

JCH-FC
DOC-B
B362

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA QUINASA FOSFOMEVALONICA
DE HIGADO DE CERDO

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias



por

Sergio Bazaes Valdés

Diciembre, 1977

Patrocinante: Profesor Jaime Eyzaguirre Philippi

PURIFICATION AND PROPERTIES OF PHOSHOMEVALONATE KINASE
FROM PIG LIVER

AN ABSTRACT

of a dissertation submitted to the Faculty of Sciences
of the University of Chile
in partial fulfillment of the requirements for the degree of
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

by

Sergio Bazaes Valdés

December, 1977

Dissertation supervisor: Professor Jaime Eyzaguirre Philippi

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile
Sede Santiago-Oriente

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

T E S I S D E D O C T O R A D O

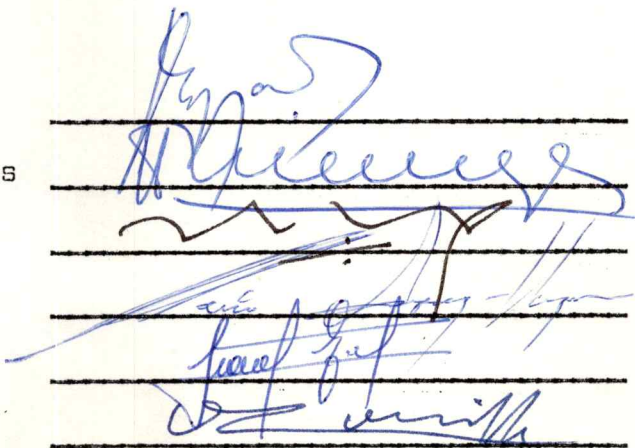
Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias
que la Tesis de Doctorado presentada por el Candidato

Sergio Enrique Bazaes Valdés

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requi-
sito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en
Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de
Diciembre de 1977

Patrocinante de Tesis

Comisión Informante de Tesis



The image shows a series of horizontal lines with handwritten signatures in blue ink. The signatures are written over the lines, with some overlapping. The first signature is at the top, followed by a second, then a third, and finally a fourth signature at the bottom. The lines are evenly spaced and extend across the width of the page.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica,
Departamento de Biología Celular, Instituto de Ciencias Biológicas,
Universidad Católica de Chile, bajo el patrocinio del Dr.
Jaime Eyzaguirre Ph.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes personas, por sus valiosos aportes al desarrollo de esta tesis:

Al Dr. Jaime Eyzaguirre, por su aporte de ideas, ayuda en la revisión de los escritos y facilidades de toda clase otorgadas.

A la memoria del desaparecido Dr. Enrique Beytía, bajo cuyo patrocinio empecé a realizar este trabajo y de quien alcancé a recibir valiosas sugerencias.

A la Sra. Ana María Jabalquinto, por su entusiasta participación en parte del desarrollo de este trabajo.

A la Sra. María Isabel Gómez y al Sr. Francisco Solís de Ovarado, por sus aportes en el desarrollo experimental. A este último, además, por su valiosa colaboración en la ejecución de las figuras.

A los docentes del laboratorio de Macromoléculas de la Universidad Católica por la ayuda que prestaron en el análisis de aminoácidos de la enzima.

A los Drs. Arnaldo Foradori y Emilio Cardemil por sus aportes materiales y de ideas.

A todas las personas del laboratorio de Bioquímica, que de un modo u otro contribuyeron a la realización de esta tesis.

Sergio Bazaes Valdés
Santiago, Diciembre de 1977

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XIX
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	9
I. MATERIALES	
A. Material biológico	9
B. Reactivos	9
C. Materiales cromatográficos	10
II. METODOS	
A. Preparación de mevalonato-5-fosfato	11
1. Preparación de quinasa mevalónica ...	11
2. Ensayo de la actividad de la quinasa mevalónica	14
a) Método espectrofotométrico	14
b) Método cromatográfico	15
3. Síntesis enzimática de H ³ -mevalonato- 5-fosfato	16
4. Purificación del mevalonato-5-fosfato	18

	Pág.
5. Identificación y pureza del mevalona-	
to-5-fosfato	23
a) Cromatografía en papel e identifica-	
ción mediante cómputo de radiactivi-	
dad	23
b) Cromatografía en papel e identifica-	
ción por revelado para fosfatos orgá-	
nicos	27
c) Cromatografía en Dowex-1-formiato ..	27
d) Análisis del contenido de fósforo ..	28
e) Análisis de nucleótidos contaminan-	
tes	28
f) Análisis de ácido mevalónico	30
6. Medición de la concentración de mevalona	
to-5-fosfato	30
B. Ensayo espectrofotométrico de la actividad	
de la quinasa fosfomevalónica	31
C. Determinación de proteínas	34
D. Medición de radiactividad	35
E. Preparación de materiales para cromatografía	37
1. DEAE-celulosa	37
2. Bio-Gel P-150	38
3. Bio-Gel P-60	39
4. Hidroxilapatita	40
5. Azul-dextrano-Sepharose	40
F. Electroforesis en geles de poliacrilamida ..	42

	Pág.
G. Determinación del peso molecular de la <u>quina</u> sa fosfomevalónica	43
1. Cromatografía en Bio-Gel P-60	43
2. Gradiente de sacarosa	44
3. Electroforesis en geles de poliacrilami- da en presencia de dodecilsulfato de so- dio	45
H. Determinación de parámetros cinéticos	46
I. Efecto de diversos iones metálicos divalen- tes y nucleótidos sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica	47
J. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)	49
1. Reacción de inactivación	49
2. Reversión por 2-mercaptoetanol y ditio- treitol	49
3. Efecto protector de los sustratos	50
4. Km aparentes de la enzima modificada ...	50
K. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato	51
1. Reacción de inactivación	51
2. Reversión de inactivación por lisina o diálisis	51
3. Efecto protector de los sustratos	52
4. Efecto del pH en la reacción de inactiva- ción	53

	Pág.
5. Determinación de las Km aparentes de la enzima modificada	54
L. Titulación de grupos sulfhidrilos de la quinasa fosfomevalónica	54
M. Efecto de 2,3-butanodiona sobre la quinasa fosfomevalónica	56
N. Determinación de la composición aminoacídica de la quinasa fosfomevalónica	56
1. Determinación del triptófano	56
2. Análisis de aminoácidos	58

RESULTADOS

A. Purificación de la quinasa fosfomevalónica	59
1. Experimentos preliminares	59
2. Método de purificación adoptado	62
a) Preparación del extracto crudo ...	63
b) Fraccionamiento con sulfato de amonio	63
c) Cromatografía en DEAE-celulosa ...	64
d) Cromatografía en Bio-Gel P-150 ...	66
e) Cromatografía en hidroxilapatita .	66
f) Cromatografía en azul-dextrano- <u>Se</u> pharose	68
3. Estimación de la pureza de la enzima .	71
4. Contenido de quinasa fosfomevalónica en el extracto crudo	76

	Pág.
B. Propiedades de la quinasa fosfomevalóni	
ca	76
1. Determinación del peso molecular	76
a) Cromatografía en Bio-Gel P-60 ...	76
b) Gradiente de sacarosa	78
c) Electroforesis en geles de polia	
crilamida en presencia de dodecil	
sulfato de sodio y 2-mercaptoeta-	
nol	78
2. Determinación de la composición de a-	
minoácidos	81
a) Análisis del triptófano	81
b) Determinación de la cisteína	85
c) Análisis de aminoácidos	86
3. Estabilidad y requerimientos de com-	
puestos sulfhidrilos	86
4. Requerimiento de metales y nucleóti-	
dos	88
5. Efecto de la temperatura sobre la es-	
tabilidad de la enzima	92
6. Efecto de fuerza iónica	92
7. Efecto del pH	95
8. Determinación de parámetros cinéticos	99

	Pág.
C. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)	101
1. Reacción de inactivación	104
2. Reversión de la inactivación por compuestos sulfhidrilos	106
3. Efecto de los sustratos en la reacción de inactivación	106
4. Determinación de las Km aparentes de la enzima modificada con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)	109
5. Número de grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad catalítica	111
D. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato	111
1. Reacción de inactivación con piridoxal-5'-fosfato y análogos	113
2. Reversión de la inactivación por lisina y por diálisis	115
3. Efecto protector de los sustratos en la reacción de inactivación	119
4. Efecto de la concentración de piridoxal-5'-fosfato	122
5. Efecto del pH en la velocidad de inactivación	127

6. Determinación de las Km aparentes de la enzima modificada con piridoxal-5'-fosfato	132
E. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por 2,3-butanodiona	134
DISCUSION	
A. Purificación de la quinasa fosfomevalónica.	138
B. Propiedades fisicoquímicas de la quinasa fosfomevalónica	143
C. Propiedades generales de la quinasa fosfomevalónica	144
D. Estudios del centro activo de la quinasa fosfomevalónica	147
E. Consideraciones finales	156
BIBLIOGRAFIA	159

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Purificación de la quinasa fosfomevalónica .	72
TABLA 2. Análisis de aminoácidos de la quinasa fosfo- mevalónica	87
TABLA 3. Efecto de diversos iones divalentes sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica	89
TABLA 4. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la quinasa fosfomevalónica	93
TABLA 5. Constantes cinéticas de la quinasa fosfome- valónica modificada con 5,5'-ditiobis-(2-ni- trobenzoato)	110
TABLA 6. Efecto de diálisis sobre la quinasa fosfome- valónica modificada con piridoxal-5'-fosfato	120
TABLA 7. Constantes cinéticas de la quinasa fosfomeva- lónica modificada con piridoxal-5'-fosfato .	133

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Intermediarios de la biosíntesis del colesterol a partir de ácido mevalónico	3
Fig. 2. Purificación de la quinasa mevalónica en DEAE-celulosa	13
Fig. 3. Ensayo cromatográfico de la quinasa mevalónica	17
Fig. 4. Purificación del H ³ -mevalonato-5-fosfato en DEAE-celulosa	21
Fig. 5. Ensayo cromatográfico de los productos de reacción de la quinasa mevalónica y quinasa fosfomevalónica	26
Fig. 6. Cromatografía del H ³ -mevalonato-5-fosfato en Dowex 1-formiato	29
Fig. 7. Curva standard para proteínas empleando el micrométodo de Lowry modificado	36
Fig. 8. Purificación de la quinasa fosfomevalónica en DEAE-celulosa	65
Fig. 9. Purificación de la quinasa fosfomevalónica por filtración en Bio-Gel P-150	67
Fig. 10. Purificación de la quinasa fosfomevalónica en hidroxilapatita	69

	Pág.
Fig. 11. Purificación de la quinasa fosfomevalónica en azul-dextrano-Sepharose	70
Fig. 12. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la quinasa fosfomevalónica purificada por hidroxilapatita y azul-dextrano-Sepharose	73
Fig. 13. Trazado densitométrico de gel de poliacrilamida de quinasa fosfomevalónica y actividad enzimática asociada	74
Fig. 14. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la quinasa fosfomevalónica purificada en azul-dextrano-Sepharose a dos concentraciones diferentes	75
Fig. 15. Trazados densitométricos de los geles de poliacrilamida presentados en la Fig. 14	77
Fig. 16. Determinación del peso molecular de la quinasa fosfomevalónica por cromatografía de exclusión molecular en Bio-Gel P-60	79
Fig. 17. Determinación del peso molecular de la quinasa fosfomevalónica en gradiente de concentración de sacarosa	80
Fig. 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la quinasa fosfomevalónica en presencia de dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol	82

Fig. 19.	Determinación del peso molecular de la quinasa fosfomevalónica por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol	83
Fig. 20.	Espectro de absorción de la quinasa fosfomevalónica en clorhidrato de guanidina 6 M	84
Fig. 21.	Efecto de la concentración de ión magnesio en la reacción catalizada por la quinasa fosfomevalónica	90
Fig. 22.	Efecto de la concentración de ATP en la reacción de la quinasa fosfomevalónica	91
Fig. 23.	Efecto de la fuerza iónica en la actividad de la quinasa fosfomevalónica	94
Fig. 24.	Efecto del pH sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica	96
Fig. 25.	Efecto del pH sobre las velocidades máximas y constantes de Michaelis aparentes para el mevalonato-5-fosfato	98
Fig. 26.	Titulación ácido-base del mevalonato-5-fosfato	100
Fig. 27.	Efecto de la concentración de mevalonato-5-fosfato a diferentes concentraciones fijas de ATP sobre la velocidad inicial de la reacción de la quinasa fosfomevalónica	102
Fig. 28.	Representación de las pendientes e intersecciones en $1/v$, en función de la concentración de Mg-ATP	103

	Pág.
Fig. 29. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)	105
Fig. 30. Efecto del 2-mercaptoetanol y ditiotreitól en la reacción de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)	107
Fig. 31. Efecto de los sustratos en la reacción de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato).....	108
Fig. 32. Determinación del número de grupos sulfhidrilos de la quinasa fosfomevalónica esenciales para la actividad	112
Fig. 33. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato	114
Fig. 34. Efecto del piridoxal sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica	116
Fig. 35. Efecto de la piridoxamina-5'-fosfato sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica	117
Fig. 36. Efectos de la lisina y borohidruro de sodio en la cinética de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato	118
Fig. 37. Tratamiento de la quinasa fosfomevalónica por dos ciclos de inactivación con piridoxal-5'-fosfato	121

	Pág.
Fig. 38. Efecto de los sustratos en la reacción de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato	123
Fig. 39. Efecto de la concentración de piridoxal-5'-fosfato en la cinética de inactivación de la quinasa fosfomevalónica	124
Fig. 40. Relación entre las constantes de pseudo primer orden de velocidad de inactivación y las concentraciones de piridoxal-5'-fosfato	125
Fig. 41. Determinación del orden de la reacción entre quinasa fosfomevalónica y piridoxal-5'-fosfato ...	128
Fig. 42. Efecto del pH sobre la velocidad de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato	130
Fig. 43. Relación entre el pH y las constantes de pseudo primer orden en la cinética de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato	131
Fig. 44. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por 2,3-butanodiona	135

ABREVIATURAS

BSA	:	albúmina de suero de bovino
BISACRILAMIDA	:	N,N'-metilen-bisacrilamida
BICINE	:	N,N-Bis-(2-hidroxietil)-glicina
CAPS	:	ácido 3-(ciclohexilamino-1-propanosulfónico)
DTT	:	ditiotreitól
DTNB	:	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
LDH	:	deshidrogenasa láctica
MVA	:	ácido mevalónico
H ³ -MVA (sal DBED)	:	sal dibenzoiletildiamina del ácido DL- me valónico con tritio unido al carbono 5.
MVA-P	:	ácido fosfomevalónico
MVA-PP	:	ácido pirofosfomevalónico
MES	:	ácido 2-(N-morfolino)-etanolsulfónico
PPO	:	2,5-difeniloxazol
POPOP	:	1,4-bis-[2-(5-feniloxazolil)]-benceno
PK	:	quinasa pirúvica
PAP	:	piridoxamina-5'-fosfato
PL	:	piridoxal
PLP	:	piridoxal-5'-fosfato
SDS	:	dodecilsulfato de sodio
TES	:	ácido N-Tris-(hidroximetil) metil-2-amino etanosulfónico

TENAP : PPO 0,4 %, naftaleno 8 %, etanol 40 %, en
tolueno

TCA : ácido tricloroacético

RESUMEN

En esta tesis se ha purificado a homogeneidad la quinasa fosfo mevalónica (EC 2.7.4.2) de hígado de cerdo, y se ha realizado un estudio de sus propiedades cinéticas, tamaño molecular, composición de aminoácidos y residuos de aminoácidos esenciales para la catálisis.

La purificación de la enzima involucra tratamiento con sulfato de amonio, cromatografía en DEAE-celulosa, Bio-Gel P-150, hidroxilapatita y azul-dextrano-Sepharose. La enzima purificada demostró estar homogénea en el análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida en ausencia de agentes desnaturantes y tiene una actividad específica de 69 unidades/milígramo de proteína. Ella presenta especificidad absoluta por ATP y requiere de un ión metálico divalente para la actividad, siendo el Mg^{+2} el más efectivo en la reacción catalizada. La enzima posee un rango óptimo de pH que se extiende, al menos, entre pH 7,5 y 9,5, el valor más alto ensayado. Presenta cinética hiperbólica para ambos sustratos, el mevalonato-5-fosfato (MVA-P) y el ATP, con una Km verdadera de 0,075 mM para el primero y de 0,46 mM para el segundo.

La enzima está estructurada como una sola cadena polipeptídica de un peso molecular de 21.000 - 22.500, medido por filtración en Bio-Gel P-60, centrifugación en gradiente de sacarosa y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

La quinasa fosfomevalónica es inactivada por 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato), (DTNB), por piridoxal-5'-fosfato, (PLP), y por 2,3-butanodiona. En todos los casos la reacción de inactivación presenta una cinética de pseudo primer orden, y el MVA-P es un efectivo protector de la enzima contra la inactivación.

El DTNB produce una rápida inactivación, al reaccionar estequiométricamente con el residuo de cisteína de la enzima. Esta inactivación puede ser revertida por 2-mercaptoetanol o ditiotreitól. En una enzima parcialmente inactivada por DTNB, no se observa modificación de las Km aparentes para ninguno de los dos sustratos. Además, la constante catalítica de la enzima residual es igual a la de la enzima no tratada con el reactivo, lo que indica la existencia de dos poblaciones de moléculas, una intacta y otra totalmente inactivada. Estos resultados sugieren que el residuo de cisteína, (el único que posee la enzima, de acuerdo al análisis de aminoácidos), está en el centro activo o en sus proximidades, pudiendo participar en el proceso catalítico mismo.

El PLP produce, a bajas concentraciones, la inactivación de la quinasa fosfomevalónica, formándose una base de Schiff entre un grupo amino primario de la enzima y el grupo aldehído del PLP. El piridoxal y la piridoxamina-5'-fosfato son inhibidores más débiles que el PLP, sugiriendo un efecto específico para este último en la reacción, probablemente debido a la presencia de los grupos fosfato y aldehído. Por medio de estudios de velocidad de inactivación en función del pH se determinó un pK de 8,25 a 24^o y de 7,95 a 31^o para el grupo reactivo amino, el que podría corresponder a un grupo ϵ amino

de un residuo de lisina, situado en microambiente con cargas positivas. Cuando se produce la inactivación, reacciona una molécula de PLP con un grupo amino por molécula de enzima.

La enzima no es totalmente inactivada por PLP, ni aumentando su concentración hasta 0,5 mM, ni sometiéndola a un segundo tratamiento de inactivación después de reducir el producto de la primera con borohidruro. La enzima parcialmente modificada, presenta una K_m aparente disminuída para el MVA-P. Estos resultados permiten suponer que el grupo reactivo está ubicado en o cerca del sitio de unión del MVA-P, explicándose la menor K_m aparente para este último por la carga positiva del nitrógeno aromático del PLP cuyo pK es 8,69, lo que facilitaría la unión del MVA-P.

La quinasa fosfomevalónica es, además, inactivada por 2,3-butanodiona, reactivo altamente específico para residuos de arginina. El hecho que el MVA-P proteja a la enzima de la inactivación por este reactivo, hace suponer que un residuo de arginina está suficientemente próximo o en el sitio mismo de unión de este sustrato. La presencia de un residuo de arginina cercano a uno de lisina en el sitio de unión del MVA-P, explica el bajo pK encontrado para el grupo amino reactivo con PLP. Estos resultados concuerdan con investigaciones realizadas sobre diversas quinasas y deshidrogenasas, que presentan lisina y arginina en el sitio de unión de sustratos aniónicos.

ABSTRACT

In this work, the enzyme phosphomevalonate kinase (EC 2.7.4.2) from pig liver has been purified to homogeneity, and the following properties of the enzyme have been studied: kinetics, molecular weight, amino acid composition and essential amino acid residues for catalysis.

The purification of the enzyme requires ammonium sulfate treatment, DEAE cellulose, Bio Gel P-150, hydroxylapatite and blue-dextran-Sepharose chromatography. The purified enzyme is homogeneous as shown by native polyacrylamide gel electrophoresis and has a specific activity of 69 units/mg protein. The enzyme shows absolute specificity for ATP and requires a divalent cation for activity, Mg^{+2} being the most effective. An optimum pH range between 7.5 and 9.5 (the highest pH assayed) is shown by the enzyme. Both substrates, 5-phosphomevalonate (MVA-P) and ATP present hyperbolic kinetics with true K_m values of 0.075 mM and 0.46 mM, respectively.

Phosphomevalonate kinase has only one polypeptide chain with a MW of 21.000 - 22.500, as established by gel filtration in Bio Gel P-60, sucrose density gradient centrifugation and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The enzyme is inactivated by 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), pyridoxal-5'-phosphate (PLP) and 2,3-butanedione. The inactivation reaction follows, in all cases, pseudo first order kinetics,

MVA-P effectively protects the enzyme against inactivation by these reagents.

DTNB produces a rapid inactivation, by reacting with the cysteine residue of the enzyme. This inactivation may be reverted by 2-mercaptoethanol or dithiothreitol. In a partially inactivated enzyme preparation, no change in the apparent K_m is observed for both substrates. In addition, the catalytic constant of the residual enzyme is identical to that of untreated enzyme, indicating the existence of two populations of molecules; one made of intact and the other of totally inactive molecules. These results suggest that the cysteine residue (the only one found in the amino acid analysis) is in or near the active site, where it may participate in the catalytic process.

Low concentrations of PLP produce inactivation of phosphomevalonate kinase, with the formation of a Schiff base between an amino group of the enzyme and the aldehyde group of PLP. Pyridoxal and pyridoxamine-5'-phosphate are weaker inhibitors than PLP, suggesting a specific effect for PLP in the inactivation reaction, probably due to the presence of the phosphate groups and aldehyde. From studies of pH vs. velocity of inactivation, a pK of 8.25 at 24^o and 7.95 at 31^o was determined for the reactive amino group. This group may correspond to an ϵ -amino group of a lysine residue in the vicinity of other positive charges. One molecule of PLP reacts with one amino group per molecule of enzyme to produce inactivation.

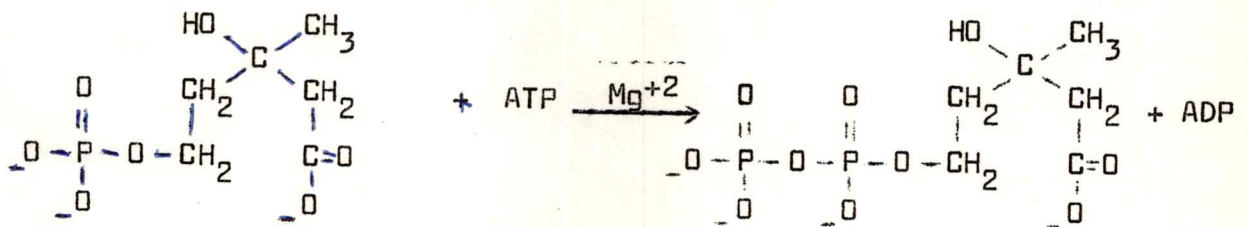
The enzyme is not totally inactivated by PLP, either by increasing the PLP concentration up to 0.5 mM or by a second inactivation

treatment after borohydride reduction of the Schiff base formed in the first treatment. The partially modified enzyme shows a lower apparent K_m for MVA-P than the native enzyme. These results suggest that the reactive group is located in or close to the binding site for MVA-P, the lower K_m for MVA-P may be explained by the positive charge of the PLP ring nitrogen (pK 8.69), which might facilitate the binding of MVA-P.

Phosphomevalonate kinase is also inactivated by 2,3-butanedione, a reagent specific for arginine residues. MVA-P protects the enzyme against inactivation by this reagent; this suggests that an arginine residue is sufficiently close to or at the binding site of this substrate. The presence of an arginine residue near a lysine residue at the binding site of MVA-P explains the low pK found for the amino group reactive with PLP. These results agree with findings by other investigators in several kinases and dehydrogenases, which present lysine and arginine groups at the binding site of anionic substrates.

INTRODUCCION

La quinasa fosfomevalónica (ATP: 5-fosfomevalonato fosfotransferasa, EC 2.7.4.2.), cataliza la fosforilación del mevalonato-5-fosfato (MVA-P) por Mg-ATP para producir mevalonato-5-pirofosfato (MVA-PP) y ADP, de acuerdo con la siguiente ecuación:



Sólo el isómero 3R-MVA-P es sustrato de la quinasa fosfomevalónica y su fosforilación por ATP es reversible, estando la reacción desplazada hacia la formación de MVA-PP (1,2).

