

Doctorado
Biol
F95425
1976
C.2

ESTUDIO DE LA BIOSINTESIS IN VITRO DE
PRECURSORES DE HIDROCARBUROS TERPENICOS

T E S I S

PRESENTADA A LA

UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS

POR

MILTON RAUL DE LA FUENTE VERA

AGOSTO, 1976

PROFESOR PATROCINANTE OSVALDO CORI M.



14269

15314

UNIVERSIDAD DE CHILE
SEDE SANTIAGO ORIENTE
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMIENTOS

El autor quiere expresar su más profundo agradecimiento a Liliana Chayet y Osvaldo Cori por su apoyo, crítica y guía; al mismo tiempo, agradece la paciente ayuda de G. del Campo, la eficiente colaboración de U. Hashagen en un aspecto de este trabajo, y el continuo auxilio de todos los integrantes del Laboratorio; a E. Beytía (QEPD), Aída Traverso, G. Pérez y N. Smith, por sus donaciones, y a los directores del Depto. de Fisiología y Biofísica por las facilidades otorgadas para el desarrollo de esta Tesis.

Este trabajo fue parcialmente financiado por las donaciones 1443 y 3121 del Servicio Técnico de Investigación Científica y Creación Artística de la Universidad de Chile, por donaciones del programa de Bioquímica de la OEA, proyecto PNUD, proyecto NSF-CONICYT, y el Convenio U. de Chile - U. de California.



I N D I C E

LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
INTRODUCCION	1
1. Desarrollo histórico de los conceptos fundamentales de la biosíntesis de isoprenoides	1
2. Biosíntesis de isopentenil pirofosfato	4
3. Isopentenil pirofosfato isomerasa	9
4. Prenilsintetasas	10
4.1. Definición	10
4.2. Propiedades generales	15
4.3. Mecanismo	16
4.4. Especificidad por el largo de cadena	20
4.5. Especificidad conformacional	21
5. Algunos problemas en la biosíntesis de monoterpenos	24
6. El origen del neril pirofosfato	31
7. Efecto de fosfolípidos en la transformación de ácido mevalónico en prenoles	35
8. Algunas propiedades de los extractos enzimáticos de vegetales.	38



METODOS Y MATERIALES -----	41
I. METODOS-----	42
1. Obtención y conservación del material biológico-----	42
1.1. Obtención de plántulas de <i>Pinus radiata</i> -----	42
1.2. Preparación y conservación de extractos acelulares de plántulas de <i>Pinus radiata</i> -----	43
1.3. Obtención de frutos de <i>Citrus sinensis</i> -----	44
2. Preparación de los extractos enzimáticos-----	46
2.1. Preparación del extracto de flavedo de <i>Citrus sinensis</i> -----	46
2.2. Preparación del extracto de polvo cetónico de flavedo de <i>Citrus sinensis</i> -----	46
3. Determinación de actividades enzimáticas-----	47
3.1. Determinación de actividades prenilsintetásicas-----	47
3.2. Determinación de la actividad isopentenil pirofosfato isomerásica-----	50
3.3. Determinación de las actividades fosfatásicas-----	50
3.4. Determinación de las actividades ciclásicas-----	53
3.5. Determinación de la transformación de ácido mevalónico en prenoles-----	53
3.6. Determinación de las actividades quinasa mevalónica y fosfomevalónica---	54
3.7. Determinación de la actividad de la fosfolipasa C-----	55
4. Técnicas cromatográficas-----	55

4.1.	Cromatografía gas-líquido -----	55
4.2.	Cromatografía en papel -----	57
4.3.	Cromatografía en placa -----	57
4.4.	Cromatografía en Sephadex -----	58
4.5.	Preparación de columnas de intercambio -----	59
4.5.1.	Preparación de columnas de DEAE Sephadex DEAE celulosa y Dowex 1 -----	59
4.5.2.	Preparación de columnas de DEAE celulosa para la purificación de fosfolípidos -----	60
4.6.	Cromatografía de adsorción en ácido silícico -----	60
5.	Preparación de fracciones crudas de fosfolípidos -----	61
5.1.	Método modificado de Clark -----	61
5.2.	Método de Folch -----	62
6.	Purificación de fosfolípidos -----	63
6.1.	Purificación de fosfolípidos por cromatografía en ácido silícico -----	63
6.2.	Purificación de fosfolípido por cromatografía en DEAE celulosa -----	64
6.3.	Purificación de fosfolípidos por cromatografía en placa gruesa -----	65
6.4.	Análisis de fosfolípidos -----	66
7.	Síntesis de prenil pirofosfatos -----	66
7.1.	Purificación de los alcoholes -----	67
7.1.1.	Purificación de isopentenol -----	67
7.1.2.	Purificación de <u>2-trans,6-trans-farnesol</u> -----	67

8.	Síntesis de sustratos radiactivos -----	70
8.1.	Biosíntesis de isopentenol pirofosfato -----	70
8.2.	Biosíntesis de ácido 2- ¹⁴ C-fosfomevalónico -----	72
8.3.	Biosíntesis de 1- ³ H-GPP y de 1- ³ H-2,6-ditran-FPP -----	73
9.	Purificación y análisis de sustratos -----	73
9.1.	Purificación -----	73
9.2.	Análisis -----	75
10.	Determinación de proteínas -----	75
10.1.	Método turbidimétrico -----	75
10.2.	Método de Lowry -----	76
11.	Determinación de fosfato -----	76
11.1.	Determinación de ortofosfato -----	76
11.2.	Determinación de fósforo total -----	76
12.	Determinación de radiactividad -----	77
13.	Preparación de suspensiones de fosfolípidos -----	78
II.	MATERIALES -----	80

RESULTADOS Y DISCUSION

1.	Efecto de fosfolípidos sobre las enzimas que transforman ácido mevalónico en prenoles -----	82
1.1.	Elección del material biológico -----	82
1.2.	Efecto de fosfolípidos en la transformación de ácido mevalónico en prenoles -----	84
1.3.	Efecto de fosfolípidos sobre quinasas mevalónica y fosfomevalónica -----	90

1.4.	Efecto de fosfolípidos sobre las actividades isopentenil pirofosfato isomerasa y prenilsintetasa -----	94
1.5.	Efecto de fosfolípidos sobre la actividad ciclásica de <u>Citrus limonum</u> -----	96
1.6.	Efecto de fosfolipasa C en la taansformación de ácido mevalónico en prenoles	97
2.	<u>Purificación de prenil sintetasa de <u>Citrus sinensis</u></u> -----	107
2.1.	Obtención del material biológico -----	107
2.2.	Estabilización de la prenil sintetasa -	108
2.3.	Descripción general de la purificación	112
2.4.	Primer fraccionamiento en sulfato de amonio -----	113
2.5.	Segundo fraccionamiento en sulfato de amonio -----	114
2.6.	Cromatografía en Sephadex G-100 -----	115
2.7.	Cromatografía de intercambio -----	118
2.8.	Cromatografía en Sephadex G-150 -----	124
2.9.	Evaluación de la ruta de purificación	126
2.9.1.	Eliminación de la actividad <u>isopentenil pirofosfato isomerasa</u>	126
2.9.2.	Eliminación de las fosfatasa	128
2.9.3.	Eliminación de los colorantes del extracto -----	130
2.9.4.	Evaluación de la purificación de la sintetasa -----	135
3.	<u>Purificación de 2-cis-farnesil pirofosfato sintetasa</u> -----	138
4.	Características de la prenilsintetasa -----	151
5.	Efecto de fosfolípidos sobre la actividad prenilsintetasa -----	157

6. Efecto de fosfolípidos en la partición agua/hexano de pirofosfatos isoprénicos -----	162
--	-----

CONCLUSIONES

1. Interacción entre fosfolípidos y las enzimas que transforman ácido mevalónico en prenoles	166
2. Purificación de actividades prenilsintetásica de <u>Citrus sinensis</u> -----	173

BIBLIOGRAFIA -----	175
--------------------	-----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Efecto de la composición del medio de reacción sobre las actividades fosfatásicas del extracto de polvo cetónico de flavedo de <u>Citrus sinensis</u> -----	52
Tabla 2.	Efecto de fosfatidiletanolamina en la transformación de ácido nevalónico en prenoles por dos preparaciones enzimáticas de plántulas de <u>Pinus radiata</u> . -----	87
Tabla 3.	Efecto de lecitina de soya en la actividad de quinasa nevalónica de extractos de plántulas de <u>Pinus radiata</u> y flavedo de <u>Citrus sinensis</u> -----	91
Tabla 4.	Efecto de lecitina de soya en la actividad de la quinasa fosfo-nevalónica de un extracto de plántulas de <u>Pinus radiata</u> ---	93
Tabla 5.	Efecto de fosfolípidos totales de cerebro de vacuno en la actividad de la IPP isomerasa, y de GDP y FPP sintetasas de extractos de polvo cetónico de flavedo de <u>Citrus sinensis</u> y plántulas de <u>Pinus radiata</u> . -----	95
Tabla 6.	Efecto de lecitina de soya sobre las actividades fosfatásicas dey ciclásicas de un extracto de flavedo de <u>Citrus sinensis</u> -----	98
Tabla 7.	Efecto de Ca^{+2} , Zn^{+2} y α -fenantrolina en la incorporación de ácido nevalónico en prenoles -----	100
Tabla 8.	Efecto de fosfolipasa C y fosfolípidos totales de cerebro en la transformación de ácido nevalónico en prenoles por un extracto de plántulas de <u>Pinus radiata</u> --	102
Tabla 9.	Efecto de fosfolipasa C y fosfolípidos totales de cerebro sobre la quinasa nevalónica de un extracto de polvo cetónico de flavedo de <u>Citrus sinensis</u> . -----	103
Tabla 10.	Efecto de fosfolipasa C sobre las quinasas nevalónica y fosfo-nevalónica de un extracto de polvo cetónico de flavedo de <u>C. sinensis</u> . -----	104

Tabla 11.	Estabilidad de una preparación de prenil-sintetasa purificada por dos fraccionamientos sucesivos con sulfato de amonio -----	111
Tabla 12.	Distribución de IPP isomerasa y FPP sintetasa en eluidos selectos de una cromatografía en DEAE Sephadex. -----	121
Tabla 13.	Comparación de la recuperación de actividad FPP sintetásica en cromatografías en DEAE Sephadex y DEAE celulosa. -----	122
Tabla 14.	Distribución de la actividad IPP isomerasa en las primeras fracciones de la purificación. -----	127
Tabla 15.	Distribución de la actividad 1- ³ H-FPP fosfatasa en las primeras fracciones de la purificación -----	129
Tabla 16.	Resumen de un proceso de purificación de prenilsintetasa -----	136
Tabla 17.	Inactivación térmica de la actividad farnesil pirofosfato sintetásica.-----	149
Tabla 18.	Efecto de metales en la actividad prenil-sintetásica.-----	153
Tabla 19.	Efecto de lecitina de soya sobre la actividad prenilsintetásica purificada -----	159
Tabla 20.	Efecto de fosfolipasa C y lecitina de soya sobre la actividad de la prenilsintetasa purificada -----	161
Tabla 21.	Efecto de lecitina de soya en la partición agua/hexano de prenil pirofosfatos.-----	163

LISTA DE FIGURAS

Fig.1.	Acido mevalónico	5
Fig.2.	Isopreno e isopentenil pirofosfato	6
Fig.3.	Biosíntesis de isopentenil pirofosfato --	8
Fig.4.	Mecanismo de la reacción catalizada por la IPP isomerasa.	11
Fig.5.	Reacciones de síntesis de prenil pirofosfa- tos	13
Fig.6.	Metabolismo de isoprenoides	14
Fig.7.	Mecanismo de la reacción catalizada por la prenilsintetasa.	17
Fig.8.	Mecanismo de condensación de IPP con GPP --	19
Fig.9.	Análisis conformacional de la estereoquímica de la condensación	23
Fig.10.	Estructura de algunos monoterpenos	25
Fig.11.	Estructura de C ₁₀ y C ₁₅ prenil pirofosfatos-	27
Fig.12.	Mecanismo de solvólisis de neril y geranil pirofosfatos	30
Fig.13.	Isomerización de farnesoles	33
Fig.14.	Efecto de diálisis a distintos pH en la esta- bilidad de la prenil sintetasa de un extrac- to de polvo cetónico de flavedo de <u>Citrus</u> <u>sinensis</u>	109
Fig.15.	Cromatografía en Sephadex G-100	116
Fig.16.	Cromatografía en DEAE Sephadex	119
Fig.17.	Cromatografía en DEAE Sephadex en un tampón que contiene geranil pirofosfato 2,5 μM	123
Fig.18.	Cromatografía en Sephadex G-150	125

Fig.19.	Elución de la actividad IPP o FPP fosfatásica en una columna de intercambio -----	131
Fig.20.	Absorción UV del extracto y de las fracciones obtenidas en la cromatografía en Sephadex G-100. -----	132
Fig.21.	Biosíntesis de 2- <u>cis</u> ,6- <u>trans</u> y 2- <u>trans</u> ,6- <u>trans</u> -farnesol por un extracto de polvo cetónico de flavedo de <u>Citrus sinensis</u> -----	139
Fig.22.	Biosíntesis de farnesoles y farnesales por un extracto de polvo cetónico de flavedo de <u>Citrus sinensis</u> -----	143
Fig.23.	Biosíntesis de 2- <u>cis</u> ,6- <u>trans</u> -farnesil pirofosfato -----	143
Fig.24.	Efecto de anilina 8 mM en la biosíntesis de 2- <u>cis</u> -farnesil pirofosfato -----	145
Fig.25.	Biosíntesis de neril pirofosfato, 2- <u>cis</u> -farnesil pirofosfato, geranil pirofosfato y 2- <u>trans</u> -farnesil pirofosfato por la preparación enzimática purificada -----	146
Fig.26.	Inactivación térmica de la <u>cis</u> -sintetasa --	150
Fig.27.	Determinación de Km por IBP -----	155
Fig.28.	Determinación del peso molecular aparente de las fracciones de prenilsintetasa por cromatografía en Sephadex G-150 -----	156
Fig.29.	Efecto de los sustratos alílicos en la inactivación térmica de las sintetetasas ----	158

ABREVIATURAS

ATP	adenosintrifosfato
BHT	2,6-di-ter-butil-p-cresol
cmc	concentración micelar crítica
C	cloroformo
DEAE	dietil amino etil
DMAPP	dimetil alilpirofosfato (2-isopentenil-1-pirofosfato)
DTT	ditiotreitol
EDTA	sal disódica del ácido etilén-diaminotetraacético
EGA	etilenglicol adipato
FPP	2- <u>trans</u> , 6- <u>trans</u> -farnesil pirofosfato
2- <u>trans</u> -FPP	2- <u>trans</u> , 6- <u>trans</u> -farnesil pirofosfato
2- <u>cis</u> -FPP	2- <u>cis</u> , 6- <u>trans</u> -farnesil pirofosfato
GPP	geranil pirofosfato
GGPP	geranil geranil pirofosfato
IPP	3-isopentenil 1-pirofosfato
M	metanol
MVA	ácido mevalónico
NAD ⁺	nicotinadenina dinucleótido
NPP	neril pirofosfato
PM	peso molecular
PMVA	ácido 5-fosfomevalónico

PP-MVA ácido 5-pirofosfomevalónico

PP pirofosfato

A_{280} A_{310} Absorbancia, donde el subíndice indica
la longitud de onda.

R E S U M E N

En esta Tesis se presentan un análisis del efecto de fosfolípidos sobre la transformación de ácido mevalónico en prenoles, y la purificación parcial de dos prenilsintetasas de diferente especificidad de producto.

Durante el estudio del primer efecto, se encontró que la transformación de ácido mevalónico por sistemas enzimáticos hidrosolubles de Pinus radiata y Citrus sinensis era inhibida por una serie de fosfolípidos: fuera de este efecto, se pudo demostrar que estos compuestos pueden transferir farnesil pirofosfato desde una fase acuosa a una fase orgánica altamente apolar.

Las prenilsintetasas se purificaron usando la siguiente secuencia: preparación de un polvo cetónico de flavedo de Citrus sinensis preparación de un extracto acuoso de esta preparación, dos fraccionamientos sucesivos con sulfato de amonio, y cromatografías en Sephadex G-100, DEAE celulosa y Sephadex G-150. La purificación fue de unas 70-100 veces, y el rendimiento de un 5%.

Las enzimas así purificadas comparten la misma especificidad hacia los sustratos IPP y DMAPP o GPP, pero generan productos con geometría diferente alrededor del doble enlace 2,3: GPP o NPP, y 2-trans o 2-cis-FPP, dependiendo del sustrato alílico usado. Ni el FPP ni el NPP son sustratos para ninguna de ambas actividades.

Ambas enzimas fueron estabilizadas en solución por DTT, EDTA y GPP, pero la enzima cis fue mucho menos estable. La misma característica se observó en experimentos de inactivación térmica.

La enzima cis fue inhibida fuertemente por los componentes coloreados del extracto, ya que se observó o un aumento significativo en la relación cis/trans cuando la preparación enzimática se libró de estos compuestos por cromatografía en Sephadex G-100: esto explica que la purificación de esta actividad fuera de unas 400 veces, medida usando la velocidad de generación de productos cis.

Esta es la primera vez que se describe y purifica esta actividad, lo que explica la generación de NPP, el precursor inmediato de los monoterpenos en Citrus.

La actividad cis fue independiente del sistema redox de isomerización que transforma 2-trans en 2-cis-farnesol, lo que sugiere que ambos sistemas son funcionalmente independientes: así, la enzima cis funcionaría exclusivamente en la biosíntesis de monoterpenos, mientras que el sistema redox podría operar en la síntesis de sesquiterpenos.

No se observó inhibición de las enzimas purificadas por fosfolípidos; por lo tanto, el efecto inhibitorio observado en el extracto podría deberse al refuerzo, por parte de los lípidos, de una interacción inhibitoria previamente existente entre las enzimas y los componentes coloreados del extracto.

A B S T R A C T

This Thesis reports two types of results: a-an analysis of the effect of phospholipids on prenil biosynthesis and liposolubility, and b-the individualization and parcial purification of two prenyltransferases with different product stetreospesificity.

The transformation of 2-¹⁴C-mevalonic acid into prenils by soluble enzymic systems of Pinus radiata and Citrus sinensis was inhibited by the addition of various kinds of crude and purified phospholipids. Controls showed that phospholipids increased marcedly the extraction of C₁₅ prenylpyrophosphates by apolar organic solvents. This explains an apparent stimulation of prenil biosynthesis previously reported.

Added phospholipids inhibited the prenyltransferase from a crude extract from an acetone powder of orange flavedo by about 50%.

Prenyltransferase was purified from Citrus sinensis flavedo by the following procedure: acetone powder preparation, aqueous extraction of the enzyme, two successive fractionations with ammonium sulfate, chromatography on Sephadex G-100, on DEAE cellulose and finally on Sephadex G-150. The purification thus achieved was 70-100 fold, and the overall yield, about 5%. Activity was measured as the initial rate of formation of acid labile

(allylic) compounds produced from 4-¹⁴C-IPP and an unlabelled allylic substrate (DMAPP or GPP).

These preparations contain two prenylsynthetases which have the same specificity for the substrates IPP and DMAPP or GPP, but generate products with different geometries around the 2,3 double bond. The reaction products of both enzymes are GPP or NPP (C₁₀), as well as 2-trans or 2-cis-FPP (C₁₅), depending on the chain length of the allylic substrate (DMAPP or GPP, respectively). They cannot use FPP for further condensation nor NPP as the C₁₀ substrate. Hence these activities are called 2-trans and 2-cis-FPP synthetases.

Both prenylsynthetases were protected from inactivation by DTT, EDTA and GPP, but the trans enzyme was much more stable than the cis transferase. The latter activity was completely lost (as seen by the absence of formation of NPP and 2-cis-FPP) after two weeks of storage at 4°C, even in the presence of these protectors. On the other hand, the trans enzyme retains 80% of its activity after a month under the same conditions. Analogously, the cis enzyme was inactivated much more rapidly than the trans enzyme at temperatures higher than 50°. These facts cannot be explained on the basis of a single transferase.

The cis/trans activity ratio increases significantly after complete elimination of the coloured components of the extract by Sephadex G-100 chromatography; this result

also points to the existence of two stereospecific transferases and suggests that the cis enzyme is strongly inhibited by the pigments of the flavedo extract. This could explain the difficulties found in the consistent demonstration of this activity in orange flavedo extracts. Accordingly, enzyme yields over 100% were often obtained after one or two successive ammonium sulfate fractionations, particularly with C₁₀ synthetase activity. The purification of the cis enzyme was about 400 times, measured by the rate of formation of cis compounds.

This is the first report of the individualization and partial purification of this cis transferase activity. This explains the biosynthesis of NPP, an immediate precursor of cyclic monoterpene hydrocarbons in Citrus sinensis and Citrus limonum flavedo.

The 2-cis-FPP synthetase activity was proved to be independent of the redox isomerization system which forms 2-cis-farnesal and 2-cis-farnesol. All these facts suggest that the cis enzyme is genetically and physically independent of the redox enzymes, in such a way that the first system could be specifically directed to monoterpene biosynthesis, and the second to sesquiterpenes metabolism, including ~~arabid~~ isic acid synthesis.

No inhibition by phospholipids could be found on the purified enzymes, suggesting that the inhibitory

effect observed on the prenylsynthetase in the crude
extract was due to a reinforcement of inhibitory between
the enzymes and the non-protein, coloured components of
the extract

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

1. Desarrollo histórico de los conceptos fundamentales de la biosíntesis de isoprenoides.

Los tejidos animales o vegetales, así como los microorganismos, contienen una gran variedad de compuestos de estructura y tamaño muy diversos, pero que tienen en común su relación biogenética con una unidad fundamental de 5 átomos de C, el isopreno, C_5H_8 . Entre estos compuestos, denominados isoprenoides, se encuentran los esteroides, carotenoides, poliprenoles, hidrocarburos hemi-, mono-, di-, tri-, y sesquiterpénicos,¹ y sus derivados oxigenados, giberelinas, ácido abscísico, caucho, gutapercha, las ubi-quinonas, etc.

La relación entre compuestos tan variados la estableció por primera vez Wallach en 1887, cuando observó que los terpenos formados por tejidos vegetales poseen una estructura que puede resultar formalmente de la yuxtaposición de unidades isoprénicas (1). Luego Robinson, en 1934, extendió este punto de vista y formuló por primera vez una

1. Ver leyenda de la Figura 6.

hipótesis biogenética al postular, sobre una base puramente estructural, que el colesterol podía derivar del escualeno, y éste, del isopreno (2). Fue más lejos aún y postuló que en los terpenos las unidades isoprénicas se disponen siempre de un modo regular: cabeza-cola o paralela.² Sin embargo, cuando se elucidaron las estructuras de algunos isoprenos complejos como el lanosterol, un intermediario en la biosíntesis del colesterol, se encontró que la regla no podía aplicarse, dado que la distribución de metilos geminales en el anillo A y en la cadena isooctílica de este compuesto no era compatible con este tipo iterativo de condensación paralela (3).

Este hecho condujo a Leopold Ruzicka, Profesor de Química Orgánica en Zurich a postular en 1953 la ahora universalmente aceptada regla biogenética del isopreno (4). De acuerdo a esta regla, los isoprenoides no se forman directamente del isopreno, sino que derivan de alcoholes isoprénicos de estructura conocida, de 10, 15, 20 y 30 átomos de carbono. Los sistemas biológicos responsables de estas transformaciones simplemente aprovecharían la reactividad natural de estos compuestos, de tal modo que todas las estructuras de los isoprenoides derivarían de aquellos

2. Se entiende por cabeza-cola la disposición en que el carbono 1 de un isopreno se yuxtapone al carbono 4 de otro (Figura 2). Se la denomina también paralela.

precursores mediante dimerizaciones antiparalelas, ciclaciones o reordenamientos predecibles de acuerdo a las reglas conocidas de la Química Orgánica. A esto se agregarían procesos de hidroxilación, oxidación y otras reacciones, hasta generar el producto final.

Ahora se sabe que los verdaderos precursores son los ésteres pirofosfóricos de estos alcoholes isoprenicos o prenoles. Sin embargo, la proposición de Ruzicka se tradujo en un rápido desarrollo de este área de la Bioquímica. El método, las ideas y las técnicas empleadas en este desarrollo constituyen probablemente la más completa y fructífera aplicación de la Química Orgánica a la Bioquímica moderna.

En 1956, Folkers y Wright identificaron a la mevalonolactona como uno de los componentes esenciales del medio de cultivo de una cepa de Lactobacillus (5). En el mismo año, Tavormina y sus asociados encontraron que el ácido mevalónico era un excelente precursor del colesterol (6), con lo que se tuvo la primera evidencia definitiva de un intermediario específico de la biosíntesis de isoprenoides. Después se encontró este mismo resultado en una serie tan grande de isoprenoides que la incorporación de radiactividad de ácido mevalónico en un determinado compuesto llegó a usarse como criterio para afirmar que este compuesto era un isoprenoide (7). Sin embargo, ahora se sabe que

esto no es cierto en todos los casos. Por ejemplo, Popják ha demostrado que el ácido mevalónico puede ser metabolizado hacia ácidos grasos (8).

Bloch (9) y Cornforth (10) probaron que el esqueleto completo del colesterol derivaba del acetato. El patrón de distribución de los carbonos derivados del metilo o del carboxilo del acetato en la estructura del colesterol, sugirió que un compuesto de 5 o 6 C era el precursor fundamental de estos compuestos, lo que se confirmó con el descubrimiento del ácido mevalónico (Figura 1).

Si bien la regla del isopreno era a priori una proposición racionalmente aceptable, no encontró apoyo experimental directo en sistemas biológicos hasta el descubrimiento en 1958 del isopentenil pirofosfato (IPP, 3-metil,3-butenil pirofosfato) (11). Este es el primer compuesto de la ruta biosintética de los isoprenoides en el que la estructura isoprénica se reconoce directamente (Figura 2)

2. Biosíntesis de isopentenil pirofosfato.

La biosíntesis de IPP se demostró a partir de ácido mevalónico (MVA) en levadura (12), bacterias (13), plantas superiores (14,60) y mamíferos, (15). Este proceso ocurre a través de tres reacciones que usan ATP; las dos primeras generan secuencialmente el grupo pirofosfato y en la última el carboxilo y el OH del MVA se eliminan

Figura 1

Acido 3-R-mevalónico

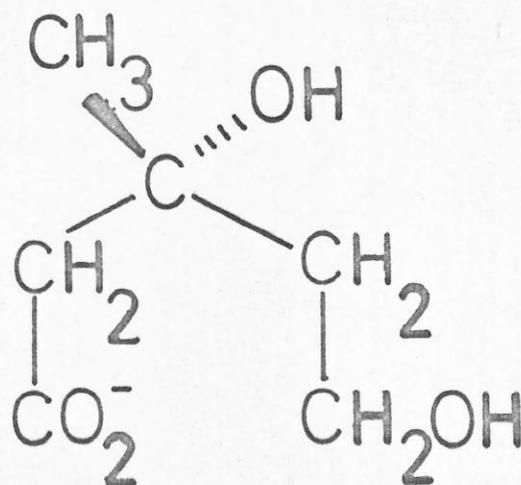
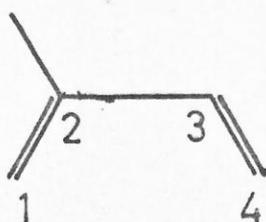
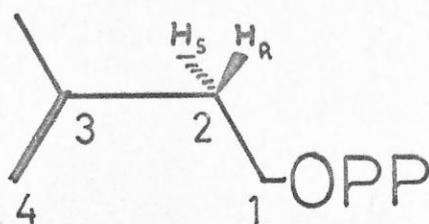


Figura 2

Isopreno e isopentenil pirofosfato



Isopreno



Isopentenil pirofosfato

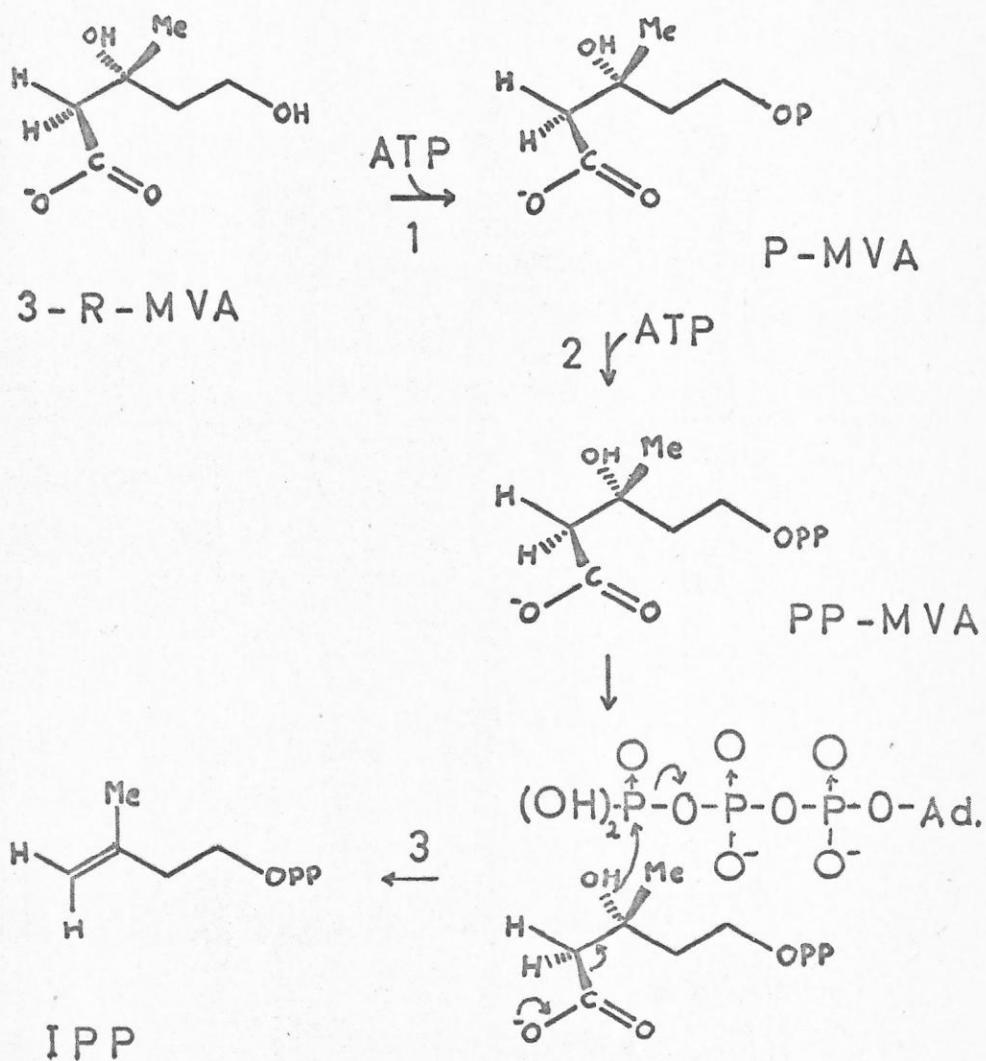
concertadamente para generar el metilo terminal del IPP (Figura 3).

Las enzimas que catalizan estas reacciones son la quinasa mevalónica, la quinasa fosfomevalónica y la pirofosfomevalónico descarboxilasa. La primera enzima se purificó en 1970 partiendo de hígado de cerdo hasta obtener una proteína homogénea (16). La enzima sólo utiliza el enantiómero R del ácido mevalónico (17, 18), requiere de un grupo SH reducido y exhibe un mecanismo secuencial ordenado de entrada y salida de reaccionantes y productos (16). La actividad es inhibida en un 50% por farnesil pirofosfato 2-3 μM (19), lo que sugiere que esta reacción es un punto de control metabólico (19) (ver Figura 6). La actividad requiere de Mg^{+2} o Mn^{+2} , siendo el primero más eficiente (16). El PM de la enzima de hígado de cerdo es de 98000 (16).

Las enzimas siguientes son mucho menos conocidas. La pirofosforilación del ácido fosfomevalónico exhibe un requerimiento de metales semejante al de la quinasa mevalónica (20). La constante de equilibrio de la reacción es del orden de 1 (21), y la actividad es fuertemente inhibida por reactivos de tioles (21). No hay datos sobre el mecanismo de la reacción. La enzima se ha purificado parcialmente de hígado de cerdo (20) y látex de Hevea brasiliensis (22), y se la ha descrito o se ha inferido su existencia por los productos intermediarios en Pinus

Figura 3

Biosíntesis de isopentenil pirofosfato



radiata (23), Cucurbita pepo (24), Citrus sinensis (63) y en hojas de Nepeta cataria (76).

La pirofosfomevalónico descarboxilasa cataliza la reacción entre pirofosfomevalónico y ATP para formar IPP, ADP, ortofosfato y CO₂. La enzima se ha purificado parcialmente de hígado de cerdo (20); el mecanismo no se conoce con certeza pero se han postulado dos hipótesis; una de ellas sugiere que durante la reacción se forma 3-fosfo-5-pirofosfomevalónico, pero este compuesto nunca se ha detectado (25); según la otra, el carboxilo y el OH del sustrato se eliminan en una reacción concertada, en la que el fosfato terminal del ATP acepta el hidroxilo saliente (Figura 3) (25). Ambas hipótesis son consistentes con la incorporación de isótopo del 3-¹⁸O-MVA en el producto ortofosfato (25). Cornforth ha demostrado que la remoción del COOH y del OH es antiperiplanar, exactamente como en la reacción química de descarboxilación y debromación de ácidos β -Br-carboxílicos (27).

La reacción requiere de Mg⁺² y el pH óptimo es de 6,5 (20). No se conocen otras características de la reacción o de la enzima.

3. Isopentenil pirofosfato isomerasa.

En la siguiente reacción de la secuencia biosintética, el IPP se transforma en el compuesto alílico dimetilalilpirofosfato (DMAPP: 3-metil-2-butenil PP), es

decir, el doble enlace migra de C_3-C_4 a C_2-C_3 . La enzima que cataliza esta reacción se denomina isopentenil pirofosfato isomerasa. Esta enzima se ha purificado unas 20 veces de hígado de cerdo (20), y de *C. pepo* (28), y se ha demostrado su existencia en levadura (11), flavedo de Citrus (29), plántulas de Pinus (34) y suero de Hevea (31). La enzima requiere de Mg^{+2} o Mn^{+2} , es inhibida por bajas concentraciones de reactivos de tioles (29, 32), y el PM se ha estimado en unos 60000 daltons (32). La constante de equilibrio es de alrededor de 9 (32).

La reacción procede probablemente a través de un carbocatión que se forma cuando un protón se adiciona al carbono metilénico del IPP (Figura 4); luego, el carbocatión se estabiliza por eliminación del H 2-pro-R del C_2 (33, 34), lo que genera el doble enlace 2,3. El nuevo metilo geminal queda trans respecto al grupo pirofosfato (35). La adición del protón ocurre sobre la cara re del doble enlace 3,4 (36). El mecanismo se muestra en la Figura 4.

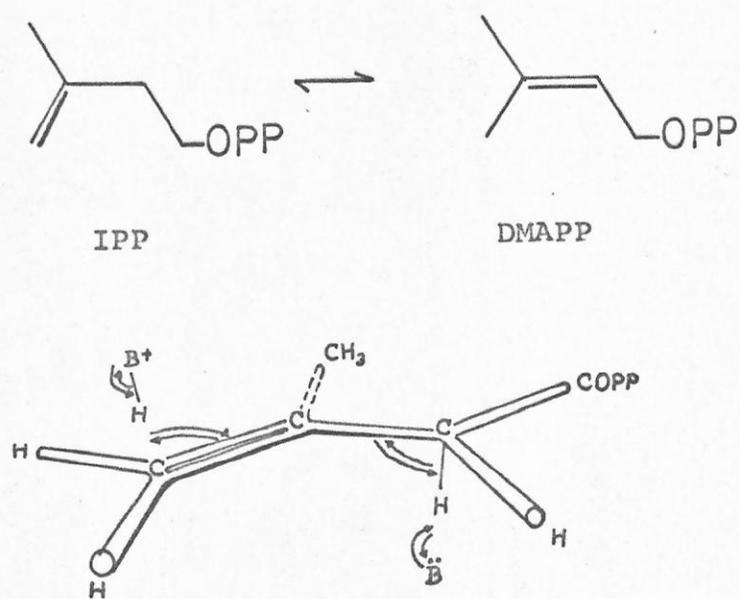
4. Prenilsintetasas.

4.1. Definición.

Se denominan prenilsintetasas o preniltransferasas a las enzimas que catalizan las reacciones de adición mostradas en la Figura 5. El IPP generado por la quinasa mevalónica, la quinasa pirofosfomevalónica y la pirofosfomevalónico descarboxilasa, sirve como la unidad condensante

Figura 4

Mecanismo de la reacción catalizada por la IPP isomerasa



El primer dibujo muestra la reacción general; en el segundo se muestran las transferencias de protón catalizadas en el sitio activo de la enzima que dan cuenta de la isomerización. Un protón se agrega al C_4 , dando un carbocatión que se estabiliza por la remoción de uno de los protones del C_2 .

básica para estas reacciones de polimerización. Los productos de estas condensaciones son el punto de partida para la generación de todos los isoprenoides, salvo los hemiterpenos (Figuras 5 y 6). Químicamente, estas reacciones de polimerización pueden considerarse como el resultado de una adición de un electrófilo (el pirofosfato alílico) a una olefina (el IPP), con eliminación de pirofosfato inorgánico y de un protón del C₂ (Figura 7); así se genera un nuevo doble enlace 2,3, en un nuevo compuesto alílico con 5 átomos de C más. Este puede adicionarse en una nueva reacción de condensación paralela a otra molécula de IPP, y así sucesivamente. Dependiendo de la especie o tejido, el número de condensaciones paralelas puede ser una o dos, como en la biosíntesis de GPP o FPP (38), puede ser de 10 a 20 como en la síntesis de poliprenoles (39), o llegar a varios miles, como en la síntesis de caucho o gutapercha (40) (Figuras 5 y 6).

