (nkat/mg)
0	0,040	0,024
5	0,046	0,025
10	0,042	0,023
20	0,044	0,024
50	0,047	0,024
100	0,051	0,025

FIGURA 17

EFFECTO DEL EDTA SOBRE LA ACTIVIDAD IPP-ISOMERASICA DEL FLAVO DO DE C. PARADISII

El extracto enzimático (0,10 mg/ml) de proteínas) se incubó a 30° durante 5 min en un medio que contenía amortiguador de succinato 150 mM pH 6,0; 2-mercaptoetanol 20 mM; [1-¹⁴C]IPP 50 μM (radiact. esp. 2,4x10⁷ dpm/μmol), con concentraciones de EDTA entre 0 y 20 mM. Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la actividad específica de la enzima, midiendo la transformación del [1-¹⁴C]IPP en los alcoholes alílicos reordenados de 5 at de C.



2.2.5. Curvas de pH

La actividad IPP-isomerásica fué estudiada a diferentes valores de pH tanto en ausencia como en presencia de Mg^{2+} 2,5 mM.

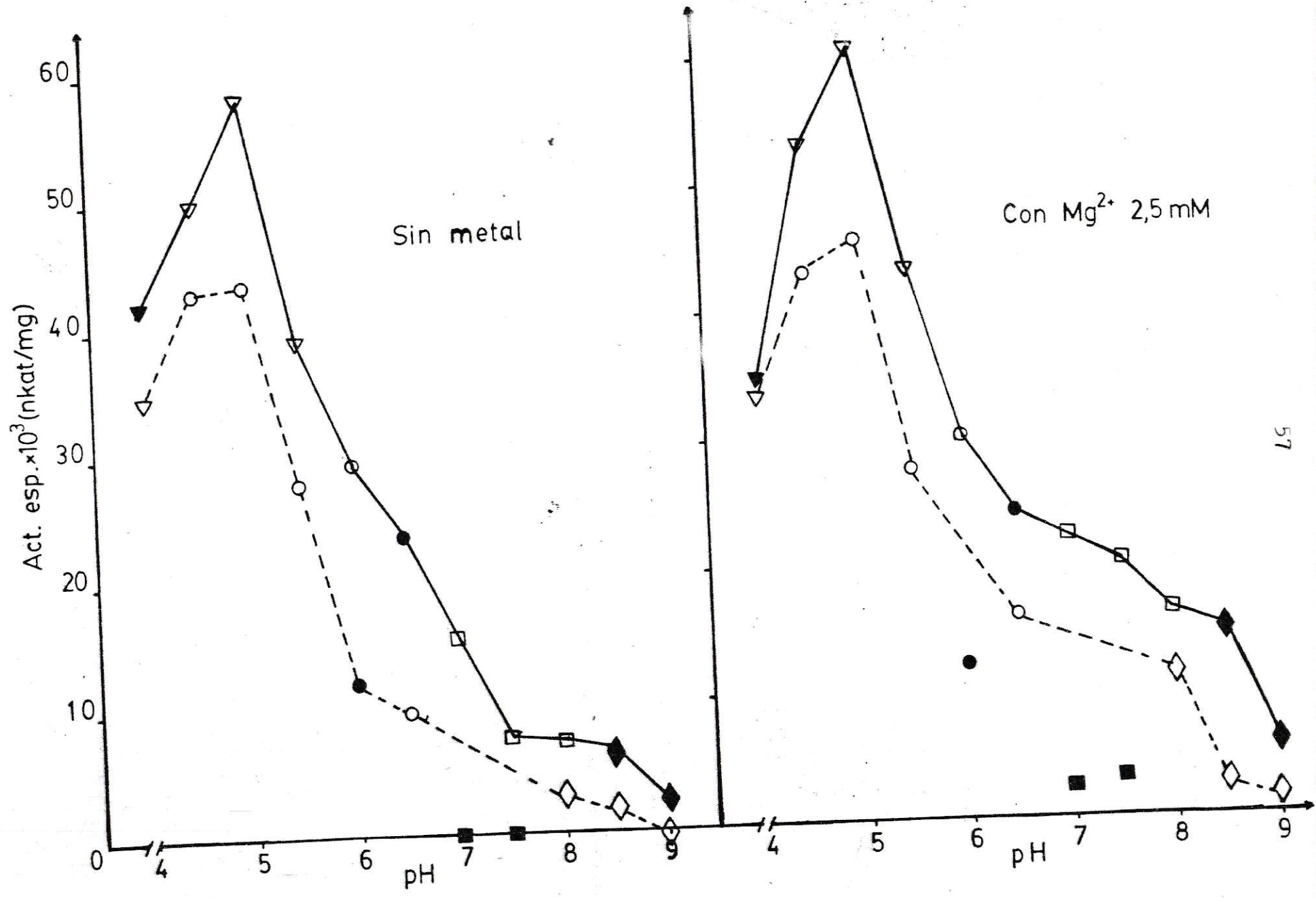
La figura 18 indica que no hubo diferencias en el pH óptimo cuando se ensayó la actividad en ausencia o en presencia del metal bivalente. La máxima actividad se obtuvo a pH 5,0 en amortiguador de acetato o succinato 150 mM y la curva presentó una inflexión alrededor de pH 6,0.

Para asegurarnos de que el DMAPP formado por acción de la IPP-isomerasa a los valores más ácidos de pH no era hidrolizado por la fosfatasa ácida presente en el sistema enzimático, tan pronto como se formaba, se hizo un control que consistió en obtener el DMAPP por acción de la actividad IPP-isomerasa a pH 6,0, luego se incubó este mismo medio por otros 5 min a los pH entre 4,0 y 6,5. Los resultados obtenidos - indicaron que la cantidad de compuestos alílicos formados al pH inicial de 6,0 fué la misma que se obtuvo como control en cada uno de los otros valores de pH.

FIGURA 18

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD IPP-ISOMERASICA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

El extracto enzimático (0,10 mg/ml de proteínas) se incubó a 30° durante 5 min con [1-¹⁴C]IPP 50 μM (radiact. esp. 2,4x10⁷ dpm/μmol) y 2-mercaptoetanol 20mM en distintos amortiguadores a pH entre 4 y 9, todos a 150 mM. Se realizó una curva de pH en ausencia de metal y otra en presencia de Mg²⁺ 2,5 mM. Se usaron los siguientes amortiguadores: Formiato pH 4,0 (▼), acetato pH 4,0-4,5-5,0 o 5,5 (▽), succinato pH 4,5-5,0-5,5-6,0 o 6,5 (○), MES pH 6,0 o 6,5 (●), fosfato pH 7,0 o 7,5 (■), TES pH 7,0-7,5 o 8,0 (□), Tris-HCl pH 8,0-8,5 o 9,0 (◇) o Glicina-NaOH pH 8,5 o 9,0 (◆). La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la actividad específica de la enzima, midiendo la mayor transformación del [1-¹⁴C]IPP en los alcoholes alílicos reordenados de 5 at de C. La hidrólisis enzimática y no enzimática, en todo el rango de pH, no afectó en forma apreciable la concentración del sustrato. La figura con líneas punteadas corresponde al perfil de pH por los valores mínimos de actividad en cada pH analizado.



2.2.6. Efecto del DTNB

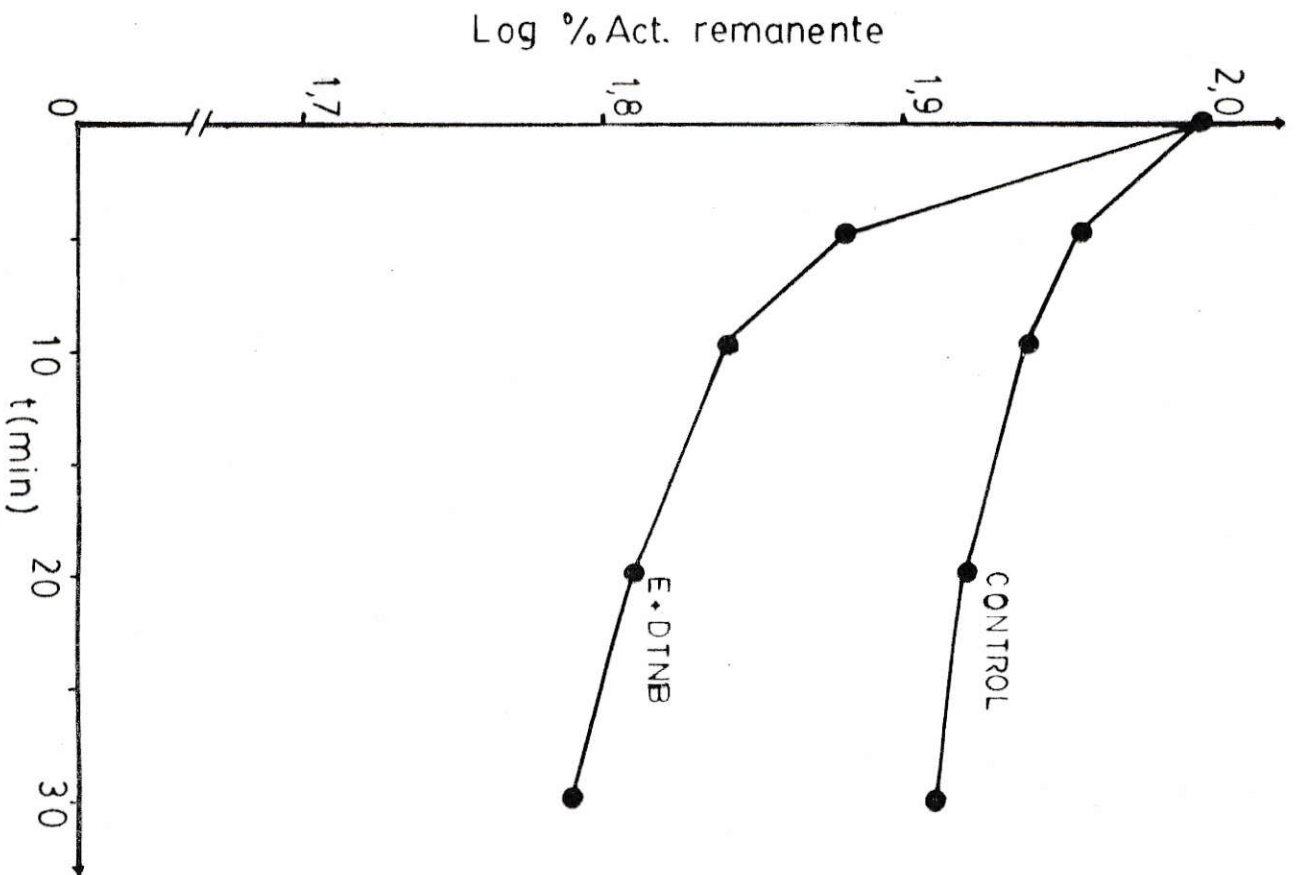
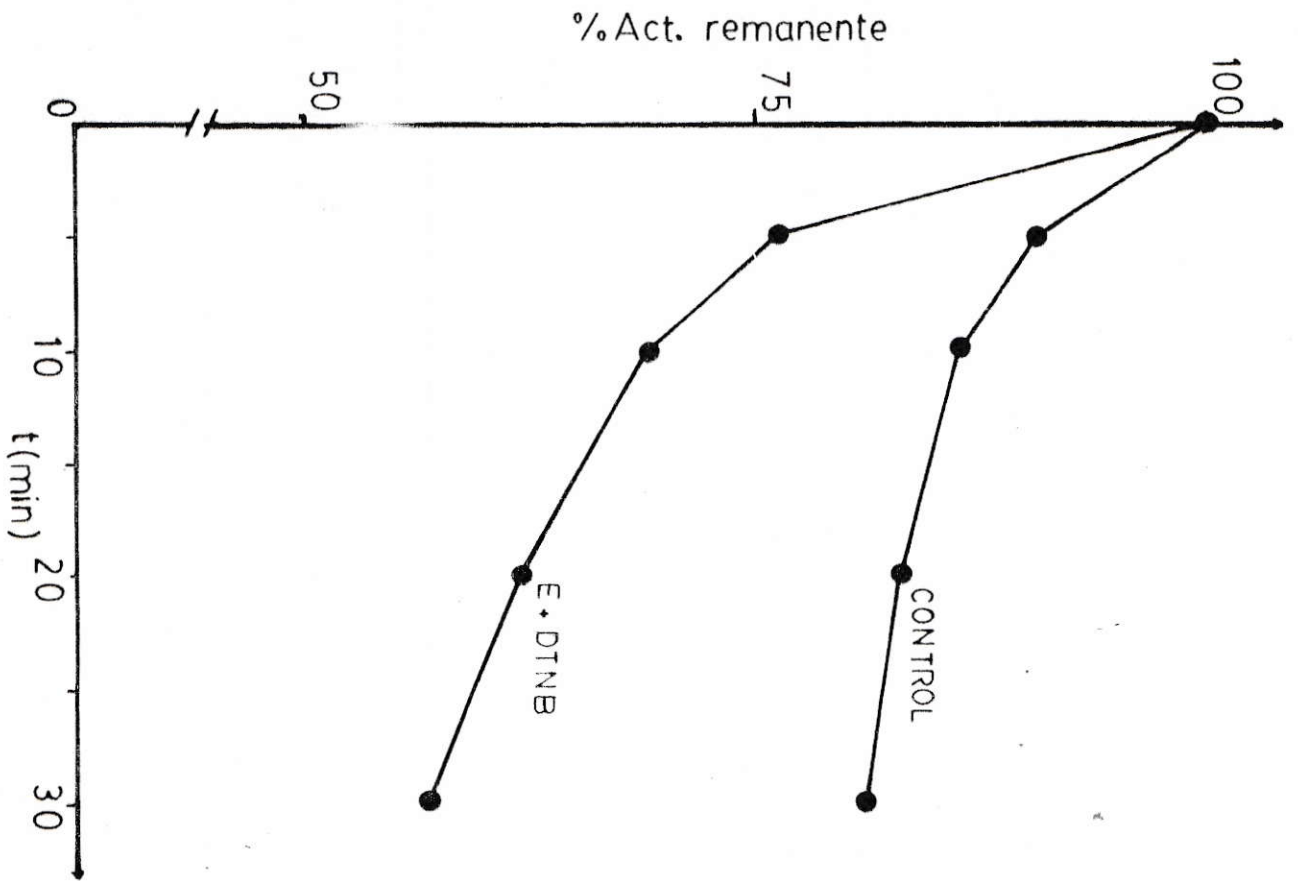
El DTNB entre 5 y 200 μM no inhibió la actividad de la IPP-isomerasa.

Esta misma preparación fué tratada por diferentes intervalos de tiempo en ausencia de sustrato con 200 μM DTNB a 30° . La actividad IPP-isomerasica del extracto tratado con DTNB presentó un patrón típico de inactivación multifásica con un $t_{0,5}$ mayor de 900 - seg (Fig 19).

FIGURA 19

INACTIVACION DE LA IPP-ISOMERASA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII
POR DTNB

El extracto (0,85 mg/ml de proteínas) se incubó a 30° por diferentes intervalos de tiempo, en amortiguador de succinato 150 mM pH 6,0 en presencia y en ausencia de 200 μ M DTNB. La reacción de inactivación se detuvo, diluyendo cada alícuota en el medio de ensayo que contenía amortiguador de succinato 150 mM pH 6,0 y [1-¹⁴C]IPP 50 μ M (radiact. esp. $2,4 \times 10^7$ dpm/ μ mol). El DTNB no inhibió la actividad, a la concentración resultante. La radiactividad se cuantificó por el método de espectrometría de centelleo para líquidos. La inactivación se expresó como el % de actividad remanente, respecto al valor inicial de la actividad.



2.3. ACTIVIDAD DE LA C₁₅-PRENILSINTETASA DEL FLAVEDO DE C. PARADISI

Los análisis de los productos de la reacción de incorporación del MVA por extractos crudos de flavedo - mostraron que se formaban cantidades apreciables de E-FPP y algo de NPP (Fig 14). Se decidió explorar las - condiciones adecuadas para estudiar las enzimas respon- sables de la formación de estos compuestos.

2.3.1. Condiciones de ensayo

La velocidad de condensación del [1-¹⁴C]IPP con - GPP por el sistema enzimático extraído del flaveo - de C. paradisi, fué función líneal de la concentra- ción de proteínas hasta los 0,06 mg/ml (Fig 20). Se observó velocidad inicial hasta los 45 min, con una incorporación máxima de IPP del 3,6% (Fig 21).

2.3.2. Efecto del metal bivalente

La actividad de la C₁₅-prenilsintetasa fué depen- diente de un ión metálico bivalente. El Mg²⁺ fué a- proximadamente 2 veces más efectivo que el Mn²⁺. Pa- ra su máxima actividad la enzima requiere de 6 mM - Mg²⁺ a pH 7,8 o de 4 mM Mn²⁺ a pH 6,5 (Fig 22).

FIGURA 20

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS DEL EXTRACTO DE FLA-
VEDO DE C. PARADISII, SOBRE SU ACTIVIDAD C₁₅-PRENILSINTETASA

Un extracto enzimático se incubó a 37° durante 30 min, en un medio que contenía amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4; -- MgCl₂ 6 mM; 2-mercaptoetanol 20 mM; GPP 10 μM; [1-¹⁴C]IPP 50 μM (radiact. esp. 2,4x10⁶ dpm/μmol) y cantidades crecientes de extracto (0-0,33 mg/ml de proteínas). Los productos de la reacción se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. La IPP-isomerasa a las condiciones del ensayo fué inactiva. Se determinó la velocidad de condensación del [1-¹⁴C]IPP con GPP, midiendo la radiactividad en los respectivos alcoholes alílicos reordenados de 15 at de C.