Esta reacción corresponde a una de las primeras etapas de la biosíntesis de compuestos isoprénicos, sustancias ampliamente distribuidas en el mundo viviente y que incluyen productos tan importantes como los terpenos, esteroides, carotenoides, caucho, giberelinas, etc. Todos estos isoprenoides tienen en común su similitud de origen y se sintetizan a través de una serie de reacciones parecidas o idénticas.

Un compuesto clave en la biosíntesis de los poliisoprenoides es el ácido mevalónico. Su descubrimiento representó uno de los

mayores avances en el conocimiento de la biosíntesis del colesterol, después que se conociera que el acetato era el precursor primario. En la Fig. 1 se presenta un esquema de los intermediarios desde ácido mevalónico hasta colesterol. El ácido mevalónico experimenta dos fosforilaciones consecutivas, la primera catalizada por la quinasa mevalónica y la segunda, por la quinasa fosfomevalónica. El MVA-PP, producto de la segunda quinasa, es descarboxilado, en una reacción que requiere ATP, a isopentenilpirofosfato, compuesto que es la fuente real de las unidades isoprénicas y precursor de todos los polienoprenoides. La biosíntesis de isopentenilpirofosfato está ampliamente representada en bacterias, levadura, plantas superiores y mamíferos (3).

En particular, la biosíntesis del colesterol en mamíferos presenta gran interés debido a que alteraciones en el metabolismo de este compuesto pueden producir alteraciones patológicas. El metabolismo del colesterol en el hígado está sometido a un complejo sistema de control y es modificado por una serie de factores ambientales, hormonales y nutricionales, siendo el colesterol mismo inhibidor de su propia formación (4,5). La enzima cuyo rol regulador está bien establecido es la β -hidroxi β -metilglutaril-CoA-reductasa, cuyo efecto regulador "in vivo" se debe a una modulación de su síntesis a velocidad constante de degradación (6-8). Sin embargo, diversos tipos de pruebas sugieren la existencia de controles reguladores secundarios a otros niveles. Bucher y col. (9) demostraron que la conversión de ácido mevalónico y de escualeno a colesterol se reduce por ayuno o por la administración de colesterol aunque en un grado menor que la

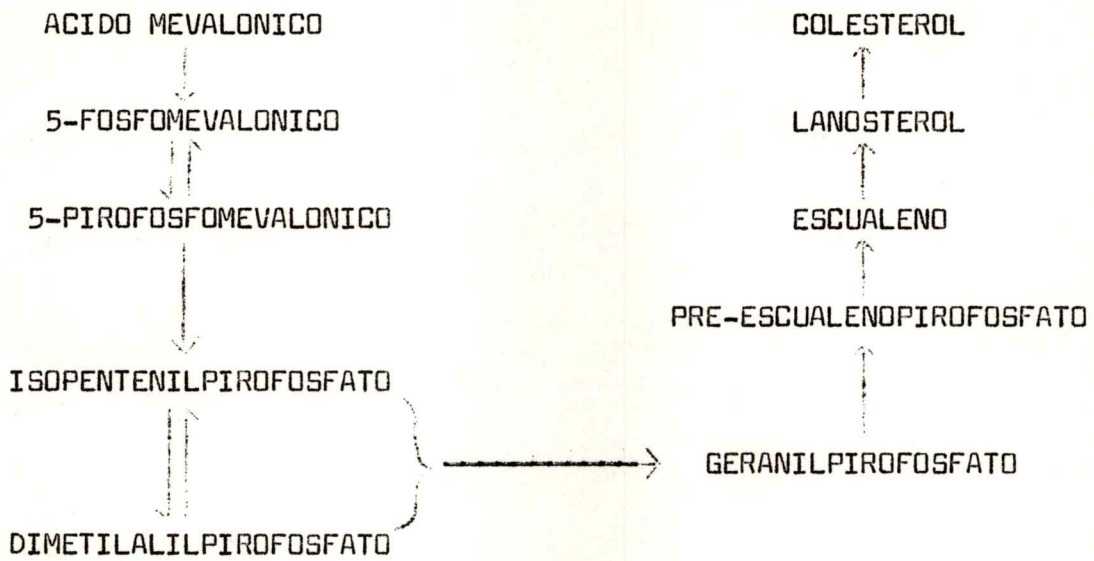


Figura 1. Intermediarios de la biosíntesis del colesterol a partir de ácido mevalónico.

conversión de acetato a colesterol, sugiriendo la presencia de mecanismos reguladores secundarios que controlan el flujo de materiales a través de la vía biosintética, o bien que el segmento completo de la vía es deprimido. Gould y Swyryd (10) sugieren dos sitios reguladores secundarios en la síntesis del colesterol, uno entre ácido mevalónico y farnesilpirofosfato y otro entre farnesilpirofosfato y escualeno. Slakey y col. (11) demostraron que el flujo de materiales a través de la vía completa de síntesis de colesterol no se puede explicar suponiendo que la única enzima reguladora es la β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA-reductasa y sugieren a lo menos dos pasos reguladores, uno entre MVA y escualeno y otro entre escualeno y colesterol. Shama Bhat y Ramosarna (12) encontraron en ratas que la utilización de MVA para la biosíntesis del colesterol presenta actividad rítmica con un máximo a medianoche. La actividad β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA-reductasa aumenta 10 veces a medianoche comparada con el medio día, mientras que la incorporación de acetato en colesterol tanto "in vivo" como "in vitro" sólo aumenta 3 veces. Estos autores, a base de estudios "in vitro", en que midieron tanto la conversión de 2-C¹⁴-mevalonato a esteroides, como la descarboxilación de 1-C¹⁴-mevalonato, concluyeron que debe haber una enzima en la vía biosintética entre MVA e isopentenilpirofosfato que presenta cambios rítmicos de actividad.

La conversión de MVA a isopentenilpirofosfato involucra 3 pasos enzimáticos: quinasa mevalónica, quinasa fosfomevalónica y descarboxilasa pirofosfomevalónica. A las tres enzimas se les ha supuesto un rol regulador en la biosíntesis del colesterol. Dorsey y Porter (13) demostraron que el farnesilpirofosfato y el geranilpirofosfato inhiben

la quinasa mevalónica de hígado de cerdo, sugiriendo que ambos compuestos podrían actuar como controles fisiológicos a nivel de esta enzima. Por otra parte, Slakey y col. (11) al realimentar con una dieta carente de grasa a ratas mantenidas en ayuno, observaron que junto con el aumento de la síntesis de farnesilpirofosfato se produce un aumento de la conversión de mevalonato a escualeno tan rápida como la primera. Este hecho hace poco probable que el efecto inhibitorio observado "in vitro" por farnesilpirofosfato y geranilpirofosfato influya "in vivo" sobre el flujo de los intermediarios. Ramachandran y Shah (14) demostraron que la fosforilación del MVA y del MVA-P no era significativamente diferente en preparaciones de hígado de ratas lactantes y destetadas, mientras que la descarboxilación del MVA resultó ser mucho más alta en ratas destetadas. Estos autores concluyen que la descarboxilación del MVA-PP es un paso regulador en la biosíntesis del colesterol hepático.

La suposición que la quinasa fosfomevalónica pudiera desempeñar un papel regulador de la biosíntesis de isoprenoides en mamíferos proviene de la alta K_m aparente determinada para el MVA-P con la enzima de hígado de cerdo, de 3×10^{-4} M (2). Por otra parte, la K_m aparente publicada para el mismo sustrato, de la quinasa fosfomevalónica de látex de Hevea brasiliensis (árbol del caucho) es $4,2 \times 10^{-5}$ M (15), de tal manera que de ser cierto un efecto regulador de la enzima de cerdo debido a su alta K_m , este criterio no parece aplicable a la enzima de Hevea brasiliensis.

El conocimiento actual que se tiene de muchas enzimas de la vía biosintética del colesterol es aún muy insuficiente. Varias han sido

purificadas a homogeneidad como la tiolasa y β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA-sintetasa de hígado de pollo, la β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA-reductasa de levadura e hígado, la quinasa mevalónica y la farnesil pirofosfato-sintetasa de hígado de cerdo y escualeno-sintetasa de levadura. Las restantes enzimas han sido sólo parcialmente purificadas (3). Es, por lo tanto, de real interés el estudio sistemático de todas las enzimas de esta vía. El objetivo de esta tesis ha sido purificar la quinasa fosfomevalónica de hígado de cerdo al más alto grado posible, a fin de caracterizarla en sus propiedades físicoquímicas, químicas y cinéticas esenciales, estudios que eventualmente pudieran determinar mejor el papel que ella desempeña en el proceso global de biosíntesis del colesterol.

La quinasa fosfomevalónica ha sido descrita en diversas fuentes tales como levadura (1, 16, 17), látex reconstituido de Hevea brasiliensis (15, 18), hígado de rata (19) y de cerdo (2, 20). Además, se ha inferido su presencia en otras fuentes por la presencia del producto de la reacción, el MVA-PP (21, 22).

Los estudios efectuados con esta enzima obtenida de las diversas fuentes, todos de carácter muy preliminar, han sido realizados con preparaciones bastante impuras de ella. Todas las preparaciones enzimáticas descritas presentan el mismo requerimiento nucleotídico de ATP, excepto la de Hevea brasiliensis que puede usar ITP y UTP pero a velocidades menores (15) y todas requieren además de iones divalentes, siendo el Mg^{+2} el más efectivo. Este ión presenta efecto óptimo sobre la quinasa fosfomevalónica de hígado de cerdo a concentración 5 mM, siendo inhibitorias concentraciones superiores. Otros io-

nes, tales como Ag^+ , Cu^{+2} y Zn^{+2} a concentración 5mM, inhiben completamente la reacción y el Co^{+2} no tiene efecto (2). La quinasa fosfo mevalónica de levadura es activada además del Mg^{+2} por Co^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} y Mn^{+2} (1) y la de Hevea brasiliensis por Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} y Mn^{+2} (15).

La quinasa fosfomevalónica requiere, al parecer, la integridad de grupos sulfhidrilos libres para su actividad. La enzima de H. brasiliensis pierde su actividad cuando se omite del medio un compuesto tiol, pudiendo recuperarse parcialmente la actividad al agregar un tiol (15). La enzima de hígado de cerdo es inhibida completamente por p-cloromercuribenzoato, siendo su efecto parcialmente revertido por 2,3-dimercaptopropanol o glutation; N-etilmaleimida y O-iodobenzog to demostraron ser buenos inhibidores, pero la iodoacetamida presenta sólo un pequeño grado de inhibición (2).

La quinasa fosfomevalónica de hígado de cerdo demostró presentar un pH óptimo entre 7,2 y 7,3 (2) y la de Hevea brasiliensis entre 7,0 y 7,5 (15). La enzima de autolizados de levadura se ha publicado que no presenta un pH óptimo definido, permaneciendo la actividad inalterada entre pH 5,5 y 10 (1).

La K_m aparente para el sustrato fosfomevalonato de la enzima de hígado de cerdo se determinó en aproximadamente 0,3 mM (2) y la de la enzima de H. brasiliensis para el mismo sustrato en 0,042 mM y para el ATP 0,19 mM (15).

Los datos presentados resumen las propiedades estudiadas de la quinasa fosfomevalónica obtenida de las diversas fuentes, estudios que se han realizado, como se ha dicho, con preparaciones muy crudas

de ella. No existen publicaciones recientes que aporten nuevos datos sobre esta enzima. Es posible que algunas de las propiedades descritas se vean modificadas con preparaciones más purificadas. Los estudios efectuados con las quinasa fosfomevalónicas de hígado de rata, hígado de cerdo y levadura fueron hechos hace más de 15 años y los realizados con la quinasa obtenida del látex de H. brasiliensis, aunque mucho más recientes (1971), también son de carácter muy preliminar.

En este trabajo se decidió utilizar el hígado de cerdo como fuente de la quinasa fosfomevalónica. Este material, obtenido de un matadero comercial, tiene el inconveniente de que se carece de control sobre los animales, pudiendo existir diferencias importantes entre un animal y otro debido a factores tales como raza o estado de alimentación. De hecho, se encontraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de enzima entre diferentes hígados en algunas preparaciones. No obstante, se eligió este material porque era posible de obtenerlo fresco, extraído del animal recién muerto, y porque permite, debido a su volumen, procesar una cantidad grande de tejido, lo cual no habría sido posible tratándose de ratas. Además, como existen estudios previos efectuados con quinasa fosfomevalónica de esta misma fuente, resultaba de interés comparar las propiedades de una preparación más pura de la enzima con las obtenidas en preparaciones menos purificadas. Por otra parte, resultaba también interesante comparar las propiedades de la quinasa fosfomevalónica con las de la quinasa mevalónica, la enzima anterior de la vía biosintética, la cual ha sido purificada de hígado de cerdo a homogeneidad, y sus propiedades cinéticas estudiadas en detalle (23).

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES

A. Material biológico

Los hígados de cerdo se obtuvieron frescos del "Matadero Lo Valledor" o del "Matadero Industrial San Miguel, S. A." Los órganos se extrajeron en un tiempo máximo de 15 minutos después del sacrificio de los animales y se mantuvieron en hielo hasta el momento de su procesamiento.

B. Reactivos

NADH, ATP, ADP, AMP, GTP, UTP, CTP, PEP, quinasa pirúvica (PK) tipo II de músculo de conejo, deshidrogenasa láctica (LDH) tipo III de corazón de vacuno, lactona del ácido DL-mevalónico, 2-mercaptoetanol, 2,5-difeniloxazol (PPO), ditiotreitól, piridoxal-fosfato (PLP), piridoxal (PL), piridoxamina-fosfato (PAP), poli A, N, N' -metilén-bisacrilamida, albúmina de suero de bovino (BSA), dodecilsulfato de sodio (SDS), 2-(N-morfolino) etanolsulfonato (MES), N-Tris-(hidroximetil)-metil-2-aminoetanosulfonato (TES), N, N-bis-(2-hidroxietil)-glicina (BICINE) y 3 (ciclohexilamino-1-propanosulfonato) (CAPS), se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.; Acrilamida se obtuvo de Bio Rad Laboratories, California, U.S.A.; DTNB, hexanodiamina, dihidracida del ácido adípico, butanodiona, bromuro de cianógeno y acetoni-trilo, fueron productos de Aldrich Chem. Co., Inc., Milwaukee, U.S.A.;

1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno (POPOP), glicerol y azul de bromofenol, se obtuvieron de Merck, Darmstadt, Alemania; sulfato de amonio, citocromo c de corazón de caballo, quimotripsinógeno A de páncreas de bovino, ovoalbúmina, clorhidrato de guanidina y azul de Coomassie se obtuvieron de Schwarz/Mann, Orangeburg, New York, U.S.A.; N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamina (TEMED) se obtuvo de Schuchardt, Munchen, Alemania; pepsina de estómago de cerdo se obtuvo de Mann Research Labs., New York, U.S.A.; 2,4,6-trinitrobenceno-sulfonato de Eastman Kodak Co., Rochester N.Y., U.S.A.; lisina, insulina y también citocromo c se obtuvo de Fluka A.G. Buchs S.G., Suiza. Además, se utilizó ATP y 2-mercaptoetanol de Calbiochem, La Jolla, California, U.S.A.; ácido DL-mevalónico-5-H³ (sal DBED), 6,74 Ci/mmol se obtuvo de New England Nuclear, Boston, U.S.A. El resto de los reactivos empleados fue de grado analítico.

C. Materiales cromatográficos

DEAE-celulosa, DE-52 fueron productos de Whatman Ltd., Springfield Mill, Kent, Inglaterra; Bio Gel P-60, Bio-Gel P-150 e hidroxilapatita (Bio Gel HTP) fueron obtenidos de Bio Rad Lab., California, U.S.A.; Sepharose 4B y azul-dextrano provinieron de Pharmacia Fine Chem., Uppsala, Suecia; Dowex-1-X8 y Dowex 50-X8 fueron obtenidos de Baker Chem. Co., Phillisburg, N.Y., U.S.A.

II. METODOS

A. Preparación de mevalonato-5-fosfato (MVA-P).

Fue necesario sintetizar el MVA-P, sustrato de la quinasa fosfomevalónica, por no estar disponible comercialmente. Los métodos químicos que utilizan como producto de partida la mezcla racémica DL-mevalonato, producen como resultado una mezcla de 3R y 3S-MVA-P, en general con un rendimiento bajo (24). El método enzimático desarrollado por Levy y Popjak (19) consiste en fosforilar el mevalonato utilizando la enzima quinasa mevalónica, y permite obtener con un rendimiento satisfactorio sólo el isómero 3R-MVA-P, que es el sustrato de la quinasa fosfomevalónica. Se adoptó el método enzimático, considerando además que la quinasa mevalónica es fácil de obtener en un grado de pureza adecuado de la misma fuente que se utilizó en la preparación de la quinasa fosfomevalónica, el hígado de cerdo. El método original de Levy y Popjak fue modificado, con lo cual se consiguió obtener un producto sin trazas de ácido mevalónico o nucleótidos detectables.

1. Preparación de quinasa mevalónica

Esta enzima se preparó de hígado fresco de cerdo, por una modificación del método de Beytía y col. (23). Un kilogramo de hígado de cerdo se homogeneizó en dos volúmenes de tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7,4⁽¹⁾ en un homogeneizador Waring Blendor. Esta operación y todas las siguientes se efectuaron entre 0-4°C. El homogeneizado se

(1) Todos los tampones empleados en la purificación fueron de pH 7,4 y contenían 2-mercaptoetanol 10 mM.

filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó sucesivamente a $8.000 \times g$ durante 10 minutos, $48.000 \times g$ por 20 minutos y $48.000 \times g$ durante 60 minutos, descartando en cada caso los precipitados. El último sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio. La fracción que precipitó entre 15 y 40 % de saturación de la sal se disolvió en tampón fosfato de potasio 10 mM y se dializó contra 50 volúmenes del mismo tampón. La solución de proteínas dializadas se adsorbió en gel de fosfato de calcio, 1 mg de gel por mg de proteína, se agitó hasta homogeneidad y se centrifugó a $1.000 \times g$ durante 10 minutos. El precipitado se trató sucesivamente con concentraciones crecientes de tampón fosfato de potasio: una vez 10 mM, dos veces 25 mM, tres veces 60 mM y cinco veces 100 mM. La quinasa mevalónica eluye, parte con fosfato de potasio 60 mM y parte con 100 mM.

Las proteínas provenientes de las fracciones con mayor actividad específica se concentraron agregando sulfato de amonio sólido hasta tener un 70 % de saturación. Después de centrifugar a $27.000 \times g$ por 10 minutos, el precipitado se disolvió en un pequeño volumen de tampón fosfato 10 mM y se dializó contra 50 volúmenes del mismo tampón.

El material dializado se adsorbió en una columna de DEAE-celulosa (3 x 50 cm), equilibrada con tampón fosfato 10 mM. La columna se lavó sucesivamente con 2 volúmenes de columna de tampón fosfato 10 mM, 20 mM y 40 mM. Se aplicó enseguida un gradiente de fosfato de potasio entre 50 y 150 mM (1 l de c/u) con lo cual se produjo la elución de la enzima. La Fig. 2 muestra el perfil de elución de la quinasa mevalónica con el gradiente de fosfato de potasio. El eluido

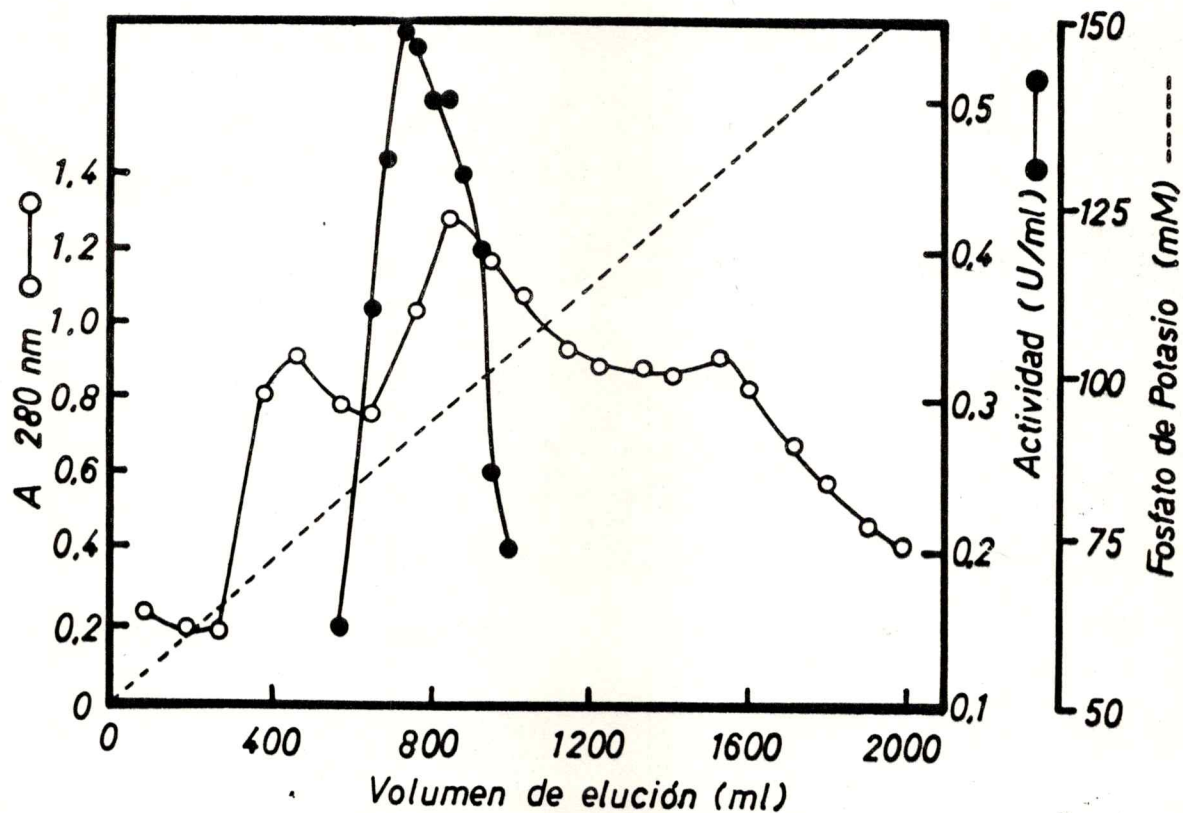


Figura 2. Purificación de la quinasa mevalónica en DEAE-celulosa. La muestra, previamente purificada por sulfato de amonio y en gel de fosfato de calcio, se aplicó a una columna de DEAE-celulosa de 3 x 50 cm. Después de lavar con fosfato de potasio, pH 7,5 a baja fuerza iónica, se aplicó un gradiente de fosfato de potasio al mismo pH entre 50 y 150 mM (1 l de cada uno). Se colectaron fracciones de 19 ml con un flujo de 60 ml/hora. Otros detalles se describen en el texto.

seleccionado de la columna de DEAE celulosa se concentró con sulfato de amonio al 70 % de saturación y se dializó contra tampón fosfato de potasio 10 mM por 16 horas.

La preparación de quinasa mevalónica obtenida carece de fosfatasa y de quinasa fosfomevalónica, como lo revelaron los métodos de determinación de actividad que se describen a continuación. El producto obtenido de 1 Kg de hígado fue de 240 a 300 unidades, con una actividad específica de 0,35 U/mg.

Alternativamente, se utilizó una preparación más purificada de la enzima (3,2 U/mg), resultante de la purificación de la quinasa fosfomevalónica a través de Bio-Gel P-150. Este polímero separa completamente la quinasa fosfomevalónica de la quinasa mevalónica, por sus diferencias en tamaño molecular, propiedad que resultó muy conveniente para la separación de las dos quinasas.

2. Ensayo de la actividad de la quinasa mevalónica

a) Método espectrofotométrico

Este método, descrito por Levy y Popják (19), acopla el ADP producido en la reacción enzimática, con las reacciones catalizadas por la quinasa pirúvica y la deshidrogenasa láctica, midiéndose la variación de absorbancia a 340 nm. La reacción se registró en un espectrofotómetro Cary 118 C o en un espectrofotómetro Varian Techtron 635. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: NADH 0,24 mM; ATP 2,5 mM; PEP 2,5 mM; $MgCl_2$ 5 mM, tampón fosfato de potasio pH 7,4 0,1 M; 2-mercaptoetanol 10 mM; quinasa pirúvica y

deshidrogenasa láctica 8 unidades de cada una. A 0,96 ml del medio de incubación mantenido a 30° en la cubeta termoregulada en el espectrofotómetro, se agregaba 0,01 ml de la solución de quinasa mevalónica. Después de registrar la línea base por 2 a 3 minutos se agregaban 0,03 ml de D1-MVA 100 mM para iniciar la reacción. Las velocidades iniciales se determinaron de las pendientes de los trazados densitométricos.