En la Figura 6 se muestra un esquema general de la biosíntesis de los isoprenoides a partir de ácido mevalónico; es obvio que la distribución de isoprenoides característica de cada tejido u órgano dependerá tanto del tamaño y la geometría de dobles enlaces de los prenil pirofosfatos como de las transformaciones específicas que estos sufren. Ya que son las prenilsintetasas las enzimas que definen el tamaño y la geometría de los prenilpirofosfatos, se puede prever que deben existir muchos tipos de enzimas

Figura 5

Reacciones de síntesis de prenil pirofosfatos

13

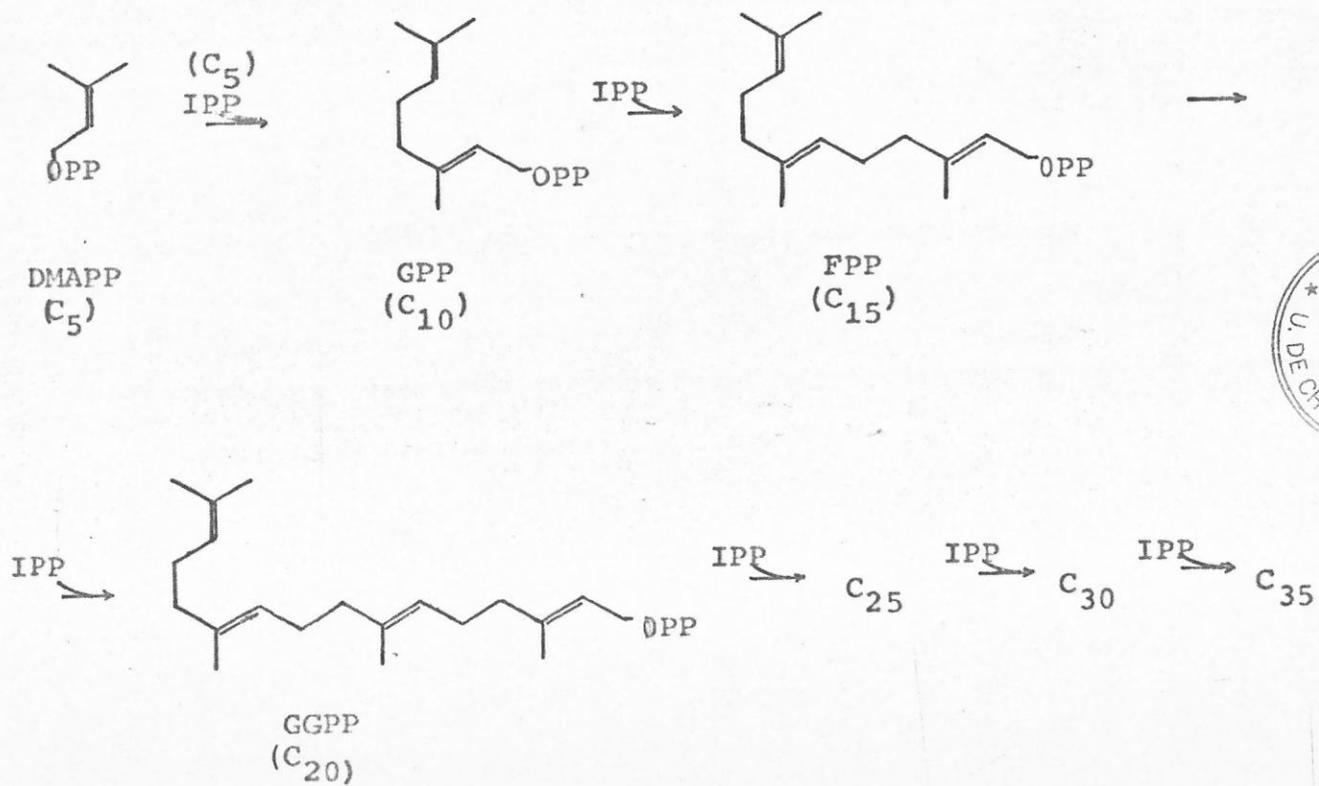
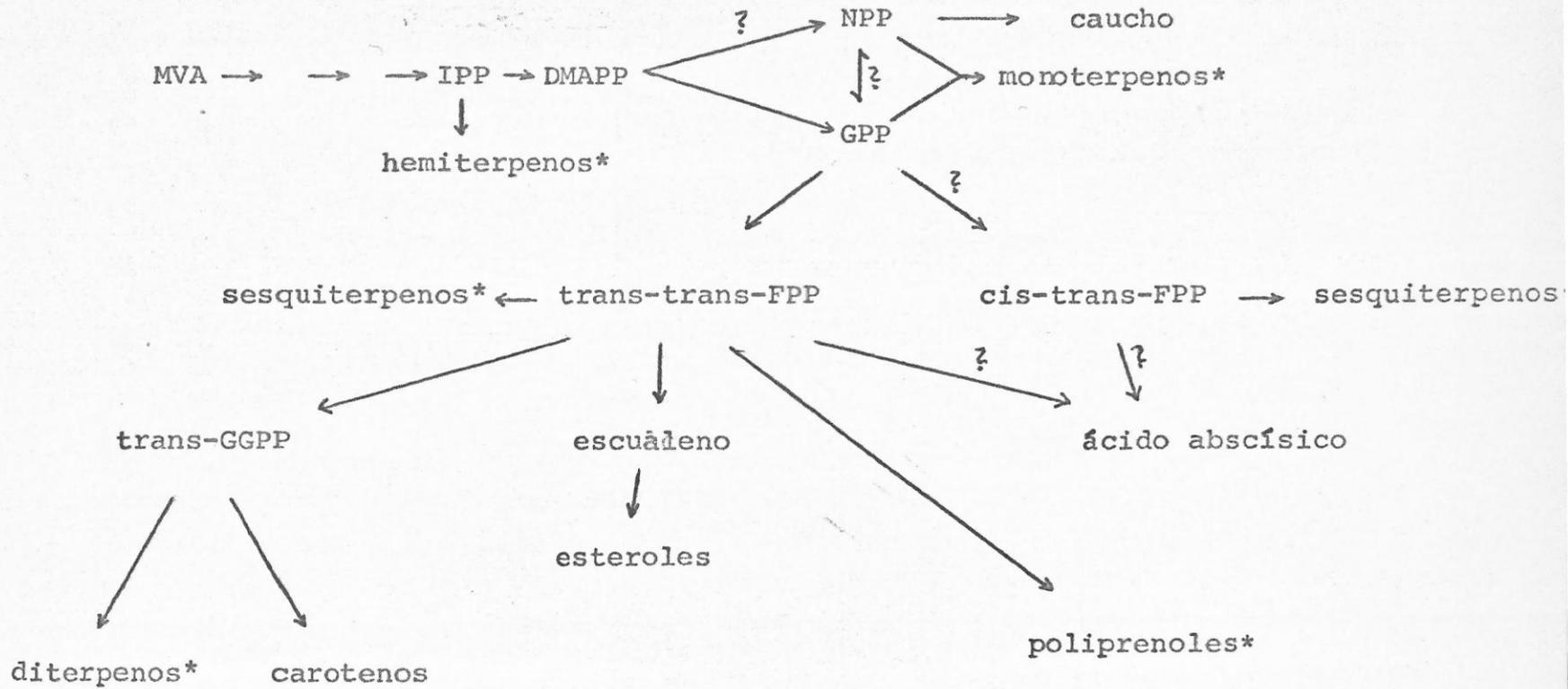


Figura 6

Biosíntesis de isoprenoides



14

*Los terpenos se denominan de acuerdo al número de unidades isoprenicas que contienen: hemi (1), mono (2), sesqui (3), di (4), etc.

que presentarán especificidad respecto a dos variables; estas son el largo de cadena del sustrato alílico y por ende del producto, y la conformación en torno a cada nuevo doble enlace generado.

4.2. Propiedades generales.

La FPP sistetasa se ha obtenido como una proteína homogénea de hígado de cerdo (41), hígado de ave (42) y de levadura (43), y se ha purificado parcialmente de Ricinus communis (44) y de C. pepo (45). Todas estas enzimas catalizan la síntesis de GPP y FPP. Otras prenilsintetasas incluyen una actividad GGPP sintetásica purificada de Micrococcus lisodeikticus (46) y detectada en semillas de C. pepo (47) y de R. communis (44), una undecaprenil pirofosfato sintetasa parcialmente purificada de Lactobacillus plantarum (48), y una C₃₅ a C₄₀ prenilpirofosfato sintetasa de M. lisodeikticus (49). Estas últimas enzimas catalizan la síntesis de C₅₅ y de C₃₅ a C₄₀ prenilpirofosfato respectivamente, usando IPP y FPP como sustratos.

Las únicas enzimas bien estudiadas, sin embargo, son las prenilsintetasas de hígado de cerdo e hígado de ave (41, 42). Estas enzimas tienen un PM de 85000 daltons, usan DMAPP o GPP como sustratos alílicos y requieren absolutamente de un metal divalente como Mg⁺² (42, 50); el Mn⁺² es algo menos eficiente. La enzima es inhibida por reactivos de tioles (50). Las Km para IPP y GPP son de

de 0,5 μM , con la enzima de hígado de ave (42) y de 1,5 y 4,3 μM con la enzima de hígado de cerdo (50), respectivamente. Se ha determinado que las enzimas de hígado de ave y levadura están compuestas por dos dímeros aparentemente idénticos (42, 43). Todas las farnesil pirofosfato sintetasas descritas en la literatura catalizan la reacción de síntesis de GPP, es decir, son tanto DMAPP como GPP transferasas. Esta evidencia vino primero de la co-purificación de ambas actividades, y luego de la demostración de que ambas FPP sintetasas purificadas hasta satisfacer varios criterios de homogeneidad proteica, exhiben también actividad GPP sintetásica (42).

El grupo de Rilling demostró recientemente que la enzima de hígado de ave posee un sitio de unión de IPP por subunidad, y un solo sitio para ambos sustratos alílicos, DMAPP y GPP. Esto demuestra que las condensaciones de C_{10} y de C_{15} son catalizadas en la misma región de la enzima.

4.3. Mecanismo.

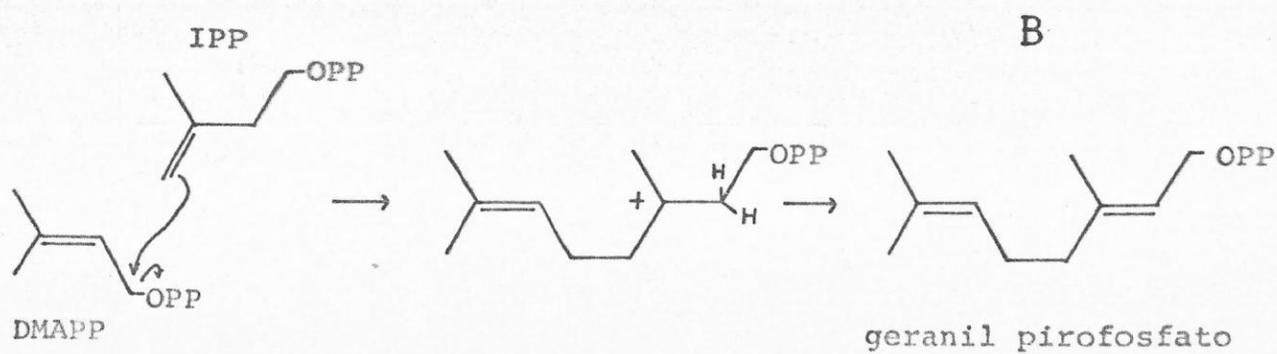
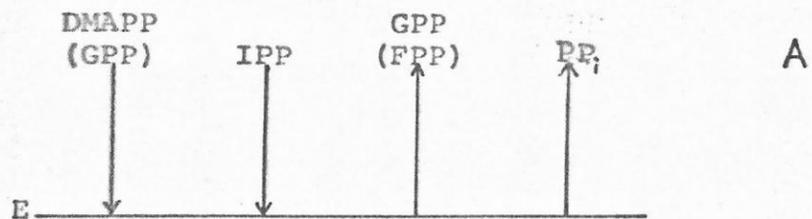
La reacción sigue un mecanismo Bi-Bi ordenado (50) como se muestra en la Figura 7; el primer sustrato es el alílico, y el primer producto es el nuevo alílico de 5 C más. El pirofosfato es el último producto en salir.

La reacción parece ocurrir con la formación de un C_1^+ carbocatión alílico, producido por la ruptura heterolítica del enlace carbo-oxígeno, probablemente inducida

Figura 7

Mecanismo de la reacción catalizada por la prenilsintetasa (50)

17

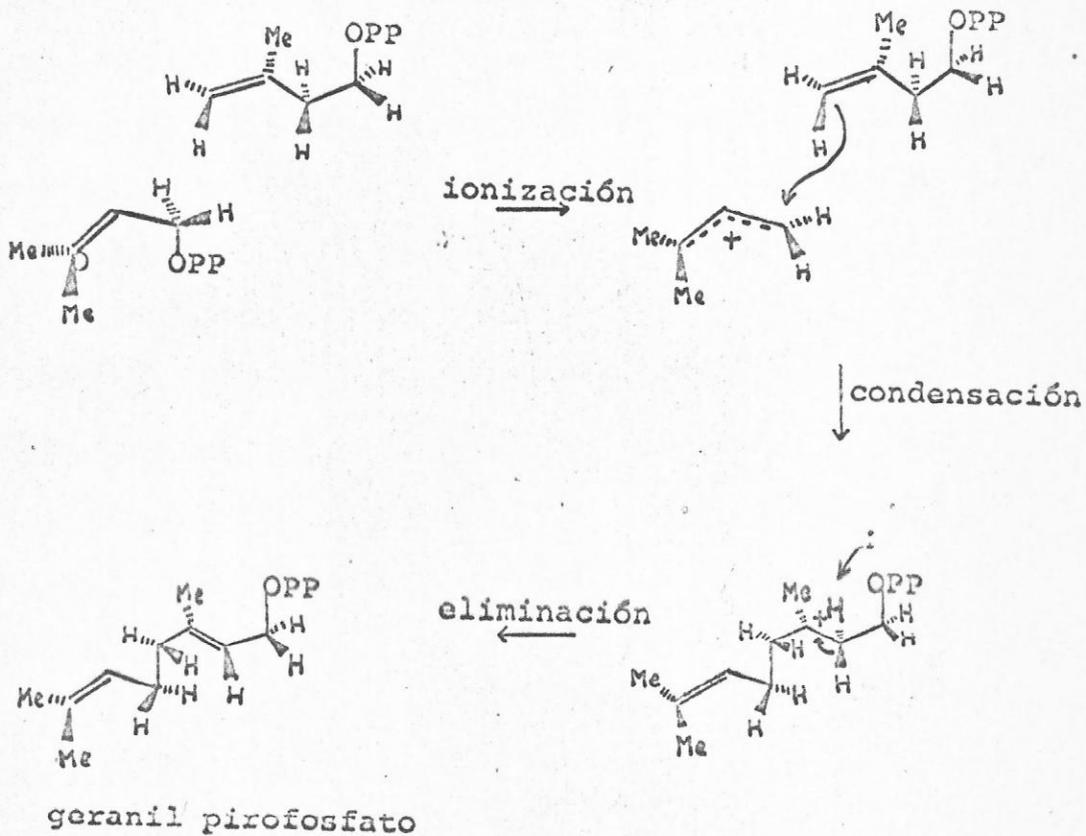


por el IPP en el sitio activo; inmediatamente después el catión alilo se adiciona por la cara si al doble enlace 3,4 del IPP (27); así, la configuración alrededor del C_1 se invierte (53). Así se genera un nuevo carbocatión que se estabiliza por la eliminación estereoespecífica del H 2-pro-R del C_2 (34, 53), como se muestra en la Figura 8.

Aunque la inversión de la configuración del C_1 del sustrato alílico es compatible con un mecanismo de condensación SN_2 (53), recientemente se encontró que la FPP prenilsintetasa de hígado de cerdo, cataliza la hidrólisis del sustrato alílico GPP, y que esta reacción es estimulada por pirofosfato inorgánico (41). También se forman pequeñas cantidades de hidrocarburos (41). La hidrólisis procede con inversión de la configuración en el C_1 del sustrato alílico, igual que en la condensación (53). Esta evidencia sugiere que la enzima puede catalizar la formación del catión alilo del GPP en una forma suficientemente estable y específica como para que no se produzca reordenamiento alílico, que generaría un alcohol terciario (linalool o un homólogo), ni racemización en el C_1 . El carbocatión se estabiliza por salida de protón dando un hidrocarburo, o reacciona con agua para dar el alcohol primario. La reacción de hidrólisis sólo se manifiesta en ausencia del segundo sustrato IPP y procede a un 3% de la velocidad de la condensación (52).

Figura 8

Mecanismo de condensación de IPP con DMAPP



4.4. Especificidad por el largo de cadena.

Bajo ciertas condiciones, la FPP sintetasa de hígado de pollo puede catalizar la formación de GGPP a partir de IPP y FPP (42), pero la velocidad de esta reacción parece demasiado baja como para ser fisiológicamente relevante. Por otro lado, una preparación bastante pura de GGPP sintetasa de Micrococcus cataliza la síntesis de GPP, FPP, y GGPP (46), y una preparación de la misma enzima obtenida de C. pepo exhibe también las tres actividades (47). Por lo tanto, la porción del sitio activo que acomoda la cadena alquilica del sustrato alílico debe ser relativamente poco específica. Esta suposición se ha demostrado experimentalmente, ya que la FPP sintetasa es capaz de condensar una serie de homólogos de GPP modificados en la región del doble enlace 6,7 (52, 54, 55, 56). Además la enzima es inhibida por octil PP y por una serie de pirofosfatos y prenil monofosfatos de cadena larga (57). Estos datos sugieren que la región de unión de la cadena alquilica del GPP se puede describir como una hendidura lineal en la estructura terciaria de la enzima; por lo tanto, uno de los factores que determina la especificidad de la enzima por el largo de cadena es la longitud de esta hendidura, respecto a la longitud del sustrato alílico.

La ligación del IPP a su sitio tiene requerimientos estructurales mucho más estrictos (53). La única

modificación que se puede introducir es el reemplazo del metilo por un grupo etilo (59).

4.5. Especificidad conformacional.

Con excepción de los poliprenoles, los intermediarios prenil pirofosfatos tienen estructura trans en animales . En tejidos vegetales, en cambio, que poseen un metabolismo isoprenico mucho más diversificado se ha encontrado neril pirofosfato, el isómero 2-cis del geranil pirofosfato (60) (Figura 11), y se conocen muchos productos con dobles enlaces de conformación cis como el ácido abscísico (61), ciertos poliprenoles (39) y el caucho (40). Sin embargo, todas las prenilsintetasas descritas generan productos trans y usan productos trans, con excepción de una enzima de algodón que participa en la biosíntesis de gossipol; ésta utiliza neril pirofosfato como sustrato alílico (64), y sintetiza el 2-trans,6-cis-FPP, diastereómero del producto generado en tejidos animales (ver estructura en la Figura 11). Sin embargo, aun esta enzima posee la geometría de sitio activo común a las demás prenil sintetasas, ya que el producto es trans en torno al doble enlace 2,3 (64).

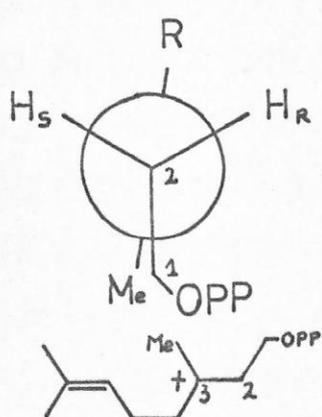
La geometría de este doble enlace 2,3 se define durante la reacción: después de la adición del metileno del IPP al C₁ del sustrato alílico se produce un carbocatión terciario que se transforma en producto por la eliminación de uno de los protones del C₂ (27, 53),

(Figuras 7 y 8). Al estudiar la estereoquímica de esta eliminación de protón, usando enzimas parcialmente purificadas o sistemas crudos que catalizan la biosíntesis de una variedad de productos de conformación cis o trans, se obtuvo un conjunto de resultados que se sistematizaron como una regla biosintética (65). Esta regla establece que la formación de dobles enlaces trans va siempre acompañada de eliminación del protón 2-pro-R del IPP y que la eliminación del protón 2-pro-S conduce siempre a la biosíntesis de un doble enlace cis (65). El análisis conformacional de la Figura 9 muestra que esta generalización no tiene apoyo en ninguna característica estructural propia de los sustratos o de los intermediarios, salvo la estructura de la enzima. Dado que el enlace simple 2,3 del carbocatión no tiene impedimento de rotación, resulta obvio que si el grupo X (Figura 9) queda sin-periplanar respecto al $-\text{CH}_2\text{O-P-O-P}$, tanto la salida del protón pro-R como la del pro-S darán origen a un producto cis. Viceversa, la conformación antiperiplanar del carbocatión generará productos trans, independientemente de cual sea el protón eliminado. Por lo tanto, el factor determinante en la estereoespecificidad de la reacción es la disposición espacial de los sitios ligantes de la enzima respecto a la base que facilita la salida de uno u otro protón.

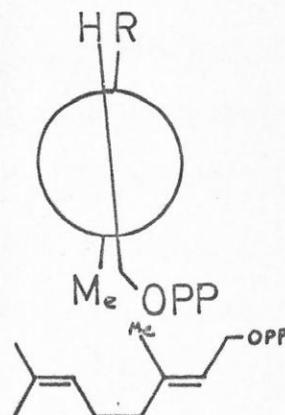
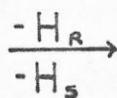
En resumen, de acuerdo a la hipótesis corriente, habrían prenilsintetasas trans que eliminarían el protón

Figura 9

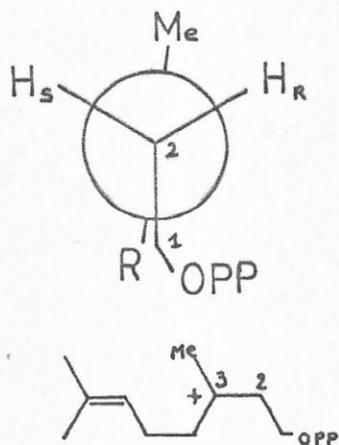
Análisis conformacional de la estereoquímica de la condensación



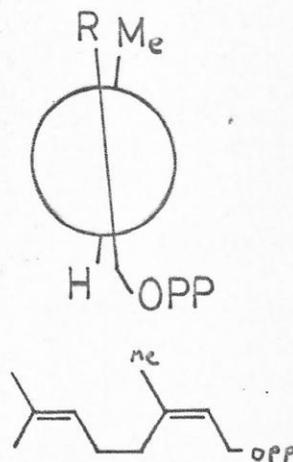
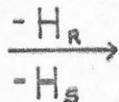
conf. antiperiplanar



geranyl pirofosfato



conf. sinperiplanar



neril pirofosfato

R: C₆H₁₁

2-pro-R, y prenilsintetasas cis, que eliminarían el protón 2-pro-S. La existencia de estas últimas, sin embargo, se infiere de la geometría de los dobles enlaces de los productos finales, (por ej. caucho), ya que su existencia nunca ha sido demostrada. Sin embargo, como se describe en la próxima sección, el estudio de la biosíntesis de monoterpenos condujo al descubrimiento del alílico cis de 10 C, neril pirofosfato. Es evidente que la investigación del origen de este compuesto y su relación metabólica con los monoterpenos podría conducir a la demostración de una actividad cis sintetasa, o a una mejor comprensión de los mecanismos de acción general de las prenilsintetasas. Estos problemas se discuten en las próximas secciones.

5. Algunos problemas en la biosíntesis de monoterpenos.

Los aceites esenciales de muchas plantas superiores contienen monoterpenos como geraniol, nerol, terpineol, linalool, hidrocarburos acíclicos, aldehidos, etc. (66) (Figura 10). Muchos compuestos isoprenoides de 10 átomos de C se propusieron como los precursores directos de estos monoterpenos antes de la demostración de la existencia del GPP como el único intermediario C_{10} en la biosíntesis del colesterol. (Figuras 6 y 11). Luego de este descubrimiento en 1959 (38), y en particular luego de su identificación como uno de los productos del metabolismo del ácido mevalónico en plantas, el GPP se constituyó en el precursor común

Figura 10

Estructura de algunos monoterpenos



mirceno



limoneno



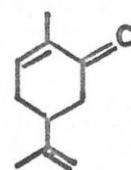
sabineno



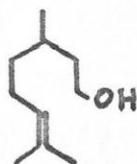
α -pineno



β -pineno



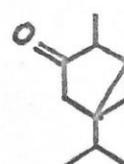
carvona



citronelol



α -terpineol



tujona

15314

UNIVERSIDAD DE CHILE
SEDE SANTIAGO ORIENTE
BIBLIOTECA CENTRAL

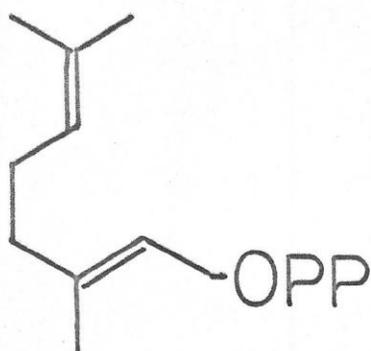
obvio. Sin embargo esta hipótesis no fue verificada experimentalmente durante una década. Sólo recientemente se han dilucidado algunos de los aspectos claves de estas vías metabólicas en los vegetales.

Como ocurrió con la biosíntesis en general de isoprenoides, el primer ataque racional a este problema se inspiró en una base puramente química. Muchos monoterpenos tienen estructura cíclica, incluyendo alcoholes e hidrocarburos (Figura 10). En 1965, Cori (81) observó por inspección de modelos que el geranil PP no sería un buen precursor de estos compuestos cíclicos desde un punto de vista químico, debido a la geometría molecular desfavorable (Figura 11). En cambio, el diastereómero cis del GPP, neril pirofosfato, (Figura 11), parecía satisfacer los requerimientos de distancias y ángulos del proceso de ciclación. Ya Zeitschel había demostrado en 1904 que el nerol se ciclaba en medio fuertemente ácido con mayor facilidad que el geraniol, de lo cual se concluyó la estructura cis del primero de estos compuestos (26).

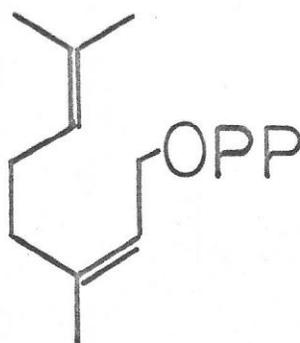
Esta hipótesis de que el NPP sería mejor precursor de monoterpenos que GPP fue sustentada por experimentos cinéticos de solvólisis no enzimática (67), y por el descubrimiento del NPP como un producto cuantitativamente importante del metabolismo de isoprenoides en extractos de plántulas de Pinus radiata (60).

Figura 11

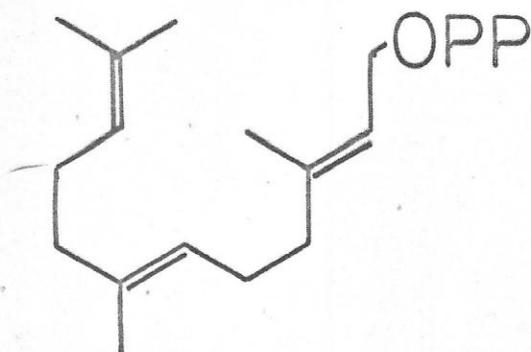
Estructura de C_{10} y C_{15} prenil pirofosfatos



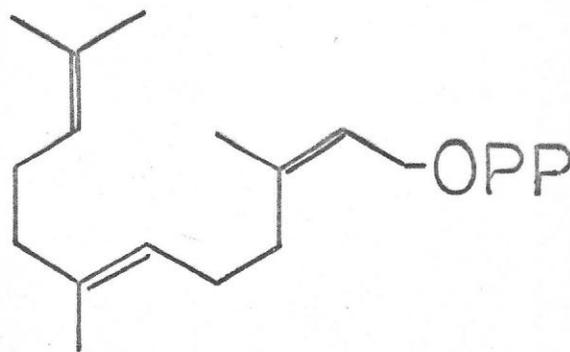
geranil pirofosfato



neril pirofosfato



2-trans,6-trans-FPP



2-cis,6-trans-FPP

Más tarde se demostró en este mismo sistema que el NPP es prácticamente el único precursor de los hidrocarburos cíclicos α y β pineno (68). El GPP fue completamente inactivo en el mismo proceso (68). En cambio, cuando se exploraron estas actividades en flavedo de Citrus sinensis (69) y de Citrus limonum (70), se encontró que NPP y GPP tienen efectividades semejantes como precursores de hidrocarburos monoterpénicos cíclicos. Las enzimas que catalizan estas reacciones se han logrado purificar unas 100 veces de C. limonum, usando una secuencia de fraccionamientos con polietilenglicol y cromatografía en DEAE Sephadex (70, 83). Estas enzimas denominadas ciclasas, sintetizan α y β pineno, sabineno y limoneno, requieren Mn^{+2} , son inhibidas por reactivos de tioles y no usan como sustrato neril o geranil monofosfato (70). Como lo indican estudios preliminares de cromatografías hidrofóbicas en columnas de Sepharosa modificada, y drásticos cambios en las razones de las actividades que usan NPP o GPP durante el almacenamiento, habrían por lo menos dos enzimas estereoespecíficas, una para cada sustrato (83).

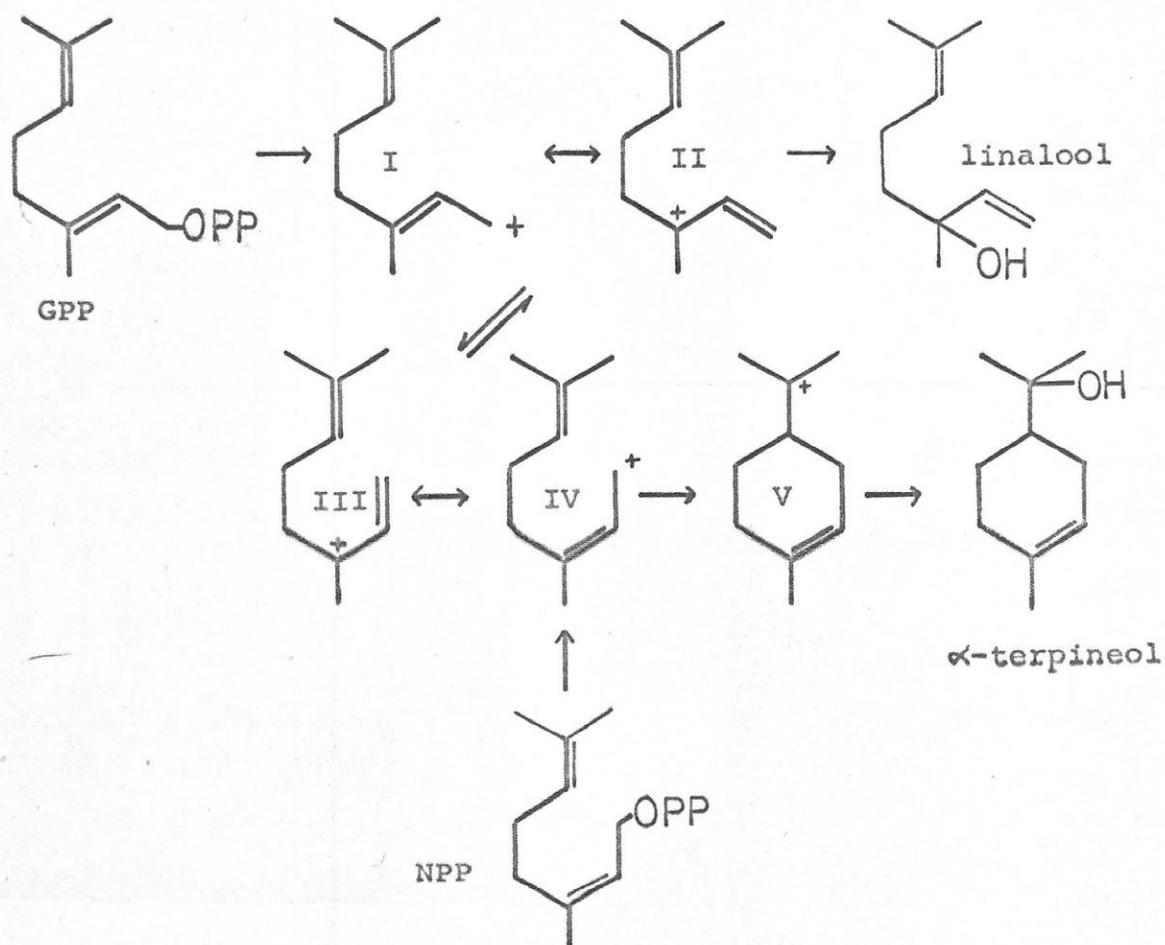
El hecho que tanto NPP como GPP sean sustratos igualmente buenos para la síntesis de estos hidrocarburos cíclicos aun cuando en el último la ciclación directa parece difícil, puede explicarse usando un argumento puramente químico, sin invocar un cambio de reactividad inducido por la unión del GPP al sitio activo de la enzima.

En el caso del NPP, el proceso podría comenzar con la formación del carbocatión cíclico descrito por las estructuras canónicas III y IV, al salir el pirofosfato (Figura 12). Este carbocatión puede transformarse rápidamente en el carbocatión cíclico más estable V luego del ataque de los electrones pi del doble enlace 6,7 sobre el C₁ parcialmente positivo. En el caso del GPP esta reacción es imposible en forma directa, ya que el C₁ está demasiado lejos de la nube pi debido a la estructura trans.

Sin embargo, la solvólisis catalizada por ácido de NPP y GPP produce los alcoholes α -terpineol y linalool (67) (Figura 12); la velocidad de formación de α -terpineol es 70 veces mayor a partir de NPP que de GPP, y la razón de productos en el equilibrio favorece ampliamente a linalool cuando el sustrato es GPP; pero el hecho de que ocurra formación del alcohol cíclico α -terpineol a partir del isómero trans demuestra que debe haber rotación alrededor del enlace 2,3. Esto es posible porque luego de la ruptura del enlace C-O al salir el pirofosfato del GPP, se forma un carbocatión cuya estructura se puede describir por las formas canónicas I y II; esta última forma contribuye más a la estructura ya que es más estable (142), y por ende, el enlace 2,3 tiene más carácter de enlace simple que de doble lo que hace menor la barrera termodinámica para la rotación. Así el catión geraniol puede isomerizarse en una etapa limitante de velocidad al catión nerilo,

Figura 12

Mecanismo de solvólisis de neril y geranil
pirofosfatos



descrito por las formas canónicas III y IV, el cual se cicla como se describe más arriba.

De este modo, las enzimas capaces de catalizar la ciclación de GPP y NPP a hidrocarburos monoterpénicos, simplemente aprovechan la reactividad inherente a estos compuestos.

6. El origen del neril pirofosfato.

Los estudios detallados en el punto anterior establecen definitivamente a los pirofosfatos alílicos cis y trans neril y geranil pirofosfato como los intermediarios claves en la biosíntesis de monoterpenos en Citrus. Sin embargo, resta el problema del origen biosintético del NPP. En principio, dos mecanismos podrían explicar la generación de este compuesto: síntesis a partir de DMAPP e IPP catalizada por una preniltransferasa que genera específicamente un doble enlace cis en 2,3, o isomerización de GPP a NPP. Este problema fue abordado por Banthorpe, estudiando la estereoquímica de la retención de protón en el C₂ en la biosíntesis de nerol y neril glucósidos (62). Se encontró que se eliminaba específicamente el protón 2-pro-R; este resultado se interpretó como una síntesis de GPP seguida de isomerización, invocando la regla biosintética como una regla sin excepciones (7). En experimentos similares en este Laboratorio, pero siguiendo la marcación estereoespecífica de NPP y no de nerol se obtuvieron resultados concordantes con

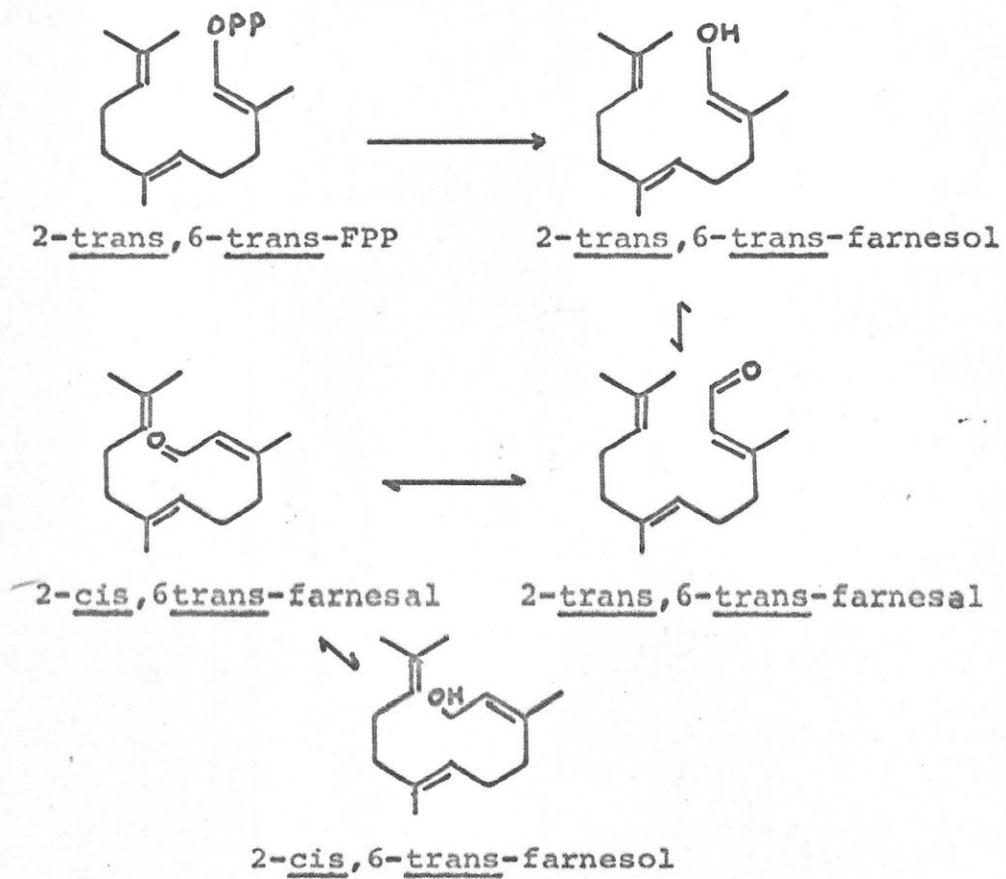
los de Banthorpe (34), vale decir, eliminación del protón 2-pro-R. En acuerdo aparente con estos resultados, Dunphy ha encontrado isomerización nerol y geraniol mediada por los respectivos aldehidos (72), y el grupo de Loomis encontró que extractos de Menta piperita y Daucus carota son capaces de isomerizar geraniol y geranil monofosfato a sus respectivos diastereómeros (74, 77). Este mismo grupo ha descrito una quinasa que fosforila nerol o neril monofosfato en Menta (75).

