

UCH-FC
DOC-B
344
C.1

DESCARBOXILASA DIFOSFOMEVALONICA.

El complejo metal-ATP activo en la catálisis y estudios
cinéticos.

Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de Doctor en Ciencias
con mención en Biología.

Facultad de Ciencias

por

ANA MARIA JABALQUINTO LOPEZ.

Director de Tesis : Dr Emilio Cardemil U.



Facultad de Ciencias

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 D O C T O R A D O

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Ana María Jabalquinto López

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de Noviembre de 1987.

Director de Tesis

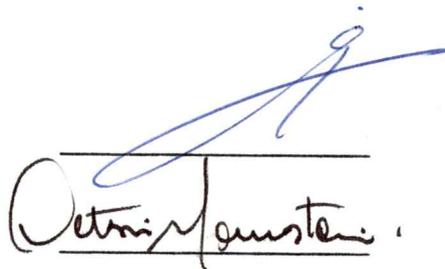
Dr Emilio Cardemil



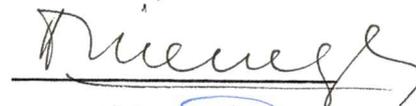
Comisión Informante de Tesis

Dr Osvaldo Alvarez

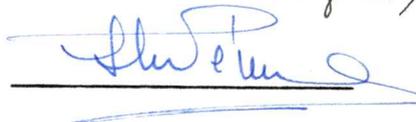
Dr Octavio Monasterio



Dr Hermann Niemeyer F



Dra Luz María Pérez



Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de Santiago de Chile bajo la dirección del Dr Emilio Cardemil U. y fue financiada por el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Santiago de Chile (Proyectos 84-104, 10-8432 y 04-8432), por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Proyectos 514, 1162 y 1428) y por la Academia de Ciencias del Tercer Mundo (Proyecto 42-CHL-14).

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos :

Al Dr Emilio Cardemil, por su constante apoyo, estímulo y críticas constructivas durante la realización de esta tesis.

A Marysol Alvear, por su entusiasta colaboración en la preparación del sustrato y purificación de la enzima. Además por haber compartido problemas y alegrías durante la realización de esta tesis.

A los Drs Octavio Monasterio y W. W. Cleland, por su colaboración y por las facilidades otorgadas para usar los programas de computación.

A la Vicerrectoría Académica de la Universidad de Santiago de Chile y a la Universidad de Chile, por haberme otorgado becas de estudios.

A los Drs R. Iyengar y F. Eckstein, por la donación de reactivos.

Ana María Jabalquinto L.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ESQUEMAS	XIII
ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVIII
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	10
Reactivos	10
Determinación de la actividad enzimática	11
Purificación de la descarboxilasa difosfomevalónica	12
Determinación de la concentración de proteínas	12
Síntesis del ADP/βS	12
Síntesis del (S _p)ATP/βS	13
Síntesis del (R _p)ATP/βS	14
Síntesis del ATPγS	14
Purificación de los tionucleótidos	14
Preparación y purificación del complejo γ-monodentado de CrATP	15
Preparación y purificación del complejo β,γ-bidentado de CrATP	16
Síntesis del mevalonato-5-fosfato	17
Síntesis del mevalonato-5-difosfato	17
Síntesis del MVAPPβS	17

	Pág.
Purificación y caracterización del MVAPP β S	18
Preparación y purificación del CrMVAPP	22
Síntesis del isopentenildifosfato	23
Preparación de materiales para cromatografía	24
Cálculo de las concentraciones del nucleótido libre, del metal libre y del complejo metal-nucleótido	24
Estudios de inhibición	26
Análisis estadístico de los resultados	26
Estudios de pH	27
Especificidad del nucleótido en la reacción enzimática	28
Efecto de los metales bivalentes	28
Determinación de las constantes cinéticas para los complejos metal-ATP	28
Complejos de CrATP como sustratos	29
Complejos de CrATP como inhibidores	29
Análogos azufrados del ATP como sustratos	29
Análogos azufrados del ATP como inhibidores	30
Inactivación de la enzima por los tionucleótidos	30
Efecto protector de los sustratos y del DTT en la reacción de inactivación	31
RESULTADOS	32
EFFECTOS DEL NUCLEOTIDO Y DEL METAL BIVALENTE SOBRE LA ACTIVIDAD	32
Efectos del ATP y del Mg ⁺²	32
Estudios de pH	36
Especificidad de la activación por el nucleótido libre	41

	Pág.
Especificidad del metal sobre la actividad enzimática	43
MECANISMO CINETICO	46
Inhibición por análogos de los sustratos	48
Inhibición por MVAP	50
Estudios con CrMVAPP	50
Estudios con MVAPP/β S	54
Inhibición por ATP γ S	54
Inhibición por AMP-PCP	57
Inhibición por los productos de la reacción	61
Inhibición por IPP	61
Inhibición por fosfato inorgánico	64
ESTRUCTURA DEL COMPLEJO METAL-ATP	64
Efecto de los complejos del CrATP en la reacción	66
Diastereoisómeros del ATP α S como sustratos	68
Diastereoisómeros del ATP β S como sustratos y como inhibidores	70
Efecto de la posición del azufre en el reemplazo por oxígeno	73
Inactivación de la enzima por los tionucleótidos	76
Efecto protector de los sustratos y del DTT en la reacción de inactivación	78
Efecto del pH en la reacción de inactivación	78
DISCUSION	81
MECANISMO CINETICO	81
EFECTOS DEL NUCLEOTIDO Y DEL METAL BIVALENTE SOBRE LA ACTIVIDAD	86

	Pág.
ESTRUCTURA DEL COMPLEJO METAL-ATP	92
PROPIEDADES DEL SITIO ACTIVO	99
REFERENCIAS	106

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Análisis de ^{31}P -NMR de los ácidos difosfomevalónicos.	21
Tabla 2. Complejos formados por los componentes de la mezcla de ensayo de la descarboxilasa difosfomevalónica al usar ATP, $\text{ATP}\gamma\text{S}$ o $\text{ATP}\beta\text{S}$ en presencia de diversos iones metálicos bivalentes.	25
Tabla 3. Constantes cinéticas aparentes para nucleótidos.	42
Tabla 4. Constantes cinéticas aparentes para los complejos metal-ATP.	45
Tabla 5. Patrones de inhibición para mecanismos cinéticos en sistemas de dos sustratos.	51
Tabla 6. Constantes cinéticas aparentes para MVAPP y para $\text{MVAPP}\beta\text{S}$.	55
Tabla 7. Constantes cinéticas aparentes para los isómeros del $\text{ATP}\gamma\text{S}$.	71
Tabla 8. Complejos del $\text{MgATP}\beta\text{S}$ y del $\text{ZnATP}\beta\text{S}$ en la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica.	72
Tabla 9. Isómeros del $\text{ATP}\beta\text{S}$ como sustratos y como inhibidores.	75
Tabla 10. Constantes cinéticas para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por análogos de los sustratos.	83
Tabla 11. Efectos cinéticos de las diferencias estructurales entre nucleótidos.	101

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Posibles mecanismos de descarboxilación del MVAPP.	5
Figura 2. Cromatografía del MVAPP/ β S en una columna de DEAE-Sephadex A-25.	19
Figura 3. Efecto de la concentración del $MgCl_2$ sobre la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica.	34
Figura 4. Efecto de la concentración del ATP sobre la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica.	35
Figura 5. Efecto de la concentración del ATP y del $MgCl_2$ sobre la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica.	37
Figura 6. Efecto del pH sobre V y V/K_{mATP} en la reacción de la descarboxilasa difosfomevalónica.	39
Figura 7. Efecto del pH sobre K_i para $ATP \gamma S$.	40
Figura 8. Efecto de diversos cationes metálicos bivalentes sobre la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica.	44
Figura 9. Inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por Cd^{+2} y por Zn^{+2} .	47
Figura 10. Gráfica de dobles recíprocos para la descarboxilasa difosfomevalónica donde las concentraciones del ATP y del MVAPP se variaron en una razón constante.	49
Figura 11. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por MVAP cuando MVAPP es el sustrato variable.	52

	Pág.
Figura 12. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por MVAP cuando ATP es el sustrato variable.	53
Figura 13. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por ATP γ S cuando ATP es el sustrato variable.	56
Figura 14. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por ATP γ S cuando MVAPP es el sustrato variable.	58
Figura 15. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por AMP-PCP cuando ATP es el sustrato variable.	59
Figura 16. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por AMP-PCP cuando MVAPP es el sustrato variable.	60
Figura 17. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por IPP cuando ATP es el sustrato variable.	62
Figura 18. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por IPP cuando MVAPP es el sustrato variable.	63
Figura 19. Estructuras de los complejos β, γ -bidentados del MgATP.	65
Figura 20. Estructuras de los complejos β, γ -bidentados del CrATP.	67

	Pág.
Figura 21. Estructuras de los complejos β, γ -bidentados del $\text{ATP}/\beta\text{S}$ con Mg^{+2} y con Cd^{+2} .	69
Figura 22. Efecto de la concentración del $\text{Zn}(\text{S}_p)\text{ATP}/\beta\text{S}$ en la reacción de la descarboxilasa difosfomevalónica.	74
Figura 23. Inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por diversos tionucleótidos.	77
Figura 24. Efecto de los sustratos y del DTT en la reacción de inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por $(\text{R}_p)\text{ATP}/\beta\text{S}$.	79
Figura 25. Efecto del pH en la inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por $(\text{R}_p)\text{ATP}/\beta\text{S}$.	80
Figura 26. Posible esquema para el mecanismo de acción de la descarboxilasa difosfomevalónica.	103

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Mecanismo general para activación.	88
Esquema 2. Posibles mecanismos para la inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por tionucleótidos.	98

ABREVIATURAS

ADP β S	:	Adenosina-5'-O-(2-tiodifosfato)
AMP-PCP	:	Adenilil(β , γ -metilen)difosfonato
AMPS	:	Adenosina-5'-O-tiofosfato
ATP α S	:	Adenosina-5'-O-(1-tiotrifosfato)
ATP β S	:	Adenosina-5'-O-(2-tiotrifosfato)
ATP γ S	:	Adenosina-5'-O-(3-tiotrifosfato)
dATP	:	2-desoxiadenosina-5'-trifosfato
DEAE	:	Dietilaminoetil
DTNB	:	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)
DTT	:	Ditiotreitol
EDTA	:	Acido etilendiaminotetraacético
G3PDH	:	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
IPP	:	Isopentenildifosfato
LDH	:	Deshidrogenasa láctica
MES	:	Acido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
MVA	:	Mevalonato
MVAP	:	Mevalonato-5-fosfato
MVAPP	:	Mevalonato-5-difosfato
MVAPP β S	:	Mevalonato-5-(2-tiodifosfato)
PEP	:	Acido fosfoenolpirúvico
PGK	:	Fosfoglicerato-quinasa
P _i	:	Ortofosfato inorgánico
PK	:	Quinasa pirúvica
TPI	:	Triosafosfato-isomerasa
Tris	:	Tris-(hidroximetil)-aminometano
V	:	Velocidad máxima

RESUMEN.

En esta tesis se ha realizado un estudio de la descarboxilasa difosfomevalónica (ATP : 5-difosfomevalonato carboxilasa (deshidratante) EC 4.1.1.33) desde un punto de vista cinético, que constituye una primera aproximación al mecanismo de acción de esta enzima.

El presente trabajo tuvo tres objetivos principales. El primero fue determinar cual de los complejos del MgATP es el sustrato verdadero y además determinar el efecto del exceso del ATP y del metal bivalente sobre la actividad de la enzima. El segundo fue discernir el mecanismo cinético y el tercero fue determinar la estructura del complejo metal-nucleótido en el sitio activo de la enzima.

El sustrato verdadero de la descarboxilasa difosfomevalónica resultó ser el MgATP^{-2} . Además, mediante variaciones en el pH, se descartó que el MgHATP^{-} también fuera un sustrato de la enzima. Los estudios realizados con el objeto de determinar los efectos del ATP libre y del metal libre sugirieron que el ATP libre actúa como un activador. Por otra parte, se demostró un efecto inhibitor producido por el Zn^{+2} libre, el Cd^{+2} libre y el Mn^{+2} libre, mientras que el Mg^{+2} libre no presentó este efecto inhibitor.

La capacidad relativa de los iones metálicos bivalentes para actuar en la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica fue evaluada en términos del cociente V/K_m para los correspondientes complejos $(\text{metal-ATP})^{-2}$. Estos fueron de 100 para Mn^{+2} , de 37 para Cd^{+2} , de 14 para Mg^{+2} y de 1,7 para Zn^{+2} .

El segundo objetivo se abordó mediante estudios de inhibición por análogos de los sustratos. En forma previa a estos estudios se confirmó que la unión de los sustratos a la enzima ocurre en forma secuencial, al obtener una parábola en una gráfica del recíproco de la velocidad con respecto al recíproco de la concentración de uno de los sustratos, cuando se varió la concentración de ambos sustratos en una razón constante. Los experimentos realizados con MVAP, un análogo del MVAPP, indicaron una inhibición competitiva con respecto al MVAPP y una inhibición mixta con relación al ATP. Los resultados obtenidos con dos análogos del ATP, el AMP-PCP y el ATP γ S, indicaron una inhibición competitiva con respecto al ATP e incompetitiva con relación al MVAPP. Estos resultados nos llevaron a concluir que el mecanismo cinético de la descarboxilasa difosfomevalónica es secuencial ordenado, siendo el MVAPP el primer sustrato que se une a la enzima.

El tercer objetivo fue determinar la estructura del complejo metal-nucleótido en el sitio activo de la enzima. Para ello, se usaron los análogos fosforotioatos del ATP. Se encontró que la actividad como sustratos de estos análogos disminuyó a medida que el reemplazo de un oxígeno por azufre en el ATP cambiaba de la posición α a la γ .

Ambos diastereómeros del ATP α S fueron sustratos de la enzima y la comparación de los cuocientes V/K_m no mostró reversión en la estereoselectividad del isómero por la enzima al reemplazar el Mg^{+2} por el Cd^{+2} , lo que sugiere que el metal no se coordina al fosforilo α del nucleótido. Para el estudio con los diastereómeros del ATP β S fue necesario cambiar el Cd^{+2} por el Zn^{+2} debido a problemas en el ensayo. En este caso solo

fueron sustratos el $Mg(R_p)ATP/\beta S$ y el $Zn(S_p)ATP/\beta S$. Esta reversión en la estereoselectividad al cambiar el catión indica que el metal se coordina al fosforilo β del ATP.

Los resultados anteriores sugirieron que la descarboxilasa difosfomevalónica usa como sustrato al isómero lambda del complejo β, γ -bidentado del $MgATP^{-2}$. En contraste con la preferencia por el isómero lambda para la reacción enzimática, los estudios de inhibición con los diastereómeros del $ATP/\beta S$ indicaron que el isómero delta se une con una afinidad igual o mayor que el isómero lambda.

La descarboxilasa difosfomevalónica fue inactivada por diversos tionucleótidos encontrándose el siguiente orden de efectividad como inactivadores : $(R_p)ATP/\beta S > (S_p)ATP/\beta S \approx ADP/\beta S \approx AMPS > ATP/\gamma S$. La protección de la inactivación ejercida por los sustratos podría indicar que el grupo reactivo está en o cerca del sitio activo. A su vez la protección ejercida por el DTT sugeriría que el tionucleótido estuviese interactuando con grupos sulfhidrilos funcionales de la enzima.

ABSTRACT

A kinetic study has been carried out on mevalonate-5-diphosphate decarboxylase (ATP : diphosphomevalonate carboxy-lyase (dehydrating) EC 4.1.1.33), as part of a first approximation to the mechanism of action of this enzyme.

This work had three main purposes. The first one was to sort out which of the complexes formed between Mg^{2+} and ATP is the true substrate and to determine the effects of free metal and free ATP in catalysis. The second one was to determine the kinetic mechanism of the enzyme and the third one was to ascertain the active metal-chelate structure for ATP in the active site of the enzyme.

The first objective was approached by carrying out a series of kinetic experiments to measure the effects of free metal, free ATP and MgATP, varied over a wide concentration range, on mevalonate-5-diphosphate decarboxylase activity. We found that $MgATP^{2-}$ is the substrate, meanwhile free divalent cations inhibited the enzyme ($Zn > Cd > Mn$). On the other hand, free Mg is not an inhibitor. Our results also suggested that free ATP acts as an activator of the enzyme.

The relative efficiency of Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , and Zn^{2+} as activating metal ions was evaluated in terms of V/K_m for the corresponding metal-ATP²⁻ complexes. The relative ratios were 100 for Mn^{2+} , 37 for Cd^{2+} , 14 for Mg^{2+} and 1.7 for Zn^{2+} .

The second purpose of this study was to determine the kinetic mechanism of mevalonate-5-diphosphate decarboxylase. When the concentration of both substrates was varied in a constant ratio, the reciprocal plot could be

fitted to a parabola, supporting a sequential mechanism.

Inhibition studies with substrates analogues were carried out to determine the order of interaction of the substrates with the enzyme. When MVAP was used as a MVAPP analog, we found it to behave as a competitive inhibitor against MVAPP and as a mixed one with respect to ATP. ATP γ S and AMP-PCP were used as ATP analogues, and in both cases competitive inhibition against ATP and uncompetitive inhibition with respect to MVAPP were found. These results indicate that the addition of the substrates to the enzyme is ordered with MVAPP adding first.

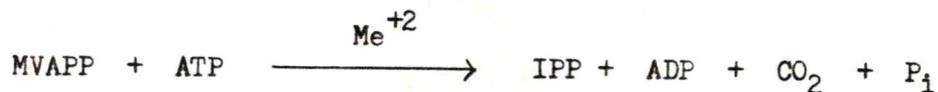
The diastereomers of phosphorothioate analogues were used as probes of the structure of the metal nucleotide substrate at the active site of the enzyme. Enzyme activity with the thio-ATP analogues decreased when the site of sulfur substitution was changed from the α to the γ position. Both diastereomers of ATP α S acted as substrates and no stereoselectivity was observed when the ATP α S isomers were used in the presence of Mg²⁺ or Cd²⁺, suggesting that the metals are not coordinated to the α phosphate. In the study with the isomers of ATP β S, Zn²⁺ was changed for Cd²⁺ because of the Cd²⁺-mediated hydrolysis of ATP β S. For the ATP β S diastereomers, a metal-dependent reversal of activity was observed. While Mg(R_p)ATP β S was a substrate, the Mg(S_p) diastereomer was not a substrate at all. Conversely, Zn(S_p)ATP β S behaved as a substrate and Zn(R_p)ATP β S did not act as such. The observed reversal of activity for the ATP β S diastereomers provides evidence that the metal is complexed to the β phosphate of ATP. From the above results it is proposed that mevalonate-5-diphosphate decarboxylase requires the lambda β,γ -bidentate MgATP chelate structure.

The enzyme is inactivated by various thionucleotides and the order of effectiveness as inactivators is : $(R_p)ATP\beta S > (S_p)ATP\beta S \approx ADP\beta S \approx AMPS > ATP\gamma S$. Both substrates protected the enzyme against inactivation by $(R_p)ATP\beta S$. As dithiothreitol prevents the enzyme inactivation, these results are interpreted as being the consequence of the interaction of the above mentioned analogues with essential thiol groups of the enzyme.

INTRODUCCION.

El grupo de productos naturales conocido como isoprenoides incluye a todas aquellas sustancias cuya biosíntesis se deriva del compuesto de cinco átomos de carbono denominado IPP. Estos isoprenoides se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza y entre ellos tenemos a los esteroides, carotenoides, terpenos y giberelinas.

La descarboxilasa difosfomevalónica (ATP : 5-difosfomevalonato carboxilasa (deshidratante) (EC 4.1.1.33)) cataliza la descarboxilación del MVAPP en presencia del ATP y un metal bivalente para producir IPP y otros productos, de acuerdo a la ecuación :



Se ha encontrado la presencia de descarboxilasa difosfomevalónica en : cerebro de rata (Ramachandran y Shah, 1977; Shama Bhat y Ramasarma, 1979), intestino de pollo (González-Pacanowska y col., 1985), y en hojas de Cymbopogon citratus (Lalitha y col, 1985). La enzima ha sido purificada parcialmente a partir de levadura (Bloch y col., 1959), látex de Hevea brasiliensis (Skilleter y Kekwick, 1971) e hígado de cerdo (Popják, 1969; Beytía, 1972). Además, la descarboxilasa difosfomevalónica ha sido purificada a homogeneidad a partir de hígado de rata (Shama Bhat y Ramasarma, 1980) y de hígado de pollo (Alvear y col., 1982).

Las descarboxilasas obtenidas de diferentes fuentes presentan algunas propiedades semejantes tales como pH óptimo, requerimiento de metales y de nucleótidos. Así, las enzimas de látex de Hevea brasiliensis (Skilleter y Kekwick, 1971), hígado de cerdo (Popják, 1969), cerebro de

rata (Ramachandran y Shah, 1977), hígado de rata (Shama Bhat y Ramasarma, 1980), e hígado de pollo (Alvear y col., 1982) requieren, para su actividad, la presencia de un metal bivalente, siendo Mg^{+2} o Mn^{+2} casi igualmente efectivos. En cuanto al requerimiento de nucleótidos, estas enzimas presentan una marcada preferencia por el ATP.

El intervalo óptimo de pH para la enzima de hígado de pollo se extiende de 4,0 a 7,0 (Alvear y col., 1982). Este óptimo de pH es algo diferente del encontrado para las enzimas de hígado de rata (Shama Bhat y Ramasarma, 1980), cerebro de rata (Ramachandran y Shah, 1977) y látex de Hevea brasiliensis (Skilleter y Kekwick, 1971) las cuales presentan pH óptimos en el intervalo de 5,3 a 6,5. Es de interés recalcar que estos autores emplearon solo amortiguadores citrato y fosfato para sus determinaciones y que se demostró con posterioridad que el citrato inhibe a las enzimas de pollo y de rata a valores de pH inferiores a 5,0 (Alvear y col., 1982).

La descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo tiene un peso molecular de 85.000 ± 2.000 y está compuesta de dos subunidades (Alvear y col., 1982), a diferencia de lo publicado para la enzima de hígado de rata, la cual es un tetramero de peso molecular de 126.000 (Shama Bhat y Ramasarma, 1980).

La enzima de hígado de pollo presenta cinética hiperbólica para ambos sustratos, con K_m verdaderas de $1,41 \times 10^{-5}$ M para el MVAPP y de $5,04 \times 10^{-4}$ M para el ATP. La representación gráfica de los datos cinéticos indica un mecanismo secuencial para la unión de los sustratos a la enzima (Alvear y col., 1982).

Estudios realizados por Ramachandran y Shah (1976) hicieron suponer que la descarboxilasa difosfomevalónica pudiera desempeñar un papel regulador en la biosíntesis de isoprenoides en mamíferos. Estos autores observaron que la fosforilación del MVA y del MVAP no era diferente en preparaciones de hígado de ratas lactantes y destetadas, mientras que la descarboxilación del MVA resultó ser mucho más alta en ratas destetadas, sugiriendo entonces una influencia del estado nutricional del animal sobre la descarboxilasa difosfomevalónica.

Sin embargo, estudios fisiológicos realizados en hígado de rata han indicado que la descarboxilasa difosfomevalónica, al igual que las dos quinasas que la preceden en la biosíntesis del colesterol, presentan variaciones en su actividad de acuerdo al estado hormonal o nutricional del animal. Así, se ha demostrado que la actividad de estas enzimas (quinasa mevalónica, quinasa fosfomevalónica y descarboxilasa difosfomevalónica) disminuye, al igual que la colesterogénesis hepática, cuando las ratas se someten a ayuno, se alimentan con una dieta que contiene colesterol o se les induce diabetes mediante estreptozotocina. Por el contrario, las actividades de estas enzimas aumentan cuando los animales se alimentan con una dieta que contiene colestiramina. De esta forma se demuestra que la descarboxilasa difosfomevalónica se comporta en forma similar a otras enzimas de la vía, lo que sugiere que la regulación de la biosíntesis del colesterol se realiza por variaciones concertadas de grupos de enzimas de la ruta (Jabalquinto y Cardemil, 1981).

Aún cuando la descarboxilasa difosfomevalónica no presente un papel regulador en la biosíntesis de isoprenoides en mamíferos, la enzima

presenta un gran interés desde el punto de vista de su mecanismo de acción, ya que existen pocas descarboxilaciones similares a ésta dentro de las reacciones del metabolismo intermediario. La reacción catalizada por la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica pudiera considerarse una de las más similares, aún cuando en este caso se libera un producto fosforilado a expensas del ATP, el fosfoenolpiruvato.

Desde el punto de vista de la química orgánica, la descarboxilación del MVAPP podría considerarse una reacción análoga a la descarboxilación, en acetona y en medio alcalino, del derivado dibromado del ácido trans-cinámico (el 2,3-dibromo-3-fenilpentanoico) para dar β -bromoestireno (Cristol y Norris, 1953). En este caso, la descarboxilación produce exclusivamente cis- β -bromoestireno, lo que indica una eliminación del carboxilo y del bromuro de tipo anti, en analogía a la eliminación de los grupos carboxilo e hidroxilo del MVAPP en la reacción catalizada enzimáticamente (Cornforth y col., 1966).

El mecanismo de la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfo-mevalónica continúa siendo un interrogante, a pesar de que los primeros estudios al respecto se hicieron a comienzos de la década de 1960. En estos estudios, Konrad Bloch y su grupo (Lindberg y col., 1962), pudieron demostrar que al usar $[3-^{18}O]$ MVAPP con una preparación obtenida de levaduras, el oxígeno del grupo hidroxilo en la posición tres del MVAPP se transfiere, luego de la descarboxilación, al fosfato inorgánico liberado. Sobre la base de este experimento, los autores sugirieron dos posibles mecanismos para la reacción de descarboxilación, como puede verse en la Figura 1.

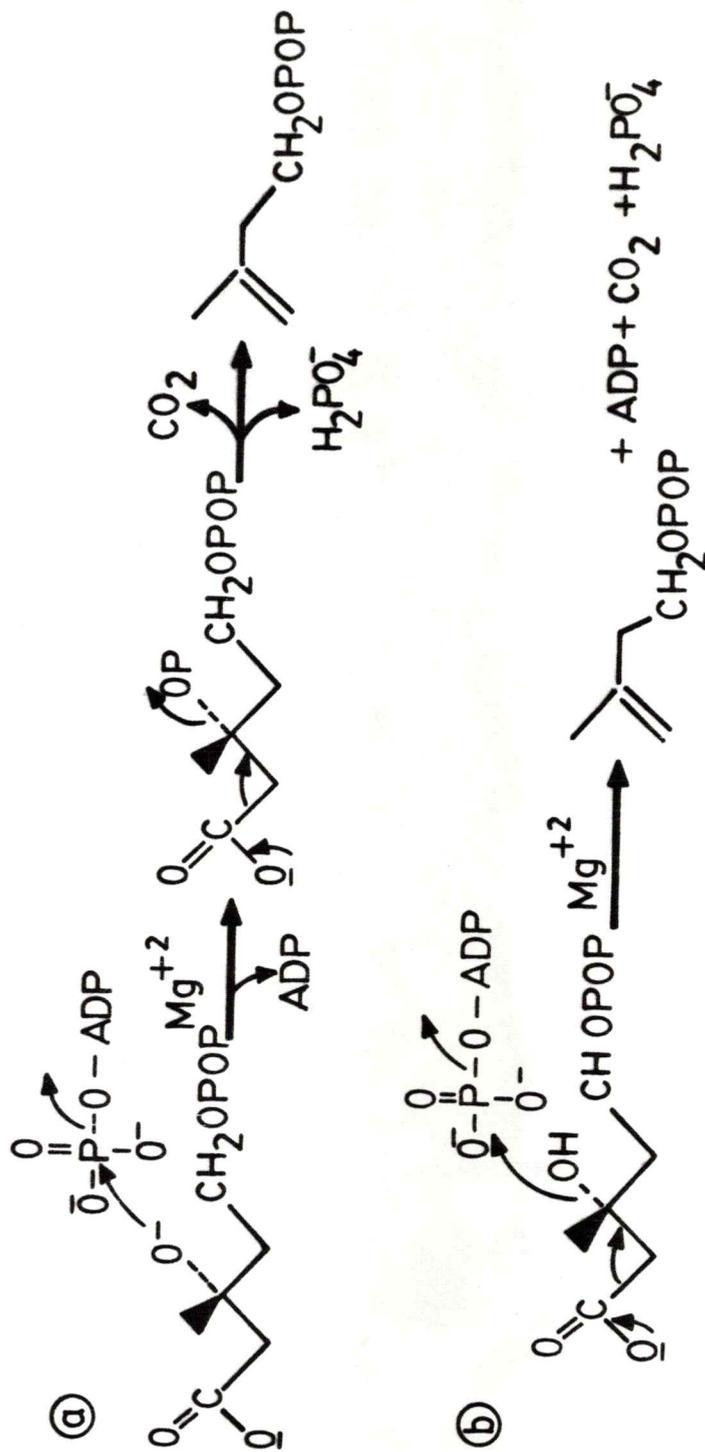


Figura 1. Posibles mecanismos de descarboxilación del MVAPP.

Se representan los mecanismos (a) a través de un intermediario trifosforilado y (b) concertado.

Los dos mecanismos propuestos difieren en que en uno de ellos (Figura 1a) hay formación de un intermediario trifosforilado y en el otro (Figura 1b) la descarboxilación, la rotura del enlace C-O, y la formación del enlace O-P son procesos concertados. En este último caso el ATP no está actuando como un agente fosforilante sino que solo está proporcionando, a través de su fosforilo terminal, un agente electrófilo capaz de atraer electrones desde el enlace C₃-O del MVAPP para generar de esa manera un centro de cargas positivas en el C₃ y favorecer entonces la descarboxilación y formación del enlace doble. Respecto a estos mecanismos, es de interés hacer notar que Popják (1969) informa que, al usar una preparación de descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de cerdo, la formación de CO₂ y de ADP aparecen como procesos sincronizados en un amplio intervalo de pH, lo que apoya el mecanismo concertado de la Figura 1b. Sin embargo, aún cuando el mecanismo fuese el de la Figura 1a, sería muy difícil demostrar que existe un retraso entre la producción de ADP y la de CO₂ con el equipo descrito por Popják (1969). Un intento de atrapar un posible intermediario trifosforilado usando un análogo no descarboxilable del MVAPP dió resultados negativos (Hellig, 1962).