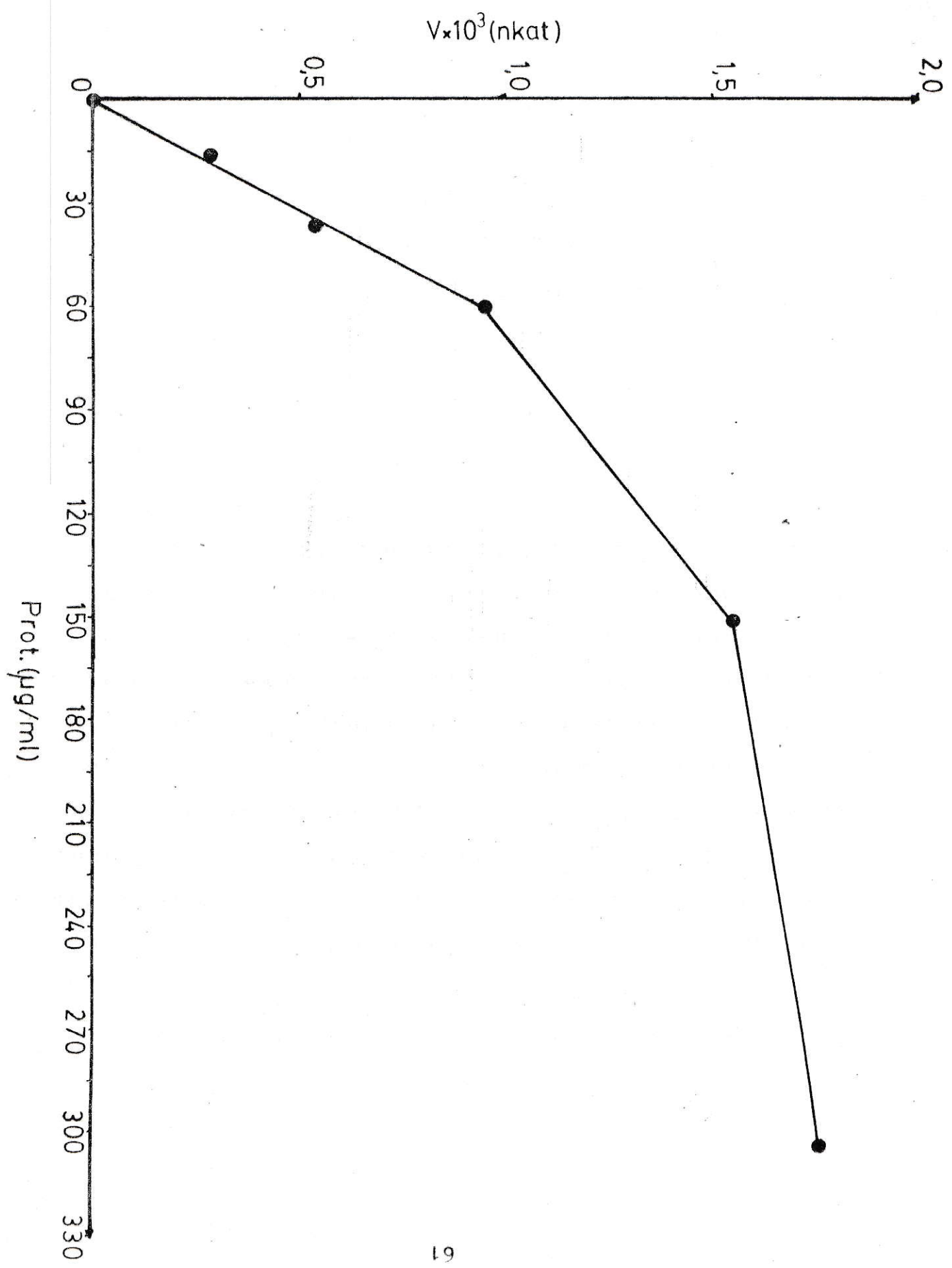
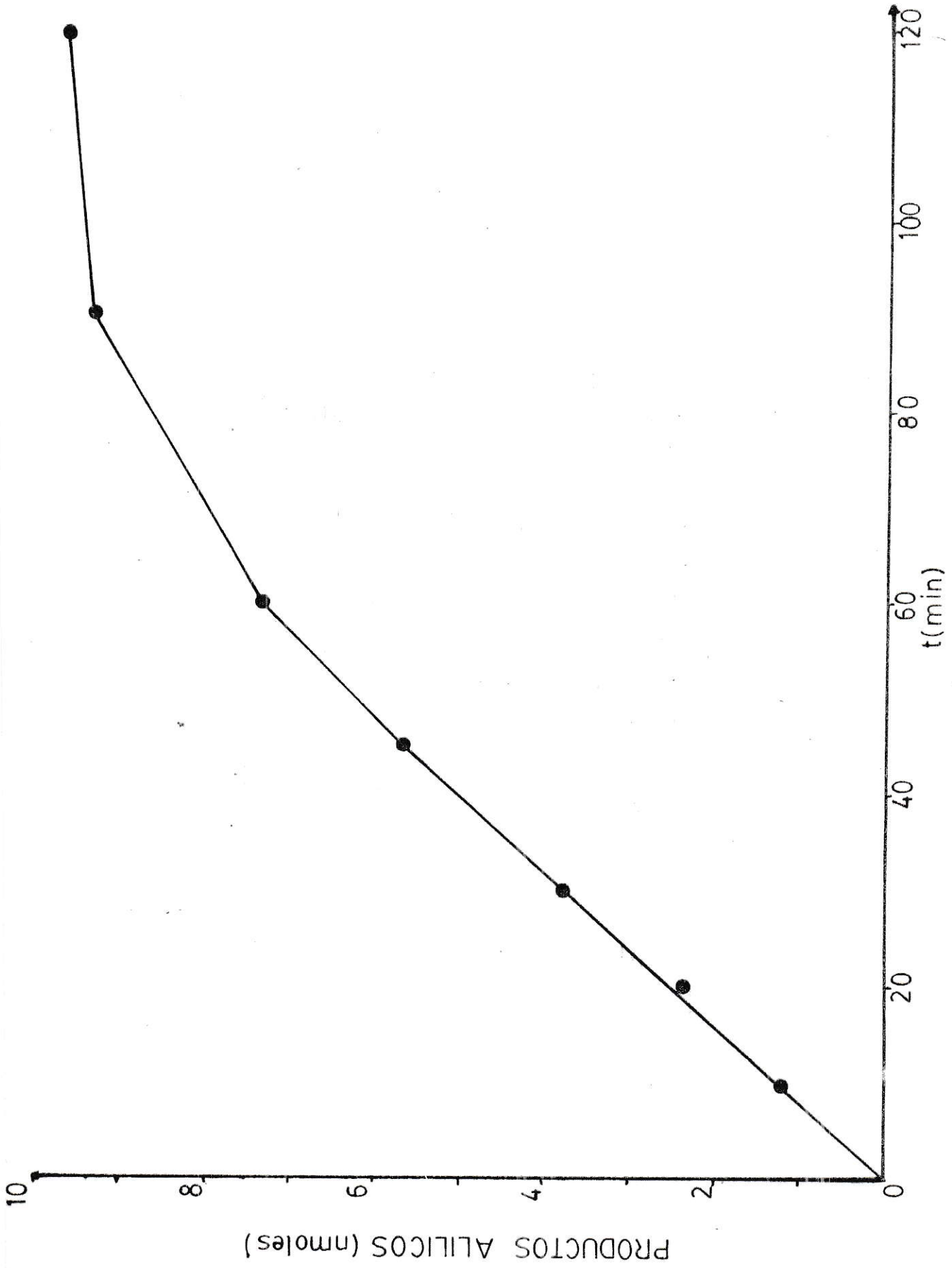


FIGURA 22

EFFECTO DEL METAL BIVALENTE SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA C₁₅-PRE-
NILSINTETASA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

El extracto acuoso (0,06 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° durante 30 min, en un medio que contenía amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4; 2-mercaptoetanol 20 mM; GPP 10 µM y - [1-¹⁴C]IPP 50 µM (radiact. esp. 2,4x10⁶ dpm/µmol) y concentraciones crecientes de MgCl₂ o MnCl₂ (0-20 mM). Cuando se usó el Mn²⁺ se cambió el amortiguador de fosfato por succinato 100 mM pH 6,5. Los productos radiactivos se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. La IPP-isomerasa a la condiciones del ensayo fué inactiva. Se determinó la actividad específica de la enzima, midiendo la radiactividad incorporada en los respectivos alcoholes alílicos reordenados de 15 at de C.



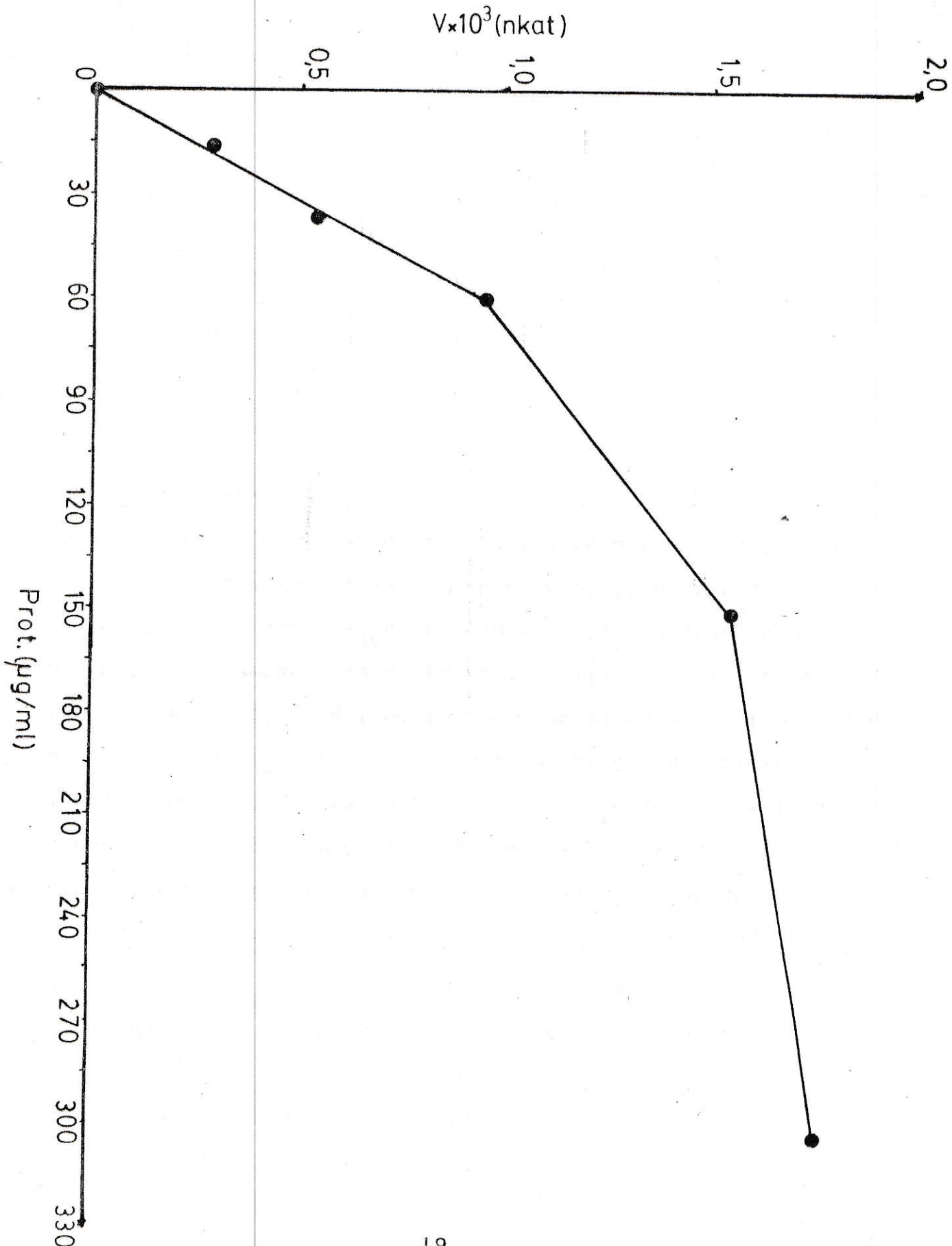
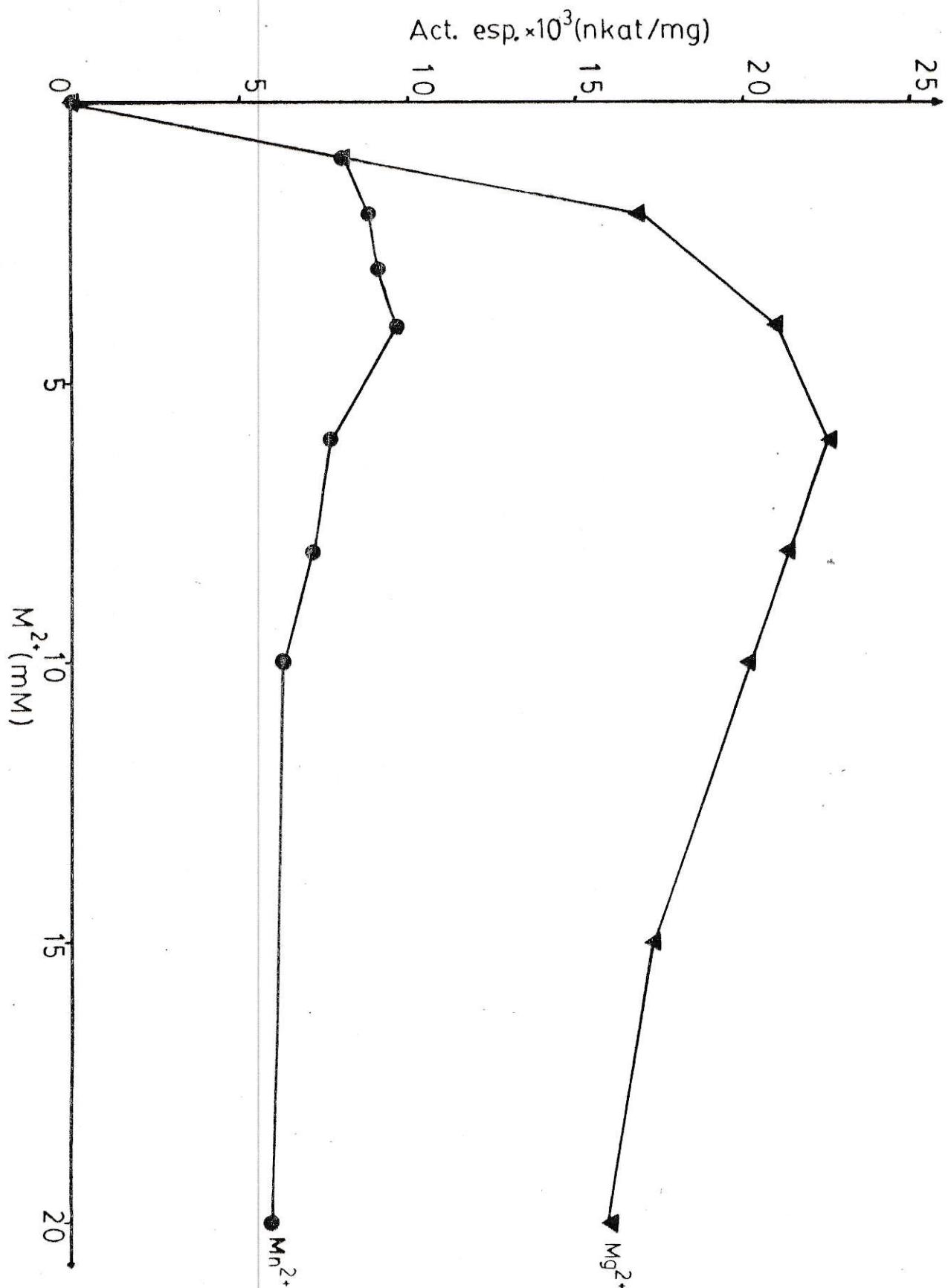


FIGURA 21

CURVA DE PROGRESO PARA LA ACTIVIDAD DE LA C₁₅-PRENILSINTETASA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

El extracto acuoso (0,06 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° durante varios intervalos de tiempo (0-120) en un medio que contenía amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4; 2-mercaptoetanol 20 mM; MgCl₂ 6 mM; GPP 10 μM y [1-¹⁴C]IPP 50 μM (radiact. esp. 2,4x10⁶ dcpm/μmol). Los productos radiactivos se cuantificaron por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la cantidad de productos alílicos formados por la condensación del [1-¹⁴C]IPP con el GPP, midiendo la radiactividad en los respectivos alcoholes alílicos reordenados de 15 at de C. La IPP-isomerasa a las condiciones del ensayo fué inactiva.



2.3.3. Curva de pH

La actividad de la C₁₅-prenilsintetasa fué estudiada en presencia de Mg²⁺ 6 mM, a diferentes valores de pH y en dos soluciones amortiguadores por cada uno.

La figura 23 muestra que la actividad de prenilsintetasa tuvo su máximo valor a pH 6,5 en amortiguador de succinato o MES 100 mM, con inflexiones en pH 5,0 y 8,0. La actividad fosfatásica determinada en el mismo experimento presentó su máximo valor a pH 5,5 en amortiguador de acetato o succinato 100 mM, con una inflexión en pH 6,0.

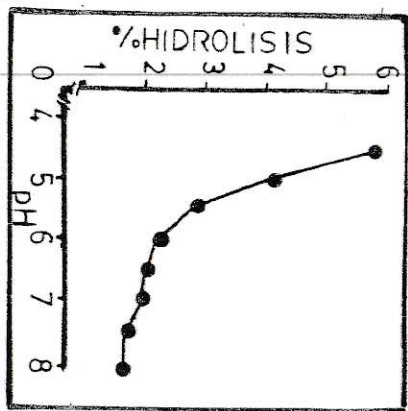
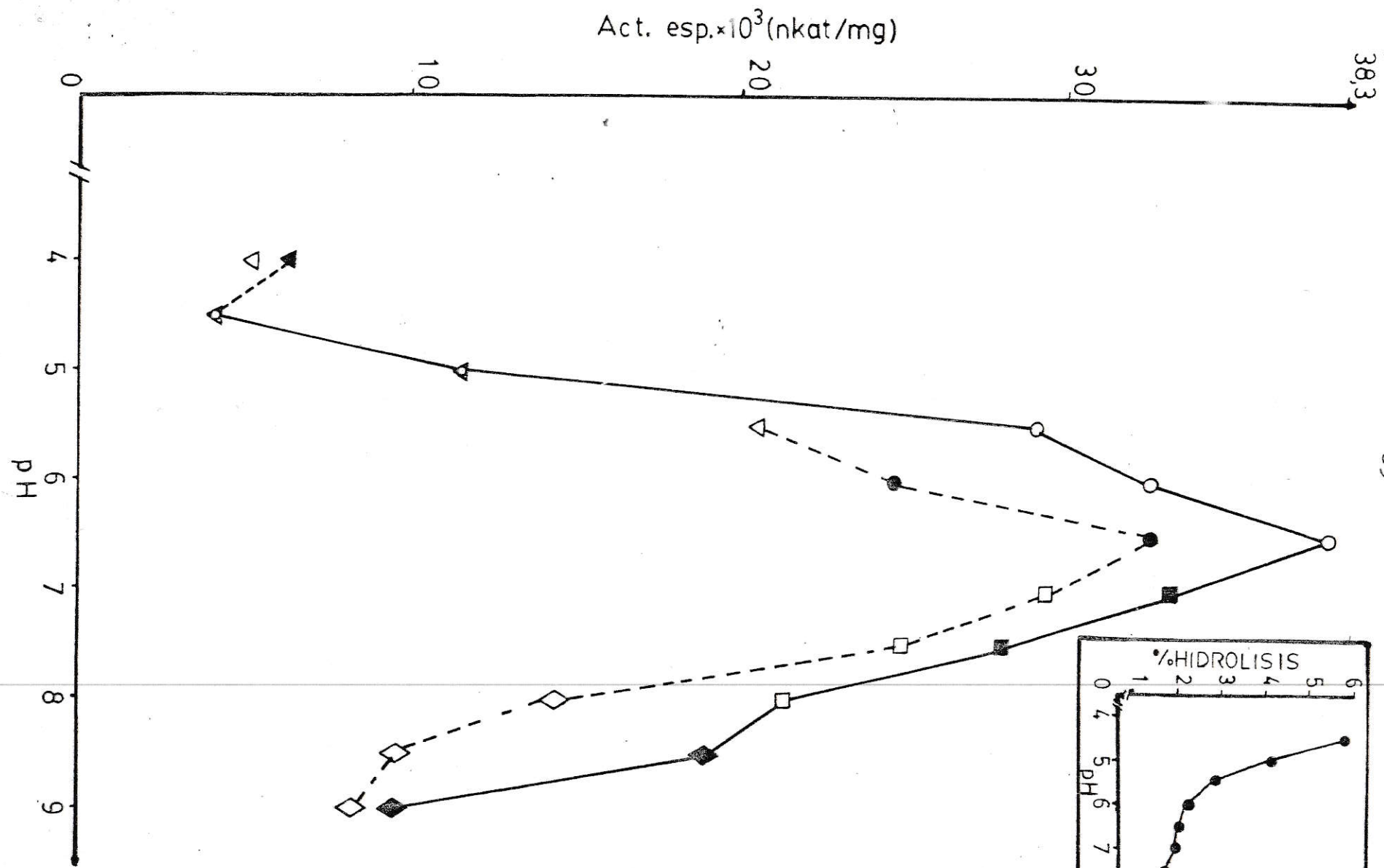
En vista que los pirofosfatos alílicos se hidrolizan no enzimáticamente a pH ácido, se hicieron los respectivos controles para determinar la cantidad de sustrato (GPP) que se consumía por dicho efecto. Los resultados obtenidos indicaron que al pH más ácido - la saturación de la enzima cambió de 98,6% a 98,5%. El otro sustrato de la enzima, el IPP se sabe que es muy poco hidrolizado en medio ácido, por lo tanto su concentración fué aproximadamente constante en todo el rango de pH estudiado.