Mecanismos de interconversión análogos se han descrito en este Laboratorio (71, 72) y en el de Overton (73) para el cis y el trans farnesol; estos estudios, mucho más claros y limpios que los similares descritos arriba, han demostrado concluyentemente que 2-trans, 6-trans farnesol puede ser isomerizado a su respectivo isómero 2-cis, 6-trans, por un proceso de óxido reducción que se describe en la Figura 13.

Este conjunto de evidencia parecería demostrar que el neril pirofosfato C_{10} , no es sintetizado directamente a partir de dos unidades de C_5 , sino que a través de un proceso de isomerización cuyo punto de partida sería GPP sintetizado estereoespecíficamente por una prenilsintetasa. Este compuesto sería hidrolizado a GP o a geraniol los que se isomerizarían fácilmente y la fosforilación específica de estos compuestos catalizadas

Figura 13

Isomerización de farnesoles



por una quinasa produciría NPP. Este es el punto de vista prevaleciente en la literatura (7). Sin embargo las velocidades de isomerización (74, 77) y de fosforilación (75) descritas parecen insuficientes para explicar los altos niveles de NPP que se encuentran con frecuencia en estudios a partir de ácido mevalónico en este Laboratorio, (60). Por otra parte, la búsqueda sistemática de una isomerización de GPP a NPP o viceversa ha dado resultados consistentemente negativos usando sustratos radiactivos que permitirían detectar hasta un 1% de interconversión (69, 70). La misma ausencia de interconversión trans-cis se ha encontrado en experimentos en que se ha usado trans,trans-FPP como sustrato y tanto con enzimas de Pinus (71) como de Citrus sinensis (70) o Citrus limonum (83).

Estos últimos resultados sugieren que al menos en Pinus y Citrus, el NPP no resulta de una isomerización de GPP, sino que de la actividad de una NPP sintetasa estereoespecífica que utilizaría DMAPP e IPP como sustratos. Sin embargo, si esta prenilsintetasa existiera, la eliminación del protón 2-pro-R del IPP usando sistemas acelulares de Pinus o de Citrus (34) contradeciría la validez general de la regla biogenética.

Esta breve revisión histórica del problema de la biosíntesis de los isoprenoides y, en particular de la biosíntesis de monoterpenos, señala una serie de

lagunas que dejan una multitud de problemas básicos por aclarar. Por ejemplo, un aspecto poco conocido de estas vías metabólicas es su regulación (85, 137). No hay ejemplos claros de regulación en la ruta MVA a FPP, excepto la inhibición de la quinasa mevalónica por FPP (19) y un efecto similar del colesterol sobre la IPP isomerasa (138). Otro posible mecanismo de regulación podría ser mediado por fosfolípidos, como sugería un efecto activante de esta ruta por estos compuestos, descrito por George-Nascimento (79). Este efecto, que fue el punto de partida de esta Tesis, se describe a continuación.

7. Efecto de fosfolípidos en la transformación de ácido mevalónico en prenoles.

En 1969, George-Nascimento describió en este laboratorio (79) un efecto aparentemente estimulante de fosfolípidos sobre la transformación de MVA en prenoles. El efecto exhibía la especificidad característica de este tipo de estimulación, ya que la fosfatidiletanolamina era la única especie activa si se ensayaban fosfolípidos de procedencia animal (cerebro). Sin embargo, la fosfatidilcolina o la fosfatidilserina de fuentes vegetales (soya, P. radiata) podían reemplazar a la fosfatidiletanolamina (79).

Este efecto era peculiar en dos sentidos. Primero, parecía haber un alto grado de especificidad por la porción hidrofóbica de la molécula del fosfolípido; la

eficiencia de la fosfatidiletanolamina como estimulante dependía de la fuente de la cual se extraía. Así la dipalmitoil-fosfatidiletanolamina sintética y la fosfatidiletanolamina de origen bacteriano no tenía ningún efecto (80), pero la especie derivada de cerebro de vacuno era muy activa. El efecto estimulante parecía ser una función de la composición de ácidos grasos del fosfolípido. No se logró establecer una correlación definida entre el tamaño y la insaturación de los acilos del fosfolípido y el efecto biológico *(80).

La segunda peculiaridad de este efecto era el hecho que las enzimas involucradas son solubles, de lo cual hay muy pocos ejemplos en la literatura (135, 136). El problema general de la estimulación de actividades enzimáticas por fosfolípidos aun no se ha resuelto desde un punto de vista mecanístico (143, 144). Una de las dificultades principales en el estudio de este efecto lo constituye precisamente el que las enzimas descritas en la literatura en las cuales se puede observar esta estimulación existen asociadas a membranas, lo que dificulta bastante la labor de purificación. El carácter hidrofóbico de la mayoría de estas proteínas hace imposible mantenerlas en solución al estado nativo en ausencia de detergentes o de fosfolípidos; estas adiciones tienden a oscurecer la interpretación de los resultados. De aquí

que la posibilidad de contar con una enzima que pueda mantenerse en solución sin la adición de compuestos anfifílicos proporcionaba un sistema apropiado para el estudio de este problema.

Por otro lado, este estudio podría agregar más información en torno a los mecanismos de regulación de las primeras etapas de la transformación de ácido mevalónico en prenoles. Es probable que estos mecanismos sean más complejos en vegetales que en animales, ya que en plantas los mismos intermediarios de la cadena biosintética de isoprenoides pueden terminar en una variedad mucho mayor de productos finales.

El objetivo inicial de esta Tesis fue localizar el punto de la secuencia MVA \rightarrow prenoles afectado por fosfolípidos, aclarar el mecanismo de este efecto, identificar las especies lipídicas activantes y relacionar estructura y acción en ellas. El logro de los dos primeros objetivos implica una labor de purificación de enzimas, y por ende, implica resolver una serie de problemas derivados de las características de los extractos enzimáticos preparados de plantas superiores. Estos problemas se esbozan a continuación.

8. Algunas propiedades de los extractos enzimáticos de vegetales.

Los tejidos vegetales contienen numerosos componentes no proteicos, normalmente adscritos a las vacuolas y a otros organelos subcelulares, que se mezclan con las proteínas del citosol durante la preparación del extracto (111, 117). Estos componentes pueden interactuar con las proteínas y modificar profundamente sus propiedades (111), lo que se refleja tanto en su actividad biológica como en su estabilidad o en sus patrones de separación. De aquí que la existencia de estos compuestos constituye uno de los problemas más serios en la purificación de enzimas vegetales.

Por lo tanto uno de los criterios fundamentales en la evaluación de la ruta de purificación de prenilsintetas que se desarrolló en esta Tesis es la eliminación de estos componentes, fuera de obtener purificación sobre la base usual de librar a la enzima de interés de otras proteínas. Aunque no conocemos con seguridad la composición de los extractos crudos, estos presumiblemente contienen clorofila (en el caso de *P. radiata*), flavonoides, que absorben fuertemente en el UV ($\lambda_{\text{máx}} = 310 \text{ nm}$ (139)), carotenos y polifenoles. Algunos de estos compuestos son responsables de la acidez del extracto, de su absorción en el UV ($A_{280} = 28$, proteína = 1 mg/ml) y de la interferencia

con reactivos capaces de ligarse a tioles (29).

Estos componentes aparentemente no influyen de un modo determinante en la estabilidad de las enzimas que proponemos estudiar (ver Resultados), pero impiden utilizar los métodos corrientes de determinación de proteínas; de aquí que en este trabajo se usara para ello el inseguro y poco sensible método turbidimétrico (112) en las primeras etapas de la purificación. Análogamente es imposible utilizar ninguna técnica basada en la absorción de luz en el UV.

No es sorprendente entonces que se haya dedicado una buena cantidad de trabajo a resolver el problema de separar las proteínas de estos colorantes (111, 117, 140). Los métodos descritos en la literatura son poco específicos y bastante enérgicos, como tratamientos con PVP, Dowex, Polyclar AT, etc., (111). De hecho, ninguno de ellos fue de utilidad en nuestro sistema (113). De aquí que un punto fundamental fuera encontrar un método para librar a la preparación de los colorantes.

En resumen, el objetivo de esta Tesis fue inicialmente al aclarar el efecto de fosfolípidos sobre la enzima de la biosíntesis de isoprenoides, especialmente descartando artificios no enzimáticos debidos a partición de fases. Como consecuencia de este trabajo, se abordó el problema de purificar la o las preniltransferasa separándolas tanto de otras proteínas como de los compuestos de

menor peso molecular del extracto, con el objeto de estudiar en ellas el efecto de fosfolípidos y su estereoselectividad en la biosíntesis de dobles enlaces.

CAPITULO I

MATERIALES Y METODOS

M E T O D O S

1. Obtención y conservación de material biológico.

1.1. Obtención de plántulas de Pinus radiata.

Treinta gramos de semillas selectas obtenidas en el Instituto Forestal, por gentileza del Dr. Norman Smith, se sembraron en bandejas sobre arena de cuarzo humedecida. Previamente la arena se lavó con agua y luego se hirvió durante 2 horas con una solución de ácido sulfúrico al 1%. El pH de la arena ácida así obtenida se ajustó a 4 lavándola con agua de la llave. Luego de la siembra, las semillas se cubrieron con una capa de arena de 1 cm de espesor, y se dejaron a temperatura ambiente bajo una ampolleta de 100 W a 40 cms de distancia. El suelo se mantuvo continuamente húmedo. La germinación se produjo al cabo de una semana y el desarrollo óptimo (10 cm de altura, 170 mg de peso) se alcanzó en unos 25 días. En estas condiciones no se necesitó agregar sales inorgánicas para mejorar el desarrollo de las plántulas y no hubo crecimiento de hongos sobre las plantas.

1.2. Preparación y conservación de extractos acelulares de plántulas de Pinus radiata.

Las plántulas se lavaron con agua destilada luego de cortar la raíz, y se molieron en un mortero previamente enfriado a -20° con un volumen de Tris.HCl 0,1 M pH 7,4 equivalente a 2 a 2,5 veces el peso de las plántulas. La congelación adecuada de la muestra se aseguró agregando nieve carbónica al mortero durante el proceso de la molienda. Esto no afectó la actividad enzimática de la preparación. El homogenizado se centrifugó a $100000 \times g \times 90$ minutos, luego de eliminar las partículas grandes por filtración. Tanto la centrifugación como el resto de las manipulaciones se efectuaron entre 0 y 4° , salvo indicación contraria. El extracto así obtenido contenía entre 2-3 mg de proteína por ml, era de color verde y el pH fue de 6,5. Esta preparación se usó inmediatamente, o se almacenó hasta una semana como una pella proveniente de una precipitación de 80% de saturación con sulfato de amonio. Para esto, se agregó al extracto sulfato de amonio sólido molido durante 20 minutos hasta alcanzar una concentración equivalente a 80% de saturación, y luego se dejó estabilizar durante 20 minutos más. La suspensión se agitó lentamente con una barra magnética. Finalmente las proteínas se decantaron centrifugando a $15000 \times g \times 10$ min. La pella así obtenida se guardó como tal a 4° . El rendimiento enzimático

varió entre 50 y 80%, medido por la incorporación de radiactividad de $2-^{14}\text{C}$ -MVA en prenoles. Alternativamente a este procedimiento de precipitación, el extracto se liofilizó y se guardó a -20° en una atmósfera seca, por un período no mayor a un mes. El rendimiento de este proceso varió entre 30 y 50%.

1.3. Obtención de frutos de Citrus sinensis.

Los frutos se obtuvieron de un conjunto seleccionado de árboles, en los "Huertos de Betania" (Mallarauco), por gentileza de Don Gonzalo Pérez, se trasladaron al laboratorio y se procesaron de inmediato o se guardaron a 4° por períodos no superiores a una semana. La colección de los frutos se llevó a cabo entre junio y septiembre.

1.4. Preparación de polvo cetónico de flavedo de Citrus sinensis.

El sistema enzimático de flavedo de Citrus sinensis se almacenó como un polvo cetónico. Los frutos se limpiaron primero con una escobilla bajo el agua de la llave y luego se lavaron con agua destilada. Se sacó el flavedo (exocarpio) sin alvedo (mesocarpio), y se cortó en trozos pequeños para asegurar una homogenización adecuada; esta se llevó a cabo durante 5 minutos, interrumpiéndola cada 0,5 minutos, en un homogenizador Waring Blendor con acetona preenfriada a -20° . La razón volumen de acetona / peso de flavedo fue de 1. El homogenizado se filtró en papel

Whatman 1 y la torta se mantuvo continuamente fría mediante la adición de pequeños volúmenes de acetona a -20° . Luego la torta se lavó con un volumen de éter preenfriado a -20° , similar al volumen de acetona usado en la homogeneización. El éter se removió posteriormente sometiendo la torta en una campana de vidrio a un vacío de 0,1 torr, y atrapando el solvente en un condensador a -25° . El tratamiento con éter no aumenta la actividad enzimática del extracto, pero permite extraer una gran cantidad de los colorantes originales del tejido que son insolubles en acetona. Un Kg de naranjas rinde aproximadamente 10 g de polvo, y el rendimiento enzimático referido a la actividad FPP sintética del extracto acuoso de flavedo es de 50%.

Todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de terpenos, desde MVA hasta farnesil pirofosfato, se conservan en el proceso. La preparación del polvo se lleva a cabo usando partidas de 40 a 50 Kg de naranjas. Estas preparaciones tienen actividades enzimáticas diferentes debido a la variación estacional. De aquí que cada preparación se ensaya independientemente, y luego las preparaciones de actividad similar se juntan y se guardan a 4° en seco.

2. Preparación de los extractos enzimáticos.

La preparación de los extractos de plántulas de *Pinus radiata* se describe en la sección 3.1.

2.1. Preparación del extracto de flavedo de *Citrus sinensis*.

Las naranjas se pelaron luego de lavarse cuidadosamente con agua destilada y una escobilla. El flavedo se trozó con tijeras y se homogenizó con un volumen de tampón Tris.HCl 0,1 M pH 7.4 o fosfato de potasio 0,1 M pH 7.4 igual a 1,5 veces el peso del flavedo; la homogenización se llevó a cabo por 5 minutos, interrumpiéndola cada 30 segundos, a 4° en un homogenizador Waring Blendor o en un Omni Mixer. El homogenizado así obtenido se pasó por gasa y se centrifugó por 20 minutos a 30000xg. El extracto tuvo un color rojizo y un pH de 6,6. La concentración de proteínas fue de 2 a 3 mg/ml.

2.2. Preparación del extracto de polvo cetónico de flavedo de *Citrus sinensis*.

El polvo se homogenizó por 5 minutos con un volumen de tampón igual a 15 veces el peso usado, en las mismas condiciones anteriores. Cuando el extracto se preparó sin intención de purificar enzimas el tampón usado fue fosfato de potasio 0,1 M pH 7.4; en caso contrario, contenía además glicerol al 10% (v/v) y DTT 0,1 mM; esta diferencia no

afectó la actividad específica de las enzimas estudiadas. El procedimiento restante fue idéntico al descrito en 2.1. El extracto resultante fue de color amarillo verdoso y quedó a pH 6,6; la concentración de proteína fue de 0,7 mg/ml. La prenilsintetasa no es extraída del polvo cetónico por otros tampones, como succinato 0,1 M pH 6, o Tris.HCl 0,1 M pH 7,4; este efecto parece relativamente específico, ya que la concentración de proteína de los extractos obtenidos usando estos tampones es la misma.

3. Determinación de actividades enzimáticas.

3.1. Determinación de actividades prenilsintetásicas.

El método se basa en que el sustrato $1-^{14}\text{C}$ -IPP es estable en ácido 1 N, a temperatura ambiente (84), mientras que los productos de la reacción, $1-^{14}\text{C}$ -GPP o $1-^{14}\text{C}$ -FPP, no lo son debido a su carácter alílico (89). 100000 cpm de $1-^{14}\text{C}$ -IPP por ml (17,5 C/mol) se incubaron en tubos cónicos con tapa esmerilada, con la cantidad de enzima que se indica en cada experimento, en MgCl_2 10 mM, mercaptoetanol 10 mM y fosfato de potasio 0,1 M pH 7,4. Cuando se ensayaron preparaciones enzimáticas contaminadas con fosfatasas, por ejemplo el extracto, se incluyó también ATP a una concentración final de 10 mM. Esta adición no afecta la actividad de la prenilsintetasa, pero disminuye significativamente la hidrólisis de sustrato o producto catalizada por las fosfatasas endógenas. El medio de

reacción contuvo además DMAPP, 21 μM final, al determinar la actividad GPP sintetasa o GPP 8,5 μM final para determinar la actividad FPP sintetasa. Estas concentraciones son saturantes. La hidrólisis de los productos alílicos catalizada por metal (86) es despreciable en estas condiciones. El tiempo del ensayo fue de 15 minutos, salvo indicación contraria.

El extracto contiene actividades fosfatásicas que hidrolizan los prenilpirofosfatos, sustrato y productos, a los alcoholes durante la incubación (87). La actividad de estas enzimas es mucho mayor que la de cualquiera de las enzimas de la ruta biosintética cuando se ensaya en condiciones óptimas (88). Por lo tanto, luego de detener la reacción enfriando a 0° , los alcoholes producidos por la actividad fosfatásica se extrajeron inmediatamente en 1,5 ml de éter de petróleo ($40-60^\circ$). Esta fracción se denomina de "lípidos libres", y, dependiendo del sistema biológico y de las condiciones del ensayo, contiene alcoholes, aldehídos e hidrocarburos (70, 71, 72). Esta extracción de lípidos libres fue innecesaria en las etapas más avanzadas de la purificación, ya que éstas no contenían fosfatásas. Luego se agregó HCl a la fase acuosa hasta alcanzar una concentración final calculada de 1,2 M y se incubó durante 10 minutos a 37° . En estas condiciones los productos alílicos formados en el curso de la reacción enzimática

son completamente hidrolizados, pero no el sustrato marcado IPP (89). Los alcoholes reordenados resultantes se extrajeron como antes y una alícuota se contó en solución de centelleo. Esta fracción se denomina "alílica", ya que proviene de los pirofosfatos alílicos del medio de reacción. Las actividades GPP y FPP sintetásicas se expresan como la cantidad de producto alílico formado en nanomoles por 15 minutos. Una unidad de actividad es por lo tanto 1 nmol de GPP o FPP formado en 15 minutos, por ml de medio de ensayo.

Durante la hidrólisis catalizada por ácido se forma un carbocatión primario (89), que se reordena inmediatamente a un carbocatión terciario, de modo que los alcoholes formados en la fracción alílica son reordenados: dimetilvinilcarbinol en el caso del DMAPP, α -terpineol y linalool con NPP y GPP respectivamente, y 6-trans-nerolidol para 2-trans o 2-cis, 6-trans farnesil pirofosfato. Ya que los dos isómeros cis y trans farnesil pirofosfato dan el mismo producto reordenado, la caracterización de los productos formados requiere de un método alternativo de determinación de la actividad, la hidrólisis enzimática. En este ensayo, denominado de "prenol fosfatos", la incubación se detiene enfriando, se extraen los lípidos libres si es necesario, y las enzimas se desnaturalizan calentando a 100° durante 3 minutos. Se enfría y se agrega tampón Tris.HCl 1 M

pH 8,3, hasta una concentración final de 0,5 M. Luego se adicionan $5,2 \times 10^{-2}$ unidades de apirasa de papa y 0,15 unidades de fosfatasa alcalina de E. coli, y se incuba a 37° durante dos o más horas; los alcoholes primarios así formados se extraen con éter de petróleo como antes. La fracción así obtenida se denomina de prenolfosfatos.

3.2. Determinación de la actividad isopentenil pirofosfato isomerásica.

Esta determinación se realiza del mismo modo que la de la prenilsintetasa pero omitiendo el sustrato alílico GPP o DMAPP. El método se basa en la estabilidad del sustrato IPP en un medio ácido, en contraposición con la labilidad del producto, el DMAPP (84). La actividad enzimática se expresa del mismo modo que para la prenilsintetasa .

3.3. Determinación de las actividades fosfatásicas.

El ensayo de la prenilsintetasa durante la purificación se llevó a cabo en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, que es un medio que deprime drásticamente la actividad de las fosfatasas originalmente presentes en el extracto (88). Por lo tanto, la determinación de la radiactividad de la fracción lípidos libres del ensayo de prenilsintetasa, no es un buen método para la cuantificación de estas actividades fosfatásicas. De aquí que era indispensable contar

con un ensayo rápido y sensible para esta determinación. Esto se consiguió aprovechando una observación de Chayet (118), de que el FPP parecía ser mejor sustrato que el GPP, y éste que el IPP, tal como lo indicaba la radiactividad de la fracción lípidos libres de las determinaciones de IPP isomerasa, y GPP y FPP sintetasa. Tal como se muestra en la Tabla 1, el FPP es hidrolizado mucho más rápidamente que los otros prenilepifosfatos. Por lo tanto, la mayor contribución a la radiactividad de la fracción lípidos libres en los ensayos anteriores está dada por el farnesol; como la cantidad de FPP formada en los ensayos de FPP sintetasa es mayor que la formada en los de GPP sintetasa, y éste mayor que la generada en el ensayo de isomerasa (cuando ambas enzimas están juntas, por ejemplo, en el extracto), obviamente las actividades fosfatásicas aparentes serán cambiantes en el mismo orden.

De aquí que para la determinación de esta actividad se usara 1-³H-2-trans-6-trans-FPP (34,1 C/mol). La fracción enzimática se incubó con este sustrato durante 15 minutos, usando una concentración de proteína de 1/10 de la utilizada en el ensayo de sintetasa. El resto de las condiciones fueron las mismas, excepto que el ATP se omitió, ya que este compuesto es un inhibidor. La concentración de sustrato fue de 5,3 μ M, y la actividad se determinó contando una alícuota de los lípidos libres.



Tabla 1

Efecto de la composición del medio de reacción sobre las actividades fosfatásicas del extracto de polvo cetónico de flavedo de Citrus sinensis.

Sustrato	Actividad específica en los tampones	
	(nmoles/min/mg)	
	Succinato 0,1 M, pH 6	Fosfato 0,1 M, pH 7,4
Isopentenilpirofosfato	0,29	0,038
Geranilpirofosfato	3,37	1,54
Farnesil pirofosfato	16,33	0,98

$1-^{14}\text{C}$ -IPP, o $1-^3\text{H}$ -GPP (1 C/mol), o $1-^3\text{H}$ -FPP se incubaron en las condiciones descritas en el texto con 6,5 μg de proteína de un extracto de polvo cetónico, en los tampones indicados más arriba. La concentración de los sustratos fue 11,6, 12,2, y 13,5 μM para IPP, GPP y FPP, respectivamente.

3.4 Determinación de las actividades ciclásicas.

En este ensayo se utilizó una preparación enzimática de flavedo de Citrus limonum, que presenta una actividad biosintética de hidrocarburos mucho mayor que cualquier otra descrita (70). La enzima se incubó con MnCl_2 10 mM, mercaptoetanol 10 mM, $144 \mu\text{M}$ $1\text{-}^3\text{H-NPP}$ (0,9 C/mol) por una hora a 37° , en tampón Tris.HCl 0,1 M pH 7,8. La fracción lípidos libres, de un volumen de 2 ml, se agitó durante 1 minuto con aproximadamente 0,5 g de ácido silícico, que retiene más del 99% de los alcoholes producidos en la incubación, pero no a los hidrocarburos (70). Luego la suspensión se centrifugó y la radiactividad del sobrenadante, correspondiente a los hidrocarburos, se determinó contando una alícuota adecuada. Los alcoholes adsorbidos en el ácido silícico se pueden eluir con éter etílico (70).

3.5. Determinación de la transformación de ácido mevalónico en prenoles.

En estos experimentos, la cantidad de enzima y el tampón que se indican en cada caso se incubaron con 100000 a 250000cpm de $2\text{-}^{14}\text{C-RS-MVA}$ (17,5 C/mol), ATP 10 mM, MgCl_2 10 mM, MnCl_2 10 mM. El tiempo de incubación varió entre 30 y 120 minutos, a 37° . El resto del procedimiento fue idéntico al usado en la determinación de la actividad prenilsintetásica, (sección 3.1.).

3.6. Determinación de las actividades quinasa mevalónica y quinasa fosfomevalónica.

Se usó 2-¹⁴C-RS-MVA como sustrato para la determinación de la actividad de la quinasa mevalónica y 2-¹⁴C-RS-PMVA sintetizado como se describe en la sección 8.2., como sustrato para la determinación de la actividad de la quinasa 5-fosfomevalónica. En estos ensayos, las cantidades de enzima y sustrato que se indican en cada experimento se incubaron en ATP 10 mM, MgCl₂ y MnCl₂ 10 mM, mercaptoetanol 20 mM y Tris.HCl 0,1 M pH 7,4, a 37°, por tiempos variables entre 5 y 20 minutos, según se indica en cada experimento. La reacción se detuvo calentando a 100° por 5 minutos. Luego del calentamiento, se centrifugó durante 2 minutos a 3000 rpm y una alícuota del sobrenadante se aplicó en línea en papel Whatman Nº1.

El análisis de productos se llevó a cabo mediante una cromatografía ascendente usando n-butanol:ácido fórmico:agua=77:10:13, o isopropanol:amoníaco:agua=3:1:1. El primer solvente resuelve muy bien entre MVA y PMVA, y el segundo, entre PMVA y PPMVA. Por lo tanto, el primer sistema se usó para la determinación de la actividad de la quinasa mevalónica, y el segundo para la de la fosfomevalónica. El procedimiento se describe en la sección 4.2.

3.7. Determinación de la actividad de la fosfolipasa C.

Esta actividad se ensayó por dos métodos: a) siguiendo el cambio de turbidez a 550 nm de una preparación cruda de lipoproteínas de yema de huevo (90), y b) determinando la cantidad de fósforo ácido soluble liberado por la enzima (91). En este método, que se usó para cuantificar exactamente la actividad enzimática, el sustrato fue fosfatidilcolina pura de soya, preparada en el Laboratorio, según la técnica descrita en la sección 6.1.

La enzima, una preparación liofilizada de fosfolipasa C de Clostridium Welchii, se disolvió en agua o en Tris.HCl 10 mM pH 7,4, y se guardó a -20°. En estas condiciones la actividad se mantuvo en un 50% luego de 2 meses.

4. Técnicas cromatográficas.

4.1. Cromatografías gas-líquido.

En este trabajo se utilizaron 2 tipos de fases líquidas en estas cromatografías: silicona SE-30 y etilén glicoladipato (EGA). La fase sólida fue Chromosorb W, lavado con ácido, tratado con hexametildisilazano, de malla 60/80. Las fases líquidas se usaron en una relación p/p de 2% (EGA) y 3% (SE-30); el relleno se llevó a cabo disolviendo la fase líquida en cloroformo (SE-30) o en acetona (EGA), y suspendiendo el soporte sólido en el mismo solvente. Este se evaporó a baja presión (0,1 torr) por

agitación continua en un evaporador rotatorio. Se usaron columnas de acero o de cobre de 0,64 cm de diámetro externo y de 3 m de largo. Las columnas se lavaron con las siguiente secuencia de solvente antes del llenado: agua, ácido nítrico (en el caso de la columna de acero), agua, amoníaco concentrado, agua y se secó perfectamente después de un último lavado con acetona.

Las cromatografías se llevaron a cabo en un instrumento Varian 1800; la temperatura del inyector fue de 250° y la del detector de conductividad térmica, de 300°. El gas portador fue He, cuyo flujo se ajustó entre 40 y 70 ml/min., dependiendo de la separación particular. La radiactividad del eluido se registró continuamente con un contador Geiger de fase gaseosa, usando butano comercial como gas de apagamiento. El volumen del detector Geiger fue de 80 ml, de modo que el ajuste de la velocidad de respuesta del contador a una constante de tiempo de 5 segundos aseguró una buena relación señal-ruido, aún con bajos niveles de radiactividad. La temperatura de este detector fue de 250° y el voltaje de trabajo se determinó rutinariamente como el punto medio del "plateau". Para esto se utilizó un estándar externo de ^{60}Co . La contaminación del equipo se eliminó reemplazando la columna cromatográfica por una vacía e inyectando varios ml de acetona y agua, en este orden. Cuando este procedimiento no dio resultados el

contador se desarmó y se lavó exhaustivamente con etanol. En estas condiciones se midieron con seguridad masas de portadores de unos 200 ug y radiactividades correspondientes a menos de 500 cpm en cada compuesto.

Cuando se hicieron colecciones integrales del eluido, este se hizo pasar a través de un tubo en U sumergido en una mezcla acetona-CO₂ sólido, a -75°. La recuperación de radiactividad en este proceso varió entre 80 y 100%.

4.2. Cromatografías en papel.

En estas cromatografías se usó papel Whatman N° 1. La muestra se aplicó en forma de línea, se secó y el papel se dejó estabilizar por una hora en la atmósfera de la cámara de cromatografía previamente saturada. Luego se sumergió en la solución cromatográfica y se dejó correr toda la noche a 4°. Finalmente el papel se secó a temperatura ambiente, se cortó transversalmente en tiras de 1 cm, que se cortaron a su vez por la mitad y se colocaron en frascos de centelleo (sección 12). Alternativamente, se tiñeron con el reactivo descrito en cada caso .

4.3. Cromatografías en placa.

En estos estudios la sílica gel se suspendió en un volumen equivalente a 1,5 veces su peso en agua, o de soluciones de nitrato de plata al 3 o 12%. La suspensión

se extendió inmediatamente sobre placas de vidrio de 20x20 cm o de 20x5 cm, previamente desgrasadas con acetona, usando un aplicador Desaga; las placas recubiertas se dejaron secar un rato a temperatura ambiente, o toda la noche si eran placas argentadas, y se activaron una hora a 110°.

La muestra se aplicó en línea o en un punto, se dejó secar, y se desarrolló en la cámara cromatográfica a temperatura ambiente.

4.4. Cromatografías en Sephadex.

A continuación se describe la preparación de las columnas de Sephadex G-100 y Sephadex G-150. La matriz, malla 40-120, se preparó hinchando el producto en agua a 96° según las instrucciones del fabricante (92). El gel, convenientemente desaireado por este procedimiento, se puso en una columna de vidrio mediante una bagueta larga. Después de llenar la columna, se estabilizó 24 horas, se agregó más gel y se estabilizó mecánicamente pasando agua bajo una presión hidrostática similar a la utilizada durante la cromatografía. Luego del empacamiento completo, la columna se cambió al tampón de elución haciendo pasar un volumen de tampón igual a 4-6 veces el volumen del lecho. Las columnas se utilizaron reiteradamente sin desarmarlas, y se guardaron a 4° en zazida durante períodos largos, sin cambios en sus propiedades resolutivas. Las cromatografías se llevaron a cabo como se detalla en las

Figuras pertinentes presentadas en Resultados. Los datos se presentan como una función del volumen del lecho y no del volumen real de elución o del número de fracción colectado, ya que la primera forma de expresar estos resultados es más adecuada para la discusión de estos experimentos (92).

4.5. Preparación de columnas de intercambio.

4.5.1. Preparación de columnas de DEAE Sephadex, DEAE celulosa y Dowex 1.

Los intercambiadores DEAE Sephadex, DEAE Celulosa y Dowex-1 se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante, (93, 94, 95) mediante lavados cíclicos con ácido y base, y luego se estabilizaron con el tampón de elución. Para esto el intercambiador se dejó 24 horas con un exceso de 10 veces en volumen del tampón de elución, de una concentración de 1 M. Luego se montó en la columna, y el exceso de tampón concentrado se sacó pasando un volumen del tampón diluido de elución, igual a 6-10 veces el volumen del lecho. Alternativamente, la primera etapa de estabilización con el tampón concentrado se llevó a cabo directamente en la columna, haciendo pasar un volumen de tampón equivalente a unos 5 volúmenes de columna. Las cromatografías se llevaron a cabo como se describe en los experimentos presentados en Resultados.

4.5.2. Preparación de columnas de DEAE celulosa para la purificación de fosfolípidos.

La preparación de la columna se llevó a cabo de acuerdo a Rouser (96). Una cantidad adecuada de DEAE celulosa, lavada con ciclos de ácido y base según las instrucciones del fabricante (94), se llevó a la forma acetato por estabilización contra 5 volúmenes de ácido glacial; el ácido se eliminó lavando exhaustivamente con metanol en un filtro de vidrio de porosidad media; este se eliminó a su vez dejando el intercambiador 24 horas al vacío sobre KOH; 15 grs de la preparación seca se resuspendieron en ácido acético y se dejaron impregnar toda la noche. Luego el intercambiador se colocó en una columna de 2,5 cms de diámetro interno, para dar una altura de 20 cms.

4.6. Cromatografía de adsorción en ácido silícico.

Una cantidad adecuada de ácido silícico (malla 100) se puso en un vaso y se lavó primero con tres volúmenes de cloroformo y luego con 4 de metanol, y se secó 24 horas a 110°. El producto seco se suspendió en cloroformo y se montó en una columna de vidrio de 2 cm. de diámetro hasta una altura de 25 cms. El adsorbente se retuvo en la columna con un tapón de lana de vidrio. Finalmente se lavó con un volumen de cloroformo desaireado que contenía BHT al 0,01%, equivalente a 3 volúmenes del

lecho, inmediatamente antes de usar.

5. Preparación de fracciones crudas de fosfolípidos.

5.1. Método modificado de Clark.

Este método es una modificación de la técnica descrita por Clark (97). Se basa en que los fosfolípidos, a diferencia del colesterol y del resto de los lípidos neutros, son bastante solubles en éter etílico pero poco solubles en acetona.

Un cerebro de vacuno comprado en el matadero o de porcino (gentileza de don José Margozzini) se conservó en hielo y se cortó en trozos de aproximadamente 50 gr, después de no más de 2 horas de muerto el animal. Un trozo se usó en la preparación y el resto se guardó congelado a -20° ; el almacenamiento en estas condiciones no afecta el estado ni la composición fosfolipídica, por un período de algunos meses (98). El material se redujo a trozos pequeños con una tijera y se molió por un minuto junto con 200 ml de acetona en un homogenizador Waring Blendor. El homogenizado se filtró bajo presión negativa en un vidrio poroso. La torta se sometió al mismo procedimiento una vez más. La torta resultante se extrajo suspendiéndola en 200 ml de éter libre de peróxidos durante 5 minutos con agitación ocasional. Se filtró como antes bajo un flujo continuo de N_2 , y la extracción etérea se

volvió a repetir del mismo modo. Los filtrados, colectados en frío y bajo N_2 , se combinaron y se concentraron en un evaporador rotatorio a menos de 20 ml; esta solución se agregó sobre 200 ml de acetona fría. El precipitado se dejó decantar una hora a 4° , se filtró por papel Whatman N° 2 bajo flujo de N_2 y el producto se guardó a -20° . Todos los solventes usados en esta preparación y en la siguiente se desairearon previamente con N_2 y todos contuvieron BHT al 0,01% (p/v). Las extracciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

5.2. Método de Folch.

La técnica de Folch (99) se basa en la utilización de una mezcla cloroformo-metanol (C/M) 2:1 (v/v), que es un excelente solvente de lípidos. El procedimiento se llevó a cabo como sigue: 50 gr de cerebro se homogenizaron con 1 lt de C/M 2:1 por 1 minuto en un Waring Blendor. El homogenizado se filtró y la torta se volvió a extraer con 500 ml del mismo solvente. Al filtrado combinado se agregaron 150 ml de metanol:agua 1:1 (p/v), se agitó y se eliminó la fase superior acuosa. La fase inferior se concentró a sequedad mediante una bomba de alto vacío. El liofilizado se disolvió en aproximadamente 5 ml de cloroformo y la solución se vertió sobre 50 ml de acetona. El precipitado se colectó y guardó como se describe en la sección

5.1.