Uno de los factores que ha impedido estudiar el mecanismo de acción de esta enzima ha sido la falta de una preparación estable y de alto grado de pureza. Al respecto es interesante destacar que la descarboxilasa de hígado de rata ha sido purificada a homogeneidad, pero la preparación obtenida es extremadamente inestable, ya que pierde el 99% de su actividad en 12 horas (Shama Bhat y Ramasarma, 1980). Por otra parte,

Alvear y col. (1982) han obtenido, a partir de hígado de pollo, una preparación altamente purificada cuya actividad específica es cien veces mayor que la de la enzima homogénea de hígado de rata (Shama Bhat y Ramasarma, 1980). La proteína de hígado de pollo es homogénea en electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas, sin embargo mediante electroforesis en condiciones desnaturantes se observa una proteína contaminante (15% de la proteína total). Esta preparación enzimática puede mantenerse un año a -20° sin pérdida de actividad y no requiere, para su actividad o estabilidad, la presencia de reactivos que contengan sulfhidrilos (Cardemil y Jabalquinto, 1985).

En nuestro laboratorio nos ha interesado estudiar el mecanismo de acción de la descarboxilasa difosfomevalónica primeramente desde el punto de vista químico. Mediante experimentos de modificación química realizados con un reactivo específico para argininas (fenilgloxal) hemos demostrado que la enzima de hígado de pollo se inactiva rápidamente siguiendo una cinética de pseudo-primer orden. La enzima parcialmente modificada no presenta una variación significativa en las K_m aparentes para ambos sustratos, sugiriendo que en tales circunstancias solo son activas las moléculas de enzima no modificadas por el reactivo. Tanto el MVAPP como el ATP protegen totalmente de la inactivación lo que sugiere que la arginina esencial está en o cerca del sitio activo (Jabalquinto y col., 1983).

Aún cuando la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo no requiere para su actividad la adición de reactivos que contengan sulfhidrilos (Cardemil y Jabalquinto, 1985), la enzima se inactiva con reactivos altamente selectivos para grupos sulfhidrilos tales como DTNB y metil-

metanotiosulfonato (Alvear y col., 1986).

La inactivación con metilmetanotiosulfonato es de pseudo-primer orden a todas las concentraciones del inactivador empleadas. El orden de la reacción (respecto al inactivador) es de dos, lo que indica que la modificación de dos grupos tioles por sitio activo es necesaria para producir la inactivación. Al respecto es interesante hacer notar que la enzima es también inactivada por reactivos específicos para ditiolos vecinos como arsenito y Cd^{+2} . Estos resultados sugieren la presencia de un grupo ditiol vecino en la enzima (Alvear y col., 1986).

Recientemente, Iyengar y col. (1986) investigaron el mecanismo de transferencia del grupo fosforilo terminal del ATP al oxígeno del C_3 del MVAPP, llevando a cabo la reacción en presencia del isómero (S_p)-adenosina-5'-0-[3- $^{17}\text{O}_2$, ^{18}O]-tiotriofosfato en lugar del ATP. Los autores encontraron que el tiofosfato producido en la reacción enzimática tenía configuración R_p , con lo que se demuestra que la reacción enzimática ocurre con inversión de la configuración en el P. Este resultado apoya fuertemente un mecanismo de transferencia directa del fosforilo γ del ATP al hidroxilo terciario del MVAPP.

Anteriormente señalamos que la descarboxilación y deshidratación catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica es única dentro de las reacciones del metabolismo intermediario, guardando cierta analogía solo con la reacción catalizada por la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica. Cabe entonces destacar la presencia de un ditiol vecino en la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica obtenida de citosol de rata (Carlson y col., 1978) y en la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo

(Alvear y col., 1980). Además, tanto la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica (Iyengar y col., 1980) como la catalizada por la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica mitocondrial (Sheu y col., 1984) ocurren con inversión de la configuración en el fósforo. Por otra parte se han encontrado residuos de arginina en el sitio activo de la descarboxilasa difosfomevalónica (Jabalquinto y col., 1983) y de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de levaduras (Malebran y Cardemil, 1980).

En esta tesis se presenta una primera aproximación al estudio del mecanismo de acción de la descarboxilasa difosfomevalónica, desde un punto de vista cinético, que incluye los siguientes objetivos :

- Determinar cuál o cuáles de los complejos del ATP y magnesio ($MgATP^{-2}$ o $MgHATP^{-}$) son sustratos en la reacción enzimática. Además, determinar los efectos del metal libre y del ATP libre.
- Dilucidar el mecanismo cinético de la reacción catalizada por la enzima, por medio de estudios cinéticos de inhibición de punto muerto y de inhibición por los productos.
- Determinar el tipo de interacción entre el magnesio y los fosforilos del ATP en el sustrato, por medio de un estudio cinético usando análogos azufrados del ATP o complejos de sustitución inertes del CrATP.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

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

- Aldrich Chemical Co., Wisconsin, EE.UU. : Isopentenol.
- Amersham Co., Illinois, EE.UU. : $[3-^{14}\text{C}]$ MVAP, $[8-^{14}\text{C}]$ ATP y $[8-^{14}\text{C}]$ ADP.
- Boehringer Mannheim, Alemania Federal : Acetato quinasa (E. coli), mioquinasa (músculo de conejo), aldolasa (músculo de conejo), TPI (músculo de conejo), PK (músculo de conejo), G3PDH (levadura), LDH (músculo de conejo), fructosa-1,6-bisfosfato, CTP, ITP, GTP, UTP, NAD^+ , $\text{ATP}\gamma\text{S}$, AMP-PCP y acetilfosfato.
- J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N.J. EE.UU. : Trietanolamina.
- Merck A.G., Darmstadt, Alemania Federal : Amoníaco, trietilamina, HCl y 2-mercaptoetanol.
- Research Products International Corp., Illinois, EE.UU. : POPOP y PPO.
- Sigma Chemical Co., St Louis, M.O. EE.UU. : NADH, ATP, PEP, piruvato, lactona del ácido (R,S)mevalónico, DTT, Tris-base, MgCl_2 , MnCl_2 , CdCl_2 , ZnCl_2 , EDTA, MES, Bistrispropano, AMP, KCl, Dowex-50W, DEAE-Sephadex A-25.
- Whatman Ltd., Kent, Inglaterra : Papel DE-81.

El tiofosfato fue gentilmente proporcionado por la Dra R. Iyengar (Institute for Enzyme Research, EE.UU.), en tanto que el $(R_p)\text{ATP}\gamma\text{S}$ y el $(S_p)\text{ATP}\gamma\text{S}$ fueron gentilmente cedidos por el Dr F. Eckstein (Max-Planck Institut).

Determinación de la actividad enzimática.

La actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica se determinó por medio de dos métodos de ensayo.

1. Ensayo espectrofotométrico para determinar ADP.

El método usado consistió en medir el ADP generado en la reacción mediante el acoplamiento de las reacciones catalizadas por la PK y la LDH, y que ha sido usado extensamente para medir reacciones enzimáticas en las que se produce ADP (Kornberg y Price, 1951 ; Cleland, 1979a). Experimentalmente se midió en forma continua la desaparición de NADH a 30° y 340 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 3, provisto de registrador, utilizando cubetas de cuarzo de 1 mL de volumen y 1 cm de paso óptico.

La mezcla de reacción estándar contenía en un volumen final de 1 mL : amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,0, KCl 100 mM, ATP 5 mM, MgCl₂ 6 mM, NADH 0,23 mM, PEP 0,5 mM, PK 6,5 unidades, LDH 11,8 unidades y MVAPP 0,15 mM. La reacción se inició con la adición de la enzima. En los experimentos cinéticos descritos más adelante, las concentraciones del ATP, MVAPP y MgCl₂ se variaron según los propósitos del ensayo.

El ensayo se efectuó siempre en condiciones tales que la actividad de las enzimas auxiliares no fuera limitante de la velocidad bajo ninguna condición usada. De igual modo, se comprobó que la concentración de producto variaba linealmente con respecto al tiempo y a la concentración de proteínas en el ensayo.

2. Ensayo para determinar P_i.

Este método se basa en la determinación del P_i producido en la

reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica (Cardemil y Jabalquinto, 1985). La mezcla de reacción estándar contenía en un volumen de 0,5 mL : amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,0, KCl 100 mM, ATP 5 mM, MgCl₂ 6 mM y MVAPP 0,44 mM. La reacción se inició con la adición de la enzima, y luego de 6 minutos de reacción a 30° la reacción se detuvo agregando 0,2 mL de EDTA 0,1 M pH 7,0. El P_i producido se determinó en una alícuota de 0,050 mL según lo descrito por Lanzatta y col. (1979).

Una unidad de enzima corresponde a la cantidad de enzima que descarboxila un μ mol del MVAPP por minuto en las condiciones de los ensayos 1 y 2.

Purificación de la descarboxilasa difosfomevalónica.

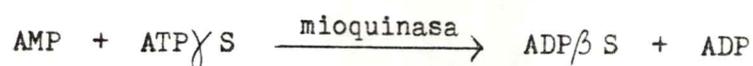
El procedimiento usado para la purificación de la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo fue el descrito por Cardemil y col. (Cardemil, 1982; Cardemil y Jabalquinto, 1985). Se obtuvieron preparaciones de enzima cuya actividad específica varió entre 6 a 7 unidades por mg de proteína.

Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bensadown y Weinstein (1976), usando seroalbúmina bovina como estándar.

Síntesis de ADP β S.

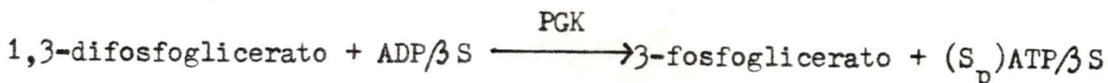
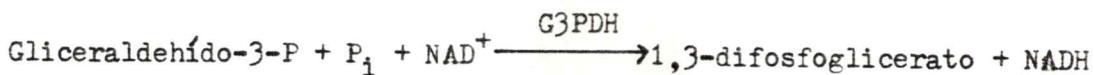
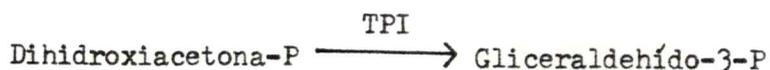
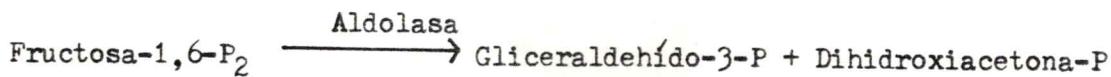
El ADP β S fue sintetizado de acuerdo a la siguiente reacción :



El método empleado en esta síntesis fue el descrito por Sheu y col. (1984). La mezcla de reacción en un volumen final de 83 mL contenía : amortiguador trietanolamina-HCl 36 mM pH 8,0, ATP γ S 1,81 mM, AMP 37 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, mioquinasa 3.330 unidades. La mezcla de reacción se incubó a 25° durante 6 horas, al cabo de este tiempo la reacción se detuvo por congelamiento.

Síntesis de (S_p)ATP/βS.

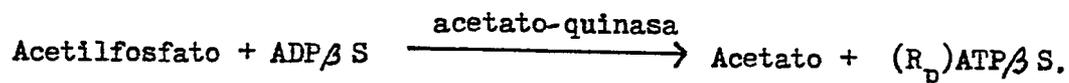
El isómero S_p del ATP/βS fue sintetizado de acuerdo a lo descrito por Webb y Trentham (1980). La secuencia de reacciones enzimáticas se indica a continuación :



La mezcla de reacción en un volumen de 20 mL contenía : amortiguador trietanolamina-HCl 40 mM pH 8,0, ADP/βS 1,5 mM, NAD⁺ 0,1 mM, P_i 10 mM, fructosa-1,6-P₂ 15,5 mM, piruvato 24 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 40 mM, LDH 166 unidades, G3PDH 640 unidades, PGK 1228 unidades, TPI 270 unidades, aldolasa 64 unidades. La mezcla de reacción se incubó a 25° durante 7 horas, al cabo de este tiempo la reacción se detuvo por congelamiento.

Síntesis de $(R_p)ATP/\beta S$.

El isómero R_p del $ATP/\beta S$ se sintetizó enzimáticamente mediante la reacción estereoespecífica catalizada por la acetato-quinasa :



La metodología empleada fue la descrita por Sheu y col. (1984). La mezcla de reacción en un volumen final de 14 mL contenía : amortiguador trietanolamina-HCl 50 mM pH 7,8, $ADP/\beta S$ 4,8 mM, acetilfosfato 70,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, acetato-quinasa 2.000 unidades. La mezcla de reacción se incubó a 25° durante 8 horas, al cabo de este tiempo la reacción se detuvo por congelamiento.

Síntesis de $ATP\gamma S$.

Inicialmente este compuesto fue obtenido comercialmente y debió ser purificado mediante cromatografía de intercambio aniónica como se describe más adelante. Posteriormente este compuesto fue sintetizado según lo descrito por Webb y Trentham (1980). Esta síntesis es idéntica a la descrita para el $(S_p)ATP/\beta S$, con la excepción que en este caso se utiliza tiofosfato y ADP en lugar de Pi y $ADP/\beta S$.

Purificación de los tionucleótidos.

Los tionucleótidos cuyas síntesis se han descrito anteriormente fueron purificados mediante cromatografía de intercambio aniónico en columnas de DEAE-Sephadex A-25 (2,2 x 40 cm) equilibradas en amortiguador trietilamina-bicarbonato 0,2 M pH 7,6. Las columnas fueron eluidas a 4°

con gradientes lineales de concentración del mismo amortiguador, cuyas concentraciones fueron las siguientes :

1. Para $\text{ATP}\gamma\text{S}$; gradiente entre 0,2 y 0,55 M (2 L cada una).
2. Para $\text{ADP}\beta\text{S}$; gradiente entre 0,2 y 0,4 M (2 L cada una).
3. Para (R_p) y $(S_p)\text{ATP}\beta\text{S}$; gradiente entre 0,2 y 0,45 M (1,5 L cada una).

Los eluidos de las columnas se analizaron midiendo la absorbancia a 260 nm; a la vez los tionucleótidos que contenían grupos tiofosfatos terminales se analizaron mediante su reacción con DTNB de acuerdo a lo indicado por Richard y Frey (1982). Las fracciones que contenían el nucleótido de interés se concentraron a casi sequedad en un evaporador rotatorio a no más de 30°. Estos residuos se disolvieron en un volumen pequeño de metanol y se evaporaron nuevamente a sequedad, este proceso se repite dos veces, con el fin de eliminar trazas del amortiguador. Los tionucleótidos se disolvieron en agua bidestilada y se guardaron a -15°.

La pureza de estos tionucleótidos se verificó mediante cromatografía líquida de alta presión usando un cromatógrafo Waters modelo 440 con una columna Waters Novapak C_{18} (3,9 x 15 cm).

Preparación y purificación del complejo γ -monodentado de CrATP.

La preparación del complejo γ -monodentado de CrATP se llevó a cabo según lo descrito por Dunaway-Mariano y Cleland (1980a). A una mezcla de 50 mL de ATP 50 mM y 50 mL de CrCl_3 50 mM se agregaron 0,4 L de agua a 85° para dar una temperatura final de 76°. Se mantuvo a esta temperatura por dos minutos, se enfrió rápidamente en agua con hielo y se aplicó a una columna (2,1 x 23 cm) de Dowex 50- H^+ (malla 100-200, previamente la-

vada con solución de Br_2 en KOH , tratada luego con HCl 6 N y lavada finalmente con agua). La columna se lavó con 2 L de agua hasta obtener una buena separación de las tres bandas coloreadas. La banda intermedia se extrajo y de ella se eluyó el CrATP monodentado con anilina 0,3 M. La anilina se eliminó de la solución de CrATP con éter. El éter disuelto en la fase acuosa se eliminó mediante una corriente de nitrógeno.

El espectro UV-visible del compuesto reveló máximos de absorción en 259 nm, 420 nm y 595 nm, con un hombro en 670 nm y un mínimo en 498 nm. Estos valores se comparan razonablemente bien con lo publicado por Dunaway-Mariano y Cleland (1980a) para el complejo γ -monodentado de CrATP. El análisis de Cr (Postmus y King, 1955) y el de fósforo total (Ames, 1966) revelaron la existencia de 0,87 moles de Cr y 3,2 moles de fósforo por mol de adenosina (determinada espectrofotométricamente a 260 nm).

Preparación y purificación del complejo β, γ -bidentado de CrATP.

La preparación de este complejo se realizó según Dunaway-Mariano y Cleland (1980a). Se mezclaron 250 mL de ATP 20 mM con 250 mL de CrCl_3 20 mM, a 4°. Se ajustó el pH a 5,7 con una solución saturada de KHCO_3 y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se ajustó el pH a 2,0 con HCl 6 N y se aplicó a una columna de Dowex 50- H^+ (2,1 x 23 cm) que había sido tratada en la forma descrita anteriormente. Se lavó con agua destilada hasta obtener una buena resolución de las tres bandas coloreadas, se eliminaron las dos superiores y la banda inferior se eluyó con anilina 0,3 M, la que se eliminó por extracción con éter.

El espectro UV-visible reveló máximos en 260 nm, 425 nm y 605 nm,

con un hombro en 678 nm y un mínimo en 505 nm, valores que están de acuerdo con lo publicado para el complejo β, γ -bidentado de CrATP (Dunaway-Mariano y Cleland, 1980a). El análisis de Cr y fósforo total indicó 1 mol de Cr y 3,4 moles de fósforo por mol de adenosina.

Síntesis de mevalonato-5-fosfato.

El MVAP fue sintetizado enzimáticamente a partir del ácido mevalónico empleando una preparación parcialmente purificada de quinasa mevalónica de hígado de cerdo. La metodología empleada fue la descrita por Bazaes (1977, 1980). Se obtuvo un rendimiento del 35% con respecto al (R)MVA presente en el medio de incubación original (El MVA comercial es una mezcla racémica (R,S) y la quinasa mevalónica utiliza sólo el isómero R).

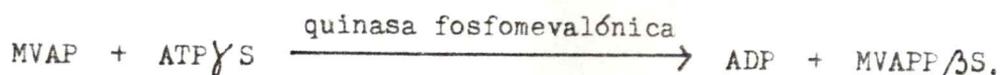
Síntesis de mevalonato-5-difosfato.

El MVAPP se sintetizó de acuerdo a lo descrito en nuestro laboratorio (Cardemil, 1982; Cardemil y Jabalquinto, 1985). El método consiste en la fosforilación del ácido mevalónico utilizando una mezcla de quinasas mevalónica y fosomevalónica, y el MVAPP producido es posteriormente purificado mediante cromatografía de intercambio iónico. El rendimiento obtenido fue del 48% con respecto al (R)MVA presente en el medio de incubación original.

Síntesis de MVAPP/ β S.

El MVAPP/ β S se sintetizó enzimáticamente (Jabalquinto y Cardemil,

1985) mediante la reacción catalizada por la quinasa fosfomevalónica :



La mezcla de reacción a 30° en un volumen final de 30 mL contenía : amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, ATP γ S 1,45 mM, MVAP 8,8 mM, MgCl₂ 5 mM, [3-¹⁴C]MVAP 7,6 x 10⁶ cpm, 2-mercaptoetanol 10 mM, quinasa fosfomevalónica 12 unidades. La producción de ADP fue determinada a distintos intervalos de tiempo, en alícuotas de 0,01 mL mediante el ensayo acoplado de la PK y LDH. Luego de 140 minutos, cuando la cantidad de ADP formada (31,8 μ moles) correspondía al 88% del rendimiento teórico (basado en la constante de equilibrio de 1 para la reacción catalizada por la quinasa fosfomevalónica (Eyzaguirre y Bazaes, 1985)), la reacción se detuvo por calentamiento en bañomaría hirviente por 3 minutos, se enfrió en hielo y se eliminó la proteína precipitada, centrifugando a 4° por 15 minutos a 23.000 g.

Purificación y caracterización del MVAPP/ β S.

El sobrenadante, obtenido como se describió en el punto anterior, se diluyó con agua destilada para bajar su conductividad a 2,9 mS y se aplicó con un flujo de 45 mL/hr a una columna de DEAE-Sephadex A-25 (1,5 x 40 cm) equilibrada en amortiguador trietilamina-bicarbonato 0,1 M pH 7,6. La columna, a 4°, se lavó con 100 mL del amortiguador y luego se aplicó un gradiente lineal de concentración entre 0,1 y 0,6 M (1 L cada una), colectándose fracciones de 15,5 mL.

El perfil de elución de la columna se muestra en la Figura 2. Los picos 1, 3 y 5 no fueron analizados ya que se supuso que correspondían

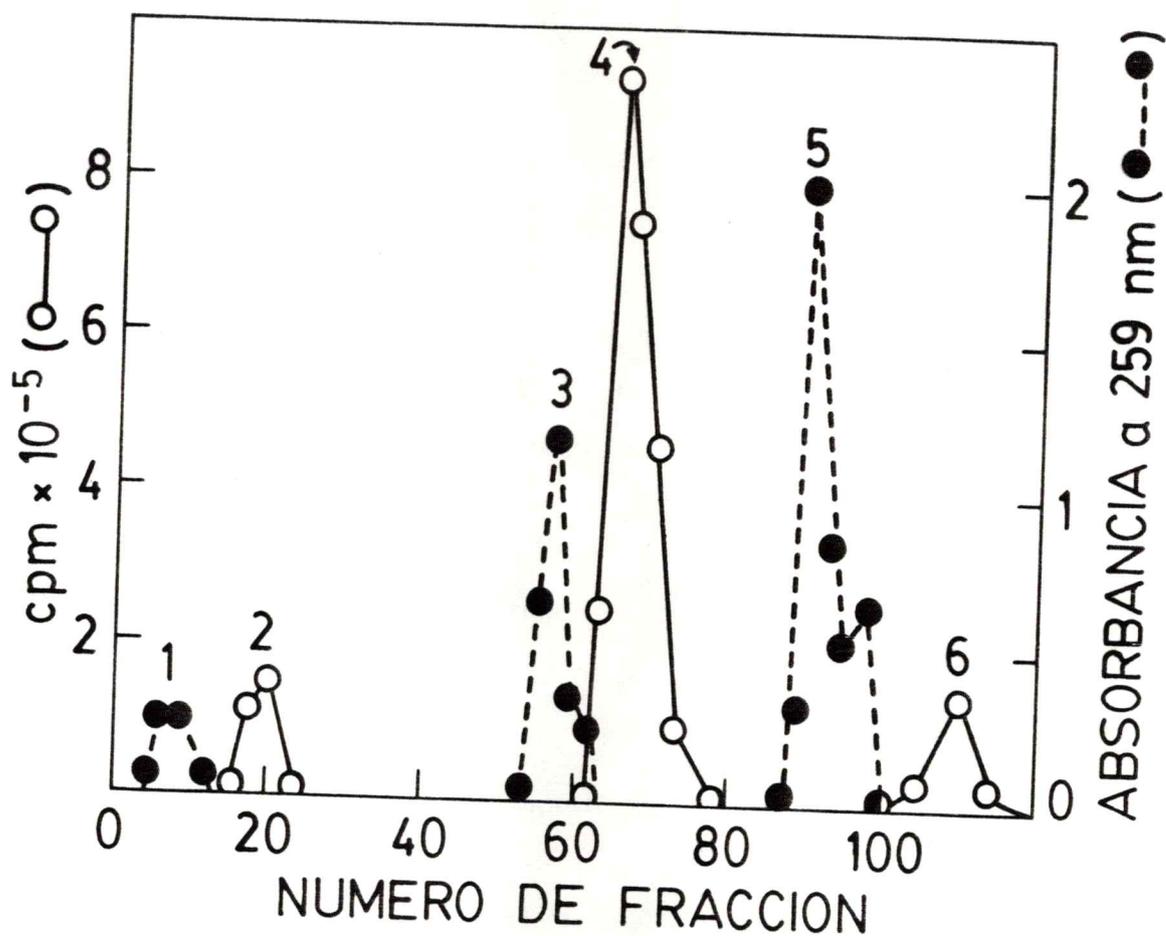


Figura 2. Cromatografía del MVAPP β S en una columna de DEAE-Sephadex A-25.

Las condiciones de la columna se describen detalladamente en el texto.

a nucleótidos remanentes. Las fracciones correspondientes a los picos 2, 4 y 6 se juntaron y se concentraron separadamente en un evaporador rotatorio a 30°. El amortiguador remanente fue eliminado agregando 2 a 3 volúmenes de metanol y re-evaporando. Los productos se disolvieron en agua y se analizaron en forma independiente.

Los picos 2 y 4 se identificaron como MVA y MVAP, respectivamente, mediante cromatografía de intercambio iónico en papel DE-81 (Eyzaguirre y Bazaes, 1985), y por medio de análisis enzimáticos.

Se demostró que el pico 6 correspondía a un éster pirofosfórico del MVA mediante la hidrólisis de una muestra de él en HCl 1N por 7 minutos en bañomaría hirviente. En estas condiciones, los pirofosfatos orgánicos se hidrolizan totalmente al correspondiente monofosfato más P_i (Clark y Switzer, 1977). El producto de este tratamiento fue analizado mediante cromatografía en papel Whatman 1 usando como sistema de desarrollo ter-butanol : ácido fórmico : agua (20 : 5 : 8) (Jabalquinto y Cardemil, 1981). El análisis del cromatograma mostró que el 100% de la radiactividad co-cromatografiaba con MVAP estándar.

La identidad del pico 6 como MVAPP/ β S fue corroborada mediante un análisis de NMR. La Tabla 1 muestra los valores correspondientes a los corrimientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (J) para MVAPP y MVAPP/ β S. Se puede apreciar un cambio en el corrimiento químico correspondiente a las resonancias de P_β de estos dos compuestos, en tanto que el corrimiento químico correspondiente al P_α de MVAPP y de MVAPP/ β S no varía. Por otra parte estos valores se comparan razonablemente bien con lo descrito en la literatura para ADP y ADP/ β S.

Tabla 1

ANÁLISIS DE ^{31}P -NMR DE LOS ACIDOS DIFOSFOMEVALONICOS^a

Compuesto	δ (ppm)		$J_{\alpha/\beta}$ (Hz)
	P_{α}	P_{β}	
MVAPP	-9,97	-5,48	22,3
MVAPP β S	-10,73	33,00	30,5
ADP ^b	-10,40	-6,20	19,5
ADP β S ^b	-11,50	34,00	29,8

^a
El análisis de ^{31}P -NMR se realizó de acuerdo a Jabalquinto y Cardemil (1985).

^b
Valores para los complejos con magnesio, tomado de Lee y O'Sullivan (1985b).

La cuantificación del análogo azufrado del MVAPP se logró mediante dos métodos diferentes. En una muestra de 0,025 mL se determinó el contenido de fósforo total (Ames, 1966) y se obtuvo una cantidad de 52 nmoles de fósforo. Una segunda muestra (0,025 mL) se empleó como sustrato de la descarboxilasa difosfomevalónica y cuando la reacción llegó a término (2 horas) se determinaron las cantidades de ADP y de P_i producidas, se encontraron 27 y 29 nmoles, respectivamente. Estos resultados están dentro de lo esperado considerando que la hidrólisis total de un mol de MVAPP produce dos moles de P_i y que en la reacción enzimática por cada mol de MVAPP que se descarboxila se produce un mol de P_i y un mol de ADP. Se obtuvo una cantidad total de 16 μ moles de MVAPP β S, lo que representa un rendimiento total de 37% con respecto al ATP γ S presente en el medio de incubación original.

Preparación y purificación de CrMVAPP.

El derivado cromado del MVAPP se preparó a partir del MVAPP usando la técnica descrita para la preparación de derivados cromados de compuestos inestables (Dunaway-Mariano y Cleland, 1980a).

A 37 mL de MVAPP 10 mM se le agregaron 37 mL de $CrCl_3$ 10 mM a 4°. Se ajustó el pH a 5,7 con HCl 0,5 M y se agitó 30 minutos a temperatura ambiente; luego se enfrió a 4° y se ajustó el pH a 2,0 con HCl 0,5 M. Se aplicó a una columna (1,3 x 12,5 cm) de Dowex-50 H^+ (tratada como se describió en la preparación del complejo γ -monodentado del CrATP). La columna se lavó con 200 mL de agua hasta obtener una buena separación de las dos bandas coloreadas. La banda inferior fue extraída y de ella

Preparación de materiales para cromatografía.

En la preparación y regeneración de las resinas se siguieron las instrucciones señaladas por los fabricantes.

Cálculo de las concentraciones del nucleótido libre, del metal libre y del complejo metal-nucleótido.

Las concentraciones de los complejos metal-nucleótido, metal-tionucleótido, del metal libre y del nucleótido libre se calcularon mediante el programa de computación descrito por Storer y Cornish-Bowden (1976).

Las reacciones consideradas en estos cálculos junto con los valores de las constantes de asociación, determinadas a 30° y a una fuerza iónica igual a 0,1 M, se muestran en la Tabla 2. Como no fue posible encontrar en la literatura valores para las constantes de asociación de $\text{ZnATP}\beta\text{S}^{-2}$ y de $\text{ZnHATP}\beta\text{S}^{-}$ se decidió usar los mismos valores que para ZnATP^{-2} y ZnHATP^{-} .

O'Sullivan y Smithers (1979) han indicado que las constantes de estabilidad para MgMVAP y MgMVAPP se pueden considerar las mismas que para los complejos MgAMP y MgADP^{-} , respectivamente. En consecuencia, en nuestros estudios para los complejos metal-MVAPP se consideraron los valores de las constantes de asociación informados para los complejos metal-ADP.

se eluyó el CrMVAPP con anilina 0,3 M, la que se eliminó por extracción con éter.

El análisis de Cr (Postmus y King, 1955) y el de fósforo total (Ames, 1966) revelaron la existencia de 1 mol de Cr y 2 moles de fósforo en el complejo.

La cuantificación del CrMVAPP se realizó incubando una muestra del complejo con EDTA 0,3 M a bañomaría hirviente por 3 minutos (Bosard y col., 1980); como resultado de este proceso el CrMVAPP se disoció en MVAPP y CrEDTA. Este MVAPP fue titulado enzimáticamente mediante la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica.

Síntesis de isopentenildifosfato.

El IPP fue sintetizado químicamente mediante fosforilación del isopentenol con fosfato de bis-trietilamonio en presencia de CCl_3CN (Edmond y col., 1971).

La reacción de fosforilación se detuvo agregando 50 mL de NH_3 al 0,5%, luego el isopentenol no reaccionante y otros subproductos se extrajeron con tres porciones de 80 mL cada una de éter etílico. La fracción acuosa se concentró en evaporador rotatorio a 40° y se extrajo con n-propanol : NH_3 (2 : 1). Con este tratamiento precipitan los fosfatos inorgánicos, los que fueron separados por centrifugación a 10.000 g durante 15 minutos. La separación de los fosfatos orgánicos se efectuó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A-25 según lo descrito por Rojas y col. (1983) y Pérez (1985).