A pesar de que el extracto usado como fuente de enzima, contiene actividad fosfatásica (sección 2.4)

FIGURA 23

EFEECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA C₁₅-PRENILSINTETASA -
DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

0,06 mg/ml de proteínas de un extracto acuoso, se incubó a 37° durante 30 min en un medio que contenía 2-mercaptoetanol 20 mM; MgCl₂ 6 mM; GPP 10 μM; [1-¹⁴C]IPP 50 μM (radiact. esp. 2,4x10⁶ dpm/μmol) y uno de los siguientes amortiguadores a 150 mM: Formiato pH 4,0 (▼), acetato pH 4,0-4,5-5,0- o 5,5 (▽), succinato pH 4,5-5,0-5,5-6,0 o 6,5 (○), MES pH 6,0 o 6,5 (●), fosfato pH 7,0 o 7,5 (■), TES pH 7,0-7,5 o 8,0 (□), Tris-HCl pH 8,0-8,5 o 9,0 (◇) o Glicina-NaOH pH 8,5 o 9,0 (◆). La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. Se determinó la actividad específica de la enzima a los pH en los cuales se obtuvo la mayor velocidad de condensación del [1-¹⁴C]IPP con el GPP. Se midió la radiactividad proveniente del [1-¹⁴C]IPP en los respectivos alcoholes alílicos reordenados de 15 at de C. - Para cada valor de pH se descontó la actividad IPP-isomerásica donde fué apreciable, la hidrólisis no enzimática del GPP y la enzimática de ambos sustratos. El recuadro muestra el % de hidrólisis no enzimática del [1-³H]GPP en todo el rango de pH estudiado. La figura con líneas punteadas corresponde al perfil de pH por los valores mínimos de actividad en cada pH analizado.



el consumo de sustratos por efecto de esta enzima -
fué despreciable en todo el rango de pH en que fué a
nalizada la actividad prenilsintetásica.

Además en el extracto enzimático está presente la
actividad IPP-isomerásica (sección 2.2) por lo tanto
los resultados presentados en la figura 23 se corri-
gieron respecto a esta actividad, en todo el rango -
de pH estudiado.

2.3.4. Efecto del DTT

Con el fin de determinar la posible participación
de grupos sulfhidrilo en la reacción enzimática, se -
estudió el efecto que podría producir un reactivo re-
ductor. Los resultados de la figura 24 indican que -
el DTT produjo un incremento en la actividad, a con-
centraciones inferiores a 10 μM (28% máxima activa-
ción), pero a concentraciones por encima de 30 μM no
tuvo efecto.

2.3.5. Efecto del DTNB

El DTNB produjo un leve efecto activador hasta con-
centraciones de 10 μM . Por encima de este nivel ac-
tuó como un inhibidor de la actividad, con una $I_{0,5}$
de aproximadamente 32 μM (Fig 25).

FIGURA 24

EFFECTO DEL DTT SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA C₁₅-PRENILSINTETASA
DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

La incubación se realizó con 0,06 mg/ml de proteínas del extracto acuoso a 37° y durante 30 min, con concentraciones crecientes de DTT (0-100 µM). El medio de ensayo contenía amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4; MgCl₂ 6 mM; GPP - 10 µM y [1-¹⁴C]IPP 50 µM (radiact. esp. 2,4x10⁶ dpm/µmol). La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. La IPP-isomerasa a las condiciones del ensayo fué inactiva. Se determinó la actividad específica de la enzima, midiendo la radiactividad proveniente del [1-¹⁴C]IPP en los respectivos alcoholes alílicos reordenados de 15 at de C.

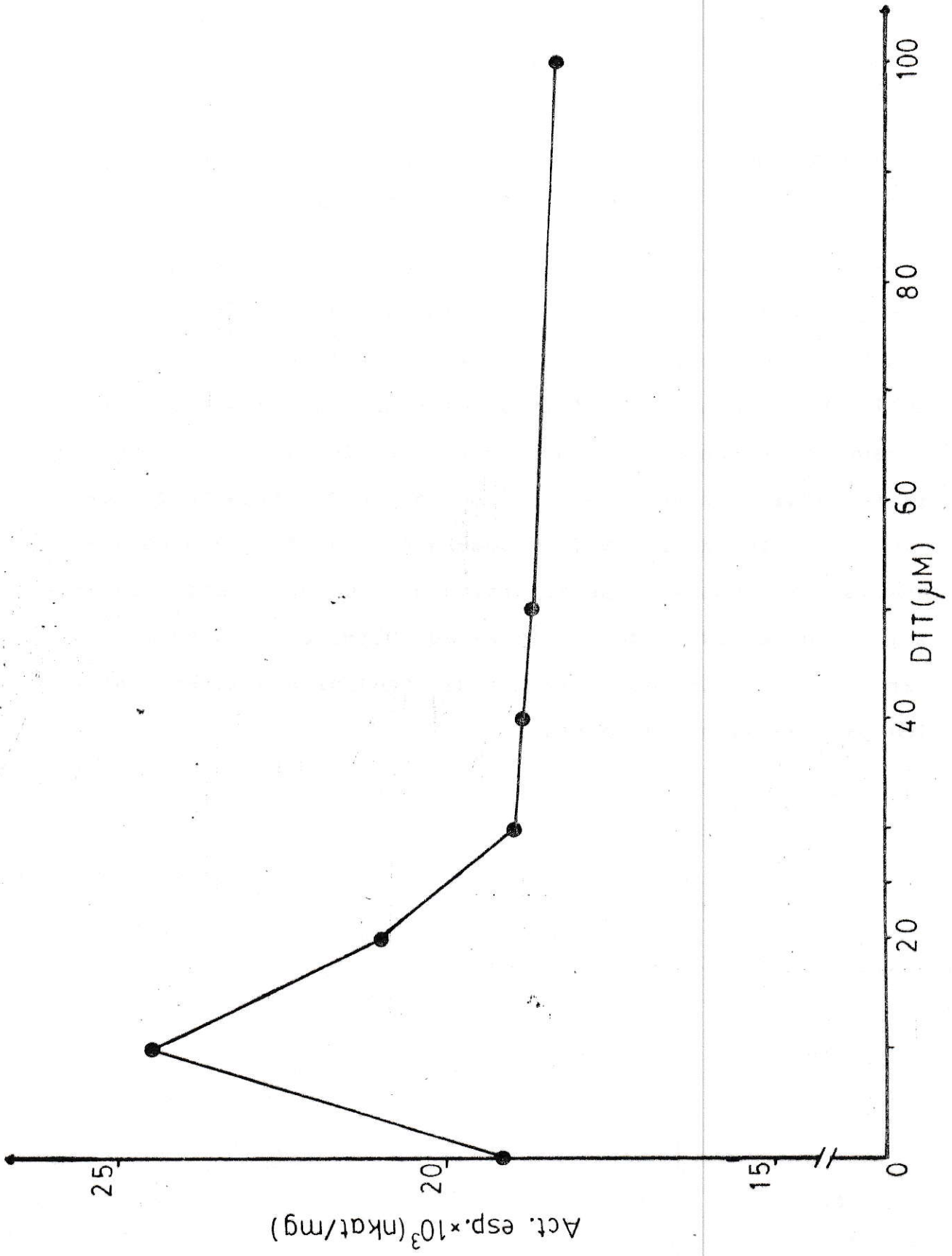
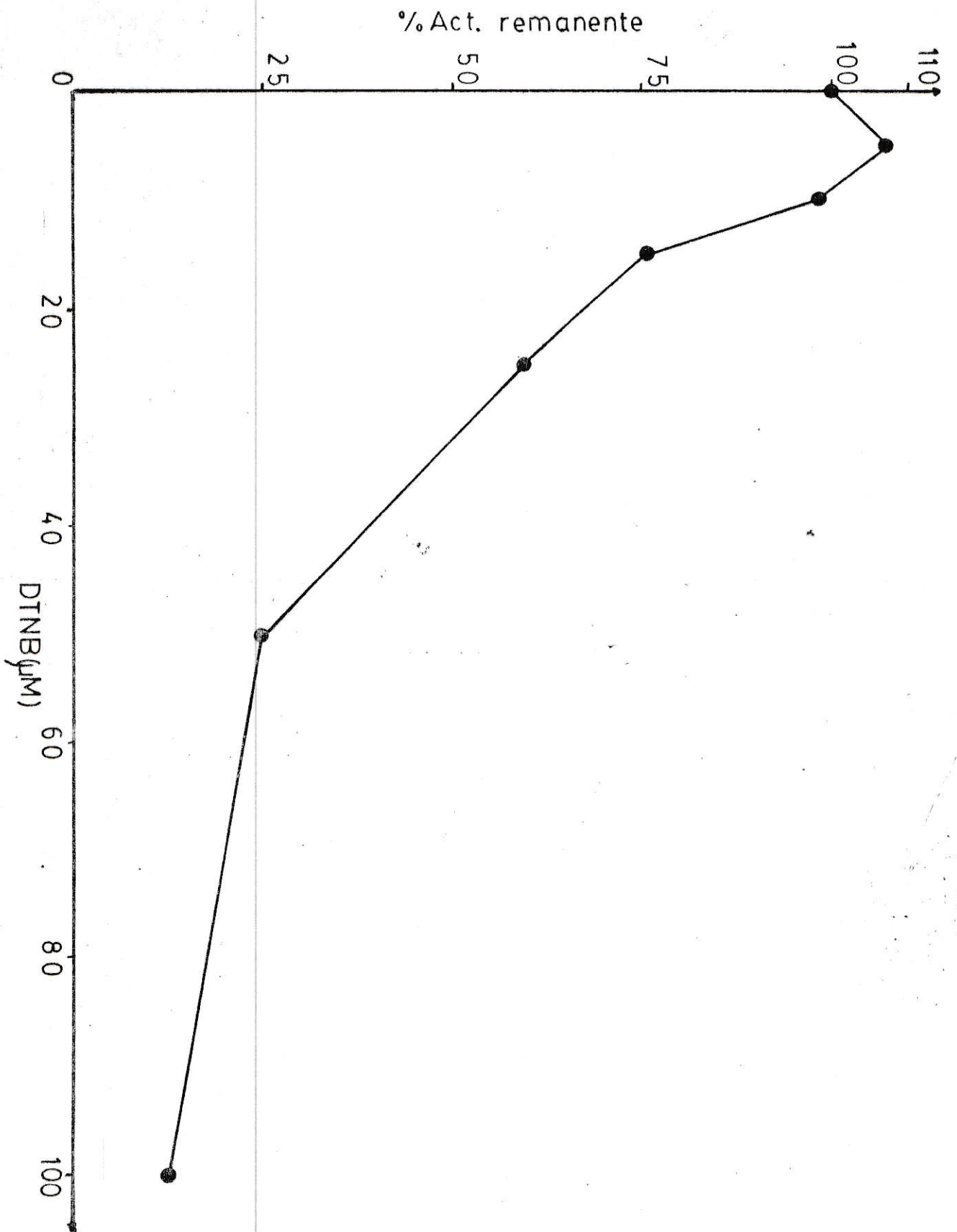


FIGURA 25

EFFECTO DEL DTNB SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA C₁₅-PRENILSINTETASA
DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

La reacción se llevó a cabo a 37° y durante 30 min en un medio que contenía amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4; MgCl₂ 6 mM; GPP 10 μM; [1-¹⁴C]IPP 50 μM (radiact. esp. 2,4x10⁶ dpm/μmol); 0,06 mg/ml de proteínas del extracto enzimático y en presencia de concentraciones crecientes de DTNB (0-100 μM). La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. La IPP-isomerasa a las condiciones del ensayo fué inactiva. Se determinó el % de actividad remanente, a c/u de las concentraciones del DTNB, con respecto al experimento realizado en las mismas condiciones experimentales pero en ausencia de DTNB.



2.3.6. Cinética de inactivación por DTNB

Los experimentos cinéticos de inactivación de la enzima con DTNB se realizaron a 0° , en ausencia de sustratos, usando diferentes concentraciones del reactivo entre 25 y 100 μM . Los resultados de inactivación de la C_{15} -prenilsintetasa del flavado de C. paradisi, por DTNB mostraron que esta enzima presenta un patrón cinético del tipo monofásico en gráficos semilogarítmicos (Fig 26).

En la tabla IX se resumen los $t_{0,5}$ y las constantes cinéticas calculadas a partir de los gráficos semilogarítmicos o las correspondientes ecuaciones.

TABLA IX

CONSTANTES CINÉTICAS Y $t_{0,5}$ PARA LA INACTIVACIÓN A 0° CON --
DTNB DE LA C_{15} -PRENILSINTETASA DE C. PARADISI

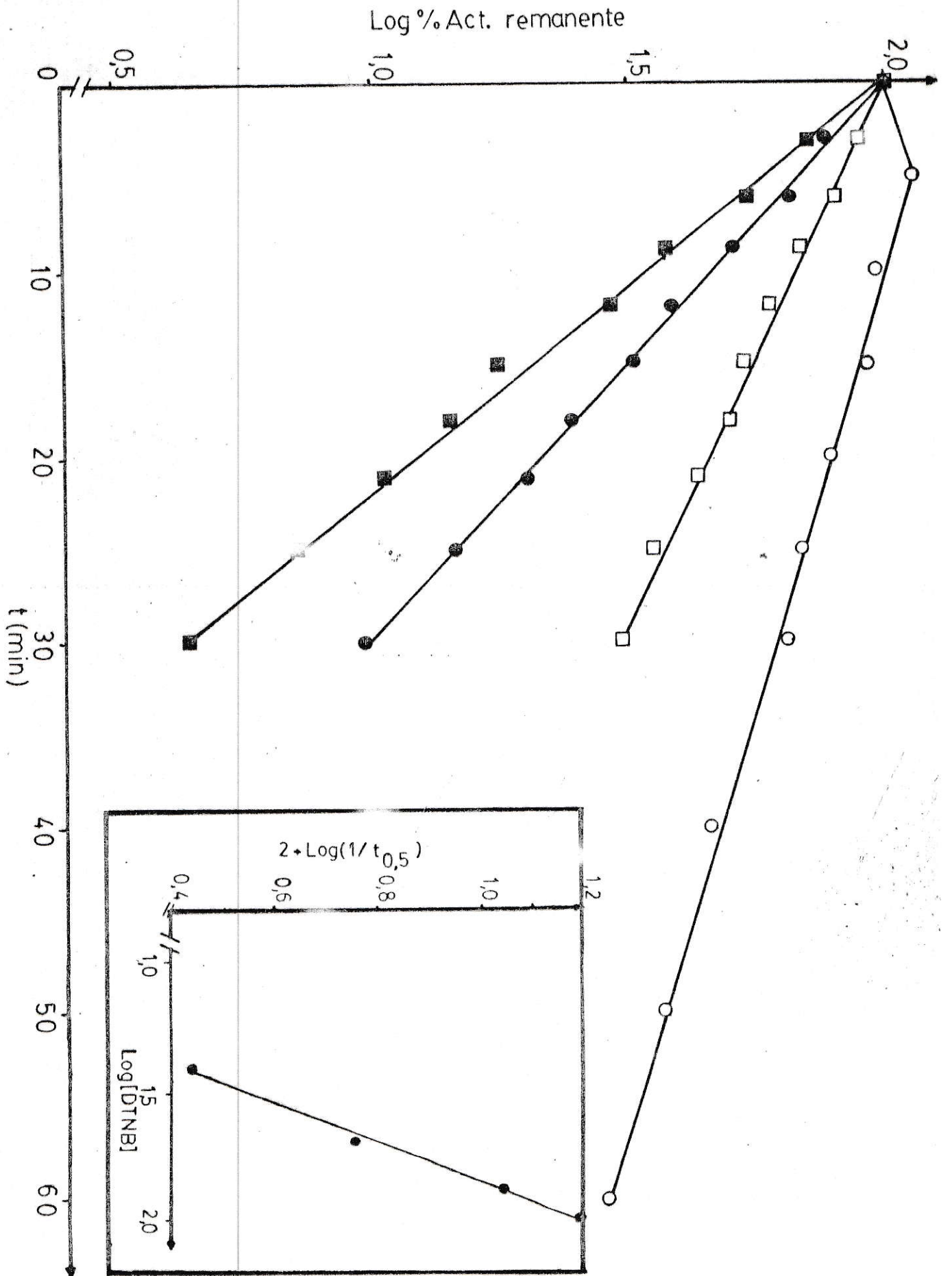
DTNB (μM)	$t_{0,5}$ (seg)	$k_{n=1}$ (seg^{-1})	$k_{n=2}$ ($\text{M}^{-1}\text{seg}^{-1}$)
25	2232	$3,1 \times 10^{-4}$	17,9
50	1032	6,7 "	19,4
75	534	12,9 "	25,0
100	384	18,0 "	26,0

En el recuadro de la figura 26 se muestran el log del inverso de los $t_{0,5}$ de cada experimento de inac-

FIGURA 26

INACTIVACION DE LA C₁₅-PRENILSINTETASA DEL FLAVEDO DE CITRUS
PARADISII CON DTNB

El extracto (0,40 mg/ml de proteínas) se incubó a 0° durante diferentes intervalos de tiempo, en amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4, en ausencia o en presencia de DTNB a las concentraciones indicadas a continuación: 25 µM (○), 50 µM (□), 75 µM (●) o 100 µM (■). La reacción de inactivación se detuvo diluyendo cada alícuota en el medio de ensayo que contenía amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4; MgCl₂ 6 mM; GPP 10 µM y [1-¹⁴C]IPP 50 µM (radiact. esp. 2,4x10⁶ dpm/µmol). La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. La actividad de la IPP-isomerasa fué - despreciable a las condiciones del ensayo. Se determinó el % de actividad remanente, a cada intervalo de tiempo, con respecto al valor inicial de la actividad. Este proceso se hizo para cada concentración de DTNB usada. En el recuadro se dibujó el log del inverso del t_{0,5} obtenido en cada experimento de inactivación, en función del log de las respectivas concentraciones de DTNB.



tivación, en función del log de la respectiva concentración del DTNB. El resultado es una recta de pendiente 1,3, que correspondería al orden de la reacción de inactivación con respecto al DTNB.