El ensayo espectrofotométrico reveló además que las preparaciones enzimáticas utilizadas en la preparación de MVA-P carecían de actividades enzimáticas que hidrolizaran al ATP o que oxidaran al NADH, hechos que se habrían manifestado por la oxidación espontánea del NADH en ausencia de MVA en el registro de la línea base.

b) Método cromatográfico

Este método de ensayo consistió en detectar por cromatografía en papel el producto de la reacción, el H^3 -MVA-P, usando como sustrato H^3 -MVA. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 0,1 ml: ATP 1 mM; $MgCl_2$ 2 mM; tampón fosfato de K pH 7,4 100 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM y H^3 -MVA 0,2 mM ($2 \mu C/\mu mol$). A esta mezcla mantenida a 30° se agregó la enzima (0,015 ml, 50 mU) y se incubó por 3 horas a la misma temperatura. La reacción se detuvo calentando 1 minuto a baño maría hirviente, luego se centrifugó la proteína precipitada y el sobrenadante se aplicó a una tira de papel Whatman Nº1 de 25 x 4 cm. El cromatograma se desarrolló en forma ascendente en un sistema de n-propanol; amoníaco; agua, 6:2:1, y luego de secarlo se

cortó en trozos de 0,5 cm, los cuales se contaron para tritio en un contador de centelleo Nuclear Chicago modelo Mark II. En La Fig. 3 aparece el resultado de uno de tales cromatogramas. En ausencia de enzima toda la radiactividad aparece asociada al H^3 -MVA. En presencia de la preparación enzimática se observan 2 máximos de radiactividad, uno corresponde al producto de la reacción el H^3 -MVA-P con un Rf de 0,30 (I) y el otro al H^3 -MVA que no reaccionó, con un Rf de 0,86 (II). Si se integra al área bajo cada pico, y recordando que la quinasa mevalónica actúa sólo sobre el isómero 3R-MVA para dar 3R-MVA-P, se puede estimar un 54 % de conversión de 3R-MVA a 3R-MVA-P.

3. Síntesis enzimática de H^3 -mevalonato-5-fosfato.

La DL lactona del ácido mevalónico se convirtió en la sal de potasio disolviendo una determinada cantidad de ella en KOH 0,1 N, calentando a 37° durante una hora y luego titulando con HCl hasta pH 7,5. Se agregó agua bidestilada hasta tener una concentración de mevalonato de alrededor de 0,1 M tomando como referencia el peso de la lactona tratada. La concentración exacta del MVA se determinó espectrofotométricamente utilizando un exceso de quinasa mevalónica, con PK y LDH como enzimas auxiliares (ver sección B de Métodos).

Se dispuso de ácido DL-mevalónico-5- H^3 (sal DBED), disuelto en metanol. Este último se evaporó bajo corriente de aire y se agregó agua bidestilada de modo de tener una solución de 40 μ C/ml. Esta solución de H^3 -MVA se mezcló con la de MVA no radiactivo en las proporciones apropiadas para tener las actividades específicas indicadas

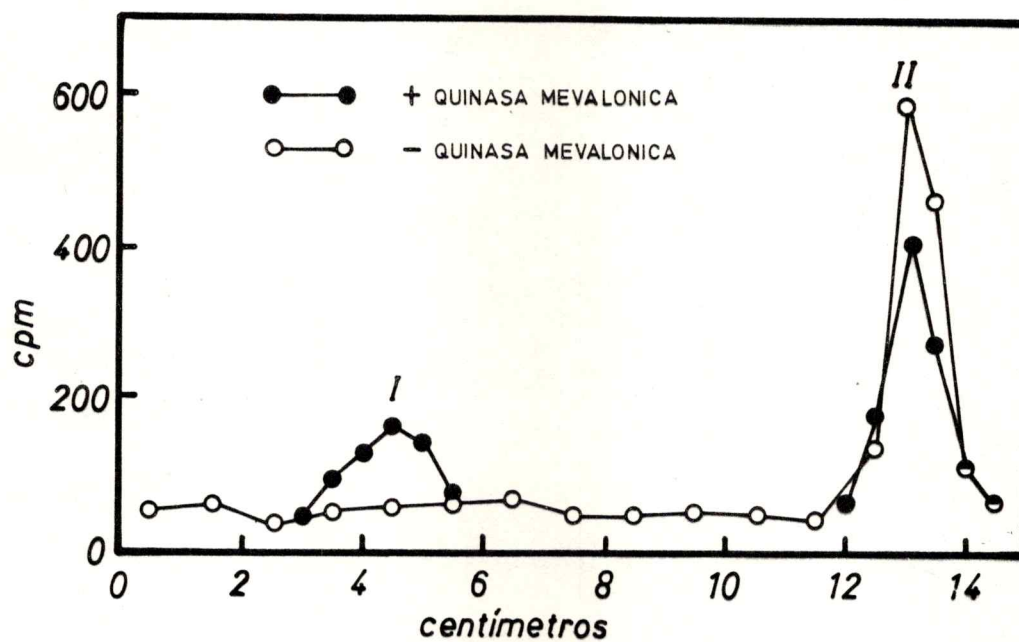


Figura 3. Ensayo cromatográfico de la quinasa fosfomevalónica.

La enzima se incubó con H^3 -MVA y los demás factores requeridos, en un volumen de 0,1 ml. Una vez detenida la reacción en baño maría hirviente, se centrifugó y el sobrenadante se sometió a cromatografía en papel, desarrollado en forma ascendente. La tira se cortó en sectores de 0,5 cm y se contó la radiactividad asociada a ellos en solución de centelleo TENAP. El control se efectuó con otra muestra pero agregando la enzima al momento de calentar al baño maría hirviente.

más adelante. Se empleó el MVA radiactivo con el fin de facilitar la detección del MVA-P obtenido en la síntesis.

La síntesis enzimática del MVA-P se realizó utilizando en su primera etapa la técnica descrita por Levy y Popjak (19). Se incubó a 30° en un volumen final de 500 ml repartidos en dos matraces Erlenmeyer con 250 ml cada uno: DL-H³-MVA 5 mM, ajustado a una actividad específica de 0,03, 0,20 o 0,1 $\mu\text{C}/\mu\text{mol}$; ATP (neutralizado con KOH) 5 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; MgCl₂ 9 mM y quinasa mevalónica, 80 unidades, en tampón fosfato de potasio 20 mM, pH 7,4. A intervalos se midió la conversión de MVA a MVA-P, tomando una alícuota de 0,05 ml y estimando el ADP producido por ensayo espectralométrico, utilizando quinasa pirúvica y deshidrogenasa láctica como enzimas auxiliares. A los 60 minutos había un 90 % de conversión del 3R-MVA a 3R-MVA-P. La incubación se prolongó por 4 horas manteniendo los matraces tapados. La reacción se detuvo calentando en baño maría hirviendo por 4 minutos, se enfrió en hielo y se eliminó la proteína precipitada centrifugando 15 minutos a 17.000 x g en el rotor SS-34 de la centrífuga Sorvall.

4. Purificación del mevalonato-5-fosfato

El aislamiento del producto, MVA-P libre de nucleótidos, sales y del MVA no utilizado presentes en el medio de incubación depende de las siguientes propiedades de los componentes de la mezcla: 1) el MVA-P es soluble en etanol de 85 %, pero forma una sal de bario ligeramente soluble en agua e insoluble en etanol de 85 %; 2) el MVA

también forma una sal de bario insoluble en etanol, pero esto no ocurre con la lactona; 3) el MVA puede convertirse en la lactona a pH ligeramente ácido calentando al vacío o bien bajo condiciones deshidratantes a baja temperatura (liofilización), y la lactona es relativamente estable aún a pH 8,5 a bajas temperaturas; 4) ADP y ATP son muy poco solubles en etanol de 85 % y sus sales de bario son menos solubles en agua que la sal de bario del MVA-P.

El sobrenadante obtenido según se describe en el acápite 3, se transfirió a balones de fondo redondo y se liofilizó hasta sequedad. El residuo seco se suspendió en agua bidestilada y se ajustó el pH a 4,2 con HCl 6N (volumen final 30-35 ml.). Se agregó etanol absoluto hasta una concentración final de 85 % y se dejó a 4^o por 2 horas. El abundante precipitado blanco formado se centrifugó a 7.700 x g durante 10 minutos (Sorvall, SS-34). Se apartó el sobrenadante, y el precipitado se lavó 3 veces con etanol de 85 %, juntándose los sobrenadantes con el primero. Se evaporó el etanol en un evaporador rotatorio a 50^o. El resto acuoso (aprox. 30-40 ml) se liofilizó hasta sequedad. El residuo seco se suspendió en 30 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 8,5 con KOH y luego se agregaron 10 ml de BaCl₂ 1 M y etanol absoluto hasta una concentración de 85 %. Se dejó reposar a 4^o por 2 horas y se centrifugó a 27.000 x g 10 minutos. El precipitado se lavó dos veces con etanol de 85^o, se suspendió en 25 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 5,2 con HCl. El Ba⁺² se eliminó agregando 10 ml de Na₂SO₄ 1 M y se centrifugó el precipitado de BaSO₄. Este último se lavó 2 veces con agua destilada juntándose los lavados con el sobrenadante.

La purificación final del MVA-P se efectuó por cromatografía en DEAE-celulosa o bien por Dowex-1-formiato.

a) Cromatografía en DEAE celulosa

El procedimiento se hizo de acuerdo al método de Dugan y col. (25) para la separación de precursores hidrosolubles de esteroides. Se preparó una columna de 3 x 25 cm de DEAE-celulosa equilibrada con NH_4HCO_3 0,2 M pH 9,0. La columna se lavó previo a la aplicación de la muestra con varios volúmenes de agua desionizada. La muestra conteniendo MVA-P se diluyó a 1 l con el objeto de bajar la conductividad a 1,8 mmho, se ajustó el pH a 8,1 con NH_4OH y luego se aplicó a la columna de DEAE-celulosa a un flujo de 115 ml/hora. La columna se lavó sucesivamente al mismo flujo con soluciones de NH_4HCO_3 pH 9,0 de concentración creciente: 150 ml 1 mM; 500 ml 10 mM; 1.000 ml 20 mM; 1.000 ml 40 mM; 650 ml 60 mM; 400 ml 100 mM.

A partir de la elución con NH_4HCO_3 40 mM se colectaron fracciones de 17 ml. Se contó la radiactividad de alícuotas de 0,1 ml de cada fracción. La Fig. 4 muestra el resultado. Sólo eluyó radiactividad significativa durante la aplicación de la muestra y el lavado con NH_4HCO_3 1 mM y después en la elución con NH_4HCO_3 40 mM. Lo primero corresponde en este sistema a la lactona del ácido mevalónico y el ácido mevalónico mismo; la elución con NH_4HCO_3 40 mM corresponde al MVA-P.

Se combinaron las fracciones correspondientes al H^3 -MVA-P. Se liofilizó a sequedad repetidas veces para eliminar el NH_4HCO_3 y finalmente se disolvió el material obtenido en 10 ml de agua bidestilada y

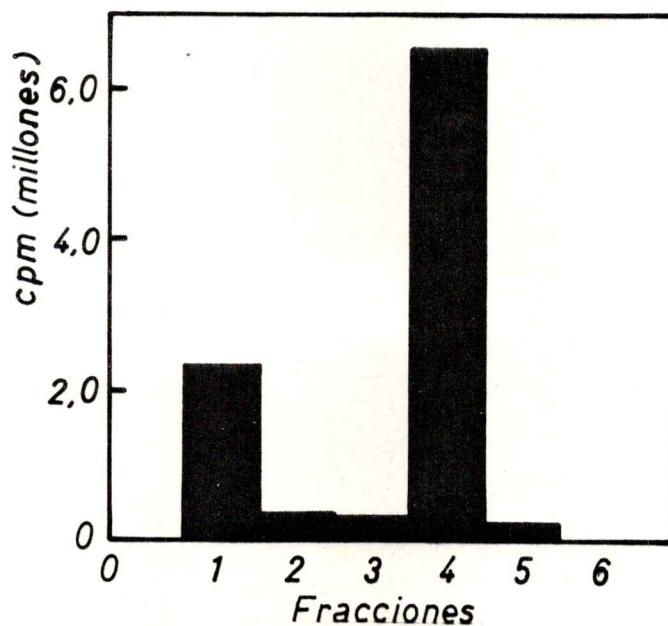


Figura 4. Purificación del H^3 -mevalonato-5-fosfato en DEAE-celulosa.

El H^3 -MVA-P parcialmente purificado, se agregó en forma de sal de bario a una columna de DEAE-celulosa de 3 x 25 cm, equilibrada con NH_4HCO_3 a pH 9,0. La columna se lavó con concentraciones crecientes de NH_4HCO_3 al mismo pH. Se contó para tritio en alícuotas de 0,2 ml de cada fracción en solución de centelleo TENAP. El gráfico presenta las cpm totales eluidas con cada concentración de NH_4HCO_3 : Aplicación de muestra y elución con 150 ml 1 mM (1), 500 ml 10^{-4} mM (2), 1.000 ml 20 mM (3), 1.000 ml 40 mM (4), 650 ml 60 mM (5) y 400 ml 100 mM (6). El MVA-P corresponde al material eluido con NH_4HCO_3 40 mM.

se ajustó el pH a 7,0. Ocasionalmente en lugar de las repetidas liofilizaciones, se trató directamente el eluido seleccionado de la columna de DEAE-celulosa con Dowex-50-X8 en forma H^+ para remover iones amonio, al mismo tiempo que el bicarbonato se libera como CO_2 . Después de ajustar el pH a 7,0 con KOH, se liofilizó a sequedad y finalmente se suspendió en agua bidestilada para su uso. El MVA-P se tituló espectrofotométricamente utilizando un exceso de quinasa fosfomevalónica y midiendo el ADP producido por una alícuota del sustrao como se describe más adelante.

b) Cromatografía en Dowex-1-formiato

Alternativamente se empleó cromatografía en Dowex-1-X8 de acuerdo con Bloch y col. (1).

El polímero, (malla 200-400, forma Cl^-) se preparó suspendiéndolo primero en agua desionizada, dejando decantar y eliminando el líquido sobrenadante con las partículas finas, procedimiento que se repitió varias veces. Se suspendió luego en 20 volúmenes de NaOH 1 M y se lavó con agua desionizada por decantación hasta que el pH fuera igual al del agua. Se suspendió en 5 volúmenes de HCOOH 1 M, lavando luego nuevamente con agua desionizada hasta pH cercano a la neutralidad. Se preparó una columna de 1 cm de diámetro y se cargó con el intercambiador iónico hasta una altura de 25 cm. La columna se lavó en pieza fría exhaustivamente con agua desionizada hasta que la conductividad de entrada fuera igual a la de salida. Se aplicó la muestra ajustada a pH 4,0 con HCOOH. Se hizo pasar un gradiente de $H_2O/HCOOH$ 4 M, 150 ml de cada uno y enseguida otro gradiente de igual

volumen de HCOOH 4 M/HCOOH 4 M-formiato de amonio 0,4 M. El MVA-P eluye en este sistema con el 2º gradiente. Se encontró una pequeña cantidad de radiactividad en las fracciones eluidas durante la aplicación de la muestra, eluyendo la mayor cantidad de ella con el 2º gradiente. La primera corresponde a restos de ácido mevalónico y su lactona, remanentes de la purificación preliminar; la segunda corresponde al MVA-P. Se combinaron las fracciones correspondientes a este último y se liofilizó a sequedad repetidas veces para eliminar el formiato de amonio. El residuo seco se suspendió en un pequeño volumen de agua bidestilada y se ajustó el pH a 7,5 con KOH. La solución se guardó a -20° . Una determinación de la estabilidad del compuesto congelado en solución, indica que se hidroliza espontáneamente en cerca del 1 % al cabo de 3 meses.

5. Identificación y pureza del mevalonato-5-fosfato.

Se utilizaron diversos criterios para identificar el MVA-P y establecer su pureza:

a) Cromatografía en papel e identificación mediante cómputo de radiactividad.

La técnica fue similar a la empleada para el ensayo de la quinasa mevalónica como se describe en la sección 2 b de Métodos. El cromatograma se desarrolló en forma ascendente o descendente durante 17 horas a temperatura ambiente en n-propanol; amoníaco; agua (60:20:20). Para efectuar el cómputo radiactivo, el papel se cortó en trozos de 0,5 o 1 cm a partir del origen, y los trozos se contaron

en el contador de centelleo usando TENAP o solución Bray como centellador. En la primeras etapas de purificación se encontraron 2 máximos de radiactividad, uno asociado al MVA con Rf 0,80-0,85 y otro correspondiente al MVA-P con Rf 0,27-0,30 en el desarrollo ascendente (25). Cuando se cuantificó la cantidad de H^3 -MVA-P formado, se encontró que el porcentaje de conversión de MVA a MVA-P era bajo y varió entre un 10 y un 56 %. Dado el hecho que el H^3 -MVA usado en la reacción de fosforilación estaba marcado con H^3 en la posición de uno de los hidrógenos unidos al carbono del grupo $-CH_2OH$, se pensó que podría estar ocurriendo algún tipo de intercambio isotópico secundario en el compuesto fosforilado que hiciera disminuir la cantidad de MVA-P radiactivo. Esto se confirmó posteriormente al establecer la actividad específica del H^3 -MVA-P sintetizado, la cual resultó ser del 5 al 10 % de la correspondiente al H^3 -MVA utilizado en la síntesis. Se comprobó que realmente la fosforilación era completa para el isómero 3R-MVA midiendo espectrofotométricamente el ADP formado en la reacción de fosforilación en presencia de quinasa pirúvica y deshidrogenasa láctica. En vista de lo anterior, el ensayo radiocromatográfico se usó sólo para fines cualitativos. La Fig. 5 presenta el comportamiento cromatográfico obtenido en el sistema señalado, desarrollado en forma descendente, de $2-C^{14}$ -MVA incubado con quinasa mevalónica y del producto de esta reacción incubado a su vez con quinasa fosfomevalónica. La Fig. 5 A, muestra la posición del $2-C^{14}$ -MVA con un Rf de 0,78. El resultado de la incubación del $2-C^{14}$ -MVA con quinasa mevalónica se muestra en la Fig. 5 B. En este caso aparecen 2 picos

Figura 5. Ensayo cromatográfico de los productos de reacción de la quinasa mevalónica y quinasa fosfomevalónica.

Se incubó a 30^o durante 3 horas en un volumen final de 1 ml, una muestra de quinasa mevalónica con 2-C¹⁴-MVA más todos los factores requeridos. Se detuvo la reacción en baño maría hirviente, se centrifugó y se aplicó 0,1 ml del sobrenadante a una tira de papel Whatman Nº 1, de 4 cm de ancho. Del resto del sobrenadante se tomó 0,6 ml y se incubó con quinasa fosfomevalónica más los factores requeridos, en un volumen de 1 ml, procediéndose en forma similar a la incubación anterior. Como control, en otra tira, se aplicó 2-C¹⁴-MVA no incubado con enzima. Los cromatogramas fueron desarrollados en el sistema n-propanol; amoníaco; agua (60:20:20) a temperatura ambiente en forma descendente. Se cortaron las tiras de papel y se midió la radiactividad de los trozos en solución de centelleo TENAP.

- A. 2-C¹⁴-MVA
- B. 2-C¹⁴-MVA + quinasa mevalónica
- C. 2-C¹⁴-MVA + quinasa mevalónica + quinasa fosfomevalónica

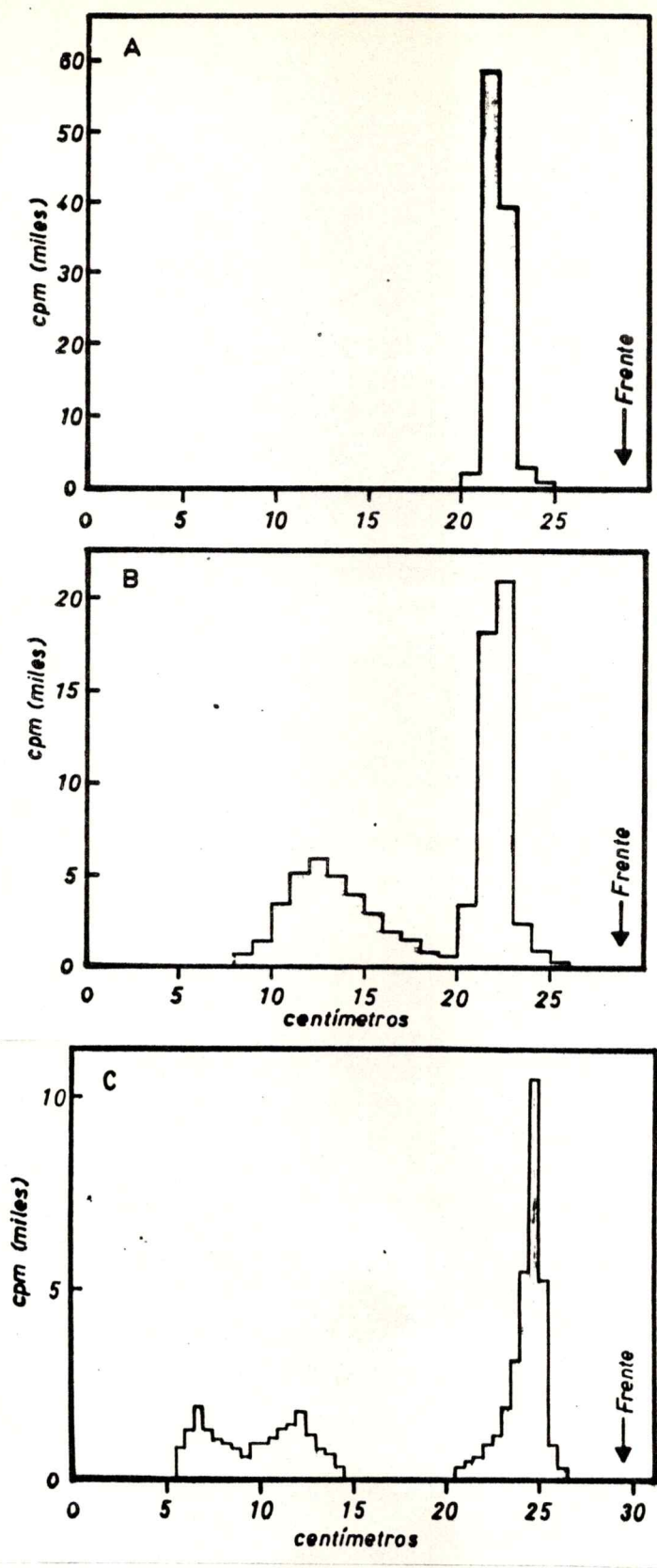


Figura 5

de radiactividad, uno correspondiente al $2\text{-C}^{14}\text{-MVA}$ que no reaccionó y el otro asociado al producto de la reacción, el $2\text{-C}^{14}\text{-MVA-P}$ con un Rf de 0,45. La incubación con quinasa fosfomevalónica del medio en que se produjo la reacción anterior se presenta en la Fig. 5 C. Puede, en este último caso, apreciarse la presencia de 3 picos de radiactividad: los correspondientes al $2\text{-C}^{14}\text{-MVA}$ y $2\text{-C}^{14}\text{-MVA-P}$ con Rfs de 0,83 y 0,42 respectivamente, además del correspondiente al $2\text{-C}^{14}\text{-MVA-PP}$ con un Rf menor de 0,23. En este sistema, el MVA, menos polar, presenta la mayor migración y el MVA-PP, más polar, presenta la menor migración (25).

b) Cromatografía en papel e identificación por revelado para fosfatos orgánicos.