Tabla 2.

COMPLEJOS FORMADOS POR LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA DE ENSAYO PARA LA DESCARBOXILASA DIFOSFOMEVALONICA AL USAR ATP, ATP α S O ATP β S EN PRESENCIA DE DIVERSOS IONES METALICOS BIVALENTES.

Reacción	K _{asociación} (M ⁻¹)	Referencia
ATP ⁻⁴ + H ⁺ \leftrightarrow HATP ⁻³	4,3 x 10 ⁰	Pecoraro y col., 1984
ATP β S ⁻⁴ + H ⁺ \leftrightarrow HATP β S ⁻³	4,4 x 10 ⁶	" " "
ATP α S ⁻⁴ + H ⁺ \leftrightarrow HATP α S ⁻³	4,5 x 10 ⁶	" " "
HATP ⁻³ + H ⁺ \leftrightarrow H ₂ ATP ⁻²	8,5 x 10 ³	" " "
ATP ⁻⁴ + Mg ⁺² \leftrightarrow MgATP ⁻²	5,0 x 10 ⁴	" " "
ATP β S ⁻⁴ + Mg ⁺² \leftrightarrow MgATP β S ⁻²	1,1 x 10 ⁴	" " "
ATP α S ⁻⁴ + Mg ⁺² \leftrightarrow MgATP α S ⁻²	3,0 x 10 ⁴	" " "
HATP ⁻³ + Mg ⁺² \leftrightarrow MgHATP ⁻	0,2 x 10 ²	" " "
HATP β S ⁻³ + Mg ⁺² \leftrightarrow MgHATP β S ⁻	2,8 x 10 ²	" " "
HATP α S ⁻³ + Mg ⁺² \leftrightarrow MgHATP α S ⁻	8,7 x 10 ²	" " "
ATP ⁻⁴ + Cd ⁺² \leftrightarrow CdATP ⁻²	2,3 x 10 ⁴	" " "
ATP α S ⁻⁴ + Cd ⁺² \leftrightarrow CdATP α S ⁻²	8,3 x 10 ²	" " "
HATP ⁻³ + Cd ⁺² \leftrightarrow CdHATP ⁻	7,6 x 10	" " "
HATP α S ⁻³ + Cd ⁺² \leftrightarrow CdHATP α S ⁻	2,9 x 10 ²	" " "
MVAPP ⁻³ + Mg ⁺² \leftrightarrow MgMVAPP ⁻	1,3 x 10 ⁴	" " "
MVAPP ⁻³ + Cd ⁺² \leftrightarrow CdMVAPP ⁻	3,8 x 10 ³	" " "
ATP ⁻⁴ + Mn ⁺² \leftrightarrow MnATP ⁻²	1,0 x 10 ⁵	O'Sullivan y Smithers, 1979
HATP ⁻³ + Mn ⁺² \leftrightarrow MnHATP ⁻	1,0 x 10 ³	" " "
MVAPP ⁻³ + Mn ⁺² \leftrightarrow MnMVAPP ⁻	3,0 x 10 ⁴	" " "
MVAPP ⁻³ + Zn ⁺² \leftrightarrow ZnMVAPP ⁻	2,0 x 10 ³	" " "
ATP ⁻⁴ + Zn ⁺² \leftrightarrow ZnATP ⁻²	6,3 x 10 ⁴	Hubbard y col., 1985
HATP ⁻³ + Zn ⁺² \leftrightarrow ZnHATP ⁻	4,0 x 10 ²	" " "
Cl ⁻ + Mg ⁺² \leftrightarrow MgCl ⁺	3,4	Sillen y Martell, 1971
Cl ⁻ + Cd ⁺² \leftrightarrow CdCl ⁺	3,6	" " "
Cl ⁻ + Zn ⁺² \leftrightarrow ZnCl ⁺	3,6	" " "
Cl ⁻ + Mn ⁺² \leftrightarrow MnCl ⁺	3,9	" " "

Estudios de inhibición.

Las constantes de inhibición K_i y K'_i se definen de acuerdo a la siguiente ecuación (Storer y Cornish-Bowden, 1977) :

$$v = \frac{V s}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) + s \left(1 + \frac{i}{K'_i}\right)}$$

la cual expresa la velocidad inicial v en términos de s , la concentración del sustrato variable, i , la concentración del inhibidor y cuatro constantes V , K_m , K_i y K'_i . La inhibición tiene un componente competitivo si K_i es finito y el inhibidor disminuye el valor aparente de V/K_m , y tiene un componente incompetitivo si K'_i es finito y el inhibidor disminuye el valor aparente de V (Storer y Cornish-Bowden, 1977).

Análisis estadístico de los resultados.

Para la determinación de los parámetros cinéticos K_m y V se usó el programa NATO escrito por el Dr A. Cornish-Bowden (facilitado por el Dr O. Monasterio). Este programa ajusta la ecuación :

$$v = \frac{V s}{K_m + s}$$

y entrega los valores de $K_m \pm$ error estándar y de $V \pm$ error estándar.

Este programa también permite analizar los datos de experimentos de inhibición de acuerdo a los modelos de inhibición competitiva, incompetitiva y mixta. Se obtienen con este programa los valores de $K_i \pm$ error estándar (inhibición competitiva), $K'_i \pm$ error estándar (inhibición incompetitiva) y de ambas constantes en caso de inhibición mixta.

Estudios de pH.

En estos experimentos la actividad enzimática se determinó mediante el ensayo que mide el ADP, empleando en este caso un sistema amortiguador compuesto por : ácido fórmico, bistrispropano y MES; la concentración de cada uno de ellos en el medio de reacción fue de 35 mM. El pH de estos amortiguadores, entre 5,0 y 8,1, se ajustó con HCl o KOH. A valores de pH menores de 6 hay un cambio no enzimático en la absorbancia debido a la descomposición del NADH, y esta velocidad enzimática (cuyo valor máximo correspondió al 12% de la velocidad de la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica) se restó de la velocidad obtenida en presencia de la enzima.

Los parámetros cinéticos V , V/K_m y K_i , se determinaron a los distintos valores de pH y las curvas se ajustaron a los valores experimentales de acuerdo a las ecuaciones 1 o 2 con los programas de Cleland (1979b).

$$\log y = \log \left(\frac{c}{1 + K_b/H} \right) \quad (1)$$

$$\log y = \log \left(\frac{c}{1 + H/K_a + K_b/H} \right) \quad (2)$$

donde y corresponde a V , V/K_m o $1/K_i$, c es el valor independiente del pH del parámetro y , K_a y K_b son las constantes de disociación de los grupos que se ionizan y H es la concentración de protones.

El programa entrega los valores de K_a y de K_b y sus correspondientes errores estándares. El análisis de los datos de acuerdo a este programa fue efectuado por el Dr W.W. Cleland.

Especificidad del nucleótido en la reacción enzimática.

La determinación de las constantes cinéticas aparentes para los diversos nucleótidos se llevó a cabo usando el ensayo espectrofotométrico que mide el ADP y que también permite medir otros nucleósido-difosfatos. Las concentraciones de los diversos nucleósido-trifosfatos se variaron entre 0,5 a 4 veces K_m , mientras que la concentración del $MgCl_2$ se mantuvo siempre 1 mM sobre la concentración del nucleótido. De este modo se aseguró que la proporción del nucleótido presente como $MgNTP^{-2}$ fuera alta y aproximadamente constante (Storer y Cornish-Bowden, 1976).

Efecto de los metales bivalentes.

El efecto de la concentración de Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} y Zn^{+2} se determinó variando las concentraciones de estos metales entre 0 y 10 mM a una concentración constante del ATP de 1 mM. En este caso, se usó el ensayo que mide el P_i , ya que la quinasa pirúvica requiere de Mg^{+2} o Mn^{+2} para su actividad, y esto imposibilita el uso del ensayo espectrofotométrico que mide el ADP.

Determinación de las constantes cinéticas para los complejos metal-ATP.

En estos experimentos la concentración del Mg^{+2} se mantuvo siempre 1 mM sobre la concentración del ATP; las concentraciones del Cd^{+2} y del Mn^{+2} fueron equimolares con la concentración del ATP; la concentración del Zn^{+2} fue el 75% de la concentración del ATP.

Complejos de CrATP como sustratos.

Tanto el complejo γ -monodentado como el complejo β, γ -bidentado de CrATP se probaron como sustratos usando el ensayo espectrofotométrico que mide la producción del ADP, en este caso se usó amortiguador MES 100 mM pH 6,0 con el objeto de evitar la hidrólisis de estos compuestos a Cr^{+3} y ATP (Dunaway-Mariano y Cleland, 1980b).

Complejos de CrATP como inhibidores.

Para estudiar el efecto de ambos complejos de CrATP como inhibidores, los experimentos se realizaron en amortiguador MES 100 mM pH 6,0, manteniendo el resto de las condiciones del ensayo espectrofotométrico que mide el ADP, excepto que la concentración del ATP fue 1 mM y la de MgCl_2 fue 2 mM.

Análogos azufrados del ATP como sustratos.

Los diastereómeros del $\text{ATP}\alpha\text{S}$ y del $\text{ATP}\beta\text{S}$ se probaron como sustratos de la descarboxilasa difosfomevalónica usando el ensayo que mide el P_i producido en la reacción y no el método espectrofotométrico que mide la producción del ADP, pues en este último se genera constantemente ATP debido a la presencia de las enzimas auxiliares.

El volumen del medio de incubación en estos experimentos fue disminuido a 0,1 mL y la reacción se detuvo luego del tiempo adecuado con 0,1 mL de EDTA 0,1 M pH 7,0. Debido a las bajas velocidades de reacción obtenidas con estos análogos, la concentración de enzima fue mayor que la usada en los experimentos con ATP (2,5 a 10 veces para $\text{ATP}\alpha\text{S}$ y 25 a 70

veces para ATP/ β S). En experimentos preliminares se comprobó que la concentración de producto variaba linealmente con respecto al tiempo y a la concentración de proteínas en el ensayo. La concentración del Mg^{+2} se mantuvo siempre 1 mM sobre la concentración del nucleótido. Mientras que la concentración del Cd^{+2} fue equimolar con la concentración del nucleótido y la concentración del Zn^{+2} fue el 75% de la concentración del correspondiente análogo azufrado del ATP.

Para la determinación de los valores de las constantes cinéticas aparentes, la concentración del respectivo complejo (metal-nucleótido)⁻² se varió entre 0,5 a 4 veces K_m .

Análogos azufrados del ATP como inhibidores.

Para estudiar el efecto de los análogos azufrados del ATP como inhibidores, los experimentos se realizaron mediante el ensayo espectrofotométrico que mide el ADP. La concentración del Mg^{+2} fue 1 mM sobre las concentraciones del ATP y del correspondiente tionucleótido.

Inactivación de la enzima por tionucleótidos.

La reacción de inactivación se efectuó incubando la descarboxilasa difosfomevalónica con los diversos tionucleótidos, en un baño a 30° en amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,0. A tiempos adecuados se tomaron alícuotas de 0,010 mL para el ensayo inmediato de actividad mediante el método espectrofotométrico que mide el ADP. El control consistió en otra muestra de enzima a la cual se agregó el mismo volumen de agua en lugar del tionucleótido. El efecto de la concentración del reactivo se

determinó incubando la enzima con concentraciones del $(R_p)ATP/\beta S$ que variaron desde 0,34 a 2,0 mM.

Efecto protector de los sustratos y del DTT en la reacción de inactivación.

El efecto protector del MVAPP, del ATP y del DTT en la reacción de inactivación se probó agregando el $(R_p)ATP/\beta S$ a la enzima preincubada con uno u otro sustrato o con el DTT.

RESULTADOS.

EFECTOS DEL NUCLEOTIDO Y DEL METAL BIVALENTE SOBRE LA ACTIVIDAD.

El análisis cinético de las enzimas que catalizan reacciones donde participan iones metálicos y nucleótidos se complica debido a la multiplicidad de especies que pueden unirse a la enzima. En la mayoría de estos casos el sustrato es el complejo metal-nucleótido, y tanto el metal libre como el nucleótido libre pueden ejercer efectos inhibidores o activadores. Cabe recordar que la concentración de estas tres especies no puede variarse independientemente debido al equilibrio existente entre el complejo metal-nucleótido, el metal libre y el nucleótido libre.

Para estudiar las posibles interacciones de los iones metálicos bivalentes y del ATP con la descarboxilasa difosfomevalónica se usó el método de London y Steck (1969). Este método consiste en efectuar experimentos en los cuales la concentración del $MgCl_2$ se mantiene fija y se observa como varía la actividad enzimática al cambiar la concentración del ATP, y viceversa.

Efectos del ATP y del Mg^{+2} .

En el experimento de la Figura 3A, se midió la velocidad de la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica a dos concentraciones fijas del ATP, en tanto que la concentración del $MgCl_2$ se varió entre 0 y 10 mM. Se aprecia que para cada concentración del ATP la actividad enzimática alcanzó un máximo el cual se mantuvo. La Figura 3B muestra las concentraciones calculadas de las diferentes especies en los ensayos

con ATP 1 mM, en ella se aprecia que cuando la concentración del MgCl_2 se varía entre 1 y 8 mM, la concentración del complejo MgATP^{-2} se mantiene constante y se produce un aumento en la concentración del Mg^{+2} . Cabe hacer notar que el mismo patrón se observó con ATP 0,25 mM pero estos datos se omitieron para mayor claridad. Si suponemos que al igual que lo informado para la mayoría de las fosfotransferasas (Morrison, 1979), el sustrato de la descarboxilasa es el complejo metal-nucleótido (lo cual se analizará a continuación), los resultados de la Figura 3 nos indicarían que el Mg^{+2} libre no es un inhibidor de la enzima.

En forma análoga se midió la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica a dos concentraciones fijas del MgCl_2 , en tanto que la concentración del ATP se aumentó de 0 a 12,5 mM. La Figura 4A muestra que para cada concentración del MgCl_2 la actividad enzimática aumentó sin llegar a alcanzar un máximo. El análisis de las concentraciones calculadas de las especies libres correspondientes al experimento con MgCl_2 2 mM se muestra en la Figura 4B; en ella se observa que cuando la concentración del ATP se varía entre 2 y 12,5 mM, la concentración del complejo MgATP^{-2} se mantiene constante y se produce un aumento en las concentraciones del ATP^{-4} y del HATP^{-3} . Se puede apreciar que aún cuando la concentración del MgATP^{-2} es constante la actividad enzimática continúa aumentando, lo que sugiere que el ATP libre (ATP^{-4} o HATP^{-3}) estaría actuando como un activador.

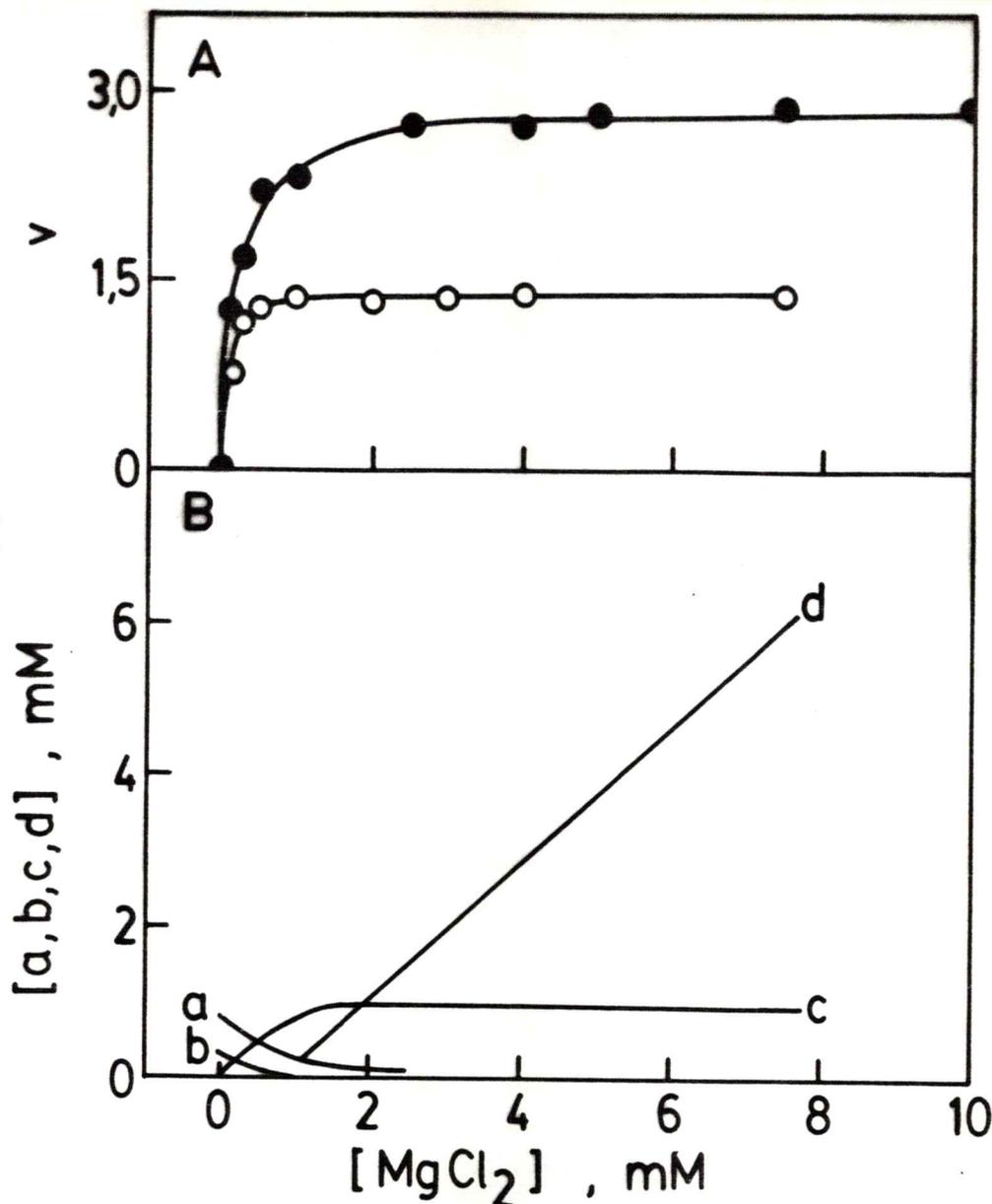


Figura 3. Efecto de la concentración del $MgCl_2$ sobre la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica.

A. El medio de incubación contenía en un volumen de 0,5 mL : amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 7,0, MVAPP 0,3 mM, descarboxilasa difosfomevalónica 9,5 mU (act. esp. 3,5 U/mg de proteína), ATP 1 mM (●) o 0,25 mM (○). La velocidad se expresa como μ moles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína.

B. Concentración de especies libres para el experimento con ATP 1 mM obtenidas por computación según lo indicado en Materiales y Métodos. Donde : a, ATP^{-4} ; b, $HATP^{-3}$; c, $MgATP^{-2}$; d, Mg^{+2} .

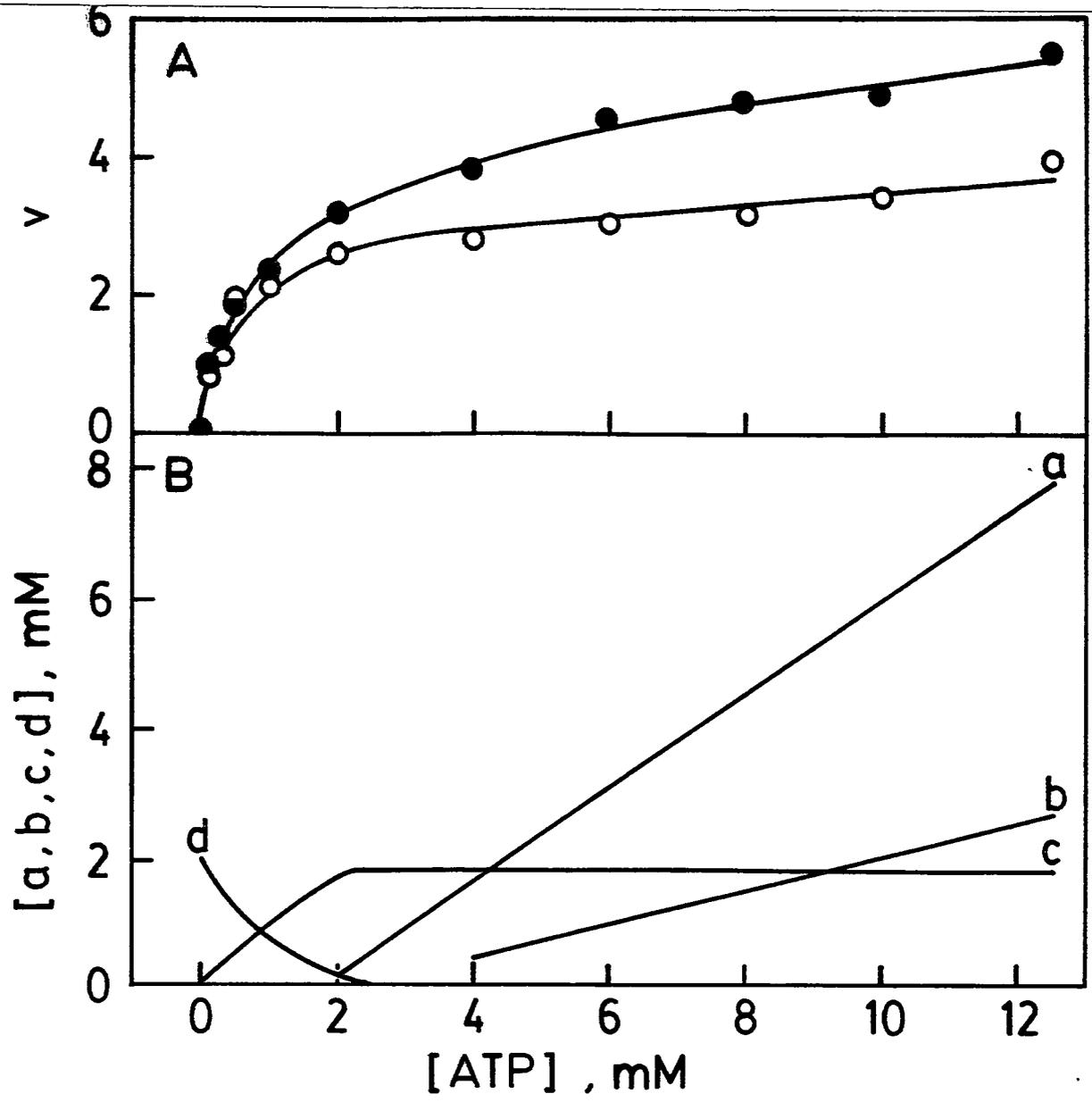


Figura 4. Efecto de la concentración del ATP sobre la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica.

A. El medio de reacción contenía en un volumen de 0,5 mL : amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 7,0, MVAPP 0,3 mM, descarboxilasa difosfomevalónica 9,5 mU (act. esp. 3,5 U/mg de proteína), MgCl₂ 2 mM (●) o 0,5 mM (○). La velocidad se expresa en μ moles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína.

B. Concentración de especies libres para el experimento con MgCl₂ 2 mM obtenidas por computación de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. Donde : a, ATP⁻⁴; b, HATP⁻³; c, MgATP⁻²; d, Mg⁺².

En el experimento de la Figura 5A se midió la actividad de la enzima en condiciones en las cuales se variaron tanto las concentraciones del ATP como las del $MgCl_2$. En la Figura 5B se muestra el análisis de las concentraciones calculadas de las especies en esos ensayos, donde se aprecia que la concentración del Mg^{+2} se mantiene constante y la concentración del $MgATP^{-2}$ va en aumento. En este caso la curva de saturación se relaciona estrechamente con la variación de la concentración del $MgATP^{-2}$, confirmando de este modo que a pH 7,0 el verdadero sustrato de la descarboxilasa difosfomevalónica es el $MgATP^{-2}$.

Estudios de pH.

Se ha demostrado que la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo no varía en el intervalo de pH comprendido entre 4,0 y 7,0 (Alvear y col., 1982). Si se considera que a pH 4,0 solo el 3% del ATP total está presente como $MgATP^{-2}$ en tanto que el 48% corresponde a $MgHATP^{-}$, el 27% a $HATP^{-3}$ y el 22% a H_2ATP^{-} (Storer y Cornish-Bowden, 1976), los resultados de Alvear y col. (1982) podrían sugerir que también fuese sustrato el complejo $MgHATP^{-}$.

Una forma de encarar este problema consiste en efectuar determinaciones de K_m y V a distintos valores de pH, tal como lo realizado por Viola y Cleland (1978) para la hexoquinasa de levadura. Estos autores analizaron la gráfica del log de V/K_{mATP} en función del pH y el hecho de que en esta representación no aparezca el pK del $MgATP^{-2}$ se tomó como una indicación de que la enzima utiliza como sustrato tanto al $MgHATP^{-}$ como al $MgATP^{-2}$.

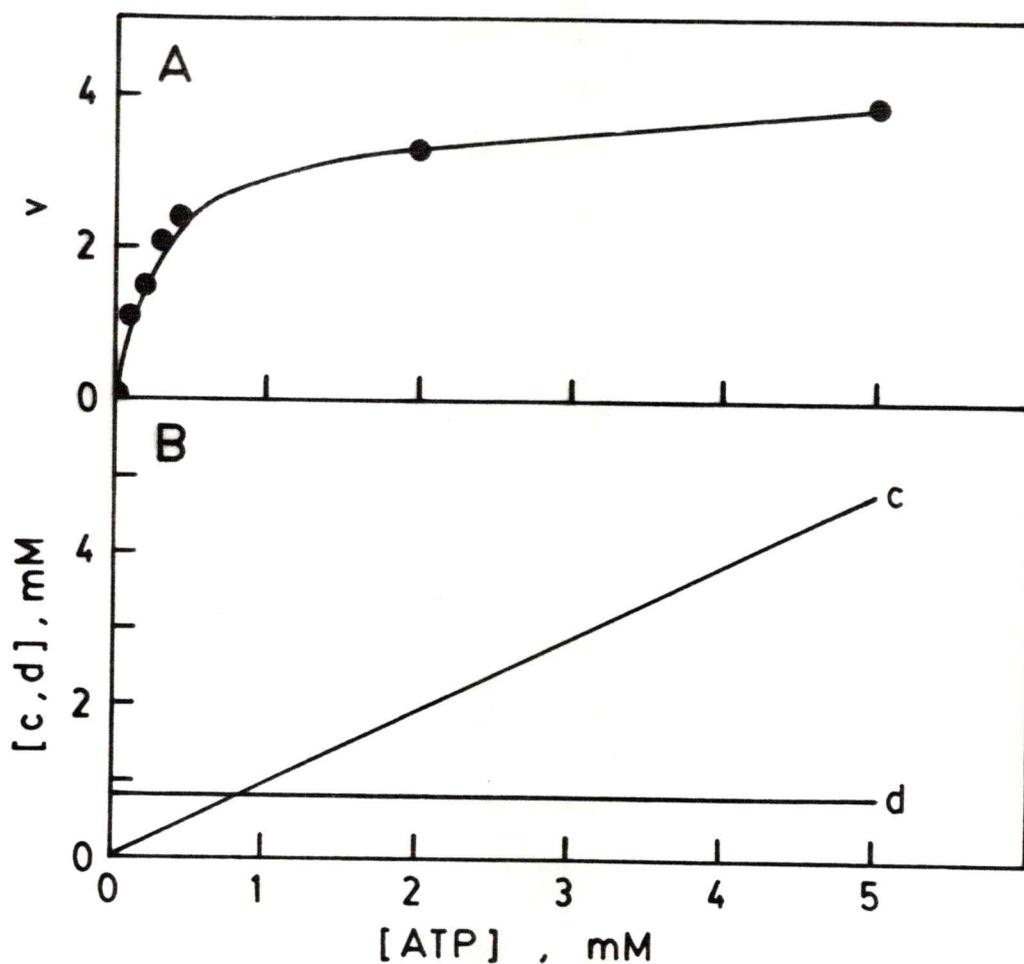


Figura 5. Efecto de la concentración del ATP y del MgCl_2 sobre la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica.

A. El medio de reacción contenía en un volumen de 0,5 mL : amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 7,0, MVAPP 0,3 mM, descarboxilasa difosfomevalónica 9,5 mU (act. esp. 3,5 U/mg de proteína). La concentración del MgCl_2 se mantuvo siempre 1 mM sobre la concentración del ATP. La velocidad se expresa en μmoles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína.

B. Concentración de especies libres obtenidas por computación de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. Donde : c, MgATP^{-2} ; d, Mg^{+2} .

Para determinar si MgHATP^- es también un sustrato de la descarboxilasa difosfomevalónica se empleó la aproximación de Viola y Cleland (1978), y para ello se estudió el efecto del pH sobre la reacción variando la concentración del ATP a niveles fijos saturantes del MVAPP. Los resultados de la Figura 6, indican que el efecto del pH sobre V difiere considerablemente del efecto sobre V/K_m ; mientras que la gráfica del $\log V$ en función del pH casi no varía en el intervalo de pH de 4,5 a 8,05, la gráfica del $\log V/K_m$ en función del pH presenta forma de campana como resultado de la pérdida de actividad tanto a valores de pH altos como a valores bajos. El análisis de los datos de la representación del $\log V/K_m$ en función del pH, de acuerdo a la ecuación 2 indicada en Materiales y Métodos, indicó un valor de pK_A de $5,70 \pm 0,12$ y un valor de pK_B de $6,52 \pm 0,12$.

Para determinar si los grupos que se ionizan observados en la gráfica del $\log V/K_m$ en función del pH corresponden a la enzima o al sustrato, se examinó la dependencia con respecto al pH del valor de K_i para el $\text{ATP}\gamma\text{S}$, compuesto que es un inhibidor competitivo con respecto al ATP (ver Figura 13). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 7, donde se observa una caída en la actividad en el lado básico con un valor de pK_B de $6,54 \pm 0,10$ (calculado empleando la ecuación 1 indicada en Materiales y Métodos). En contraste con lo observado en la representación del $\log V/K_m$ en función del pH el valor de pK_A de 5,70 no se observa en la representación del $-\log K_i$ en función del pH.