2.3.7. Cinética de reversión de la inactivación con DTNB

Debido a que la enzima C_{15} -prenilsintetasa de pomelo fué inactivada por DTNB, se quiso determinar si la inactivación sería reversible o no. Para esto se agregó DTT a una concentración final de 1 mM, a un extracto previamente incubado durante 20 min a 0° -- con $50 \mu\text{M}$ DTNB y en ausencia de sustratos. Se observó que se recuperaba el 90% de la actividad inicial después de 20 min de haber agregado el reactivo reductor. (Fig 27)

2.3.8. Análisis de los productos de la reacción

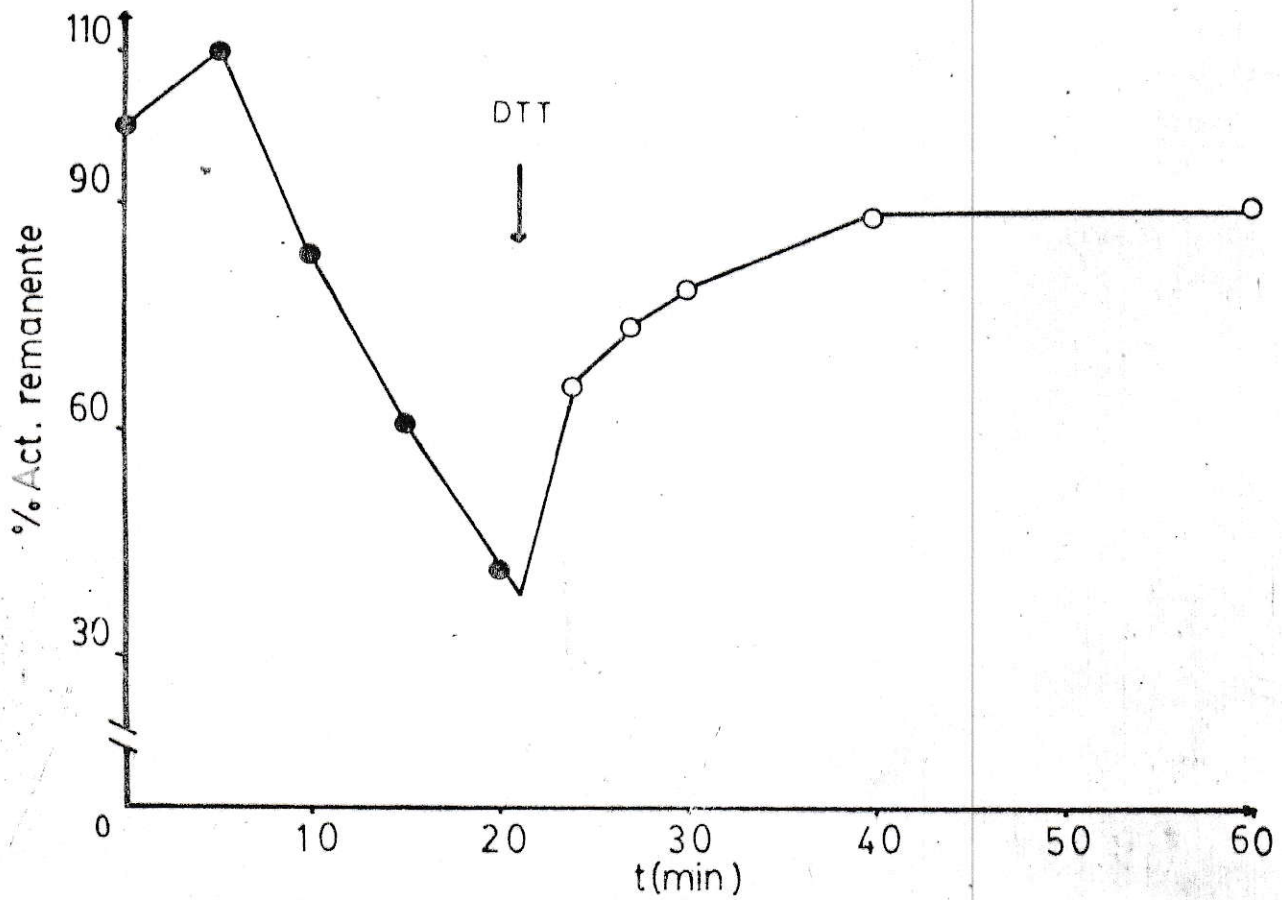
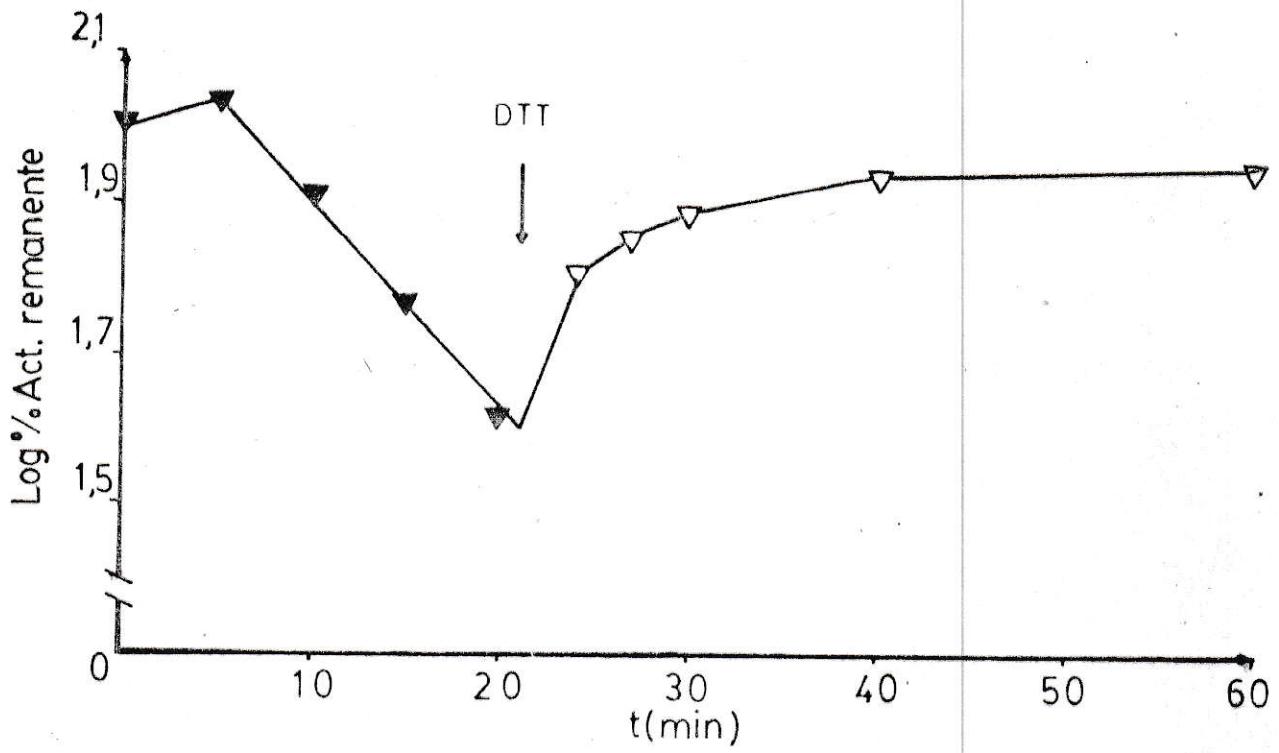
Los productos de la reacción enzimática, catalizada por la C_{15} -prenilsintetasa del flavedo de C. paradisi se analizaron por TLC y por GLC (sección 1.3.1 y 1.3.3).

Para la identificación de los productos se usaron tres criterios analíticos: a) Placas de sílica gel G impregnadas con EGA al 2% en acetona, b) Placas de

FIGURA 27

EFFECTO DEL DTT SOBRE LA REACCION DE INACTIVACION DE LA C₁₅-
PRENILSINTETASA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII CON DTNB

Un extracto acuoso (0,40 mg/ml de proteínas) se inactivó de la misma manera descrita en el experimento de la figura - 26. A los 20 min de inactivación se agregó DTT hasta una -- concentración final de 1 mM. La reacción se detuvo por dilu ción en el medio de ensayo de igual composición que el del - experimento descrito en la figura 26. Se determinó la acti- vidad remanente en el extracto después de agregado el DTT, a - varios intervalos de tiempo. Se expresó como porcentaje, -- respecto a un experimento control. La radiactividad se cuan- tificó por espectrometría de centelleo para líquidos.



sílica gel GF₂₅₄ preparada con solución de AgNO₃ al 12,5% y c) Cromatografía en fase gaseosa, previa sililación (20), y usando columna de SE-30.

En las figuras 28 y 29 se consignan los resultados de los análisis por TLC de productos en presencia de Mg²⁺, y en las figuras 30 y 31 en presencia de Mn²⁺; en la figura 32 se muestran los resultados del análisis de los productos por GLC.

En presencia de Mg²⁺ la C₁₅-prenilsintetasa del - flavado de C. paradisi catalizó la formación de prenilfosfatos de 15 at de C de conformación E o Z (E-FPP y Z-FPP), en tanto que en presencia de Mn²⁺ solamente se produjo el E-FPP, o si se produjo el correspondiente isómero de conformación Z, las cantidades fueron tan pequeñas que no fué posible detectarlo - por las técnicas analíticas utilizadas.

El análisis de los productos por GLC indicó que - en presencia de Mg²⁺ los compuestos de conformación E y Z se formaron en una proporción de 3 a 1.

2.3.9. Purificación y estabilidad

Muchos fueron los intentos para purificar la actividad enzimática, pero los resultados no tuvieron éxito, pues aunque en las etapas en las que se logró

FIGURA 28

ANALISIS POR TLC DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION, EN PRESEN-
CIA DE Mg^{2+} , DE LA C_{15} -PRENILSINTETASA DEL FLAVEDO DE CITRUS
PARADISII

La reacción se llevó a cabo a 37° durante 3 h en un medio -
que contenía amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4; $MgCl_2$ 6
mM; 2-mercaptoetanol 20 mM; GPP 10 μM ; $1-^{14}C$ IPP 50 μM (radi-
act. esp. $2,4 \times 10^6$ dpm/ μmol) y 0,06 mg/ml de proteínas del ex-
tracto enzimático. Los productos de las fosfatasas se reti-
raron por extracción con hexano. La fase acuosa remanente -
se hidrolizó con fosfatasa alcalina de intestino de ternero
a 37° por 2 h. Los productos se extrajeron en hexano y se -
analizaron en placas de sílica gel G impregnadas con EGA
, usando como solvente de desarrollo hexano:acetato -
de etilo=8:2. La radiactividad se cuantificó por espectrome-
tría de centelleo para líquidos. Se encontró radiactividad
asociada a los estándares E-FOH y Z-FOH cuyos R_f fueron 0,46
y 0,56 respectivamente.

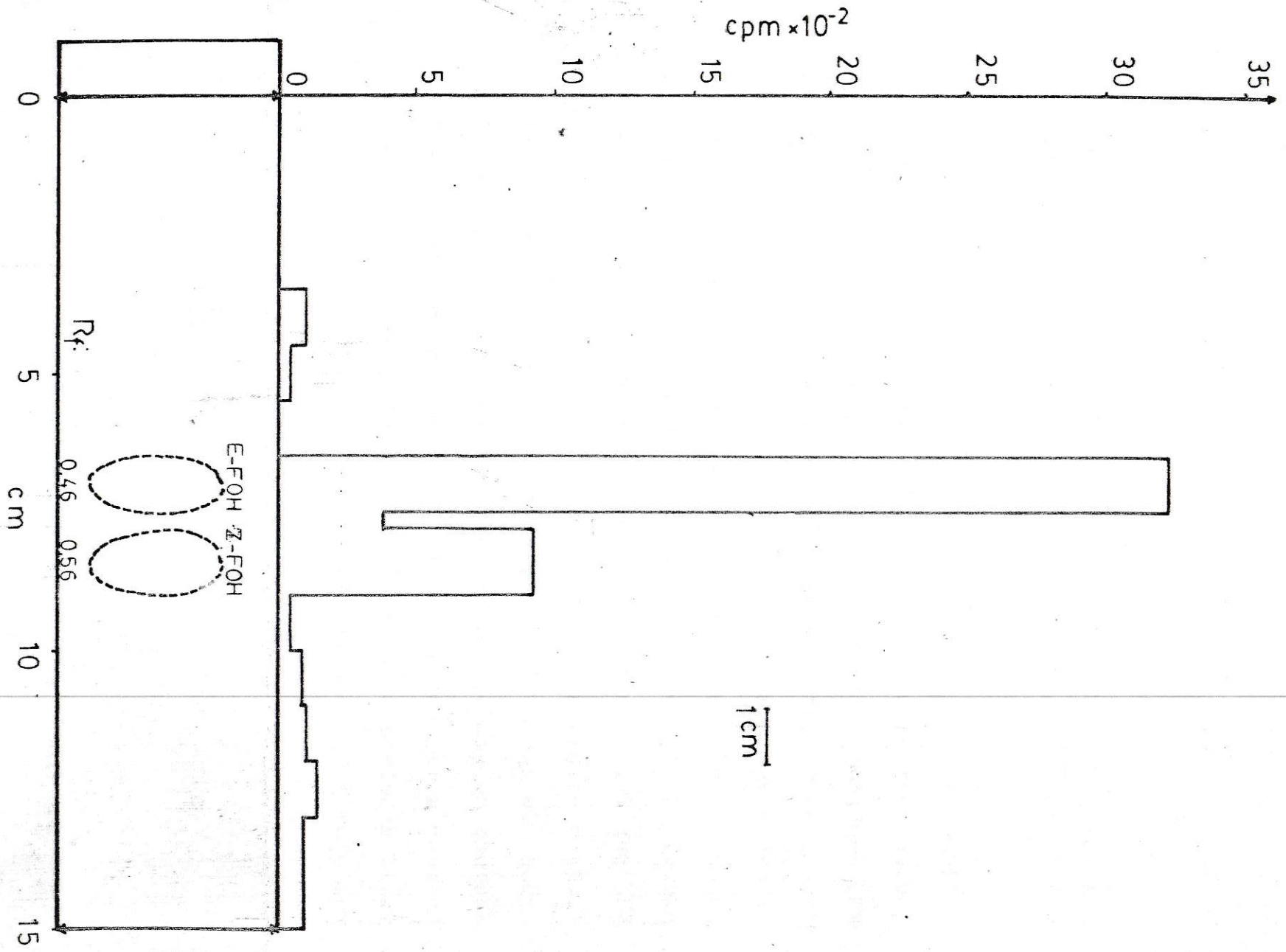


FIGURA 29

ANALISIS POR TLC DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION, EN PRESENCIA DE Mg^{2+} , DE LA C_{15} -PRENILSINTETASA DEL FLAVEDO DE CITRUS PARADISII.

La reacción se llevó a cabo a 37° durante 3 h en un medio que contenía amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4; $MgCl_2$ 6 mM; 2-mercaptoetanol 20 mM; GPP 10 μM ; $[1-^{14}C]$ IPP 50 μM (radiact. esp. $2,4 \times 10^6$ dpm/ μmol) y 0,06 mg/ml de proteínas del extracto enzimático. Los productos de las fosfatásas se retiraron por extracción con hexano. La fase acuosa remanente se hidrolizó con fosfatasa alcalina de intestino de ternero a 37° por 2h. Los productos se extrajeron con hexano y se analizaron en placas de sílica gel GF₂₅₄, preparada con solución acuosa de $AgNO_3$ al 12,5%, usando como solvente de desarrollo acetato de etilo. La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. Se encontró radiactividad asociada a los estándares E-FOH y Z-FOH cuyos R_f fueron 0,41 y 0,51 respectivamente.

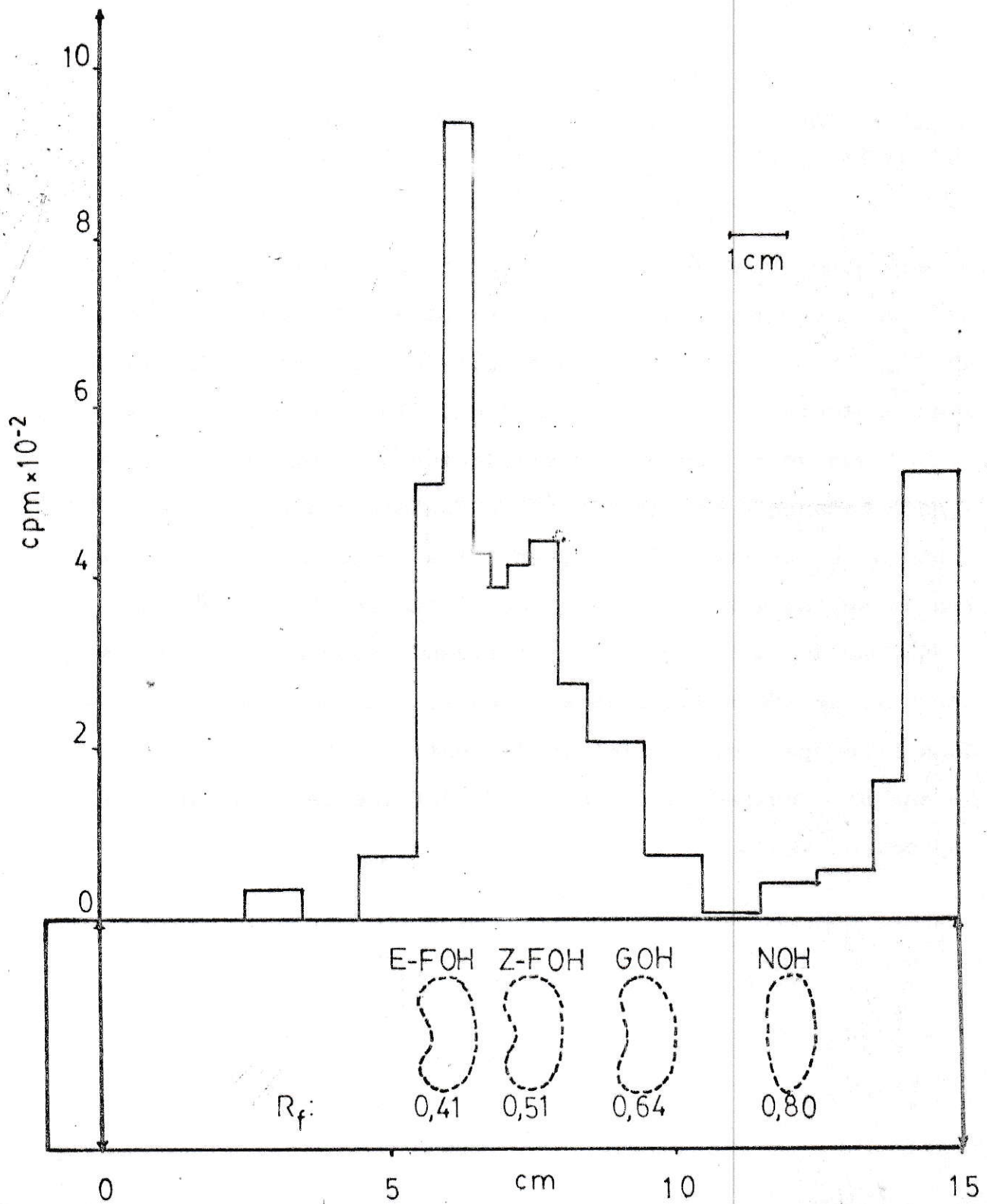


FIGURA 30

ANALISIS POR TLC DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION, EN PRESENCIA DE Mn^{2+} , DE LA C_{15} -PRENILSINTETASA DEL FLAVEDO DE CITRUS PARADISII

Un extracto enzimático (0,06 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° durante 3h en amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4 con $[1-^{14}C]$ IPP 50 μM (radiact. esp. $2,4 \times 10^6$ dpm/ μmol); GPP 10 μM ; 2-mercaptoetanol 20 mM y $MnCl_2$ 4 mM. Los productos de las fosfatasa se retiraron por extracción con hexano. La fase acuosa remanente se hidrolizó con fosfatasa alcalina de intestino de ternero a 37° por 2h. Los productos se extrajeron en hexano y se analizaron en placas de sílica gel G impregnadas con EGA, utilizando como solvente de desarrollo hexano:acetato de etilo=8:2. La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. Se encontró radiactividad asociada únicamente al estándar E-FOH con un R_f de 0,52.