En este caso, las tiras de papel se revelaron de acuerdo a la técnica descrita por Rosenberg (26). Después del desarrollo y una vez secos los papeles, se sumergieron en el reactivo molibdato, que contiene molibdato de amonio ácido en acetona, se dejaron al aire y luego se trataron con el reactivo reductor que contiene cloruro de vanadilo en acetona. Al evaporarse esta última, los fosfatos orgánicos aparecen como manchas azules sobre fondo blanco. Se encontró una perfecta correspondencia entre la zona radiactiva asignada al MVA-P y la posición de la mancha azul, cuando se reveló el cromatograma según esta técnica.

c) Cromatografía en Dowex-1-formiato.

El Dowex-1-formiato se utilizó tanto para la purificación del MVA-P como para su identificación. Este sistema cromatográfico

presenta patrones de elución característicos para los diferentes precursores solubles de esteroides y ha sido utilizado por diferentes autores (1, 25, 18, 27). En la Fig. 6 se muestra el perfil cromatográfico obtenido cuando se pasó el MVA-P purificado en DEAE-celulosa a través de una columna Dowex-1-formiato de 1 x 25 cm según la metodología explicada en la sección A 4. Otros precursores solubles de esteroides tales como mevalonato-pirofosfato o isopen-tenilpirofosfato deben eluir con un tercer gradiente de HCOOH 4 M-formiato de amonio 0,4 M/HCOOH 4 M-formiato de amonio 0,8 M. Puede apreciarse en el gráfico la ausencia total de otros compuestos en la zona correspondiente a este último gradiente. El máximo de radiactividad corresponde a la posición descrita para el MVA-P.

d) Análisis del contenido de fósforo.

Se determinó el contenido de P del MVA-P sintetizado, según King (28). Se encontró una estequiometría exacta de 1 mol de P/mol de MVA-P, titulado enzimáticamente por método espectrofotométrico. Este análisis por una parte, y por otra la no existencia de fosfato ácido-lábil, corroboran la identidad del producto como MVA-P.

e) Análisis de nucleótidos contaminantes.

El análisis para ATP y ADP se efectuó durante las diferentes etapas de purificación del sustrato por 2 métodos:

1) Observación de fluorescencia bajo luz ultravioleta. En las primeras etapas de purificación se observó una mancha fluorescente con Rf 0,18-0,22 en el sistema n-propanol; amoníaco; agua, desarrollado en forma ascendente que probablemente corresponde al

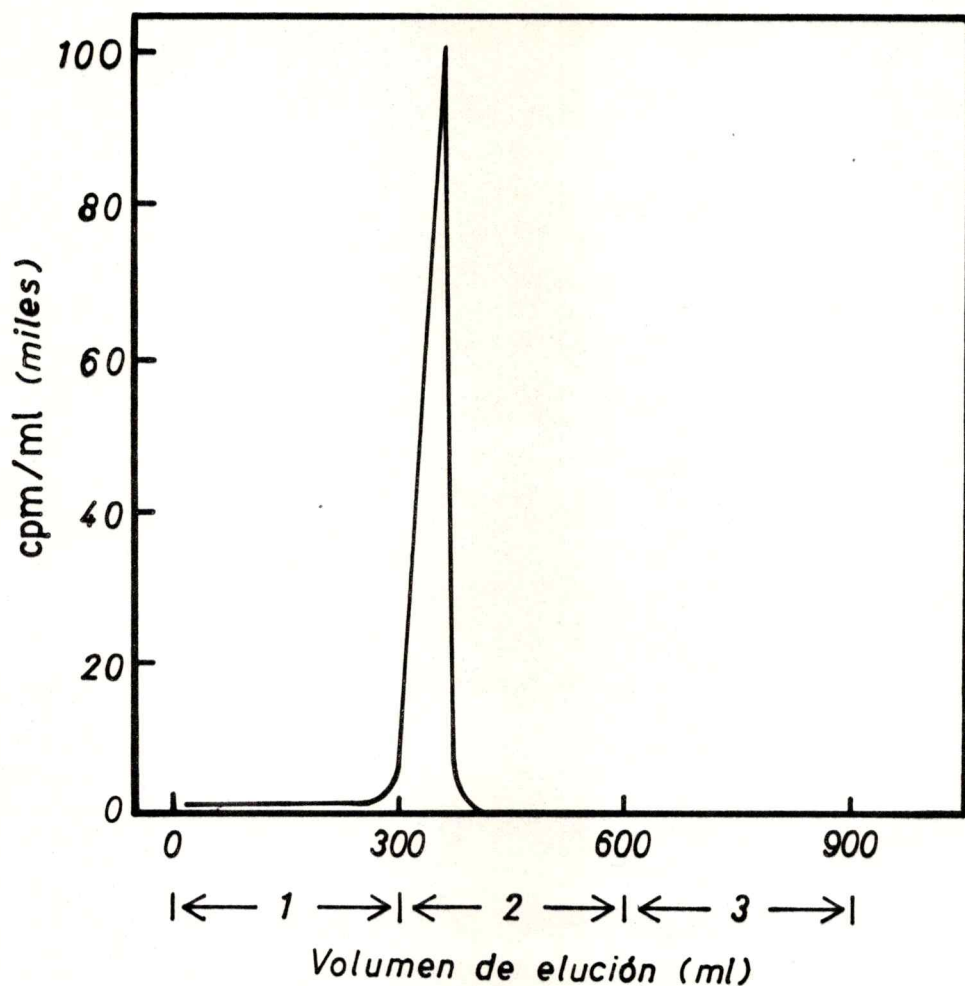


Figura 6. Cromatografía del H^3 -mevalonato-5-fosfato en Dowex-1-formiato.

El H^3 -MVA-P purificado en DEAE-celulosa como se describe en el texto, se aplicó a una columna de Dowex-1-formiato de 25 x 1 cm. Se hizo pasar 300 ml de cada uno de los siguientes gradientes a un flujo de 90 ml/hora, colectándose fracciones de 10 ml: H_2O /ácido fórmico 4 M (1), ácido fórmico 4 M/ácido fórmico 4 M-formiato de amonio 0,4 M (2) y ácido fórmico 4 M-formiato de amonio 0,4 M/ácido fórmico 4 M-formiato de amonio 0,8 M (3). Se contó la radiactividad en alícuotas de 0,1 ml en solución de centelleo TENAP.

ATP. Esta mancha fue aún detectable en el sobrenadante de sulfato de bario pero desapareció después de la purificación del MVA-P por DEAE-celulosa.

2) Ensayo espectrofotométrico. El ADP se tituló midiendo la oxidación del NADH a 340 nm en un medio que contenía en un volumen final de 1 ml: fosfato K 100 mM pH 7,5; NADH 0,24 mM; PEP 25 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; $MgCl_2$ 5 mM; PK y LDH 8 unidades de cada una. Después de registrar la línea base se inició la reacción agregando 0,05 ml de la solución conteniendo ADP. El ensayo correspondiente para ATP contenía en un volumen de 1 ml: fosfato de K pH 7,5 100 mM; NADH 0,24 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; PEP 2,5 mM; $MgCl_2$ 5 mM; PK y LDH 8 unidades de cada una; MVA 3 mM; quinasa mevalónica 50 mU. A 0,95 ml de la mezcla conteniendo los reactivos señalados, se agregó 0,50 ml de la solución donde se quería determinar la presencia de ATP. El producto purificado no presentó ATP ni ADP medidos por los métodos espectrofotométricos descritos.

f) Análisis de ácido mevalónico

Se determinó si la preparación purificada de MVA-P contenía MVA detectable utilizando el ensayo espectrofotométrico para quinasa mevalónica descrito en la Sección A-2 a) de Métodos. No se encontró contaminación de MVA en el producto purificado.

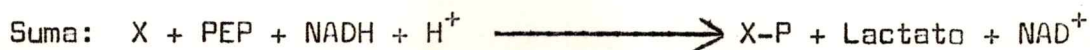
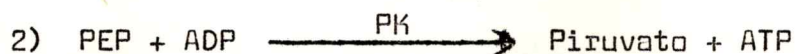
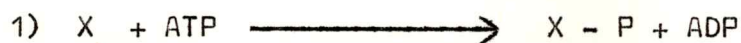
6. Medición de la concentración de mevalonato-5-fosfato.

Se tituló la concentración de MVA-P utilizando el ensayo para quinasa fosfomevalónica que se describe en la sección B de

Métodos. La reacción de fosforilación del MVA-P a MVA-PP es reversible, pero en presencia de PEP y PK se desplaza totalmente hacia la formación de MVA-PP a medida que el ADP formado en la reacción es refosforilado a ATP (2). El medio de reacción contenía en un volumen de 0,99 ml: NADH 0,24 mM; ATP 2,5 mM; PEP 2,5 mM; fosfato de K pH 7,5 100 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; PK y LDH 8 unidades de cada una; quinasa fosfomevalónica, 100 mU. Después de registrar la línea base en un espectrofotómetro Cary 118C se agregó el MVA-P en un volumen de 0,01 ml y se dejó que la reacción llegara a su término. Se restó la pequeña caída de absorbancia producida por la dilución al agregar el MVA-P preparando una cubeta similar y a la que se agregó 0,01 ml de agua en lugar del MVA-P. De la variación de absorbancia a 340 nm, la cual es proporcional a la cantidad de ADP producido, se estimó la concentración de MVA-P.

B. Ensayo espectrofotométrico de la actividad de la quinasa fosfomevalónica,

El método consiste en medir el ADP generado en la reacción en un sistema acoplado a la oxidación del NADH. Este ensayo propuesto inicialmente por Tchen (29), ha sido usado por diversos autores para el ensayo de la quinasa mevalónica y quinasa fosfomevalónica de diversas fuentes, y se basa en el acoplamiento de 3 reacciones (en que X = MVA o MVA-P):



El resultado es la oxidación de NADH a una velocidad igual a la formación de ADP, siempre que la reacción 1) sea la limitante de velocidad. La desaparición del NADH se siguió a 30^o y 340 nm en un espectrofotómetro Cary 118 C o en Varian Techtron 635, ambos provistos de registrador, utilizando cubetas de 1 ml de volumen y 1 cm de paso óptico.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: fosfato de potasio pH 7,5, 100 mM; 2-mercaptoetanol 100 mM; NADH 0,24 mM; ATP 2,5 mM; PEP 2,5 mM; MgCl₂ 5 mM, PK y LDH 8 unidades de cada una. A 0,975 ml de la mezcla de reacción mantenida a 30^o se agregaba 0,01 ml de la solución de quinasa fosfomevalónica. Después de registrar la línea base por 2-3 minutos se agregaba 0,015 ml de MVA-P 50 mM (0,75 μ moles) con lo cual se iniciaba la reacción.

La velocidad de consumo de NADH, proporcional a la producción de ADP, se calculó de la pendiente del trazado densitométrico y del coeficiente de extinción milimolar 6,22 del NADH (30).

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que fosforila un micromol de MVA-P por minuto a 30^o, en las condiciones de ensayo descritas. La actividad específica de una preparación de quinasa fosfomevalónica se define como el número de unidades por mg de proteína.

Los reactivos se prepararon de la siguiente manera: el ATP se neutralizó con KOH hasta pH 7,5. La sal triciclohexilamina del PEP se usó sin ajustar pH, la sal monociclohexilamina se ajustó a pH 7,5 con KOH. Las enzimas auxiliares PK y LDH se mezclaron de tal modo que 3 μ l de la mezcla tuvieran 8 unidades de cada enzima.

El NADH y el 2-mercaptoetanol se prepararon frescos cada vez. Los tampones y las enzimas se guardaron a 4°; el resto de las soluciones a -20°.

El ensayo espectrofotométrico se efectuó siempre en condiciones tales que la actividad de las enzimas auxiliares no fuera limitante de velocidad bajo ninguna condición usada. Cuando se introdujo un cambio, se probó cuidadosamente el comportamiento de ellas.

En preparaciones muy crudas se agregó NaF 10 mM a la mezcla de reacción, a fin de inhibir fosfatasas muy activas presentes en tales extractos, y evitar así la destrucción del NADH. Este ensayo es útil entre pH 5,1 y 8,5. Bajo pH 5 el NADH se destruye rápidamente (31). La principal ventaja de usar este método de ensayo en extractos crudos es su rapidez, esencial cuando se trabaja en la purificación de una enzima. Sin embargo, los resultados deben interpretarse con cautela por cuanto la presencia de descarboxilasa pirofosfomevalónica en preparaciones de quinasa fosfomevalónica debería dar resultados artificialmente elevados para la quinasa, ya que esta última también requiere de ATP. El ensayo, no obstante, no se invalida si sólo se miden velocidades iniciales. Por otra parte, si otros componentes del sistema de ensayo están presentes en exceso, el método se puede usar para el análisis cuantitativo del ADP, ATP, MVA o MVA-P. Para el ADP basta con PK y LDH. Para el ATP y MVA puede usarse quinasa mevalónica, además de PK y LDH. En el primer caso, el medio de reacción contiene MVA y la reacción se inicia agregando el ATP; en el segundo, el medio contiene

ATP y la reacción se inicia agregando el MVA. Para el análisis del MVA-P se emplea quinasa fosfomevalónica junto con PK y LDH. Estos métodos se emplearon para determinar la presencia de estas sustancias en la preparación y purificación del MVA-P.

C. Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por los siguientes métodos:

a) Método de biuret (32) en la estimación del contenido de proteínas de extractos crudos y fracciones precipitadas con sulfato de amonio.

b) Absorbancia a 280 nm se utilizó en el análisis relativo de eluidos de columnas de DEAE-celulosa, Bio-Gel P-150 e hidroxilapatita.

c) Micrométodo, aplicable a muestras con bajo contenido de proteínas y que contienen materiales que interfieren con el método de Lowry clásico, tales como glicerol, Tris o 2-mercaptoetanol. El método, propuesto por Bensadoun y Weinstein (33), consiste en agregar a la solución de proteínas en un volumen de 3 ml, 0,025 ml de deoxicolato de sodio al 2 %. Se agita vigorosamente y se deja en reposo por 15 minutos. Se agrega 1 ml de TCA al 24 %, se mezcla y se centrifuga a $3.300 \times g$ durante 30 minutos. El sobrenadante se separa por succión y el precipitado se trata de forma similar al método de Lowry convencional (34), agregando 1,5 ml del reactivo Lowry C y agitando vigorosamente. Se agrega luego 0,15 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu y después de 45 minutos en la

obscuridad, se leen las absorbancias a 660 nm. Este método se aplicó introduciendo la modificación de agregar 0,1 ml de NaOH 1 M antes del reactivo de Lowry C, por cuanto quedaba un pequeño remanente de TCA después de aspirar éste por succión que era necesario neutralizar.

En este trabajo se utilizaron tubos de centrifuga cónicos, los cuales permitieron visualizar mejor el escaso precipitado en el fondo del tubo. Las pequeñas trazas de precipitado adherido a las paredes no constituyeron riesgo de ser succionadas, al dejar el pequeño remanente de TCA ya comentado, y que fue neutralizado con NaOH. El método resultó muy reproducible y permite detectar hasta 1-2 μ g de proteína por tubo. La Fig. 7 muestra una curva de calibración obtenida con albúmina de suero de bovino (BSA).

D. Medición de radiactividad.

Las mediciones de radiactividad se efectuaron en un contador de centelleo líquido Nuclear Chicago, modelo Mark II. Se utilizaron frascos de cómputo de 20 ml de capacidad, con 10 ml de líquido de centelleo. Este último fue ya sea solución Bray (naftaleno 60 g; PPO 4 g; POPOP 0,2 g; metanol 100 ml; etilenglicol 20 ml; p-dioxano hasta completar 1 l), o bien TENAP (naftaleno 80 g; PPO 4 g; etanol absoluto 400 ml; tolueno hasta completar 1 l). Los e-luidos radiactivos de columnas de las preparaciones de MVA-P fueron contados directamente de estas soluciones, agregando 0,1-0,2 ml a cada frasco de cómputo. En los ensayos radiocromatográficos se introdujeron dentro de los frascos de cómputo los trozos de papel

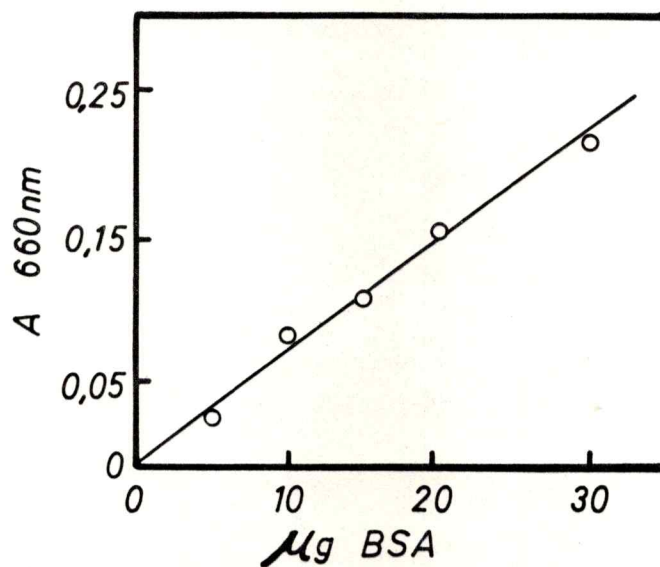


Figura 7. Curva standard para proteínas empleando el micrométodo de Lowry modificado.

Se utilizó como patrón una solución de albúmina de suero de bovino (BSA). Los detalles experimentales se describen en el texto.

cortados del cromatograma, cuidando que quedaran totalmente sumergidos.

E. Preparación de materiales para cromatografía.

Se describe la preparación y manipulación de los polímeros utilizados en la purificación y estudio de la quinasa fosfomevalónica. Todas las separaciones cromatográficas fueron efectuadas a 4°. Los polímeros, cuando no estaban en uso, se mantuvieron en azida de sodio al 0,02 %.

1. DEAE-celulosa.

Este material se procesó de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por Whatman (35). El intercambiador se preparó suspendiéndolo en 10-20 volúmenes de agua, se agitó suavemente, se dejó decantar y se eliminó el líquido sobrenadante conteniendo las partículas finas. Este procedimiento se repitió 2 veces. Se trató luego con 15 vol. de HCl 0,5 N durante 30 minutos, se filtró en embudo Büchner a través de papel Whatman Nº 1 y se lavó con bastante agua desionizada hasta pH 5-6. Se suspendió luego en 15 volúmenes de NaOH 0,5 N agitando durante otros 30 minutos. Se filtró y se lavó con abundante agua desionizada hasta que el pH del filtrado se acercara a la neutralidad. El intercambiador se suspendió en tampón fosfato de K 50 mM pH 7,5, se agitó suavemente y se reajustó el pH de la mezcla con KH_2PO_4 . Se filtró y se suspendió en el tampón de partida, fosfato de K 10 mM pH 7,5 de modo que el volumen total fuera aproximadamente del doble del volumen decantado. Con esta suspensión se cargó la columna. Se utilizaron columnas de vidrio .

provistas de criba del mismo material. Antes de cargar la columna se colocó una capa de perlas de vidrio sobre la criba. El empaque de las columnas se hizo bajo presión hidrostática cuidando que desde el momento de agregar la suspensión hasta tener la columna empacada, las operaciones se hicieran lo más rápido posible a fin de evitar corrientes de convección. Una vez empacada la columna se colocó sobre la superficie del intercambiador un disco de papel Whatman Nº 1 con perforaciones hechas con un alfiler a fin de evitar la alteración de la superficie en las manipulaciones posteriores. Sobre esta última se dejó una capa de 2-3 cm de líquido. La columna se tapó con un tapón de goma provisto de una extensión hecha con una pipeta Pasteur, la cual se dejó sumergida en la solución tampón.

La columna se siguió lavando con el tampón de partida hasta que el pH y la conductividad fueran iguales a la entrada y salida.

El intercambiador se regeneró tratándolo con NaCl 1 M, agitando suavemente durante 1 hora en la cual se desprende la mayor parte del material proteico adherido y siguiendo luego con el procedimiento descrito para el tratamiento del material nuevo.

2. Bio-Gel P-150.

El polímero se preparó de acuerdo a las instrucciones de Bio Rad Laboratories (36). El material hidrató en un matraz de Kitasato, suspendiéndolo en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5 con agitación suave, y se dejó luego en reposo por varias horas a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se suspendió en tampón fresco de modo de tener una suspensión donde el volumen de tampón fuera aproximadamente igual al volumen del material decantado. Se

desaireó aspirando con una bomba de vacío. A una columna Pharmacia de 5 a 10 cm provista de dos adaptadores, se agregó tampón fosfato, aproximadamente un 20 % del volumen de la columna y luego se agregó suavemente la suspensión agitada de la resina. Cuando hubo decantado 2-5 cm de gel, se abrió la salida, cuidando de no exceder la presión hidrostática recomendada por el fabricante. Cuando fue necesario, se agregaron porciones adicionales del polímero antes que hubiera decantado la porción anterior. Una vez que la columna estuvo empacada (75 cm de altura) se instaló en pieza fría a 4^o, se ajustó el adaptador superior, y se hizo pasar tampón con la ayuda de una bomba peristáltica durante 24 horas a un flujo de 25 ml/hora, ligeramente superior al que se iba a usar posteriormente en la separación cromatográfica. El adaptador superior se reajustó cada vez que el nivel del polímero fue bajando. Una vez que se estabilizó el nivel superior a una altura de 75-80 cm, se invirtió el flujo a la misma velocidad hasta que pasara al menos un volumen de columna. La aplicación de la muestra y la elución posterior se hizo con un flujo invertido de 20 ml/hora usando tampón fosfato de potasio 10 mM pH 7,5 como eluyente. La columna se usó repetidas veces lavándola después de cada corrida con el mismo tampón fosfato.

3. Bio-Gel P-60.

Este polímero se utilizó en la determinación del peso molecular de la quinasa fosfomevalónica. Su preparación se efectuó de modo similar al descrito para el Bio-Gel P-150. Se empleó una columna marca Pharmacia de 1,6 cm de diámetro, la cual se empacó

hasta una altura de 82 cm. El polímero se equilibró en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; KCl 0,1 M; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 20 mM. Antes de ser utilizado se equilibró durante 48 horas, a 4⁰ con un flujo invertido de 12 ml/hora. Cuando se aplicaron las muestras, el flujo se redujo a 10 ml/hora.

4. Hidroxilapatita.

La preparación del gel se efectuó de acuerdo a instrucciones proporcionadas por el fabricante (36). El polvo seco se suspendió en 6 partes de tampón fosfato 10 mM pH 7,5 agitando suavemente con varilla de vidrio. Se dejó decantar por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante con el material fino. Se agregó otra porción de tampón fosfato y se repitió la operación anterior. Se suspendió la hidroxilapatita en un volumen igual de tampón y con esta suspensión se cargó una columna de 1,6 cm de diámetro hasta una altura de 18 mm, cuidando de dejar sobre la superficie del gel 1 cm de líquido. Debe evitarse que se seque la parte superior del gel porque absorbe CO₂ y se forma una costra en la superficie.

Se lavó luego la columna en pieza fría a 4⁰ con varios volúmenes de tampón fosfato de K antes de aplicar la muestra.

La hidroxilapatita después de ser usada se regeneró lavando la columna con tampón fosfato de K 0,5 M y luego con varios volúmenes de columna de tampón de partida.

5. Azul-dextrano-Sepharose.

Este material se preparó según Ryan y Vestling (37) acoplando el azul-dextrano a la Sepharose activada con bromuro de cianógeno. Se lavaron 50 g de Sepharosa 4 B (peso húmedo compacto obtenido

después de centrifugar a $200 \times g$ durante 1 minuto) en 1 l de agua desionizada filtrando en embudo Büchner. Se suspendió en 50 ml de agua desionizada. Se agregaron 50 ml de carbonato de sodio 2 M y se mezcló con agitación suave. A esta mezcla, agitándose en hielo se adicionaron de una vez, aumentando la velocidad de agitación, 2,5 ml de una solución conteniendo 2 g de CNBr por ml en acetoni-trilo (38). Se agitó vigorosamente por 1 minuto y enseguida se filtró rápidamente en embudo Büchner y se lavó rápidamente en forma sucesiva con 1 l de NaHCO_3 0,1 M pH 9,5 y volúmenes iguales de agua y tampón carbonato de sodio 0,4 M pH 10, filtrando en un embudo Büchner con vacío. El polímero compacto, así activado, se suspendió inmediatamente en 50 ml del tampón carbonato antes mencionado conteniendo 1 g de azul-dextrano. Se reajustó el pH a 10. La suspensión se agitó suavemente por 18 horas a 4° . El producto obtenido se lavó con 6 l de KCl en embudo Büchner para remover el azul-dextrano no reaccionado. Se controló la eficiencia del lavado midiendo la absorbancia a 280 nm del líquido de lavado. El polímero se suspendió en agua desionizada. Se preparó una columna hecha con una jeringa de vidrio de 7,5 x 2,4 cm (30 ml) a la cual se le puso un trozo de "nytex" presionado con perlas de vidrio finas. Se cargó la columna con el polímero de azul-dextrano-Sepharose suspendido en agua desionizada, se introdujo en la pieza fría a 4° y se lavó con agua desionizada hasta que no apareció absorbancia a 280 nm. Se lavó enseguida con tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM. Finalmente se lavó con 2 volúmenes del mismo tampón que contenía además glicerol al 10 % y en esta forma

quedó preparada para aplicar la muestra.

F. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La electroforesis en condiciones no desnaturantes se realizó de acuerdo con las técnicas usuales descritas por diversos autores y resumidas por Gabriel (39). Se prepararon geles de poliacrilamida, en tubos de vidrio de 10 cm de largo y 0,6 cm de diámetro interno y se utilizó un equipo de electroforesis Büchler. El gel de concentración (0,2 ml) contenía acrilamida al 3,7 % y bisacrilamida al 0,8 %. El gel de resolución (2,0 ml) se preparó con acrilamida al 10-11 ó 12 % y bisacrilamida al 0,1 %. Ambos geles contenían tetrametilen-etilendiamina (TEMED) al 0,032 % y persulfato de amonio al 0,025 %. La muestra se aplicó en glicerol al 10-20 % o sacarosa conteniendo además 0,005 ml de azul de bromofenol al 0,1%. El tampón de electroforesis consistía en Tris, 25 mM; glicina, 192 mM, pH 8,3. Se aplicó corriente constante de 1 mA por gel en el gel de concentración y 2,5 mA por gel en el gel de resolución. Los geles se tñieron durante 1 hora con azul de Coomassie al 0,25 % en metanol 45 %; ácido acético 10 %. El destañido se hizo en metanol 20 %; ácido acético 10 % durante 24-48 horas. Los registros densitométricos de los geles fueron efectuados en un accesorio de registro para geles acoplado al espectrofotómetro Varian Techtron 635 a 600 nm, a una velocidad de 10 o 25 mm/minuto. Para la detección de actividad enzimática en los geles, éstos se corrieron en la pieza fría a 4^o y además se hizo circular por la cámara exterior del aparato, agua a 10^o propulsada por un baño termorregulado Gilson.

Terminada la corrida, los geles se extrajeron rápidamente y se cor
taron transversalmente con un seccionador en segmentos de 0,2 cm.
Cada trocito se transfirió a un pequeño tubo de ensayo y se molió
en frío con una bagueta delgada de vidrio agregando inmediatamen
te 0,2 ml de tampón fosfato de potasio 0,2 M, pH 7,5 conteniendo
2-mercaptoetanol 10 mM. La actividad enzimática se ensayó ensegui
da tomando 0,02 ml de cada sobrenadante una vez que el gel tritura
do hubo decantado en cada tubo, empleando la técnica descrita en
la sección B. Alternadamente, se cortaron los geles longitudinal-
mente con una hoja de bisturí, dejándose una mitad para ensayo de
actividad según el método descrito, y la otra mitad para tinción
con azul de Coomassie. De esta manera fue posible establecer la
banda de proteína correspondiente a la quinasa fosfomevalónica.

G. Determinación del peso molecular de la quinasa fosfomeva
lónica.

1. Cromatografía en Bio-Gel P-60.

El peso molecular de la enzima se determinó de acuerdo a An
drews (40, 41). Se empacó una columna Pharmacia de 1,6 cm de diá-
metro con Bio-Gel P-60 en tampón Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0; KCl 0,1
M; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM hasta una altura de 82 cm. U-
na vez empacado el polímero se invirtió el flujo equilibrando con
el mismo tampón a una velocidad de 12 ml/hora con la ayuda de una
bomba peristáltica, durante 48 horas. Al momento de aplicar las
muestras el flujo se redujo a 10 ml/hora. Se aplicó primeramente
1 ml de una solución de azul-dextrano para determinar el volumen de

exclusión y sucesivamente proteínas de peso molecular conocido: pepsina (35.000) (42), quimotripsinógeno (25.000)(42), citocromo c (12.400) (40) e insulina (5.750)(43). Todas las muestras fueron aplicadas en un volumen de 1 ml conteniendo 5-10 mg de proteína y se colectaron fracciones de 2 ml. Las posiciones de elución de los diferentes marcadores se determinaron midiendo la absorbancia a 600 nm para el azul-dextrano, a 412 nm para el citocromo c y a 280 nm para insulina, quimotripsinógeno y pepsina. La posición de elución de la quinasa fosfomevalónica se determinó por el ensayo espectrofotométrico de actividad.

2. Gradiente de sacarosa.

Los gradientes de sacarosa fueron preparados entre 5 y 20 % en tampón fosfato de potasio 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM, en tubos de nitrocelulosa de 5 ml para el rotor SW 65 de la ultracentrífuga Beckman. Como marcadores se utilizaron citocromo c (12.400) (40), albúmina sérica de bovino (67.000) (40) y deshidrogenasa láctica (140,000) (42). Las muestras se aplicaron en tampón fosfato 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM en un volumen de 0,1 ml. La quinasa fosfomevalónica y la albúmina de suero de bovino fueron aplicadas separadamente; citocromo c y deshidrogenasa láctica se aplicaron juntas en un mismo tubo. Se centrifugó durante 17 horas a 160.000 x g en una ultracentrífuga Beckman modelo L 5-40. Terminada la centrifugación se fraccionó el contenido de cada tubo tomando fracciones de 0,2 ml desde el fondo del tubo hacia arriba utilizando un equipo Isco Gradient Analyzer. A cada fracción se agregó 0,8 ml de tampón fosfato 10 mM procediéndose a determinar la posición de cada

proteína en el gradiente. Citocromo c y albúmina de suero de bovino fueron determinadas por absorbancia a 412 y 280 nm respectivamente; la deshidrogenasa láctica se determinó mediante ensayo enzimático de actividad así como también la quinasa fosfomevalónica.

3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio.

La electroforesis se efectuó en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1 % en placas de poliacrilamida al 11 %, de 12 x 15 x 0,15 cm en un aparato Hoeffler Scientific Instruments. Las soluciones fueron preparadas de acuerdo a Laemmli (44). Las muestras, a una concentración de proteína de 2 mg/ml se diluyeron 1:1 con el "tampón de muestra", el cual contenía Tris-HCl 0.125 M pH 6,8; SDS 6 % (p/v); 2-mercaptoetanol 10 % (v/v); glicerol al 20 %. Las muestras se calentaron al baño maría hirviente por 3 minutos y luego fueron depositadas sobre el gel de concentración (acrilamida al 3 % p/v; bisacrilamida al 0,08 % p/v; TEMED al 0,1 % v/v; persulfato de amonio al 0,025 % p/v). Se aplicó un voltaje regulado de 70 volts y una vez que las muestras pasaron al gel de resolución (acrilamida al 11 %; bisacrilamida al 0,27 %; TEMED al 0,05 %; persulfato de amonio al 0,025 % p/v) se aumentó el voltaje a 110 volts.

Las soluciones de quinasa fosfomevalónica muy diluidas empleadas fueron concentradas precipitando con ácido tricloroacético en presencia de ácido poliadenílico, de acuerdo con Valenzuela y col. (45). A 0,1 ml de la solución de enzima conteniendo 0,2-0,3 mg/ml se agregaron 0,01 ml de ácido poliadenílico (2 mg/ml) y 0,2 ml

de TCA al 20 %. Se centrifugó 20 minutos a $10.000 \times g$ en el rotor HB-4 de la centrífuga Sorvall. El precipitado se lavó dos veces con etanol-éter (v/v) y una vez con éter. Luego se disolvió en el "tampón de muestra" (0,025-0,040 ml) y se continuó con el tratamiento descrito.

Los geles se fijaron en una solución de isopropanol 50 %; TCA 10 % durante 30 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron durante 15 horas con azul de Coomassie al 0,1 % en isopropanol 25 %; TCA 10 %. El desteñido se hizo con ácido acético al 10 % con agitación a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Se utilizaron los siguientes marcadores para establecer la relación entre movilidad y peso molecular: ovoalbúmina, 43.000 (46); quimotripsinógeno A, 25.000 (42); citocromo c, 12.400 (40).

H. Determinación de parámetros cinéticos.

Los estudios se hicieron ensayando la actividad de la quinasa fosfomevalónica a 30° como se describe en la sección B de Métodos. Las Km verdaderas para el MVA-P y el ATP fueron determinadas preparando varios medios de reacción que contenían cantidades constantes de tampón fosfato pH 7,5, NADH, PEP, Mg^{+2} , 2-mercaptoetanol, PK y LDH, y cantidades variables de ATP. A alícuotas apropiadas de cada uno de tales medios, se agregó la quinasa fosfomevalónica, y luego de registrar la línea base se agregó el MVA-P a concentraciones variables en un volumen final de 1,0 ml.

Los datos cinéticos fueron procesados de acuerdo al método de Lineweaver-Burk o de Eadie Hofstee, en programas de computación

elaborados en una calculadora programable Canon, modelo Canola SX 300.

El efecto de la concentración del Mg^{+2} se determinó variando la concentración de Mg^{+2} a concentraciones constantes de ATP y de MVA-P. La concentración de $MgCl_2$ de la solución patrón, preparada por pesada del producto comercial se determinó exactamente ti tulando el ión cloruro conductimétricamente por medio de un titula dor automático.

El efecto del pH en la actividad enzimática se determinó efectuando el ensayo espectrofotométrico de la actividad en una serie de tampones de Good (47), a concentración 100 mM entre pH 5,5 y 9,5. Se utilizaron los tampones MES, TES, BICINE y CAPS, ajustán dose el pH en cada caso con KOH. En los valores de pH extremos se controló la efectividad de las enzimas auxiliares utilizadas en el ensayo. Esto se hizo agregando ADP a una mezcla de reacción que contenía PK y LDH además de los sustratos y cofactores correspondientes a los diferentes pH. La oxidación instantánea del NADH se tomó como una indicación de que las enzimas auxiliares eran efec tivas a estos valores de pH. En todo caso, a valores de pH extremos se agregó el doble de la cantidad usual de ellas.

I. Efecto de diversos iones metálicos divalentes y nucleótidos sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica.

Para establecer si otros iones metálicos podían reemplazar al Mg^{+2} en la reacción catalizada por la quinasa fosfomevalónica,

se hizo reaccionar la enzima con sus sustratos MVA-P 1 mM, ATP 2,5 mM y la sal de un ión metálico a concentración 5 mM en un medio que contenía Tris-HCl 100 mM pH 7,5 y 2-mercaptoetanol 10 mM. Se ensayaron $MnCl_2$, $ZnSO_4$ y $CoSO_4$. Después de preincubar con la enzima a 30° por 5 minutos se inició la reacción agregando el MVA-P. La reacción se detuvo a los 10 minutos con 1 ml de $HClO_4$ al 3 % y se agregó enseguida un volumen de KOH suficiente para neutralizar el $HClO_4$. Los tubos fueron transferidos a hielo y se centrifugó el $KClO_4$ y proteínas precipitados a $2.500 \times g$ durante 10 minutos en el rotor HB-4 de la centrifuga Sorvall. El sobrenadante se apartó para el ensayo espectrofotométrico del ADP generado en la reacción. Esto se hizo tomando 0,5 ml del sobrenadante y agregando Mg^{+2} 5 mM; KCl 50 mM; PEP 2,5 mM; NADH 0,24 mM; Tris-HCl 100 mM pH 7,5 hasta un volumen de 1,0 ml. Luego de registrar la línea base a 340 nm se agregó 0,003 ml de PK y LDH (8 unidades de cada una) y se midió la variación de absorbancia hasta titular totalmente el ADP formado. Previo al ensayo con otros metales se hizo una curva de velocidad de formación de ADP en función del tiempo usando Mg^{+2} , entre 0 y 20 minutos obteniéndose una respuesta lineal.

Se empleó este método, y no el método cinético habitual, pues la quinasa pirúvica requiere también de Mg^{+2} para su actividad.

El efecto de otros nucleótidos se hizo simplemente reemplazando el ATP por GTP, UTP y CTP en el ensayo espectrofotométrico normal. Dado que la quinasa pirúvica utilizada en el ensayo acoplado presenta una baja especificidad de sustrato nucleotídico como ha sido

demostrado por Plowman y Krall (48), el ensayo puede hacerse sin mayores reservas.

J. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato).

1. Reacción de inactivación.

Se dializó exhaustivamente la quinasa fosfomevalónica contra tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5 sin mercaptoetanol a fin de eliminar este último de la solución en que se mantiene la enzima. El 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato) (DTNB) se preparó en metanol o en el tampón fosfato de potasio. A la solución de enzima, en tampón fosfato, preincubada a 30^o se agregó el DTNB a la concentración requerida. A tiempos adecuados se tomaron alícuotas de 0,01 ml para el ensayo inmediato de la actividad. El control consistió en otra muestra de enzima tratada en condiciones similares a la cual se agregó el mismo volumen de solvente en vez de DTNB. El efecto de la concentración del reactivo se determinó incubando la enzima con concentraciones de DTNB que variaron desde 1×10^{-5} a 1×10^{-4} M, lo que representa un exceso molar de DTNB de 6 a 60 veces con respecto a la enzima.

2. Reversión por 2-mercaptoetanol y ditioneitol.

El efecto del 2-mercaptoetanol y del ditioneitol (DTT) se probó incubando la enzima con DTNB en la forma descrita en el párrafo anterior. Después de medir la reacción durante cierto

tiempo se apartaron dos alícuotas; a una se agregó 2-mercaptoetanol y a la otra DTT, ambos a concentración final 1 mM y se continuó registrando la actividad a tiempos apropiados. Al resto de la enzima tratada con DTNB también se continuó midiendo su actividad a lo largo del tiempo. Los valores de actividad fueron corregidos por el efecto de dilución al agregar los reactivos.

3. Efecto protector de los sustratos.

El efecto de la presencia de los sustratos en la reacción de inactivación se probó incubando la enzima con MVA-P o con Mg-ATP y agregando a tiempo cero el DTNB. Paralelamente se hicieron controles de la enzima tratada con DTNB sin sustratos y de la enzima incubada con cada uno de los sustratos en ausencia de DTNB.

4. Km aparentes de la enzima modificada.

Se determinaron las Km aparentes para ambos sustratos con la quinasa fosfomevalónica parcialmente inactivada con DTNB. Para ello, la enzima se trató con DTNB a concentración final $2,5 \times 10^{-5}$ M, y se incubó a 30° durante 15 minutos. Se transfirió luego al hielo y se procedió a determinar las Km aparentes para el MVA-P y el ATP. El exceso de reactivo que no reaccionó con la enzima no se eliminó. La actividad residual de la quinasa fosfomevalónica conservada en hielo, se determinó cada cierto tiempo hasta los 75 minutos después de la adición de DTNB, tiempo superior al empleado en el experimento. Se comprobó que el grado de inactivación permaneció constante en el tiempo señalado.

K. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato.

1. Reacción de inactivación.

La inactivación se efectuó incubando la solución de enzima a 30° con PLP en tampón fosfato 10 mM conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM. La reacción se inició agregando el PLP preparado en el mismo tampón. A tiempos apropiados se tomaron alícuotas para el ensayo espectrofotométrico de la actividad. En forma paralela se efectuó un control reemplazando el PLP por el tampón de incubación. Se probó el efecto de la concentración de PLP incubando la enzima con concentraciones de PLP que variaron entre 5×10^{-6} y 5×10^{-5} M por 30 minutos, lo que representa un exceso molar de PLP en relación a la enzima que varió entre 4 y 44 veces. En forma similar se estudió el efecto de los análogos piridoxal y piridoxamina-5'-fosfato. El PLP se preparó siempre fresco en tampón fosfato 10 mM pH 7,5 y se cuidó de proteger las soluciones de la luz con papel obscuro.

2. Reversión de inactivación por lisina o diálisis.

El efecto de la lisina se probó incubando la quinasa fosfomevalónica a 30° con PLP, midiéndose la actividad residual durante un cierto tiempo, al término del cual se agregó lisina y se continuó la medición de actividad a tiempos apropiados. La muestra control se trató en las mismas condiciones excepto que no se agregó lisina.

El efecto del NaBH_4 se probó de la siguiente manera: se incubó una solución de enzima con PLP y se midió la actividad residual hasta los 10 minutos. A los 11 minutos se agregó NaBH_4 y a los 20

minutos se agregó lisina. El registro de la actividad se prolongó hasta los 50 minutos. Otra muestra de enzima tratada con PLP a la misma concentración, sin otras adiciones sirvió de control de inactivación. Los valores de actividad fueron corregidos, siempre que fue necesario, para compensar el efecto de dilución.

La reversión por diálisis de la enzima modificada se efectuó incubando la quinasa fosfomevalónica a 30° con PLP $2,5 \times 10^{-5}$ M durante 30 minutos. La muestra se dividió en dos partes, una de las cuales se sometió a diálisis contra tampón fosfato 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM durante 5 horas y la otra se dejó como control sin dializar. Separadamente se incubaron otras muestras de enzima a 30° durante 30 minutos, una sin adiciones, otra con NaBH_4 y la tercera con PLP, agregándose a esta última el NaBH_4 después del período de incubación. A continuación, estas muestras fueron también dializadas durante 5 horas contra el mismo tampón.

3. Efecto protector de los sustratos.

Se determinó el efecto que ejercían los sustratos en la reacción de inactivación. Para ello se agregó el PLP a la enzima preincubada con MVA-P (0,9 mM) o con Mg-ATP (2,4 mM) y se tomaron alícutas de 0,01 ml a tiempos apropiados para el ensayo de actividad. Como controles se incubaron muestras de la enzima con cada uno de los sustratos en las mismas condiciones experimentales. Las actividades se corrigieron por la dilución al agregar el reactivo modificador.

4. Efecto del pH en la reacción de inactivación.

El efecto del pH se determinó incubando la enzima a diferentes pH con PLP $1,5 \times 10^{-5}$ M, en diversos tampones de Good 0,1 M conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM. Los tampones empleados en los rangos de pH que se indica fueron: MES (6,5 - 7,5), TES (7,0 - 8,0) BICINE (8,0 - 9,0) y CAPS (9,0 - 9,5). Después de preincubar la enzima en el tampón correspondiente durante 3 minutos a 24° o a 30° se agregó el PLP a concentración final $1,5 \times 10^{-5}$ M y se tomaron a lícotas a diferentes tiempos para el ensayo de la actividad residual. El control consistió en una solución de enzima tratada de i déntica forma pero omitiendo el PLP.

El esquema experimental descrito en el párrafo anterior no permite hacer mediciones a tiempos menores de 2 minutos, que es el que se requiere en tomar la muestra y efectuar el ensayo de actividad. Con el objeto de efectuar mediciones a tiempos más cortos se procedió de la siguiente manera: se incubó un pequeño volumen de la solución de enzima en el tampón correspondiente en pequeños tubos de ensayo. Después de agregar el PLP se detuvo la reacción a los tiempos apropiados con NaBH_4 . En el tubo control se reemplazó el PLP por el mismo volumen de tampón. Todos los tubos estuvieron el mismo tiempo a la temperatura del experimento. Terminada la in cubación, los tubos fueron transferidos al hielo y se tomó de cada uno de ellos una alícuota para el ensayo de actividad. Con este procedimiento se tomaron muestras cada 30 segundos. El NaBH_4 detie ne la reacción de inactivación y ésta no puede continuar aún en

presencia de PLP, ya que el NaBH_4 al parecer reacciona con el PLP remanente, reduciendo el grupo aldehído.

5. Determinación de las K_m aparentes de la enzima modificada.

Se incubó la enzima con PLP $4,5 \times 10^{-5}$ M durante 30 minutos a 30° en tampón fosfato de potasio 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM y al cabo de este tiempo se redujo con NaBH_4 . En forma paralela se incubaron otras dos muestras de enzima. En una de ellas se reemplazó el PLP por el tampón de incubación, agregándose el NaBH_4 igual que a la muestra problema; la otra no contuvo PLP ni NaBH_4 , siendo ambos reemplazados por el volumen equivalente de tampón fosfato. Todas las muestras fueron dializadas contra el mismo tampón fosfato por 5 horas. Las K_m aparentes para los dos sustratos fueron determinadas en las tres muestras de enzima.

L. Titulación de grupos sulfhidrilos de la quinasa fosfomevalónica.

La determinación de grupos sulfhidrilos de la enzima se efectuó utilizando DTNB de acuerdo al método de Ellman (49). Se midió a lo largo del tiempo la formación del 2-nitro-5-mercaptobenzoato detectable por absorbancia a 412 nm, con un coeficiente de extinción molar de $1,36 \times 10^4$. El número de grupos -SH esenciales para la actividad de la enzima se determinó en experimentos paralelos, midiéndose a tiempos apropiados la actividad residual de la quinasa fosfomevalónica después de la adición de DTNB. Se dializó

la enzima homogénea en un volumen de 1 ml contra tampón fosfato 10 mM, pH 7,5 sin mercaptoetanol a fin de eliminar este último de la solución de enzima. La muestra se dividió en dos partes iguales, una para titulación de grupos -SH y la otra para la medida de actividad residual. Ambas porciones se llevaron a 0,98 ml con tampón fosfato. Una de ellas se introdujo en una cubeta de 1 ml en el portacubetas termorregulado del espectrofotómetro Cary 118 C mantenido a 30° y después de la estabilización de la temperatura se agregó 0,02 ml de DTNB 2 mM (concentración final 0,04 mM), preparado en el mismo tampón. Se registró la variación de absorbancia a 412 nm a lo largo del tiempo, leída contra una cubeta que contenía la misma cantidad de DTNB en tampón fosfato. La segunda porción de enzima se trató también con DTNB 0,04 mM y se midió la actividad residual a diferentes tiempos.

La titulación de grupos sulfhidrilos totales se efectuó de la siguiente manera: se dializó la quinasa fosfomevalónica, primero contra tampón fosfato de potasio 10 mM pH 7,5 sin mercaptoetanol y luego contra clorhidrato de guanidina 6 M preparado en tampón fosfato 10 mM pH 6,5. Después de la diálisis se ajustó el pH a 8,2 con KOH y se llevó a un volumen de 0,98 ml con tampón fosfato. Se agregó 0,020 ml de DTNB 4 mM y se registró la variación de absorbancia a 412 nm en el espectrofotómetro Varian Techtron 635 durante 90 minutos a temperatura ambiente. El blanco contenía la misma cantidad de DTNB en la solución de clorhidrato de guanidina.

M. Efecto de 2,3-butanodiona sobre la quinasa fosfomevalónica.

Se probó el efecto de la butanodiona agregando este reactivo a concentración 7 mM a la quinasa fosfomevalónica en tampón borato 60 mM, pH 7,89 de acuerdo a Riordan (50). La reacción se efectuó a 25^o y su curso se siguió durante 30 minutos tomando a tiempos apropiados muestras de 0,01 ml y ensayando inmediatamente la actividad de la enzima. El efecto de la presencia de los sustratos se probó agregando butanodiona a la enzima preincubada por 5 minutos con MVA-P o con ATP y MgCl₂.

N. Determinación de la composición aminoacídica de la quinasa fosfomevalónica.

1. Determinación del triptófano.

Como el triptófano se destruye por hidrólisis ácida, este aminoácido se determinó espectrofotométricamente de acuerdo al método de Edelhoch (51) que consiste en medir las absorbancias de la proteína a 280 y 288 nm en clorhidrato de guanidina 6 M preparado en tampón fosfato 20 mM, pH 6,5. El método permite determinar simultáneamente tirosina y triptófano si se conoce el contenido de cistinas. Como la absorción del triptófano es cerca de 4 veces la de la tirosina en sus respectivos máximo de absorción, la precisión en la estimación del primer aminoácido es mucho mejor que la del segundo. El contenido de ambos aminoácidos se puede estimar de las absorbancias a 288 y 280 nm y del conocimiento de los coeficientes

de extinción molar resolviendo las dos ecuaciones simultáneas:

$$E_{288} = N_{\text{try}} 4.815 + M_{\text{tyr}} 385$$

$$E_{280} = N_{\text{try}} 5.690 + M_{\text{tyr}} 1.280$$

en que N_{try} y M_{tyr} representan el número de moles de triptófano y tirosina respectivamente. Los valores de extinción están basados en los compuestos modelos N-acetil-L-triptofanamida y Gly-Tyr-Gly.