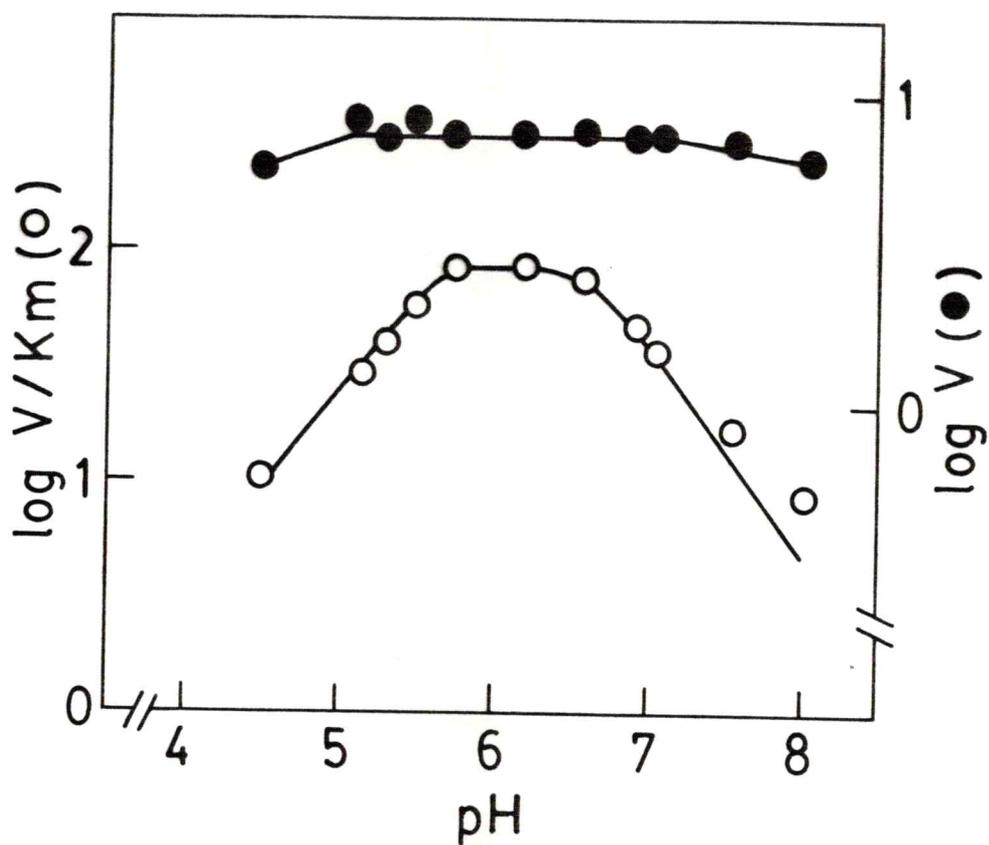


Figura 6. Efecto del pH sobre V y V/K_{mATP} en la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica.

Los valores representados son los obtenidos experimentalmente y las líneas continuas representan el mejor ajuste a la ecuación 2 indicada en Materiales y Métodos.

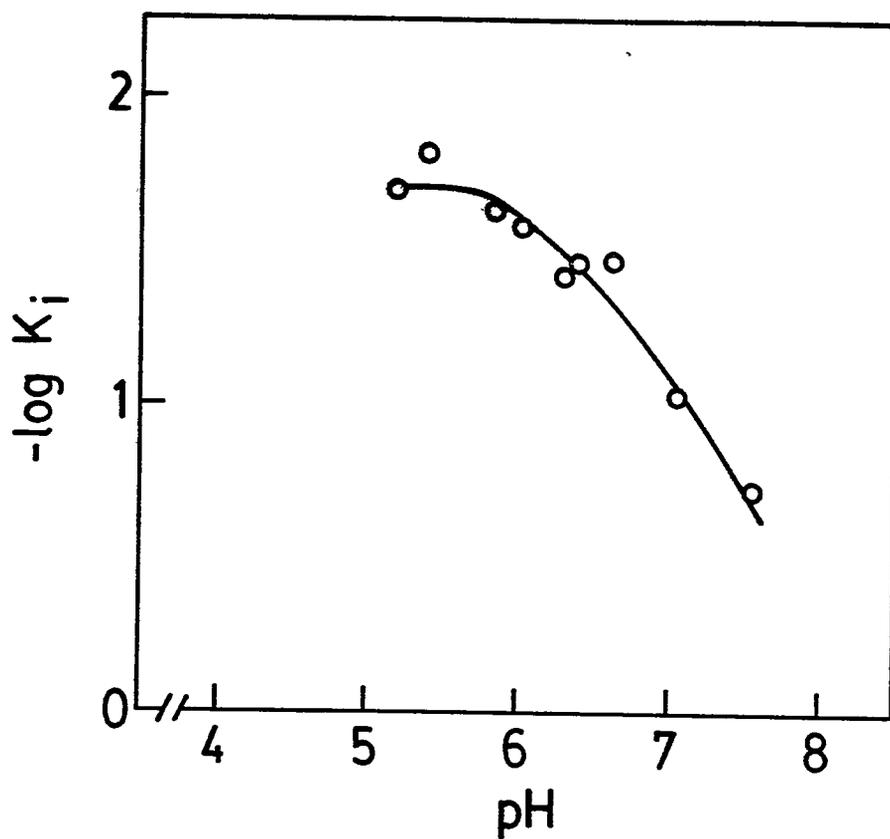


Figura 7. Efecto del pH sobre K_i para $\text{ATP}\gamma\text{S}$.

Los valores representados son los obtenidos experimentalmente y la línea continua representa el mejor ajuste a la ecuación 1 indicada en Materiales y Métodos. Las unidades para K_i son mM.

Estos resultados nos llevan a concluir que el pK_A de 5,7 corresponde al pK del complejo $MgATP^{-2}$. Por consiguiente, y empleando el mismo razonamiento de Viola y Cleland (1978), nuestros resultados indican que el $MgHATP^{-}$ no es sustrato de la enzima.

Especificidad de la activación por el nucleótido libre.

Para determinar si el efecto activador del ATP libre observado en la Figura 4A es producido por otros nucleósido-trifosfatos se determinó primeramente la especificidad como sustratos de estos compuestos. En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos a partir de experimentos en los que se determinaron las constantes cinéticas, K_m y V , de diversos nucleósido-trifosfatos (dATP, CTP, UTP, ITP y ATP), usados en forma de complejo Mg-nucleótido. Los resultados indican que existen requerimientos estructurales bastante restringidos para el nucleótido, ya que cualquier cambio en su base nitrogenada disminuye la capacidad de la enzima para utilizarlo como sustrato. Es de interés hacer notar el caso del ITP, compuesto que no presentó actividad detectable como sustrato y tampoco actuó como inhibidor, indicando de este modo que no se une a la enzima.

En un experimento en el que se midió la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica a una concentración fija del $MgCl_2$ de 1 mM, mientras que la concentración del dATP se aumentó de 0 a 10 mM, no se encontró una activación significativa con el exceso de este compuesto lo que sugiere que la activación por el nucleótido libre es específica para el ATP.

Tabla 3

CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES PARA NUCLEÓTIDOS.^a

Nucleótido	K_m (mM)	V $\left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min por mg de proteína}} \right)$	V/K_m $\left(\frac{\text{mL}}{\text{min por mg de proteína}} \right)$
ATP	$0,20 \pm 0,01$	$6,09 \pm 0,20$	$30,5 \pm 2,5$
dATP	$0,26 \pm 0,03$	$4,20 \pm 0,15$	$16,2 \pm 2,4$
UTP	$0,02 \pm 0,003$	$0,10 \pm 0,01$	$5,0 \pm 1,3$
GTP	$0,05 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$2,4 \pm 0,5$
CTP	$0,60 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,02$	$0,6 \pm 0,1$
ITP	--- ^b	---	---

a

Determinadas por medio del método espectrofotométrico que mide los nucleósido-difosfatos liberados en la reacción, según lo indicado en Materiales y Métodos.

b

Este compuesto no presentó actividad como sustrato.

Por otra parte, el efecto activador del ATP libre detectado primeramente a pH 7,0 se observó también a pH 5,2 y 8,2, indicando de este modo que tanto HATP^{-3} (especie predominante a pH 5,2) como ATP^{-4} (única especie a pH 8,2) son responsables de este efecto.

Especificidad del metal sobre la actividad enzimática.

Se ha demostrado que la descarboxilasa difosfomevalónica de diferentes organismos presenta un requerimiento absoluto de cationes metálicos bivalentes, siendo los mejores Mg^{+2} y Mn^{+2} (Alvear y col., 1982).

En el experimento de la Figura 8, se determinó la actividad enzimática a una concentración fija del ATP de 1 mM, en tanto que las concentraciones de MnCl_2 , CdCl_2 , ZnCl_2 y MgCl_2 se aumentaron de 0 a 10 mM. Se puede apreciar que con MnCl_2 , CdCl_2 y ZnCl_2 la actividad enzimática aumentó hasta un máximo y luego disminuyó, a diferencia de lo encontrado con MgCl_2 . Estos resultados indican un efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática de Zn^{+2} libre, Cd^{+2} libre y Mn^{+2} libre.

Una vez que se determinó el efecto sobre la actividad enzimática de los diferentes iones metálicos se procedió a evaluar la especificidad del metal en la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica, y para esto se determinaron las constantes cinéticas aparentes para los complejos MgATP^{-2} , MnATP^{-2} , CdATP^{-2} y ZnATP^{-2} en condiciones en las cuales la concentración del respectivo metal libre no inhibiera. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 4, donde se puede apreciar que el mejor sustrato es el complejo MnATP^{-2} seguido por el CdATP^{-2} .

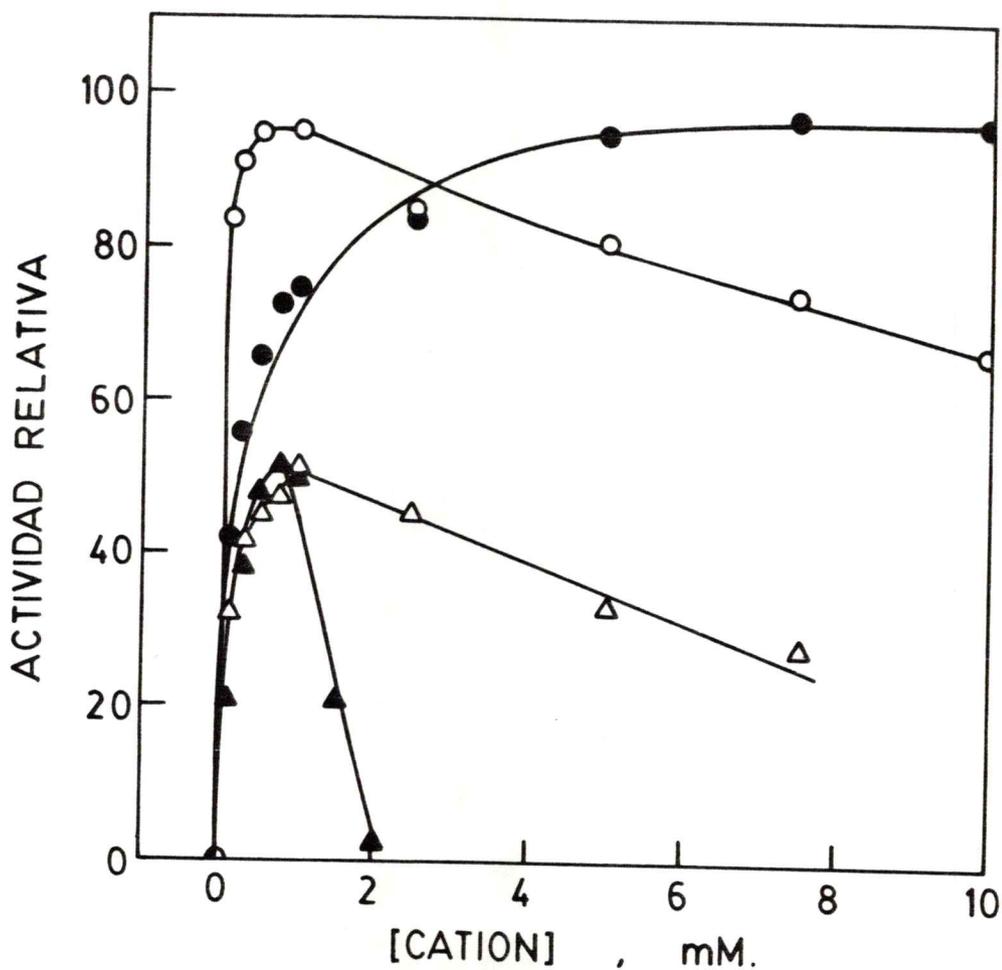


Figura 8. Efecto de diversos cationes metálicos bivalentes sobre la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica.

La actividad enzimática se determinó mediante el ensayo que mide el P_i según lo indicado en Materiales y Métodos, excepto que la concentración del ATP fue 1 mM y que los iones metálicos usados fueron: Mg^{+2} (●), Mn^{+2} (○), Ca^{+2} (△) y Zn^{+2} (▲). La actividad es relativa a la velocidad máxima con Mg^{+2} .

Tabla 4

CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES PARA COMPLEJOS METAL-ATP.^a

Complejo ^b	K_m (mM)	V $\left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min por mg de proteína}} \right)$	V/K_m $\left(\frac{\text{mL}}{\text{min por mg de proteína}} \right)$
MnATP ⁻²	0,03 ± 0,002	7,30 ± 0,10	243,3 ± 19,6
CdATP ⁻²	0,05 ± 0,01	4,50 ± 0,10	90,0 ± 20,0
MgATP ⁻²	0,18 ± 0,01	7,20 ± 0,20	40,0 ± 3,3
ZnATP ⁻²	1,05 ± 0,05	4,11 ± 0,10	3,9 ± 0,3

a
Determinadas por medio del método que mide el P_i liberado en la reacción, según se describe en Materiales y Métodos.

b
La concentración de los respectivos complejos metal-ATP⁻² se calculó usando el programa de computación descrito por Storer y Cornish-Bowden (1976).

Dado que tanto el Cd^{+2} como el Zn^{+2} se unen fuertemente a ditiolos y como se ha informado la presencia de al menos un grupo ditiol vecino en la descarboxilasa difosfomevalónica (Alvear y col., 1986), se decidió efectuar experimentos de inactivación por el Cd^{+2} y por el Zn^{+2} de la enzima. La Figura 9 muestra que ambos iones son capaces de inactivar irreversiblemente a la descarboxilasa de hígado de pollo, observándose que el Cd^{+2} , a una concentración de 0,05 mM, produce una inactivación del 80% en tanto que la inactivación por el Zn^{+2} se produce a concentraciones mayores. Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados en compuestos modelos en los cuales se ha demostrado que el Cd^{+2} se une a los ditiolos con una afinidad dos órdenes de magnitud mayor que la del Zn^{+2} (Lolkema y col., 1986).

MECANISMO CINÉTICO.

Estudios cinéticos en velocidad inicial realizados con anterioridad a esta tesis (Alvear y col., 1982), indicaron un mecanismo en secuencia de acuerdo a la terminología de Cleland (1970). La adición en secuencia de ambos sustratos fue confirmada en este trabajo al estudiar la velocidad de reacción en función del inverso de la concentración de cualquiera de los sustratos, variando el MVAPP y el ATP en una razón constante (Garcés y Cleland, 1969; Tsopanakis y Herries, 1975).

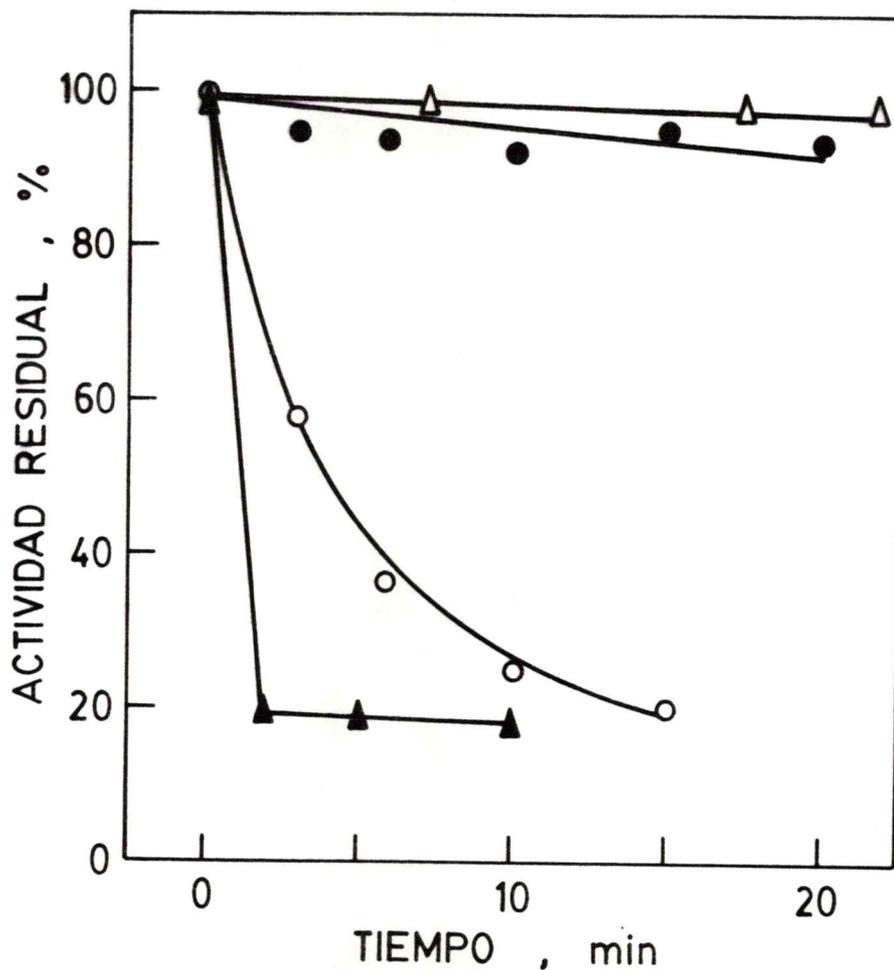


Figura 9. Inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por Cd^{+2} y por Zn^{+2} .

La reacción se efectuó incubando la enzima (64 mU; act. esp. 5,6 U/mg de proteína) a 30° en presencia de : 0,05 mM Cd^{+2} (▲), 0,05 mM Zn^{+2} (●), 1,0 mM Zn^{+2} (○) y control (Δ); en amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 7,0. A los tiempos indicados en la figura, se tomaron alícuotas de 0,010 mL para el ensayo de la enzima por medio del ensayo espectrofotométrico que mide el ADP.

Para un mecanismo en secuencia se debería obtener una parábola según la siguiente ecuación :

$$1/v = xK_{ia}K_b1/A^2 + (K_a + xK_b) 1/A + 1/v$$

Para un mecanismo ping-pong se debería obtener una línea recta de acuerdo a la siguiente ecuación :

$$1/v = (K_a + xK_b) 1/A + 1/v$$

para ambas ecuaciones $x = A/B$

Cabe hacer notar que también se obtendrá una línea recta para un mecanismo en secuencia en el cual la constante de disociación del primer sustrato sea despreciable respecto a A y K_a .

En el caso de la descarboxilasa difosfomevalónica se obtuvo una relación parabólica entre el recíproco de la velocidad y el recíproco de la concentración del ATP, cuando el ATP y el MVAPP se variaron en una razón de 15 : 1 (Figura 10).

Inhibición por análogos de los sustratos.

Con el objeto de distinguir entre un mecanismo en secuencia al azar y un mecanismo en secuencia ordenada se empleó el enfoque propuesto por Fromm (1979). El cual requiere la disponibilidad de un inhibidor competitivo para cada sustrato. Estos inhibidores deben ser del tipo de punto muerto, es decir aquellos que sin ser sustratos o productos de la reacción, son capaces de formar complejos reversibles con una o más formas de la enzima. Estos complejos se denominan abortivos, ya que no participan en la reacción y solo pueden disociarse en $E' + I$, donde E' representa cualquier forma de la enzima e I representa al inhibidor (Cleland, 1970).

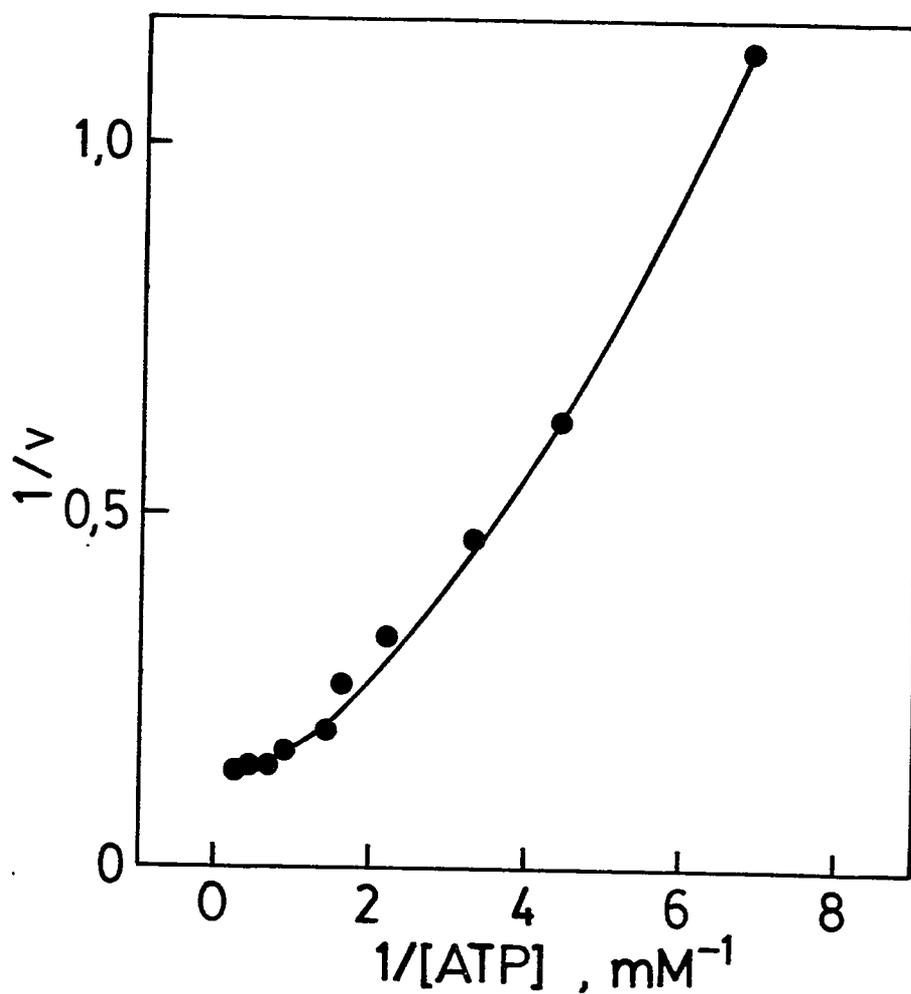


Figura 10. Gráfica de dobles recíprocos para la descarboxilasa difosfo mevalónica donde las concentraciones de ATP y MVAPP se variaron en una razón constante.

La actividad se determinó a través del método que mide el ADP según se indica en Materiales y Métodos. La razón entre la concentración del ATP y del MVAPP fue 15,0. El intervalo de concentración del ATP usado fue 0,15-3,0 mM, la concentración del $MgCl_2$ se mantuvo 1 mM sobre la concentración del ATP. La velocidad se expresa como μ moles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína.

En la Tabla 5 se muestra el tipo de inhibición predicha por Fromm (1979) para inhibidores de punto muerto para mecanismos con dos sustratos.

Inhibición por MVAP.

Se estudió el efecto inhibitor del MVAP usando MVAPP como sustrato variable, a una concentración fija del ATP de 0,3 mM. La Figura 11 muestra los resultados de este experimento al graficar los datos de acuerdo a la ecuación de Hanes (1932). Los datos de este experimento se procesaron suponiendo inhibición competitiva e inhibición mixta con el programa NATO. El análisis de los resultados obtenidos indicó una inhibición competitiva con un valor de K_i de $6,03 \pm 0,28$ mM.

La Figura 12 muestra los resultados obtenidos al estudiar el efecto inhibitor del MVAP usando ATP como sustrato variable, a una concentración fija del MVAPP de 0,023 mM. El análisis de los resultados, provenientes de procesar los datos al igual que lo indicado anteriormente, indicó una inhibición mixta con un valor de K_i de $4,39 \pm 0,39$ mM y un valor de K'_i de $20,27 \pm 8,66$ mM.

Debido a que el MVAP se comporta frente al ATP como un inhibidor mixto en el cual hay un fuerte predominio de uno de sus componentes (competitivo) se decidió estudiar otros compuestos análogos del MVAPP.

Estudios con CrMVAPP.

El derivado cromado del MVAPP a una concentración de 1 mM no actuó como inhibidor ni tampoco como sustrato de la reacción. Estos hechos nos indican que este compuesto no se une al sitio activo de la enzima.

Tabla 5

PATRONES DE INHIBICION PARA MECANISMOS CINETICOS EN
SISTEMAS DE DOS SUSTRATOS^a

Mecanismo	Inhibidor competitivo para sustrato	Inhibición respecto a	
		A	B
Al azar	A	C ^b	M
	B	M	C
Ordenado	A	C	M
	B	IC	C

^a
Adaptado de Fromm (1979).

^b
C, inhibición competitiva; M, inhibición mixta; IC, inhibición
incompetitiva.

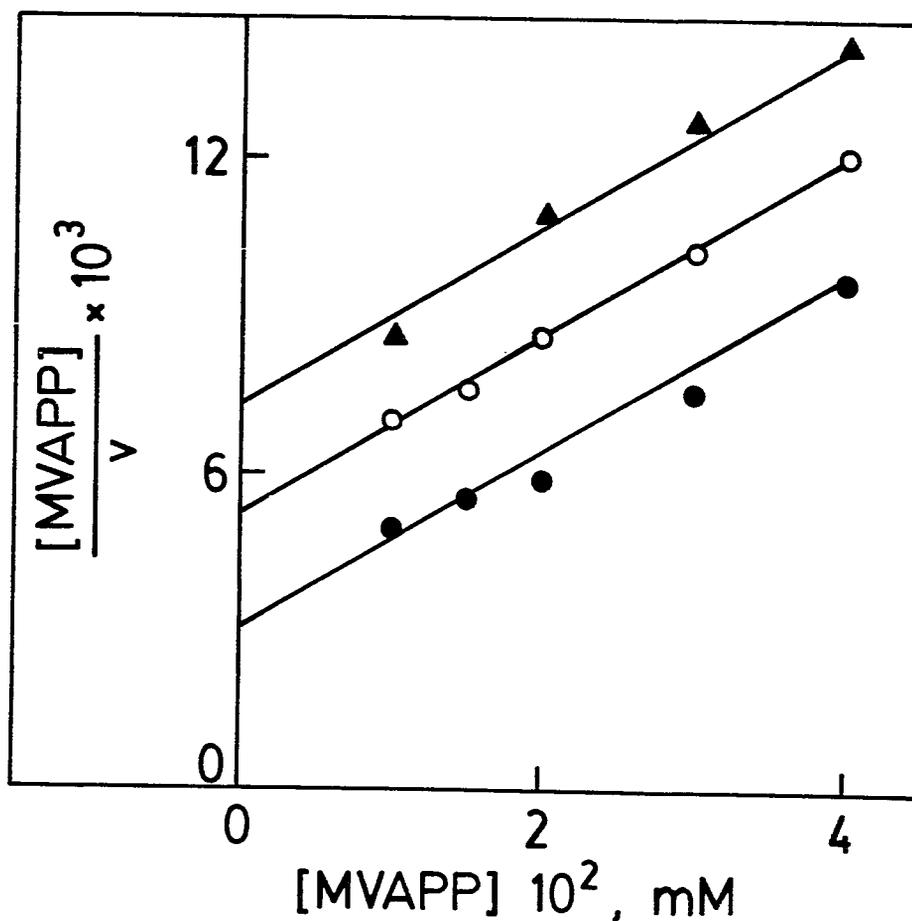


Figura 11. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por MVAP cuando MVAPP es el sustrato variable.

La actividad enzimática se determinó mediante el ensayo que mide el ADP según se indica en Materiales y Métodos. La concentración del ATP fue 0,3 mM y las concentraciones del MVAP fueron : ●, 0 mM; ○, 4,1 mM y ▲, 8,2 mM. La concentración del MgCl_2 se mantuvo 1 mM sobre la concentración del ATP. La velocidad se expresa como μmoles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína. Los símbolos corresponden a los valores experimentales y las rectas a los valores teóricos entregados por el programa de computación.