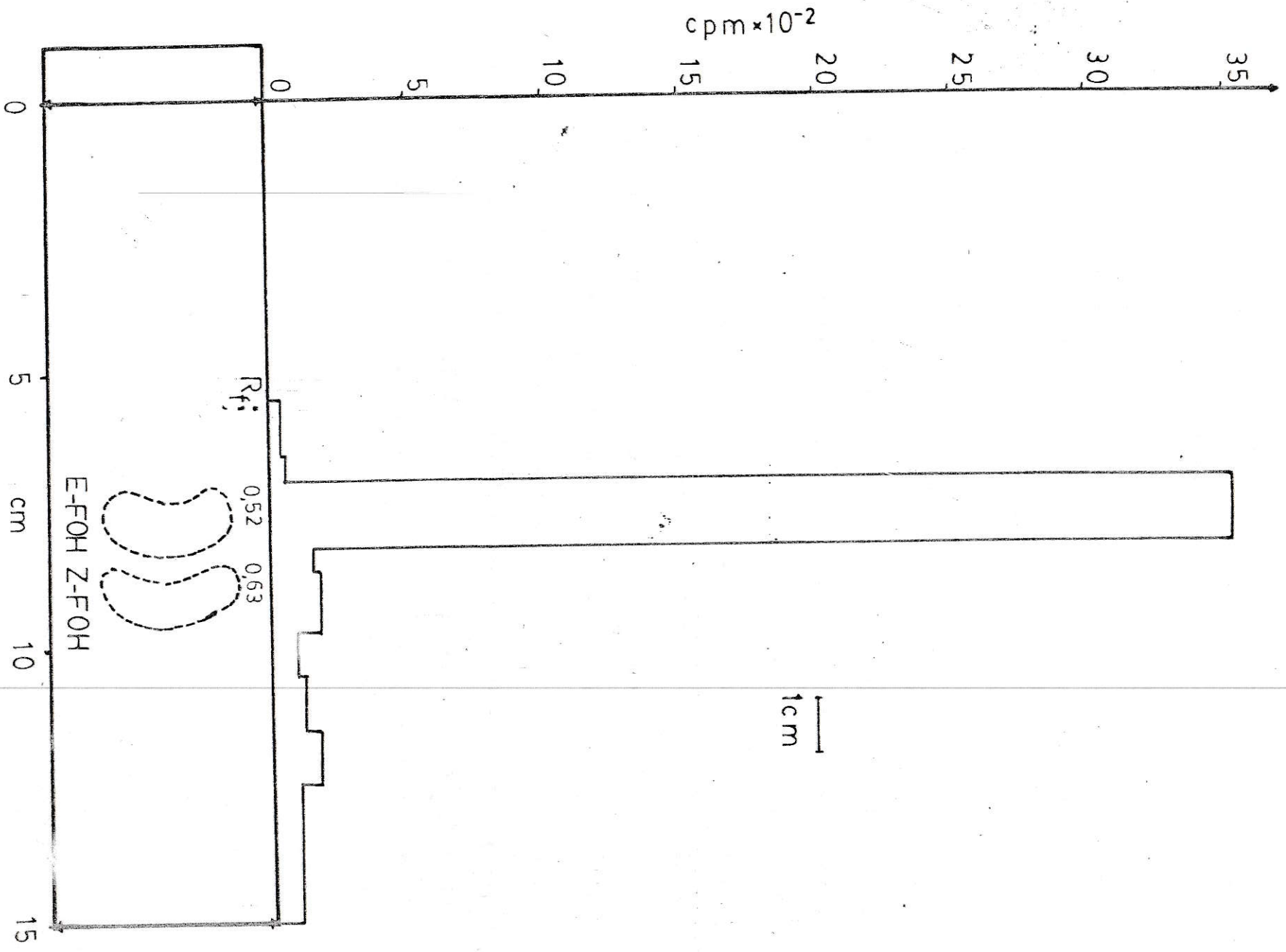


FIGURA 31

ANALISIS POR TLC DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION, EN PRESENCIA DE Mn^{2+} , DE LA C_{15} -PRENILSINTETASA DEL FLAVEDO DE CITRUS PARADISII

La reacción se llevó a cabo a 37° durante 3h, en un medio - que contenía amortiguador de fosfato 100 mM pH 7,4; 2-mercaptoetanol 20 mM; $MnCl_2$ 4 mM; GPP 10 μ M; $[1-^{14}C]$ IPP 50 μ M (radiact. esp. $2,4 \times 10^6$ dpm/ μ mol) y 0,06 mg/ml de proteínas del extracto enzimático. Los productos de las fosfatasas se retiraron por extracción con hexano. La fase acuosa remanente se hidrolizó con fosfatasa alcalina de intestino de ternero a 37° por 2h. Los productos se extrajeron con hexano y se analizaron en placas de sílica gel GF₂₅₄, preparadas con solución acuosa de $AgNO_3$ al 12,5%. La radiactividad se cuantificó por espectrometría de centelleo para líquidos. El solvente de desarrollo fué acetato de etilo. Se encontró radiactividad asociada, únicamente al estándar E-FOH con un R_f de 0,39.

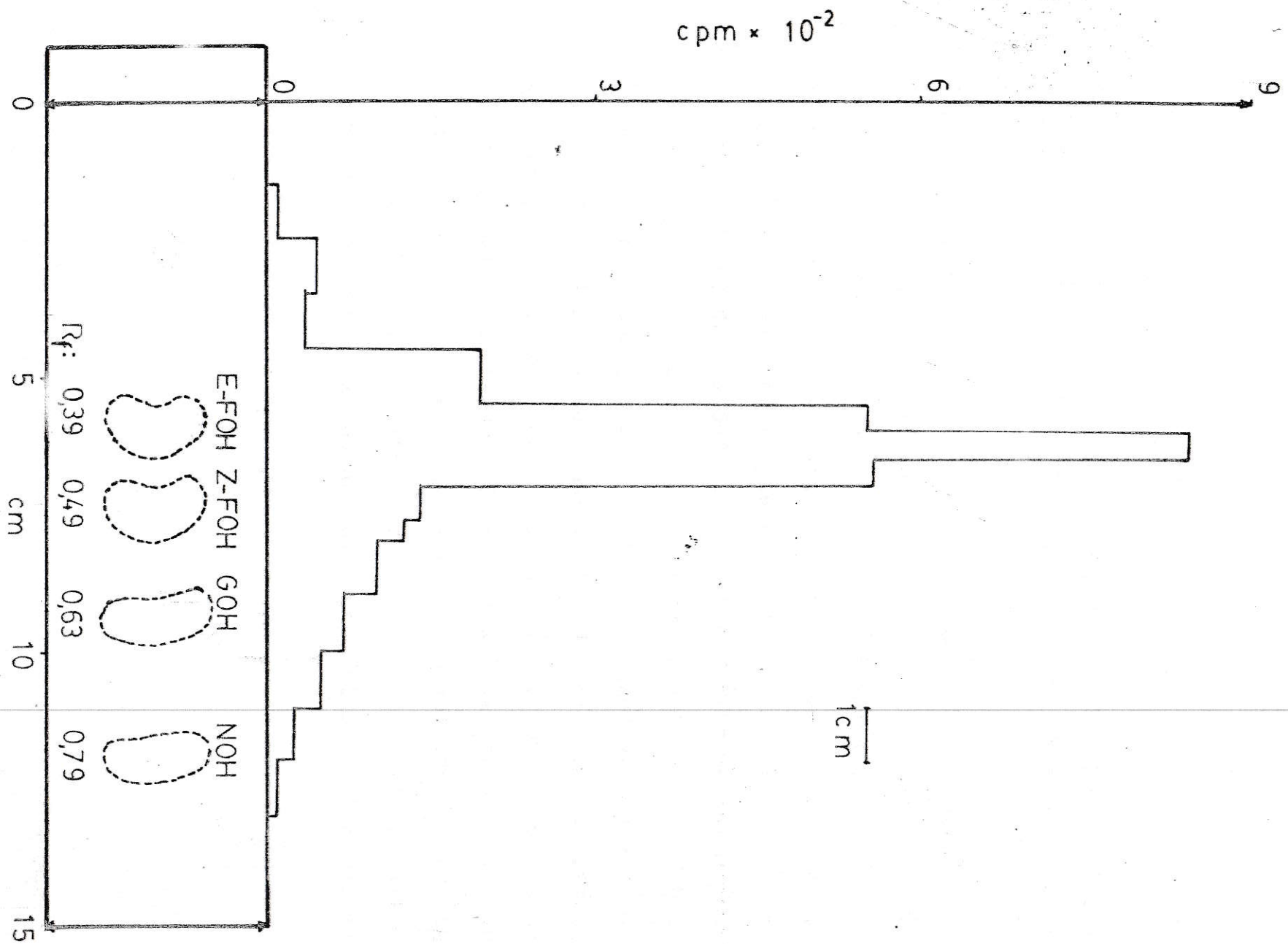
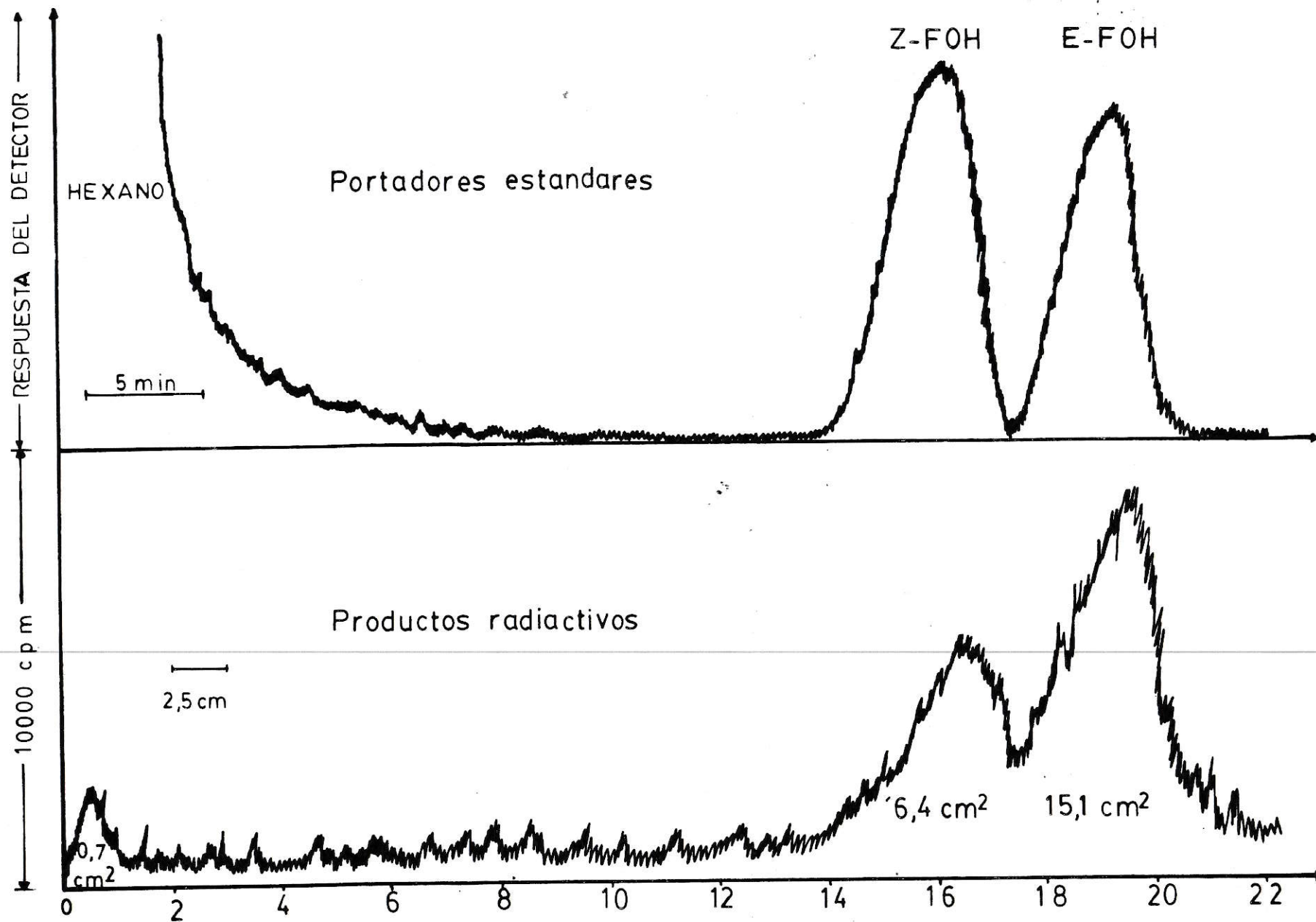


FIGURA 32

ANALISIS POR GLC DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCION, EN PRESEN
CIA DE Mg^{2+} , DE LA C_{15} -PRENILSINTETASA DEL FLAVEDO DE CITRUS
PARADISII

Los productos extraídos en la fase hexánica, después de hidrólisis con fosfatasa alcalina de intestino de ternero, de la fase acuosa proveniente de un experimento similar al descrito en la figura 28, se analizaron por cromatografía en fase gaseosa en las condiciones experimentales que se detallaron en la tabla I para C_{15} (FOH). Los productos sililados se analizaron en el cromatógrafo. La radiactividad se localizó en un contador Geiger para fase gaseosa, acoplado al cromatógrafo. Se encontró radiactividad asociada a los portadores estándares E-FOH y Z-FOH en una proporción de 3 a 1, calculada a partir de las áreas bajo las curvas dibujadas por el canal del inscriptor acoplado al contador proporcional. Las cifras anotadas bajo las curvas indica el área de ellas, que es una medida de la proporción entre ambos diastereoisómeros.



purificarla, la preparación fué muy poco estable.

En la tabla X se resumen los resultados obtenidos al tratar de purificar la enzima por fraccionamiento con sulfato de amonio y en columnas de filtración - con Sephadex G-25.

TABLA X

PURIFICACION Y ESTABILIDAD DE LA ENZIMA C₁₅-PRENILSINTETASA
DEL FLAVEDO DE CITRUS PARADISI

EXP.	ETAPA	ACTIVIDAD (nkat/mg)	%ACT. REC.
I	Extracto fresco	0,016	100,0
	Fracción 0/80 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,004	25,0
	Fracción 0/80 liofilizada:		
	a. Analizada a 0 días	0,002	12,5
	b. Guardada 5 días a -20°	0,001	6,2
II	Extracto fresco	0,041	100,0
	Fracción 40/70 (NH ₄) ₂ SO ₄	0,070	170,7
	Fracción 40/70 dializada(1)	0,044	107,3
	Fracción 40/70 liofilizada	0,002	4,9
III	Extracto fresco	0,021	100,0
	Extracto guardado 5 días a 4°	0,020	95,2
	Extracto liofilizado:		
	a. Analizado a 0 días	0,019	90,5
	b. Guardado 5 días a -20°	0,020	95,2
	c. Guardado 15 días a -20°	0,018	85,7
IV	Extracto fresco	0,025	100,0
	Eluido columna G-25:		
	a. Analizado a 0 días	0,053	212,0
	b. Guardado 1 día a 4°	0,047	188,0(88,7)
	c. Guardado 2 días a 4°	0,029	116,0(54,7)

- (1) La diálisis se llevó a cabo contra amortiguador de fosfato 100 mM, mercaptoetanol 10 mM y EDTA 2 mM en un volumen de 200 veces el volumen del extracto a dializar y a 4° durante 30 min y por tres veces consecutivas.
- Las cifras entre paréntesis significan el % de actividad con respecto al eluido de la columna analizado a 0 días.

2.4. ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA

El estudio de las actividades fosfatásicas presentes en el sistema enzimático extraído del flavedo de C. paradisi se dividió en dos etapas según el sustrato que se utilizó, de tal forma que se estudiaron las actividades de la pirofosfatasa inorgánica y de la prenilfosfatasa, usando como sustratos el pirofosfato inorgánico y el $[1-^3\text{H}]\text{GPP}$ respectivamente.

2.4.1. Actividad de la pirofosfatasa inorgánica

2.4.1.1. Condiciones de ensayo

La cantidad de fósforo inorgánico (Pi) liberado por la acción de la pirofosfatasa del flavedo de pomelo fué función lineal de la concentración de proteínas hasta los 0,08 mg/ml. Se observaron velocidades iniciales por lo menos hasta los 15 min (Fig 33 A y B).

2.4.1.2. Efecto de la concentración del sustrato

La actividad pirofosfatásica presentó un patrón hiperbólico Michaeliano normal con una V_{max} de -- 0,71 μkat a 10 mM PPI y una K_m de 1,7 mM (Fig 34).

FIGURA 33

ACTIVIDAD DE LA PIROFOSFATASA INORGANICA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

En A se muestran los resultados del efecto de la concentración de las proteínas del extracto del flavedo de C. paradisi, cuando se incubaron cantidades crecientes del extracto (0-0,3 mg/ml de proteínas) en un medio que contenía amortiguador de succinato 100 mM pH 6,0 y PPI 10 mM, en un baño a 37° durante 10 min. Se determinó la velocidad de hidrólisis del PPI, midiendo el fósforo liberado por acción de las fosfatasas, por el método de Fiske y Subba Row.

En B se muestran los resultados obtenidos al incubar un extracto acuoso (0,03 mg/ml de proteínas) a 37° por diferentes intervalos de tiempo, en un medio que contenía amortiguador de succinato 100 mM pH 6,0 y PPI 10 mM. La cantidad del Pi liberado por la hidrólisis enzimática del PPI se determinó por el método de Fiske y Subba Row.