6. Purificación de fosfolípidos.

Para purificar las fracciones crudas de fosfolípidos obtenidas por cualquiera de los procedimientos anteriores se utilizaron dos técnicas de cromatografía en columna, y cromatografía en placa gruesa. La cromatografía en DEAE celulosa fue menos usada debido a los grandes volúmenes de solventes que es necesario utilizar. Todos los solventes usados contuvieron BHT al 0,01% y se desairearon previamente con N_2 .

6.1. Purificación de fosfolípidos por cromatografía en ácido silícico.

A una columna de 2,5 por 25 cm preparada como se describe en la sección 4.6., se aplicaron 300 mg de fosfolípidos crudos, disueltos en unos 20 ml de cloroformo, y se eluyó con 150 ml de este mismo solvente; este volumen se colectó en una sola fracción, que contiene colesterol y lípidos neutros. Se continuó eluyendo con una mezcla cloroformo-metanol 4:1 (v/v) de 150 ml, que se colectó en tres fracciones de 50 ml. Luego se eluyó del mismo modo con cloroformo-metanol 3:1 (v/v) y finalmente con cloroformo-metanol 2:1. La cromatografía se realizó a una sobrepresión de N_2 de 0,1 a 0,3 atm., para asegurar un flujo uniforme de 2-3 ml/min. Las fracciones se recogieron a 0°, bajo N_2 .

Los primeros 50 ml de cloroformo-metanol 4:1 contuvieron cantidades muy pequeñas de fosfolípido, pero en la segunda fracción colectada con este solvente eluyó aproximadamente el 60% de la fosfatidiletanolamina inicial, contaminada con pequeñas cantidades de fosfatidilserina, como se pudo demostrar por cromatografía en placa fina (sección 6.4.). La fracción 3:1 contuvo ambos fosfolípidos en aproximadamente la misma cantidad. La fosfatidilcolina fue eluida de la columna con cloroformo-metanol 2:1, contaminada con cantidades pequeñas de otros fosfolípidos, cuya naturaleza no fue adecuadamente demostrada; el contaminante más importante pareció ser esfingomielina.

6.2. Purificación de fosfolípidos por cromatografía en DEAE-celulosa.

Esta técnica se realizó de acuerdo a Rouser (96). La muestra (100-200 mgs) se aplicó disuelta en cloroformo a una columna de DEAE celulosa preparada como se describe en la sección 4.5.2: se lavó con un volumen de cloroformo equivalente a 9 veces el total de la columna para eliminar los lípidos neutros. Luego se eluyó con un volumen similar de cloroformo metanol 9:1 (v/v) con lo que sale la fosfatidilcolina, contaminada con algunos lípidos complejos. La fosfatidiletanolamina es eluida del mismo modo usando cloroformo-metanol 7:3 (v/v). La columna se continua lavando con solventes de polaridad creciente:

cloroformo-metanol 1:1, cloroformo-ácido acético 3:1, ácido acético-metanol. Los fosfolípidos ácidos, como la fosfatidilserina, no son eluidos hasta el lavado con ácido acético. En todas las eluciones se colectaron volúmenes de 350 ml, en frío y bajo N_2 . Las fracciones se concentraron hasta un volumen de 20 ml y se analizaron mediante cromatografías en placa delgada y tinción con reactivos específicos (sección 6.4.).

6.3. Purificación de fosfolípidos por cromatografía en placa gruesa.

Cuarenta mg de fosfolípidos crudos o semipurificados por alguno de los procedimientos anteriores en columna, se aplicaron en línea a placas de 20x20 cm de sílica gel G, de 1,5 mm de espesor, preparada como se describe en la sección 4.3. La banda que contenía los fosfolípidos de interés se identificó por su posición relativa luego de revelar con un pulverizado de agua. La fracción se raspó de la placa, el agua se eliminó al vacío (0,01 torr), y los fosfolípidos se extrajeron 3 veces con volúmenes de 5 ml de cloroformo-metanol 2:1 (v/v). Las fracciones se juntaron y se concentraron a 3 ml. Luego se analizaron por cromatografía en placa delgada y tinción con reactivos específicos (sección 6.4.). El solvente usado en este proceso de purificación fue cloroformo:metanol:agua=65:25:4.

6.4. Análisis de fosfolípidos.

Los lípidos se identificaron por cocromatografía con estándares en placas delgadas de sílica gel y por tinción con reactivos específicos. Las placas, de 0,25 mm de espesor, se prepararon como se describe en la sección 4.3.; la solución de fosfolípido se aplicó en un punto y la cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente. Los solventes usados fueron cloroformo:metanol:agua=65:25:4 y cloroformo:metanol:ácido acético:agua=50:25:8:4.

Los valores de R_f variaron en un 10% y coincidieron con los descritos en la literatura (100,101). Los fosfolípidos con grupos amino se revelaron con un pulverizado de ninhidrina (102), y los que contienen un grupo colina se revelaron del mismo modo con el reactivo de Draggendorf (103). Como reactivos de tinción general de lípidos se usaron Rodamina 6 B (102) o I_2 , aplicado pulverizando sobre la placa una solución de I_2 en metanol al 10%.

7. Síntesis de prenil pirofosfatos.

A continuación se describe la síntesis de isopentenil pirofosfato y farnesil pirofosfato; tanto el DMAPP como el GPP usados en este trabajo se sintetizaron del mismo modo por L. Chayet. Se utilizó la técnica de Cramer (104), que usa dioxano difosfato como reactivo fosforilante y los prenoles como sustratos.

7.1. Purificación de los alcoholes.

7.1.1. Purificación de isopentenol.

Este alcohol (3-metil,3-butenol) se usó directamente en la fosforilación ya que el análisis por cromatografía de gases (columna de EGA, 30°, el resto de las condiciones descritas en la sección 4.1.), no mostró contaminaciones, y el isopentenol eluyó de la columna como un pico simétrico, cuya área correspondió a la esperada teóricamente si toda la masa inyectada fuera isopentenol. En las condiciones de la cromatografía, el método habría detectado un nivel de contaminación tan bajo como el 1%.

7.1.2. Purificación de 2-trans,6-trans-farnesol.

Diez ml de una preparación comercial (95% pura) que contiene los 4 diastereómeros del farnesol se estabilizaron durante 2 horas a una presión de 0,2 mm de Hg en el balón de una columna de destilación de banda anular rotatoria (Perkin-Elmer, modelo NFT-51). Se calentó suavemente hasta que la temperatura de la cabeza de la columna adiabática subió bruscamente a 91°, y se empezó a recoger en este momento usando una relación de reflujo de 200:1; se colectaron 10 fracciones cuyos volúmenes fluctuaron entre 0,5 y 1 ml, hasta que la temperatura de la cabeza de la columna fue de 94°. La frecuencia de rotación de la banda anular se mantuvo en 20000 rpm durante todo el reflujo.

La destilación duró 3 horas, y la presión se mantuvo entre 0,18 y 0,2 mm de Hg.

Las fracciones se analizaron por cromatografía de gases en columnas de EGA y de SE-30: los alcoholes se siliaron antes de inyectar en esta última columna. El orden de destilación fue el siguiente: cis-cis farnesol, trans-cis farnesol, cis-trans farnesol y trans-trans farnesol. El primer alcohol se obtuvo virtualmente puro en la primera fracción; las demás fracciones contuvieron cantidades variables de 2 o 3 farnesoles. La fracción de mayor punto de ebullición, que fue la utilizada en la síntesis, contenía 80% del isómero trans-trans y 20% del isómero cis-trans.

7.2. Pirofosforilación de alcoholes.

En esta síntesis se usa dioxano difosfato como agente fosforilante, acetonitrilo como solvente y tricloroacetonitrilo como catalizador. La reacción produce los ésteres mono, piro y trifosforilados de los alcoholes.

El dioxano difosfato se prepara mezclando dioxano y ácido ortofosfórico en una relación molar 1:1, filtrando el precipitado en una atmósfera seca y removiendo el exceso de dioxano por liofilización. El producto así obtenido se vuelve a disolver en dioxano, antes de usar, para regenerar el dioxano difosfato hidrolizado y se vuelve a liofilizar. El solvente orgánico se libró de

peróxidos pasándolo por una columna de alúmina activada (148), y se destiló sobre cribas moleculares. Todos los reactivos usados en la síntesis se destilaron y secaron sobre cribas moleculares y se guardaron en un desecador de vidrio sobre pentóxido de fósforo. El material de vidrio fue igualmente secado calentándolo a 120° durante 2 horas y luego almacenándolo sobre el pentóxido de fósforo. Estas precauciones son necesarias debido a la extrema susceptibilidad del dioxano difosfato a la hidrólisis.

El prenol purificado (0,9 mmoles), se mezcló con 0,81 ml de tricloroacetoneitrilo y se agitó violentamente durante media hora con una pequeña barra magnética, en un balón de 50 ml de forma cónica, cerrado. El dioxano difosfato (0,84 g), se disolvió en una mezcla de 0,84 ml de trietilamina y 30 ml de acetoneitrilo; esta solución se agregó sobre la solución que contenía el alcohol durante 4 horas mediante un embudo de decantación y se dejó agitando 10 horas más. La solución final fue de color amarillo. El proceso se llevó a cabo con el sistema completamente cerrado a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 50 ml de hidróxido de amonio 0,1 M. Luego, los componentes orgánicos del medio de reacción se extrajeron 2 veces con 50 ml de éter etílico libre de peróxidos, y la fase etérea se extrajo a su vez con dos porciones de 50 ml de la solución amoniacal. Las fases acuosas se

juntaron, y el éter disuelto se removió en un evaporador rotatorio a presión reducida (0,1 torr). El prenil pirofosfato se purificó como se describe en la sección 8.

8. Síntesis de sustratos radiactivos.

8.1. Biosíntesis de isopentenil pirofosfato.

La síntesis de este compuesto se realizó utilizando una preparación del suero de *Hevea Brasiliensis*, centrifugada a 100000xg, que contiene las enzimas que catalizan la conversión de ácido mevalónico en IPP, con buen rendimiento (40, 105). El suero no tiene actividad IPP isomerásica detectable (40), lo que lo hace adecuado para la biosíntesis de IPP, ya que este producto no es transformado en DMAPP. De este modo, se puede obtener un rendimiento considerablemente superior al que se logra usando las enzimas de hígado de cerdo, que es de un 60%. El procedimiento ha sido adecuadamente descrito, por lo que no se detallará aquí (105).

Se usó como sustrato 3-RS -2¹⁴C-MVA, que se incubó con una cantidad adecuada de suero por 15 o 30 minutos, junto con ATP.Mg⁺². A fin de corregir por los cambios de actividad enzimática entre las diferentes partidas de suero, o por aquellos ocurridos durante el almacenamiento, y para minimizar el efecto de las fosfatasas endógenas del suero, se llevó a cabo un ensayo pequeño para determinar el tiempo óptimo de la reacción. Esto se hizo

mediante experimentos de pulsos de enzima, a 37°: se llevó a cabo una primera incubación, se detuvo calentando a 96°, y se repitió el mismo proceso 3 veces más, agregando enzima cada vez. El progreso de la reacción se siguió mediante cromatografías en papel (propanol:amoníaco:agua=3:1:1, sección 5.2), y el IPP producto se identificó por cocromatografía con IPP auténtico radiactivo. Este ensayo se confirmó con ensayos biológicos usando la mezcla 3-E-MVA e IPP como sustrato de la prenilsintetasa purificada, y por identificación en el cromatógrafo de gases, del alcohol liberado de esta mezcla luego de una hidrólisis con fosfatasa alcalina y apirasa. Los resultados fueron coincidentes, excepto que la cantidad de radiactividad recuperada en la hidrólisis enzimática fue menor; esto se debe probablemente a la alta volatilidad del isopentenol a 37°. El rendimiento de la biosíntesis fue normalmente de 80-85%, aunque se pueden conseguir valores tan buenos como 92%; el peor resultado que hemos obtenido es de 50%, que es lo mejor en el procedimiento que usa las enzimas de hígado de cerdo (106), o de un lisado de levadura (107).

El 1-¹⁴C-IPP así obtenido se purificó como se describe en la sección 9.

8.2. Biosíntesis de 2-¹⁴C-fosfoamevalónico.

0,25 uC de 2-¹⁴C-PS-MVA se incubaron con 8.10^{-3} unidades de quinasa mevalónica de hígado de cerdo, donación del Dr. E. Beytía, en 0,5 ml de una solución de ATP 5 mM, MgCl₂ 6mM, Tris HCl 50mM, pH 7.4 y mercaptoetanol 10mM. La incubación se llevó a cabo por 30 minutos a 30° y se detuvo calentando a 96° por 3 minutos. Los productos se analizan por cromatografía en papel (butanol:ácido fórmico:agua=77:10:13). El rendimiento varió entre 30 a 90%, respecto a la cantidad inicial de sustrato utilizable, 3-R-MVA. La identidad del producto se verificó por tratamiento con apirasa de papa y fosfatasa alcalina, lo que generó un producto cuyo R_f en la misma cromatografía correspondía a la de MVA, y por incorporación de marca en prenoles catalizada por enzimas de Pinus. El PMVA no se purificó, ya que nosotros no deseábamos llevar a cabo un estudio exhaustivo de las propiedades de la quinasa fosfo-mevalónica de Pinus o Citrus ni llevar a cabo un proceso de purificación de la misma actividad. Los componentes del medio de ensayo de la biosíntesis que se agregan junto con el sustrato PMVA en el ensayo de esta enzima, no pueden tener un efecto deletéreo, ya que los mismos se agregan o se generan durante la incubación con los extractos enzimáticos.

se puede separar del sustrato durante la cromatografía. Cuando se purificó $1-^{14}\text{C}$ -IPP, el medio de reacción se llevó del mismo modo a 400 ml en Tris. HCl 10 mM, pero se omitió la incubación con pirofosfatasa.

A continuación la muestra se aplicó a una columna de 30x1,5 cms de DEAE Sephadex A-25 preparada y estabilizada en tampón Tris.HCl 0,01 M pH 8,3, como se describe en la sección 4.5., con un flujo de alrededor de 27 ml/h; los productos de la síntesis se eluyeron primero con un volumen del mismo tampón equivalente a 4-6 volúmenes del lecho; luego con el mismo volumen de bicarbonato de amonio 0,1 M, y finalmente, con una gradiente lineal cuyo volumen fue igual a 10 volúmenes de columna, de límites 0,1 y 0,35 M en bicarbonato de amonio. El pH se mantuvo en las dos últimas eluciones con Tris. HCl 10 mM pH 8,3.

El primer lavado eluye aquellos compuestos que no se retienen o se retienen débilmente, como los alcoholes no fosforilados en las síntesis orgánicas, o como el ácido S-mevalónico proveniente de la biosíntesis de IPP. El lavado con 0,1 M bicarbonato de amonio, eluye aquellos compuestos con carga negativa superior, como el isopentenil monofosfato que se genera en la biosíntesis de IPP o los monofosfatos y el ortofosfato de las síntesis químicas. La gradiente permite separar entre difosfatos y trifosfatos; los primeros eluyen a una fuerza iónica de 0,2 M y los segundos

a 0,3 M.

9.2. Análisis.

Los productos así obtenidos se analizaron en una cromatografía en papel, como se describe en la sección 4.2., usando n-propanol amoníaco agua=3:1:1. Los sustratos no marcados se revelaron con el reactivo de Nanos 'Isherwood (145) y la migración de los sustratos radiactivos se determinó como se describe en la sección 4.2. Luego los sustratos se trataron con fosfatasa alcalina y apirasa, para dar los respectivos alcoholes que se analizaron por cromatografía de gases. En el caso de análisis de los sustratos radiactivos alílicos (GPP, FPP) se determinó además su debilidad a la hidrólisis ácida, incubando una cantidad adecuada de sustrato en HCl 1N por 10 min. a 37°, extrayendo los alcoholes reordenados con éter de petróleo y contando una alícuota de la fase orgánica. El último criterio fue su utilización por enzimas de polvo cetónico de flavedo de C. sinensis.

10. Determinación de proteínas.

10.1. Método turbidimétrico.

Este método se utilizó en los extractos y en las etapas iniciales de purificación. El extracto contiene colorantes que interfieren con los métodos basados en la absorción de luz al UV, así como en las distintas reacciones de proteínas que se utilizan corrientemente para la

determinación de su concentración (110, 111).

En este método 2,5 ml de TCA al 6% (p/v) se agregaron sobre 2,5 ml de una solución que contiene la muestra y la turbidez se comparó con un blanco de agua en un colorímetro Klett usando un filtro verde (112). El método es lineal hasta una cantidad de 3,0 mg finales de proteína y detecta hasta 0,1 mg de proteína por muestra.

10.2. Método de Lowry.

Este método se utilizó después de eliminar los componentes fenólicos no proteicos del extracto en la purificación; para esto se utilizó como estándar una preparación de prenilsintetasa purificada cuyo contenido en proteína se determinó por el método turbidimétrico; solo así son comparables las determinaciones hechas con ambos métodos.

11. Determinación de fosfato.

11.1. Determinación de ortofosfato.

Se utilizó el método de Fishbe y Subbarow (114).

11.2. Determinación de fósforo total

Se usó el método de Ames (115). A un volumen de muestra no mayor que 0,1 ml se agregan 0,2 ml de $Mg(NO_3)_2$ al 10% en etanol. La mezcla se seca sobre una llama suave y luego se calcina hasta cenizas blancas. Se enfría y se agregan 0,3 ml de HCl 1N. Se calienta a 100° durante

15 minutos, se enfría y determina ortofosfato como se describe más arriba.

12. Determinación de radiactividad.

Las condiciones de cómputo de radiactividad por centelleo se ajustaron con respecto al volumen de la solución de centelleo, a la concentración del centelleador secundario y al volumen máximo de éter de petróleo que puede agregarse a la solución de centelleo sin disminuir la eficiencia.

Se utilizó tolueno como solvente primario con etanol al 10% (v/v), para solubilizar muestras acuosas. Usando 2,5-difeniloxazol (4 g/lit) como centelleador primario, se encontró que una concentración de 0,125 g/lit del centelleador secundario (1,4-bis(2-(5-feniloxazolil)-benzeno (POPOP) da máxima eficiencia de cómputo para ^{14}C y ^3H en dos ml de solución centelleante, aun luego de la adición de 0,5 ml de éter de petróleo (40-60). La eficiencia no cambió al aumentar la concentración de POPOP o el volumen de la solución de centelleo hasta 10 ml, ni al eliminar el etanol; en este último caso el máximo del espectro de energía se desplaza ligeramente, ya que el etanol es un apagador, pero esto se corrige simplemente cambiando la atenuación de los pulsos de voltaje. Cuando se contaron tiras de papel o cuando se determinó la radiactividad de una solución de éter de petróleo de volumen mayor que 0,5 ml,

el volumen de la solución de centelleo se aumentó a 5 ml, para mantener la eficiencia del cómputo.

La eficiencia del cómputo en estas condiciones fue de 85% en el caso de ^{14}C y de 35% para ^3H , en muestras no acuosas. La temperatura fue la del ambiente. El apagamiento se determinó rutinariamente por el método de razón de canales (146), que se calibró usando $^{14}\text{C}-\text{CH}_3\text{OH}$ y $^3\text{H}-\text{H}_2\text{O}$ como estándares, y acetona como apagador.

Las soluciones acuosas se contaron en 10 ml de esta solución, que admite fácilmente hasta 10 μl de fase acuosa, o en 10 ml de solución centelleante de Bray (147). La eficiencia del cómputo en esta solución fue del 85% si el volumen de agua agregado no es mayor que un ml. El pH ácido y la alta fuerza iónica disminuyeron drásticamente la eficiencia del cómputo de radiactividad de estas fases acuosas; por lo tanto, las muestras acuosas se neutralizaron y/o diluyeron antes de contarlas. Se utilizó un contador Nuclear Chicago modelo 6801.

13. Preparación de suspensiones de fosfolípidos.

Una cantidad adecuada de fosfolípido disuelto en cloroformo metanol 1:1, se evaporó bajo una corriente de N_2 ; el lípido seco se agregó agua o tampón desaireados y se sonicó. Este proceso se realizó durante 3-4 minutos con un equipo Biosonik III (Bronwill), a 20 KHz, con la

máxima potencia. La formación de vesículas se completa en este tiempo (126, 127). La suspensión tuvo un leve turbidez (A_{550} menor que 0,05), que no desapareció cuando el tiempo de la sonicación se aumento hasta los 30 min. Todo el proceso se llevó a cabo en frío y bajo una corriente continua de N_2 . La sonicación se llevó a cabo con intervalos de unos 30 segundos, a fin de mantener la temperatura en 4° .

M A T E R I A L E S

Los reactivos que se indican a continuación se obtuvieron de las firmas mencionadas en cada caso: nerol y geraniol, de Fritzsche Brothers, Co., New York, USA; farnesol, dimetilalilalcohol, de Aldrich Chem.Co., Milwaukee, USA; ácido 2-¹⁴C-mevalónico y ³H-NaBH₄, de New England Nuclear, Boston, USA;

2,5-difenil oxazol y 1,4-bis(2-(5-feniloxazolil)) benceno, de Nuclear Chicago, Illinois, USA

ácido silícico (100 mesh), de Mallinkrodt, Saint Louis, USA;

cribas moleculares, de Union Carbide, USA;

Sephadex y sus derivados, de Pharmacia Fine Chem., Uppsala, Suecia;

DEAE celulosa, de Whatman Co., Kent, Inglaterra;

fosfatasa alcalina y fosfolipasa C, de Sigma Chem.Co., Saint Louis, USA,

proteínas estándares, de Mann Research Co., New York, USA;

El resto de los reactivos y solventes usados se obtuvieron de diversas firmas, y fueron de la mayor pureza disponible, excepto el sulfato de amonio (p. usos bioquímicos) y el fosfato de potasio monoácido (purísimo), de Merck, Darmstadt, Alemania.



CAPITULO II

RESULTADOS Y DISCUSION

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

1. Efecto de fosfolípidos sobre las enzimas que transforman ácido mevalónico en prenoles.1.1. Elección del material biológico.

Los primeros estudios de este efecto se realizaron con extractos enzimáticos de plántulas de Pinus radiata (79). Resultados semejantes se obtuvieron con un sistema similar de flavedo de Citrus sinensis (69). Por lo tanto, ambas preparaciones enzimáticas parecían adecuadas para estudiar este problema.

Las actividades enzimáticas de los extractos de flavedo de Citrus muestran grandes variaciones estacionales por lo que no es posible preparar extractos activos más que durante la mitad del año. A este efecto se agrega un alto grado de dispersión debido a las diferencias individuales entre los frutos de un mismo árbol (118); de aquí que es muy difícil correlacionar cuantitativamente resultados obtenidos de distintas preparaciones pequeñas de flavedo, requisito esencial en la exploración de métodos de purificación de enzimas. Estos problemas no existen en el caso de las plántulas de Pinus cultivadas en el laboratorio, que son metabólicamente muy homogéneas. En cambio la masa de

material que se obtiene es muy pequeña; cada plántula pesa unos 170 mg, mientras que el flavedo de una naranja pesa entre 10 a 20 g. Por estas razones y con el fin de aclarar algunos aspectos del efecto de fosfolípidos que no requerían de la purificación de enzimas, se empleó inicialmente el sistema enzimático obtenido de Pinus Radiata. Sin embargo, la mayoría de los experimentos se repitieron con el sistema de flavedo de Citrus para asegurar la identidad de la respuesta de ambos sistemas si es que era necesario planificar nuevos experimentos en un sistema basado en conclusiones obtenidas con el otro.

El primer problema fue entonces encontrar condiciones que permitieran optimizar la germinación y el desarrollo de las plántulas de Pinus Radiata, ya que el rendimiento inicial de las plantaciones fue muy pobre. Con este objeto se estudiaron sólo los efectos del pH del suelo y de la adición de sales inorgánicas, ya que se había demostrado que la adición de hormonas vegetales no tenía efecto en este nivel de desarrollo de las plántulas (122). Así se encontró que este desarrollo es óptimo a pH 4: a un pH más ácido, las semillas mueren; a pH 5, pocas semillas son viables, el crecimiento es lento y se produce una extensa contaminación por hongos que atacan a las plántulas en el cuello de la raíz. La adición de sales inorgánicas descritas en la literatura como esenciales (123) no tuvo ningún

efecto en la germinación o en el desarrollo de las plántulas. Por lo tanto, el pH del suelo es la única variable importante en este proceso, bajo las condiciones utilizadas en este estudio.

Las preparaciones de enzima de las plántulas así obtenidas fueron notablemente homogéneas respecto a actividades enzimáticas y concentración de proteína.

1.2. Efecto de fosfolípidos en la transformación de ácido mevalónico en prenoles.

El enfoque experimental de este problema se basó en los criterios que se describen a continuación: 1. En los primeros estudios (69, 79) el efecto de fosfolípidos sobre el metabolismo de isoprenoides se determinó casi siempre en la fracción lípidos libres, que es un índice de las actividades fosfatásicas del extracto, (ver Métodos, sección 3.1.); los estudios del efecto de fosfolípidos sobre las fracciones alifáticas y prenol fosfatos produjeron resultados poco claros (133). Al mismo tiempo se demostró que la actividad de las fosfatasa del extracto no era afectada por la adición de fosfolípidos (79), y se consiguió evidencia contraria a la posibilidad de que el efecto de los fosfolípidos ocurriera en alguna etapa de la secuencia entre MVA a IPP (124). Así el sitio de acción más probable de los fosfolípidos parecían ser las reacciones posteriores a la síntesis de IPP, es decir, las catalizadas por

la IPP isomerasa y la prenilsintetasa. Ya que los productos de la actividad de estas enzimas son compuestos alílicos, pareció importante determinar de rutina el efecto de fosfolípidos tanto sobre la fracción lípidos libres como en la alílica.

2. La determinación de la transformación de ácido mevalónico en prenoles se basa en la extracción de estos alcoholes con éter de petróleo. Los pirofosfatos remanentes en la fase acuosa son transformados en alcoholes por hidrólisis química o enzimática, y extraídos del mismo modo; los fosfolípidos son compuestos anfifílicos muy hidrofóbicos (concentración micelar crítica de 10^{-10} M (125)), lo que hace probable que interfirieran con el proceso fisicoquímico de la extracción y produzcan un artefacto en la extracción. Por esta razón se incluyó siempre un control en el que los fosfolípidos se agregaron al medio de incubación después de detener la reacción; este control dió una medida cuantitativa del efecto de los lípidos en la partición de fases.

Los experimentos se hicieron habitualmente agregando los fosfolípidos al medio como una suspensión sonicada; las condiciones de la sonicación se ajustaron de modo de obtener la mayor dispersión posible (126, 127). En otros experimentos los fosfolípidos se agregaron al medio como una solución etérea, en un volumen muy pequeño. No se observaron diferencias debidas al modo de agregar el lípido.

A continuación se presenta un conjunto de experimentos (Tabla 2 a Tabla 10) representativos de cada efecto estudiado. Casi todos estos experimentos se repitieron con fosfolípidos crudos y puros de distintas fuentes (cerebro de porcino o vacuno, soya y en algunos casos de flavedo de Citrus sinensis) y en ellos se utilizan los sistemas enzimáticos de plántulas de Pinus radiata, flavedo de Citrus sinensis o de extracto de polvo cetónico de flavedo de Citrus sinensis. Los resultados fueron cualitativamente similares, independientemente del sistema usado.

Cuando se repitieron los experimentos de incorporación de $2\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA descritos por George-Nascimento et al (79), bajo condiciones esencialmente idénticas, se encontró el mismo efecto de estimulación sobre la fracción lípidos libres. De aquí que se realizaron experimentos en las que las actividades fosfatásicas del extracto se redujeron drásticamente (fosfato 0,1 M, KF 0,14 M) (60), con el objeto de determinar el efecto de fosfolípidos sólo sobre la fracción alílica, es decir, el efecto de fosfolípidos sobre la biosíntesis de los pirofosfatos alílicos sin interferencia de las fosfatasas.

En la Tabla 2 se muestra este efecto en la incorporación de ácido mevalónico catalizada por enzimas de Pinus radiata bajo las condiciones descritas antes. El experimento se realizó sobre un extracto de plántulas y sobre un

Tabla 2

Efecto de fosfatidiletanolamina en la transformación de ácido mevalónico en prenoles por dos preparaciones enzimáticas de plántulas de *Pinus radiata*.

Preparación	Fracción	Radioactividad en prenoles (cpm)		
		Control sin fosfolípido	Control de extracción*	Adición de 3.5 ng de fosfolípido
Extracto	Lípidos libres	72	1020	820
	Alílicos	1220	4292	312
Precipitado de 80% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Lípidos libres	90	653	1135
	Alílicos	882	2354	380

225000 cpm de 3-ES-2- ^{14}C -MVA se incubaron durante una hora con 1 mg de proteínas de cada preparación enzimática, en un volumen de 0,5 ml bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. El tampón fue fosfato de potasio 0,1 M pH 7,4, y la solución contuvo KF 144 mM final. La fosfatidiletanolamina de cerebro de canguro se agregó como una solución acuosa sonicada.

*En este ensayo, la reacción se llevó a cabo como en el primer control, pero se agregó el fosfolípido inmediatamente antes de detener la reacción.

precipitado de 80% de saturación en sulfato de amonio, preparado a partir del mismo extracto. Los fosfolípidos aumentaron claramente la incorporación de radiactividad en la fracción lípidos libres. Como el control de extracción por fosfolípido exhibe el mismo resultado, es claro que este efecto no resulta de una acción sobre las enzimas durante la transformación del sustrato, sino que de un efecto en la partición fase acuosa/hexano (columna 1 y 2 de Tabla 2). El efecto del fosfolípido es mucho mayor (680%) sobre la partición de radiactividad entre hexano y agua que el posible efecto estimulante (71%) sobre la o las reacciones enzimáticas (Tabla 2). Un resultado cualitativamente similar se obtuvo con la preparación enzimática precipitada con sulfato de amonio. Este efecto del fosfolípido sobre la partición fue poco reproducible, como es característico de este tipo de equilibrio (128).

Al comparar la incorporación de marca en presencia de fosfolípido con la de los controles, se observa una profunda inhibición de la incorporación en la fracción aliflica que puede ser interpretado como un efecto relacionado con las reacciones enzimáticas mismas, (Tabla 2).

Tanto en la fracción lípidos libres como aliflicos, el control de extracción muestra que la radiactividad extraída en hexano por fosfolípido, aumenta significativamente si se compara con el ensayo que no lleva lípido. Este efecto arroja dudas sobre la validez del método de

ensayo, ya que sugiere, en principio, que una fracción importante de los alcoholes generados en el curso de la reacción enzimática son arrastrados hacia la fase orgánica sólo en presencia de un compuesto anfifílico. Sin embargo las siguientes observaciones apoyan la validez del método: la extracción de los alcoholes radiactivos no es cuantitativa en los experimentos sin adición de fosfolípidos. Sólo un 75% de la radiactividad es removida desde la fase acuosa por una sola extracción. Este valor es notablemente constante y no aumenta cuando se agregan portadores ni al semisaturar la solución en NaCl (151), método este último usado para mejorar la extracción de prenoles de la fase acuosa a la fase no polar. Además, los experimentos sin fosfolípidos son reproducibles dentro de un 15%, lo que es bueno si se considera que en este ensayo de transformación de ácido mevalónico en prenoles se está midiendo simultáneamente la actividad de por lo menos 6 enzimas. Estos hechos sugieren que el método de ensayo es en sí correcto, pero que la adición de fosfolípidos introduce alteraciones que no se pueden explicar con el tipo de experimentos mostrado en la Tabla 2.

Pese a estas limitaciones, los resultados de la Tabla 2 muestran que, contrariamente a los datos anteriores a este trabajo (79), no hay estimulación de la cadena biosintética MVA a FPP en un extracto de plántulas, sino que parecería ocurrir una inhibición de alguna actividad. Este

último efecto fue poco reproducible y debe considerarse como una tendencia más que como un efecto definitivamente demostrado.

Los experimentos como el descrito en la Tabla 2 no permitían extraer conclusiones respecto al origen y al punto de la posible inhibición por fosfolípidos, ya que el análisis del sistema se hace en condiciones de régimen estacionario; la técnica empleada solo mide los niveles de los productos finales de la secuencia. De aquí que se decidió determinar el efecto de los fosfolípidos en experimentos en condiciones de velocidad inicial y en particular sobre las primeras y las últimas enzimas de la secuencia biosintética: quinasas mevalónicas, IPP isomerasa y preniltransferasas.

1.3. Efecto de fosfolípidos sobre quinasas mevalónica y fomevalónica.

En la Tabla 3 se muestra el efecto de fosfolípidos sobre la actividad de la primera enzima de la secuencia, la quinasa mevalónica. El análisis de productos no requiere en este caso de una partición de fases, sino que se analiza directamente la fase acuosa por cromatografía en papel. Con esta metodología no se espera, ni de hecho se observa un efecto inespecífico del fosfolípido. Sin embargo fue necesario precipitar la mayor parte de los lípidos agregados calentando a 100° durante 5 minutos en

Tabla 3

Efecto de lecitina de soya en la actividad de quinasa mevalónica de extractos de plántulas de *Pinus radiata* y flavo-
do de Citrus sinensis.

Extracto	Actividad enzimática (Radiactividad en fosfomevalónico, (cpm))		
	Control sin fosfolípido	Control de extracción	Adición de fosfolípido 2,2 mM
<u>Pinus radiata</u>	10006	9891	9256
<u>Citrus sinensis</u>	18276	17233	18276

0,05 mg de proteína se incubaron durante 15 minutos con 202000 cpm de 3-RS-2-¹⁴C-MVA en un volumen de 0,1 ml. El tampón fue Tris.HCl pH 7,4, 0,1 M final. El resto de las condiciones y la determinación de actividad se describen en Materiales y Métodos.

La lecitina de soya fue una preparación comercial no purificada que contiene alrededor de un 30% de fosfatidiletanolamina. La concentración del lípido se expresa en función del contenido de fósforo.

presencia de una cantidad adecuada de proteína (5mg/ml) para eliminar posibles artificios debido a la migración de los lípidos sobre el papel. El método alternativo disponible, cromatografía sobre Dowex-formiato (23), dió resultados poco confiables debido a extenso apagamiento durante el cómputo de radiactividad de los eluidos de la columna. El método usual de ensayo de esta actividad, que determina el ADP formado mediante reacciones acopladas que generan NADH (16), no se puede utilizar ya que el extracto absorbe infinitamente en el ultravioleta a la concentración requerida para la determinación de actividad. La Tabla 3 muestra claramente que no hay ningún efecto de fosfolípidos en la quinasa mevalónica de Pinus o Citrus. El mismo resultado se obtuvo en el ensayo del efecto de fosfolípidos sobre la enzima siguiente de la secuencia, la quinasa fosfomevalónica (Tabla 4). Estos experimentos fueron completamente reproducibles.

Incidentalmente, estos resultados ilustran sobre la estereoselectividad de la quinasa fosfomevalónica: el sustrato de esta enzima es el enantiómero 3-R del ácido 5-fosfomevalónico, ya que la quinasa mevalónica de hígado de cerdo usada en la biosíntesis de este sustrato es absolutamente específica por el 3-R-MVA. El hecho de que la quinasa fosfomevalónica de Pinus use el enantiómero R obviamente no excluye que pueda utilizar el isómero S.

Tabla 4

Efecto de lecitina de soya en la actividad de la quinasa fosfomevalónica de un extracto de plántulas de Pinus radiata.

	Actividad enzimática	
	Radiactividad en PP-MVA (cpm)	% de transformación del sustrato
Control	4394	13,7
Control de extracción	4471	14,0
Adición de 2,5 mg de lecitina de soya	5431	16,9

0,5 mg de un precipitado de 80% de saturación previamente dializado contra Tris.HCl 0,1 M, pH 7,4 se incubaron 20 minutos con 32000 cpm de 3-R-2-¹⁴C-PMVA, en un volumen de 0,2 ml; el tampón del ensayo fue el mismo de la diálisis. El lípido, el mismo del experimento descrito en la Tabla 3, se agregó como una suspensión sonicada. El resto de las condiciones del ensayo y la determinación de actividad se describen en Materiales y Métodos.

Sin embargo, las enzimas del extracto de P. radiata pueden transformar solo el 50% de la radiactividad de la mezcla racémica comercial del ácido mevalónico, en experimentos prolongados (82). Por lo tanto es posible que ambas quinasas tengan la misma estereoespecificidad por los enantiómeros R.

1.4. Efecto de fosfolípidos sobre las actividades isopen- tenilpirofosfato isomerásica y prenilsintetásica.

Cuando se estudió el efecto de fosfolípidos sobre la IPP isomerasa y las actividades prenilsintetásicas, se encontró el mismo tipo de efecto que en los experimentos de transformación de ácido mevalónico en alílicos, es decir, resultados poco reproducibles con un efecto que tiende a ser inhibitorio. La Tabla 5 muestra un experimento en el que se ve claramente esta inhibición.

Para analizar estos resultados, es importante tener en cuenta que durante el ensayo de la isomerasa se encuentra que más de un 50% de la marca del producto está asociada a los prenoles de 10 y 15 átomos de C. Este efecto resulta de la mayor actividad preniltransferásica, relativa a la de la isomerasa, en el extracto, y de la marcación doble y triple de los productos de C₁₀ y C₁₅ si se usa IPP marcado como único sustrato (78). La contribución de la actividad prenil transferásica hace difícil distinguir cual de estas enzimas es la afectada por el

Tabla 5

Efecto de fosfolípidos totales de cerebro de vacuno en la actividad de la IPP isomerasa, y de GPP y FPP sintetasa de extractos de polvo cetónico de flavedo de Citrus sinensis y plántulas de Pinus radiata.