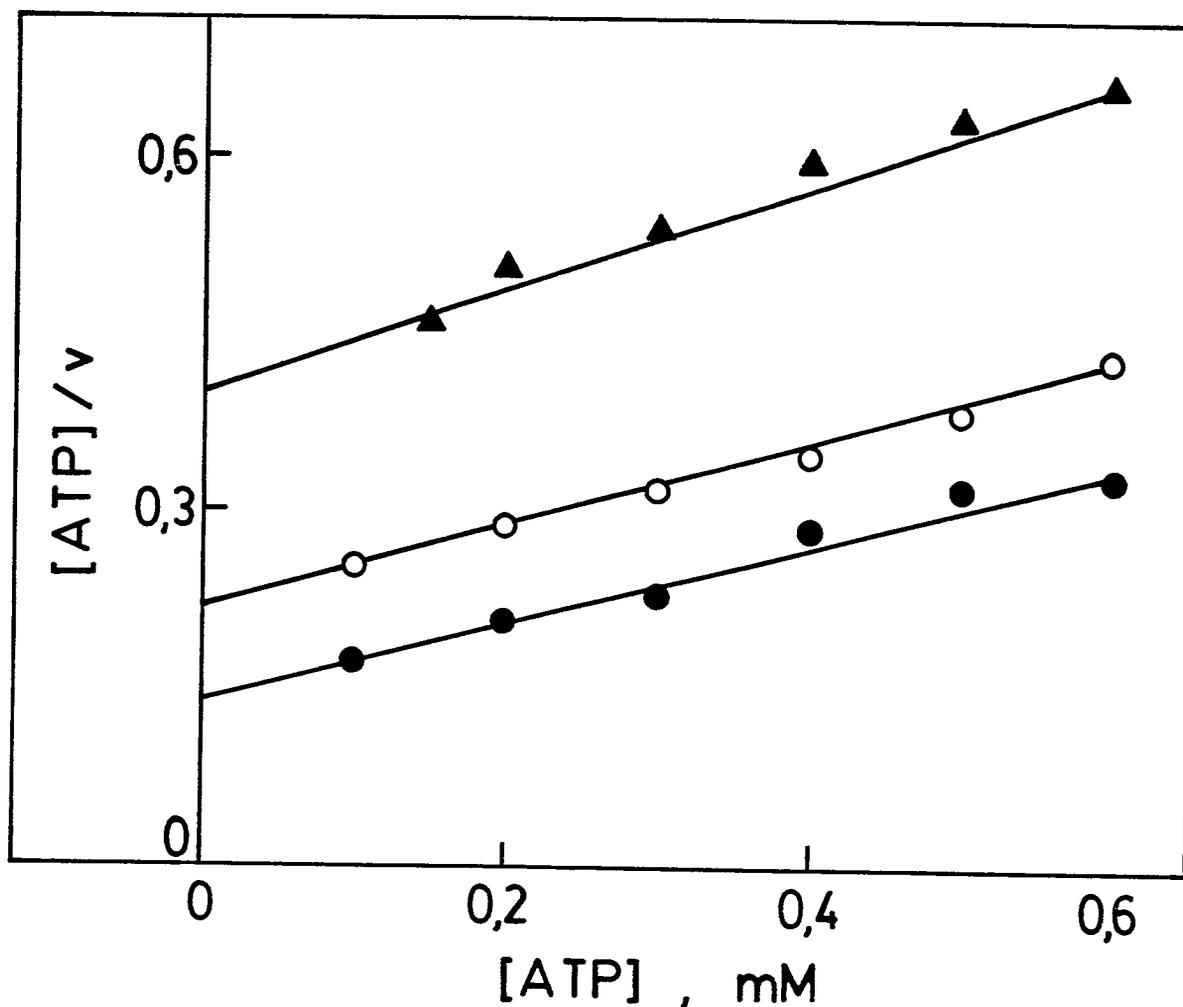


Figura 12. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por MVAP cuando ATP es el sustrato variable. La actividad enzimática se determinó como se indica en la Figura 11. La concentración del MVAPP fue 0,023 mM y las concentraciones del MVAP fueron : ●, 0 mM; ○, 2,46 mM y ▲, 8,2 mM. La concentración del $MgCl_2$ se mantuvo 1 mM sobre la concentración del ATP. La velocidad se expresa como μ moles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína. Los símbolos corresponden a los valores experimentales y las rectas a los valores teóricos entregados por el programa de computación.

Estudios con MVAPP β S.

En vista de los resultados comentados anteriormente se decidió sintetizar un compuesto en el cual se modificara el grupo difosfato del MVAPP. Así, se sintetizó el análogo azufrado del MVAPP, en el que se reemplaza un oxígeno por un azufre en el fosforilo β del MVAPP.

Este compuesto resultó ser un sustrato de la enzima, como se muestra en la Tabla 6. La comparación de las razones V/K_m para MVAPP y MVAPP β S indicó que la descarboxilasa difosfomevalónica muestra una preferencia de 34 : 1 para su sustrato normal. Este compuesto al ser un mal sustrato debiera actuar como inhibidor, pero esto no se pudo probar ya que éste produjo interferencias con las enzimas auxiliares en el ensayo que mide el ADP. Cabe hacer notar que el ensayo que mide el P_i no puede ser usado para determinar las constantes cinéticas del MVAPP debido a problemas técnicos al usar concentraciones entre 0,01 y 0,04 mM del MVAPP.

Inhibición por ATP γ S.

ATP γ S es un análogo del ATP en el cual uno de los oxígenos libres del fosforilo γ es reemplazado por azufre. En la Figura 13 se muestra el efecto inhibitorio del ATP γ S con respecto al ATP, a una concentración fija del MVAPP. Los datos de este experimento se procesaron suponiendo inhibición competitiva e inhibición mixta con el programa NATO. El análisis de los resultados obtenidos indicó una inhibición competitiva con un valor de K_i de $0,09 \pm 0,01$ mM.

Tabla 6

CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES PARA MVAPP Y MVAPP β S

Sustrato	K_m (mM)	V $\left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min por mg de proteina}} \right)$	V/K_m $\left(\frac{\text{mL}}{\text{min por mg de proteina}} \right)$
MVAPP	$0,013 \pm 0,002$	$3,69 \pm 0,04$	$283,8 \pm 46,7$
MVAPP β S	$0,140 \pm 0,010$	$1,18 \pm 0,06$	$8,4 \pm 1,0$

Las constantes cinéticas para MVAPP se determinaron mediante el método espectrofotométrico que mide el ADP según lo indicado en Materiales y Métodos, las concentraciones del MVAPP se variaron entre 0,01 y 0,04 mM. Los parámetros cinéticos para MVAPP β S se determinaron mediante el método que mide el P_i según lo indicado en Materiales y Métodos, las concentraciones del MVAPP β S se variaron entre 0,04 y 0,22 mM.

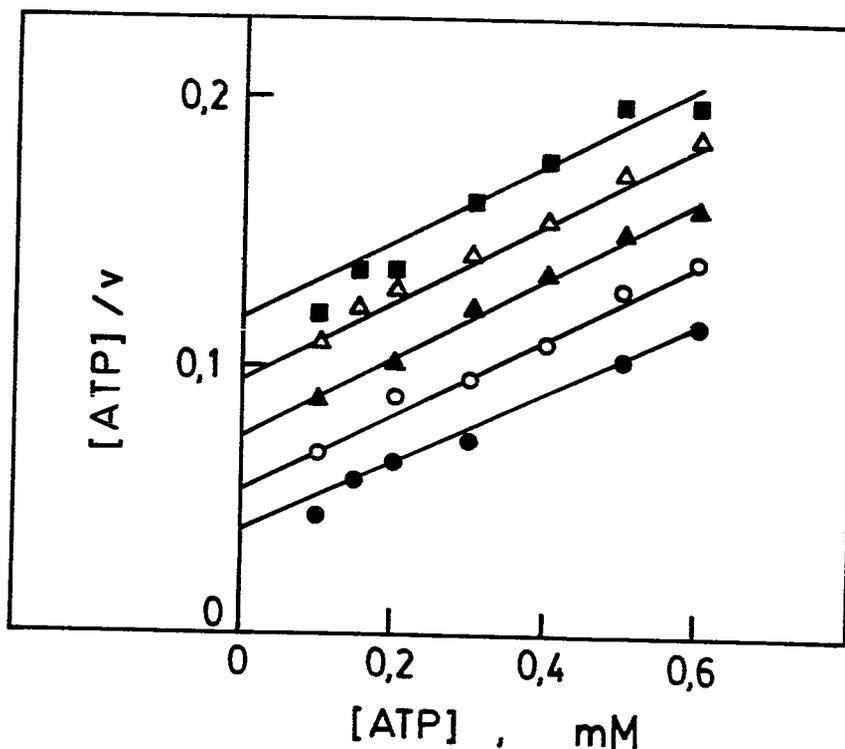


Figura 13. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por ATP γ S cuando ATP es el sustrato variable. La actividad enzimática se determinó mediante el ensayo que mide el ADP según se indica en Materiales y Métodos. La concentración del MVAPP fue 0,05 mM y las concentraciones del ATP γ S fueron : ●, 0 mM; ○, 0,06 mM; ▲, 0,119 mM; △, 0,179 mM; ■, 0,239 mM. La concentración del MgCl₂ se mantuvo 1 mM sobre las concentraciones del ATP y del ATP γ S. La velocidad se expresa como μ moles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína. Los símbolos corresponden a los valores experimentales y las rectas a los valores teóricos entregados por el programa de computación.

La Figura 14 muestra los resultados obtenidos al estudiar el efecto inhibitor del ATP γ S usando MVAPP como sustrato variable, a una concentración fija del ATP. El análisis de los resultados, provenientes de procesar los datos suponiendo inhibición incompetitiva e inhibición mixta, indicó una inhibición incompetitiva con un valor de K_i' de $0,65 \pm 0,04$ mM.

Inhibición por AMP-PCP.

En este análogo del ATP se ha reemplazado al puente de oxígeno entre el fosforilo β y el fosforilo γ del ATP por un grupo metileno. La Figura 15 muestra los resultados obtenidos al estudiar el efecto inhibitor del AMP-PCP usando ATP como sustrato variable, a una concentración fija del MVAPP de $0,023$ mM. El análisis de los resultados, provenientes de procesar los datos al igual que lo indicado para el ATP γ S, indicó una inhibición competitiva con un valor de K_i de $14,01 \pm 1,99$ mM.

La Figura 16 muestra los resultados obtenidos al estudiar el efecto inhibitor del AMP-PCP usando MVAPP como sustrato variable, a una concentración fija del ATP de $0,3$ mM. El análisis de los resultados, provenientes de procesar los datos suponiendo inhibición incompetitiva e inhibición mixta, indicó una inhibición incompetitiva con un valor de K_i' de $5,22 \pm 0,38$ mM.

Al comparar los resultados de los experimentos de inhibición por análogos del MVAPP y del ATP con el tipo de inhibición predicha por Fromm (1979) para inhibidores de punto muerto para mecanismos birreactantes (Tabla 5), queda claro que los datos indican un mecanismo en secuencia ordenada, en el cual el ATP es el segundo sustrato que se une a la enzima.

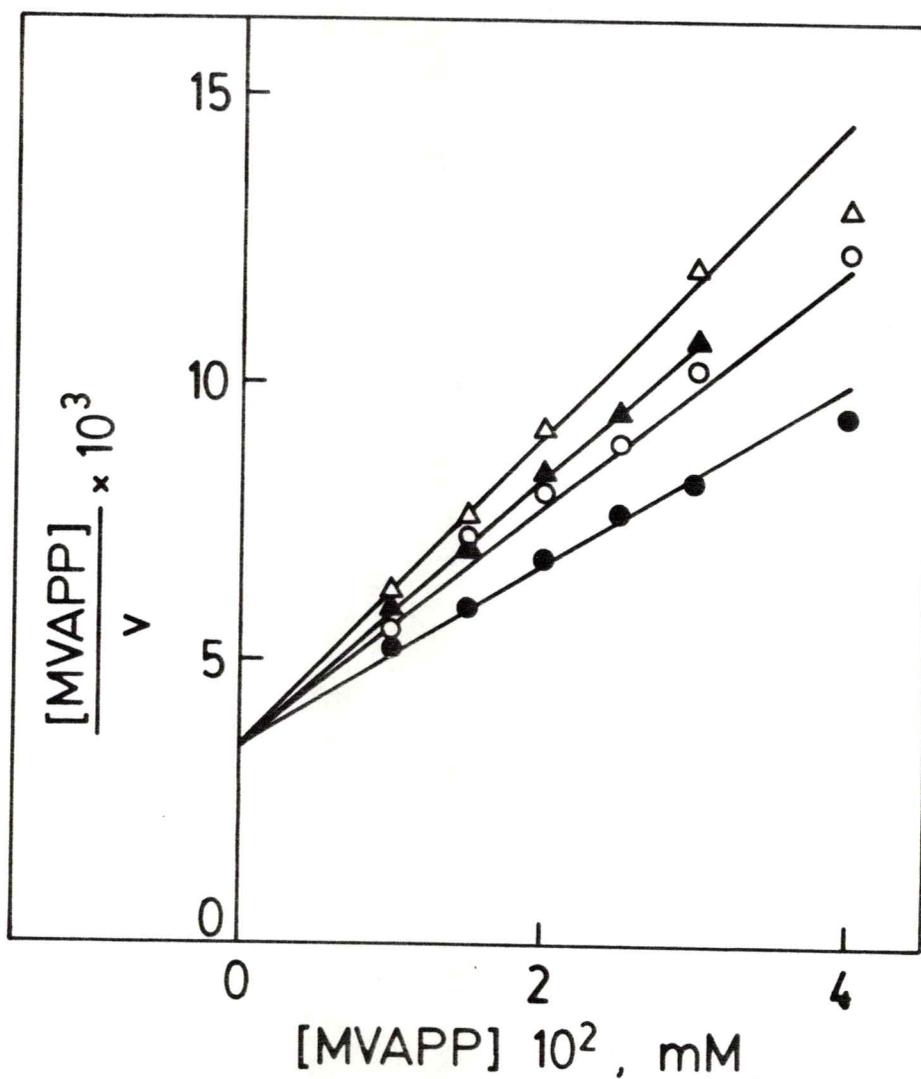


Figura 14. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por ATP γ S cuando MVAPP es el sustrato variable.

La actividad enzimática se determinó como se indica en la Figura 13. La concentración del ATP fue 1 mM y las concentraciones del ATP γ S fueron : ●, 0 mM; ○, 0,179 mM; ▲, 0,296 mM y △, 0,447 mM. La concentración del MgCl₂ se mantuvo 1 mM sobre las concentraciones del ATP y del ATP γ S. La velocidad se expresa como μ moles de MVAPP descarboxilados por min. por mg de proteína.

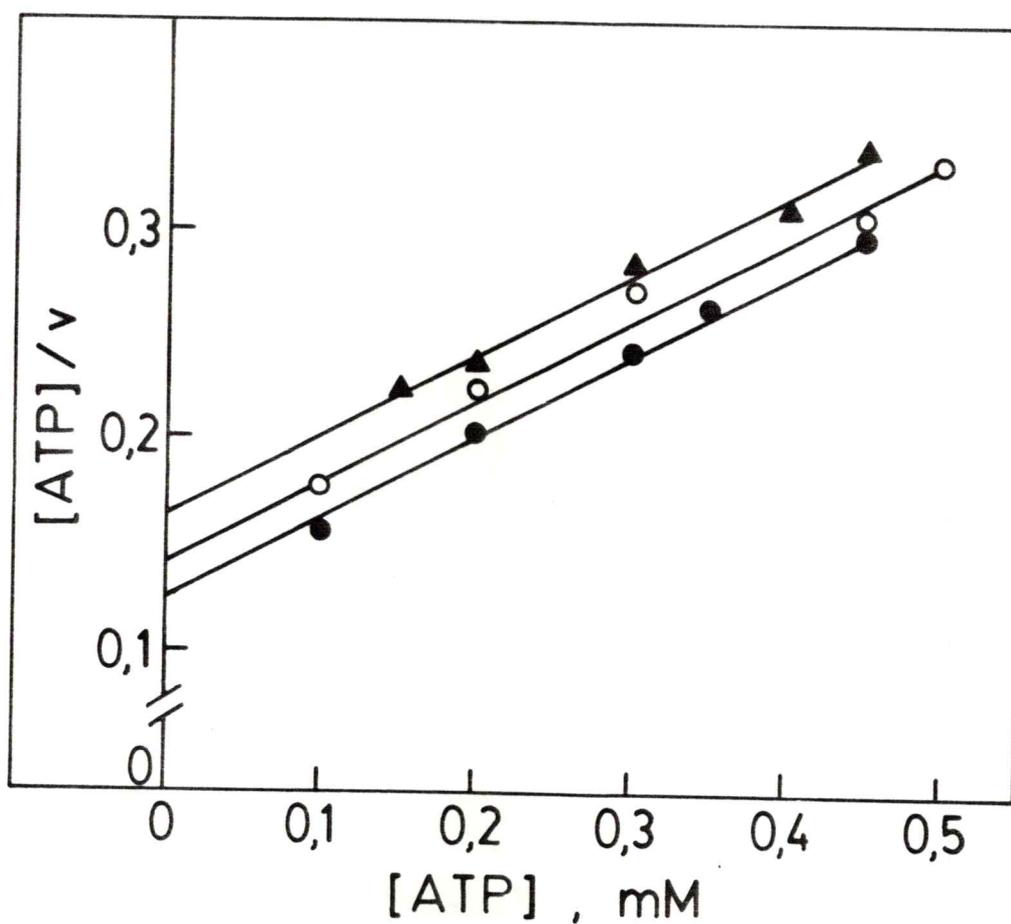


Figura 15. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por AMP-PCP cuando ATP es el sustrato variable.

La actividad enzimática se determinó según lo indicado en la Figura 13. La concentración del MVAPP fue 0,023 mM y las concentraciones del AMP-PCP fueron : ●, 0 mM, ○, 1,95 mM y ▲, 3,9 mM. La concentración del $MgCl_2$ se mantuvo 1 mM sobre las concentraciones del ATP y del AMP-PCP. La velocidad se expresa como μ moles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína. Los símbolos corresponden a los valores experimentales y las rectas a los valores teóricos entregados por el programa de computación.

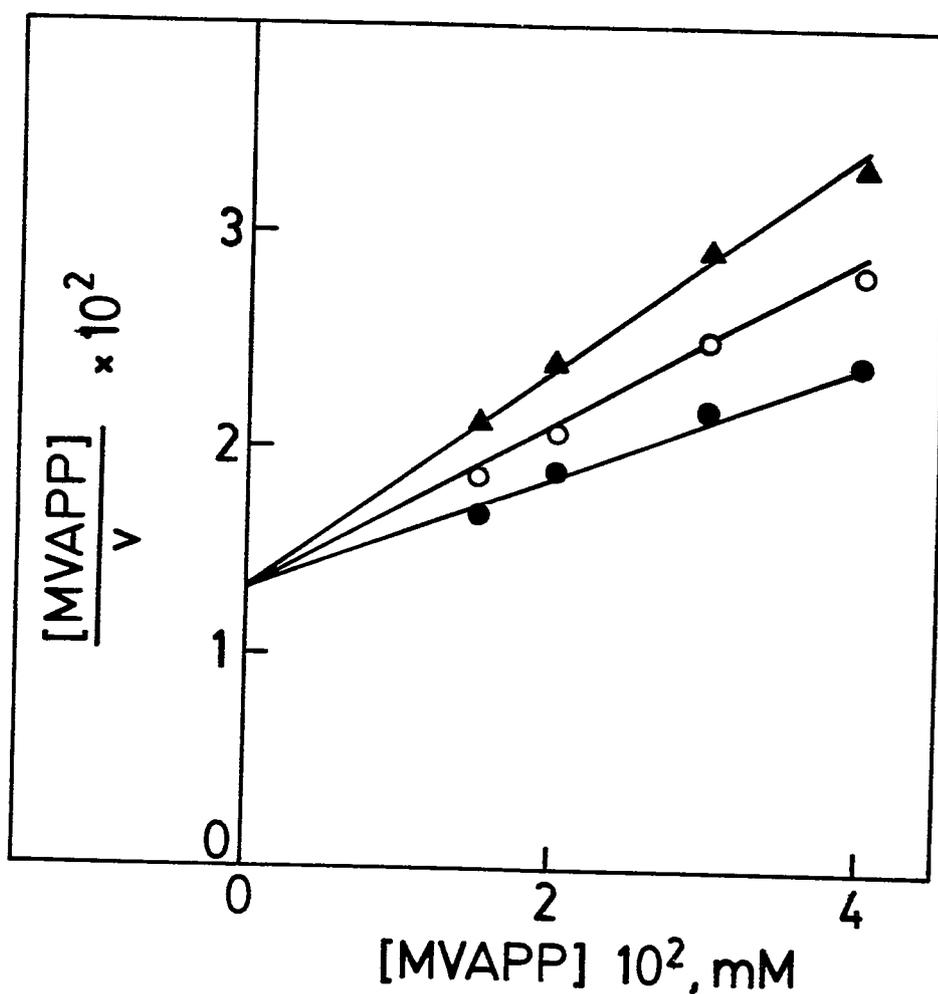


Figura 16. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por AMP-PCP cuando MVAPP es el sustrato variable.

La actividad enzimática se determinó de acuerdo a lo indicado en la Figura 13. La concentración del ATP fue 0,3 mM y las concentraciones del AMP-PCP fueron : ●, 0 mM, ○, 2,38 mM y ▲, 4,75 mM. La concentración del MgCl_2 se mantuvo 1 mM sobre las concentraciones del ATP y del AMP-PCP. La velocidad se expresa como μmoles de MVAPP descarboxilados por minuto y por mg de proteína. Los símbolos corresponden a los valores experimentales y las rectas a los valores teóricos entregados por el programa de computación.

Inhibición por los productos de la reacción.

Para conocer el orden de salida de los productos de la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo se efectuaron estudios de inhibición por los productos de la reacción.

Inhibición por IPP.

Al estudiar el efecto de la inhibición del IPP usando ATP como sustrato variable, a una concentración fija del MVAPP de 0,023 mM, se obtuvo una inhibición mixta (Figura 17). La gráfica secundaria de las intersecciones en función de la concentración del inhibidor resultó parabólica, este resultado impidió procesar los datos con el programa NATO ya que éste solo es aplicable a inhibiciones lineales. La gráfica secundaria de las pendientes en función de la concentración del IPP fue lineal determinándose un valor de K_i de $5,34 \pm 0,68$ mM.

Al realizar experimentos de inhibición por IPP, usando ahora el MVAPP como sustrato variable y manteniendo fija la concentración del ATP en 0,3 mM, se obtuvo también una inhibición mixta (Figura 18). La gráfica secundaria de las pendientes en función de la concentración del IPP fue lineal y de ella se determinó un valor de K_i de $7,56 \pm 1,00$ mM, la gráfica secundaria de las intersecciones en función de la concentración del inhibidor fue parabólica.

Esta inhibición parabólica se puede deber a la unión de a lo menos dos moléculas del inhibidor a la enzima o a la formación de complejos abortivos ternarios que son complejos de punto muerto del tipo enzima-sustrato-producto (Cleland, 1970).

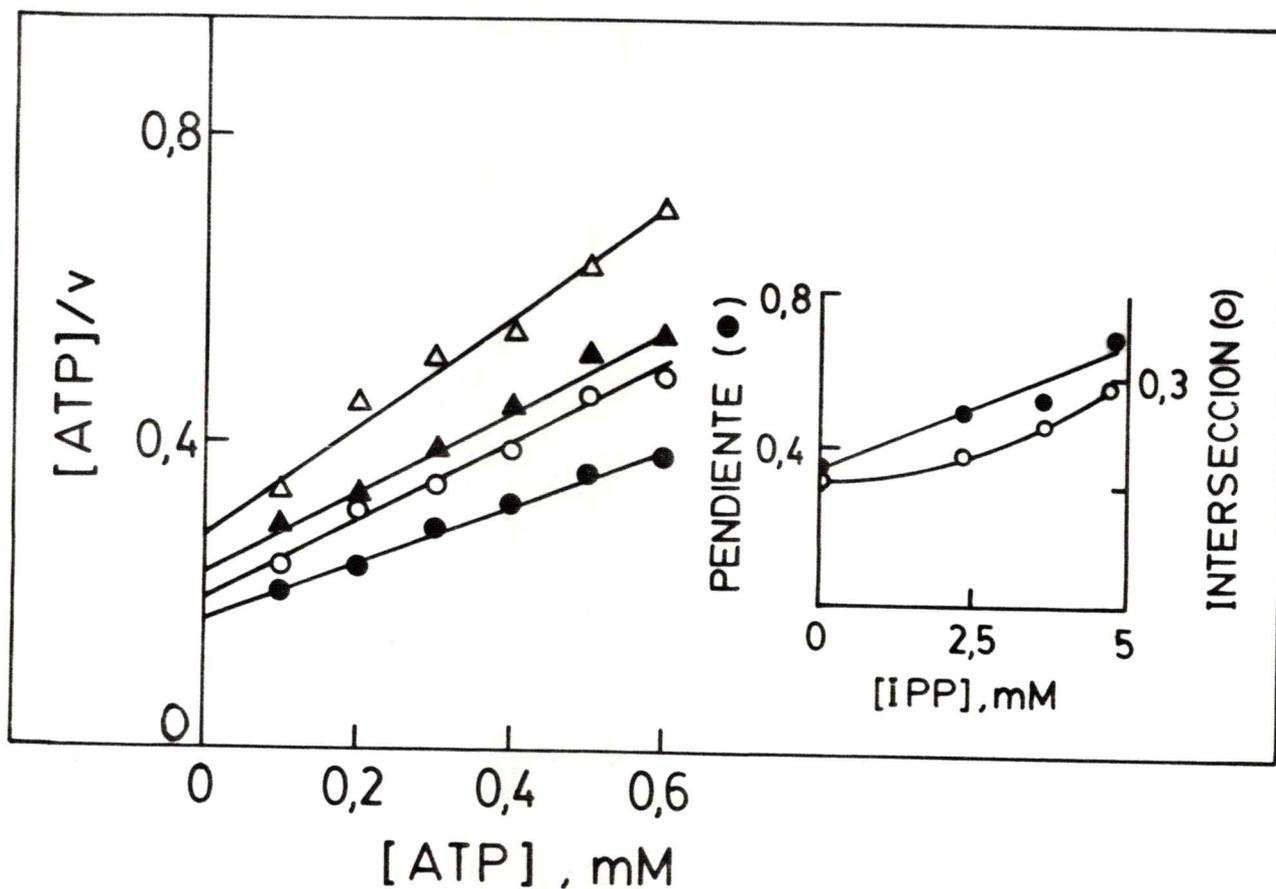


Figura 17. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por IPP cuando ATP es el sustrato variable. La actividad enzimática se determinó mediante el ensayo que mide el ADP según lo indicado en Materiales y Métodos. La concentración del MVAPP fue 0,023 mM y las concentraciones del IPP fueron: ●, 0 mM; ○, 2,4 mM; ▲, 3,6 mM y △, 4,8 mM. La concentración del MgCl_2 se mantuvo 1 mM sobre las concentraciones del ATP y del IPP. La velocidad se expresa como μmoles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína. Inserta se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración del IPP.

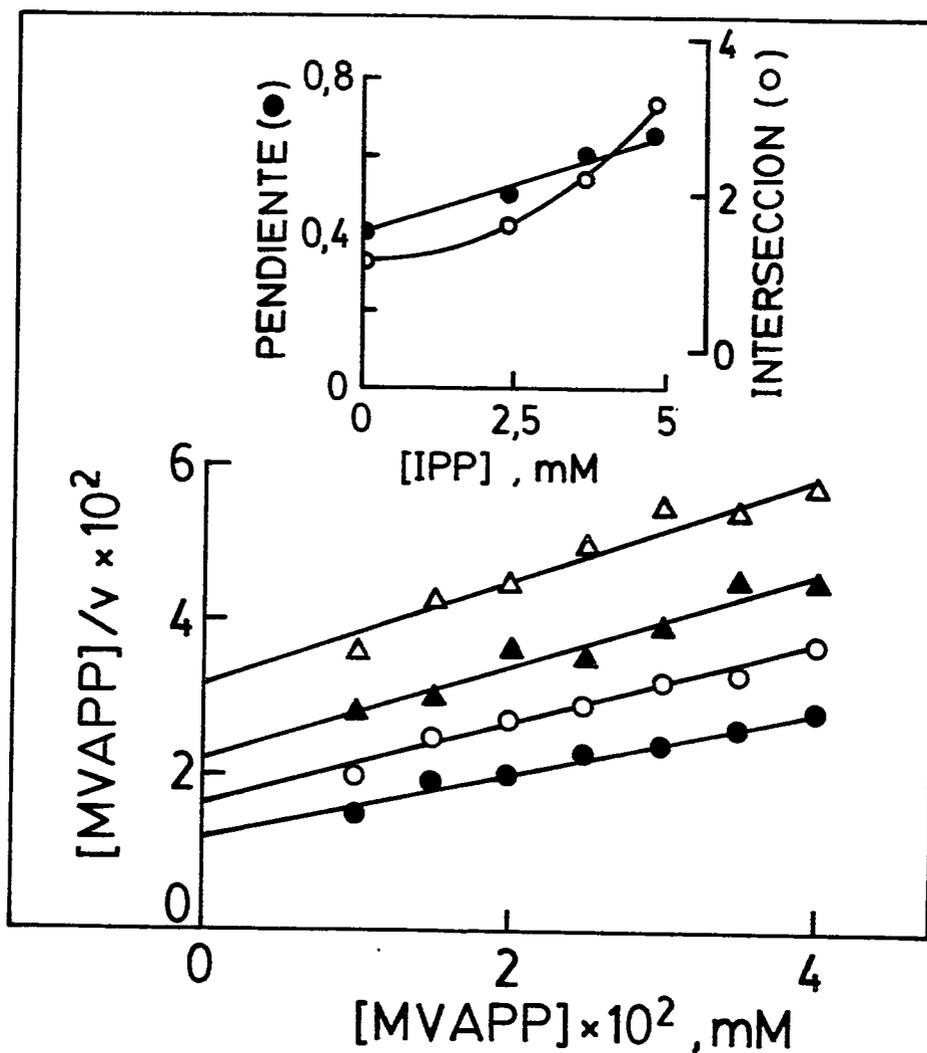


Figura 18. Gráfica de Hanes-Woolf para la inhibición de la descarboxilasa difosfomevalónica por IPP cuando MVAPP es el sustrato variable. La concentración del MgCl_2 y la determinación de la actividad enzimática son las mismas que se indican en la Figura 17. La concentración del ATP fue 0,3 mM y las concentraciones del IPP fueron : ●, 0 mM; ○, 2,4 mM; ▲, 3,6 mM y △, 4,8 mM. La velocidad se expresa como μmoles de MVAPP descarboxilados por minuto y por mg de proteína. Inserta se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración del IPP.

Inhibición por fosfato inorgánico.

Este producto se probó como inhibidor en un amplio intervalo de concentraciones desde 10 a 150 mM, no observándose inhibición lo que indica una afinidad muy baja de este producto por la enzima.

En vista de este resultado y considerando que experimentos preliminares de inhibición por bicarbonato indicaron que este producto era un mal inhibidor, se decidió no continuar con estos estudios ya que para poder postular el orden de salida de los productos es necesario tener todos los patrones de inhibición.

ESTRUCTURA DEL COMPLEJO METAL-ATP.

En las reacciones enzimáticas en las cuales el complejo $MgATP^{-2}$ actúa como sustrato, el ión metálico puede estar unido a cualquiera de los tres grupos fosforilos del ATP o a una combinación de ellos formando ya sea complejos mono-, bi- o tridentados (Merrit y col., 1978).