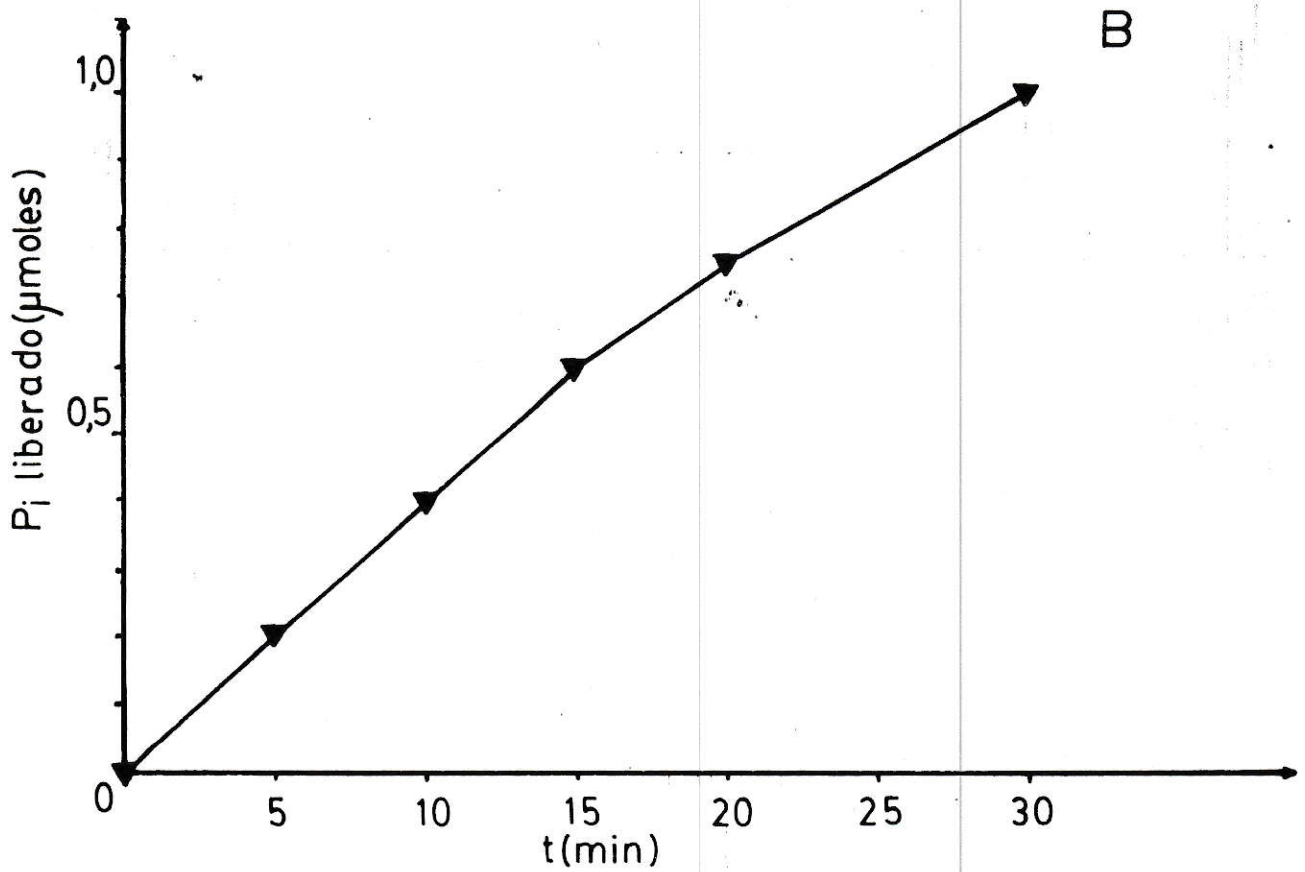
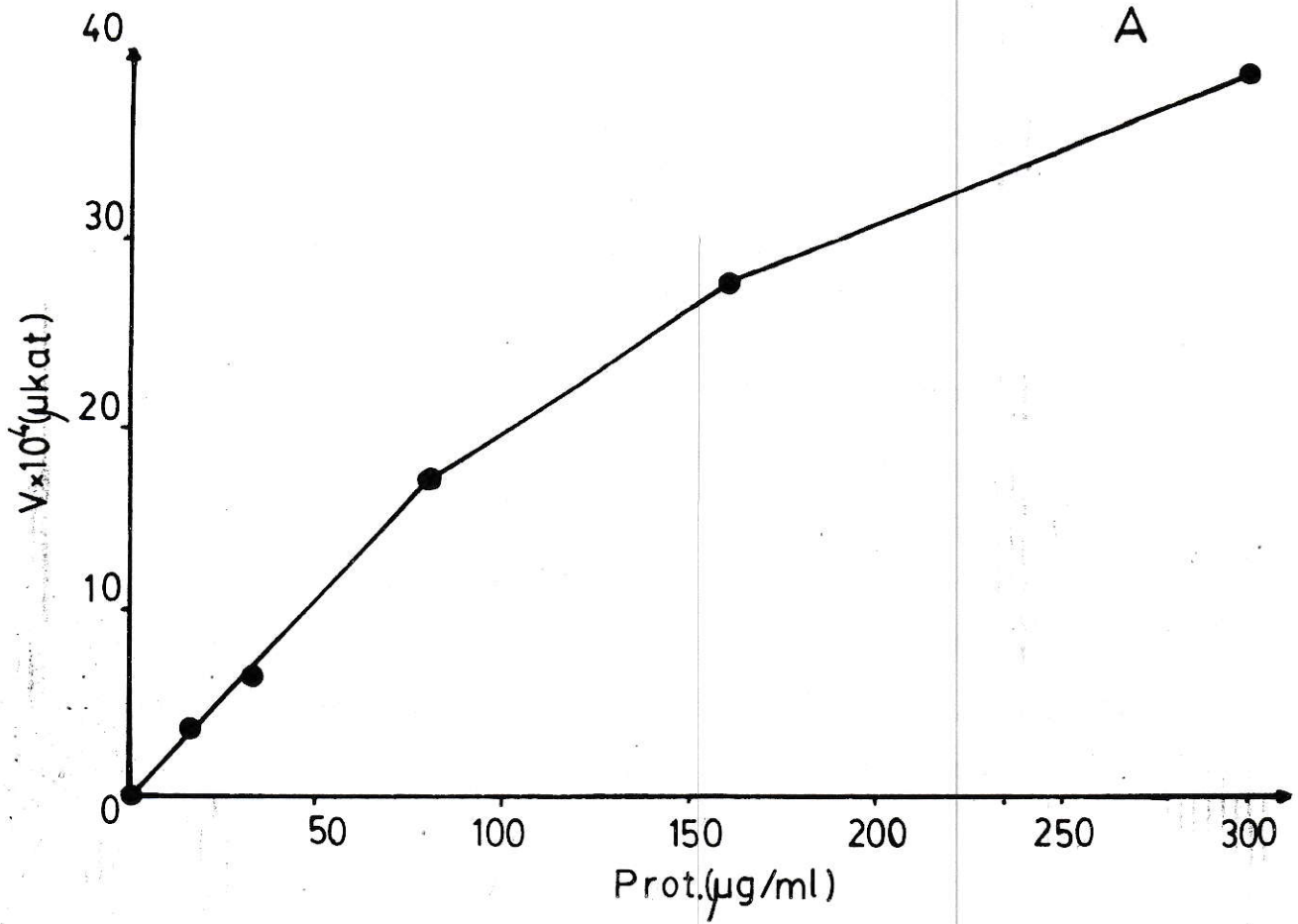
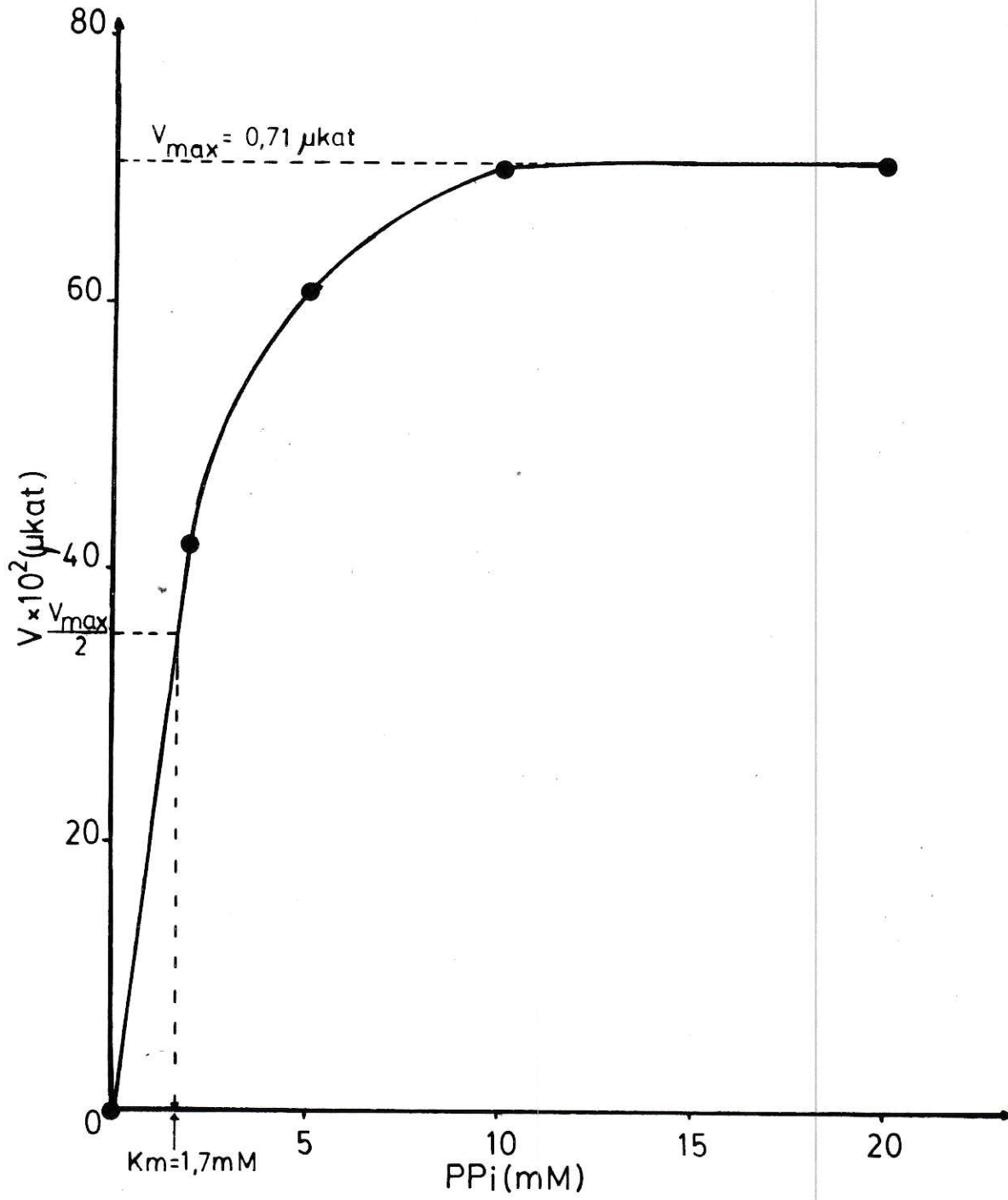


FIGURA 34

EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO, SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PIROFOSFATASA INORGANICA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

El extracto acuoso (0,03 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° por 10 min, en un medio que contenía amortiguador de succinato 100 mM pH 6,0 y PPI a concentraciones crecientes entre 0 y 20 mM. La velocidad de la reacción se determinó, midiendo el producto de la reacción por el método de Fiske y - Subba Row. Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de la curva michaeliana obtenida.



2.4.1.3. Efecto del metal bivalente y EDTA

El Mg^{2+} a una concentración de 5 mM inhibió en un 10% la actividad de la pirofosfatasa de Citrus paradisi.

El EDTA no afectó la actividad hasta una concentración de 20 mM a pH 6,0.

2.4.1.4. Efecto del Fluoruro (F^-)

El fluoruro de potasio (KF) a una concentración de 27 mM inhibió en un 50% la actividad de la pirofosfatasa de pomelo (Fig 35).

2.4.1.5. Especificidad por el sustrato

La fosfatasa presente en el extracto del flavo-
do de C. paradisi presentó una amplia especificidad por el sustrato, aunque su mayor actividad la tuvo con PPI.

En la tabla XI se resumen los resultados de la actividad fosfatásica para varios sustratos, referidos a la actividad de la pirofosfatasa inorgánica, todos a una misma concentración de 10 mM.

FIGURA 35

EFEECTO DEL FLUORURO (F^-) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PIROFOSFATASA INORGANICA DEL FLAVEDO DE C. PARADISII

La reacción se llevó a cabo a 37° durante 10 min, en un medio que contenía amortiguador de succinato 100 mM pH 6,0 y PPI 10 mM y 0,03 mg/ml de proteínas del extracto enzimático. La actividad se ensayó a concentraciones crecientes de KF entre 0 y 90 mM. La actividad remanente se determinó, cuantificando el producto de la reacción por el método de Fiske y Subba Row.

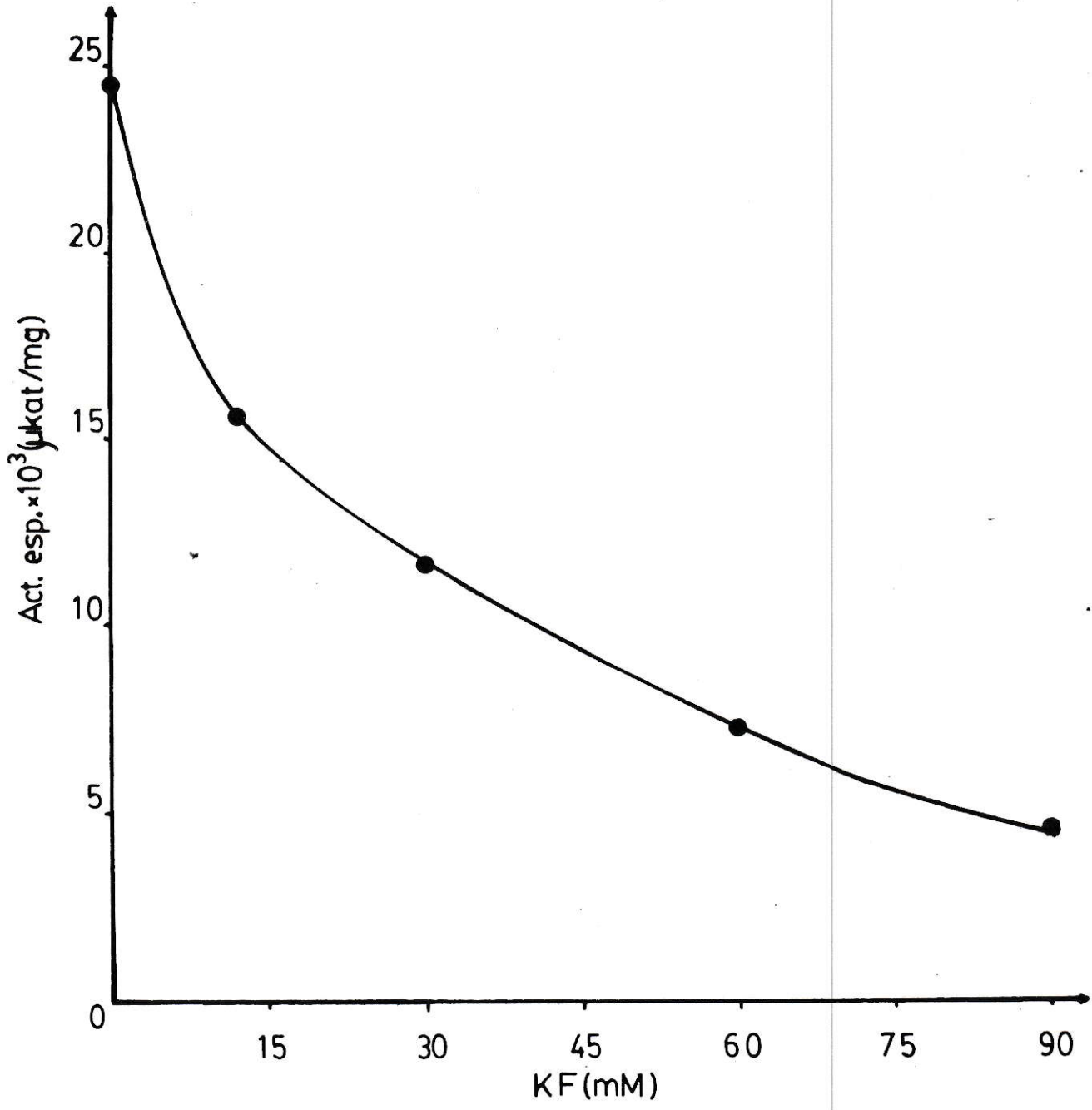


TABLA XI

ESPECIFICIDAD POR EL SUSTRATO DE LA FOSFATASA DEL FLAVEDO DE
CITRUS PARADISII

SUSTRATO	% ACTIVIDAD
PPi	100,0
p-Nitrofenilfosfato	62,2
ATP	46,3
AMP	16,2

2.4.1.6. Estabilidad del sistema enzimático

La actividad pirofosfatásica del extracto permaneció estable en un 100%, cuando se la guardó hasta 20 días a 4°.

2.4.2. Actividad de la prenilfosfatasa

2.4.2.1. Condiciones de ensayo y estabilidad

La actividad GPPasa fué función líneal de la concentración de proteínas hasta los 0,08 mg/ml, y durante 20 min de reacción.

El extracto acuoso retuvo el 95% de su actividad original al cabo de 10 días de guardado a 4°.

2.4.2.2. Curva de Mg^{2+}

El ión Mg^{2+} incrementó en un 5% la actividad de la prenilfosfatasa a concentraciones inferiores a 1 mM, mientras que a niveles superiores inhibió su actividad.

2.4.2.3. Efecto del DTNB

Una concentración de 50 μM DTNB inhibió en un 17% la actividad de la GPPasa, mientras que 100 μM DTNB inhibieron un 23%.