	Actividad específica (U/ml)		
	Control sin fosfolípidos	Control de extracción	Adición de 2 mg de fosfolípidos crudos de cere- bro
IPP isomerasa de <u>Citrus</u>	0,31	0,22	0,27
GPP sintetasa de <u>Citrus</u>	0,97	0,57	1
FPP sintetasa de <u>Citrus</u>	1,36	0,89	1,19
FPP sintetasa de <u>Pinus</u>	0,51	0,31	0,65

Citrus sinensis: $1\text{-}^{14}\text{C}$ -IPP (100000 cpm), se incubó 15 min con 1 mg de proteína, en un volumen final de 1 ml, bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La determinación de actividad se detalla en el mismo capítulo.

Pinus radiata: $1\text{-}^{14}\text{C}$ -IPP (20000 cpm), se incubó 15 minutos con 0,4 mg de proteína de un precipitado de 80% de saturación de sulfato de amonio, en un volumen de 0,2 ml. El resto de las condiciones y el ensayo de actividad se describen en Materiales y Métodos.

El fosfolípido se agregó como una suspensión sonicada, a una concentración final de 2 mg/ml en cada caso.

fosfolípido en el ensayo de la isomerasa.

Las actividades C_{10} y C_{15} sintetásicas fueron inhibidas en aproximadamente la misma proporción, que es lo que se espera si es que ambas reacciones son catalizadas por la misma proteína (42).

La interpretación más simple de este conjunto de resultados es que la única enzima afectada por fosfolípidos es la prenilsintetasa, y que el efecto observado en la IPP isomerasa es un reflejo de la inhibición de la primera enzima. La ausencia de efecto de fosfolípidos en las quinonas mevalónicas, determinado tanto por experimentos de régimen estacionario (124), como de velocidad inicial, sugieren que el efecto inhibitorio de fosfolípidos en la transformación de ácido mevalónico en compuestos alílicos se ejerce por lo tanto en el nivel de la prenilsintetasa. A fin de corroborar esta conclusión y estudiar el mecanismo de este efecto era imprescindible contar con una preparación de enzima sustancialmente purificada, lo que se intentó como se describe más adelante.

1.5. Efecto de fosfolípidos sobre la actividad ciclásica de *Citrus Limonum*.

Los datos hasta aquí presentados sugieren que el efecto descrito de estimulación por fosfolípidos de la incorporación de ácido mevalónico en los lípidos libres, es un artificio de la técnica de extracción. Sin embargo,

estos experimentos no descartan un efecto de fosfolípidos sobre los sistemas enzimáticos que sintetizan hidrocarburos monoterpénicos en Pinus, ya que en este sistema no más de un 0,05% de MVA es transformado en hidrocarburos (82). Por lo tanto, la contribución de estos compuestos a la radiactividad de la fracción lípidos libres es tan pequeña que difícilmente podría apreciarse un efecto estimulador, si es que lo hubiera. Por esta razón se decidió utilizar un extracto de flaveo de Citrus limonum, que contiene una actividad ciclásica mucho mayor (70). En la Tabla 6 se muestra la ausencia de efecto de fosfatidilcolina de soya sobre la ciclasa de Citrus limonum; el mismo resultado se obtuvo al utilizar fosfatidiletanolamina de la misma fuente y fosfolípidos totales de cerebro de porcino sobre una preparación parcialmente purificada de la misma enzima.

1.6. Efecto de fosfolipasa C en la transformación de ácido mevalónico en prenoles.

Para completar este estudio era necesario librar la preparación enzimática de fosfolípidos endógenos, tratándola con fosfolipasas; esto podría además poner en evidencia un requerimiento absoluto de fosfolípidos. Para esto se utilizó fundamentalmente fosfolipasa C, aunque se hicieron algunos experimentos con veneno de Crotalus adamanteus, que contiene varias actividades fosfolipásicas (130).

Estos estudios plantearon inicialmente dos

Tabla 6

Efecto de lecitina de soya sobre las actividades fosfatásicas y ciclásicas de un extracto de flavado de Citrus limonum.

Ensayo	Control	Control de extracción	Actividades enzimáticas (nmoles/hora)
			Adición de lecitina 1,2 nM
Fosfatasas*	60	70,8	69,2
Ciclasas	6,34	6,7	6,48

110000 cpm de 1-³H-NPP se incubaron 30 min con 1 mg de proteína en un volumen de 1 ml. El extracto se preparó del mismo modo que el de flavado de C. sinensis, excepto que el tampón fue Tris.HCl pH 7,8 y contuvo mercaptoetanol a una concentración final de 10 mM. Las condiciones del ensayo y de la determinación de productos se detallan en Materiales y Métodos.

El fosfolípido, lecitina de soya comercial, se agregó como una suspensión acuosa sonicada; la concentración se expresa en función del contenido de fósforo.

*Calculada a partir de la hidrólisis del NPP.

problemas; el primero fue encontrar un método para inactivar o separar la fosfolipasa C de nuestras enzimas antes del ensayo de actividad. El segundo tenía relación con la mantención de la actividad de estas enzimas durante una preincubación a 37°.

Cuando se estudia el efecto de la fosfolipasa C sobre enzimas microsomales, el método usual para eliminarla antes del ensayo de actividad consiste en centrifugar el medio de preincubación a 100000xg; así se recuperan los microsomas en la pella, y la fosfolipasa queda en el sobrenadante. Este método no era aplicable a nuestro sistema enzimático no particulado, de modo que para inactivar la fosfolipasa se aprovechó su carácter de metaloenzima dependiente de Zn^{+2} (129). Usando una preparación cruda de lipoproteínas de yema de huevo, se encontró que la enzima es inmediatamente inactivada por la adición de o-fenantrolina 0,1 mM final, y que este efecto no es revertido por la adición de Mg^{+2} o Mn^{+2} , que son necesarios en la transformación de ácido mevalónico. El EDTA no inactiva a la fosfolipasa aun luego de media hora en las mismas condiciones.

Por otra parte era necesario saber si los componentes agregados al medio, indispensables para la actividad lipásica, tenían efecto sobre la transformación de MVA. En la Tabla 7 se muestra el efecto de Ca^{+2} , Zn^{+2} y o-fenantrolina en la incorporación de 2- ^{14}C -MVA por un extracto

Tabla 7

Efecto de Ca^{+2} , Zn^{+2} y o-fenantrolina en la incorporación de $2\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ por extractos de plántulas de Pinus Radiata.

	Porcentaje de incorporación relativo al control		
	$\text{Ca}^{+2}\#$ 2,3 mM	$\text{Zn}^{+2}\ast$ 2 mM	o-fenantrolina*
Lípidos Libres	100	41,5	48,2
Alfílicos	101	60,4	225,7
Prenol fosfatos	-	40,5	81,3

#Experimento 1: extracto Pinus, 2 mg en 0,5 ml., incubación de 1 hora, en bufer TrisCl 93 mM, pH 7,4: 130000 cpm en RS-2- $^{14}\text{C-MVA}$. El resto de las condiciones como se describe en Materiales y Métodos.

#Experimento 2: extracto de Pinus, 3,1 mg en 0,5 ml, 1 hora de incubación.

Tampón: TrisCl, 0,1 M pH 7,8; 225000 cpm en RS-2- $^{14}\text{C-MVA}$

UNIVERSIDAD DE CHILE
SIDE SANTIAGO ORIENTE
BIBLIOTECA CENTRAL

de Pinus. Se ve que no hay efecto de Ca^{+2} 2 mM en la incorporación de marca ni en la fracción lípidos libres ni en la fracción alílica. La o-fenantrolina disminuyó ligeramente la incorporación en la fracción prenolfosfatos (IPP+más pirofosfatos alílicos) y el Zn^{+2} bloqueó la síntesis de IPP, ya que la caída en la incorporación de radiactividad en lípidos libres y alílicos se debe a la disminución de la incorporación en la fracción prenol fosfatos; probablemente este catión interfiere en las primeras reacciones de la secuencia que requieren Mg^{+2} o Mn^{+2} . Esta inhibición desapareció al agregar un exceso de o-fenantrolina.

La actividad de transformación de ácido mevalónico se pierde por completo aun luego de preincubaciones tan cortas como 15 minutos en ausencia de fosfolipasa C. Este problema se resolvió agregando MVA no marcado y ATP al medio de preincubación; en presencia de estos sustratos, la inactivación del sistema enzimático se redujo drásticamente. Aparentemente la enzima más lábil de la secuencia es la quinasa mevalónica ya que no se consiguió estabilizar el sistema en experimentos análogos ni al agregar PMVA ni IPP. No se hicieron intentos adicionales para aclarar este efecto, y estos resultados se utilizaron directamente en los experimentos siguientes con fosfolipasa C.

Como se muestra en las Tablas 8,9 y 10, la fosfolipasa C no tuvo ningún efecto sobre la transformación de

Tabla 8

Efecto de fosfolipasa C y fosfolípidos totales de cerebro en la transformación de ácido mevalónico en prenoles por un extracto de plántulas de Pinus radiata.

Condición	Incorporación de marca en prenoles (cpm)	
	Lípidos libres	Alílicos
<u>Control no preincubado</u>	296	3220
<u>Preincubado sin fosfolipasa</u>		
Control	120	2356
Control de extracción	128	2228
Adición de fosfolípidos totales de cerebro, 2 mg/ml	66	808
<u>Preincubado con fosfolipasa C</u>		
Control	181	2480
Control de extracción	98	2052
Adición de fosfolípidos totales de cerebro, 2 mg/ml	76	2052

0,72 mg de fosfolipasa C se incubaron 30 minutos con 6,7 mg de proteína de un extracto de plántulas de Pinus radiata, en un volumen final de 1,52 ml, a 37°, en un medio que contenía Tris.HCl 10 mM pH 7,4, 5,2 μ M MVA no marcado, 10 mM MgCl₂, 10 mM ATP y 10 mM mercaptoetanol. La reacción se detuvo agregando o-fenantrolina hasta una concentración de 0,5 mM final, y alícuotas de 0,45 ml se ensayaron en un volumen final de 1 ml, por 1 hora, con 270000 cpm de ácido mevalónico radiactivo, bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

La preparación de fosfolípidos, obtenida de cerebro de vacuno, se agregó al medio de ensayo como suspensión sonicada en Tris.HCl 10 mM pH 7,4.

Tabla 9

Efecto de fosfolipasa C y fosfolípidos totales de cerebro sobre la quinasa mevalónica de un extracto de polvo cetónico de flavedo de Citrus sinensis

Condición	Actividad enzimática (cpm en PMVA)		
	Control	Control de extracción	Adición de fosfolípidos 1 mg/ml final
Extracto preincubado sin fosfolipasa C	1043	894	892
Extracto preincubado con fosfolipasa C	1028	1123	806

4,4 mg de proteína del extracto se preincubaron con 5 mg de fosfolipasa C en un volumen de 5,5 ml durante 40 min. en las condiciones descritas en la leyenda de la Tabla 8. Alícuotas de 0,05 ml se incubaron en un volumen final de 0,1 ml con ácido mevalónico radiactivo, 20200 cpm finales. Las condiciones del ensayo y determinación de actividad se describen en Materiales y Métodos.

Tabla 10

Efecto de fosfolipasa C sobre las quinasas mevalónica y fosfomevalónica de un extracto de polvo cetónico de flavo de Citrus sinensis

	Incorporación de marca en	
	(cpm)	
	PMVA	PPMVA
Extracto no preincubado	7238	680
Extracto no preincubado sin fosfolipasa C	6023	658
Extracto preincubado con fosfolipasa C	6110	755

1,4 mg de proteína de extracto se incubaron 30 min con 2 mg de fosfolipasa C, en un volumen de 2,5 ml, en las condiciones descritas en la leyenda de la Figura 8; de éste se usó una alícuota de 0,06 ml para la determinación de actividad, en un volumen de 0,1 ml, añadiendo 20200 cpm de ácido mevalónico radiactivo. Tiempo del ensayo, 15 min. La incubación y la determinación de actividad se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

ácido mevalónico en prenoles ni sobre la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica. Estos resultados sugieren que este sistema enzimático no es absolutamente dependiente de fosfolípidos, y que los fosfolípidos originales del extracto no interfieren en el efecto de los lípidos agregados.

Los experimentos con veneno de Crotalus adamanteus que se realizan en condiciones esencialmente idénticos, excepto por la adición de albúmina de suero al final de la preincubación, arrojaron cualitativamente el mismo resultado que los experimentos anteriores. El veneno no se utilizó rutinariamente, ya que posee una potente actividad proteásica estimulada por Ca^{+2} (131), lo que tiende a oscurecer los resultados.

Un problema difícil de esclarecer fue si algún componente del extracto de Pinus o Citrus inhibe a la fosfolipasa C. En experimentos en que se utilizó como sustrato fosfatidilcolina pura preparada en el Laboratorio y la actividad fosfolipásica se determinó siguiendo la liberación de fósforo ácido soluble(91), se encontró una profunda inhibición de la reacción al agregar una alícuota de extracto, acompañada por una extensa floculación de la suspensión de fosfolípidos. La dispersión de los lípidos es esencial para la manifestación de la actividad de la enzima (132). Así, no es posible determinar si la inhibición de la

fosfolipasa fue un efecto directo sobre la actividad o un efecto indirecto sobre el estado fisicoquímico del sustrato, los fosfolípidos. Un método más correcto para determinar la actividad de una fosfolipasa en el sistema enzimático en estudio es seguir directamente cambios en la composición lipídica del sistema. Esto no se puede llevar a cabo en nuestro extracto enzimático soluble de P. radiata, cuyo contenido fosfolipídico es indetectable por el siguiente método. Una preparación corriente de extracto (30 ml, 60 mg de proteína), se liofilizó para concentrarla y se extrajo con cloroformo-metanol 2:1; el extracto orgánico se concentró y aplicó en placas de sílica gel G, que se desarrollaron y tiñeron con Rodamina como se describe en Materiales y Métodos.

Los experimentos aquí presentados muestran que no hay efecto estimulador de fosfolípidos sobre las enzimas que transforman ácido nevalónico en prenoles; por lo tanto, los estudios anteriores deben explicarse sobre una base que excluya a las reacciones enzimáticas en sí. Sin embargo, estos experimentos sugieren que existe un efecto inhibitorio de los fosfolípidos ensayados sobre una de las reacciones de la secuencia. Esta observación nos llevó a la etapa que se describe a continuación.

2. Purificación de prenilsintetasa de *Citrus sinensis*.

2.1. Obtención del material biológico.

La purificación de enzimas de fuentes vegetales plantea serios problemas derivados de las características de estos sistemas, como la variación estacional de las actividades enzimáticas (116), las bajas cantidades de proteína de la célula vegetal, la resistencia mecánica de la pared celular, y la presencia de componentes coloreados desnaturalizantes en los extractos (117).

De aquí que la primera meta en un proceso de purificación es conseguir una fuente de enzima homogénea y estable que pueda prepararse en grandes cantidades durante la estación de mayor actividad. En el caso de la prenilsintetasa de *Citrus sinensis*, el período activo está entre junio y septiembre en Chile (118).

Este problema se resolvió con la preparación de un polvo cetónico de flavedo de *Citrus sinensis* (118), que es completamente estable hasta por dos años: el contenido de colorantes de esta preparación está notablemente disminuido respecto al sistema original ya que buena parte se solubiliza en la acetona y en el éter etílico de la preparación del polvo. Todas las enzimas involucradas en la transformación de ácido mevalónico en prenoles se conservan en el proceso. La prenil sintetasa se extrae del polvo homogenizando en tampón fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4;

parece existir un cierto grado de especificidad en la extracción por fosfato, ya que otros tampones, como succinato 0,1 M pH 6 o Tris.HCl 0,1 M pH 7,4, producen extractos con bajas actividades específicas.

2.2. Estabilización de la prenilsintetasa.

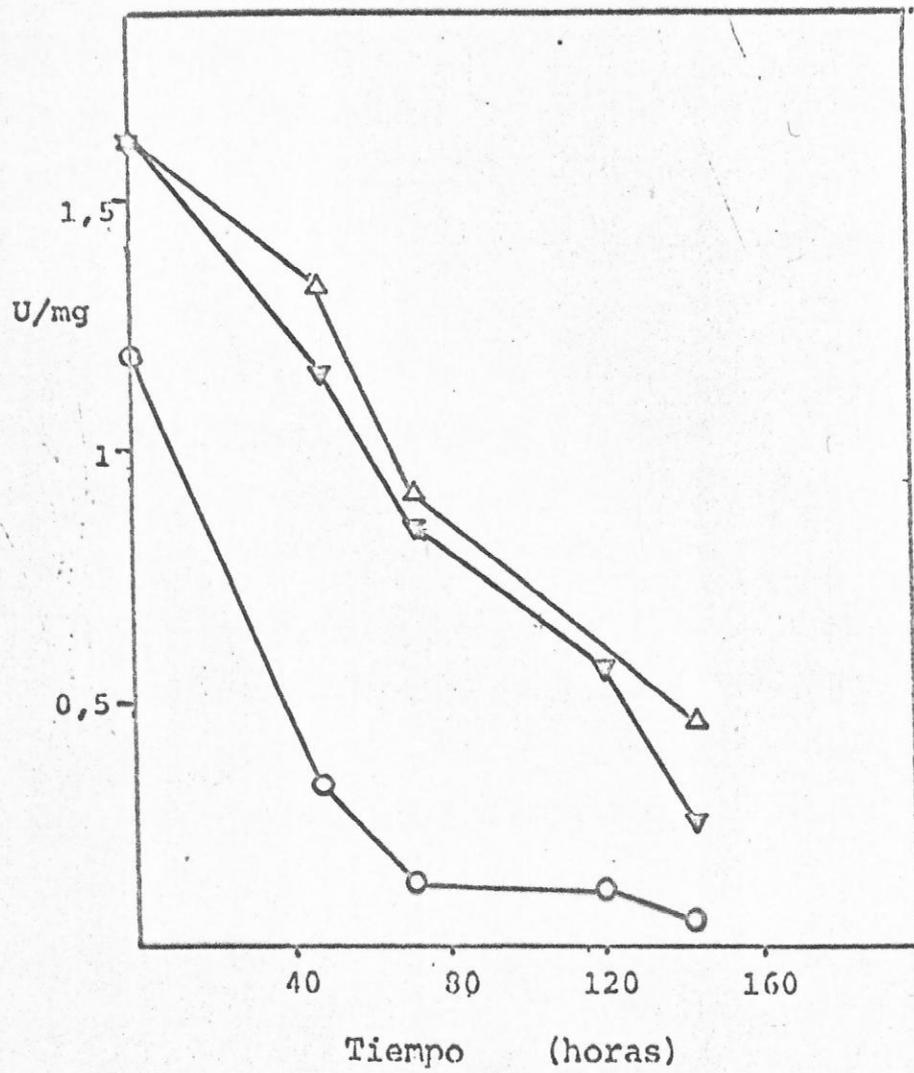
El extracto en fosfato 0,1 M pH 7,4 es bastante inestable, ya que generalmente pierde la mitad de la actividad en unas 24 horas, lo que impone una severa limitación a los estudios en el extracto. En los estudios preliminares de purificación de esta actividad (78), se había encontrado que la prenilsintetasa era estabilizada durante un fraccionamiento con sulfato de amonio si el extracto contenía glicerol 10%, 40 mM EDTA y DTT 0,1 mM (78). Sin embargo estas adiciones no modifican la inactivación durante el almacenamiento en solución ni cuando el extracto se guarda congelado. De aquí que fuera imperativo intentar la estabilización de la enzima en el extracto. Como se ve en el experimento mostrado en la Figura 14, la actividad decae rápidamente si el extracto, obtenido en tampón fosfato pH 7,4, se dializa contra el mismo tampón. En cambio la velocidad de inactivación es significativamente menor cuando el extracto se dializa contra succinato 0,1 M pH 6, o cuando se dializa contra succinato pH 6 y se redializa contra tampón de fosfato pH 7,4. La interpretación más simple de este resultado es que la diálisis a pH ácido permite remover un inactivante

Figura 14

Efecto de diálisis a distintos pH en la estabilidad de la prenilsintetasa de un extracto de polvo cetónico de flavado de Citrus sinensis

Dos volúmenes de 9 ml de un extracto de polvo cetónico preparado como se describe en Materiales y Métodos, se dializaron contra 1 lt de tampón succinato 50 mM pH 6; una de las fracciones dializadas se guardó, y la otra se redializó contra fosfato 0,1 M, pH 7,4. Otro volumen adicional del mismo extracto, 8 ml, se dializó contra fosfato 0,1 M pH 7,4, sin diálisis previa contra el tampón succinato. Todos los tampones contuvieron EDTA 2 mM DTT 0,1 mM.

En las fracciones así obtenidas se determinaron las actividades FPP sintetasa e IPP isomerasa; la actividad de la primera se obtuvo restando la contribución de la segunda, que fue casi despreciable en las condiciones del ensayo. Δ — Δ , extracto dializado contra succinato, \circ — \circ extracto dializado contra fosfato, ∇ — ∇ extracto dializado contra succinato y fosfato.



de bajo peso molecular; esto no ocurre a pH 7,4. Se ve también en la Figura 14 que las dos fracciones de extracto dializada contra fosfato, idénticas salvo por la diálisis previa de una de ellas a pH ácido, muestran distintas actividades específicas iniciales, lo que sugiere que el inactivante es también un inhibidor.

Los pigmentos del extracto no son los responsables de esta inactivación rápida, ya que el espectro de absorción del extracto no se altera ni la solución de diálisis tiene absorbancia medible entre 250 y 320 nm.

Cualquiera sea el inactivante y el mecanismo que permite su eliminación a pH 6, la suposición más simple respecto, a la interacción del inactivante con el sistema es que esta es de carácter polar ya que su remoción se logra bajando el pH en solo 1,4 unidades. Por lo tanto, cualquier tratamiento que interfiera con este tipo de interacciones debería aumentar la estabilidad de la prenilsintetasa. Como se ve en Tabla 11, la estabilidad de la prenilsintetasa aumenta luego de un fraccionamiento en sulfato de amonio. La alta concentración de sal durante este proceso podría interferir directa o indirectamente en la interacción inactivante-proteína.

La estabilidad de la prenilsintetasa depende también de sus características: la GPP transferasa de hígado de cerdo es inactivada por reactivos de tioles (50);

Estabilidad de una preparación de prenilsintetasa purificada por dos fraccionamientos sucesivos con sulfato de amonio.

Tiempo almacenamiento (días)	Actividad residual (%)
0	100
4	108,4
7	96
12	65

La enzima, preparada por dos precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio entre 45 y 65% de saturación, como se describe en el texto, se almacenó a 4° en fosfato 0,1 M, pH 7,4, EDTA 2 mM, DTT 0,1 mM, a una concentración de proteínas de 2 mg/ml.

El ensayo de actividad se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

esto permite comprender el efecto DTT y EDTA en nuestra enzima (78), ya que esta se inactiva rápidamente en cualquiera de los estados de purificación, en ausencia de estos compuestos. Un efecto similar se ha descrito recientemente para la sintetasa de hígado de ave (51).

La adición de glicerol al extracto (10%, v/v) permite obtener excelentes rendimientos en los fraccionamientos con sulfato de amonio. Se ha descrito un efecto estabilizante de glicerol en varias enzimas (119, 120, 121) pero este alcohol no mejoró la estabilidad de la sintetasa durante el almacenamiento. La estabilidad de la enzima no mejora en ninguno de los estados de pureza descritos en esta Tesis cuando la preparación enzimática se congela. Sin embargo, si la solución de enzima congelada se deseca por liofilización se obtiene una preparación indefinidamente estable, aun para el caso del extracto.

2.3. Descripción general de la purificación.

La purificación de las actividades prenilsintéticas que se describe en este trabajo se llevó a cabo en las siguientes etapas:

- A. Fraccionamiento del extracto con sulfato de amonio entre los límites de 45 y 65% de saturación.
- B. Fraccionamiento con sulfato de amonio de la preparación así obtenida entre los mismos límites.
- C. Cromatografía en Sephadex G-100.

D. Cromatografía en DEAE Sephadex o DEAE celulosa.

E. Cromatografía en Sephadex G-150.

2.4. Primer fraccionamiento en sulfato de amonio.

El extracto de polvo cetónico, preparado en 0,1 M fosfato pH 7,4, glicerol 10%, DTT 0,1 mM, al que se agregó después de la extracción EDTA hasta una concentración final de 45 mM, se fraccionó entre 45 y 65% de saturación en sulfato de amonio. Para esto, se agregó sulfato de amonio sólido hasta alcanzar una concentración equivalente a 45% de saturación: la sal se molió previamente sólo hasta eliminar los grumos. La precipitación se llevó a cabo en cámara fría, con agitación suave (60 a 80 rpm) con una hélice de vidrio, y durante 20 a 25 minutos. Luego se dejó estabilizar con agitación durante 15 minutos más y la suspensión se centrifugó a 15000xg x 10 minutos. La pella se eliminó y el sobrenadante se llevó del mismo modo a 65% de saturación. La purificación fue de 1,5 a 3 veces y el rendimiento varió entre 80-120%, para la actividad FPP sintetásica; el rendimiento para la GPP sintetasa fue usualmente 20 a 30% mayor. El rendimiento fue alto sólo observando estrictamente las condiciones descritas. Aparentemente hay un efecto específico de glicerol en la protección de la actividad durante el fraccionamiento, ya que esto no se observó en otras etapas de la purificación. Una interpretación de este efecto es que el glicerol modifica las interacciones proteína

colorante durante el fraccionamiento; estas interacciones podrían ser drásticamente alteradas en un medio de alta fuerza iónica, según se infiere del compartamiento de una fracción de enzima sometida a este tratamiento en una columna de Sephadex G-100, comparada con una fracción no tratada (sección 2.6). Esta preparación de enzima contuvo una cantidad apreciable del color original.

2.5. Segundo fraccionamiento en sulfato de amonio.

La pella obtenida en la precipitación anterior se disolvió en fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4, EDTA 40 mM, DTT 0,1 mM, glicerol 10%, en un volumen tal que la concentración de proteína fue de 2-3 mg/ml. El pH de esta solución varió entre 7 y 7,2. Se repitió el fraccionamiento con sulfato de amonio, del mismo modo.

Este proceso fue menos reproducible que el anterior, ya que una fracción variable de la actividad prenilsintetásica se distribuyó entre las pellas 0 y 45% y 45 a 65% de saturación. Aparentemente esto resulta de una combinación de efectos de la concentración de proteínas y del pH. Cuando la concentración de proteína inicial fue de 6 a 9 mg/ml, el pH resultante de la solución fue menor que 7, probablemente debido a que en estas condiciones los compuestos ácidos originales del extracto están también en mayor concentración. Hasta el 50% de la actividad prenilsintetásica precipitó en el fraccionamiento de 0 a 45% de saturación

en alta concentración de proteína y bajo pH. En cambio cuando la concentración inicial de proteína se ajustó entre 2 a 3 mg/ml no más del 20% de la actividad se encontró en esa fracción. Esta actividad perdida en la primera precipitación parece aceptable si se considera el alto rendimiento del proceso y la eliminación parcial de la IPP isomerasa y las fosfatasas; el rendimiento varió entre 80 a 100% y la purificación entre 3 y 3 veces,

2.6. Cromatografía en Sephadex G-100.

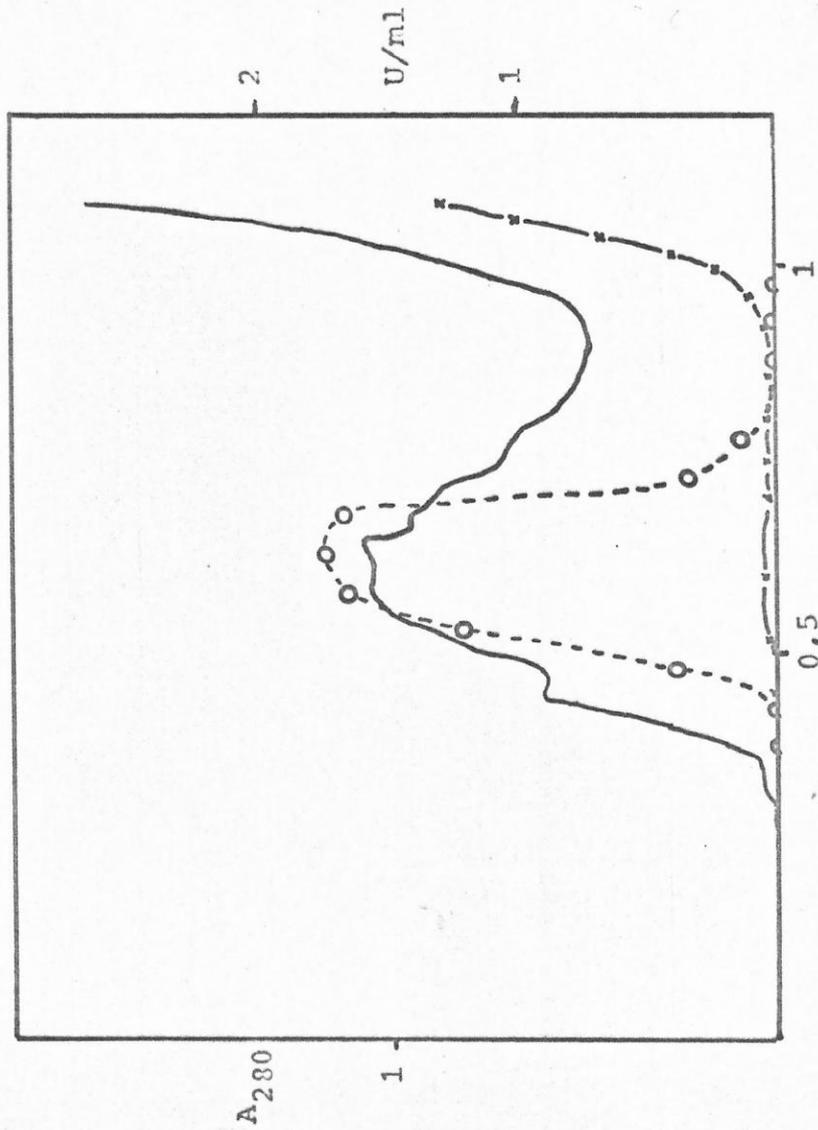
La pella obtenida en el último fraccionamiento se disolvió en un volumen mínimo de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4, glicerol al 10% (v/v), DTT 0,1 mM, y 40 mM EDTA. Esta solución (30-60 mg/ml) se aplicó a una columna de Sephadex G-100, preequilibrada en fosfato 0,1 M, pH 7,4, EDTA 2 mM y 0,1 mM DTT, y se eluyó con el mismo tampón. En algunos experimentos se utilizó un tampón succinato pH 6, que contuvo EDTA y DTT a la misma concentración anterior, lo que no introdujo alteraciones ni en el rendimiento o la purificación enzimática, ni en el patrón general de elución.

Como se ve en la Figura 15, toda la proteína eluyó de la columna en un solo ancho pico separándose de los componentes coloreados de la muestra (determinados por A_{310} en la Figura 15). El pico de proteínas no se puede resolver, independientemente de cualquier factor como

Figura 15

Cromatografía en Sephadex G-100

2,9 ml (46,1) mg de la 2a. pella 45-65% de sulfato de amonio, se aplicaron a una columna de 108 cm³ (diámetro 1 cm), estabilizada en succinato de potasio 0,1 M, pH 6, EDTA 2 mM y DTT 0,05 mM. Las fracciones fueron de 1 ml y el flujo se ajustó a 7 ml/hora. En el eluido se determinó A₂₈₀ (—), A₃₁₀ (x—x), y actividad FPP sintética (o----o) como se describe en Materiales y Métodos.



Volumen de elución (en vol. de columna)

relación volumen de la muestra/volumen de la columna, geometría de la columna, flujo o tampón usado. Todas las actividades enzimáticas que se han ensayado en el eluido, prenilsintetasa, IPP isomerasa (29), fosfatasas (78) (determinadas por radiactividad en lípidos libres), y $1\text{-}^3\text{H-GPP}$ fosfatasa (88), se reparten a todo lo ancho del pico sin separación significativa. Este comportamiento se mantiene al recromatografiar en la misma columna la fracción de proteína (78). Por lo tanto, en este sistema prevalece un alto grado de interacción proteína-proteína.

Esta etapa se usó rutinariamente para librar a la preparación enzimática de los componentes coloreados, que interfieren en la cromatografía de intercambio siguiente. La condición para lograr este objetivo es la presencia de sulfato de amonio en la muestra. Si se cromatografía un extracto no precipitado o un precipitado previamente dializado no hay separación de proteína y color. El rendimiento de la etapa fue de un 80%, sin purificación, si es que esta se refiere a la actividad enzimática total recuperada en el proceso, pero la purificación es virtualmente completa si la actividad específica se refiere a la concentración de colorantes, expresados por su absorbancia a 310 nm.

2.7. Cromatografía de intercambio aniónico.

El eluido de proteína de la cromatografía anterior se concentró por ultrafiltración en un equipo Amicon (membrana PM-30), o por liofilización, y se estabilizó por diálisis en fosfato 0,01 o 0,015 M pH 7,4, DTT 0,1 mM, EDTA 2 mM. Luego se aplicó a una columna de DEAE Sephadex o DEAE celulosa preequilibrada en el mismo tampón, y se eluyó inmediatamente con una gradiente lineal de fosfato entre las concentraciones de 0,01 a 0,1 M, o 0,015 a 0,15 M. El volumen total de la gradiente fue igual a 6 volúmenes del lecho.

La mayor parte de la proteína (95%), incluyendo la actividad fosfatásica residual, cluye en el volumen "vacío" de la columna, sin retenerse, mientras que la prenilsintetasa es eluida cuando la concentración calculada del tampón alcanza a 60-70 mM.

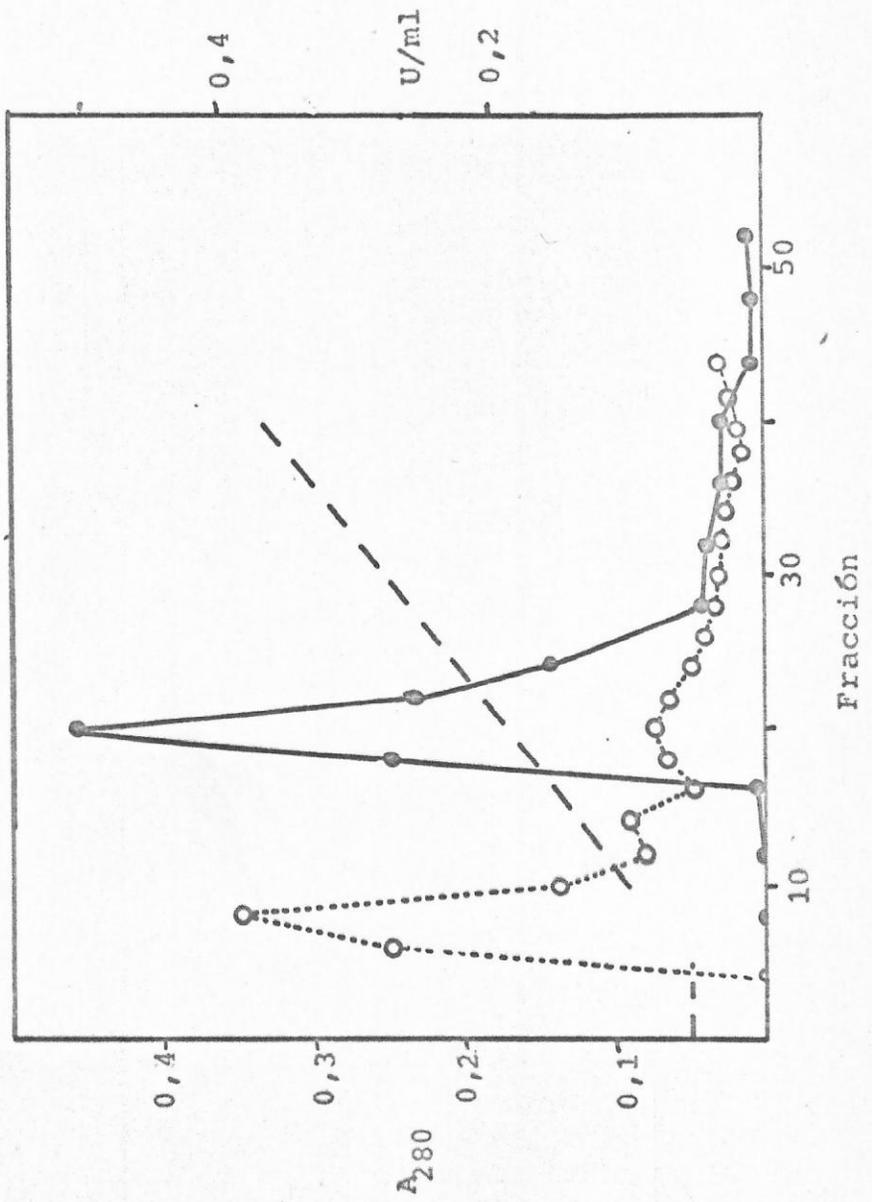
Estas cromatografías se ensayaron primero en DEAE Sephadex (Figura 16): aunque la purificación obtenida osciló entre 30 a 50 veces respecto al extracto inicial, el rendimiento fue solo de un 10%. Este valor se pudo aumentar hasta un 30% cuando la cromatografía se llevó a cabo en presencia del sustrato alílico GPP, que estabiliza a la prenilsintetasa en solución; en estas condiciones la actividad se distribuyó en un número muy grande de fracciones (Figura 17), de tal modo que una fracción importante de la

Figura 16

Cromatografía en DEAE Sephadex

15,1 ml del eluido selecto de la columna de Sephadex G-100 se estabilizaron por diálisis en fosfato 30 mM pH 7,4, EDTA 2 mM, y DTT 0,1 mM. Se aplicó a una columna de 39 cm³ (diámetro de 1,5 cm) y la concentración de fosfato se aumentó linealmente hasta 150 mM; el volumen de la gradiente fue de 200 ml. Se colectaron fracciones de 4 ml, a un flujo de 33 ml/hora. En el eluido se determinó A₂₈₀ (O---O) y actividad FPP sintetásica (O—O), como se describe en el texto.