La coordinación del ión metálico con uno de los átomos de oxígeno del fosforilo α o β hace que ese fosforilo particular sea ahora un grupo quiral, lo que nos lleva a la existencia de varios diastereómeros. En el caso del complejo β, γ -bidentado, al colocar el anillo de seis miembros en el plano del papel el grupo AMP puede estar ya sea sobre (isómero lambda) o bajo el plano (isómero delta), como se muestra en la Figura 19. En el caso del complejo α, β -bidentado, tanto el fosforilo α como el β son ahora quirales. Esto implica que tanto el grupo adenosina como el fosforilo pueden estar bajo o sobre el plano, generándose

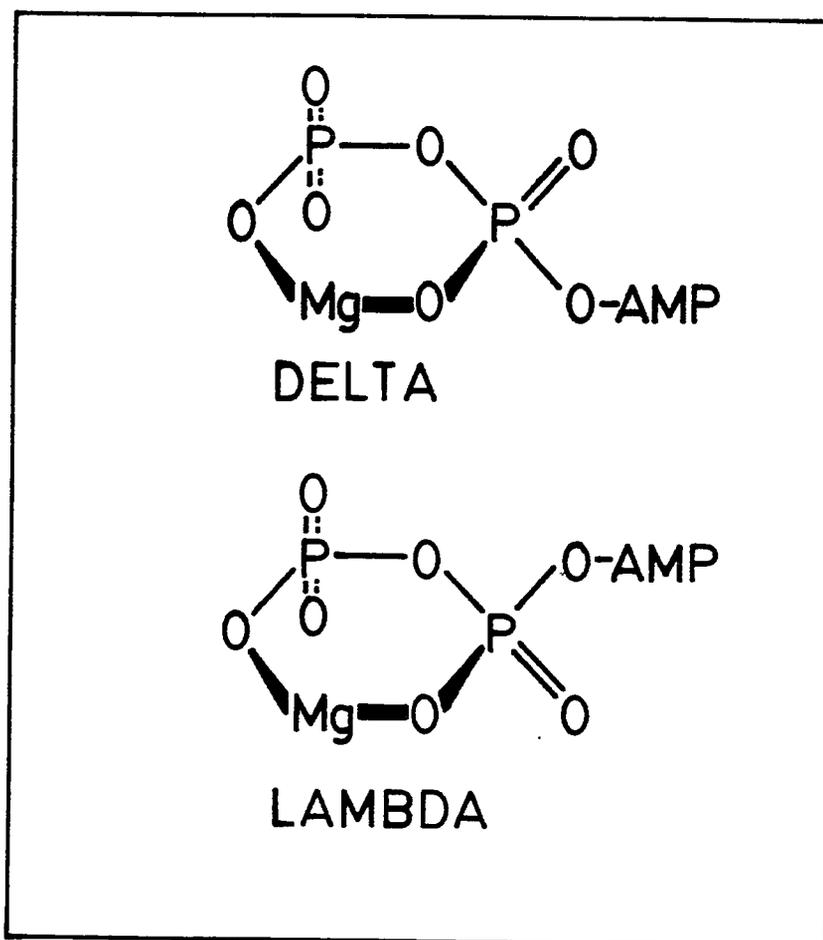


Figura 19. Estructuras de los complejos β, γ -bidentados del MgATP

así cuatro diastereómeros.

Debido a que la velocidad de recambio entre el Mg^{+2} complejo como $MgATP^{-2}$ y el metal libre es muy alta, no es posible determinar la estructura del complejo metal-ATP en el sitio activo de una enzima usando sus sustratos naturales. Actualmente existen dos métodos de tipo cinético que sirven a este propósito; uno de ellos hace uso de los análogos fosforotioatos del ATP, en tanto que el otro utiliza los complejos de sustitución inertes, como el CrATP y el CoATP.

Para determinar la estructura del complejo metal-nucleótido Cleland introdujo el uso de los complejos CrATP y CoATP (De Pamphilis y Cleland, 1973; Dunaway-Mariano y Cleland, 1980a, b; Cleland, 1982). Estos complejos se caracterizan por presentar velocidades de intercambio del metal con el nucleótido muy lentas, lo que permite la separación y caracterización de los diferentes isómeros de coordinación. Así por ejemplo, la coordinación de los fosforilos β y γ en el complejo bidentado del CrATP genera un centro quiral en el fosforilo β , obteniéndose dos estereoisómeros, como se indica en la Figura 20.

Efecto de los complejos del CrATP en la reacción.

La actividad como sustratos tanto del complejo γ -monodentado como del complejo β, γ -bidentado CrATP no pudo ser detectada en las condiciones de ensayo utilizadas. Por otra parte, se comprobó que ni el complejo monodentado ni el bidentado, a concentraciones máximas de 5,3 y 6,6 mM, respectivamente, ejercían un efecto inhibitor sobre la reacción.

-2-

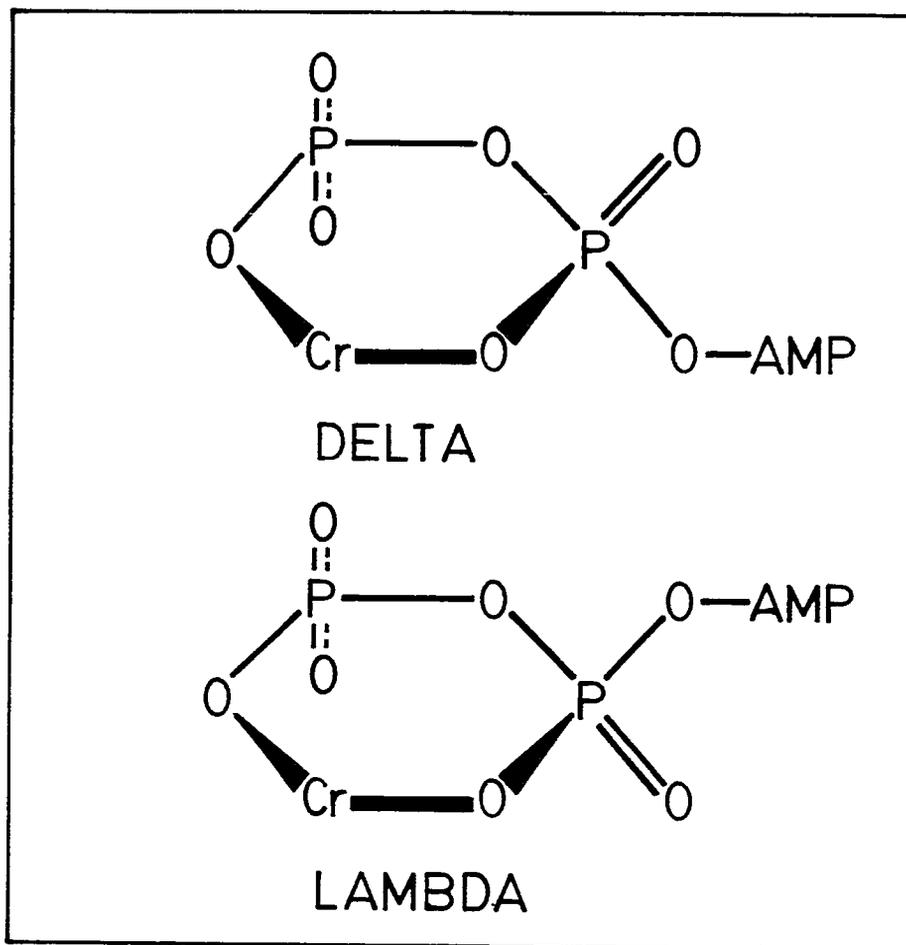


Figura 20. Estructuras de los complejos β, γ -bidentados del CrATP.

Cabe destacar que estos complejos CrATP o CoATP son inhibidores de varias quinasas y presentan constantes de inhibición del orden de μM (Dunaway-Mariano y Cleland, 1980b).

Uno de los enfoques más ampliamente usado para determinar la estructura del complejo metal-nucleótido, es el de los análogos fosforotioatos del ATP introducido por Eckstein (Goody y Eckstein, 1971; Eckstein, 1983; 1985). En estos análogos se reemplaza por azufre uno de los oxígenos libres de los fosforilos α o β del ATP, generándose así quiralidad en el grupo fosforilo α o β dando origen a un par de diastereómeros, R_p y S_p .

Se ha determinado que el Mg^{+2} se une preferentemente al oxígeno, en tanto que el Cd^{+2} se coordina de preferencia al azufre. Por consiguiente el complejo con Mg^{+2} del isómero R_p tendrá la misma configuración estereoquímica que el complejo con Cd^{+2} del isómero S_p , y viceversa (Figura 21) (Jaffe y Cohn, 1978).

Estos análogos azufrados del ATP se pueden utilizar como sustratos en una reacción enzimática y si se encuentra reversión en la selectividad del isómero por la enzima al reemplazar al Mg^{+2} por Cd^{+2} , esto indica que el ión metálico está unido al grupo fosforilo que lleva el azufre (Cohn, 1982; Eckstein, 1985).

Diastereoisómeros del ATP α S como sustratos.

Ambos diastereómeros del ATP α S al ser utilizados como sustratos de la descarboxilasa difosfomevalónica presentaron cinéticas corrientes de Michaelis-Menten. La Tabla 7 resume las constantes cinéticas aparentes

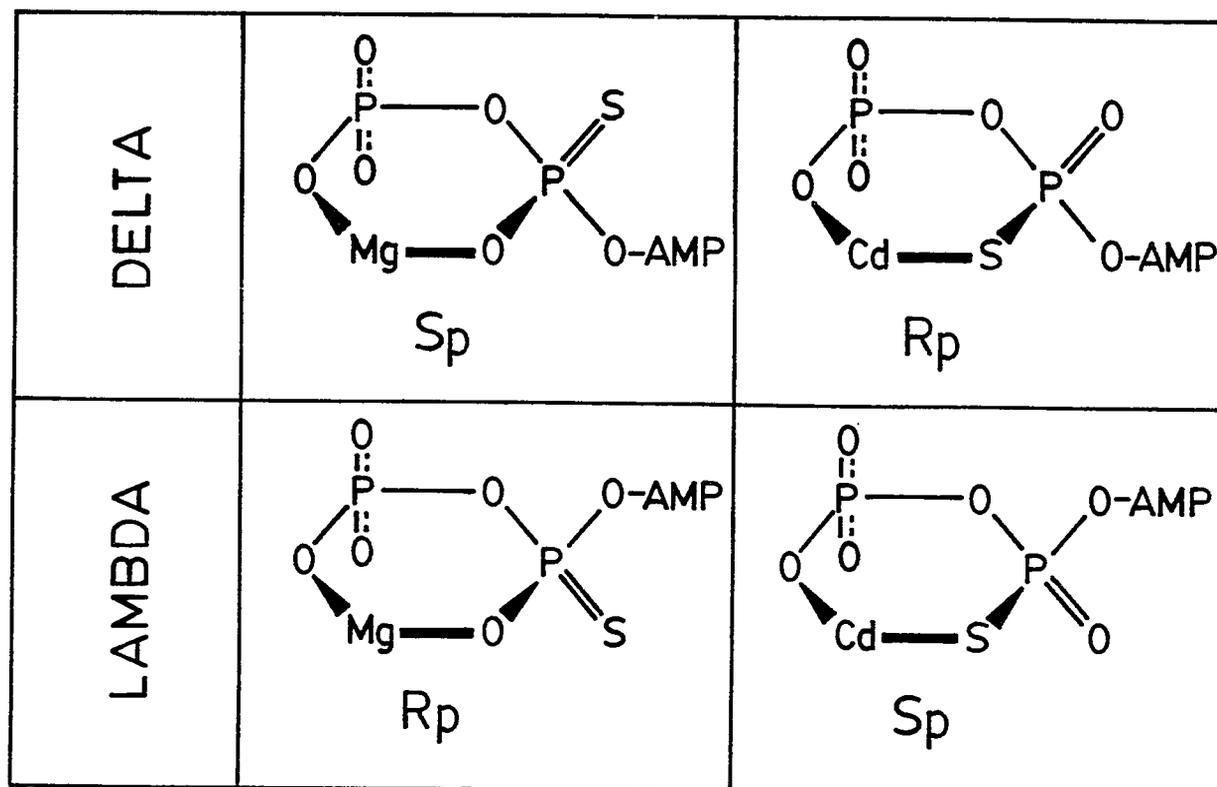


Figura 21. Estructuras de los complejos β, γ -bidentados del ATP β S con Mg^{+2} y con Cd^{+2} .

obtenidas para ambos isómeros del ATP α S en presencia de Cd⁺² o Mg⁺² y su comparación con el sustrato normal ATP. La presencia del átomo de azufre en el fosforilo α hace que la actividad, de acuerdo al coeficiente catalítico V/K_m , disminuya con respecto al ATP. Este efecto se debe a una caída en V acompañada de un aumento en la K_m , a excepción del Cd(S_p)ATP α S donde se aprecia un aumento en V. La comparación de los cuocientes V/K_m indica que no hay inversión de la preferencia estereoquímica para los diastereómeros del ATP α S al cambiar Mg⁺² por Cd⁺²; lo que nos lleva a la conclusión que el metal no se une al ATP a través de su fosforilo α en el complejo MgATP⁻².

Diastereoisómeros del ATP β S como sustratos y como inhibidores.

En estudios preliminares realizados en presencia de Cd⁺², ambos isómeros del ATP β S mostraron una alta velocidad de hidrólisis no enzimática la cual interfiere en el ensayo enzimático. En vista de que no era posible utilizar Cd⁺², se decidió usar Zn⁺² ya que se ha demostrado que este metal se coordina también de preferencia al azufre (Jaffe y Cohn, 1979) y que ha sido usado en este mismo tipo de estudios con enzimas que no presentan actividad con Cd⁺² (Jaffe y col., 1982; Tombras Smith y Cohn, 1982).

La Tabla 8 muestra las velocidades obtenidas a una concentración de 2,25 mM de los complejos MgATP β S⁻² y ZnATP β S⁻². Se puede apreciar que el reemplazo por azufre de uno de los átomos de oxígeno del fosforilo β del ATP, produce una marcada disminución de la actividad. Así, mientras el Mg(R_p)ATP β S es sustrato de la enzima, el Mg(S_p)ATP β S no

Tabla 7

CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES PARA LOS ISÓMEROS DEL ATP α S.

Complejo	K_m (mM)	V $\left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min por mg de proteína}} \right)$	V/ K_m $\left(\frac{\text{mL}}{\text{min por mg de proteína}} \right)$
MgATP	0,18 \pm 0,02	3,70 \pm 0,08	20,6 \pm 2,7
CdATP	0,05 \pm 0,01	2,30 \pm 0,10	46,0 \pm 11,2
Mg(R _p)ATP α S	0,35 \pm 0,03	1,61 \pm 0,06	4,6 \pm 0,6
Mg(S _p)ATP α S	4,95 \pm 0,06	2,00 \pm 0,13	0,4 \pm 0,03
Cd(R _p)ATP α S	0,11 \pm 0,03	1,58 \pm 0,01	14,4 \pm 4,0
Cd(R _p)ATP α S	1,51 \pm 0,16	7,44 \pm 0,31	4,9 \pm 0,7

Los parámetros cinéticos se determinaron usando el ensayo que mide el P_i liberado en la reacción de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos. Se usó una preparación de descarboxilasa difosfomevalónica de act. esp. 3,53 Unidades/mg de proteína.

Tabla 8

COMPLEJOS DEL MgATP β S Y DEL ZnATP β S EN LA REACCION
 CATALIZADA POR LA DESCARBOXILASA DIFOSFOMEVALONICA.

Complejo ^a	velocidad ($\frac{\mu\text{moles}}{\text{min por mg de proteina}}$)
MgATP	6,62
ZnATP	3,62
Mg(R _p)ATP β S	0,01
Mg(S _p)ATP β S	no detectable
Zn(R _p)ATP β S	no detectable
Zn(S _p)ATP β S	0,02

^a
 La concentración de los respectivos complejos fue 2,25 mM.
 La actividad se determinó a través del método que mide el
 P_i según lo indicado en Materiales y Métodos, usando una
 preparación de descarboxilasa difosfomevalónica de act. esp.
 7 Unidades/mg de proteína.

Tabla 9

ISOMEROS DEL ATP β S COMO SUSTRATOS Y COMO INHIBIDORES.

Compuesto	K_m (mM)	V $\left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min por mg de prote\u00edna}} \right)$	K_i (mM)
Mg(R _p)ATP β S	7,43 \pm 0,07	0,03 \pm 0,002	0,61 \pm 0,03
Mg(S _p)ATP β S	-----	-----	0,42 \pm 0,02

La determinaci3n de las constantes cin\u00e9ticas aparentes, K_m y V, se realiz3 mediante el ensayo que mide el P_i de acuerdo a lo indicado en Materiales y M\u00e9todos. Se us3 una preparaci3n de descarboxilasa difosfomeval3nica de act. esp. 3,53 Unidades/mg de prote\u00edna.

Para la determinaci3n de las constantes de inhibici3n se us3 el ensayo espectrofotom\u00e9trico que mide el ADP seg\u00fan lo indicado en Materiales y M\u00e9todos, excepto que las concentraciones del ATP se variaron entre 0,1 y 0,6 mM, y la concentraci3n del $MgCl_2$ fue 1 mM sobre las concentraciones del nucle3tido y del tionucle3tido.

es sustrato y lo contrario ocurre en presencia del Zn^{+2} . Este hecho nos indica que hay inversión de la preferencia estereoquímica para los diastereómeros del $ATP/\beta S$ al cambiar el Mg^{+2} por el Zn^{+2} , lo que nos sugiere que el metal se compleja al ATP a través del fosforilo β .

Al determinar los parámetros cinéticos para el $Zn(S_p)ATP/\beta S$ nos encontramos que éste no presentó un comportamiento cinético según Michaelis-Menten (Figura 22). Este efecto pudiera ser atribuido al tiónucleótido ya que las condiciones para el ensayo fueron las mismas que se utilizaron para determinar las constantes cinéticas del $ZnATP$. Es necesario destacar que el $ZnATP$ presenta un comportamiento cinético de acuerdo a Michaelis-Menten.

El valor de los parámetros cinéticos determinados para el $Mg(R_p)ATP/\beta S$ se muestra en la Tabla 9. Para determinar si el $Mg(S_p)ATP/\beta S$ era capaz de unirse a la enzima se estudió si este compuesto era un inhibidor de la reacción. Ambos diastereómeros del $ATP/\beta S$ resultaron ser inhibidores competitivos y sus correspondientes valores de K_i se muestran también en la Tabla 9. Al respecto cabe destacar que el isómero S_p se une con una afinidad casi el doble de la del isómero R_p . Así, aunque el isómero delta no es activo como sustrato, se une tan bien o mejor que el isómero lambda.

Efecto de la posición del azufre en el reemplazo por oxígeno.

Al comparar los parámetros cinéticos de las reacciones del $MgATP$ y de los isómeros más activos del $MgATP/\alpha S$ y del $MgATP/\beta S$ (Tablas 7 y 9) encontramos que las velocidades máximas decrecen en el orden

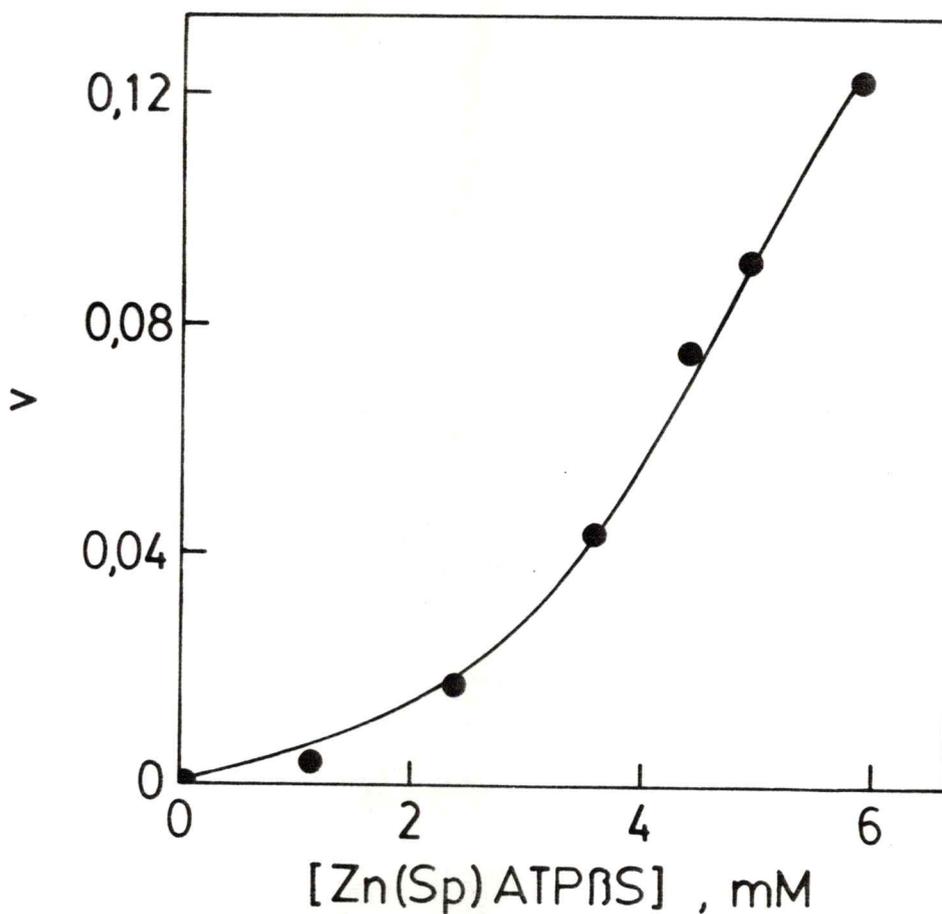


Figura 22. Efecto de la concentración del $Zn(S_p)ATP\beta S$ en la reacción de la descarboxilasa difosfomevalónica.

El medio de reacción contenía en un volumen de 0,1 mL : amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 7,0, MVAPP 0,3 mM, descarboxilasa difosfomevalónica 80 mU (act. esp. 7 U/mg de proteína). La concentración del Zn^{+2} fue el 75% de la concentración del $(S_p)ATP\beta S$. La concentración del complejo $(Zn(S_p)ATP\beta S)^{-2}$ se determinó mediante el programa de computación indicado en Materiales y Métodos. La velocidad se expresa como μ moles de MVAPP descarboxilados por minuto por mg de proteína.

$ATP > ATP\alpha S \gg ATP\beta S$ ajustándose al patrón general (Ngoc y col, 1979) que indica que al reemplazar un oxígeno por azufre en el ATP la velocidad disminuye progresivamente a medida que el reemplazo se acerca al sitio de rompimiento del enlace.

No fue posible determinar los parámetros cinéticos para $ATP\gamma S$ ya que con este compuesto la enzima presenta una actividad muy disminuida (Iyengar y col., 1986).

Inactivación de la enzima por tionucleótidos.

Ngoc y col. (1979) han informado que la fosfofructoquinasa de músculo de conejo se inactiva por $ATP\alpha S$ y $AMPS$. Debido a que este es el único trabajo existente en la literatura en el cual se informa sobre un efecto inactivador de los análogos fosforotioatos de los nucleótidos, y si se considera que el azufre del $ATP\alpha S$ o del $ATP\beta S$ es susceptible de reaccionar con grupos sulfhidrilos de la enzima, se decidió estudiar si estos tionucleótidos eran capaces de inactivar irreversiblemente a la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo.

En el experimento de la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos al incubar la enzima con diferentes tionucleótidos. Se aprecia que en el intervalo de concentraciones de 1,5 a 1,9 mM, el mejor agente inactivante es el $(R_p)ATP\beta S$.

Se investigó también la inactivación por $ATP\gamma S$, encontrándose que este compuesto a una concentración de 10 mM produce un 50% de inactivación en 210 minutos.

Dado que el mejor agente inactivante fue el $(R_p)ATP\beta S$ se decidió

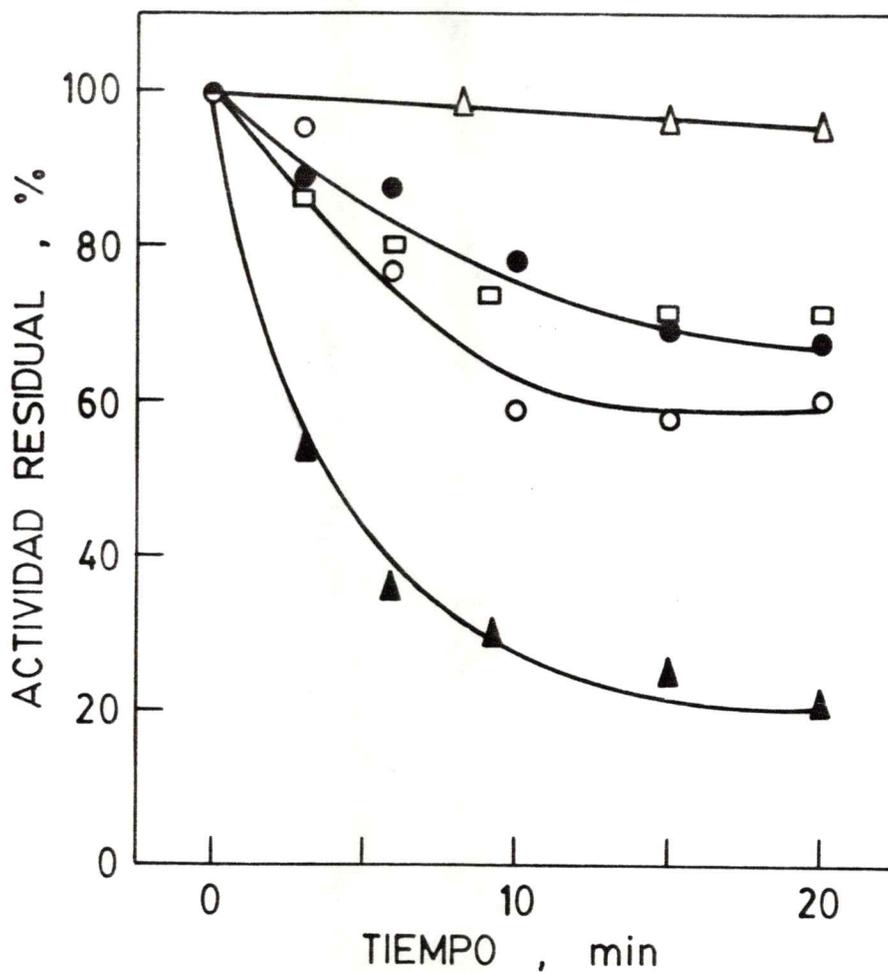


Figura 23. Inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por diversos tionucleótidos.

La reacción se efectuó incubando la enzima (64 mU; act. esp. 5,6 U/mg de proteína) a 30° en presencia de : 1,67 mM (R_p)ATPβS (▲); 1,50 mM (S_p)ATPβS (□); 1,90 mM ADPβS (○); 1,77 mM AMPS (●) y control (Δ); en amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 7,0. A los tiempos indicados en la figura, se tomaron alícuotas de 0,010 mL para el ensayo de la enzima.

usar este compuesto para estudiar la inactivación de la enzima. Al incubar la descarboxilasa difosfomevalónica con diferentes concentraciones del $(R_p)ATP\beta S$ la inactivación ocurrió rápidamente en forma proporcional a la concentración del inactivador (no se muestra).

Efecto protector de los sustratos y del DTT en la reacción de inactivación.

Se probó si el MVAPP y el ATP ejercían algún efecto protector sobre la enzima, agregando el $(R_p)ATP\beta S$ a la enzima preincubada con uno u otro sustrato. La 24 muestra que tanto el MVAPP como el ATP a concentraciones de 0,2 y 5,0 mM respectivamente, protegieron parcialmente de la inactivación producida por el $(R_p)ATP\beta S$ 1,67 mM.

La Figura 24 nos muestra también que al efectuar la reacción de inactivación en presencia de DTT 15 mM, no ocurrió inactivación de la enzima. Este resultado podría sugerir que los tionucleótidos estarían interactuando con grupos sulfhidrilos de la descarboxilasa difosfomevalónica.

Efecto del pH en la reacción de inactivación.

Este estudio se efectuó utilizando diversos amortiguadores para la preincubación de la enzima con el inactivador. Estos fueron los siguientes : Tris-HCl 100 mM pH 7,0; MES 100 mM pH 5,4 y N,N'-Bis(2-hidroxietil)-piperazina 100 mM pH 5,6. Se encontró que la inactivación de la enzima se ve notablemente disminuida a pH ácido (Figura 25).

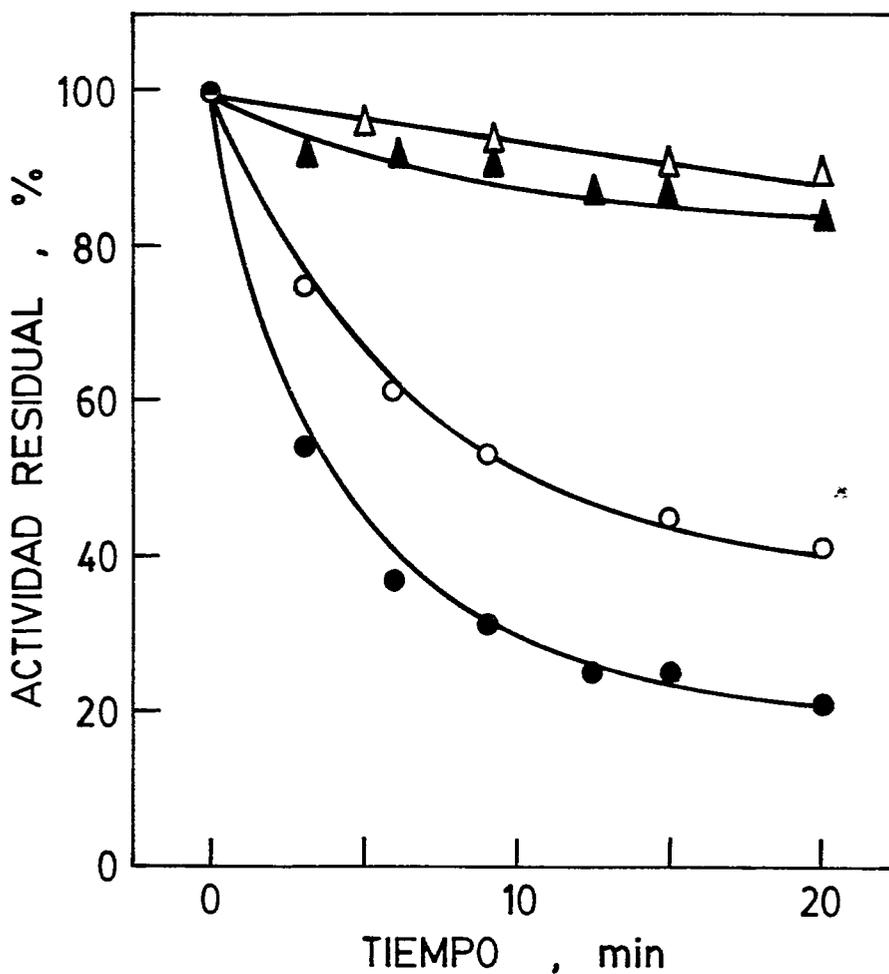


Figura 24. Efecto de los sustratos y del DTT en la reacción de inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por $(R_p)ATP\beta S$.