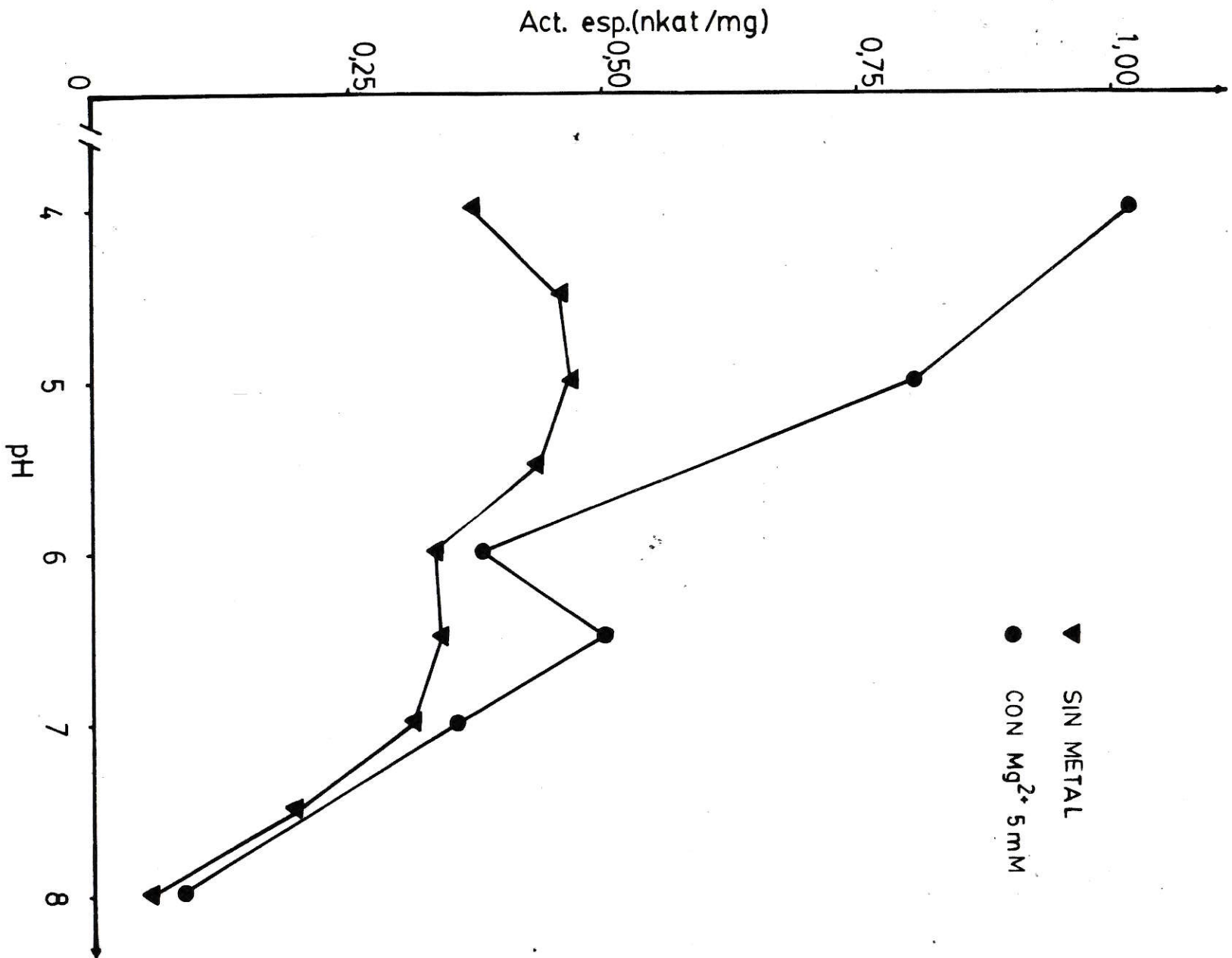
2.4.2.4. Curvas de pH

La actividad de la GPPasa tuvo un perfil de pH con un máximo a pH 5,0, pero en la figura 36 se observa otro leve máximo a pH 6,5. Pensando que tal vez este segundo máximo fuera realmente una actividad diferente a la correspondiente en pH 5,0, se hizo un experimento en presencia de Mg^{2+} 5 mM, ya que las fosfatasas alcalinas requieren de metal bivalente(42,92). El resultado se muestra también en la figura 36 y se observó que el Mg^{2+} incrementó en un 50% la actividad de la enzima correspondiente al valor de pH 6,5, precisamente en el punto donde se presentó el segundo máximo.

FIGURA 36

EFFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PRENILFOSFATASA DEL - FLAVEDO DE C. PARADISII

El extracto acuoso (0,06 mg/ml de proteínas) se incubó a 37° durante 10 min, en un medio que contenía [1-³H] GPP 0,2 mM (radiact. esp. $2,9 \times 10^7$ dpm/ μ mol) y distintos amortiguadores a diferentes pH. Se usaron los siguientes: Acetato o formiato pH 4,0; acetato o succinato pH 4,5-5,0 o 5,5; succinato o MES pH 6,0 o 6,5; fosfato o TES pH 7,0 o 7,5; TES o Tris-HCl pH 8,0 o Tris-HCl o Glicina-NaOH pH 8,5 o 9,0. Los resultados que se muestran en la figura, para cada valor de pH, son el valor promedio de los datos obtenidos con los dos amortiguadores. El mismo experimento se repitió, en presencia de Mg²⁺ 5 mM. La actividad específica de la enzima se determinó cuantificando los alcoholes radiactivos por espectrometría de centelleo para líquidos.



Al igual que en la sección 2.3.3, se realizaron los controles no enzimáticos para la hidrólisis ácida del GPP. Los resultados obtenidos indicaron que a las condiciones del ensayo se obtuvo un máximo de hidrólisis ácida a pH 4,0 del GPP de 2%. - Por lo tanto la concentración de dicho sustrato se considera aproximadamente constante en todo el rango de pH estudiado.

3. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Un sistema enzimático extraído del flavado de Citrus paradisi forma a partir de $[2-^{14}\text{C}]$ MVA los intermediarios fosforilados PMVA, PPMVA, IPP como también los prenilpirofosfatos de 5, 10 y 15 at de C. Su identificación indica que estos compuestos se forman en la vía isoprenoide, y que éste al igual que C. sinensis (29,47) y P. radiata (14,114) tiene algunas etapas en común con la biosíntesis del escualeno (16) y del caucho (7) (Esquema 1). Las enzimas responsables de la trayectoria no fueron estudiadas individualmente, pero se puede inferir su presencia por la identificación de sus productos. En consecuencia, el sistema enzimático de C. paradisi comprende: Quinasa mevalónica, quinasa fosfomevalónica, descarboxilasa pirofosfomevalónica, IPP-isomerasa, C_{10} y C_{15} prenilsintetasas. Además se determinó la presencia de una prenilfosfatasa inespecífica, responsable de la aparición de IP, compuesto identificado por Chesterton y Kekwick (25), como también de la fracción LL cuantificada en algunos ensayos.

Las propiedades de las enzimas del flavado de C. paradisi que transforman el MVA en terpenoides de 5, 10 y 15 at de C, son algo diferentes a las de enzimas análogas descritas en otros organismos (14,47,55,65,93,118).

El sistema enzimático requiere de la presencia de un ión -

metálico bivalente. El Mn^{2+} es el metal más efectivo, seguido del Mg^{2+} y Co^{2+} ; no hay incorporación con Ca^{2+} (Fig 4). - La diferencia de efectividad de los metales puede ser interpretada como un efecto sobre las distintas enzimas que participan en la secuencia de reacciones a partir de MVA. Las - quinazas, descarboxilasa, IPP-isomerasa y prenilsintetasas - presentan diferentes requerimientos de metal. La mayoría de las quinazas reportadas requieren de Mn^{2+} en preferencia al Mg^{2+} (15,114,118); algunas IPP-isomerasas también prefieren el Mn^{2+} al Mg^{2+} (11,55); mientras que las prenilsintetasas - son más efectivas con Mg^{2+} (35,38,50,54) y solamente una, la de C. sinensis (35) presenta actividad con Co^{2+} . Otro factor que podría explicar la diferencia de efectividad del Mn^{2+} respecto al Mg^{2+} y al Co^{2+} es el hecho que el sistema enzimático usado fué un extracto crudo y allí podrían existir otras proteínas u otros ligandos que tuvieran afinidad en orden de creciente por el Co^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} . Como consecuencia, disminuiría la cantidad de metal libre y por lo tanto la oportunidad de intervenir en las reacciones enzimáticas.

En el medio de ensayo está presente el ATP como sustrato de las quinazas, y como se sabe que este compuesto forma complejos con los metales bivalentes (84), es posible que estos sean más estables que los de los otros sustratos en las condiciones del ensayo, disminuyendo también la disponibilidad de metal libre. La muy baja incorporación de MVA, en ausen-

cia de metal, señala que las preparaciones enzimáticas prácticamente no contienen metal bivalente endógeno.

La actividad de la IPP-isomerasa fué independiente de la presencia de cualquier metal bivalente, y se pensó que este resultado se debía a la presencia de metales endógenos en el extracto. La ausencia de incorporación y de actividad de C_{15} -prenilsintetasa, en ausencia de metal, demostró que el extracto no contenía metales que pudieran intervenir como cofactores. Se comprobó la no participación de metal en la reacción de la isomerasa, al obtener la misma actividad en ausencia o en presencia de metal o EDTA, tanto con extracto crudo como con extractos tratados con Chellex 100 o filtrados a través de una columna con Sephadex G-25. Es esta la primera IPP-isomerasa independiente de metal que se describe.

Los experimentos realizados para determinar el pH óptimo de la IPP-isomerasa (Fig 18), confirman que esta enzima es independiente de la presencia del metal bivalente. Se obtiene el mismo pH óptimo de 5,0 en amortiguador de acetato o succinato 150 mM, tanto en ausencia como en presencia de Mg^{2+} 2,5 mM.

La concentración de ATP requerida para obtener la máxima incorporación de MVA tuvo relación con la concentración de M^{2+} presente en el medio. Para Co^{2+} el cociente ATP/Co^{2+} -- fué de 1, mientras que para Mg^{2+} o Mn^{2+} fué de 2. Cocientes

más altos ocasionaron una inhibición de la incorporación. - En cambio, en Pinus (14) y en C. sinensis (47) el cociente ATP/M^{2+} fué de 2 para los tres metales mencionados. La diferencia entre los cocientes ATP/M^{2+} podría explicarse como un efecto producido por una diferencia entre la unión de los metales con proteínas u otros ligandos presentes en el extracto con el ATP, pues las constantes de formación de los complejos $[\text{ATP-M}]^{n-}$ son del mismo orden de magnitud para los tres metales utilizados (84, 108).

El fluoruro (F^-), en presencia de Mg^{2+} inhibe la incorporación de MVA a nivel de todas las tres fracciones analizadas (Fig 8), mientras que en presencia de Mn^{2+} (Fig 9) este anión solamente inhibe las fosfatasas y actúa como un activador en la síntesis de los prenilpirofosfatos. Efectos inhibitorios del F^- también se han reportado para otras enzimas, tales como α -quimotripsina (61), fosfatasa de *E. coli* y levadura (74), etc. Esto puede ser explicado en base a lo observado en la enolasa de levadura. Meyerhof (75) señala que la inhibición se debe a que el F^- en presencia de fosfato, forma un complejo con el Mg^{2+} , el fluorofosfato de magnesio, descrito por Massart (74). Este desplaza al Mg^{2+} de su unión con la enzima y actúa como inhibidor competitivo. Además a mayor concentración de Mg^{2+} es menor la concentración de F^- ($I_{0,5}$) necesaria par inhibir en un 50% la actividad de la enziam. Como la incorporación de MVA fué dependiente de

la presencia de Mn^{2+} o Mg^{2+} (Fig 4) y además se comprobó que el extracto contiene fosfato inorgánico libre (sección 7.4.2) es posible que el efecto retardador se deba a un drenaje del metal por parte del anión, como consecuencia de la formación del complejo fluorofosfato de magnesio o manganeso (74). Además este complejo actuaría como inhibidor competitivo, desplazando al metal de su unión con la o las enzimas.

El efecto activador de la incorporación de MVA, debida al F^- , en presencia de Mn^{2+} a nivel de las fracciones AA y PP (Fig 9), se explicaría en base a que este anión inhibe la actividad fosfatásica del sistema (Figs 8,9), al igual que en C. sinensis (47,83) y P. radiata (14). Como consecuencia, se permitiría una mayor acumulación de prenilpirofosfatos, que se cuantifican tanto en la fracción AA como en PP.

El efecto estimulante del mercaptoetanol en la utilización de MVA (Fig 10), indica que hay enzimas en la ruta biosintética de isoprenoides en C. paradisi, que requieren de la presencia de grupos SH libres. Esto se apoya además en los efectos del DTNB en la incorporación del MVA, ya que es un reactivo bastante específico para esta clase de grupo funcional.

La IPP-isomerasa de C. paradisi, no es inhibida por DTNB hasta 200 μM , aunque en ausencia de sustrato es inactivada por DTNB 200 μM a 30°, con un $t_{0,5}$ mayor de 30 min (Fig 19).

Estos resultados señalan que para llevarse a cabo la reacción de isomerización se requiere que la enzima contenga grupos SH libres, que son protegidos por el sustrato del efecto de este reactivo. Resultados similares han sido obtenidos con la enzima de C. limonum (44), pero usando PCMB.

El efecto estimulante del DTT sobre la actividad de la C_{15} -prenilsintetasa (Fig 24), es otro ejemplo del requerimiento de grupos SH, muy común en enzimas de la vía isoprenoide (93). El efecto retardador de mayores concentraciones del DTT sobre la prenilsintetasa, puede atribuirse a la reducción de puentes disulfuro, que ocasionaría un cambio conformacional que afectaría la actividad de la enzima. El efecto asintótico debido a concentraciones de DTT por sobre $30 \mu\text{M}$, se interpretaría como si todos los grupos SH libres de la proteína fueran reducidos con esta concentración de DTT, que mantendría el estado de oxidación de dichos grupos.

La C_{15} -prenilsintetasa es inactivada en ausencia de sustratos por DTNB, a concentraciones entre 25 y $100 \mu\text{M}$ a 0° (Fig 26), con $t_{0,5}$ entre 6 y 37 min. La curva de inactivación muestra una pendiente única, de lo que se puede inferir que en la reacción enzimática participaría una sola clase de grupos SH, para mantener la conformación más activa de la enzima o para intervenir directamente en la catálisis. En vista de que los experimentos de inactivación se realizaron con una misma cantidad de enzima a varias concentraciones del

DTNB, que el patrón cinético de inactivación fué monofásico y al resultado del recuadro de la figura 26, se puede afirmar que la reacción de modificación de los grupos SH es de - pseudoprimer orden con respecto al DTNB.

La inactivación de la prenilsintetasa con DTNB es revertida en un 90% por la presencia de DTT 1 mM. Esta es una prueba más de que los grupos SH libres intervienen de alguna forma en la reacción de esta enzima.

La cinética de inactivación de la prenilsintetasa (Tabla IX), muestra que al calcular la constante de velocidad como si fuese de pseudoprimer o de segundo orden, estas aumentaron a medida que se incrementó la concentración del DTNB. El - que la constante de pseudoprimer orden dependa de la concentración del reactivo, significa que el DTNB además está interviniendo en otras reacciones con grupos que no participan en la actividad de la enzima y que pueden pertenecer a otras proteínas o compuestos presentes en el extracto enzimático. Esta hipótesis es sustentada por el hecho que la constante - de segundo orden respecto al DTNB, tiende a un valor independiente de la concentración de éste. En este caso la reacción supuestamente de segundo orden sería realmente de orden uno.

Es importante señalar que a concentraciones inferiores a 10 μ M, el DTNB incrementó la actividad de la C₁₅-prenilsinteta.

tasa. Resultados similares se han reportado para miosina pero con PCMB (37). Una posible interpretación de este resultado, podría ser que el DTNB reaccionará con algunos grupos SH y como consecuencia, expusiera otros que estuvieran bloqueados.

Resultados de inactivación, similares a los obtenidos con C. paradisi, se han reportado para un sistema de C. sinensis pero con PCMB (30). Con DTNB este mismo sistema presentó un patrón de inactivación bifásico (22,30).

La C_{15} -prenilsintetasa del flavedo de C. paradisi presenta un pH óptimo de 6,5 (Fig 23) con inflexiones a pH 5,0 y a 8,0. Aún cuando los resultados de una curva de pH no son suficientes para concluir cuáles podrían ser los residuos de aminoácidos implicados en la reacción enzimática, la inflexión a pH 8,0 y el requerimiento de grupos SH para la actividad de la enzima, coinciden en sugerir la probable participación de un residuo de Cisteína (pK_a de 8,33). Una hipótesis similar fué propuesta para la enzima de C. sinensis (70).

Al igual que los sistemas enzimáticos extraídos de P. radiata (14), de C. sinensis (47) y de C. limonum (23), el obtenido de C. paradisi, presenta una actividad fosfatásica que hidroliza una variedad de sustratos de diferentes naturalezas, tal como PPI, p-Nitrofenilfosfato, ATP, AMP, GPP, NPP etc. (Tabla XI). Las propiedades generales de la pirofosfa-

tasa inorgánica y de la prenilfosfatasa son muy semejantes a las reportadas para el sistema de C. sinensis (83). No requieren de metal para su actividad, aunque en presencia de Mg^{2+} la pirofosfatasa es levemente inhibida y la GPPasa es tenuamente afectada. El F^- actúa como un típico inhibidor de la pirofosfatasa con una $I_{0,5}$ de 27 μM . La curva de pH para la GPPasa presentó un máximo a pH 5,0 y un segundo alrededor de pH 6,5. Estos resultados indican que posiblemente en el extracto están presentes dos actividades prenilfosfatásicas; una ácida con pH óptimo de 5,0 y otra con su máximo a pH 6,5, quizás perteneciente, por su requerimiento de metales, a la categoría de fosfatasas alcalinas (42,92).

El sistema enzimático de Citrus paradisi forma a partir de MVA y en presencia de Mn^{2+} compuestos Z- C_{10} y E- C_{15} . Usando como sustratos GPP + IPP en presencia de Mn^{2+} se forma como sería de esperar, a priori, sólo el compuesto E- C_{15} . En cambio, a partir de estos mismos sustratos en presencia de Mg^{2+} , se forman los productos E-FPP y Z-FPP en una proporción E/Z de 3 (Figs 28,30,32). Este patrón de distribución de productos según su conformación E o Z, difiere del obtenido con un extracto de polvo cetónico de flavedo de naranja (29,35), en el que el cociente E/Z es de 12 en presencia de Mg^{2+} .

Los trabajos reportados sobre estudios de prenilsintetasas en otros sistemas (38,50,54,82,91,97), señalan que el -

producto de la reacción fué siempre de conformación E sea de 10, 15 o 20 at de C, y además estos sistemas utilizan únicamente sustratos de conformación E. Solamente el grupo de Heinstejn ha reportado la formación de los 4 diastereoisómeros del FPP (EE,EZ,ZE,ZZ), a partir tanto de NPP como de GPP, en un sistema enzimático aislado de Gossypium hirsutum (1, - 117). Estos autores no estudian el efecto del metal en la estereoquímica de la formación de los productos; solamente utilizan Mg^{2+} como cofactor.

La diferencia en la acumulación de productos C_{10} formados a partir de MVA, se podría explicar de la siguiente manera: Suponiendo que la o las prenilsintetasas formaran cantidades comparables de GPP y de NPP, como este último no es sustrato para el paso de C_{10} a C_{15} se acumularía (59) y sería drenado sólo por las carbociclasas (14,23,27,29,47) que en nuestras condiciones de ensayo están muy poco activas. En cambio, el GPP es sustrato de una o más prenilsintetasas, que sabemos están activas. En consecuencia, la concentración de estado estacionario del GOH o de sus derivados sería muy baja.

La estereoespecificidad del producto formado por la o las prenilsintetasas no es fija, sino que depende de la naturaleza del metal bivalente. Como ya se señaló, en presencia de Mg^{2+} , se formaron a partir del GPP los productos E y Z- C_{15} , con una razón E/Z de 3, en tanto que con Mn^{2+} en lugar del Mg^{2+} no se detectó la formación del producto Z (Figs 28,30).