Purificación: 32 veces, rendimiento: 6,4%, respecto al extracto. --- , concentración de fosfato en el eluido.



actividad cocromatografía con la actividad IPP isomérica, que eluye un poco después (Tabla 12). La inactivación es menor al usar DEAE celulosa; en la Tabla 13 se muestra una comparación entre dos experimentos exploratorios con ambos intercambiadores. Estos resultados sugieren que la prenilsintetasa se inactivaría irreversiblemente al unirse a la matriz del DEAE Sephadex, ya que la pérdida de actividad no se debe a la remoción de un activador o a la destrucción de una estructura cuaternaria activa, según se demostró en experimentos de recombinación de las fracciones eluidas. El patrón de elución en las columnas de DEAE celulosa fue idéntico al de las de DEAE Sephadex.

Cuando la muestra no se libró por completo de colorantes en la cromatografía anterior, una fracción importante de la actividad eluyó con el pico principal de proteína (Figura 17); este artificio se debe probablemente a que las sustancias coloreadas modifican la interacción de la prenilsintetasa con las demás proteínas. La mayor parte del color se retiene en la columna de intercambio. Esta interacción es tan intensa que los pigmentos no se pueden remover lavando la columna ni con NaOH 0,1 M, ni con fosfato 1 M pH 7,4, o succinato 1 M pH 6 (88). Sólo un solvente de fuerza iónica muy alta, como el sulfato de amonio saturado (aproximadamente 5,2 M, $\mu = 35$ M), es capaz de romper estas interacciones (83).

Tabla 12

Distribución de IPP isomerasa y FPP sintetasa en eluidos selectos de una cromatografía en DEAE Sephadex

Fracción	Actividad especifica (U/mg)	
	IPP isomerasa	FPP sintetasa
I	0,02	0,07
II	0	1,06
III	1,15	1,49

Las actividades se ensayaron como se describe en Materiales y Métodos, en un tiempo de 15 min. Las fracciones se obtuvieron de la cromatografía en DEAE Sephadex mostrada en la Figura 17.

En el cálculo de la actividad de la sintetasa se restó la contribución de la isomerasa.

Tabla 13

Comparación de la recuperación de actividad FPP sintética en cromatografías en DEAE Sephadex y DEAE Celulosa.

Matriz	Actividad en la muestra	Actividad recuperada en el eluido activo (U)	Porcentaje recuperado
DEAE-Sephadex ^a (Tampón de elución con GPP)	2,86	0,84	29,3
DEAE-Celulosa ^b (Elución sin GPP)	15,8	16,2	102,5

a. 5.8 ml de una preparación de prenilsintetasa purificada por cromatografía en DEAE-Sephadex, en fosfato 0,03M pH 7,4, EDTA 2 mM, DTT 0,1 mM, GPP 1,9 μ M se aplicaron a una columna de 10,3x0,9 cm estabilizada en el mismo tampón. Se eluyó con 10 ml del mismo tampón y luego con 15 ml de fosfato 0,1 M pH 7,4 EDTA 2 mM, DTT 0,1 mM, GPP 1,9 μ M. Flujo = 1,25 ml/min.; se colectaron 23 fracciones de 1,1 ml. las fracciones 12 a 20 se juntaron y concentraron inmediatamente en un equipo Amicon (membrana PM-30). El conjunto de fracciones 1 a 11 no tuvo actividad FPP sintética. No se recobró actividad al eluir la columna con fosfato 1 M pH 7,4.

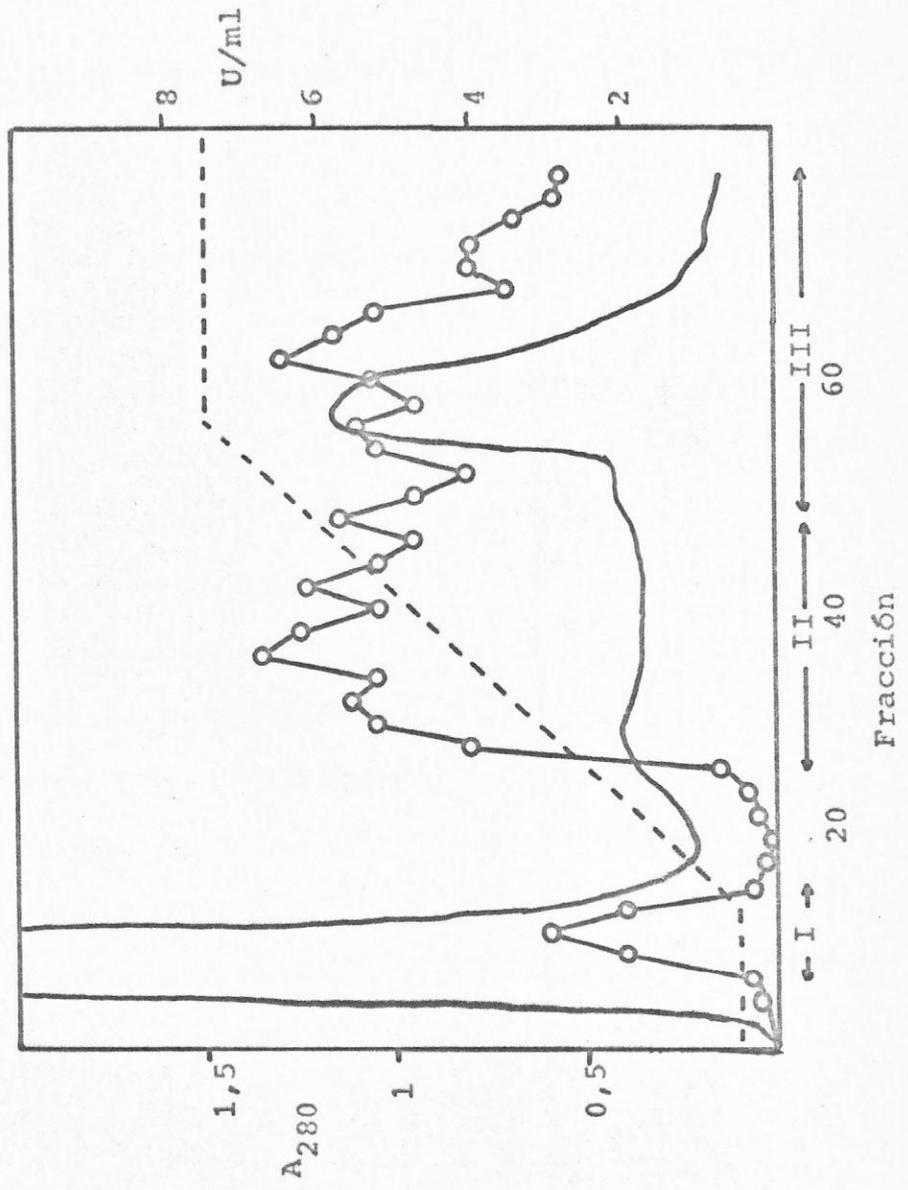
b. 0,6 ml de un eluido de Sephadex G-100, en fosfato 17 mM, pH 7,4, EDTA 0,3 mM se aplicaron a una columna de DEAE celulosa estabilizada con fosfato 10 mM pH 7,4, EDTA 2mM, DTT 0,1 mM. Se eluyó con 10 ml de fosfato 10 mM, fosfato 0,1 M y fosfato 1 M. Estos tampones contienen además EDTA 2 mM y DTT 0,1 mM. Se colectaron fracciones de 10 ml. Flujos = 1 ml/min. Sólo el eluido de 0,1 M fue activo. Las dimensiones de esta columna fueron las mismas de la anterior.

Figura 17

Cromatografía en DEAE Sephadex en un tampón que contiene geranil pirofosfato 2,5 μ M

34 mg de proteína en un volumen de 11 ml, se aplicaron a una columna de 35 cm³ (diámetro 0,9 cm), estabilizada en tampón fosfato 0,01 M pH 7,4, EDTA 2 mM, DTT 0,1 mM, GPP 2,5 μ M. La cromatografía se desarrolló aplicando una gradiente lineal (vol. total de 200 ml) hasta 0,15 M fosfato, el resto de los componentes a concentración constante. Se colectaron fracciones de 7 ml a un flujo de 0,7 ml/min. En el eluido se determinó A₂₈₀ (—) y actividad FPP sintetásica (o—o). La actividad enzimática que cocromatografía con el pico principal de proteína es un artificio de las condiciones: la muestra no fue totalmente desprovista de colorantes antes de aplicarla a la columna (ver texto).

Los números romanos indican las fracciones que se mezclaron para la determinación de actividad mostrada en la Tabla 12.



2.8. Cromatografía en Sephadex G-150.

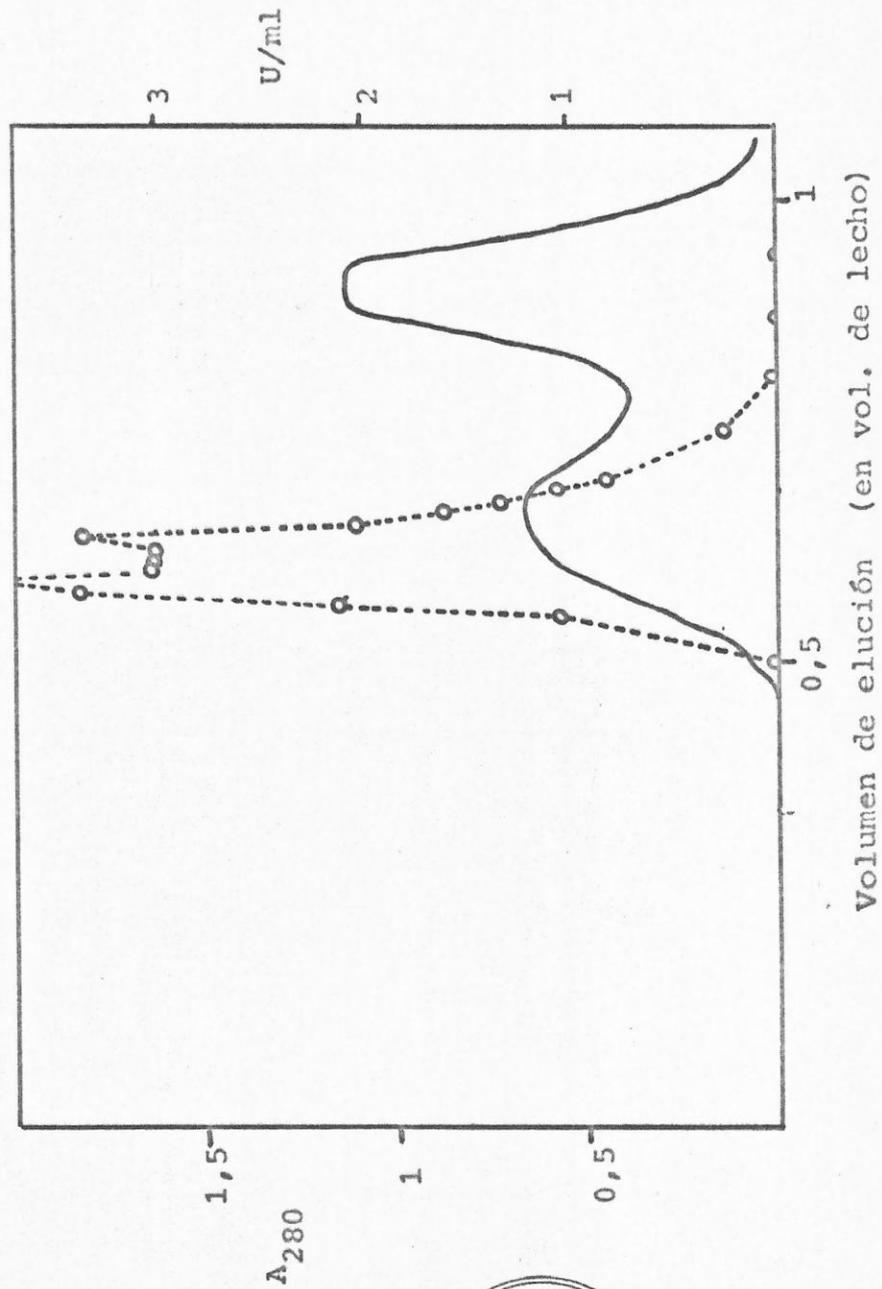
El análisis de la preparación enzimática obtenida en la cromatografía anterior por electroforesis en geles de poliacrilamida reveló la presencia de dos proteínas principales contaminadas con otras tres bandas muy débiles. El hecho de que estas proteínas cocromatografien en la columna de intercambio sugiere que ellas tienen una carga negativa más o menos equivalente a pH 7,4; por lo tanto, la separación durante la electroforesis debería resultar de una diferencia en tamaño más que en carga. Esta hipótesis se puso a prueba en una columna de Sephadex G-150, que tiene un rango de resolución de PM mayor que la forma G-100 (92), ya que el PM de la prenilsintetasa es de 86000 en otros sistemas (42, 43).

Con este fin el eluido activo de la cromatografía de intercambio se concentró por liofilización, se disolvió en 1 ml de agua y se aplicó en una columna de Sephadex G-150, de 79x0,8 cm. La columna se estabilizó previamente en fosfato 0,1 M, sin agregar los protectores y la cromatografía se desarrolló usando un flujo de 2,6 ml/ml/hora. Como se ve en la Figura 19, aparecen dos familias de proteínas limpiamente separadas en el eluido. La prenilsintetasa se distribuyó en dos picos levemente adelantados al primer pico de proteínas. Estas fracciones enzimáticas son idénticas en cuanto a la proporción de

Figura 18

Cromatografía en Sephadex G-150

2,81 mg de proteína purificada por una cromatografía en DEAE celulosa se aplicaron a una columna de 40 cm³ (diámetro 0,8 cm), estabilizada en fosfato 0,2 M pH 7,4. Volumen de las fracciones, 0,54 ml; flujo, 2,5 ml/hora. En el eluido se determinó A₂₈₀ (—) y actividad FPP sintética (o---o), como se describe en Materiales y Métodos.



productos cis y trans que generan, y respecto a la velocidad de desnaturalización térmica. Así, esta disociación de actividades se podría deber simplemente a un equilibrio de asociación proteína-proteína, y no a dos distintas prenilsintetasas. El rendimiento de esta cromatografía fue de un 50%, y la purificación de 70 a 100 veces, respecto al extracto.

2.9. Evaluación de la ruta de purificación.

2.9.1. Eliminación de la actividad isopentenil pirofosfato isomerásica.

Como se muestra en la Tabla 14, la actividad IPP isomerasa se recupera en un 140% luego del primer fraccionamiento con sulfato de amonio. Este valor osciló entre 80 y 140% y la purificación entre 1,5 y 3 veces. Sin embargo, durante la segunda precipitación esta actividad se redujo consistentemente a un 20-30% de la actividad inicial, sumando la actividad remanente en las pellas de 45 y 65% de saturación. No hubo actividad en el sobrenadante. Este hecho sugiere que la enzima es irreversiblemente inactivada cuando el pH inicial del fraccionamiento está alrededor de 7, ya que no hay ninguna otra diferencia con el primer fraccionamiento fuera de la composición proteica.

La actividad IPP isomerásica remanente en el segundo fraccionamiento de 65% de saturación cocromatografió con la prenilsintetasa durante la cromatografía en Sephadex G-100,

Tabla 14

Distribución de la actividad IPP isomerasa en las primeras fracciones de la purificación

Fracción	Vol. (ml)	Prot. total (mg)	Act.es- pecif. (U/mg)	Act.total (U)	Recupe ración %	Purif. (veces)
Extracto	155	119	0,19	22,6		1
1a. frac. 45-65%	24,5	49	0,65	31,8	140,7	3,4
2a. frac. 0-45%	4,7	6,9	0,21	1,45	6,4	1,1
2a. frac. 45-65%	1,5	18,5	0,3	555	24,5	1,6
Eluido se- lecto Sepha- dex G-100	13	12,5	0,58	7,25	32,1	3,05

pero se retuvo más en la cromatografía de intercambio, de modo que se pudo separar eficientemente de la prenilsintetasa por la elución con la gradiente lineal de fosfato. Por lo tanto, la actividad isomerásica fue tan baja en las fracciones de prenilsintetasa obtenidas finalmente de la columna de Sephadex G-150, que no se la detectó por ensayo directo de alílicos ni por análisis de productos en el cromatógrafo de gases.

2.9.2. Eliminación de las fosfatasas.

El segundo fraccionamiento con sulfato de amonio sirvió para eliminar casi toda la actividad fosfatásica, como se ve en la Tabla 15; alrededor de un 10% de la actividad inicial, o 3% de la del extracto, acompañó a la prenilsintetasa en la pella 45-65% de saturación. Del mismo modo que para la distribución de la sintetasa, se observó un cierto grado de dispersión en la distribución de esta actividad entre ambas pellas. Aparentemente, igual que antes, los factores fundamentales en la distribución son la concentración de proteínas y el pH. A baja concentración de proteínas y pH mayor que 7, la fosfatasa (determinada usando IPP o FPP como sustratos), cae casi cuantitativamente en la pella de 45% de saturación.

La actividad fosfatásica remanente se pudo separar completamente de la prenilsintetasa durante la

Tabla 15

Distribución de la actividad 1-³H-FPP fosfatasa en las primeras fracciones de la purificación.

	Vol. (ml)	Prot. total (mg)	Act.es- pecif. (U/mg)	Act. total (U)	Recupe ración %	Purif. (veces)
Extracto	500	535	12,4	6634		1
1a. frac. 0-45%	44	183	0	0	0	0
1a. frac. 45-65%	28,1	215	18,9	4064	61,3	1,5
2a. frac. 0-45%	6	112	17,4	1948	29,4	1,4
2a. frac. 45-65%	2	19	10,2	194	2,9	0,8

cromatografía de intercambio (Figura 19), determinada usando IPP o FPP como sustratos.

2.9.3. Eliminación de los colorantes del extracto.

En la Figura 15 se muestra el retraso del color respecto a las proteínas en la cromatografía en Sephadex G-100. Virtualmente todo el color puede ser separado de la proteína bajo condiciones cromatográficas adecuadas. Esta resolución solo se produce cuando la muestra proviene de una precipitación con sulfato de amonio y se ha aplicado a la columna, en consecuencia, en un solvente de alta fuerza iónica. Si se omite la etapa de precipitación el color y la proteína eluyen en el mismo volumen.

En la Figura 20 se muestran los espectros de absorción UV del extracto, eluido de proteína y eluido de color de la columna de Sephadex. Se ve que $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$ en el extracto; este máximo no se debe a los cromóforos de las proteínas ya que en esta determinación del espectro, el extracto se diluyó hasta una concentración de proteína de 0,02 mg/ml. El mismo máximo aparece en el eluido de pigmento de la columna de Sephadex G-100, que no tiene proteínas, determinada por el método turbidimétrico a la máxima sensibilidad (alrededor de 0,1 mg/ml). Por lo tanto la absorción del extracto en el UV resulta de la absorción de los pigmentos y no de la proteína, cuya contribución es casi

Figura 19

Elución de la actividad fosfatásica en una columna de intercambio

764 mg de proteína se aplicaron a una columna de DEAE celulosa de 1,5x24 cm, que se desarrolló usando un gradiente total de 280 ml, como se muestra en la Figura, entre los límites de 10 a 150 mM fosfato, el resto de las condiciones como se describe en Materiales y Métodos. En el eluido se determinó A_{280} (O--O), y actividad fosfatásica (O----O) como se describe en Materiales y Métodos. Gradiente de fosfato-----

Figura 20

Absorción UV del extracto y de las fracciones obtenidas en la cromatografía en Sephadex G-100.

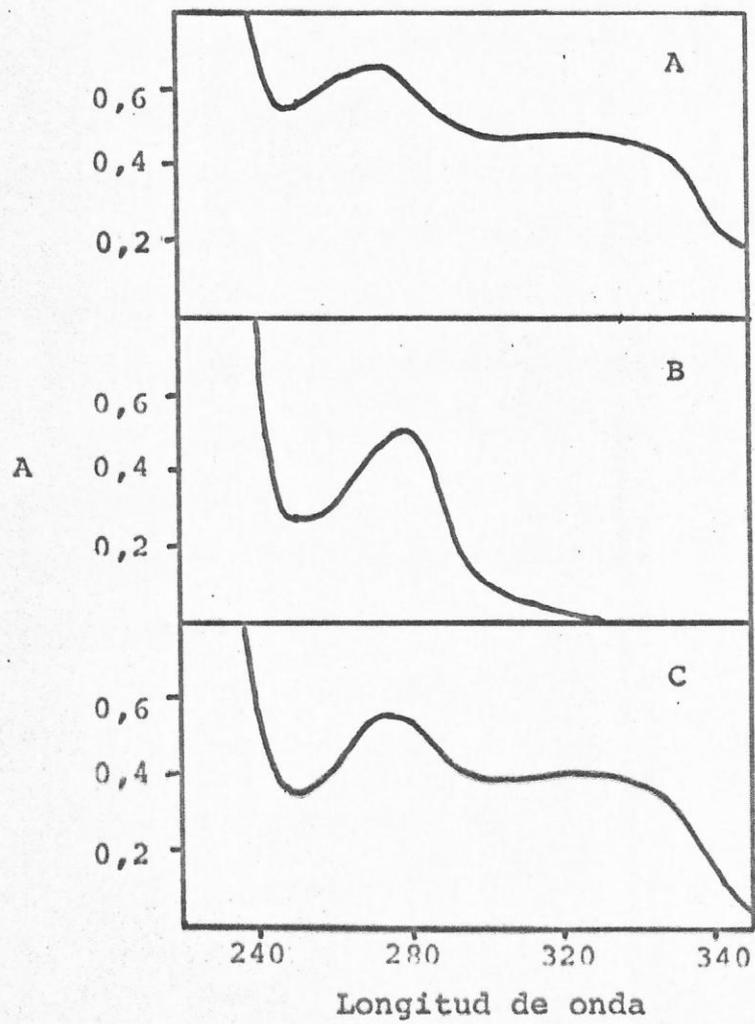
Se muestra el espectro de absorción entre 240 y 360 nm

para: A. extracto diluido 50 veces, concentración de proteína en la cubeta, 0,02 mg/ml.

B. Eluido de proteína de la columna de Sephadex G-100; concentración de proteína en la cubeta, 0,5 mg/ml.

C. Eluido de pigmento de la columna de Sephadex G-100, diluido 20 veces en la cubeta; la fracción original no contiene proteínas.

La concentración de proteínas de cada muestra se determinó por el método turbidimétrico.



despreciable.

En cambio, el eluido de proteína de la columna de Sephadex G-100, muestra el típico espectro de proteínas, con un máximo en la región de 280 nm y un mínimo en 250 nm.

En principio, la separación de los pigmentos de la proteína podría resultar de dos efectos, como se discute a continuación. La interacción entre estos compuestos podría ser de carácter polar, probablemente iónica, como lo indica el hecho que la resolución requiere de alta fuerza iónica en el solvente en que se disuelve la muestra antes de la aplicación para la cromatografía; además los pigmentos se retienen fuertemente en columnas de intercambio, mientras que casi toda la proteína eluye sin retenerse, bajo las condiciones usadas en este trabajo. Esto sugiere que la carga de los colorantes es fuertemente negativa a pH 7,4, mientras que la de las proteínas podría ser positiva; la interacción colorante-DEAE Sephadex (o celulosa) es iónica: puede ser removido de la columna por una solución saturada de sulfato de amonio, pero no por urea 4 M (83). De este modo, el primer factor involucrado en la separación de proteínas en la columna de Sephadex podría ser la ruptura de interacciones iónicas por el sulfato de amonio del medio. El segundo factor se puede deducir de la observación del patrón de elución de la cromatografía mostrado en la Figura 15. Se ve que los pigmentos eluyen claramente

después de un volumen de columna, lo que indica interacción entre ellos y la matriz de dextrano del Sephadex (152). Se ha descrito a los flavonoides como compuestos capaces de formar puentes de H con macromoléculas (111), por ejemplo, proteínas; esta capacidad podría explicar la débil retención de los colorantes en la columna de Sephadex.

Por lo tanto, la resolución entre proteína y colorantes se conseguiría combinando la ruptura inicial de la interacción proteína-colorantes con el desarrollo a través de toda la cromatografía de una interacción colorantes-dextrano. Esta hipótesis es formalmente similar al esquema de la cromatografía de "intervención", de Kierkegaard (153). La separación completa de ambos componentes requiere de columnas muy largas bajo las condiciones descritas en esta Tesis; sin embargo, si la hipótesis planteada más arriba es correcta, podría ser posible resolver completamente entre ambos en columnas pequeñas usando sulfato de amonio en el tampón de estabilización y elución, que actuaría como un "interventor" de acuerdo al esquema de Kierkegaard.

Fuera de la aplicación para el extracto de polvo cetónico, la secuencia precipitación con sulfato de amonio-cromatografía en Sephadex G-100 se ha usado exitosamente en el Laboratorio para la separación de proteína y color en extractos de flavedo de C. sinensis (78), flavedo de C. limonum (29), y de plántulas de P. radiata.

Todos estos extractos tienen un color diferente, lo que sugiere que contienen distintos pigmentos. Por lo tanto, el método podría ser aplicable a un amplio rango de sistemas crudos vegetales, por lo que podría sumarse a la lista de tratamientos descritos para la separación de proteína y pigmentos en sistemas vegetales (111); sin embargo, el procedimiento aquí descrito parece mucho más suave y eficiente que estas metódicas, suponiendo que la enzima de interés soporte una precipitación salina y una cromatografía en Sephadex.

2.9.4. Evaluación de la purificación de la sintetasa.

El desarrollo de la ruta de purificación aquí presentado (Tabla 16) estuvo complicado por la inestabilidad de la enzima en solución, en todos los niveles de la purificación, y por la desnaturalización de la enzima durante la cromatografía de intercambio en DEAE Sephadex. El proceso tiene un buen rendimiento hasta la etapa de Sephadex G-100 (alrededor de 80%, ver Tabla 16), pero en la etapa siguiente se pierde aproximadamente el 90% de la actividad inicial. Debido a las limitaciones en la cantidad de material de partida disponible y a las dificultades prácticas involucradas en su obtención, no es posible desarrollar un proceso destinado a conseguir la purificación sustancial de una enzima de flavedo de Citrus, si el rendimiento-enzimático del procedimiento es pobre. Por esta razón se gastó mucho tiempo y trabajo en la exploración de las condiciones adecuadas para aumentar el rendimiento de la cromatografía de intercambio

Tabla 16

Resumen de un proceso de purificación de prenilsintetasa

Frac.	Vol. (ml)	Conc. Prot. (mg/min)	Prot. total (mg)	Act.esp. (U/mg)	Act.total (U)	Rend. (%)	Purif. (veces)	Razón* C ₁₀ /C ₁₅
Extracto 1990		1,3	2587	1,08	2794	100		2,1
1a.frac. 45-65%	430	2,42	1040,6	2,45	2549	91	2,26	1,49
2a.frac. 45-65%	16,8	60	808	3,44	2779	99,4	3,18	1,44
Eluido Seph. G-100	18,3	38,6	706,4	8,11	5728	205	7,4	1,39
Eluido Selecto DEAE cel.	1,9	0,45	8,6	55,9	481	17	51,7	1,44
Combinac. eluidos activos Seph. G-150	2,56	0,08	0,2	77,71	1,55	0,6	71,7	-

* Se refiere a la razón de actividades específicas de GPP y FPP sintetetasas.

en DEAE Sephadex; esto no se pudo conseguir, como se describe sumariamente en la sección 2.7. de este Capítulo. Sin embargo, cuando dispusimos de DEAE celulosa, encontramos que el rendimiento de esta cromatografía podía aumentar significativamente.

Por otro lado, la cromatografía siguiente en Sephadex G-150 se llevó siempre a cabo en ausencia de los protectores DTT y EDTA. El rendimiento enzimático de esta etapa, relativa a la anterior, fue de 50%; este valor podría aumentar en presencia del reductor y el complejante. Es probable que la adición de GPP al tampón de elución aumente aun más la recuperación de actividad en esta etapa; sin embargo, este sustrato podría alterar el patrón de elución, como ocurre en la cromatografía de intercambio.

Aunque las cromatografías en DEAE celulosa y Sephadex G-150 no se exploraron exhaustivamente, se puede esperar sobre la base de las consideraciones anteriores, que el rendimiento final del proceso mejore notablemente, al afinar el detalle de las condiciones.

Ya que estábamos más interesados en conseguir una fracción desprovista de los contaminantes enzimáticos (IPP isomerasa y fosfatasas), y los no proteicos, que en obtener una preparación enzimática homogénea, se dedicó comparativamente poco tiempo al análisis de la composición proteica de las distintas fracciones por electroforesis

en gel. Además, nos pareció más importante la exploración de las dos prenilsintetasas estereoespecíficas en la preparación purificada, que caracterizar definitivamente su estado de pureza. Los estudios de electroforesis se complicaron por la extensa inactivación de la enzima durante el procedimiento: se recupera menos del 1% de la actividad inicial luego de la electroforesis a pH 8,9; esto dificulta la asignación de una de las bandas de proteínas como la(s) prenilsintetasa(s). El primer eluido activo de la cromatografía en Sephadex G-150 no contiene más de 3 proteínas, si es que una de estas especies corresponde a la prenilsintetasa, lo que no se pudo determinar con absoluta certeza.

3. Purificación de 2-cis-farnesil pirofosfato sintetasa.

El efecto inhibitorio de los fosfolípidos sobre la actividad prenilsintetásica en extractos de P. radiata o de polvo catónico de flavedo de C. sinensis, podría interpretarse alternativamente a la inhibición directa de la enzima, como una estimulación del metabolismo del FPP; por ejemplo, aumentando la velocidad de la transformación de farnesol en aldehídos sesquiterpénicos (72, 73). Como estos últimos compuestos aparecen en la fracción lípidos libres, se llevó a cabo un análisis por cromatografía en fase gaseosa de los productos de la reacción en esta fracción; así se encontró un pico de radiactividad que cocromatografía con 2-cis-farnesol auténtico (Figura 21). La

Figura 21

Biosíntesis de 2-cis,6-trans y 2-trans,6-trans-farnesol por un extracto de polvo cetónico de flaveo de Citrus sinensis.

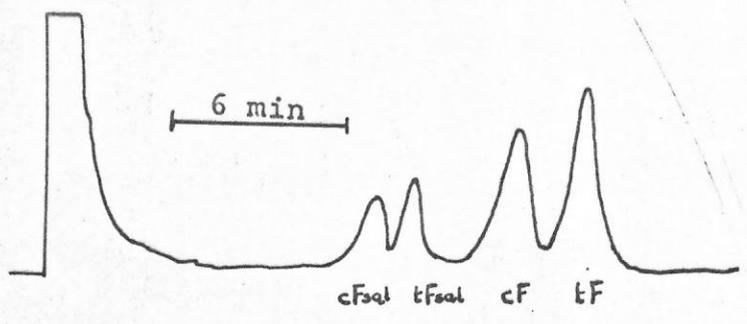
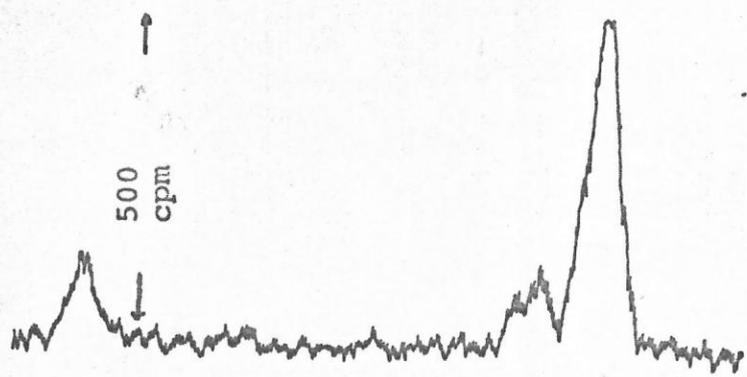
0,3 mg de un extracto de polvo cetónico se incubaron por tiempos variables (ver Figura 22) con IPP radiactivo (145000) cpm, bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos, excepto que el tampón del ensayo fue succinato de potasio 0,1 M, en un volumen final de 1 ml.

La enzima se dializó previamente contra el mismo tampón.

A lo tiempos indicados en la Figura 22, la reacción se detuvo enfriando, y los alcoholes se extrajeron como se describe en Materiales y Métodos.

A cada fracción lípidos libres se agregaron 200 ug de cis y trans farnesol y 2-cis,6-trans y 2-trans,6-trans-farnesol, se concentró a unos 200 µl, a presión reducida (0,1 torr), y la fracción concentrada se silió usando 20 µl de bis-(trimetilsilil)-acetamida; el producto siliado se inyectó al cromatógrafo. Se usó una columna de SE-30, a 165°, isotérmico; el flujo de He se ajustó a 40 ml/min. El resto de las condiciones de análisis se describen en Materiales y Métodos.

El cromatograma mostrado corresponde a un tiempo de incubación de 30 minutos (ver Figura 22). El trazado superior es el perfil de radiactividad del eluido. cFsal=cis-farnesol, tFsal,trans-farnesol; cF y tF, cis y trans-farnesol.



biosíntesis de este compuesto a partir de MVA se describió en 1972 en este Laboratorio (71), y más tarde se demostró la existencia de una vía que conduce a la generación de este alcohol: en este proceso, el 2-cis-farnesol resulta de la isomerización trans-cis de 2-trans-farnesol mediada por la formación de los respectivos aldehídos sesquiterpénicos (72, 73). Sin embargo, el análisis de nuestra fracción de lípidos libres no mostró aldehídos, la adición de fosfolípidos no tuvo efecto en la distribución de productos.

Estos resultados nos llevaron a investigar la síntesis de aldehídos sesquiterpénicos en el extracto de polvo cetónico. El extracto fresco de flavedo de naranja forma aldehídos en ausencia de NAD^+ (71), probablemente debido a la presencia endógena de este cofactor: la adición de NAD^+ al medio de ensayo acelera la transformación de 2-trans-farnesol en aldehídos. En cambio, en el extracto de polvo cetónico hay una etapa de purificación intermedia, la preparación de este material de trabajo. Por lo tanto, el contenido de NAD^+ endógeno debería ser menor, y la velocidad de formación de aldehídos sesquiterpénicos, concomitantemente más lenta. De aquí que se diseñó un experimento en que la reacción entre IPP y GPP se dejó proceder durante una hora en ausencia de NAD^+ agregado, en tampón succinato pH 6 para acelerar la formación de 2-trans-farnesol; a la hora se agregó el cofactor. Tal como se ve en la

Figura 23, la síntesis de trans-farnesal sólo se evidencia después de la adición de NAD^+ y el cis-farnesal aparece después de la formación de su isómero, exactamente como se había descrito antes (71). Sin embargo, el 2-cis-farnesol aparece muy temprano en el curso de la reacción, antes de la adición de NAD^+ e independientemente de una formación detectable de los aldehidos. Estos hechos sugerían que el diastereómero cis se formaba no por un mecanismo de isomerización trans-cis, sino que por condensación directa de GPP con IPP. Por lo tanto, se llevó a cabo un experimento de condensación de corta duración, y luego de extraer los lípidos libres del incubado e hidrolizar los pirofosfatos remanentes con fosfatasa alcalina y apirasa, se analizaron los alcoholes primarios así formados. El eluido del cromatógrafo de gases mostró radiactividad asociada a 2-cis-farnesol y 2-trans-farnesol (Figura 23). Es muy difícil interpretar este resultado por una hipótesis que excluya la formación de 2-cis-FPP, es decir, que no implique una reacción de condensación directa catalizada por una prenilsintetasa. Sin embargo, para descartar definitivamente la posibilidad de isomerización trans-cis mediada por los respectivos aldehidos (72), se repitió el experimento en presencia de anilina: este compuesto forma una base de Schiff con el 2-trans-farnesal, bloqueando la transformación de este aldehido en el isómero 2-cis (72), e impidiendo así la

Figura 22

Biosíntesis de farnesoles y farnesales por un extracto de polvo cetónico de flavedo de Citrus sinensis.

Se estudió la formación de aldehídos incubando varios tubos tal como se describe en la leyenda de la Figura 21; la reacción se detuvo en dos de ellas a la media hora y a la hora, y al resto se agregó NAD^+ (0,23 mM final) en este instante, y se dejó proceder durante dos horas más. El análisis de cada fracción se detalla en la Figura 21.