La reacción se efectuó incubando la enzima (64 mU; act. esp. 5,6 U/mg de proteína) a 30° con 1,67 mM de $(R_p)ATP\beta S$ (●) en presencia de 15 mM DTT (Δ), 0,20 mM MVAPP (▲) y 5 mM ATP (○); en amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 7,0.

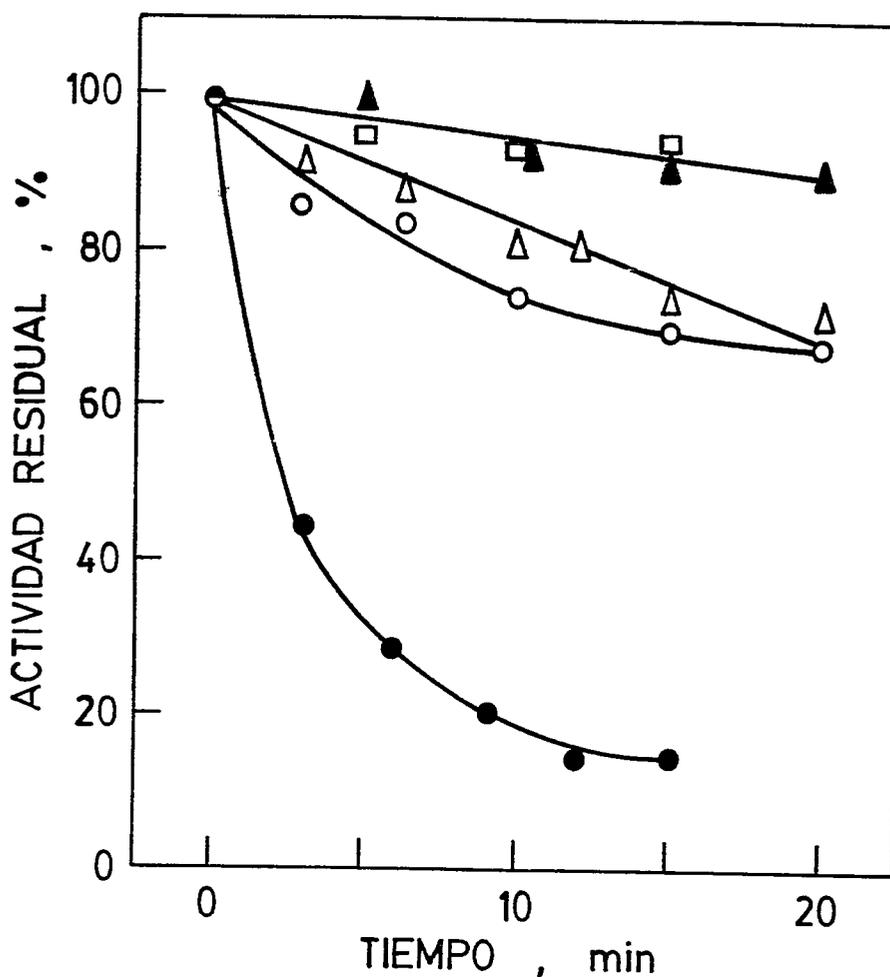


Figura 25. Efecto del pH en la inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por $(R_p)ATP\beta S$.

La reacción se llevó a cabo en los siguientes amortiguadores : MES 0,1 M pH 5,4 en presencia (○) o en ausencia (□) de 1,67 mM $(R_p)ATP\beta S$; N,N'-Bis(2-hidroxietil)-piperazina 0,1 M pH 5,6 en presencia (Δ) o en ausencia (▲) de 1,67 mM $(R_p)ATP\beta S$; Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 en presencia (●) de 1,67 mM $(R_p)ATP\beta S$. Se usó una preparación de descarboxilasa difosfomevalónica de act. esp. 5,6 U/mg de proteína.

DISCUSION.

En esta tesis se presenta una primera aproximación al estudio del mecanismo de acción de la descarboxilasa difosfomevalónica desde un punto de vista cinético. Para una mayor claridad de la exposición hemos dividido esta discusión en cuatro puntos : mecanismo cinético, efectos del nucleótido y del metal bivalente sobre la actividad, estructura del complejo metal-ATP y propiedades del sitio activo.

MECANISMO CINETICO.

A partir de estudios realizados en velocidad inicial se ha sugerido que la unión de los sustratos a la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo ocurre en forma secuencial (Alvear y col., 1982). Los resultados obtenidos con la enzima de cerebro de pollo (Zafra y col., 1985) permiten llegar a igual conclusión.

En esta tesis se confirmó la formación de un complejo ternario previo a la liberación de los productos, al obtener una parábola en una gráfica del recíproco de la velocidad con respecto al recíproco de la concentración de uno de los sustratos, usando el ATP y el MVAPP en una razón constante. Sin embargo, estos estudios no nos dicen si la unión de los sustratos o la liberación de los productos suceden en un orden obligatorio o al azar.

Se propuso determinar el orden de adición de los sustratos a la enzima mediante estudios de inhibición con análogos de los sustratos. De acuerdo a Fromm (1979), para un mecanismo en secuencia ordenada se espera que el

análogo del segundo sustrato que se adiciona a la enzima presente una inhibición de tipo incompetitivo con respecto al primer sustrato. Por el contrario, en un mecanismo al azar se espera obtener inhibición competitiva cuando el inhibidor es análogo del sustrato variable, e inhibición mixta cuando el inhibidor no es análogo del sustrato variable.

Los estudios realizados con MVAP, un análogo del MVAPP, indicaron una inhibición competitiva con respecto al MVAPP y una inhibición mixta con respecto al ATP. Los resultados obtenidos con dos análogos del ATP, el ATPγS y el AMP-PCP, fueron coincidentes pues la inhibición fue competitiva con respecto al ATP e incompetitiva con respecto al MVAPP. Estos resultados indican un mecanismo en secuencia ordenada en el cual el MVAPP es el primer sustrato que se adiciona a la enzima.

Thompson y Bachelard (1976) han examinado la relación existente entre el valor de la constante de inhibición aparente para inhibidores de punto muerto y el valor de la constante de inhibición verdadera. Este último puede obtenerse sólo si se conoce con certeza el mecanismo cinético de la reacción y se escoge la representación gráfica apropiada. En el caso de un mecanismo en secuencia ordenada, es posible obtener el valor de la K_i verdadera, a partir de gráficas secundarias de intersecciones provenientes de la gráfica de Hanes-Woolf, sólo si el inhibidor es competitivo con respecto al primer sustrato que se adiciona a la enzima.

En la Tabla 10 se muestran los valores de las constantes de inhibición verdaderas para los análogos de los sustratos de la descarboxilasa difosfomevalónica calculados a partir de los valores de K_i y de K_i' obtenidos en esta tesis, tomando en cuenta los valores de K_{1a} y de las constantes

Tabla 10.

CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA INHIBICIÓN DE LA DESCARBOXILASA
DIFOSFOMEVALÓNICA POR ANALÓGOS DE LOS SUSTRATOS.

Inhibidor	Sustrato variable	K_i	$(K_i^v)^a$	K_i^i	$(K_i^v)^b$
		mM			
MVAP	MVAPP	3,66	3,66 ^c	-	-
MVAP	ATP	4,39	2,65	20,27	7,67
ATP γ S	ATP	0,09	0,05	-	-
ATP γ S	MVAPP	-	-	0,65	0,22
AMP-PCP	ATP	14,01	5,56	-	-
AMP-PCP	MVAPP	-	-	5,22	3,26

a
Para la inhibición del MVAP con respecto al MVAPP $K_i = K_i^v$. El valor de K_i^v para la inhibición del MVAP en relación al ATP fue calculado a partir de $K_i = K_i^v \left(1 + \frac{[MVAPP]}{K_{i,a}} \right)$. Para la inhibición del ATP γ S o del AMP-PCP con respecto al ATP^v fue calculado a partir de $K_i = K_i^v \left(1 + \frac{K_{i,a}}{[MVAPP]} \right)$.

b
El valor de K_i^v para la inhibición del MVAP con respecto al ATP fue calculado a partir de $K_i^i = K_i^v \left(1 + \frac{[MVAPP]}{K_{mMVAPP}} \right)$, mientras que para la inhibición del ATP γ S o del AMP-PCP con respecto al MVAPP fue calculado a partir de $K_i^i = K_i^v \left(1 + \frac{[ATP]}{K_{mATP}} \right)$.

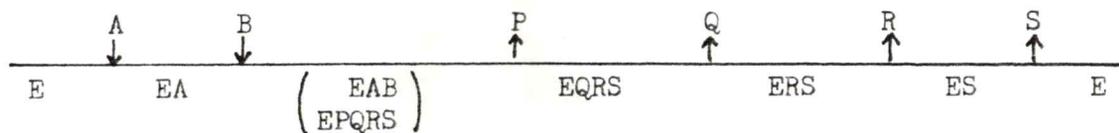
c
Se informan los valores calculados para K_i^v sin su correspondiente error estándar debido a que los valores informados por Cardemil (1982) para $K_{i,a}$, K_{mATP} y K_{mMVAPP} no lo tienen.

Todas las ecuaciones provienen de Thompson y Bachelard (1976).

K_i^v = constante de inhibición verdadera.

de Michaelis informados por Cardemil (1982). Se observa que para AMP-PCP estos valores son similares (3,26 y 5,56 mM), en tanto que para el MVAP (2,65, 3,66 y 7,67 mM) y para el ATP S (0,05 y 0,22 mM) hay una mayor diversidad. La diferencia entre estos valores se puede atribuir : a) a la acumulación de los errores experimentales en la determinación de las respectivas constantes y b) a la diferencia en las condiciones experimentales empleadas en esta tesis y las informadas por Cardemil (1982).

Una vez conocido el orden de adición de los sustratos a la enzima, nos interesó conocer el orden de liberación de los productos. A modo de ejemplo discutiremos los resultados esperados de los estudios de inhibición por producto suponiendo un mecanismo Bi-Tetra en secuencia ordenada (Cleland, 1970).



Se espera que S sea un inhibidor competitivo con respecto a A y mixto con respecto a B; P debería ser mixto con respecto a A y a B; Q y R deberían ser incompetivos con respecto a A y a B. Para poder distinguir entre Q y R se puede estudiar la inhibición en presencia de otro producto. Así, un nivel fijo de S hará la secuencia de R a A o B reversible y por lo tanto el patrón de inhibición del producto R será ahora mixto, mientras que a un nivel fijo de P el patrón de inhibición de Q será mixto con respecto a A o a B.

La inhibición ejercida por el IPP fue mixta con respecto a ambos sustratos lo que podría indicar que el IPP es el primer sustrato que se libera de la enzima, siempre y cuando el mecanismo cinético fuera el indicado

anteriormente. Por otra parte, el fosfato inorgánico en concentraciones hasta 0,15 M no produjo inhibición. Cabe hacer notar que la descarboxilasa difosfomevalónica de látex de Hevea brasiliensis (Skilleter y Kekwick, 1971) tampoco es inhibida por P_i , aunque la concentración máxima probada por estos autores fue solo de 10 mM. En vista de este resultado y considerando que experimentos preliminares de inhibición por bicarbonato indicaron que este producto era un mal inhibidor, se decidió no continuar con estos estudios ya que para poder postular el orden de salida de los productos es necesario tener todos los patrones de inhibición.

La protección ejercida por el $MgATP^{-2}$ en los experimentos de inactivación de la descarboxilasa difosfomevalónica por fenilgloxal (Jabalquinto y col., 1983) y por metilmetanotiosulfonato (Alvear y col., 1986) no es compatible con un mecanismo en secuencia ordenada en el cual el $MgATP^{-2}$ se une al complejo enzima-MVAPP. Una posible explicación a estas protecciones es un mecanismo al azar con una vía preferencial con MVAPP como el primer sustrato. Otra posibilidad sería la unión del $MgATP^{-2}$ a la enzima libre con la formación de un complejo de punto muerto, en analogía a lo que ocurre con las quinasas mevalónica (Soler y col., 1979) y fosfomevalónica (Valdevenito, 1983). Al respecto, es interesante destacar que tanto la reacción catalizada por la quinasa mevalónica (Beytía y col., 1970) como la catalizada por la quinasa fosfomevalónica (Valdevenito, 1983) y la catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica, presentan mecanismos secuenciales ordenados donde el segundo sustrato que se une a la enzima es el complejo $MgATP^{-2}$.

EFECTOS DEL NUCLEOTIDO Y DEL METAL BIVALENTE SOBRE LA ACTIVIDAD.

Al igual que para muchas de las fosfotransferasas estudiadas (Morrison, 1979), el sustrato verdadero de la descarboxilasa difosfomevalónica es el MgATP^{-2} .

La actividad de la enzima presentó una relación hiperbólica al aumentar las concentraciones del ATP y del MgCl_2 (Figura 5). La única especie que presenta una relación positiva con la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica en esta situación es el MgATP^{-2} , indicando de esta manera su identidad como sustrato. Por otra parte, mediante variaciones en el pH, se descartó que el MgHATP^- fuera un sustrato para la enzima, como ocurre con la hexoquinasa de levadura (Viola y Cleland, 1978).

La gráfica del $\log V/K_{\text{mATP}}$ en función del pH mostró quiebres tanto a valores de pH altos como a valores bajos, correspondiendo al quiebre de pH bajo un valor de pK de $5,70 \pm 0,12$. Así, un grupo en el sustrato o en la enzima debe estar desprotonado para la actividad enzimática. Ya que el MgATP^{-2} tiene un pK de 5,3 (Jaffe y Cohn, 1978a), parece probable que sea su ionización la que se observa en el lado ácido de la gráfica del $\log V/K_{\text{mATP}}$ en función del pH. Esta conclusión es apoyada por el hecho que este pK no se observa en la gráfica de $-\log K_i$ para el $\text{ATP} \gamma \text{S}$ en función del pH. Al respecto, cabe destacar que el $\text{MgATP} \gamma \text{S}^{-2}$ tiene un pK de 4,2 (Jaffe y Cohn, 1978a). De esta forma podemos concluir que el MgHATP^- no es sustrato de la enzima, ya que de acuerdo a Viola y Cleland (1978) si la enzima utilizara como sustratos tanto al MgATP^{-2}

como al $MgHATP^-$, el pK del nucleótido no debería aparecer en la gráfica de V/K_{mATP} en función del pH.

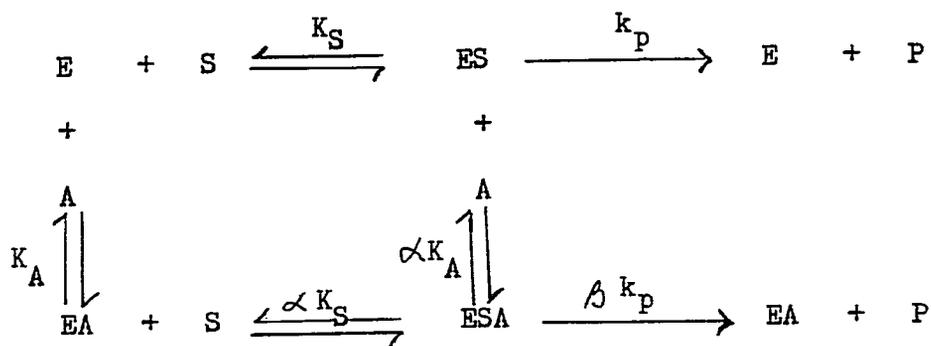
Por otra parte, los estudios realizados con el objeto de determinar el efecto del ATP libre sobre la actividad enzimática sugirieron que éste actúa como un activador. Si consideramos que la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica ocurre en ausencia del ATP libre podemos considerar que esta especie actúe como un activador.

En el Esquema 1 se muestra un modelo para una activación y la ecuación cinética correspondiente. Al respecto, Segel (1975) ha indicado que en general, se espera que α sea menor que 1 y que β sea mayor que 1. Por otra parte, la ecuación de velocidad nos indica que en una gráfica de dobles recíprocos se espera obtener una familia de rectas cuyas pendientes disminuyan al aumentar la concentración del activador

Para establecer fehacientemente que el ATP libre actúa como un activador de la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo se debería efectuar una serie de experimentos en los cuales se determine el efecto sobre la velocidad de diferentes concentraciones del ATP libre, en un intervalo de concentraciones del $MgATP^{-2}$. Al graficar los resultados de este experimento en la forma de dobles recíprocos deberíamos obtener una familia de rectas cuyas pendientes disminuyan al aumentar la concentración del ATP libre.

La activación por el ATP libre de enzimas que utilizan como sustrato al $MgATP^{-2}$ no es común, aunque recientemente se ha informado que en hígado de cerdo, tanto la quinasa mevalónica (Lee y O'Sullivan, 1983) como la quinasa fosfomevalónica (Lee y O'Sullivan, 1985a) y la descarboxilasa

ESQUEMA 1.

MECANISMO GENERAL PARA ACTIVACION ^a

$$\frac{v}{V} = \frac{[S]}{K_S \frac{\left(1 + \frac{[A]}{K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)} + [S] \frac{\left(1 + \frac{[A]}{\alpha K_A}\right)}{\left(1 + \frac{\beta[A]}{\alpha K_A}\right)}}$$

^a Tomado de Segel (1975).

difosfomevalónica (J. W. O'Sullivan, comunicación personal) son activadas por el ATP libre.

La activación de estas enzimas por el ATP libre puede ser explicada mediante dos mecanismos. Por una parte se puede pensar en un cambio pequeño el cual afecte sólo al medio ambiente local del sitio activo de la enzima, y por otra parte en un cambio substancial que produjera la polimerización de la enzima y de esta forma se afecte el sitio activo. Al respecto es interesante destacar que en el caso de la quinasa mevalónica, mediante estudios de sedimentación en gradientes de sacarosa se ha podido descartar la polimerización de la enzima, y los resultados de los experimentos de fluorescencia están de acuerdo con que la unión del ATP libre a la enzima produce un cambio conformacional (Lee y O'Sullivan, 1983).

Se ha informado previamente que una variedad de iones metálicos, entre ellos Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , y en menor grado Ca^{+2} y Ba^{+2} , pueden reemplazar al Mg^{+2} en la reacción catalizada por la descarboxilasa de hígado de pollo (Alvear y col., 1982). Estos experimentos fueron realizados bajo condiciones estandarizadas, con 5 mM ATP y 5 mM del respectivo ión metálico.

Dada la relevancia que tienen el Cd^{+2} y el Zn^{+2} para la determinación de la estructura del complejo metal-ATP, especialmente en los experimentos con los análogos fosforotioatos del ATP (Cohn, 1982 ; Eckstein, 1985), se estudió en mayor detalle la capacidad de los iones metálicos bivalentes para actuar en la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica. Se demostró que mientras el Mg^{+2} libre no tiene un efecto

sobre la actividad enzimática, hay un claro efecto inhibitor producido por Zn^{+2} libre, Cd^{+2} libre y Mn^{+2} libre.

La eficiencia relativa de Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} y Zn^{+2} como metales activadores para la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica se evaluó en términos del cociente V/K_m . La comparación de V/K_m para los correspondientes complejos $(metal-ATP)^{-2}$ indicó que Mn^{+2} es el mejor activador, efecto debido principalmente al bajo valor de K_m obtenido en presencia de este ión metálico. Los cocientes relativos fueron : Mn^{+2} 100, Cd^{+2} 37, Mg^{+2} 14, y Zn^{+2} 1,7, lo que está en desacuerdo con el requerimiento de metales indicado en la literatura para esta enzima (Skilleter y Kekwick, 1971; Popják, 1969; Ramachandran y Shah, 1977; Shama Bhat y Ramasarma, 1980, y Alvear y col., 1982). En todos estos casos se informa que la actividad de la descarboxilasa difosfomevalónica es igual con Mg^{+2} o con Mn^{+2} . Referente a este punto es de interés hacer notar que los autores anteriormente nombrados realizaron mediciones de velocidad a una concentración fija del ATP y del correspondiente ión metálico y no calcularon las concentraciones de los complejos $(metal-ATP)^{-2}$.

La investigación del papel del ión metálico en las reacciones catalizadas por fosfotransferasas, mediante el estudio de los valores de las constantes cinéticas en presencia de diferentes iones metálicos, ha sido escasa. Las investigaciones realizadas en la reacción reversa de la creatina-quinasa han indicado que V se relaciona con la capacidad del ión metálico para polarizar el enlace N-P de la fosfocreatina y que el radio iónico del catión bivalente influencia la unión del metal-nucleótido

al complejo enzima-fosfocreatina (Morrison y Uhr, 1966). Por otra parte, estudios realizados con la NAD-quinasa han mostrado que la misma V se obtiene con $MgATP^{-2}$, $MnATP^{-2}$, $CoATP^{-2}$ y $ZnATP^{-2}$, aunque estos complejos metal-ATP tienen diferentes constantes de Michaelis (Apps, 1969).

Se ha informado la presencia de al menos un grupo ditiol vecino en la enzima de hígado de pollo (Alvear y col., 1986), y ya que tanto Cd^{+2} como Zn^{+2} se unen fuertemente a ditiolos (Lolkema y col., 1986), podría haberse pensado que la inhibición producida por Cd^{+2} libre y por Zn^{+2} libre se debiera a una inactivación de la enzima por estos cationes. Los experimentos de inactivación por estos iones metálicos, sin embargo, indicaron que ambos cationes inhiben irreversiblemente a la descarboxilasa difosfomevalónica, siendo el Zn^{+2} un mal inactivador con respecto al Cd^{+2} . Estos resultados indican que la inhibición producida por el Cd^{+2} libre y por el Zn^{+2} libre no es debida a inactivación de la enzima ya que si este fuese el caso el Zn^{+2} debería haber sido mejor inactivador que el Cd^{+2} .

El estudio del tipo de inhibición producida por el exceso del ión metálico, y en este caso el Cd^{+2} sería el ión de elección, permitiría saber si éste se está uniendo al sitio activo de la enzima (inhibición competitiva) o si existe otro sitio de unión para el metal libre (inhibición no competitiva).

Los experimentos de inactivación comentados anteriormente están de acuerdo con estudios realizados en ditiolos modelos (en los cuales se ha demostrado que el Cd^{+2} se une con mayor afinidad que el Zn^{+2} (Lolkema y col., 1986)), y además nos permiten confirmar la presencia de un grupo ditiol vecino en la enzima de hígado de pollo.

ESTRUCTURA DEL COMPLEJO METAL-ATP.

Existen varios enfoques que permiten determinar la estructura del complejo metal-nucleótido en el sitio activo de una enzima. Por una parte están los enfoques de tipo estructural como el cálculo de distancias a partir del efecto de un ión paramagnético como el Mn^{+2} en los tiempos de relajación longitudinal de núcleos magnéticos como el ^{31}P , o los estudios de difracción de rayos X, y por la otra parte tenemos los métodos de tipo cinético en los cuales se hace uso ya sea de los análogos fosforotioatos del ATP (Eckstein, 1985) o de los complejos de sustitución inertes, como el CrATP o el CoATP (Cleland, 1982).

En esta tesis hemos enfocado el estudio de la estructura del complejo metal-ATP en el sitio activo de la descarboxilasa difosfomevalónica mediante los dos métodos cinéticos comentados anteriormente.

En nuestras condiciones de ensayo encontramos que tanto el complejo γ -monodentado como el complejo β, γ -bidentado del CrATP no eran sustratos de la enzima. Cleland (1982) ha propuesto que la actividad como sustratos de los complejos del CrATP se observa sólo cuando la enzima no tiene que insertar una de sus cadenas laterales en la esfera de coordinación interna del metal. Es difícil, sin embargo, indicar algún significado a la falta de actividad con la descarboxilasa difosfomevalónica debido a que nuestras condiciones experimentales no permitían detectar un ciclo único de reacción.

Ambos diastereómeros del ATP α S fueron sustratos de la descarboxilasa difosfomevalónica y la comparación de los cuocientes V/K_m no mostró re-

versión en la estereoselectividad del isómero por la enzima al reemplazar el Mg^{+2} por el Cd^{+2} . Estos resultados sugieren que el metal no se coordina al fosforilo α del nucleótido, aunque la falta de estereoselectividad que hemos encontrado con el $ATP\alpha S$ puede tener varias explicaciones además de la no unión del metal. Así, las restricciones estructurales impuestas por el sitio activo de la enzima pueden forzar al Mg^{+2} y al Cd^{+2} a unirse a un mismo ligando (Cohn, 1982). Además, la alta proporción de especies tridentadas en el $CdATP\alpha S$ (75%) en comparación con la del $MgATP\alpha S$ (27%) (Pecoraro y col., 1984), implica que la capacidad de los complejos del $MgATP\alpha S$ y del $CdATP\alpha S$ para actuar como sustratos va a depender también de la capacidad del sitio activo de la enzima para aceptar complejos bidentados o tridentados, y de su preferencia por la forma extendida o plegada del nucleótido.

Para el estudio con los diastereómeros del $ATP\beta S$ fue necesario cambiar el Cd^{+2} por el Zn^{+2} debido a problemas en el ensayo. Cabe recordar que el Zn^{+2} al igual que el Cd^{+2} se coordina de preferencia al azufre (Jaffe y Cohn, 1979) y ha sido usado en este mismo tipo de estudios con enzimas como la 3-fosfoglicerato-quinasa (Jaffe y col., 1982) y la metionil-tRNA sintetasa (Tombras Smith y Cohn, 1982).

Se observó reversión en la selectividad de los isómeros del $ATP\beta S$ por la enzima al reemplazar el Mg^{+2} por el Zn^{+2} . Así, mientras el $Mg(R_p)ATP\beta S$ fue sustrato de la enzima, el $Mg(S_p)ATP\beta S$ no presentó actividad como sustrato, en tanto que lo contrario ocurrió en presencia del Zn^{+2} en que el sustrato fue el complejo $Zn(S_p)ATP\beta S$. Es necesario hacer notar que en este caso no fue posible hacer una comparación de los

cuocientes V/K_m ya que el $Zn(S_p)ATP/\beta S$ no presentó un comportamiento cinético de acuerdo a Michaelis-Menten. La razón de este comportamiento es desconocida y no fue estudiada en mayor profundidad. Sin embargo, la comparación de los cuocientes de velocidad proporciona evidencia que el metal se compleja al fosforilo β del ATP.

Los resultados obtenidos con los isómeros del ATP/ βS como sustratos también nos indican que la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo es estereoselectiva para el isómero lambda del complejo metal-nucleótido (Figura 21). Es de interés hacer notar que de todas las enzimas investigadas hasta el momento, la preferencia por el isómero lambda o por el isómero delta es de aproximadamente un 50% en cada caso (Eckstein, 1985). Al respecto, la quinasa mevalónica (Lee y O'Sullivan, 1984) tiene preferencia por el isómero lambda del complejo metal-ATP y la quinasa fosfomevalónica (Lee y O'Sullivan, 1985b) prefiere el isómero delta del complejo metal-nucleótido.

La reversión observada para los diastereómeros del ATP/ βS indica que el metal se compleja al fosforilo β del nucleótido en alguna etapa de la reacción enzimática, posiblemente durante la etapa limitante de la velocidad. Como no se encontró reversión en el fosforilo α , la interpretación más simple de estos resultados es que el metal se compleja con el ATP a través de los fosforilos β y γ . Aunque la complejación al fosforilo γ del ATP no se puede demostrar directamente con el método de los fosforotioatos, se supone que la forma activa del sustrato es el complejo β, γ -bidentado del ATP, ya que el complejo β -monodentado se considera termodinámicamente menos estable que el complejo cíclico β, γ -

bidentado (Eckstein, 1983).

En contraste con la preferencia por el isómero lambda para la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica, los estudios de inhibición con los diastereómeros del ATP/βS indican que el isómero delta se une con mayor afinidad que el isómero lambda. En el caso de la fosfofructoquinasa de hígado de bovino también se ha informado que el isómero inactivo como sustrato se une igual o mejor que el isómero activo (Pecoraro y col., 1985). Una posible explicación a este hecho ha sido sugerida por Mejillano y col. (1986). Estos autores trabajando con la formiltetrahidrofolato-sintetasa han encontrado que aunque la enzima es estereoespecífica para el isómero delta del $MgATP^{-2}$, une con igual afinidad a los isómeros lambda del ATP/βS y del CrATP. Ellos suponen que la parte AMP del nucleótido se ubica en un sitio específico, colocando el fosforilo γ del isómero delta a una distancia apropiada del sitio catalítico. Si el isómero lambda se uniera con la parte AMP del nucleótido en el mismo sitio, el fosforilo γ quedaría ahora más alejado del sitio catalítico.

Ya que tanto el isómero lambda como el delta del complejo β,γ-bidentado estarán presentes en una solución de MgATP, debe considerarse que la descarboxilasa difosfomevalónica actúa en la presencia de un inhibidor competitivo del sustrato metal-nucleótido.

Eckstein (1985) ha realizado un análisis de los estudios efectuados con los análogos fosforotioatos del ATP, del cual podemos destacar que todos los patrones posibles de reversión de la estereoselectividad han sido observados. De esta manera, se ha encontrado reversión en el

fosforilo α y β , por ejemplo, en el caso de la arginina-quinasa, creatina-quinasa y piruvato-quinasa; por otra parte se ha encontrado reversión en el fosforilo β para la fosfofructoquinasa y acetato-quinasa entre otras. En cambio, solo en el caso de la fosfoglicerato-quinasa se ha encontrado reversión únicamente en el fosforilo α . Es interesante hacer notar que de todas las enzimas estudiadas hasta la fecha no se ha dado el caso de no encontrar reversión ni en el fosforilo α ni en el β .

Las reacciones enzimáticas en las cuales participa el ATP corresponden a sustituciones nucleofílicas ya sea en el fosforilo α , β o γ del ATP con desplazamiento de pirofosfato, AMP o ADP, respectivamente. En general, los desplazamientos nucleofílicos sobre el átomo de fósforo se pueden agrupar en dos clases de mecanismos, el disociativo o S_N1 y el asociativo o S_N2 (Mildvan, 1979).

Mildvan (1979), propone tres criterios para determinar el mecanismo de las reacciones en que participa el ATP. Dentro de éstos se encuentra la ubicación del ión metálico en el complejo activo. Se apoya la existencia de un mecanismo asociativo cuando el metal coordina al grupo fosforilo del ATP que va a ser sustituido, puesto que esta coordinación dificulta el otro mecanismo. El segundo criterio es conocer las distancias inter-sustratos de la enzima, al respecto se espera que la distancia entre el nucleófilo y el fosforilo atacado sea menor (ejemplo $\leq 3,3 \text{ \AA}$) para un mecanismo asociativo que para uno disociativo (ejemplo $\geq 4,9 \text{ \AA}$). Finalmente, el tercer criterio es determinar la estereoquímica de la sustitución en el átomo de fósforo. Se espera que el mecanismo

disociativo ocurra con racemización en el fósforo; en cambio el asociativo ocurre con inversión o retención (si ha ocurrido una pseudo-rotación) de la configuración.