La quinasa fosfomevalónica homogénea se dializó sucesivamente contra clorhidrato de guanidina 6 M en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 6,5, luego contra un gran volumen de tampón fosfato 10 mM hasta que no se encontró absorbancia detectable a 260 nm en el tampón de diálisis, y finalmente contra la solución de clorhidrato de guanidina 6 M. Con este tratamiento se consiguió eliminar el ATP que contenía la solución de enzima purificada, resultante de la elución de la columna de azul-dextrano-Sepharose. Se registró el espectro de absorción de la quinasa fosfomevalónica entre 250 y 400 nm en el espectrofotómetro de doble haz Cary 118 C en cubetas de 1 cm de paso óptico. En la cubeta de referencia se colocó la solución de clorhidrato de guanidina y se ajustó la línea base utilizando el sistema de autocompensación de rendija. Una vez ajustada la línea base se reemplazó el blanco por la muestra y se registró el espectro de la enzima. Los valores de absorbancia a 280 y 288 nm fueron leídos directamente del espectro registrado.

2. Análisis de aminoácidos.

La muestra de quinasa fosfomevalónica en clorhidrato de guanidina 6 M obtenida según se describe en el párrafo anterior, se dilizó exhaustivamente contra varios cambios de agua desionizada a fin de eliminar totalmente las sales. Se apartaron 0,05 ml para medir el contenido de proteína, y el resto se dividió en dos partes de 135 μ g de enzima cada una, colocándolas en tubos de 12 x 100 mm cuidadosamente lavados. Se liofilizó a sequedad y luego a cada muestra se agregó 0,6 ml de HCl 6 N y se selló bajo nitrógeno. Una de ellas se hidrolizó durante 24 horas y la otra durante 48 horas a 110^o.

El análisis de aminoácidos se hizo en un analizador de aminoácidos Beckman 120 C. De cada muestra se aplicó 0,2 ml a la columna básica y 0,2 ml a la columna ácida. El registro densitométrico se hizo utilizando la escala expandida del instrumento (0,0-0,1 unidades de absorbanza). La concentración de cada aminoácido se estimó de los trazados densitométricos en comparación a los valores presentados por aminoácidos patrones procesados de manera similar a la muestra de enzima.

RESULTADOS

A. Purificación de la quinasa fosfomevalónica.

1. Experimentos preliminares.

Se probaron diversas combinaciones de métodos para purificar la quinasa fosfomevalónica. Los antecedentes disponibles señalaban que esta enzima se encuentra en la fracción soluble del homogeneizado celular de hígado y en menor concentración - alrededor de la cuarta parte - en relación a la quinasa mevalónica (2, 19). Los métodos preliminares de purificación descritos comprendían la preparación de un sobrenadante obtenido por precipitación del homogeneizado con sulfato de protamina, fraccionamiento con sulfato de amonio y adsorción en gel de fosfato de calcio. Este último debería adsorber selectivamente la quinasa mevalónica dejando la quinasa fosfomevalónica en el sobrenadante.

El problema de la purificación se abordó fraccionando directamente con sulfato de amonio el sobrenadante obtenido por centrifugación del homogeneizado de hígado a $100.000 \times g$ durante 45 minutos. Precipitando las proteínas con la sal a diferentes concentraciones se estableció que el rango óptimo de precipitación de la enzima se obtenía entre 30 y 60 % de saturación. La adsorción en gel de fosfato de calcio de la fracción obtenida por precipitación

con sulfato de amonio en el corte indicado, no resultó en una separación óptima de las dos quinasa y además se produjo una pérdida significativa de unidades de quinasa fosfomevalónica. En consecuencia, la adsorción en gel de fosfato de calcio fue descartada.

El comportamiento de la quinasa fosfomevalónica en DEAE-celulosa se estudió aplicando a una columna de DEAE-celulosa equilibrada con tampón fosfato de potasio 10 mM a pH 7,5 el material precipitado con sulfato de amonio entre 30 y 60 % de saturación, y lavando luego con concentraciones crecientes del mismo tampón. La enzima eluyó con una concentración de fosfato 100 mM. En la purificación se optó, una vez aplicada la muestra a baja fuerza iónica, por lavar la columna con tampón fosfato 50 mM, pH 7,5 y luego aplicar un gradiente de fosfato entre 60 y 250 mM.

La hidroxilapatita se ensayó con el material procedente de la columna de DEAE-celulosa y también con el obtenido en Bio-Gel P-150, este último, una etapa más de purificación. En el primer caso, la enzima fue retenida por la hidroxilapatita y se eluyó de ella con fosfato de potasio 50 mM, pH 7,5. En el segundo caso, con un material mucho más purificado, la quinasa fosfomevalónica no se retuvo pero sí otras proteínas contaminantes. Se optó por utilizar este gel después de la etapa del Bio-Gel P-150 por obtenerse un rendimiento más satisfactorio.

El comportamiento de la enzima en azul-dextrano-Sepharose, preparado como se describe en la sección E de Métodos, se estudió

con la preparación obtenida de la columna de hidroxilapatita. El polímero fue equilibrado en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5; 2-mercaptoetanol 10 mM; glicerol 10 %. La enzima fue retenida cuantitativamente en este material y se eluyó con KCl 0,3 M o con ATP 10 mM. La recuperación fue del orden de 60 - 80 %, obteniéndose un material prácticamente homogéneo por electroforesis en geles de poliacrilamida. Este método se adoptó en la purificación final de la quinasa fosfovalónica.

Otros sistemas de purificación ensayados fueron los siguientes:

- Polimina P. Este reactivo se probó al 0,05 % antes y después del fraccionamiento del extracto crudo con sulfato de amonio. Si bien se consiguió algún grado de purificación, el resultado no se consideró satisfactorio.
- Bio Gel P-60. Este polímero, empleado en estudios de peso molecular de la quinasa fosfovalónica dio por resultado una purificación considerable de la enzima. Se utilizó una columna de 1,6 por 80 cm y se equilibró en tampón Tris, como se describe en la sección G 1 de Métodos, o bien en tampón fosfato de potasio 10 mM pH 7,5; 2 mercaptoetanol 10 mM. Se aplicó la muestra procedente de la etapa de hidroxilapatita con un flujo invertido de 10 ml/hora obteniéndose una purificación de 2,2 veces con una actividad específica de 9-10 U/mg.
- ADP-Sepharose y ATP-Sepharose. Se preparó ADP-Sepharose por dos métodos; el primero acoplado hexanodiamina y el segundo, la dihidracida del ácido adípico según Lamed y col. (52), a la Sepharose activada con bromuro de cianógeno en acetonitrilo según March y col. (38).

ATP-Sepharose se preparó por el segundo de estos métodos. El grado de sustitución de la Sepharose con cualquiera de los dos brazos se estimó con trinitrobenzeno sulfonato (53). El nucleótido oxidado con peryodato en la oscuridad se hizo reaccionar con la Sepharose sustituida. El contenido de nucleótido unido al polímero se determinó de acuerdo con Failla y Santi (54).

La quinasa fosfomevalónica procedente de la columna de Bio-Gel P-150 fue retenida por ADP-Sepharose preparada utilizando hexanodiamina como espaciador, pero no por la preparada con la dihidracida del ácido adípico. En el primer caso, la enzima eluyó del polímero con un gradiente de KCl 0-0,4 M. La purificación fue sin embargo poco satisfactoria. Probablemente la unión de la enzima al polímero ocurrió por intercambio iónico ya que el método de preparación de derivados de agarosa con hexanodiamina genera grupos de isourea ionizables con pK de 10,4, de modo que a pH 7,5 no están disociados y presentan carga positiva (55). La ATP-Sepharose retuvo parcialmente la enzima del mismo grado de purificación que la tratada por ADP-Sepharose, y se pudo eluir con ATP 10 mM. El rendimiento no fue, sin embargo, satisfactorio, tanto por la poca cantidad de enzima retenida por el polímero, como por el grado de purificación alcanzado.

2. Método de purificación adoptado.

Todas las operaciones fueron efectuadas a 0-4^o, a menos que se señale de otro modo.

a) Preparación del extracto crudo.

Un kilogramo de hígado fresco de cerdo se cortó en trozos pequeños sobre una base de madera con un cuchillo afilado y se homogeneizó en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5⁽¹⁾ en un homogeneizador Waring Blendor a máxima velocidad cinco veces durante 20 segundos con intervalos de un minuto. El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gasa y se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos en el rotor GSA de la centrifuga Sorvall. El sobrenadante se centrifugó a 43.500 x g por 20 minutos en el rotor SS-34 en la misma centrifuga. El nuevo sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g durante 45 minutos en el rotor Tipo 35 de una ultracentrifuga Beckman modelo L5-40, en tubos de policarbonato. El sobrenadante de 100.000 g se filtró a través de lana de vidrio entre capas de gasa a fin de remover material lipídico.

b) Fraccionamiento con sulfato de amonio.

Al extracto crudo obtenido en la etapa anterior, mantenido en un vaso de precipitado en hielo, se agregó lentamente y con agitación suave, sulfato de amonio sólido hasta una concentración de 30 % de saturación. La cantidad de sal agregada a cada porcentaje de saturación se calculó considerando base la solubilidad a 25^o (solución saturada es 4,1 M y requiere 767 g/l). Terminada la adición de sulfato de amonio se dejó agitando suavemente durante 30 minutos y luego se centrifugó a 15.000 x g en el rotor SS-34 de la centrifuga Sorvall.

(1) A menos que se señale expresamente, todos los tampones utilizados en la preparación y mantención de la quinasa fosfovalónica contienen 2-mercaptoetanol 10 mM.

Al sobrenadante se agregó más sulfato de amonio de modo de elevar la concentración de la sal al 60 % de saturación, procediéndose en forma similar al paso anterior. El precipitado 30-60 % se suspendió en aproximadamente 400 ml de tampón fosfato de potasio 5 mM, pH 7,5 y se dializó contra 5 litros del mismo tampón 1 mM, pH 7,5, durante 18 horas, con un cambio en este tiempo a las 10 horas.

c) Cromatografía en DEAE-celulosa.

Al material dializado de la etapa anterior se ajustó el pH a 7,5 con KOH y se diluyó con tampón fosfato 1 mM, pH 7,5 a fin de bajar la conductividad de 8,5-12 mmho que solía presentar, a alrededor de 3-4 mmho. Este material se aplicó a una columna de DEAE-celulosa de 30 x 6,4 cm equilibrada con tampón fosfato 10 mM, pH 7,5. Se empleó un flujo de 145 ml/hora con ayuda de una bomba peristáltica. Una vez aplicada la muestra, se lavó la columna con 7 litros de tampón fosfato 50 mM y enseguida se aplicó un gradiente lineal del mismo tampón fosfato entre 60 y 250 mM (1,6 l de c/u), colectándose fracciones de 20 ml. El resultado de esta elución se presenta en la figura 8. El eluido con la más alta actividad específica se concentró agregando sulfato de amonio al 80 % de saturación. Después de centrifugar a 27.000 x g durante 10 minutos (SS-34, Sorvall), el precipitado se suspendió en el mínimo volumen de tampón fosfato 10 mM (50-60 ml). La purificación alcanzada en esta etapa fue de 27-32 veces en relación al extracto crudo. La enzima quedó libre de fosfatasa y NADH-oxidasas que interfirieran con el ensayo espectrofotométrico de actividad.

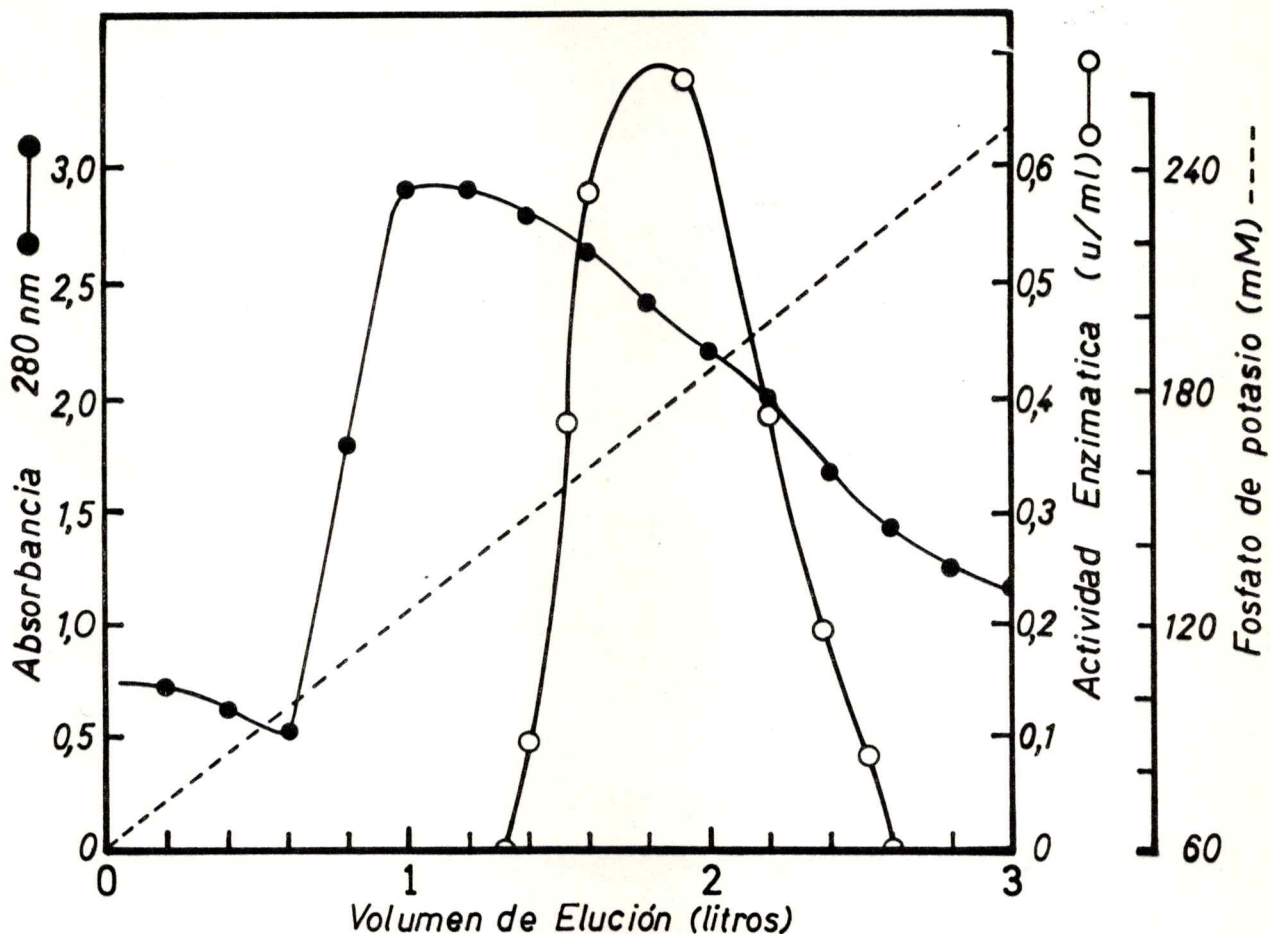


Figura 8. Purificación de la quinasa fosfomevalónica en DEAE-celulosa.

Se utilizó una columna de 30 x 6,4 cm, equilibrada con tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5 y a ella se aplicó la solución proteica conteniendo la quinasa fosfomevalónica, obtenida por fraccionamiento del extracto crudo con sulfato de amonio. Una vez aplicada la muestra se lavó la columna con 7 litros de tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7,5. Se hizo pasar enseguida un gradiente de fosfato de potasio entre 60 - 250 mM (1,6 + 1,6 l), al mismo pH y se colectaron fracciones de 20 ml a un flujo de 145 ml/hora. En el gráfico se presenta sólo la elución con el gradiente.

d) Cromatografía en Bio-Gel P-150.

La solución proteica de la etapa anterior se aplicó a una columna de Bio-Gel P-150 de 75 x 5 cm equilibrada con tampón fosfato de potasio 10 mM, con un flujo invertido de 20 ml/hora. Una vez aplicada la muestra, se eluyó con el mismo tampón 10 mM pH 7,5 y se colectaron fracciones de 10 ml. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la figura 9. Se juntaron las fracciones con la más alta actividad específica y el eluido seleccionado se concentró por ultrafiltración en una celda Amicon utilizando una membrana UM 10, hasta un volumen de 10-15 ml. A la solución concentrada se agregó glicerol hasta concentración de 45 % y se guardó en congelador a -20° . La enzima guardada en estas condiciones es estable por varios meses y de este modo se almacenó a fin de juntar material de varias preparaciones. La purificación alcanzada en esta etapa varió entre 400 y 600 veces en relación al extracto crudo.

La columna de Bio-Gel P-150 separa completamente la quinasa fosfomevalónica de la quinasa mevalónica. Esta última, por tener un peso molecular mayor que la primera, tiene un menor volumen de elución. Este hecho se aprovechó para obtener quinasa mevalónica con el objeto de preparar MVA-P según se describe en Métodos.

e) Cromatografía en hidroxilapatita.

La preparación enzimática procedente de la columna de Bio-Gel P-150, previa dilución 1:3 en tampón fosfato 10 mM para bajar la concentración de glicerol, se aplicó a una columna de hidroxilapatita (Bio-Gel HTP) de 18 x 1,6 cm equilibrada con tampón fosfato 10 mM.

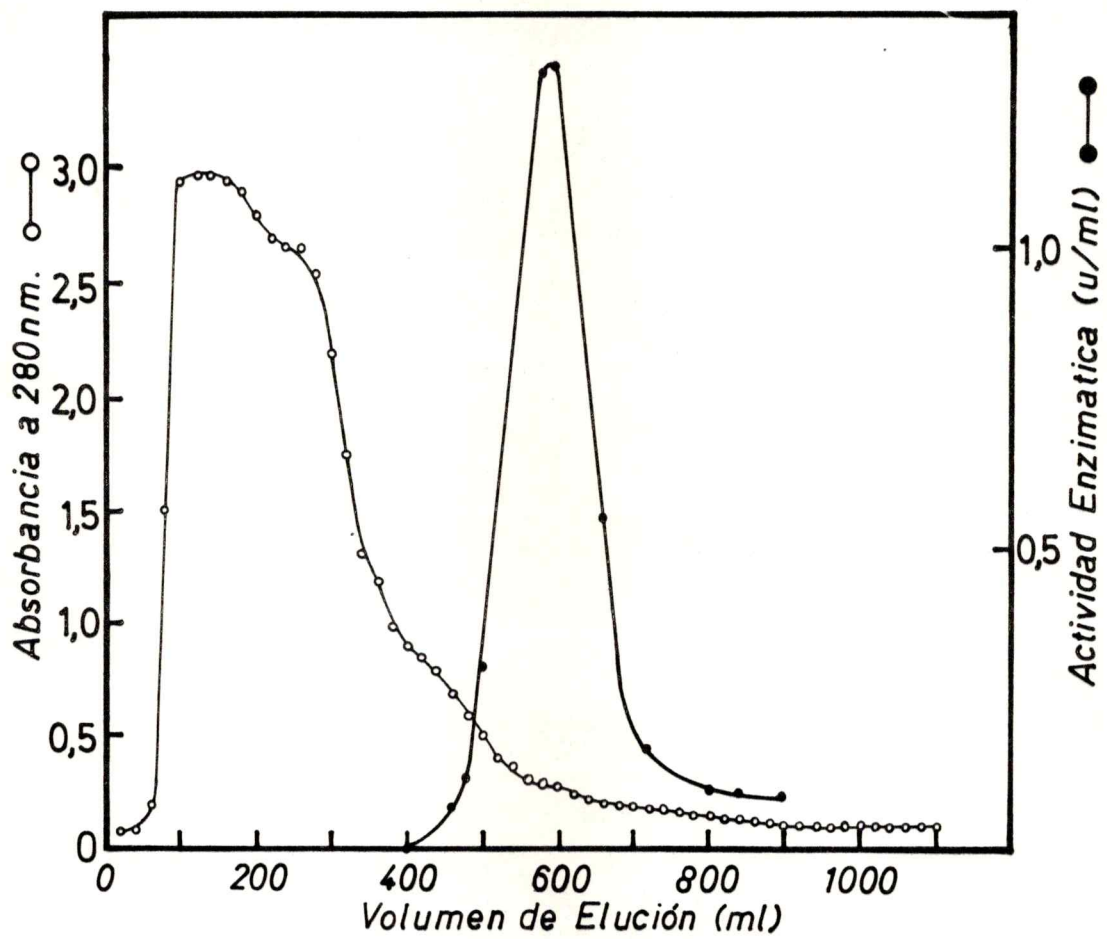


Figura 9. Purificación de la quinasa fosfomevalónica por filtración en Bio-Gel P-150.

La quinasa fosfomevalónica, previamente purificada por cromatografía en DEAE-celulosa, se aplicó a una columna de 75 x 5 cm de Bio-Gel P-150, equilibrada con tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5. Se eluyó con el mismo tampón y se colectaron fracciones de 10 ml con flujo invertido de 20 ml/hora.

La columna se lavó luego con 70 ml del mismo tampón y se colectaron fracciones de 2 ml a un flujo de 30 ml/hora. La enzima no es retenida por la hidroxilapatita en estas condiciones y sale junto con el lavado. Otras proteínas sí son retenidas y pueden ser eluidas con concentraciones más altas de fosfato (Fig. 10).

Se concentraron las fracciones con mayor actividad específica por ultrafiltración en membrana Amicon UM 10 hasta un volumen de 2-4 ml y el ultrafiltrado se guardó en glicerol al 50 % a -20° . La purificación alcanzada en esta etapa fue de 1.000 a 1.700 veces en relación al extracto crudo.

f) Cromatografía en azul-dextrano-Sepharose.

El material procedente de la etapa anterior se diluyó 1:3 con tampón Tris-HCl 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM. Se utilizó como columna una jeringa hipodérmica de 30 ml conteniendo este volumen de azul-dextrano-Sepharose, preparada según se describe en la sección E de Métodos. La columna se equilibró con tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5; 2-mercaptoetanol 10 mM; glicerol 10 %. Se aplicó la muestra colectando se fracciones de 2 ml a un flujo de 30 ml/hora y se lavó enseguida con 40 ml del mismo tampón, con lo cual eluyen proteínas contaminantes. La elución de la quinasa fosfomevalónica se efectuó haciendo pasar 60 ml del mismo tampón de lavado pero conteniendo ATP 10 mM (Fig. 11). Se juntaron las fracciones con actividad enzimática, y el eluido seleccionado se concentró por ultrafiltración en membrana Amicon UM 10 hasta un volumen de 3 ml. A la solución de enzima purificada se agregó glicerol hasta el 50 % y se guardó a -20° .