- radiactividad asociada a trans-farnesol
- radiactividad asociada a cis-farnesol
- radiactividad asociada a trans-farnesal
- radiactividad asociada a cis-farnesal

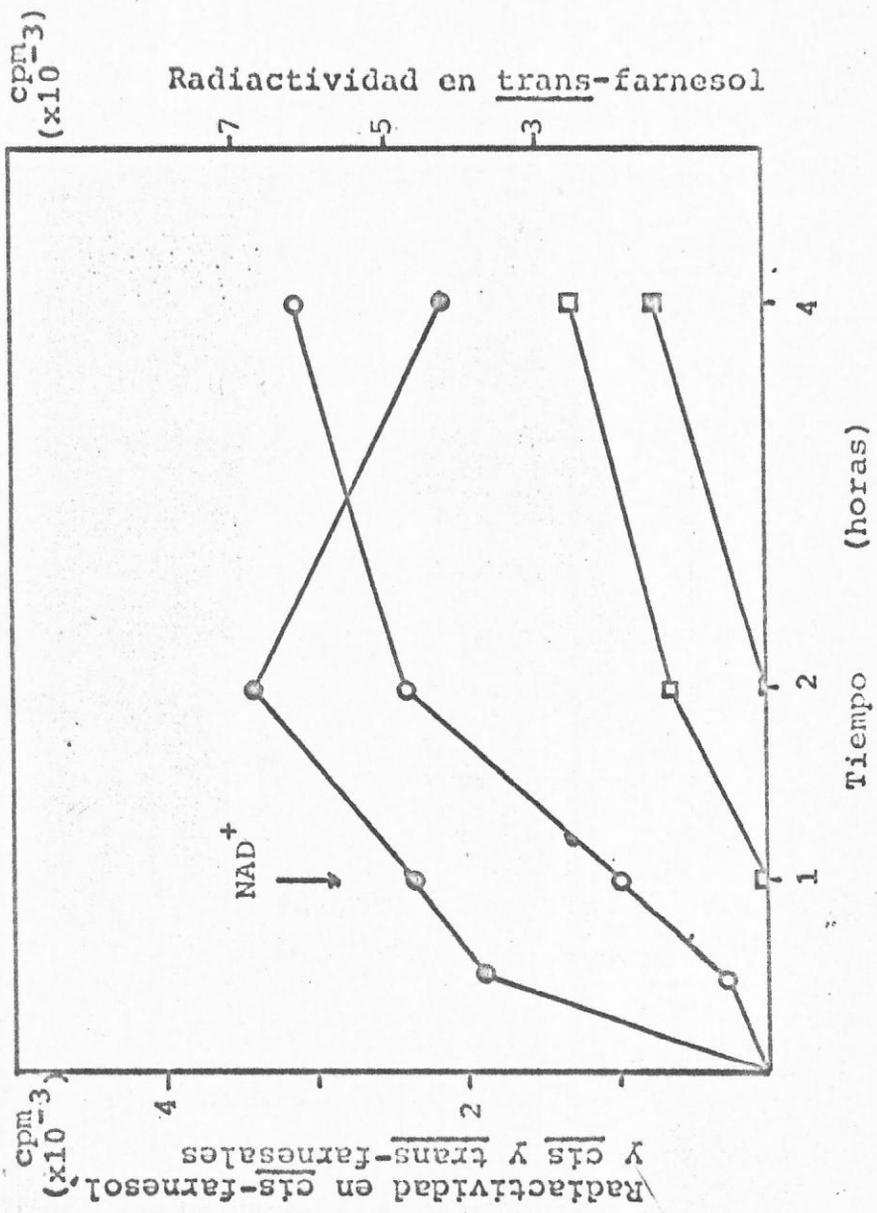
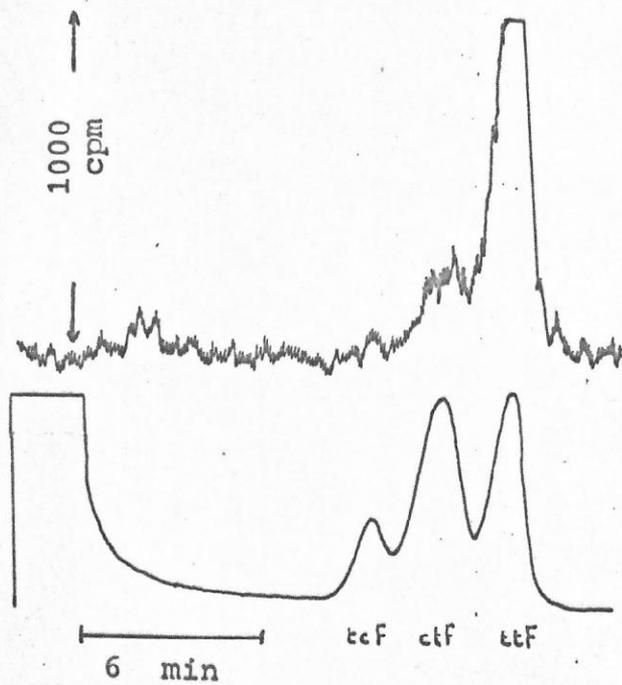


Figura 23

Biosíntesis de 2-cis,6-trans-farnesil pirofosfato

0,65 mg de proteína de un extracto de polvo cetónico de Citrus sinensis se incubaron 30 minutos con 1-¹⁴C-IPP, (131000 cpm) en un volumen de 1 ml, bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos, excepto que el tampón fue succinato 0,1 M pH 6. El extracto se dializó previamente contra el mismo tampón. La fracción lípidos libres se extrajo y en la fase acuosa se realizó el análisis de prenol fosfatos, como se describe en Materiales y Métodos. La nueva fracción etérea se concentró a presión reducida (0,1 torr) luego de agregar 400 ug de 2-cis y 2-trans-farnesol como portadores; la fracción concentrada se sililó y analizó como se describe en la leyenda de la Figura 22.



formación del cis farnesol mediada por este mecanismo. Como se muestra en la Figura 24, la generación de cis-FPP por un extracto de polvo cetónico procedió independientemente de la presencia de anilina en el medio de reacción. Estos hallazgos demuestran que este sistema de polvo cetónico es capaz de formar el diastereómero 2-cis del farnesil pirofosfato.

La síntesis de este compuesto podría, en principio, resultar de tres mecanismos independientes:

1. De la actividad de una cis-prenilsintetasa que forma 2-cis-FPP condensando IPP con GPP.
2. De la actividad de una isomerasa capaz de transformar el 2-trans-FPP en su isómero 2-cis.
3. De una actividad prenilsintetásica no específica respecto al producto (34), que condense IPP y GPP para dar ambos isómeros.

No se hizo ningún intento por discernir entre estas posibilidades en el extracto, ya que la disponibilidad de una ruta de purificación y de una preparación de enzima purificada debería en principio excluir algunas de las alternativas señaladas.

En la Figura 25 se muestra la distribución de productos de los eluidos activos obtenidos de la columna de Sephadex G-150. Se ve que ambas sintetizan NPP, GPP, y ambos diastereómeros del FPP en una razón trans/cis de

Figura 24

Efecto de anilina 8 mM en la biosíntesis de 2-cis,6-trans-farnesil pirofosfato

0,011 mg de una preparación de enzima purificada por cromatografía en DEAE Sephadex se incubaron con 1-¹⁴C-IPP (90300 cpm), por 30 minutos, en un volumen de 0,5 ml. El resto de las condiciones se describe en Materiales y Métodos, excepto que a uno de los tubos se agregó anilina a una concentración final de 8 mM. El análisis se llevó a cabo como se indica en la Figura 23.

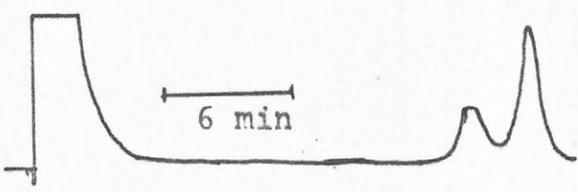
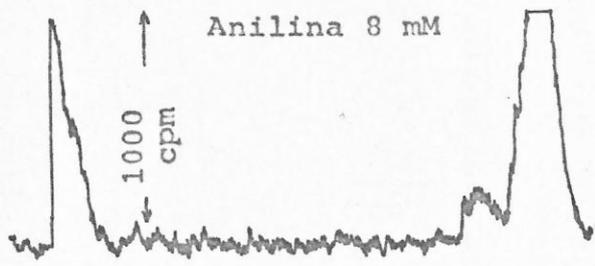
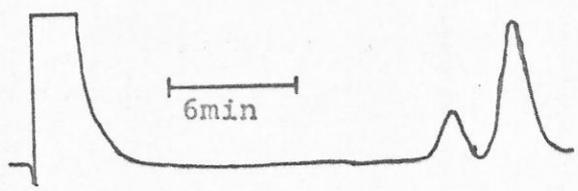
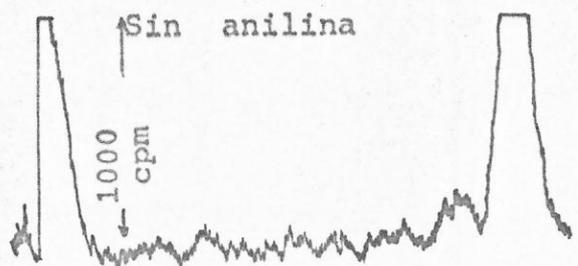
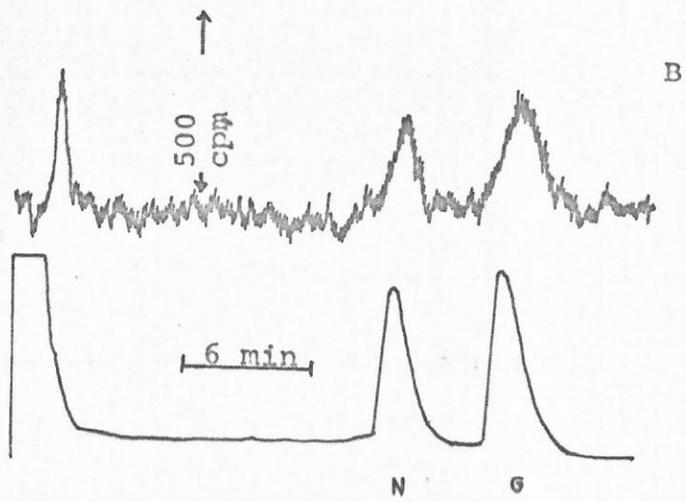
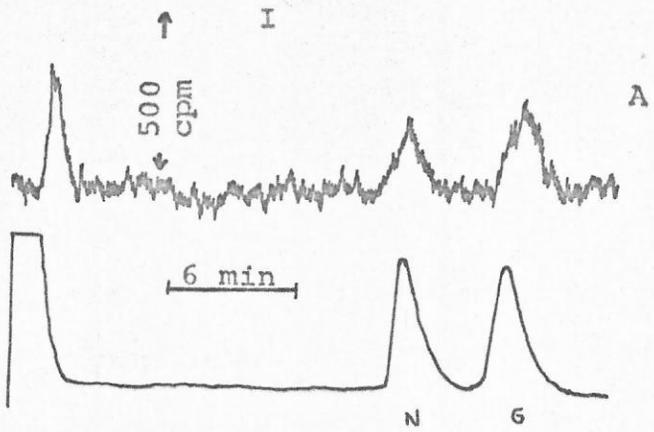
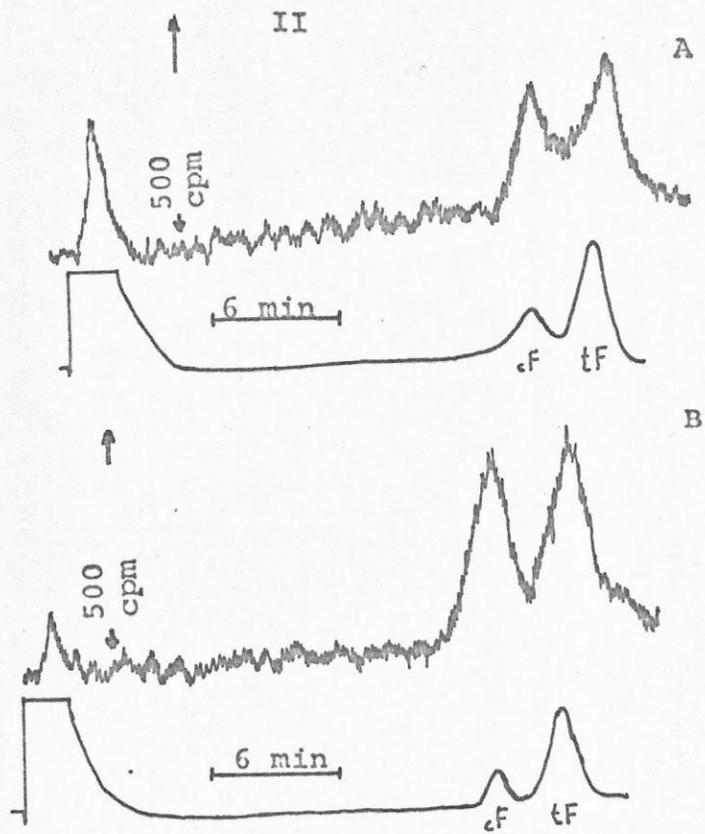


Figura 25

Biosíntesis de neril pirofosfato, 2-cis-farnesil pirofosfato, geranil pirofosfato y 2-trans-farnesil pirofosfato por la preparación enzimática purificada.

15 μ g de las fracciones enzimáticas purificadas por cromatografía en Sephadex G-150, se incubaron con IPP radiactivo, bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos, excepto por la omisión de ATP y por el uso de un tampón succinato 0,1 M, pH 6. Se determinaron las actividades C_{10} y C_{15} sintetetasas usando DMAPP y GPP, respectivamente. La reacción se detuvo calentando 1 minuto a 100° , y los pirofosfatos se llevó a cabo un análisis de prenil fosfatos, como se describe en Materiales y Métodos. Los alcoholes así producidos se extrajeron con éter de petróleo; las fracciones en que se determinó actividad C_{10} sintetasa se agregó 200 μ g de nerol, geraniol, 2-cis y 2-trans-farnesol; una alícuota adecuada se concentró a unos 200 μ l, la fracción concentrada se inyectó al cromatógrafo; se usó una columna de EGA, a 110° , que se llevó a 165° luego de la elución de geraniol; el flujo de He fue de 40 ml/min. El análisis de la síntesis de C_{15} se llevó a cabo del mismo modo, pero usando sólo los sesquiterpenoles como portadores, e inyectando a 165° en una columna de SE-30; la fracción concentrada se sililó antes de la inyección como se describe en la Figura 21.





A: productos obtenidos usando la fracción enzimática de menor volumen de elución de la columna de Sephadex G-150,

B: productos obtenidos usando la fracción de mayor volumen de elución de la misma columna.

N: nerol; G: geraniol; cF: cis-farenol; tF: trans-farenol.

I : síntesis de C₁₀ prenil pirofosfatos; A, usando la fracción enzimática de mayor PM de la columna de Sephadex G-150; B, ídem, pero usando la fracción de menor PM aparente

II : síntesis de C₁₅ prenil pirofosfatos; A y B, igual que antes.

aproximadamente 1,5. Estos datos apoyan la hipótesis de que ambas fracciones de la columna de Sephadex G-150 no son más que distintas formas de agregación de ambas enzimas (sección 2.8.).

La razón de productos trans/cis se ha alterado drásticamente respecto a la del extracto, como se ve al comparar con el patrón de productos obtenido en el extracto, (Figura 23), lo que es muy difícil de explicar si existe una sola sintetasa inespecífica respecto al producto. Así la formación de los dos diastereómeros cis y trans podría deberse a la existencia de dos enzimas: dos prenilsintetasas o una transferasa más una isomerasa.

A fin de descartar definitivamente la tercera posibilidad se diseñó un experimento de estabilidad térmica: se determinaron las condiciones de tiempo, temperatura y concentración de proteína en que se pierde alrededor del 50% de la actividad total, medida por el ensayo de productos ácido-lábiles (Tabla 17). La preparación de enzima se preincubó en estas condiciones, y luego se determinaron los productos de condensación de C_{10} y C_{15} formados en el ensayo usual. Como se ve en la Figura 26, la actividad cis sintetasa, medida por la formación de NPP y de 2-cis-FPP, se destruye completamente y sólo GPP y 2-trans-FPP se detectan como productos de reacción. En condiciones de diferente concentración de proteína o diferentes

Tabla 17

Inactivación térmica de la actividad farnesilpirofosfato sintetásica.

		Actividad residual	
		Eluido 1*	Eluido 2*
A. Efecto de la temperatura			
Preincubación de 5 min. a	0°	100	100
" " " "	53°	93	88
" " " "	58°	82,6	82
" " " "	63°	9,6	7,1
B. Cinética de inactivación a 60°			
Preincubación de 0 min.		100	100
" " 2 "		83,5	74
" " 5 "		72,6	59,3
" " 10 "		52,3	46,2

Condiciones de la preincubación: GPP 9.5 μ M, MgCl₂, fosfato 0,1 mM, pH 7,4, DTT 0,2 mM. En el experimento B² se hizo sólo una preincubación por cada preparación enzimática, y se fueron sacando alícuotas a los tiempos indicados sobre tubos preenfriados. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

* Eluido 1: corresponde al eluido activo de mayor PM aparente de la columna de Sephadex G-150; el eluido 2 es el segundo pico de actividad.

Figura 26

Inactivación térmica de la cis-sintetasa.

Este experimento se llevó a cabo preincubando la preparación de enzima en Sephadex G-150, a una temperatura de 60° y un tiempo de 10 min, pero multiplicando los volúmenes por 4 y determinando la actividad exactamente como se describe en la Figura 17. El análisis se llevó a cabo como se describe en la Figura 25.

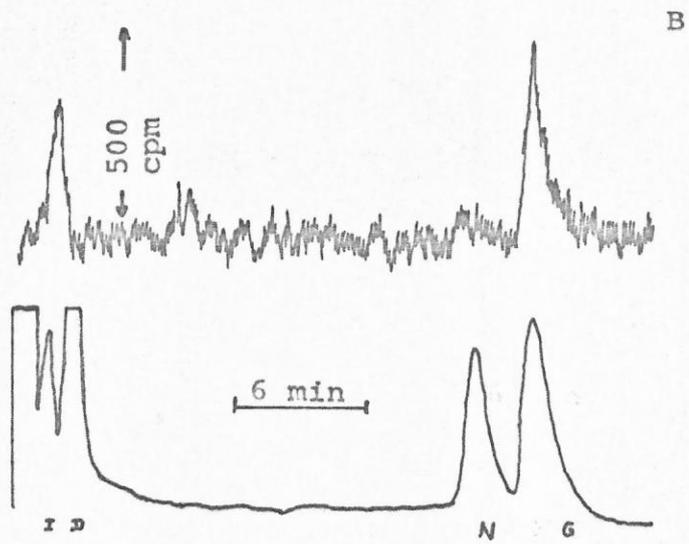
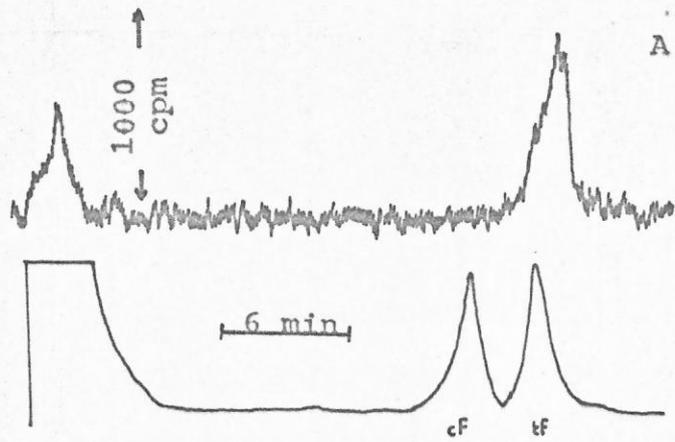


Figura 27

Determinación de K_m por IPP

En esta determinación se utilizó la preparación de enzima obtenida en la cromatografía de intercambio aniónico. La actividad se determinó en las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

- actividad DMAPP transferásica
- actividad GPP transferásica

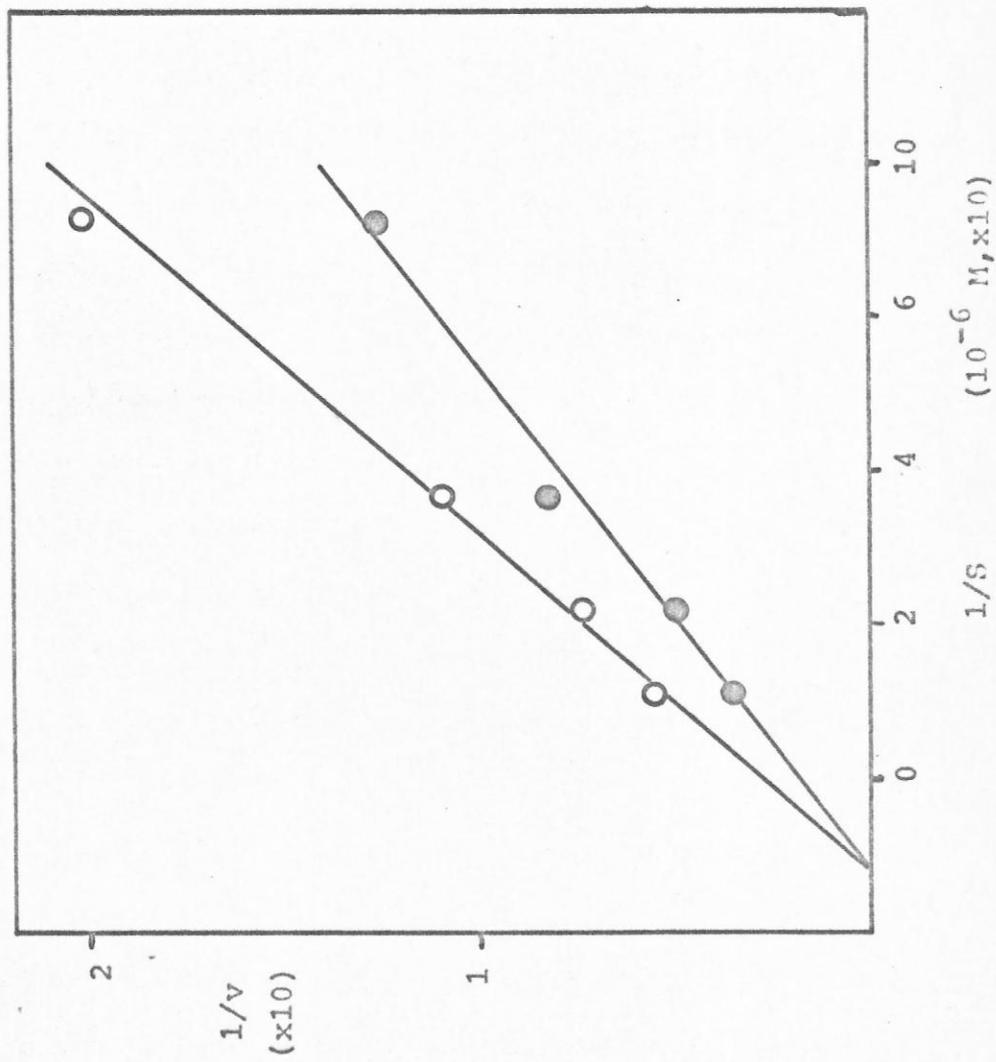


Figura 28

Determinación del peso molecular aparente de las fracciones de prenilsintetasa obtenidas por cromatografía en Sephadex G-150.

La columna se calibró usando γ -globulina, albúmina de suero, ovoalbúmina y quimotripsina (2 mg de cada una), que se cromatografiaron en la misma columna de Sephadex G-150 bajo condiciones idénticas a las usadas en la purificación de las sintetetas (Figura 18).

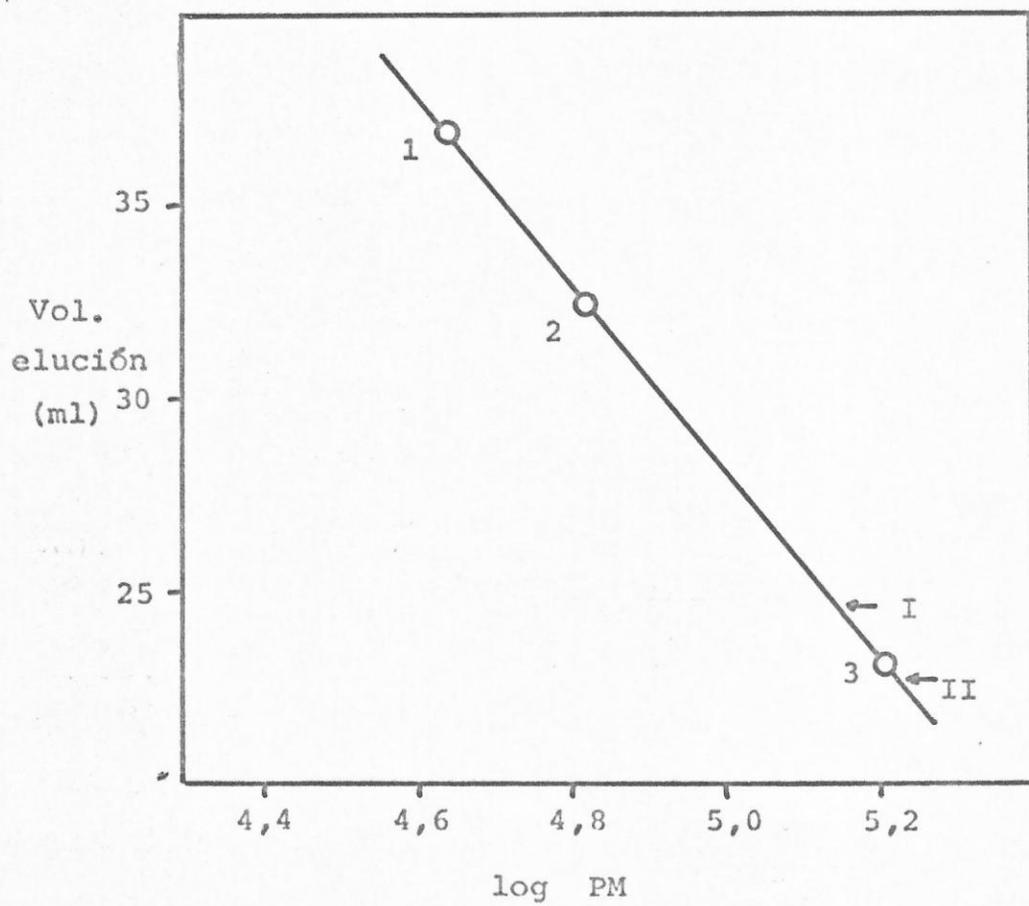
1, ovoalbúmina

2, seroalbúmina humana

3, γ -globulina

I, eluido activo de mayor volumen de elución (Figura 18)

II, eluido activo de menor volumen de elución.



de inactivación de las sintetasas cis y trans, junto con un efecto indeterminado de la concentración de proteína. El primer argumento es apoyado por la forma de la cinética de inactivación: esta es siempre más rápida al comienzo del proceso (Figura 29), y durante la inactivación rápida la actividad cis sintetasa desaparece por completo (Figura 26). Además, esta misma actividad se pierde por completo cuando la preparación purificada de enzima se guarda en solución un mes en 2 mM DTT y 5 μ M GPP: en cambio la actividad trans se mantiene en un 80% en el mismo período, en las mismas condiciones. En ausencia de GPP, en cambio, ambas actividades decaen a 0 en un par de semanas. Estos hechos, que se aprovecharon para aumentar la estabilidad de la enzima en solución, demuestran que el GPP es capaz de estabilizar ambas enzimas, y que la cis sintetasa es intrínsecamente menos estable que su homóloga trans.

5. Efecto de fosfolípidos sobre la actividad prenilsintetasa.

En la Tabla 19 se muestra el efecto de fosfatidilcolina comercial de soya, que contiene alrededor de 30% de fosfatidiletanolamina, sobre una preparación de prenilsintetasa proveniente de una columna de Sephadex G-150. Esta preparación no tiene actividad fosfolipolítica de IPP ni de FPP: de aquí que, como se ve en el control, no hay incorporación en la fracción lípidos libres. Sin embargo, se ve

Figura 29

Efecto de los sustratos alifáticos en la inactivación térmica de las sintetasas.

0,08 mg de enzima purificada por cromatografía en DEAE Sephadex se incubaron a los tiempos de la Figura, a 50°, en fosfato 0,1 M pH 7,4, MgCl₂ 7,5 mM, en presencia de GPP 19 μM (○—○), DMAPP 53,5 μM (Δ—Δ), o en ausencia de estos sustratos (○—○), y la actividad se determinó después a 37°, en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, excepto por la omisión de ATP.

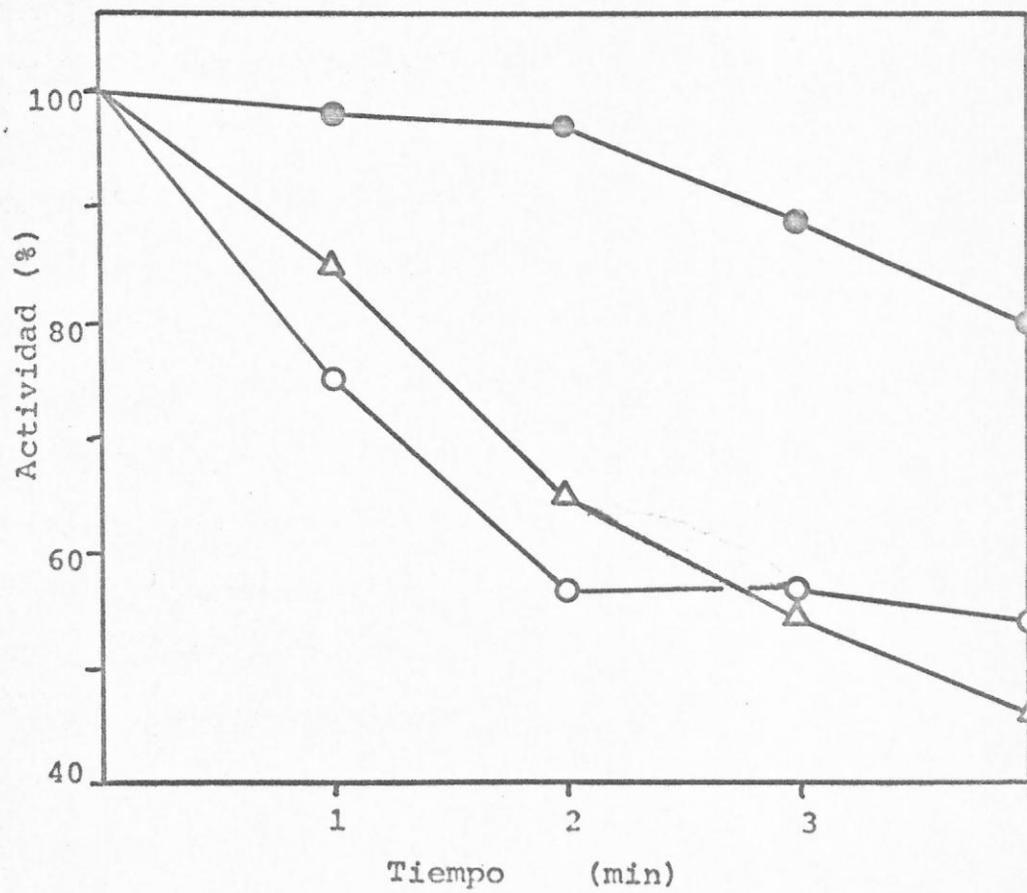


Tabla 19

Efecto de lecitina de soya sobre la prenilsintetasa purificada

	Sustrato e producto en lípidos libres*	Actividad prenilsin- tetásica
	(nmoles)	(U/ng)
Control	0	79,9
Control de extracción	0,26	91,4
Adición de lecitina 1mg/ml	0,29	101

El ensayo de actividad se llevó a cabo por 15 min. en las condiciones descritas en Materiales y Métodos, usando 3,6 ug de enzima purificada.

La lecitina se suspendió por sonicación antes de agregarla al medio de ensayo.

*Calculado a partir de la radiactividad de la fracción lípidos libres; no se puede expresar como actividad fosfatásica ya que esta preparación de enzima está desprovista de estas actividades.

que la adición de fosfolípidos antes o después de la incubación implica aparición de radiactividad en esta fase. Este resultado fuerza a concluir que los fosfolípidos pueden transportar prenilpirofosfatos (las únicas especies radiactivas en solución) hacia la fase orgánica. No hay un efecto significativo sobre la actividad prenilsintetásica, determinada por la incorporación en alílicos. Este resultado indica que no hay efecto de fosfolípidos sobre la prenilsintetasa, y que los efectos observados en el extracto se deben a alguna interacción compleja que probablemente involucra algún otro componente.

El experimento de la Tabla 20, hecho con la misma enzima apoya esta opinión. En este experimento se preincubó la prenilsintetasa con una concentración muy alta de fosfolipasa C; el objetivo fue destruir lípidos aun ligados a la enzima a pesar del proceso de purificación. A esta concentración de fosfolipasa, se observa un aumento en la fracción lípidos libres, presumiblemente debido a la presencia de una fosfatasa contaminante de la preparación de fosfolipasa C, que no es inhibida por la *o*-fenantrolina usada para detener la acción de esta última enzima. Ocurre igualmente una inactivación parcial de la prenilsintetasa que presumiblemente se debe a una proteasa de la preparación comercial de fosfolipasa.

Tabla 20

Efecto de fosfolipasa C y lecitina de soya sobre la actividad de la prenilsintetasa purificada

Condición	nmoles de* sustrato o producto en lípidos libres*	Actividad prenilsintetásica (U/mg)
<u>Enzima no preincubada con fosfolipasa C</u>		
Control	0	77,9
Control de extracción	0,25	98,8
Adición de lecitina de soya, 4 mg/ml	0,18	103,8
<u>Enzima preincubada con fosfolipasa C</u>		
Control	0,39	39,4
Control de extracción	0,35	85,4
Adición de lecitina de soya, 4 mg/ml	0,18	83,8

En cada ensayo, 3,6 ug de enzima se preincubaron con 1 mg de fosfolipasa C en un volumen de 0,22 ml, durante 15 min., a 37°, en tampón succinato 50 mM pH 6,5, mercaptoetanol 10 mM, GPP 9,5 µM. La reacción se detuvo con β-fenantrolina (Tabla 8), y la actividad se determinó como se describe en Materiales y Métodos.

*Ver Tabla 19.

6. Efecto de fosfolípidos en la partición agua/hexano de pirofosfatos isoprénicos.

Tal como lo sugiere el experimento anterior, los fosfolípidos son capaces de transferir prenilpirofosfatos en solución acuosa hacia una fase orgánica. Sin embargo, este experimento no permite extraer conclusiones respecto a si hay o no algún grado de especificidad en la extracción de los pirofosfatos, ya que en el medio de reacción hay IPP y FPP radiactivos. En el experimento mostrado en la Tabla 21, se ensayó el efecto de lecitina de soya comercial sobre la partición fase acuosa/solvente apolar de los tres pirofosfatos IPP, GPP y FPP, en condiciones esencialmente idénticas a las utilizadas en los ensayos. Como se ve en la Tabla 21, los prenil pirofosfatos no pasan a la fase orgánica en ausencia de fosfolípidos, pero en presencia de estos hay una transferencia aparentemente específica de FPP hacia el medio apolar. Este resultado refuerza la conclusión del experimento anterior, y explica resultados como los de la Tabla 2; en esta Tabla se mostró el efecto de fosfolípidos en la transformación de ácido mevalónico en prenoles catalizada por enzimas de Pinus. El experimento se diseñó de modo de reducir drásticamente la actividad fosfatásica del extracto, lo que efectivamente se consiguió, como se ve en el control respectivo de la Tabla 2; sin embargo, la radiactividad de la fracción lípidos

Tabla 21

Efecto de lecitina de soya en la partición agua/hexano de prenil pirofosfatos.

Sustrato	Transferencia a la fase apolar	
	(pmoles/nmol de sustrato)	
	Control	Más lecitina
Isopentenil pirofosfato	0	0,9
Geranil pirofosfato	0	3,4
Farnesil pirofosfato	0	78

Un mol de $1\text{-}^{14}\text{C}$ -IPP, o $1\text{-}^3\text{H}$ -FPP, o 10 nmoles de $1\text{-}^3\text{H}$ -GPP (1 C/mol), se mezclaron con una solución de fosfato 0,1 pH 7,4, MgCl_2 10 mM, la que se agregó 1 mg de lecitina de soya comercial previamente sonicada, hasta completar un volumen de 1 ml. La solución se extrajo inmediatamente a temperatura ambiente con 1,5 ml de éter de petróleo, y se determinó la radiactividad de una alícuota. En todos los casos se llevó a cabo un ensayo control idéntico, salvo por la omisión del fosfolípido.

libres aumentó notablemente en presencia de fosfolípidos. Estos resultados demuestran que el efecto estimulante descrito por George-Nascimento y colaboradores (79), no se debe a una acción de los fosfolípidos sobre las enzimas que catalizan la conversión de MVA en prenoles, sino a la transferencia del farnesil pirofosfato generado en la incubación hacia la fase orgánica, durante la determinación de la actividad



CAPITULO III

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Interacción entre fosfolípidos y las enzimas que transforman ácido mevalónico en prenoles.

La proposición de la existencia de un efecto de fosfolípidos en la transformación de ácido mevalónico en prenoles, catalizada por enzimas vegetales, tuvo origen en dos clases de evidencia experimental: primero, un aumento en la cantidad de prenoles en presencia de fosfolípidos, determinado por la radiactividad de la fracción lípidos libres, y segundo, en la aparente especificidad de este efecto respecto a la estructura del fosfolípido (30, 79). Por lo tanto, este trabajo se planeó inicialmente como una secuencia de dos etapas fundamentales: encontrar primero la o las enzimas activadas, usando los fosfolípidos descritos como estimulantes e investigar después los requerimientos estructurales del fosfolípido usando el sistema enzimático purificado.