En cambio, en una preparación enzimática parcialmente purificada de flavedo de C. sinensis el cociente E/Z fué de 4 en presencia de Mg^{2+} o Mn^{2+} ; con Co^{2+} la razón incrementó a 8 y en presencia de Ni^{2+} no hubo síntesis del producto Z.

Este fenómeno se puede interpretar en términos de la existencia de 2 o más prenilsintetasas estereoespecíficas, que podrían diferir en su especificidad por el metal. Sin embargo, no puede excluirse la existencia de una sola enzima que genere un carbocatión cuya conformación sea definida por la naturaleza del metal. Un determinado metal (Ni^{2+} en la enzima de naranja (35) o Mn^{2+} en la de pomelo) permitiría solamente la conformación que lleva a los productos E, mientras que otros metales serían menos efectivos para estabilizar la geometría del carbocatión y llevarían a la formación tanto de producto E como Z.

El conjunto de estos datos indica que la estereoespecificidad de las prenilsintetasas en Citrus respecto al producto no es sólo una característica intrínseca de la enzima, sino que dependería de la estructura del complejo metal-sustrato (o quizás del metal-producto).

Las enzimas que sintetizan isoprenoides en un extracto de flavedo de Citrus paradisi son, a rasgos generales, muy semejantes a las enzimas análogas descritas en otros tejidos vegetales o en tejidos animales. Sin embargo, hay algunas -

diferencias que pueden justificar un estudio más completo.

La IPP-isomerasa de C. paradisi difiere de la descrita hasta ahora en su independencia de metal bivalente y en su insensibilidad a reactivos modificadores de grupos SH, si bien es inactivada por DTNB en ausencia de sustrato.

Las prenilsintetasas de C. paradisi forman mayor cantidad de productos Z que las de otras especies de Citrus, y su estereoespecificidad de producto depende en distinta forma de la naturaleza del metal bivalente.

Todas estas diferencias, aparte de su interés comparativo, pueden conducirnos a obtener de este fruto un mejor material de partida para el estudio de la estereoquímica del alargamiento de la cadena isoprenoide.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, S.R. and Heinstejn, P.H.
Phytochem., 12, 2167(1973)
2. Agranoff, B.W., Eggerer, H., Henning, U. and Lynen, F.
J. Biol. Chem., 235, 326(1960)
3. Allen, C.M., Alworth, W., McCrae, A. and Bloch, K.
J. Biol. Chem., 242, 1895(1967)
4. Ames, B.N.
En "Methods in Enzymology" Vol VIII pag 116 E.F. Neufeld and V. Ginsburg (eds.). Academic Press., New York, 1966.
5. Anderson, D.O., Norgard, D.W. and Porter, J.W.
Arch. Biochem. Biophys., 88, 68(1960)
6. Archer, B.L., Barnard, D., Lockbam, E., Cornforth, J., Cornforth, R.H. and Popják, G.
Proc. Royal Soc., 163B, 519(1966)
7. Archer, B.L. and Audley, B.G.
Advanc. Enzymol., 29, 221(1967)
8. Attaway, J.A., Pieringer, A.P. and Barabas, L.J.
Phytochem., 6, 25(1967)
9. Banthorpe, D.V., Charlwood, B.V. and Francis, M.J.O.
Chemical Reviews, 72, 115(1972)
10. Banthorpe, D.V., LePatourel, N.J. and Francis, M.J.O.
Biochem. J., 130, 1045(1972)
11. Banthorpe, D.V., Doonan, S. and Gutowski, J.A.
Arch. Biochem. Biophys., 184, 381(1977)
12. Banthorpe, D.V., Ekundayo, O. and Rowan, M.G.
Phytochem., 17, 1111(1978)
13. Basaez, S.
Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología (1977)
14. Beytía, E., Valenzuela, P. and Cori, O.
Arch. Biochem. Biophys., 129, 346(1969)

15. Beytía, E., Dorsey, J.K., Marr, J., Cleland, W.W. and Porter, J.W.
J. Biol. Chem., 245, 5450(1970)
16. Beytía, E. and Porter, J.W.
Ann. Rev. Biochem., 45, 113(1976)
17. Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A.H. and de Waard, A.
J. Biol. Chem., 234, 2595(1959)
18. Bonner, J.
En "Plant Biochemistry" pag 675. J. Bonner and J.E. - Varner (eds.). Academic Press., New York. 1965
19. Cardemil, E. Vicuña, R., Jabalquinto, A.M. and Cori, O.
Anal. Biochem., 59, 636(1974)
20. Chayet, L.
Tesis para optar al título de Bioquímico. U. de Chile (1972)
21. Chayet, L., Pont Lezica, R., George-Nascimento, C. and Cori, O.
Phytochem., 12, 95(1973)
22. Chayet, L., Pérez, L.M., Cardemil, E., De la Fuente, M. Rojas, C., Portilla, G., Hashagen, U., Taucher, G. and Cori, O.
VII International Congress of essential Oils. October 7-11 th, Kyoto, 1977
23. Chayet, L., Rojas, C., Cardemil, E., Jabalquinto, A.M., Vicuña, R. and Cori, O.
Arch. Biochem. Biophys., 180, 318(1977)
24. Chaykin, S., Low, J., Phillips, A.H., Tchen, T.T. and Bloch, K.
Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 44, 998(1958)
25. Chesterton, C.J. and Keckwick, R.G. O.
Arch. Biochem. Biophys., 125, 76(1968)
26. Cori, O.
En "Progress Report Grant N# FG-Ch 101, September 1966
27. Cori, O.
Arch. Biochem. Biophys., 135, 416(1969)
28. Cori, O.
En "Bases Moleculares de la acción hormonal". M. Perre ta, J. Minguell y G. Swaneck (eds.). Ediciones sede -

Santiago Sur, Universidad de Chile, Santiago, pag 11, 1976.

29. Cori, O., Chayet, L., De la Fuente, M., Fernández, L.A. Hashagen, U., Pérez, L.M., Rojas, C., Sánchez, G., - Vial, M.V. and Portilla, G.
Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, 32, - 97(1980)
30. Cori, O., Chayet, L., Pérez, L.M., Rojas, C. y Portilla, G.
En "Memorias del Simposio de Modificación Química de - Enzimas". Julio 21-22, Santiago, 1980
31. Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Popják, G. and Yengoyan, L.
J. Biol. Chem., 241, 3970(1966)
32. Cornforth, R.H. and Popják, G.
Methods Enzymol., 15, 359(1969)
33. Cramer, F. and Böhm, W.
Angew. Chem., 71, 775(1959)
34. De la Fuente, M.
Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias. U. de Chile, 1976.
35. De la Fuente, M., Pérez, L.M., Hashagen, U., Chayet, L. Rojas, C., Portilla, G. and Cori, O.
Phytochem. (Aceptado para publicación 1981).
36. Dixon, M. and Webb, E.C.
En "Enzymes" 2nd ed. p 38. Longmans, England, 1964
37. Ducke
Biochim. Biophys. Acta, 126, 600(1966)
38. Eberhardt, N.L. and Rilling, H.C.
J. Biol. Chem., 250, 863(1975)
39. Edmond, J. and Popják, G.
J. Biol. Chem., 249, 66(1974)
40. Faini di Castri, F.
Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico U. de Chile. 1970.
41. Fernández, L.A.
Tesis para optar al título de Bioquímico. U. de Chile 1978.

42. Fernley, H.N.
En "The Enzymes" Vol IV 3a ed. p 417. P.D. Boyer (ed.)
Academic Press., New York-London, 1971
43. Fiske, C.H. and SubbaRow, J.
J. Biol. Chem., 66, 375(1925)
44. Foster, R.
Tesis para optar al título de Bioquímico. U. de Concep
ción. 1974
45. Francis, M.J.
Chem. Rev., 72, 115(1972)
46. Gel filtration: "Theory and Practice" Ed. Pharmacia,
Fine Chemicals, Upsala, Swecia.
47. George-Nascimento, C. and Cori, O.
Phytochem., 10, 1803(1971)
48. Goodwin, T.W.
En "Terpenoids in plants" p 1. J.B. Pridham (ed.). Aca
demic Press., London, 1967
49. Gough, D. and Hemming, F.
Biochem. J., 117, 309(1970)
50. Green, T.R. and West, C.A.
Biochem., 13, 4720(1974)
51. Hellig, H. and Popják, G.
J. Lipid Res., 2, 235(1968)
52. Hemming, F.W.
En "Natural Substances Formed Biologically from Mevalo
nic Acid". pag 105. T.W. Goodwin (ed.) Academic Press.,
New York, 1970
53. Henning, U., Möslein, E.M. and Lynen, F.
Arch. Biochem. Biophys., 83, 259(1959)
54. Holloway, P.W. and Popják, G.
Biochem. J., 104, 57(1967)
55. Holloway, P.W. and Popják, G.
Biochem. J., 106, 835(1968)
- 56.. Holloway, P.W.
En "The Enzymes" Vol VI 3a ed. pag 565. P.D. Boyer (ed)
Academic Press, New York and London, 1972

57. Holuigue, L.
Tesis para optar al título de Bioquímico. U. de Chile.
1980
58. International Union of Biochemistry Nomenclature Committee Units of Enzyme activity. Recomendations a978.
Eur. J. Biochem., 1977
59. Jacob, G., Cardemil, E., Tellez, R., Pont Lezica, R. and Cori, O.
Phytochem., 11, 1683(1972)
60. Jedliki, E., Jacob, G., Gaini, F. and Cori, O.
Arch. Biochem. Biophys., 152, 590(1972)
61. Kacker, S.K. and Shambaugh, G.E.Jr.
Arch. Otolaryngol., 106, 260(1980)
62. Kandutsch, A.A., Paulus, H., Levin, E. and Bloch, K.
J. biol. Chem., 239, 2507(1964)
63. Keenan, M.V. and Allen, C.M.
Arch. Biochem. Biophys., 161, 375(1974)
64. Levy, H.R. and Popják, G.
Biochem. J., 72, 35p(1959)
65. Levy, H.R. and Popják, G.
Biochem. J., 75, 417(1960)
66. Loomis, W.D. and Battaile, J.
Biochim. Biophys. Acta, 67, 54(1963)
67. Loomis, W.D.
En "Terpenoids in Plants". Pag 59. J.B. Pridham (ed.).
Academic Press, London, 1967
68. Loomis, W.D. and Croteau, R.
En "Recent Advances in Phytochemistry". Vol 6. pag 147
Academic Press. Inc., New York, 1973
69. Loomis, W.D. and Croteau, R.
En "The Biochemistry of Plants". vol 4. Chap 13. Biochemistry of Terpenoids. P.K. Stumpf and E.E. Con (eds)
1980
70. Loyola, G.
Tesis para optar al título de Bioquímico. U. de Chile
1980

71. Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. and Kessel, I.
Angew. Chem., 70, 738(1958)
72. Lynen, F., Agranoff, B.W., Eggerer, H., Henning, U. -
and Möslein, E.M.
Angew. Chem., 71, 657(1959)
73. Markley, K. and Smallman, E.
Biochim. Biophys. Acta, 47, 327(1961)
74. Massart, L.
En "The Enzymes" Vol 1 part 1 1a ed. pag 331. J.B. Sumner and K. Myrbäck (eds.). Academic Press Inc. Publishers, New York, 1950
75. Meyerhof, O.
En "The Enzymes" Vol 1 part 2. 1a ed. pag 1207. J.B. Sumner and K. Myrbäck (eds.). Academic Press Inc. Publishers, New York, 1951
76. Nishino, T., Ogura, K. and Seto, S.
Biochim. Biophys. Acta, 302, 33(1973)
77. Ogura, K., Nishino, T. and Seto, S.
J. Biochem., 64, 197(1968)
78. Ogura, K., Koyama, T. and Seto, S.
J. Chem. Commun., 81(1972)
79. Ogura, K., Shinka, T. and Seto, S.
J. Biochem., 72, 1101(1972)
80. Ogura, K., Saito, A. and Seto, S.
J. Am. Chem. Soc., 96, 4037(1974)
81. Ohnoki, S., Suzue, G. and Tanaka, S.T.
J. Biochem., 52, 423(1962)
82. Oster, M.O. and West, C.A.
Arch. Biochem. Biophys., 127, 112(1968)
83. Pérez, L.M., Taucher, G. and Cori, O.
Phytochem., 19, 183(1980)
84. Perrin, D.D. and Sharma, V.S.
Biochim. Biophys. Acta, 127, 35(1966)
85. Popják, G., Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Ryhage, R. and Goodman, Dew.S.
J. Biol. Chem., 237, 56(1962)

86. Popják, G., Holloway, P.W. and Baron, J.M.
Biochem. J., 111, 325(1969)
87. Popják, G., Edmond, J., Wong, S.M. and Williams, V.P.
J. Biol. Chem., 246, 6254(1971)
88. Potty, V.H. and Bruemmer, J.H.
Phytochem., 9, 1229(1970)
89. Poulter, C.D. and Satterwhite, D.M.
Biochem., 16, 5470(1977)
90. Rasmussen, R.A.
"Special Report: Isoprene Plant Species List". Oregon
Graduate Center, 19600 N.W. Walker Road, Beaverton,
Oregon 97005, 1978
91. Redd, B.C. and Rilling, H.C.
Biochem., 15, 3739(1976)
92. Reid, T.W. and Wilson, I.B.
En "The Enzymes" Vol IV 3a ed. pag 373. P.D. Boyer (ed.)
Academic Press, New York-London, 1971
93. Richards, J.H. and Hendrickson, J.B.
In "The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Aceto-
genins". pag 12. W.A. Benjamin Inc., New York, 1964
94. Rilling, H.C. and Boch, K.
J. Biol. Chem., 234, 1424(1959)
95. Robinson, D.R. and West, C.A.
Biochem., 9, 80(1969)
96. Ruzicka, L.
Experientia, 9, 357(1953)
97. Sagami, H., Ogura, K., Seto, S. and Kurodawa, T.
Biochim. Biophys. Res. Comm., 85, 572(1978)
98. Saito, Akio
Ph.D. Dissertation, Dep. of Chemistry. Tohoku Univer-
sity, Sendai, 1976
99. Sanderman, W., Schweers, W., Bruns, K., Stockmann, H.
and Beinhaff, O.
Bull. Nat. Inst. of Sciences of India No.37, 168
New Delhi, 1968
100. Shah, D.H., Cleland, W.W. and Porter, J.W.
J. Biol. Chem., 240, 1946(1965)

101. Skilleter, D.N., Williamson, I.P. and Kekwick, R.G.O.
Biochem. J., 98, 27p(1966)
102. Skilleter, D.N. and Kekwick, R.G.O.
Biochem. J., 124, 407(1971)
103. Smith, M. and Khorana, H.G.
En "Methods in Enzymology". Vol VI. pag 651. S.P. -
Colowick and N.O. Kaplan (eds.). Academic Press, New
York, 1963
104. Stadman, E.R., Novelli, G.G. and Lipman, F.
J. Biol. Chem., 191, 365(1951)
105. Stahl, E. (ed)
"Thin-Layer Chromatography. A laboratory handbook.
pag 195. Academic Press Inc. Publishers, New York, 1965
106. Stanley, R.C.
Nature, 182, 738(1958)
107. Suarez, D., García-Peregrin, E. and Mayor, F.
Phytochem., 13, 1059(1974)
108. Taquikhan, M.M. and Martell, A.E.
J. Am. Chem. Soc., 88, 668(1966)
109. Tavornina, P.A., Gibbs, M.H. and Huff, J.W.
J. Am. Chem. Soc., 78, 4498(1956)
110. Tchen, T.T.
J. Am. Chem. Soc., 79, 6344(1957)
111. Tchen, T.T.
J. Biol. Chem., 233, 1100(1958)
112. Umbreit, W.W., Burnis, R.H. and Sauffer, J.F.
En "Manometric Techniques". pag 272. Burgess Publi-
shing Co., Minn., USA, 1959
113. Valenzuela, M.A., Del Campo, G., Marín, E. and Traver-
so-Cori, A.
Biochem. J., 133, 755(1973)
114. Valenzuela, P., Beytía, E., Cori, O. and Yudelevich, O.
Arch. Biochem. Biophys., 113, 536(1966)
115. Valenzuela, P. and Cori, O
Tetrahedron Letters, 32, 3089(1967)

116. Vial, M.V.
Tesis para optar al título de Bioquímico. U. de Chile
1980
117. Widmaier, R., Howe, J. and Heinstein, P.
Arch. Biochem. Biophys., 200, 609(1980)
118. Williamson, I. P. and Kedwick, R.G.O.
Biochem. J., 96, 862(1965)
119. Witting, L.A. and Porter, J.W.
J. Biol. Chem., 234, 2841(1959)
120. Wright, A.F. and Folkers, K.
En "Advances in Enzymology". Vol 23, pag 471. F.P. -
Nord (ed.) Interscience, New York-London, 1961
121. Yeh, L-S. and Rilling, H.C.
Arch. Biochem. Biophys., 183, 718(1977)

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis fué realizada para dar cumplimiento al requisito exigido para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Bioquímica, bajo la Tutoría del Dr. Osvaldo Cori M. y la dirección de la Dra. Luz María Pérez R. A ellos deseo expresar mi más profundo agradecimiento por su ayuda, comprensión y en especial su aporte moral e intelectual para poder lograr los objetivos planteados por el ejecutor de la tesis.

También quiero agradecer la cooperación de los integrantes del laboratorio de Bioquímica, en especial a María Antonieta Valenzuela P., por su ayuda desinteresada y su aporte intelectual, moral y material.

Agradezco también a los memoristas que pasaron por el laboratorio durante mi permanencia en el mismo, en especial a Gustavo Loyola G. por su cooperación y sus sugerencias en la realización del trabajo. Al profesor Hernán Rodríguez por su ayuda en la realización de los análisis IR y NMR. Al profesor Javier Puente por su colaboración en la cuantificación de productos radiactivos.

La permanencia del suscrito fué financiada con una beca del Programa Regional de Entrenamiento en Ciencias Biológicas Proyecto RLA/78/024, PNUD/UNESCO. Por tal motivo agra-

deuzco profundamente a su Coordinador Regional el Dr. Jorge -
Allende, por su continua ayuda y aporte económico, ya que -
sin su colaboración hubiera sido imposible llegar hasta el -
final.

Agradecemos al Dr. Erich Klein, de Dragoco, Holzminden la
donación de terpenoides estándar y para síntesis.

Además agradezco al personal de Biblioteca, María Noram-
buena e Ilse Valencia su cariño y eficiencia.

Por último deseo agradecer a todas aquellas personas que
de alguna u otra forma hicieron posible el logro de los obje-
tivos y por sobre todo mi feliz permanencia en este hermoso
país hermano "CHILE".

Esta tesis fué parcialmente financiada por el proyecto - B-005 del Servicio de Desarrollo Científico, Creación Artística y Cooperación Internacional de la Universidad de Chile, por el proyecto PNUD-UNESCO RLA-78-024-79-19 y por un proyecto cooperativo N.S.F.U.S.A. entre el Depto de Química de la Universidad de California, Santa Bárbara y el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas.