La aplicación de tanto el primer como del tercer criterio para la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica nos permite sugerir que ésta ocurre mediante un mecanismo asociativo. Al respecto, en esta tesis hemos dado evidencia de que el metal se coordina al ATP formando un complejo β, γ -bidentado, en tanto que Iyengar y col. (1986) han demostrado que la reacción ocurre con inversión de la configuración en el fósforo.

Los experimentos de inactivación de la enzima por los diferentes tionucleótidos indicaron que el mejor inactivador es el $(R_p)ATP\beta S$ y el peor es el $ATP\gamma S$. En una condición intermedia se encontraron el $(S_p)ATP\beta S$, el $ADP\beta S$ y el $AMPS$.

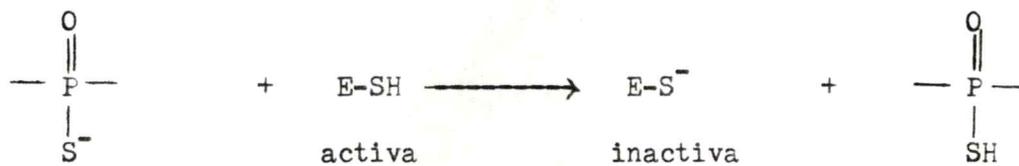
La protección de la inactivación ejercida por los sustratos sugiere que el grupo reactivo está en o cerca del sitio activo. A su vez, la protección ejercida por el DTT podría indicar que el tionucleótido estuviera interactuando con grupos sulfhidrilos funcionales de la descarboxilasa difosfomevalónica. Al respecto, se ha informado la presencia de grupos sulfhidrilos, con un pK de 7,3, en la enzima de hígado de pollo (Alvear y col., 1986).

La inactivación ejercida por los análogos azufrados de los nucleótidos podría explicarse mediante los dos mecanismos que se muestran en el Esquema 2. En el mecanismo A se postula que la unión del tionucleótido al sitio activo de la enzima produciría la desprotonación de un

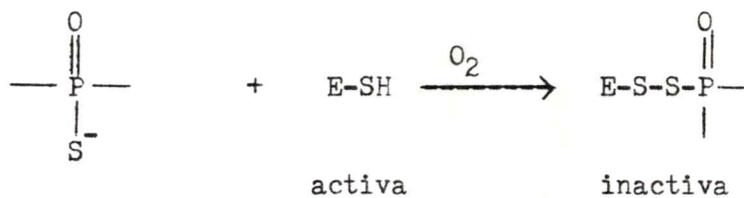
ESQUEMA 2.

POSIBLES MECANISMOS PARA LA INACTIVACION DE LA DESCARBOXILASA DIFOS-
FOMEVALONICA POR TIONUCLEOTIDOS.

Mecanismo A



Mecanismo B



grupo sulfhidrilo funcional de la enzima haciendo que ésta se inactive. En tanto que en el mecanismo B se postula la oxidación de un grupo tiol de la enzima con la formación de un enlace disulfuro entre el análogo fosfortioato y el grupo sulfhidrilo de la enzima.

Se podría distinguir entre estos dos mecanismos inactivando la enzima con $[^{14}\text{C}]\text{-ATP}\beta\text{S}$ y determinando la cantidad de radiactividad incorporada a la enzima luego de una filtración en gel. Para el mecanismo A se esperaría encontrar un solo pico de radiactividad el cual no correspondería con el pico de proteína. Por el contrario, si el mecanismo de inactivación es el indicado en B, se esperaría encontrar dos picos de radiactividad, uno correspondiente al compuesto covalente enzima-fosfortioato y el otro correspondería al exceso de inactivador.

Estos resultados junto con lo informado por Ngoc y col. (1979) hacen recomendable determinar este efecto inactivador de los tionucleótidos antes de iniciar experimentos cinéticos con los tionucleótidos como análogos de los sustratos, especialmente en enzimas en las cuales existan grupos sulfhidrilos esenciales.

PROPIEDADES DEL SITIO ACTIVO.

La comparación de la información acumulada hasta este momento acerca de la especificidad del nucleótido en la reacción catalizada por la descarboxilasa difosfomevalónica indica que los requerimientos estructurales para la actividad son bastante restringidos (Tablas 3, 7 y 9). Por otra parte, si se considera la similitud existente entre el AMP-PCP y el ATP, la diferencia entre el valor de K_1 para este análogo ($14,01 \pm$

1,99 mM) y la K_m para el ATP ($0,20 \pm 0,01$ mM) sugiere que el sitio de unión para el nucleótido es altamente específico.

Con el objeto de correlacionar las variaciones estructurales de los sustratos con la catálisis se pueden evaluar los cambios en la K_m y en la V , siempre que supongamos que la K_m es una medida de la unión del sustrato a la enzima y que la V es una medida de la constante de velocidad catalítica. Estos supuestos, sin embargo, son válidos solo en condiciones de equilibrio rápido. Por otra parte, Cleland (1975) y Northrop (1975) han indicado que cuando no hay equilibrio rápido V y V/K_m son las variables cinéticamente independientes. Usando este concepto Williams y Northrop (1978) analizaron los valores de V/K_m junto con los valores de V para distinguir entre efectos en la unión y en la catálisis. De este modo las modificaciones estructurales de los sustratos que afecten a los parámetros V y V/K_m en el mismo sentido indicarán una alteración de la catálisis, mientras que aquellos cambios que afecten a la unión afectarán a V y V/K_m en sentido opuesto.

Los resultados provenientes del análisis según Williams y Northrop (1978) se muestran en la Tabla 11, donde podemos observar que las modificaciones en la base, en el azúcar o en el grupo fosforilo α del ATP producen cambios en el mismo sentido para V y V/K_m , lo que indica un efecto en la catálisis. La comparación del $(R_p)ATP\beta S$ con el ATP también indica un efecto en la catálisis, pero como el cambio en V/K_m es mucho mayor que el cambio en V , pensamos que esto sea indicativo de algún efecto en la unión. Es de interés hacer notar que el análisis de los resultados por el enfoque tradicional (cambios en la K_m y en la V)

Tabla 11

EFFECTOS CINETICOS DE LAS DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE
NUCLEOTIDOS^a.

Nucleótido	ΔV	$\Delta V/K_m$ (veces)
ATP	1,00	1,00
dATP	0,69	0,53
ATP	1,00	1,00
(Rp)ATP α S	0,44	0,26
ATP	1,00	1,00
(Rp)ATP β S	0,01	0,0002
ATP	1,00	1,00
GTP	0,02	0,08
ATP	1,00	1,00
CTP	0,06	0,02
ATP	1,00	1,00
UTP	0,02	0,16

^a

Datos obtenidos a partir de los valores que se dan en las

Tablas 3, 7 y 9.

permite llegar a las mismas conclusiones obtenidas de acuerdo al método de Williams y Northrop (1978).

Por otra parte, los cambios estructurales en el MVAPP producen un efecto significativo en su actividad como sustrato. Así, el reemplazo de un oxígeno por azufre en el fosfato terminal produce una notoria disminución de su actividad como sustrato (Tabla 6). En tanto que la metilación del grupo carboxilo (Hellig, 1962; Jabalquinto y Cardemil, resultados preliminares), al igual que la coordinación del grupo difosfato con Cr impiden que estos compuestos se unan al sitio activo de la enzima. En cambio el reemplazo de uno de los hidrógenos del C-6 por flúor, hace que el compuesto resultante sea un excelente inhibidor de la enzima (Nave y col., 1985). El bajo valor de K_i (37 nM) encontrado para este compuesto ha llevado a estos autores a sugerir que el 6-fluormevalonato-5-difosfato pudiera ser un análogo del estado de transición.

Nuestros resultados permiten postular el siguiente esquema para el mecanismo de acción de la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo (Figura 26). Ambos sustratos se encuentran simultáneamente unidos a la enzima en sitios adyacentes y la reacción se inicia con la abstracción de un protón del hidroxilo del C-3 del MVAPP por un grupo básico en la enzima (X en la Figura 26), seguida por un ataque nucleofílico del oxígeno del C-3 sobre el fosforilo γ del complejo lambda β, γ -bidentado del $MgATP^{-2}$ en una reacción $S_N2(P)$ que transcurre con inversión de la configuración en el fósforo. La unión de los sustratos se facilita por la presencia de a lo menos un residuo de arginina en el sitio activo (Jabalquinto y col., 1983).

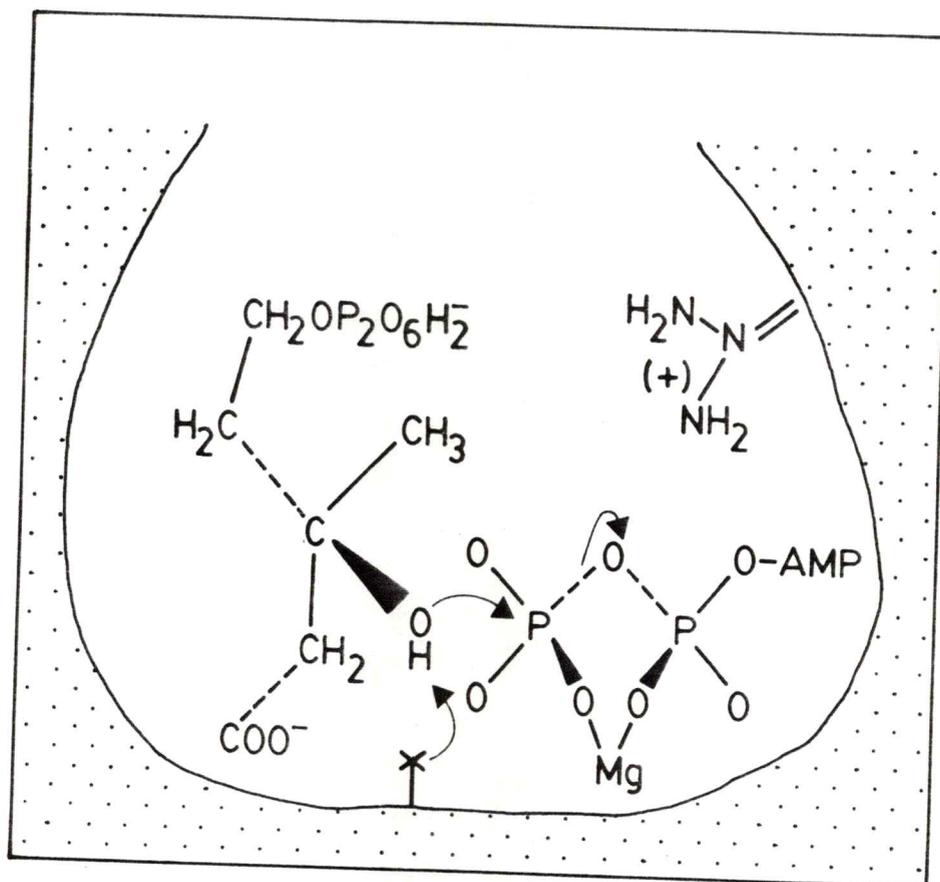


Figura 26. Posible esquema para el mecanismo de acción de la descarboxilasa difosfomevalónica.

Actualmente se está investigando en nuestro laboratorio la identidad del grupo X (Figura 26), y parece posible que este grupo sea el grupo con un $pK < 4$ que se visualiza en la gráfica de $\log V$ en función del pH (Figura 6). Un grupo con estas características podría corresponder a un residuo de ácido aspártico o de ácido glutámico. Viola y Cleland (1978) han asignado un papel similar al que nosotros postulamos para este grupo con $pK < 4$ a un residuo de ácido aspártico del sitio activo de la hexoquinasa de levaduras, aunque para esta enzima el pK de ese residuo de aminoácido es 6,2.

El complejo metal-nucleótido al interactuar con la enzima lo puede hacer a través de los grupos fosforilos o por algún ligando del metal. Para distinguir en este aspecto se ha utilizado el complejo inerte CrATP. En la mayoría de las enzimas estudiadas, el CrATP es un inhibidor competitivo cuando la interacción con la enzima se efectúa a través de los oxígenos de los grupos fosforilos (Dunaway-Mariano y Cleland, 1980b). En cambio, cuando la enzima interactúa con el sustrato a través del ión metálico, como en el caso de la pirofosfatasa inorgánica de levadura, los complejos de pirofosfato de Cr^{+3} no son inhibidores (Sperow y Buttler, 1976).

En el caso de la descarboxilasa difosfomevalónica ya que tanto el complejo γ -monodentado como el β, γ -bidentado del CrATP no actuaron como inhibidores, se podría sugerir que el $MgATP^{-2}$ interactúa con la enzima a través del ión metálico.

Este punto podría ser confirmado mediante técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Al respecto, el efecto paramagnético

del Mn^{+2} sobre la velocidad de relajación longitudinal de los protones del agua se ha usado para determinar el esquema de coordinación de los complejos ternarios enzima-metal-sustrato (Mildvan, 1979).

REFERENCIAS

- Alvear, M., Jabalquinto, A. M., Eyzaguirre, J. y Cardemil, E. (1982) Purification and characterization of avian liver mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Biochemistry* 21, 4646-4650.
- Alvear, M., Jabalquinto, A. M. y Cardemil, E. (1986) Grupos sulfhidrilos en la descarboxilasa difosfomevalónica de hígado de pollo. *Arch. Biol. Med. Exp.* 19, R-171.
- Ames, B. (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate, and phosphatases. *Methods Enzymol.* 8, 115-118.
- Apps, D.K. (1969) Kinetic studies on pigeon liver nicotinamide-adenine dinucleotide kinase. *Eur. J. Biochem.* 7, 260-266.
- Bazaes, S. (1977) Purificación y propiedades de la quinasa fosfomevalónica de hígado de cerdo. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Bazaes, S., Beytía, E., Jabalquinto, A.M., Solis de Ovando, F., Gómez, I. y Eyzaguirre, J. (1980) Pig liver phosphomevalonate kinase I. Purification and properties. *Biochemistry* 19, 2300-2304.
- Bensadoun, A. y Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering substances. *Anal. Biochem.* 70, 241-250.
- Beytía, E. (1972) Purification and properties of the enzymes catalyzing the intermediate reactions in the conversion of mevalonate to squalene. Tesis para optar al grado de Doctor (Ph. D.), Universidad de Wisconsin, EE.UU.
- Beytía, E. y Porter, J.W. (1976) Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 45, 113-142.

- Beytia, E., Dorsey, J.K., Marr, J., Cleland, W.W. y Porter, J.W. (1970) Purification and mechanism of action of hog liver mevalonic kinase. *J. Biol. Chem.* 245, 5450-5458.
- Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A.H. y deWaard, A. (1959) Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 234, 2595-2604.
- Bossard, M.J., Vik, T.A. y Schuster, S.M. (1980) Beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase catalyzed formation of a transition state analog in ATP synthesis. *J. Biol. Chem.* 255, 5342-5346.
- Cardemil, E. (1982) Descarboxilasa pirofosfomevalónica : Purificación y propiedades de la enzima de hígado de pollo y papel de la enzima de hígado de rata en la regulación de la biosíntesis del colesterol. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Cardemil, E. y Jabalquinto, A.M. (1985) Mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase from chicken liver. *Methods Enzymol.* 110, 86-92.
- Carlson, G.M., Colombo, G. y Lardy, H.A. (1978) A vicinal dithiol containing an essential cysteine in phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine triphosphate) from cytosol of rat liver. *Biochemistry* 17, 5329-5338.
- Clark, J.M. y Switzer, R.L. (1977) *Experimental Biochemistry*. Freeman y Co., San Francisco, pp 142-146.
- Cleland, W.W. (1970) Steady state kinetics. en *The Enzymes* (Boyer, P.D. ed) Vol. II Third Edition. Academic Press, New York, pp 1-65.
- Cleland, W.W. (1975) Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Account Chem. Res.* 8, 145-151.

- Cleland, W.W. (1979a) Optimizing coupled enzyme assays. *Anal. Biochem.* 99, 142-145.
- Cleland, W.W. (1979b) Statistical analysis of enzyme kinetic data. *Methods Enzymol.* 63, 103-138.
- Cleland, W.W. (1982) Preparation of chromium (III) and cobalt (III) nucleotides as chirality probes and inhibitors. *Methods Enzymol.* 87, 159-179.
- Cohn, M. (1982) Some properties of the phosphorothioate analogues of adenosine triphosphate as substrates of enzymic reactions. *Account Chem. Res.* 15, 326-332.
- Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Pópjak, G. y Yengoyan, L. (1966) Studies on the biosynthesis of cholesterol. XX Steric course of decarboxylation of 5-pyrophosphomevalonate and of the carbon to carbon bond formation in the biosynthesis of farnesyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 241, 3970-3987.
- Cristol, S.J. y Norris, W.P. (1953) Mechanisms of elimination reactions. IX The spontaneous decomposition of salts of β -haloacids trans-cinnamic acid dibromide. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 2645-2646.
- DePamphilis, M.L. y Cleland, W.W. (1973) Preparation and properties of chromium (III)-nucleotide complexes for use in the study of enzyme mechanisms. *Biochemistry* 12, 3714-3723.
- Dunaway-Mariano, D. y Cleland, W.W. (1980a) Preparation and properties of chromium (III) adenosine 5'-triphosphate, chromium (III) adenosine 5'-diphosphate, and related chromium (III) complexes. *Biochemistry* 19, 1496-1505.

- Dunaway-Mariano, D. y Cleland, W.W. (1980b) Investigations of substrate specificity and reaction mechanism of several kinases using chromium (III) adenosine 5'-triphosphate and chromium (III) adenosine 5'-diphosphate. *Biochemistry* 19, 1506-1515.
- Eckstein, F. (1983) Phosphorothioate analogues of nucleotides. Tools for the investigation of biochemical processes. *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22, 423-439.
- Eckstein, F. (1985) Nucleoside phosphorothioates. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 367-402.
- Edmond, J., Popják, G., Wong, S.M. y Williams, V.P. (1971) Presqualene alcohol. Further evidence on the structure of a C₃₀ precursor of squalene. *J. Biol. Chem.* 246, 6254-6271.
- Eyzaguirre, J. y Bazaes, S. (1985) Phosphomevalonate kinase from pig liver. *Methods Enzymol.* 110, 78-85.
- Fromm, H.J. (1979) Use of competitive inhibitors to study substrate binding order. *Methods Enzymol.* 63, 467-486.
- Garcés, E. y Cleland, W.W. (1969) Kinetic studies of yeast nucleoside diphosphate kinase. *Biochemistry* 8, 633-640.
- Goody, R.S. y Eckstein, F. (1971) Thiophosphate analogs of nucleoside di and triphosphates. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 6252-6257.
- González-Pacanowska, D., Marco, C., García-Martínez, J. y García-Peregrin, E. (1985) Role of mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase in the regulation of chick intestinal cholesterologenesis. *Biochem. Biophys. Acta* 833, 449-455.
- Hanes, C.S. (1932) Studies on plant amylases. The effect of starch con-

- centration upon the velocity of hydrolisis by amylase of germinated barley. *Biochem. J.* 26, 1406-1421.
- Hellig, H.R. (1962) Enzymic studies on the biosynthesis of cholesterol from mevalonic acid. Tesis para optar al grado de Doctor (Ph. D.), Universidad de Londres, Inglaterra.
- Hubbard, M.J., Sullivan, P.A. y Shepherd, M.G. (1985) The kinetics and divalent cation inhibition of plasma membrane ATP ase in the yeast *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 260, 6782-6787.
- Iyengar, R., Cardemil, E. y Frey, P.A. (1986) Mevalonate 5-diphosphate decarboxylase : Stereochemical course of the ATP-dependent phosphorylation of mevalonate 5-diphosphate. *Biochemistry* 25, 4693-4698.
- Jabalquinto, A.M. y Cardemil, E. (1980) Secondary regulatory sites in rat liver cholesterol biosynthesis : Role of 5-pyrophosphomevalonate decarboxylase. *Lipids* 15, 196-199.
- Jabalquinto, A.M. y Cardemil, E. (1981) The effect of diabetes, nutritional factors, and sex on rat liver and kidney mevalonate kinase, mevalonate-5-phosphate kinase, and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 132-139.
- Jabalquinto, A.M. y Cardemil, E. (1985) Enzymatic synthesis of mevalonate-5-(2-thiodiphosphate). *Biochem. Int.* 11, 653-660.
- Jabalquinto, A.M., Eyzaguirre, J. y Cardemil, E. (1983) Evidence of essential arginyl residues in chicken liver mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 338-343.
- Jaffe, E.K. y Cohn, M. (1978a) ^{31}P NMR spectra of the thiophosphate analogues of adenine nucleotides; effects of pH and Mg^{2+} binding.

- Biochemistry 17, 652-657.
- Jaffe, E.K. y Cohn, M. (1978b) Divalent cation-dependent stereospecificity of adenosine 5'-O-(2-thiotriphosphate) in the hexokinase and pyruvate kinase reactions. *J. Biol. Chem.* 253, 4823-4825.
- Jaffe, E.K. y Cohn, M. (1979) Diastereomers of the nucleoside phosphorothioates as probes of the structure of the metal nucleotide substrates and of the nucleotide binding site of yeast hexokinase. *J. Biol. Chem.* 254, 10839-10845.
- Jaffe, E.K., Nick, J. y Cohn, M. (1982) Reactivity and metal-dependent stereospecificity of the phosphorothioate analogs of ADP and ATP and reactivity of Cr(III)ATP in the 3-phosphoglycerate kinase reaction. *J. Biol. Chem.* 257, 7650-7656.
- Kornberg, A. y Price, W.E. (1951) Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. *J. Biol. Chem.* 193, 481-495.
- Lalitha, R., George, R. y Ramasarma, T. (1985) Mevalonate decarboxylation in lemon grass leaves. *Phytochemistry* 24, 2569-2571.
- Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S. y Candia, O.A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 100, 95-97.
- Lee, C.S. y O'Sullivan, W.J. (1983) An improved purification procedure, an alternative assay and activation of mevalonate kinase by ATP. *Biochim. Biophys. Acta* 747, 215-224.
- Lee, C.S. y O'Sullivan, W.J. (1984) Phosphorothioate analogues of adenosine triphosphate as substrates of the mevalonate kinase reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 787, 131-137.

- Lee, C.S. y O'Sullivan, W.J. (1985a) Improved procedures for the synthesis of phosphomevalonate and for the assay and purification of pig liver phosphomevalonate kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 839, 83-89.
- Lee, C.S. y O'Sullivan, W.J. (1985b) The interaction of phosphorothioate analogues of ATP with phosphomevalonate kinase. *J. Biol. Chem.* 260, 13909-13915.
- Lindberg, M., Yuan, C., deWaard, A. y Bloch, K. (1962) On the mechanism of formation of isopentenylpyrophosphate. *Biochemistry* 1, 182-188.
- Lolkema, J.S., Hoeve-Duurkens, R.H. y Robillard, G.T. (1986) The phosphoenolpyruvate-dependent fructose-specific phosphotransferase system in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.* 154, 651-656.
- London, W.P. y Steck, T.L. (1969) Kinetics of enzyme reactions with interaction between a substrate and a (metal) modifier. *Biochemistry* 8, 1767-1779.
- Malebrán, L.P. y Cardemil, E. (1986) Residuos de arginina catalíticamente importantes en la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica de levaduras. *Arch. Biol. Med. Exp.* 19, 224.
- Mejillano, M.R., Wendland, M.F., Everett, G.W., Rabinowitz, J.C. y Himes, R.H. (1986) Substrate and inhibitor activities of the screw sense isomers of metal-nucleotide complexes in the formyltetrahydrofolate synthetase reaction. *Biochemistry* 25, 1067-1072.
- Merritt, E.A., Sundaralingam, M., Cornelius, R.D. y Cleland, W.W. (1978) X-ray crystal and molecular structure and absolute configuration of (dihydrogen tripolyphosphate)tetraamine cobalt(III) monohydrate. A model for a metal-nucleoside polyphosphate complex. *Biochemistry* 17, 3274-3278.

- Mildvan, A.S. (1979) The role of metals in enzyme-catalyzed substitutions at each of the phosphorous atoms of ATP. *Adv. Enzymol.* 49, 103-126.
- Morrison, J.F. (1979) Approaches to kinetic studies on metal-activated enzymes. *Methods Enzymol.* 63, 257-294.
- Morrison, J.F. y Cleland, W.W. (1966) Isotope exchange studies of the mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate : creatine phosphotransferase. *J. Biol. Chem.* 241, 673-687.
- Morrison, J.F. y Uhr, M.L. (1966) The function of bivalent metal ions in the reaction catalysed by ATP : creatine phosphotransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 122, 57-74.
- Nave, J.F., d'Orchymont, H., Ducep, J.B., Piriou, F. y Jung, M.F. (1985) Mechanism of the inhibition of cholesterol biosynthesis by 6-fluoromevalonate. *Biochem. J.* 227, 247-254.
- Ngoc, L.D., Jebeleanu, G. y Barzu, O. (1979) Interaction of sulfur-containing ATP analogs with rabbit muscle phosphofructokinase. *FEBS Lett.* 97, 65-68.
- Northrop, D.B. (1975) Steady-state analysis of kinetic isotope effects in enzymic reactions. *Biochemistry* 14, 2644-2651.
- O'Sullivan, W.J. y Smithers, G.W. (1979) Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. *Methods Enzymol.* 63, 294-336.
- Pecoraro, V.L., Hermes, J.D. y Cleland, W.W. (1984) Stability constants of Mg^{2+} and Cd^{2+} complexes of adenine nucleotides and thionucleotides and rate constants for formation and dissociation of MgATP and MgADP. *Biochemistry* 23, 5262-5271.
- Pecoraro, V.L., Rendina, A.R. y Cleland, W.W. (1985) Determination of the screw sense specificity of bovine liver fructokinase. *Biochemistry*

- Pérez, L.M. (1985) Estudio de la isomerización enzimática de sesquiterpenoles en flavedo de Citrus sinensis. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Popják, G. (1969) Enzymes of sterol biosynthesis in liver and intermediates of sterol biosynthesis. *Methods Enzymol.* 15, 393-494.
- Postmus, C. y King, E.L. (1955) The equilibria in acidic solutions of chromium(III) ion and thiocyanate ion. *J. Phys. Chem.* 59, 1208-1222.
- Ramachandran, C.K. y Shah, S.N. (1976) Decarboxylation of mevalonate pyrophosphate is one rate-limiting step in hepatic cholesterol synthesis in suckling and weaned rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 42-47.
- Ramachandran, C.K. y Shah, S.N. (1977) Studies on mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase and pyrophosphomevalonate decarboxylase in developing rat brain. *J. Neurochem.* 28, 751-757.
- Richard, J.P. y Frey, P.A. (1982) Synthesis of chiral $[^{18}\text{O}]$ phosphorothioate analogues of adenine nucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 3476-3481.
- Rojas, M.C., Chayet, L., Portilla, G. y Cori, O. (1983) Substrate and metal specificity in the enzymic synthesis of cyclic monoterpenes from geranyl and neryl pyrophosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 222, 389-396.
- Segel, I.H. (1975) *Enzyme kinetics*. John Wiley & Sons. N.Y. pp 227-231.
- Shama Bhat, C. y Ramasarma, T. (1979) Effect of phenyl and phenolic acids on mevalonate-5-phosphate kinase and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase of the rat brain. *J. Neurochem.* 32, 1531-1537.
- Shama Bhat, C. y Ramasarma, T. (1980) Purification and properties of mevalonate pyrophosphate decarboxylase of rat liver. *Indian. J. Biochem.*

- Biophys. 17, 249-254.
- Sheu, K.F., Ho, H.T., Nolan, L.D., Markovitz, P., Richard, J.P., Utter, M.F. y Frey, P.A. (1984) Stereochemical course of thiophosphoryl group transfer catalyzed by mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochemistry* 23, 1779-1783.
- Sillen, L.G. y Martell, A.R. (1971) Stability constants. Chem. Soc. Spec. Publ. 25.
- Skilleter, D.N. y Kekwick, R.G.O. (1971) The enzymes forming isopentenylpyrophosphate from 5-phosphomevalonate (mevalonate-5-phosphate) in the latex of Hevea brasiliensis. *Biochem. J.* 124, 407-417.
- Soler, M., Jabalquinto, A.M. y Beytfa, E. (1979) Hog liver mevalonate kinase : inactivation by pyridoxal-5'-phosphate and evidence of dead-end inhibition by one of the substrates. *Int. J. Biochem.* 10, 931-935.
- Sperow, J. W. y Buttler, L.G. (1976) Cr(III) complexes as active site probes of yeast inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* 251, 2611-2612.
- Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. (1976) Concentration of $MgATP^{-2}$ and others ions in solution. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochem. J.* 159, 1-5.
- Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. (1977) Kinetic evidence for a 'mnemonic' mechanism for rat liver glucokinase. *Biochem. J.* 165, 61-69.
- Thompson, M.F. y Bachelard, H.S. (1976) Determination of true K_i values in enzyme dead-end inhibition kinetic studies. *Anal. Biochem.* 71, 507-518.

- Tombras Smith, L. y Cohn, M. (1982) Reactions of thio analogues of adenosine 5'-triphosphate catalyzed by methionyl-tRNA synthetase from E. coli. and metal dependence of stereospecificity. Biochemistry 21, 1530-1534.
- Tsopanakis, A.D. y Herries, D.G. (1975) Kinetic discrimination between two types of enzyme mechanism. Application to lactose synthetase. Eur. J. Biochem. 53, 193-196.
- Valdevenito, D.G. (1983) Mecanismo cinético de la quinasa fosfomevalónica. Tesis para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Viola, R.E. y Cleland, W.W. (1978) Use of pH studies to elucidate the chemical mechanism of yeast hexokinase. Biochemistry 17, 4111-4117.
- Webb, M.R. y Trentham, D.R. (1980) Analysis of chiral inorganic [^{16}O , ^{17}O , ^{18}O] Thiophosphate and the stereochemistry of the 3-phosphoglycerate kinase reaction. J. Biol. Chem. 255, 1775-1779.
- Williams, J.W. y Northrop, D.B. (1978) Substrate specificity and structure-activity relationships of gentamicin acetyl transferase I. J. Biol. Chem. 253, 5908-5914.
- Zafra, M.F., Gonzalez-Pacanowska, D. y García-Peregrin, E. (1985) Kinetic properties of mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase from neonatal chick liver and brain. IRCS Med. Sci. 13, 1251-1252.