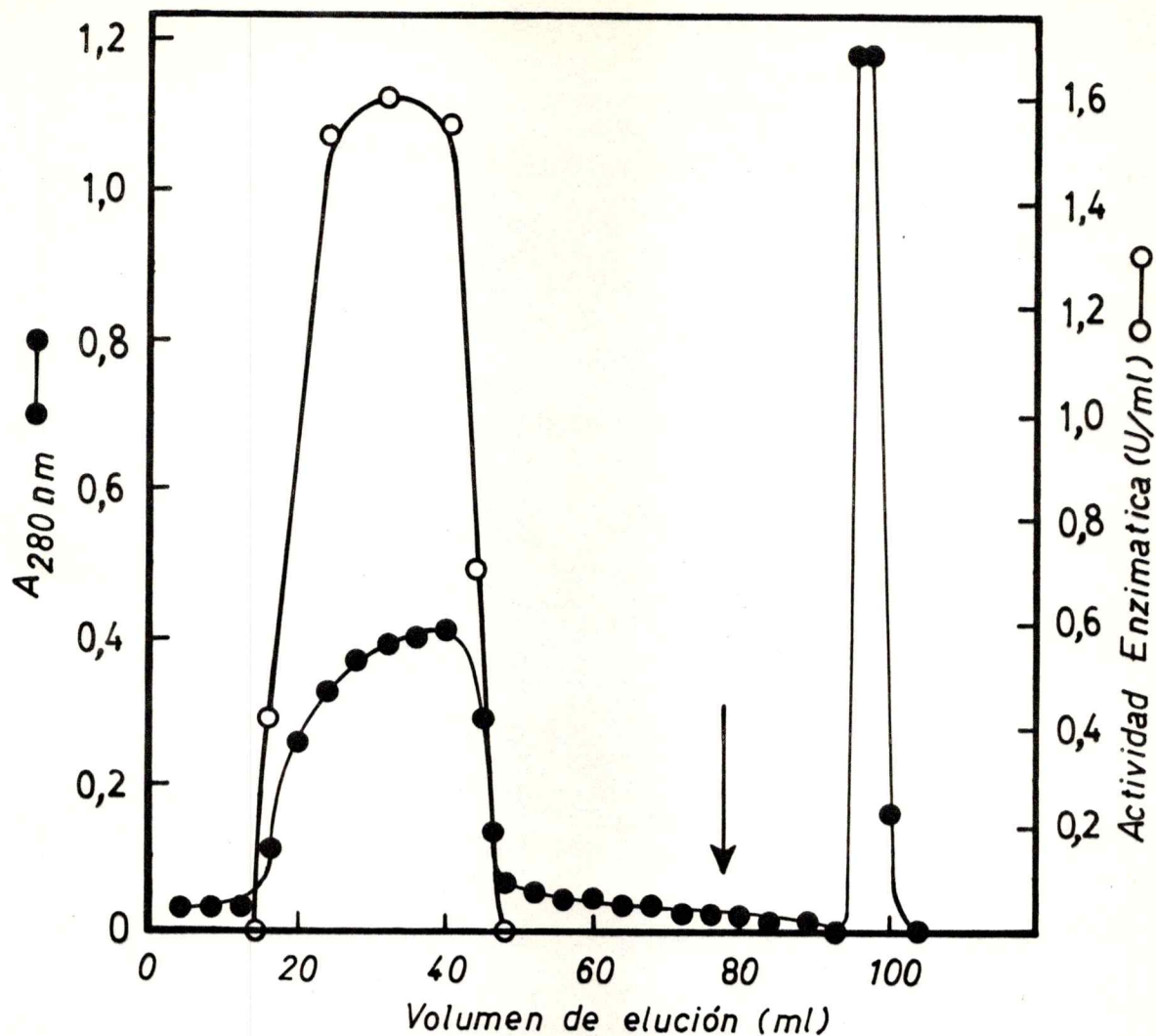


Figura 10. Purificación de la quinasa fosfovalónica en hidroxilapatita.

La enzima, ya purificada por cromatografía en Bio-Gel P-150, se aplicó a una columna de 18 x 1,6 cm equilibrada con tampón fosfato 10 mM, pH 7,5. Se colectaron fracciones de 2 ml a un flujo de 30 ml/hora. Una vez aplicada la muestra, se lavó con el mismo tampón, produciéndose la elución de la enzima. En el punto indicado por la flecha, se lavó la columna con tampón fosfato 0,5 M con lo cual eluyen proteínas contaminantes.

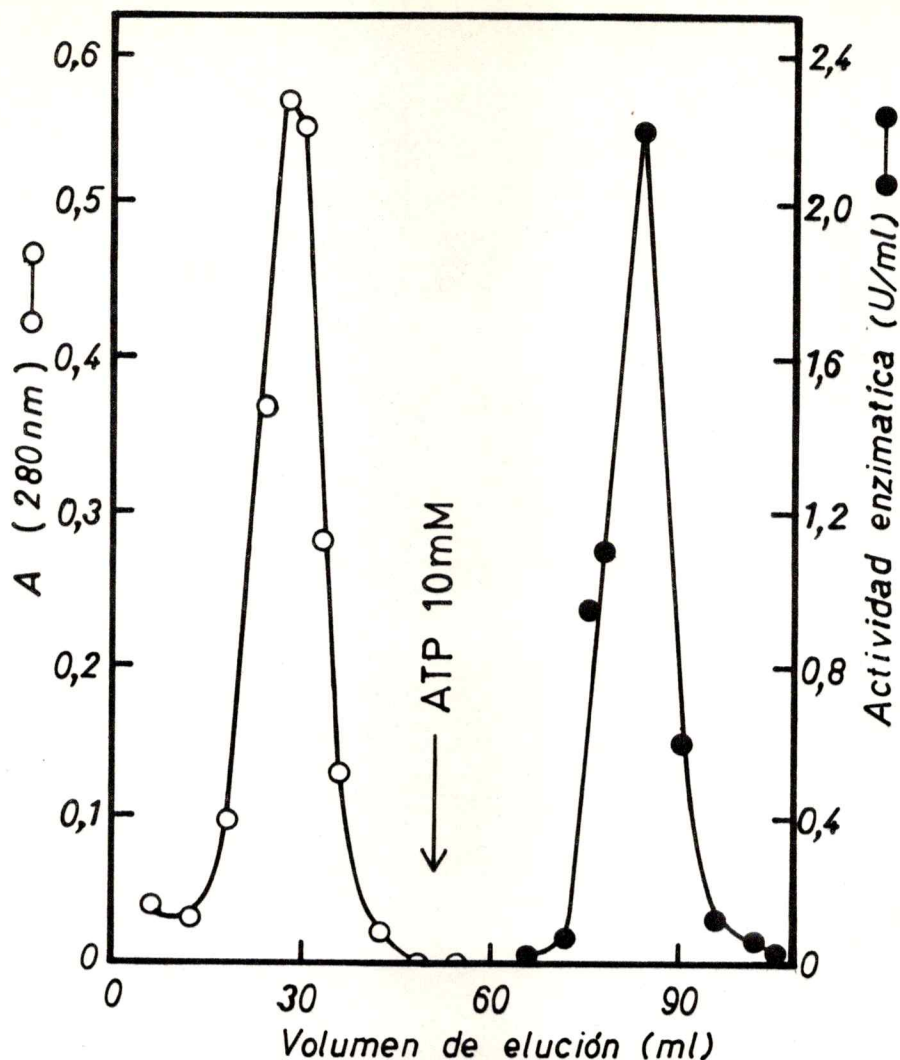


Figura 11. Purificación de la quinasa fosfovalónica en azul-dextrano-Sepharose.

La quinasa fosfovalónica, purificada por hidroxilapatita, se aplicó a una columna de azul-dextrano-Sepharose de 7,5 x 2,4 cm. El polímero se equilibró con tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 10 %. Se colectaron fracciones de 3 ml con un flujo de 30 ml/hora. Una vez aplicada la muestra (10 ml), se lavó con 40 ml de tampón Tris-HCl. En el punto indicado por la flecha se eluyó con ATP 10 mM en el mismo tampón. La absorbancia a 280 nm sólo se registró antes de la adición del ATP.

Los resultados obtenidos en la purificación de la quinasa fosfomevalónica se muestran en la tabla 1. La actividad específica, de 0,0088 U/mg encontrada en el extracto crudo sube a 69 U/mg en la enzima purificada, obteniéndose una purificación de más de 7.800 veces con un rendimiento de 9,3 %. El procedimiento repetido varias veces, dio resultados similares.

3. Estimación de la pureza de la enzima.

Se utilizó la electroforesis en geles de poliacrilamida con concentraciones de acrilamida del 10, 11 ó 12 %. La concentración a apropiada de esta última en los geles se estableció después de varios ensayos previos en que se ubicó la posición de la quinasa fosfomevalónica cortando los geles transversalmente en secciones de 2 mm y efectuando el ensayo de actividad según se describe en la sección F de Métodos.

La figura 12 muestra geles de poliacrilamida al 10 % de una muestra de enzima obtenida por hidroxilapatita y tratada después por azul-dextrano-Sepharose. Esta última etapa representa una purificación de 8 veces con respecto a la etapa anterior. El gel N° 2 corresponde a una muestra de enzima purificada en azul-dextrano-Sepharose cortado longitudinalmente y teñido con azul de Coomassie. El trazado densitométrico de esta mitad de gel se presenta en la figura 13, en que también se muestra el ensayo de actividad efectuado con la otra mitad del gel. Hay una correspondencia perfecta entre la actividad enzimática y la proteína asociada. La figura 14 presenta geles

Tabla 1. Purificación de la quinasa fosfovalónica

Fracción	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Unidades totales	Actividad específica (U/mg)	Purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1.530	85.680	752	0,0088	-----	100
Sulfato de amonio	521	49.495	590	0,0119	1,35	78,4
DEAE-celulosa	660	1.716	420	0,24	27,3	55,8
Bio-Gel P-150	340	80,9	290	3,57	406	38,6
Hidroxilapatita	14	13,6	123	9,0	1.022	16,3
Azul-dextrano-Sephrose	4,6	1,012	70	69,1	7.852	9,3

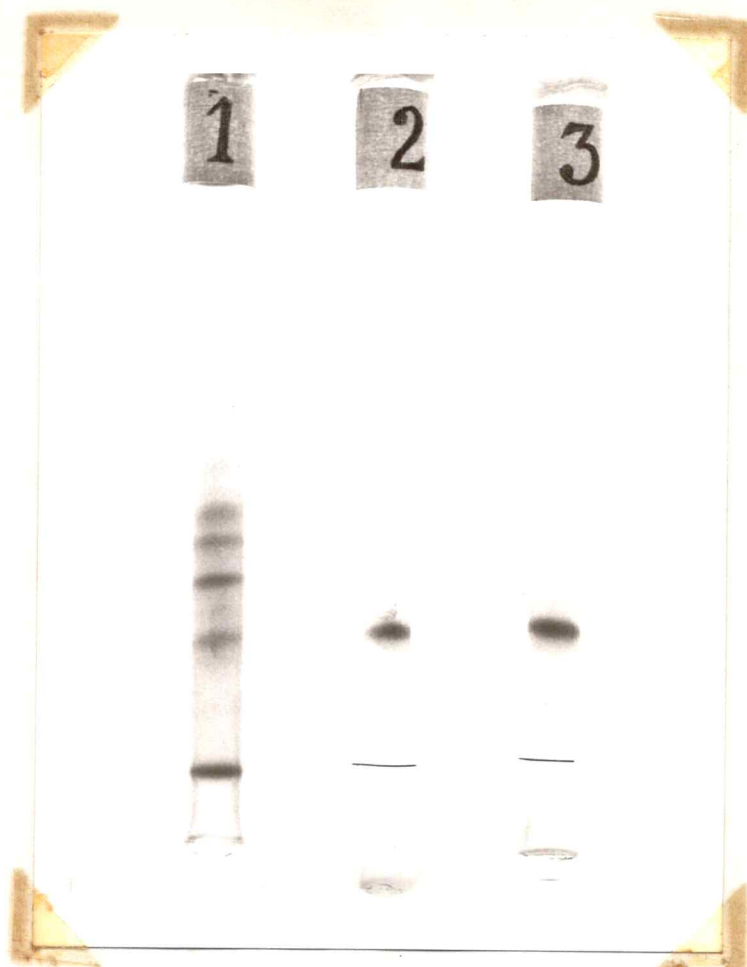


Figura 12. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la quinasa fosfomevalónica purificada por hidroxilapatita y azul-dextrano-Sepharose.

La electroforesis se efectuó en tubos cilíndricos de 0,6 cm de diámetro con acrilamida al 10 %. El gel Nº 2 se cortó longitudinalmente y se tñó una mitad; la otra mitad se destinó para ensayo de actividad. 1) 35 μ g de enzima purificada por hidroxilapatita, 2) 23 μ g de enzima purificada por azul-dextrano-Sepharose, 3) 14 μ g de enzima purificada por azul-dextrano-Sepharose.

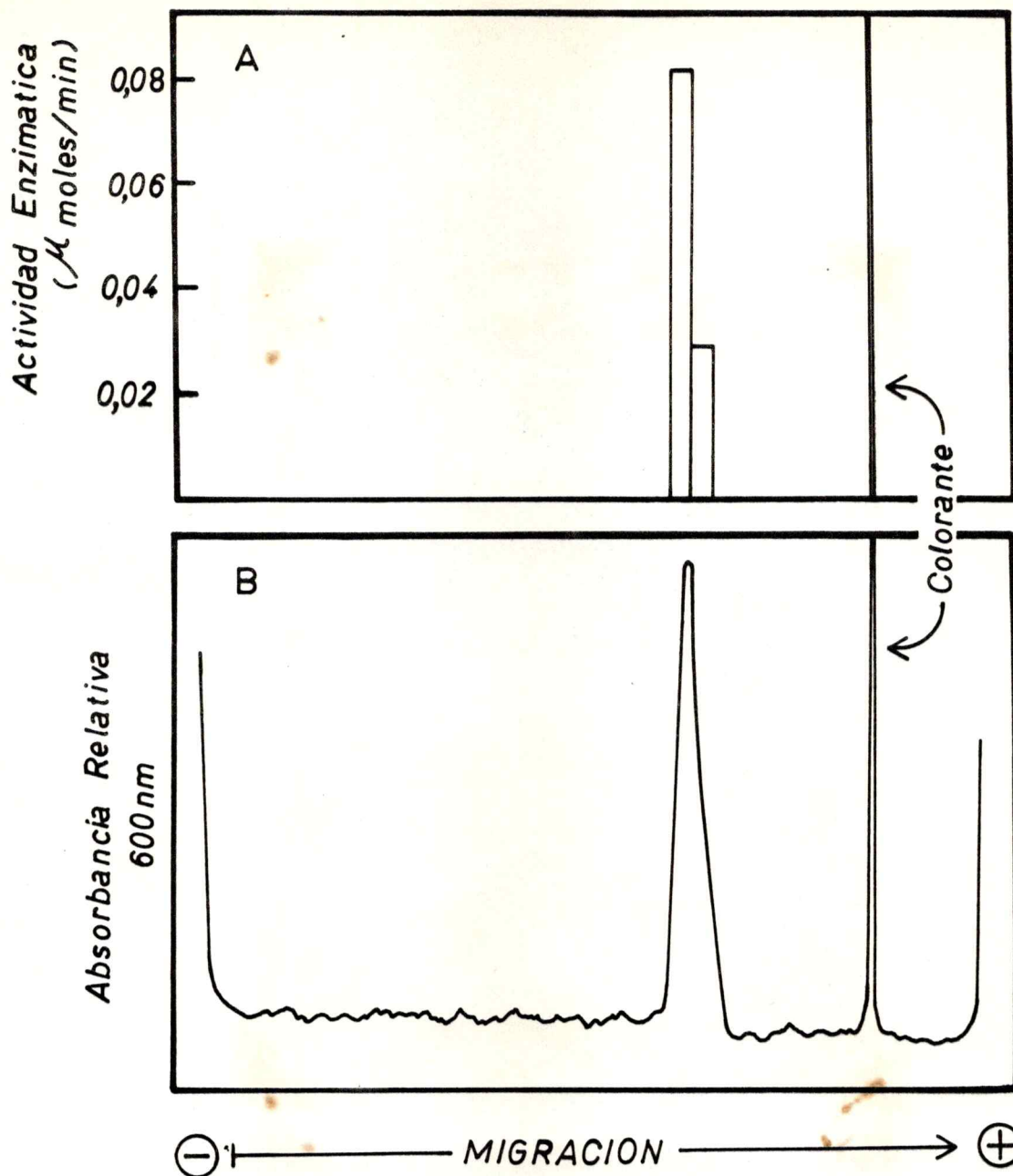


Figura 13. Trazado densitométrico de gel de poliacrilamida de quinasa fosfovalónica y actividad enzimática asociada.

Una mitad del gel N^o 2 presentado en la Fig. 12, se cortó en secciones de 2 mm para el ensayo de actividad enzimática (A) y la otra mitad se tiñó con azul de Coomassie (B). El trazado densitométrico se efectuó utilizando un accesorio de registro para gels acoplado al espectrofotómetro Varian Techtron 635, a 600 nm y a una velocidad de 25 mm/minuto. La actividad enzimática se expresa en unidades presentes en cada trocito de gel.



Figura 14. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la quinasa fosfomevalónica purificada en azul-dextrano-Sepharose, a dos concentraciones diferentes.

La electroforesis se efectuó en geles con acrilamida al 11 %. Las cantidades de proteína aplicadas fueron: 1) 5 μg y 2) 12 μg . Las condiciones experimentales se describen en Métodos.

al 11 % de la enzima purificada a dos concentraciones diferentes y los trazados densitométricos correspondientes aparecen en la figura 15. La electroforesis de la quinasa fosfomevalónica purificada, en presencia de SDS al 0,1 %, demostró presentar una sola banda, como se describe en la sección B de Resultados, indicando que la enzima es un monómero o bien un oligómero de subunidades iguales.

4. Contenido de quinasa fosfomevalónica en el extracto crudo.

En el ensayo espectrofotométrico normal de la enzima, en tampón fosfato de potasio 100 mM pH 7,5, 1 ml del extracto crudo contiene 0,49 unidades de actividad. Suponiendo que no se produce inactivación o activación de la enzima en el curso de la purificación, 1 ml de extracto crudo contiene 0,0071 mg de quinasa fosfomevalónica. Como 1 ml de extracto crudo contiene alrededor de 56 mg de proteína, la cantidad de quinasa fosfomevalónica se estimó en 0,0127 % del total de proteínas solubles del extracto crudo.

B. Propiedades de la quinasa fosfomevalónica.

1. Determinación del peso molecular.

El peso molecular de la enzima se determinó por tres métodos:

a) Cromatografía en Bio-Gel P-60.

El comportamiento de la quinasa fosfomevalónica en Bio-Gel P-150 usado en la purificación de la enzima, en que ésta eluye muy

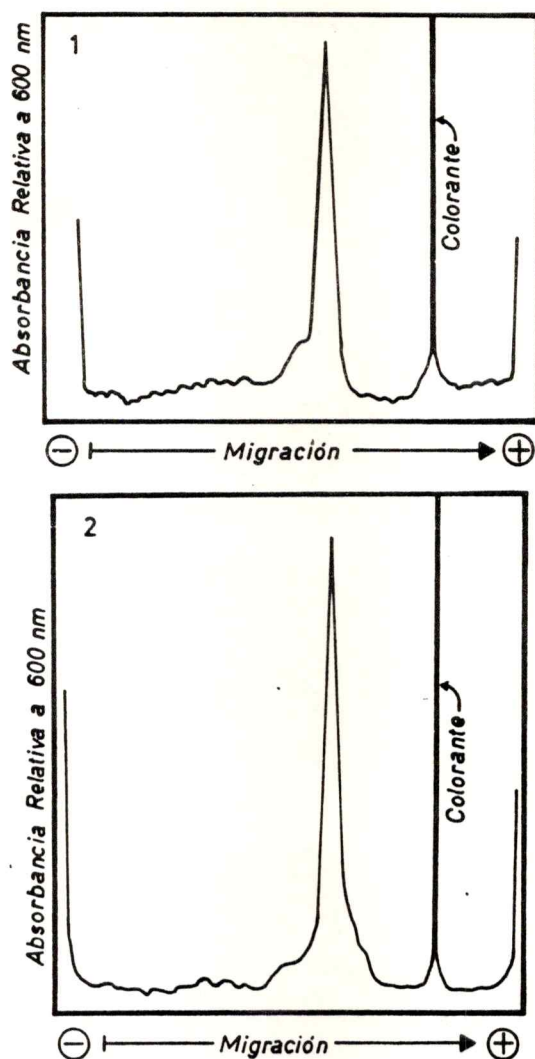


Figura 15. Trazados densitométricos de los geles de poliacrilamida presentados en la Figura 14.

Los registros fueron efectuados a 600 nm y a una velocidad de 25 mm/minuto. El gel 1 contenía 5 μg de proteína y se utilizó una escala de absorbancia de 0 a 0,5; el gel 2 contenía 12 μg de proteína y el registro se hizo con una escala de absorbancia de 0 a 1,0.

atrás del grueso de las proteínas, sugirió que la enzima era de bajo peso molecular e inferior a la quinasa mevalónica. Se preparó una columna de Bio-Gel P-60 de 1,6 x 82 cm, como se describe en Métodos, equilibrada con Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0; KCl 0,1 M; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM. Los marcadores de peso molecular conocido utilizados fueron pepsina (35.000)(42), quimotripsinógeno (25.000)(42), citocromo c (12.400)(40) e insulina (5.750)(43). La figura 16 muestra el resultado de representar los cuocientes entre los volúmenes de elución, (V_e) y el volumen de exclusión (V_o) en función de los pesos moleculares en escala logarítmica. Se puede estimar un peso molecular de 22.5000 para la enzima.

b) Gradiente de sacarosa.

Los gradientes, ~~preparados~~ como se describe en Métodos, mostraron una relación lineal entre los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como patrones: deshidrogenasa láctica (140.000)(42), albúmina sérica de bovino (67.000)(40) y citocromo c (12.400)(40) y los logaritmos de sus migraciones correspondientes, deducidas del número de fracciones (Fig. 17). Del gráfico es posible establecer un peso molecular de 22.000 para la quinasa fosfomevalónica.

c) Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol.

La electroforesis se efectuó en placas de poliacrilamida de 12 x 15 x 0,15 cm con una concentración de acrilamida de 11 % en

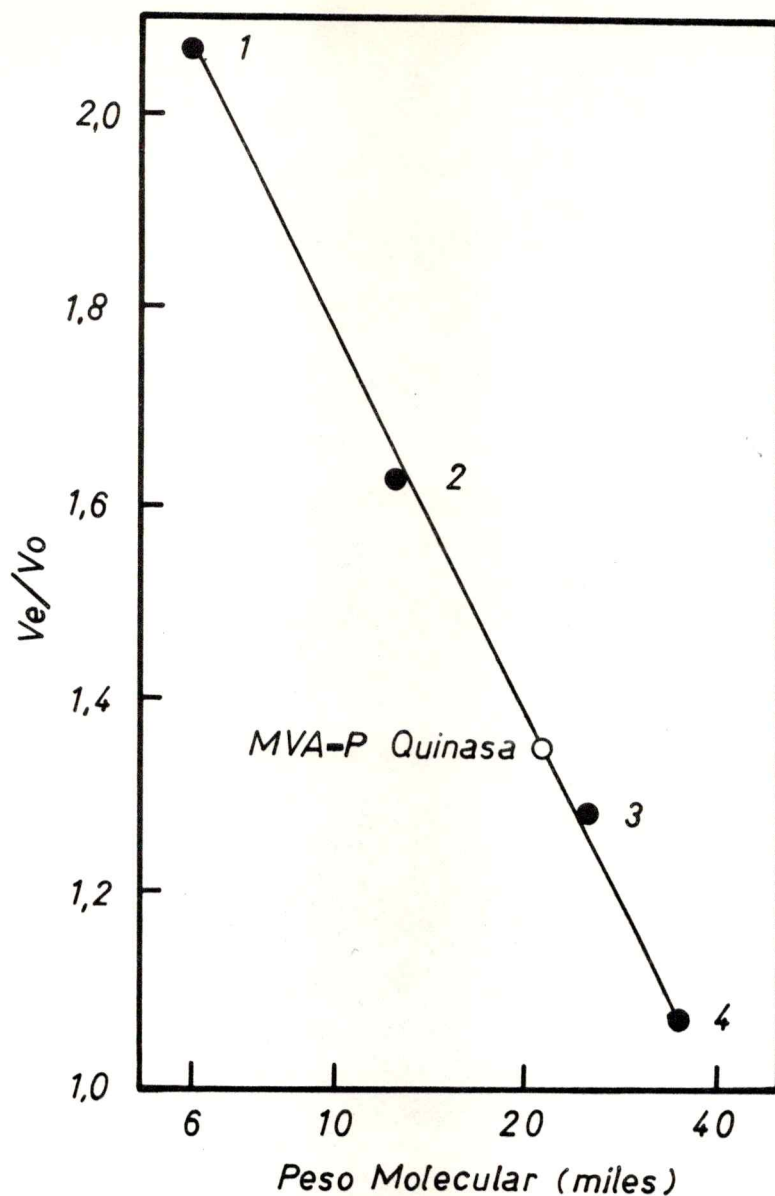


Figura 16. Determinación del peso molecular de la quinasa fosfomevalónica por cromatografía de exclusión molecular en Bio-Gel P-60.

Se utilizó una columna de Bio-Gel P-60, de 1,6 x 82 cm equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM; pH 8,0; KCl 100 mM; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM. Las muestras fueron aplicadas en un volumen de 1 ml conteniendo: 1, insulina (10 mg); 2, citocromo c (5 mg); 3, quimotrip sinógeno (5 mg); 4, pepsina (10 mg). Se aplicaron 28 unidades de quinasa fosfomevalónica de una actividad específica de 5,6 U/mg de proteína. Se colectaron fracciones de 2 ml con un flujo invertido de 10 ml/hora.

