

■ ATP FOSFONATO Y AZUL DE CIBACRON UNIDOS A POLIDEXTRANO PARA PURIFICAR PIROFOSFOHIDROLASAS.

Calvo, V., Valenzuela, M.A., y Traverso-Cori, A. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacológicas. Universidad de Chile. Vicuña Mackenna 20.

Se han aislado dos enzimas de los tubérculos de *S. tuberosum*, variedades Pimperl y Desirée. Estas dos enzimas hidrolizan tanto ATP como ADP, pero a diferentes velocidades.

Para usar en la última etapa de purificación de éstas enzimas, se sintetizó un análogo del sustrato (5' ATP), llamado 5'  $\beta\gamma$  metilen-trifosfato de adenosina (ATP fosfonato). Este compuesto no es hidrolizado por las pirofosfohidrolasas, pues tienen un enlace metileno en reemplazo del enlace pirofosfórico. Además, este análogo es inhibidor competitivo de las actividades ATPasicas y ADPasicas de la

pirofosfohidrolasa de variedad Pimpernel o bien de la Desirée.

Este análogo de ATP, se unió a una matriz insoluble de polidextrano a través de un brazo o espaciador de pentanodiamina. La unión se efectuó por la formación de una base de Schiff, entre el derivado 2',3'-(ATP fosfonato) dialdehído, obtenido previa oxidación con metaperyodato sódico. Posteriormente se redujo la base de Schiff con borohidruro de sodio.

Una preparación parcialmente purificada de esta enzima, fue adsorbida en una columna rellena con este material (ATPfosfonato-pentanodiamino-agarosa). Luego se eluyó selectivamente la enzima con un gradiente lineal de ATP, obteniéndose una pureza enzimática de 97%. La determinación de pureza enzimática estuvo basada en la electroforesis en gel de poliacrilamida: se obtuvo una sola banda de proteínas; también, se logró separar las otras proteínas que impurifican a esta enzima. Entre ellas, se encontró una actividad exonucleasa que es capaz de hidrolizar el enlace  $\alpha\beta$  -pirofosfórico del ATPfosfonato. Por esta razón, después de usada esta columna, se observó que tenía menos capacidad de adsorción para la pirofosfohidrolasa. Sin embargo, por medio de este ligando inmovilizado (ATP fosfonato-pentanodiamina-agarosa), se logró purificar a homogeneidad tanto la enzima de la variedad Pimpernel como Desirée. Siempre que estas preparaciones enzimáticas estén libres de exonucleasas.

El azul de Cibacrón, F<sub>3</sub> GA, se conoce como un colorante que interactúa en el sitio de unión enzima-sustrato, especialmente de quinazas y dehidrogenasas. En el caso de la apirasa o pirofosfohidrolasa, este colorante actúa como un buen inhibidor ( $K_i = 14 \mu M$ ) para la actividad ATPasa.

Por esta razón, se inmovilizó covalentemente azul de Cibacrón a una matriz de polidextrano, para luego adsorber una preparación de apirasa. La enzima se eluye mediante un gradiente lineal solamente de fuerza iónica (1,8 M de KCl) o bien a alta fuerza iónica con un gradiente lineal de ATP.

De esta columna, la enzima eluyó un 83% pura. Creemos que si se desea obtener una apirasa pura, se debe usar primero una columna de Azul de Cibacrón, antes de la columna de ATP fosfonato. Esta idea derivó del hecho que las preparaciones más impuras de apirasa o pirofosfohidrolasa tuvieron una cantidad de exonucleasa que deterioraron (por hidrólisis) el ligando ATP fosfonato.

Las enzimas altamente purificadas, obtenidas por estos métodos de preparación o bien por otros no descritos en este trabajo, pierden la mitad de su actividad en un período de 60 días. Este hecho aún no esclarecido se abordará posteriormente.