Con este objeto, se usaron mezclas totales de fosfolípidos provenientes de cerebro de vacuno, porcino y soya en el estudio del efecto activante de fosfolípidos en la transformación de ácido mevalónico en prenoles. Al mismo tiempo se utilizó fosfatidiletanolamina,

fosfatidilcolina, y en algunos casos fosfatidilserina todos purificados de las mismas fuentes. Uno de los sistemas enzimáticos utilizados fue un polvo cetónico de flavado de Citrus sinensis, en cuya preparación se han eliminado una gran cantidad de los lípidos neutros y polares endógenos, debido al tratamiento con acetona y éter. En este sistema, por lo tanto, cualquier efecto de fosfolípidos debería haberse observado mucho más limpiamente que en el extracto de P. radiata o el de flavado fresco de C. sinensis.

Sin embargo, los resultados demuestran categóricamente que no hay un efecto estimulador de la transformación de ácido mevalónico en prenoles, independiente del sistema enzimático y del fosfolípido usado. Esta conclusión, basada en unos 40 experimentos de incorporación de marca de $2\text{-}^{14}\text{C}$ -MVA en prenoles, fluye de la comparación entre los ensayos en que se intentó determinar el efecto del fosfolípido y los controles en que se determinó el efecto de estos compuestos en la metodología de ensayo en sí. El efecto descrito por George-Nascimento (79) se debe a un artificio de la técnica, causado por la transferencia del farnesil pirofosfato hacia la fase orgánica por los fosfolípidos, y posiblemente, por una interferencia de estos compuestos en la unión de farnesol a las proteínas del extracto; Beytia y colaboradores (60) demostraron que una

cantidad significativa de farnesol proveniente de $2\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ permanece unido a una fracción de proteína de extractos de plántulas de P. radiata, aun después de varias precipitaciones con sulfato de amonio y subsecuente cromatografía en Sephadex G-100. El farnesol unido no se extrae con éter de petróleo, pero sí con butanol (60); de este modo, un efecto físicoquímico adicional del fosfolípido puede consistir en la transferencia del farnesol unido a proteínas hacia la fase orgánica en la determinación de actividad.

Por otra parte, la especificidad estructural en el requerimiento de fosfolípido puede explicarse sobre la base de la probable influencia de la estructura del fosfolípido en su interacción con farnesil pirofosfato. Tal como se ve en la Tabla 21, sólo el farnesil pirofosfato es transferido por lecitina de soya hacia la fase orgánica, en tanto que IPP y GPP permanecen en la fase acuosa. Esta diferencia surge obviamente de la cadena hidrofóbica más larga del FPP: se ha calculado que la adición de un metileno a una cadena alifática disminuye la energía libre de transferencia desde agua a una fase apolar en unas 0,8 Kcal/mol (153). Claramente, la interacción FPP-fosfolípido resultará de la combinación de dos interacciones, una polar, y otra hidrofóbica. Es evidente de los datos de la Tabla 21 que ésta última es la determinante, ya que el grupo polar es el mismo en el IPP, GPP y FPP. Por lo tanto, la capacidad del lípido

a desarrollar interacciones hidrofóbicas también es un factor importante. Esta capacidad se expresa en los valores de la concentración micelar crítica (cmc) para moléculas anfifílicas; por ejemplo, se sabe que el valor de este parámetro es mucho menor cuando la longitud de las cadenas hidrofóbicas sustituyentes en el grupo polar aumenta (154) lo que implica que la interacción hidrofóbica se ha hecho concomitantemente mayor: análogamente, la cmc de la dipalmitoilfosfatidilcolina aumenta en cinco órdenes de magnitud cuando este parámetro se determina para su lisofosfátido, es decir, para el mismo fosfolípido con un acilo menos (125).

Por lo tanto, se puede esperar que la interacción FPP-fosfolípido será mucho menor en el caso de un lisofosfátido o en el caso de fosfolípido de cadena corta, que cuando se utilice un fosfolípido de cadena larga; en el trabajo anterior se encontró que ni la dipalmitoilfosfatidiletanolamina (C_{16}) (79), ni fosfatidiletanolamina bacteriana, fundamentalmente C_{16} (30), ni lisofosfatidiletanolamina (79), tenían efecto estimulante aparente en la transformación de ácido mevalónico en prenoles. En cambio este efecto se veía claramente al utilizar fosfolípidos de cerebro, que contienen un buen porcentaje de fosfolípidos de cadena larga (162).

En oposición a la ausencia de efecto enzimático

de los fosfolípidos medido sobre la fracción lípidos libres, se encontró una inhibición variable de la catálisis de la transformación de ácido mevalónico en prenoles en la fracción aliflica. La dispersión intrínseca de estos experimentos introduce cierto grado de incerteza en la interpretación de estos experimentos; de aquí que este efecto debe entenderse como una tendencia.

En el extracto se identificó a la prenilsintetasa como la enzima inhibida por fosfolípidos, pero cuando estos estudios se repitieron sobre la enzima purificada no se pudo demostrar ningún cambio en la actividad enzimática. Este hecho puede interpretarse suponiendo que el efecto inhibitorio de los fosfolípidos en el extracto involucra algún otro componente del sistema, por ejemplo, los colorantes, ya que no hay razón alguna por la que la prenilsintetasa haya perdido una capacidad específica de ser inhibida por fosfolípidos durante el proceso de purificación. A nuestro conocimiento, nunca se ha descrito un efecto de esta clase para las enzimas que interactúan con fosfolípidos.

Por lo tanto, la explicación de los datos de inhibición se podría explicar suponiendo que el fosfolípido refuerza una interacción enzima-inhibidor. Hay una serie de datos indirectos que apoyan esta hipótesis; por ejemplo, existe una fuerte interacción proteína-proteína-colorante, que se manifiesta en la imposibilidad de separarlos durante

una cromatografía en Sephadex G-100, en ausencia de una concentración salina inicial adecuada. Por otro lado, cuando el extracto se somete a una diálisis a pH ácido, se remueve un inhibidor, y la estabilidad de la enzima aumenta significativamente. Más aún, cuando se determina la actividad cis-sintetásica después de la cromatografía en Sephadex G-100, se encuentra un aumento significativo en esta actividad; esto sugiere que los componentes coloreados del extracto, que se separan durante esta cromatografía, inhiben fuertemente la actividad cis. Por lo tanto, no es improbable que la inhibición de la prenilsintetasa causada por fosfolípidos se base en una modificación de la interacción sintetasa-inhibidor.

Un aspecto interesante de estos estudios lo constituye la transferencia del farnesil pirofosfato hacia una fase apolar por fosfolípidos. In vivo, esto podría expresarse como una tendencia de este sustrato a dirigirse espontáneamente a un sistema de fosfolípidos. Esta mayor hidrofobicidad del FPP, en contraposición con los intermediarios que lo preceden en la biosíntesis, podría aclarar el que las enzimas involucradas en la síntesis de FPP no estén aparentemente asociadas a ningún sistema de membranas, en tanto que las enzimas que condensan FPP o GGPP por su extremo polar o las que manejan sustratos isoprénicos de mayor PM se encuentran siempre asociadas a membranas.

Por ejemplo, la escualeno sintetasa, un complejo formado por dos enzimas que transforman dos moléculas de farnesil pirofosfato en escualeno, el precursor directo de todos los triterpenos, es microsomal (155). Igualmente microsomal es el sistema análogo que transforma geranylgeranylpirofosfato en fitoeno, en la biosíntesis de carotenos (156). Las enzimas involucradas en el metabolismo de algunos poliprenoles, como la C_{55} isoprenilpirofosfato sintetasa (48) y la C_{55} isoprenil quinaso (157) son microsomales. De hecho esta última enzima es tan hidrofóbica que se ha solubilizado de la membrana mediante extracción con butanol, y no puede mantenerse en solución acuosa en la ausencia de detergentes. Más aún, de acuerdo al esquema corriente que explica el rol de poliprenil fosfatos en la biosíntesis de la pared bacterial, estos compuestos deben atravesar la membrana plasmática transportando azúcares, y retornando al interior de la célula para ser refosforilados (158).

Sin embargo, en todos los sistemas estudiados hasta ahora, las enzimas relacionadas con la síntesis de FPP desde ácido mevalónico son solubles y, aparentemente no tienen relación con los sistemas de membranas celulares. De este modo, se puede considerar a las enzimas de la biosíntesis de los isoprenoides como formando dos compartimentos, uno soluble y otro inmovilizado, en microsomas o cloroplastos, con el FPP o el GGPP como "mensajeros" entre

ambos. Esta posición clave podría tal vez explicar porqué el primero de estos compuestos es el único regulador conocido de esta vía.

2. Purificación de actividades prenilsintetásicas de *C. sinensis*.

Los estudios descritos en esta Tesis establecen una ruta para aislar la o los prenilsintetasas, que aunque no conduce a una purificación total, produce una preparación de enzima completamente desprovista de los contaminantes no proteicos y enzimáticos que interfieren en el estudio de estas enzimas, como la IPP isomerasa y las fosfatasas. Sobre la base del comportamiento de la enzima en DEAE celulosa amorfa, es probable que una cromatografía en DEAE celulosa microgranular aumente la purificación y eventualmente resuelva entre cis y trans prenilsintetasas. Una técnica adicional, o complementaria, podría consistir en la utilización de una cromatografía de filtración iónica en DEAE Sephadex. En este tipo de cromatografía, en que no hay absorción neta sobre la matriz, que es mucho más rápida y que concentra la muestra (159), uno debería esperar rendimientos muy superiores al usual de 10% obtenido por la técnica de absorción corriente en DEAE Sephadex.

Otra etapa de purificación adicional consistiría en una cromatografía en Sepharosas modificadas, que contienen residuos alquílicos de longitud variable (160) esto se

basa en una de las características conocidas de las preniltetrasas de hígado de mamíferos y de zapallo, la existencia de un surco hidrofóbico que acomoda la cadena hidrofóbica del sustrato alílico. En principio, la utilización de estas técnicas debería permitir separar las actividades cis y trans, dando con esto una prueba irrefutable de la existencia de ambas actividades y permitiendo su estudio independiente. Dentro de los objetivos propuestos en esta investigación no se contemplaría el intentar una purificación absoluta, sino demostrar la existencia de dos preniltetrasas estereoselectivas en cuanto a la conformación de los sustituyentes en torno al enlace C_2-C_3 , pero con la misma estereoespecificidad en cuanto a la quiralidad del protón eliminado de C_2 .

Para realizar estudios directos de sitio activo sería necesario acumular algunos miligramos de preniltetrasas puras, pero este objetivo parece extremadamente difícil de alcanzar, ya que para tener la razonable cantidad inicial de 200 g de proteína cruda de partida, en un solo proceso de purificación, se requerirían unas 3 toneladas de frutos como material de partida para la preparación del polvo cetónico.

3. Cis prenilsintetasa de Citrus sinensis.

La aparición del diastereómero 2-cis del GPP o del 2-trans-FPP no es un artificio de la técnica analítica, ya que se puede obtener un preparado enzimático desprovisto de la actividad cis, y está demostrado que la recromatografía del efluente no indica ningún cambio en las proporciones relativas de cis y trans farnesol (71). Por otro lado, el patrón de distribución es idéntico tanto en columnas de SE-30 como de etilénglicoladipato.

Por lo tanto los resultados presentados en esta Tesis demuestran por primera vez la purificación de una enzima capaz de sintetizar NPP y 2-cis,6-trans-FPP.

Del mismo modo que las farnesilpirofosfato sintetasas descritas en la literatura, que generan GPP y trans FPP, esta actividad cis prenilsintetásica cataliza la síntesis de neril pirofosfato (C_{10}), a partir de IPP y DMAPP, y la de cis-farnesilpirofosfato (C_{15}) a partir de IPP y GPP. El producto NPP no es sustrato en la formación de C_{15} por esta preparación de enzima, la que solo utiliza GPP, del mismo modo que las trans farnesil pirofosfato sintetasas. Si la enzima fuera capaz de usar el NPP como sustrato, formaría 2-cis,6-cis-FPP; por lo tanto, la combinación de actividades cis y trans sintetizaría 2-trans,6-trans-FPP, 2-cis,6-trans-FPP, y 2-cis,6-cis-FPP, a partir de IPP y DMAPP. Este último no ha sido detectado como producto

natural en Citrus, pero sí en semillas de algodón (64).

Si se supone que las transferasas cis y trans están sujetas a control independiente podrían existir dos rutas metabólicas separadas, una que va a través de los clásicos intermediarios trans y que culmina en la síntesis de carotenoides (C_{40}) y escualeno (C_{30}), y otra que culmina en la biosíntesis de monoterpenos. En efecto, la cis sintetasa, generará NPP usando IPP y DMAPP, pero a diferencia de lo que ocurre con la enzima trans, este producto de C_{10} no es sustrato para una nueva condensación; en cambio, el sustrato GPP es rápidamente utilizado por la prenilsintetasa trans; se dispone de evidencia (118) que sugiere que la K_m de la reacción catalizada por la enzima trans para DMAPP, es mucho mayor que para GPP; esto conduce necesariamente a un bajo nivel de régimen estacionario del alílico trans de C_{10} , que es lo que se observa en el patrón de productos cuando se usan IPP y DMAPP como sustratos (78). Por lo tanto el GPP producido por la enzima trans es rápidamente drenado hacia terpenos de mayor PM, mientras que el NPP se dirigiría exclusivamente a la biosíntesis de monoterpenos.

Este impedimento cinético podría tal vez explicar porqué a través de la evolución se desarrollaron dos sistemas enzimáticos que, usando dos sustratos distintos, GPP y NPP, son capaces de generar los mismos hidrocarburos monoterpénicos en Citrus. Si en la generación de

hidrocarburos monoterpénicos se hubiera utilizado exclusivamente al GPP la biosíntesis de monoterpenos podría haber estado sujeta por drenaje a una grave limitación de precursor.

Si el locus celular de las sintetasas cis y trans fuera diferente, la síntesis de 2-cis-FPP por la enzima cis probablemente procedería a una velocidad muy pequeña, ya que el sustrato alílico requerido, GPP, sería sintetizado y utilizado en otra parte. Esta limitación podría ser el origen del sistema de isomerización trans-cis de farnesoles descrito en este Laboratorio (72) y en el de Overton (73). Aunque no está claro cual es el destino metabólico de los intermediarios de esta secuencia óxido-reductiva, es posible que ella constituya la primera etapa en la secuencia de reacciones que conducen a la biosíntesis de la hormona vegetal, ácido abscísico (122). El intermediario químicamente necesario es el 2-cis-farnesal, que puede ser oxidado al ácido 2-cis-farnesoico, etc., para generar finalmente ácido abscísico (122). La síntesis del aldehído, por lo tanto, debería estar sujeta a un delicado control, lo que sería difícil de conseguir por las razones señaladas antes, si el precursor directo de C₁₅ fuera el 2-cis, y no el 2-trans-FPP.

Según estas hipótesis, entonces, la enzima cis se encargaría de proporcionar sustrato para la síntesis de

monoterpenos, en tanto que la enzima trans se intercalaría en la biosíntesis de C_{30} , C_{40} y de sesquiterpenos, como el ácido abscísico.

La dualidad de los sistemas enzimáticos cis y trans se expresa en el hecho de que la síntesis de los intermediarios cis no se detecta regularmente, tanto en estudios de incorporación marca de $2-^{14}C$ -MVA en prenoles, como en las condensaciones directas de IPP con DMAPP o GPP (78), catalizadas por extractos de flavedo fresco de frutos obtenidos al azar en el mercado.

Aunque no hay estudios sobre la regulación de la actividad cis sintetásica, está establecido que la actividad trans de flavedo de C. sinensis está sujeta a una fuerte variación estacional (118): lo mismo ocurre con la ciclase de C. limonum (83). En C. pepo, las actividades FPP y GGPP sintetásicas son reguladas independientemente (16). Por lo tanto, es muy probable que uno de los factores involucrados en la incapacidad de detectar consistentemente esta actividad en frutos obtenidos al azar, radique en una regulación independiente de la actividad trans.

Nosotros observamos un fuerte aumento en la relación trans/cis en la fracción enzimática obtenida de la cromatografía en Sephadex G-100, respecto a la del extracto. Esta es la primera preparación de la ruta de purificación que no contiene colorantes. Por lo tanto, es posible

que otra dificultad en la demostración de esta actividad consista en una fuerte inhibición por los componentes no proteicos del extracto. De aquí que la preparación de un polvo cetónico capaz de remover la mayor parte de estos compuestos, hace de esta fuente de enzimas el material de elección para la demostración consistente de esta actividad.

4. Mecanismo de la cis prenilsintetasa.

Tal como se demostró en este Laboratorio, la biosíntesis de NPP y 2-cis,6-trans FPP procede con eliminación del protón 2-pro-P del IPP (34). Como explicación de estos resultados, los autores propusieron dos mecanismos para la síntesis de isómeros cis. Uno de estos mecanismos se basa en suponer una actividad estereoespecífica que produce directamente el cis isoprenil pirofosfato, mientras que en el otro el carbocatión terciario intermediario sufriría una rotación alrededor del enlace 2,3 para generar una estructura en la que el grupo- CH_2OPOP y el sustituyente mayor en C_3^+ es sinperiplanar. Así esta última hipótesis plantea que una sola enzima cataliza la síntesis de ambos diastereómeros.

Los estudios realizados sobre la estructura del sitio activo de trans prenilsintetasas indican que toda la zona de la proteína que une al IPP y a la región $\text{C}_1\text{-C}_4$ del sustrato alílico es altamente específica. Si estas

conclusiones se extrapolan a la generación de NPP o cis FPP, la segunda hipótesis, que requiere un sitio activo relativamente "suelto", parece improbable. Parece más improbable aun si se considera que si éste fuera el mecanismo, la razón de productos cis/trans estaría determinada sólo por la rotación alrededor del enlace 2,3. Por lo tanto la distribución relativa de productos cis y trans no estaría definida por una propiedad intrínseca de la enzima, sino que por un efecto físico independiente de los requerimientos metabólicos, como es la rotación de un enlace durante una trayectoria de reacción. Por lo tanto, la velocidad relativa de formación de los isómeros cis y trans dependería de las condiciones fisicoquímicas en que se ensaya la enzima, y no de factores tales como la estación o el método de preparación. Nuestro sistema enzimático no cumple con ninguna de estas condiciones. Finalmente, no hay, a nuestro conocimiento, evidencia alguna en la literatura de una enzima que genere indiferentemente isómeros cis y trans.

Las únicas diferencias que es necesario postular respecto a la estructura del sitio activo de la cis prenil sintetasa relativa a la de la trans prenilsintetasa es el traslado del sitio de unión del pirofosfato a una posición sinperiplanar y un pequeño cambio en la región que acomoda al metilo 3.

La primera predicción químicamente razonable sobre el mecanismo de la biosíntesis de los monoterpenos se estableció hace 10 años con la proposición del NPP como el precursor más probable de estos compuestos. Posteriormente, estudios de incorporación de marca de precursores radiactivos en monoterpenos demostraron esta hipótesis en extractos de P. radiata. Sobre estas bases, la elucidación del problema general de la biosíntesis de monoterpenos requería demostrar inequívocamente esta relación precursor-producto aislando la o las enzimas involucradas en estas transformaciones, determinar el mecanismo de biosíntesis de NPP, y determinar los mecanismos individuales de biosíntesis de monoterpenos mediante estudios con las enzimas purificadas. El primer objetivo se ha resuelto recientemente en este Laboratorio con los estudios de Cardemil, Chayet, Rojas y Jabalquinto: la segunda meta ha sido alcanzada tal como se describe en esta Tesis, y el tercer problema se está abordando actualmente con el diseño de reactivos dirigidos al sitio activo. De este modo, no parece ilusorio esperar que la biosíntesis de monoterpenos alcance luego un nivel de desarrollo que la ubiquen junto a las de giberelinas y carotenoides, como una de las áreas parcialmente comprendidas de la Bioquímica vegetal.

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

1. O.Wallach, Justus Liebigs Ann.Chem., 239, 1, (1887).
2. R.Robinson, J.Soc.Chem.Ind.(London), 51, 464, (1932).
3. L.Ruzicka, Ann.Rev.Biochem., 42, 1, (1973).
4. L.Ruzicka, A.Eschenmoser, H.Heusser, Experientia, 9, 357, (1953).
5. A.F.Wagner, K.Folkers, En Advances in Enzymology, F.P. Nord. Ed., vol.23, Interscience, New York-London, 1961, p.471.
6. P.A.Tavormina, M.H.Gibbs, J.W.Huff, J.Am.Chem.Soc., 78, 4498, (1956).
7. M.J.Francis, Chem.Rev., 72, 115, (1972).
8. J.Edmond, G.Popják, J.Biol.Chem., 249, 66, (1974).
9. K.Bloch, Harvey Lectures, Ser. 48, (1950-51), 68, (1952).
10. J.W.Cornforth, G.D.Hunter, G.Popják, Biochem.J., 54, 590, (1953).
11. F.Lynen, H.Eggerer, U.Henning, I.Kessel, Angew.Chem., 70, 738, (1958).
12. H.C.Rilling, K.Bloch, J.Biol.Chem. 234, 1424, (1959).
13. S.Ohnoki, G.Suzue, S.J.Tanaka., J.Biochem. 52, 423, (1962).
14. D.G.Anderson, D.W.Norgard, J.W.Porter, Arch.Biochem. Biophys. 88, 68, (1960).
15. L.A.Witting, J.W.Porter, J.Biol.Chem. 234, 2841, (1959).
16. E.Beytia, J.K.Dorsey, J.Marr, W.W.Cleland, J.W.Porter, J.Biol. Chem. 245, 5450, (1970).

17. F.Lynen, M.Gassl, Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 313, 291, (1958)..
18. R.H.Cornforth, J.W.Cornforth, G.Popják, Tetrahedron, 18, 1351, (1962).
19. J.K.Dorsey, J.W.Porter., J.Biol.Chem., 243, 4667, (1968).
20. E.Beytía, Tesis Doctorado, Universidad de Wisconsin, 1972 .
21. H.Hellig, G.Popják, J.Lipid.Res., 2, 235, (1961).
22. D.N.Skilleter, I.P.Williamson, R.G.Kekwick, Biochem.J., 98, 27p, (1966).
23. P.Valenzuela, E.Beytía, O.Cori, A.Yudelevich, Arch. Biochem.Biophys., 113, 536, (1966).
24. W.D.Loomis, J.Bataille, Biochem, Biophys.Acta, 67, 54, (1963).
25. M.Lindberg, C.Yuan, A.deWaard, K.Bloch, Biochemistry, 1, 182, (1962).
26. O.Zeitschel, Berichte, 39, 1780, (1906).
27. J.W.Cornforth, R.H.Cornforth, G.Popják, L.Yengoyan, J.Biol.Chem., 241, 3970, (1966).
28. K.Ogura, T.Nishino, S.Seto, Phytochemistry, 10, 779, (1971).
29. Richard Foster, Tesis para optar al título de Bioquímico, Universidad de Chile, 1974 .
30. Germaine Jacob, Tesis para optar al título de Bioquímico, Universidad de Chile, 1970 .
31. C.J.Chesterton, R.G.Kekwick, Biochem.J., 98, 26p., (1966).
32. P.W.Holloway, en The Enzymes 3a. Ed., P.Boyer, Ed., vol. 6,. Academic Press, New York-London, 1970,p.565. .
33. G.Popják, The Enzymes, 3a. Ed., P.Boyer, vol. 2, Academic Press, New York-London, 1970,p.116. .

34. E.Jedlicski, G.Jacob, F.Faini, O.Cori, Arch, Biochem, Biophys., 152, 590, (1972).
35. D.Arighi, Experientia, 14, 153, (1958).
36. K.Clifford, J.W.Cornforth, R.Mallaby, G.T.Phillips, J.Chem. Soc., Chem.Comm., 1599 (1971).
37. J.W.Cornforth, K.Clifford, R.Mallaby, G.T.Phillips, Proc.Roy. Soc.Lond, B., 182, 277, (1972).
38. F.Lynen, B.W.Agranoff, H.Eggerer, U.Henning, E.M. Möslein, Angew.Chem., 71, 657, (1959).
39. F.W.Hemming, en Natural Substances Formed Biologically from Mevalonic Acid, T.W.Goodwin, Ed., Academic Press New York, 1970, p.105.
40. B.L.Archer, B.G.Audley, En Advances in Enzymology, F.F.Nord, Ed, vol.29, Interscience, New York-London, 1967, p.221.
41. C.D.Poulter, H.C.Rilling. Biochemistry, 15, 1079, (1976).
42. B.C.Reed, H.C.Rilling Biochemistry, 14, 50, (1975).
43. H.L.Eberhardt, H.C.Rilling, J.Biol.Chem., 250, 863, (1975).
44. T.R.Green, C.A.West, Biochemistry, 13, 4720, (1974).
45. K.Ogura, T.Nishino, S.Seto. J.Biochem., 64, 197, (1968).
46. A.A.Kandutsch, E.Paulus, E.Levin, K.Bloch., J.Biol.Chem, 239, 2507, (1964).
47. K.Ogura, T.Shinka, S.Seto, J.Biochem., 72, 1101, (1972).
48. M.V.Keenan, C.M.Allen, Arch.Biochem.Biophys., 161, 375, (1974).
49. C.M.Allen, W.Alworth, A.MacCrae, K.Bloch, J.Biol.Chem., 242, 1895, (1967).

50. P.W.Holloway, G.Popják,
Biochem.J., 104, 57, (1967).
51. B.C.Reed, H.C.Rilling,
Trabajo enviado a publicación.
52. T.Nishino, K.Ogura, S.Seto,
J.Am.Chem.Soc., 94, 6849, (1972).
53. J.W.Cornforth,
Angew.Chem., Int.Ed., 7, 903, (1968).
54. K.Ogura, T.Nishino, T.Koyama, S.Seto,
J.Am.Chem.Soc., 92, 6036, (1970).
55. T.Nishino, K.Ogura, S.Seto.,
Biochem.Biophys,Acta., 302, 33, (1973).
56. G.Popják, P.W.Holloway, J.M.Baron,
Biochem.J., 111, 325, (1969).
57. G.Popják, P.W.Holloway, R.P.M.Bond, M.Roberts,
Biochem.J., 111, 333, (1969).
58. K.Ogura, A.Saito, S.Seto,
J.Am.Chem.Soc., 96, 4037, (1974).
59. K.Ogura, T.Koyama, S.Seto,
J.Chem.Soc., Chem.Comm., 881, (1972).
60. E.Beytía, P.Valenzuela, O.Cori.
Arch.Biochem.Biophys., 129, 346, (1969).
61. A.W.Galston, P.J.Davis,
Control Mechanisms in Plant Development Prentice Hall,
New Jersey, 1970, p.135.
62. M.J.Francis, D.V.Banthorpe, G.W.Le Patourel,
Nature (London), 223, 10051, (1970).
63. V.H.Potty, J.H.Brueemmer,
Phytochem., 9, 1229, (1970).
64. S.R.Adams, P.H.Heinstein,
Phytochemistry, 12, 2167, (1973).
65. D.P.Gough, F.W.Hemming,
Biochem.J., 105, 10c, (1967).

66. J.F.Kefford, B.V.Chandler,
The Chemical Constituents of Citrus Fruits, Academic
Press, New York-London, 1970.
67. P.Valenzuela, O.Cori,
Tetrahedron Lett., 32, 3089 (1967).
68. O.Cori,
Arch.Biochem.Biophys., 135, 416, (1969).
69. C.George-Nascimento, O.Cori,
Phytochem., 10, 1803, (1971).
70. L.Chayet, M.Rojas, E.Cardemil, A.M.Jabalquinto,
R.Vicuña, O.Cori,
Trabajo enviado a publicación.
71. G.Jacob, E.Cardemil, L.Chayet, R.Tellez, R.Pont-
Lezica, O.Cori,
Phytochem., 11, 1683, (1972).
72. L.Chayet, R.Pont-Lezica, C.George-Nascimento, O.Cori,
Phytochem., 12, 95, (1973).
73. K.H.Overton, F.H.Roberts,
Biochem.G., 144, 585, (1974).
74. W.E.Shine, W.D.Loomis,
Plant.Physiol., 49, 37, (1972).
75. R.T. van Aller, W.R.Nes
Phytochem., 7, 25, (1968)
76. M.R.Downing, E.D.Mitchell,
Phytochem., 13, 1419, (1974).
77. W.E.Shine, W.D.Loomis,
Phytochem, 13, 2095, (1974).
78. L.Chayet, R.Déves, E.Berríos, O.Cori,
Resultados no publicados.
79. C.George-Nascimento, E.Beytía, A.R.Aedo, O.Cori,
Arch.Biochem.Biophys., 132, 470, (1969).
80. K.Ogura, T.Koyama, S.Seto,
Biochem.Biophys.Res.Comm., 35, 875, (1969).
81. O.Cori,
Boletín de la Academia de Ciencias de Chile, 1, 57,
(1968).

82. P.Valenzuela, O.Cori, A.Yudelevich,
Phytochem, 5, 1005, (1966).
83. L.Chayet, M.Rojas, E.Cardemil, O.Cori,
Trabajo no publicado.
84. D.M.Logan,
J.Lipid Res., 13,137, (1972).
85. T.W.Goodwin, en Biochemistry of Chloroplasts,
T.W.Goodwin, Ed., vol.2,Academic Press,London,
1967,p.722.
86. C.George-Nascimento, R.Pont-Lezica, O.Cori,
Biochem,Biophys.Res.Comm., 45, 119, (1971).
87. L.M.Pérez
Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias
Químicas, Universidad de Chile, comunicación personal.
89. W.S.Goodman, G.Popják,
J.Lipid.Research, 1, 286, (1960).
90. A.C.Ottolenghi,
En Methods in Enzimology, J.M.Lowenstein, Ed., vol.14,
Academic Press, New York, 1969 p.190.
91. A.C.Ottolenghi,
ibid,p.192.
92. Gel Filtration: Theory and Practice, Edit. por
Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia.
93. Ion Exchangers, an Outstanding aid in Biochemistry,
Edit. por Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia.
94. Advanced Ion-Exchange Celluloses, Tech.Bulletin IE2,
Ed. por Whatman, London, Inglaterra.
95. Propiedades de Resinas Dowex, edit. por Dow Chem.Co.,
Midland, Michigan,
96. G.Rouser, G.Kritchevsky, A.Yamamoto,
en Lipid Chromatographic Analysis, G.V.Marinetti,
Ed.,Marcel Dekker, New York, 1967,
97. J.M.Clark,
Ed., Experimental Biochemistry, W.H.Freeman, San Fran-
cisco, 1964, p.58.

98. G.Rouser, G.Kritchevsky, A.Yamamoto,
op.cit., p.110.
99. J.Folch, I.Ascoli, A.Lees, J.A.Meath, F.N.Le Baron,
J.Biol.Chem., 191, 833, (1961).
100. O.Renkonen, P.Varo,
en Lipid Chromatographic Analysis, G.V.Marinetti, Ed.,
Marcel Dekker, New York, 1967, p.56.
101. V.P.Skipski, M.Barclay,
en Methods in Enzymology, J.M.Loewenstein, Ed., vol.
14, Academic Press, New York-London, 1969, p.530.
102. V.P.Skipski, M.Barclay, ibid, p.546.
103. D.Waldi,
Thin Layer Chromatography, E.Stahl, Ed., Academic
Press, New York-London, 1962, p.491.
104. F.Cramer, W.Bohm,
Angew.Chem., 71, 775, (1959).
105. A.R.Aedo,
Tesis para optar al título de Bioquímico, Universidad
de Chile, 1969.
106. D.H.Shah, W.W.Cleland, J.W.Porter,
J.Biol.Chem., 240, 1946, (1965).
107. T.R.Green, D.J.Baisted,
Biochem.J., 130, 983, (1972).
108. R.T.van Aller, W.R.Nes,
Phytochem., 7, 85, (1968).
109. M.C.Rojas,
Tesis para optar al título de Bioquímico, Universidad
de Chile, 1976.
110. V.H.Potty,
Anal Biochem., 29, 533, (1969).
111. W.D Loomis, en
Methods in Enzymology, S.Fleischer, Ed., vol.31,
Academic Press, New York-London, 1974, p.528.
112. E.R.Stadtman, G.D.Novelli, F.Lipmann,
J.Biol Chem., 191, 365, (1951).

113. O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall,
J.Biol.Chem., 193, 265, (1951).
114. C.H.Fiske, Y.Subbarow,
J.Biol.Chem., 66, 375, (1925).
115. B.W.Ames,
en Methods in Enzimology, E.F.Neufeld y V.Ginsburg,
Eds., vol.8, Academic Press, London, 1966, p.116.
116. A.J.Burbott, W.D.Loomis,
Plant Physiol., 44, 173, (1969).
117. W.D.Loomis, J.Bataille,
Phytochem., 5, 423, (1966).
118. L.Chayet,
Trabajo inédito
119. R.Hertefuss, D.J.Buchanan-Davidson, M.Stahman, Arch.
Biochem. Biophys., 85, 200, (1959).
120. D.R.Robinson, C.A.West, Biochemistry, 9, 80, (1969).
121. A.Y.Lu, M.J.Coon,
J.Biol.Chem., 243, 1331, (1968).
122. R.Pont-Lezica, L.Chayet, O.Cori,
Resultados no publicados.
123. J.Bonner, A.W.Galston,
Principios de Fisiología Vegetal, Aguilar, Madrid,
1959, p.57.
124. C.George-Nascimento,
Tesis para optar al título de Bioquímico,
Universidad de Chile.
125. C.Tanford,
The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and
Biological Membranes, John Wiley, New York, 1971,
p.100.
126. B.Sheard,
Nature, 223, 1057, (1969).
127. E.G.Finer, A.G.Flok, A.Hanser,
Biochim.Biophys. Acta., 260, 49, (1972).

128. Bruce Cassels, Depto. de Química, Universidad Técnica del Estado, comunicación personal.
129. A.C.Ottolenghi,
Biochim. Biophys. Acta, 106, 510, (1965).
130. H.van der Bosch, Ann.Rev.Biochem., 43, 243, (1974).
131. A.T.Tu, Ann.Rev.Biochem., 42, 235, (1973).
132. R.F.Zuvaal, B.Roelofsen,
Methods Enzym., vol.32, Academic Press, 1974, p.160.
133. C.George-Nascimento y G.Jacob,
Trabajo no publicado.
134. L.Kierkegaard, C.C.Agee, Proc.Natl.Acad.Sci.,
USA, 70, 2424, (1973).
135. E.Kennedy, S.Weiss,
J.Biol.Chem. 222, 193, (1956).
136. M.L.Dinamarca, A.Ramírez, E.Ballester, E.del Villar,
J.Capdevilla, R.Maccioni, Int.J.Biochem, 6, 405,
(1975).
137. T.Ramasarna,
En Current Topics in Cellular Regulation vol.6,
Academic Press, London, vol.6, 1972, p.169.
138. P.F.Smith, R.Smith,
J.Bacteriol, 103, 27, (1970),
139. T.Robinson,
The Organic Constituents of Higher Plants, Burgess
Publishing, Minneapolis, 1963.
140. C.A.Price,
Methods in Enzymology, S.Fleischer, Ed., vol.31,
Academic Press, New York-London, 1974, p.501
141. D.R.Robinson, C.A.West,
Biochemistry, 9, 80, (1969).
142. C.W.Wheland, Resonance in Organic Chemistry, John
Wiley, New York, 1955, p.12.
143. H.Sandermann,
FEBS Lett., 21, 254, (1972).

144. B.Fourcans, M.K.Jain, L.
Advances in Lipid Research, 12, 148, (1974).
145. B.J.Davis,
Ann.N.Y.Acad. Sci., 121, 404, (1964).
146. E.T.Bush,
Anal.Chem., 35, 1024, (1963).
147. G.A.Bray,
Anal.Biochem., 1, 279, (1960).
148. A.I.Vogel,
Practical-Organic Chemistry, 3a, Ed., John Wiley,
New York, 1962, p.177.
149. C.M.Hanes, F.A.Isherwood,
Nature, 164, 1107, (1949).
150. M.O.Oster, C.A.West,
Arch.Biochem. Biophys., 127, 112, (1968).
151. P.W.Holloway, G.Popják,
Biochem. J., 106, 835, (1968).
152. J.Porath, en Advances in Protein Chemistry, C.B.
Anfinsen, M.L.Anson, K.Bailey, J.T.Edsall, Eds.,
Academic Press, New York-London, 1962, p.209.
153. C.Tanford, op.cit., p.6
154. C.Tanford, op.cit, p.50.
155. A.Qureshi, E.Beytia, J.W.Porter,
Biochem.Biophys.Res.Comm., 48, 1123, (1972).
156. D.E.Gregonis, H.C.Billing,
Biochemistry, 13, 1538, (1974).
157. H.Sandermann, J.L.Strominger
Proc.Natl.Acad.Sci, USA, 68, 2441, (1971).
158. L.Rothfield, D.Romeo,
Bacteriols. Rev., 35, 14, (1971).
159. L.Kierkegaard, T.Johnson,E.Bock, Anal.Biochem.,
50, 122, (1972).

160. Z.Er-el, Y.Zaidenzaig, S.Shaltiel,
Biochem.Biophys.Res.Comm., 49, 383, (1972).
161. T.Shinka, K.Ogura, S.Seto
Phytochem., 13, 2103, (1974).
162. G.Rouser,
J.Am.Oil Chem. Soc., 40, 425, (1963).

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

MILTON DE LA PUENTE VERA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito
de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en
BIOLOGIA en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Agosto
de 1976.

Sr. Profesor
Patrocinante de Tesis
Dr. Osvaldo Cori M

Comisión Informante de Tesis
Dr. Bruce Cassels

Handwritten signature of Dr. Bruce Cassels.

Comisión Informante de Tesis
Dr. Luis Corcuera

Comisión Informante de Tesis
Dr. Jaime Byzaguirre

Comisión Informante de Tesis
Dr. Antonio Morello

Comisión Informante de Tesis
Dr. Tito Ureta