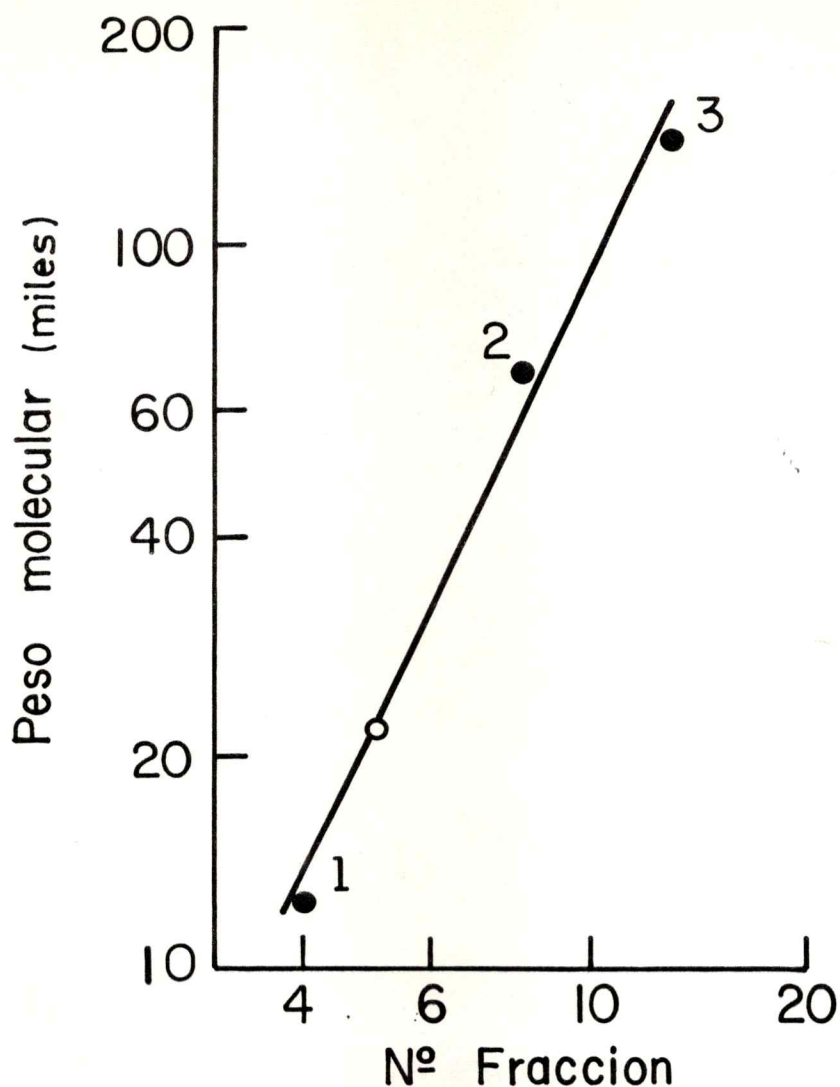


Figura 17. Determinación del peso molecular de la quinasa fosfomevalónica en gradiente de concentración de sacarosa.

Los gradientes se prepararon entre 5 - 20 %, en tampón fosfato de potasio 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM, en tubos de nitrocelulosa de 5 ml para el rotor SW 65. Se centrifugó durante 17 horas a 160.000 $\times g$. Se colocaron las siguientes proteínas: 1, citocromo c (3 mg); 2, albúmina de suero de bovino (3 mg); 3, deshidrogenasa láctica (0,18 mg); o, quinasa fosfomevalónica (3 unidades, act. esp. 5,6 U/mg de proteína).

presencia de SDS y 2-mercaptoetanol, según se señala en Métodos (Fig. 18). Los marcadores de peso molecular conocido utilizados fueron: ovoalbúmina, 43.000 (46), quimotripsinógeno, 25.000 (42) y citocromo c, 12.4000 (40). Como la electroforesis se realizó en condiciones desnaturalantes, se puede pensar que la quinasa fosfomevalónica está estructurada a base de una sola cadena polipeptídica, puesto que se encontró una sola proteína y de peso molecular muy semejante al obtenido por otros métodos. Del gráfico de logaritmos de los pesos moleculares en función de la migración relativa (Fig. 19) se determinó un peso molecular de 21.000 para la quinasa fosfomevalónica.

2. Determinación de la composición de aminoácidos.

a) Análisis de triptófano.

Este aminoácido, debido a que se destruye por hidrólisis ácida se determinó independientemente por el método de Edelboch (51) como se describe en Métodos. Se registró el espectro de absorción de la quinasa fosfomevalónica homogénea a una concentración de 183,5 µg/ml en clorhidrato de guanidina 6M; fosfato de potasio 10 mM; pH 6,5. Se utilizó el espectrofotómetro de doble haz Cary 118 C. El espectro se registró entre 250 y 400 nm (Fig. 20). Del gráfico se obtuvieron absorbancias de 0,175 a 288 nm y de 0,24 a 280 nm. Con estos datos se estimó la concentración de triptófano mediante la ecuación:

$$N_{\text{try}} = E_{288}/3.103 - E_{280}/10.318$$

en que N_{try} = concentración molar de triptófano.



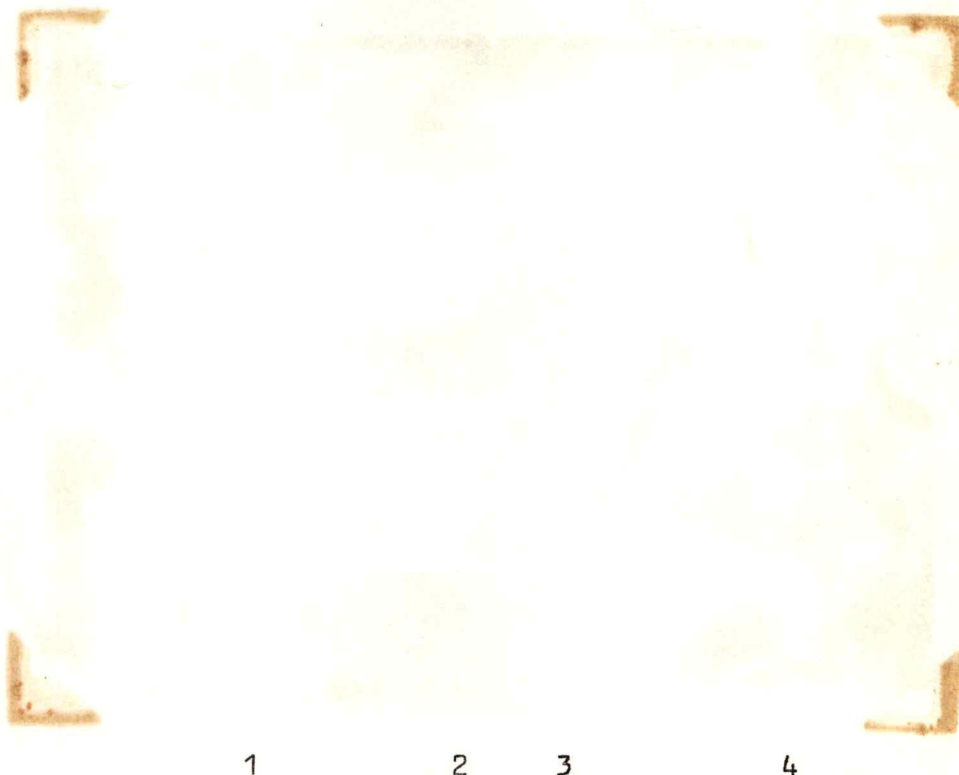


Figura 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la quinasa fosfomevalónica en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

La electroforesis se efectuó en una placa de poliacrilamida de 15 x 12 x 0,15 cm, con una concentración de acrilamida de 11 % en presencia de SDS al 0,1 %. Se aplicaron las siguientes proteínas: 1, quinasa fosfomevalónica (1 μ g) en cuadruplicado; 2, citocromo c; 3, quimotripsinógeno; 4, ovoalbúmina. Las muestras 2, 3 y 4 se hicieron en duplicado con 2,5 μ g cada una. Otros detalles experimentales se incluyen en Métodos.

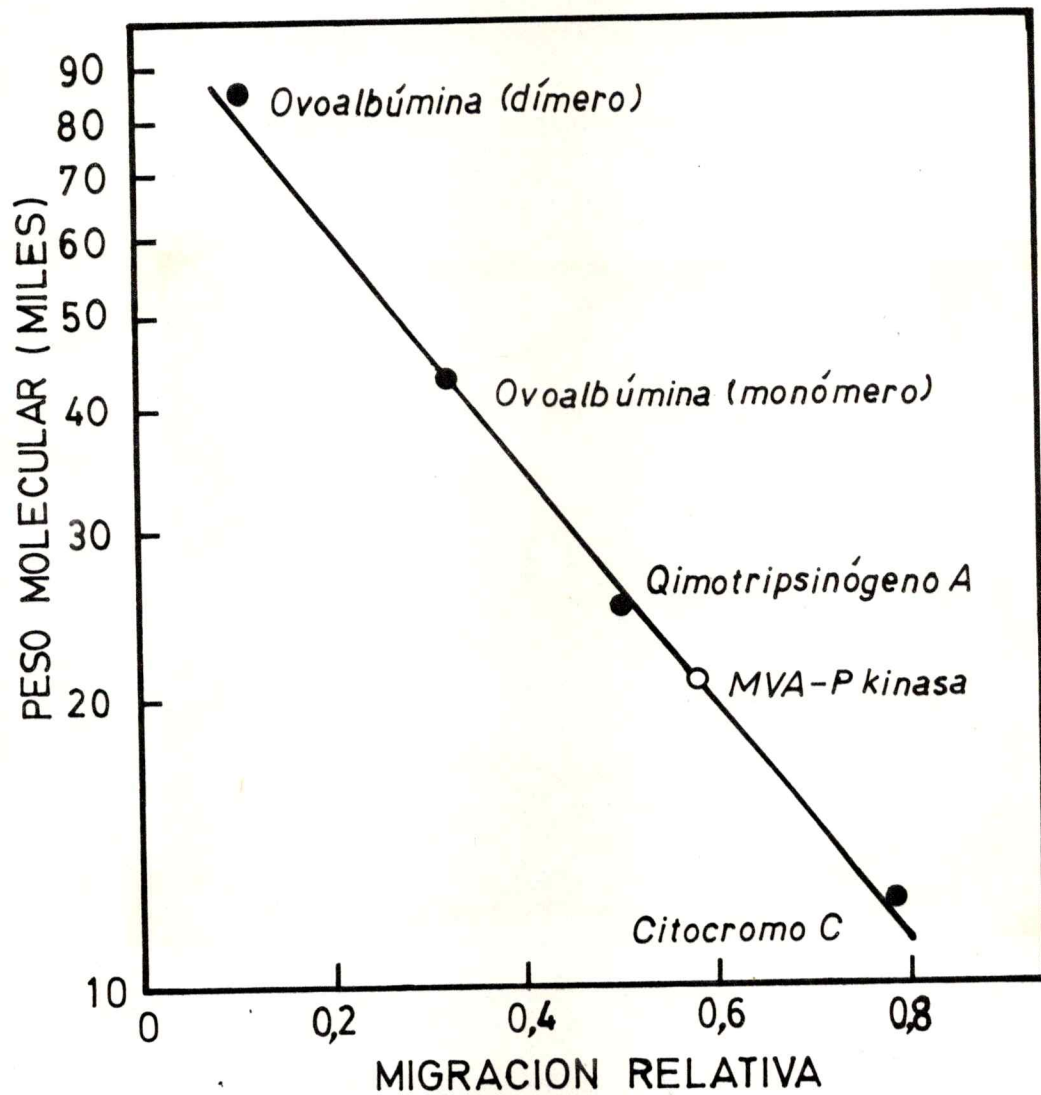


Figura 19. Determinación del peso molecular de la quinasa fosfomevalónica por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

Se utilizaron los datos de la Fig. 18.

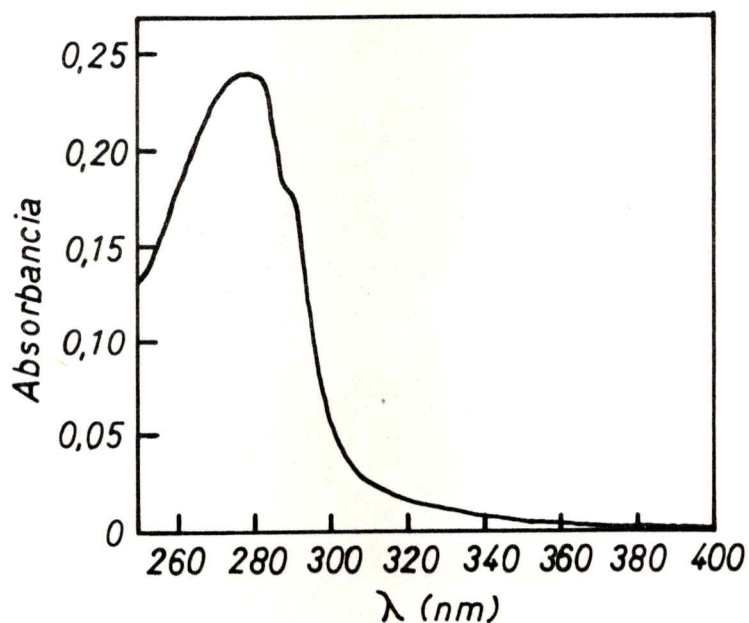


Figura 20. Espectro de absorción de la quinasa fosfomevalónica en clorhidrato de guanidina 6 M.

El espectro de la enzima homogénea (183,5 $\mu\text{g/ml}$) se registró en clorhidrato de guanidina 6 M; fosfato de potasio 10 mM, pH 6,5. Se utilizó el espectrofotómetro Cary 118 C con cubetas de 1 cm de paso óptico y 1 unidad de absorbancia en fondo de escala, contra el solvente como blanco.

Como la enzima posee sólo un residuo de cisteína y carece de cistinas, según lo reveló el análisis de aminoácidos (ver más adelante), se descartó la absorbancia que pudieran aportar estos compuestos. El número de moles de triptófano calculados fue 3,93 por mol de enzima suponiendo un peso molecular de 22.000 y de 3,75 suponiendo un peso molecular de 21.000 para la quinasa. El coeficiente de extinción molar calculado a 280 nm en la solución de clorhidrato de guanidina fue 28.770 y el $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 13,08. Se obtuvo una razón A_{280}/A_{260} de 1,4.

b) Determinación de la cisteína.

Este aminoácido se determinó titulando con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)(DTNB) el número total de grupos sulfhidrilos de la enzima, en clorhidrato de guanidina 6 M, como se describe en Métodos. A 109 μg de la enzima homogénea, dializada contra clorhidrato de guanidina 6 M en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 6,5, se ajustó el pH a 8,2 y se tituló con DTNB 0,08 mM, en un volumen final de 1,0 ml. La variación de absorbancia a 412 nm se registró durante 90 minutos a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Varian Techtron 635. Suponiendo un peso molecular de 21.000 para la quinasa fosfomevalónica, se calculó 1,27 moles de -SH por mol de enzima; suponiendo un peso de 22.000 se estimó 1,33 moles de -SH por mol de enzima. En consecuencia, la enzima posee 1 ó 2 residuos de cisteína, siendo 1 la cifra más probable.

c) Análisis de aminoácidos.

El análisis de los aminoácidos se efectuó con dos muestras de 135 μ g cada una, de quinasa fosfovalónica homogénea e hidrolizada en HCl 6 N a 110^o durante 24 y 48 horas, como se indica en Métodos. Se utilizó un analizador de aminoácidos Beckman modelo 120 G. El resultado se muestra en la tabla 2. Se observa que hay una caída del contenido de arginina, fenilalanina y metionina a las 48 horas de hidrólisis en relación a las 24 horas. En el caso de la metionina sólo se encontró este aminoácido a las 24 horas de hidrólisis y no a las 48 horas. Otros aminoácidos como serina y glicina presentaron un contenido mayor a las 48 horas. Para los cálculos se tomaron los mayores valores encontrados. En la columna 4 se presenta el cálculo del número de moles de cada aminoácido por mol de enzima. Para ello se supuso un residuo de metionina por mol de enzima. El triptófano y la cisteína se determinaron independientemente, como se describe en Métodos. La suma de los pesos moleculares de todos los residuos da un peso molecular de 20.803, lo que concuerda bastante bien con el peso molecular determinado por otros métodos.

3. Estabilidad y requerimiento de compuestos sulfhidrilos.

Entre las pocas propiedades de la quinasa fosfovalónica descritas, está la esencialidad de compuestos sulfhidrilos para la mantención de la actividad catalítica. La enzima de hígado de cerdo es completamente inhibida por p-cloromercuribenzoato, siendo el efecto parcialmente revertido por 2,3-dimercaptopropanol o glutatión (2).

Tabla 2. Análisis de aminoácidos de la quinasa fosfomevalónica.

Residuo	Tiempo de hidrólisis		Nº de residuos/ mol de enzima ⁽¹⁾
	24 horas	48 horas	
	µmoles aminoac/mg proteína		
Lisina	0,2152	0,1923	9
Histidina	0,0982	0,1076	5
Arginina	0,2732	0,1960	12
Aspartato + asparagina	0,3758	0,3818	17
Treonina	0,1980	0,1787	8
Serina	0,2486	0,3209	14
Glutamato + glutamina	0,5679	0,5843	26
Prolina	0,0864	0,0810	4
Glicina	0,3438	0,3835	17
Alanina	0,2945	0,2993	13
Valina	0,2008	0,2248	10
Metionina	0,0236		1
Isoleucina	0,1390	0,1365	6
Leucina	0,3683	0,3548	16
Tirosina	0,0948	0,0889	4
Fenilalanina	0,2512	0,1317	11
Triptofano ⁽²⁾			4
Cisteína ⁽³⁾			1
Peso molecular enzima			20.803

Las condiciones experimentales se describen en Métodos.

(1) Se supuso un residuo de metionina por mol de enzima.

(2) Determinado por el método de Edelhoeh (51).

(3) Determinado por el método de Ellman (49).

No se determinó el contenido de amonio.

Se comprobó que la quinasa fosfomevalónica procedente de la columna de Bio-Gel P-150 se inactivó rápidamente cuando se omitió del medio el 2-mercaptoetanol, cayendo la actividad en un 99 % en 20 días. Esta preparación, con 2-mercaptoetanol, con una actividad específica de 3 a 4 U/mg de proteína y una concentración de proteínas de 3,5 a 5 mg/ml se mantuvo inalterada por 3 meses a 4°. Las preparaciones más purificadas no fueron tan estables, en estas condiciones, pero guardadas en tampón fosfato o Tris 10 mM conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM y glicerol al 50 % a -20°, se conservaron con poca pérdida de actividad durante un período de 60 días, que fue el máximo tiempo que se necesitó almacenarlas antes de ser utilizadas.

4. Requerimiento de metales y nucleótidos.

Se ha descrito que la quinasa fosfomevalónica de diversas fuentes requiere de un ión metálico divalente para la actividad, siendo el Mg^{+2} el mejor activador (1, 2, 15). En la tabla 3 puede apreciarse que el Mg^{+2} presenta, a una concentración 5 mM, el mejor efecto activante sobre la enzima, en relación a Mn^{+2} , Zn^{+2} y Co^{+2} , manteniendo el ATP constante a concentración 2,4 mM. En la figura 21 se muestra el efecto de la concentración de Mg^{+2} . A una concentración de ATP 2,5 mM, la actividad enzimática aumenta hasta 5 mM de Mg^{+2} y luego se mantiene constante hasta 12 mM. No se probaron concentraciones superiores.

El efecto de la concentración de ATP se presenta en la figura 22. En presencia de Mg^{+2} , la velocidad aumenta hasta llegar a un

Tabla 3. Efecto de diversos cationes divalentes sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica.

Metal	Actividad relativa
Cloruro de magnesio	100,0
Cloruro de manganeso	65,2
Sulfato de zinc	56,1
Sulfato de cobalto	63,6

En un volumen de 0,99 ml se preincubaron a 30^o: MVA-P 1 mM, ATP 2,5 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y el correspondiente metal 5 mM, en tampón Tris-HCl. 100 mM pH 7,5. La reacción se inició agregando 0,01 ml de quinasa fosfomevalónica (15 mU). A los 10 minutos se detuvo la reacción con 1 ml de HClO₄ al 3 % y se neutralizó con KOH. El ADP producido se midió espectrofotométricamente a 340 nm utilizando PK y LDH como enzimas auxiliares. Otros detalles experimentales se describen en Métodos. Los resultados se expresan en por ciento de la actividad obtenida con Mg⁺².

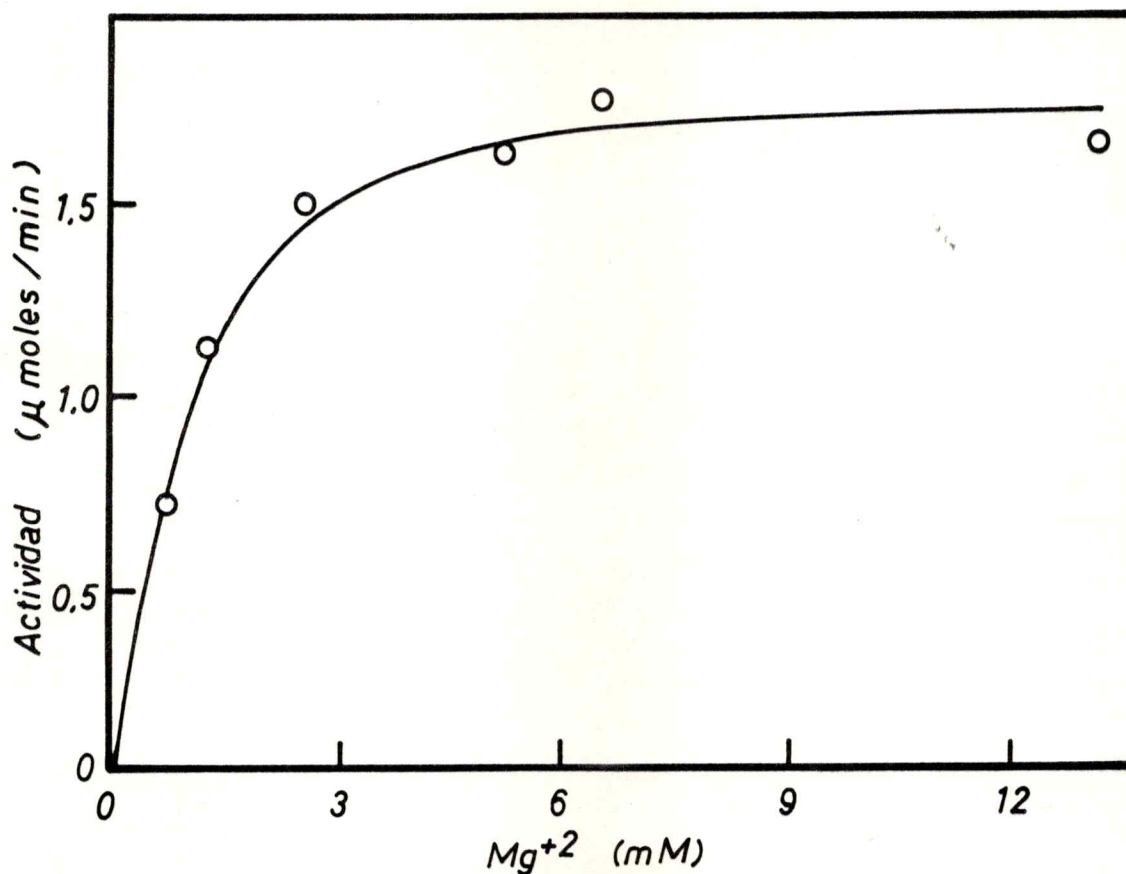


Figura 21. Efecto de la concentración de ión magnesio en la reacción catalizada por la quinasa fosfomevalónica.

El medio de ensayo contenía NADH 0,24 mM; ATP 2,5 mM; PEP 2,5 mM; MVA-P 1 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; quinasa fosfomevalónica 18 mU (act. esp. 4,2 U/mg de proteína); PK y LDH, 8 unidades de cada una, en tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7,5. La actividad enzimática está expresada como los μ moles de MVA-P fosforilados/minuto y por ml de la solución de enzima de la cual se tomaron las muestras para los ensayos.

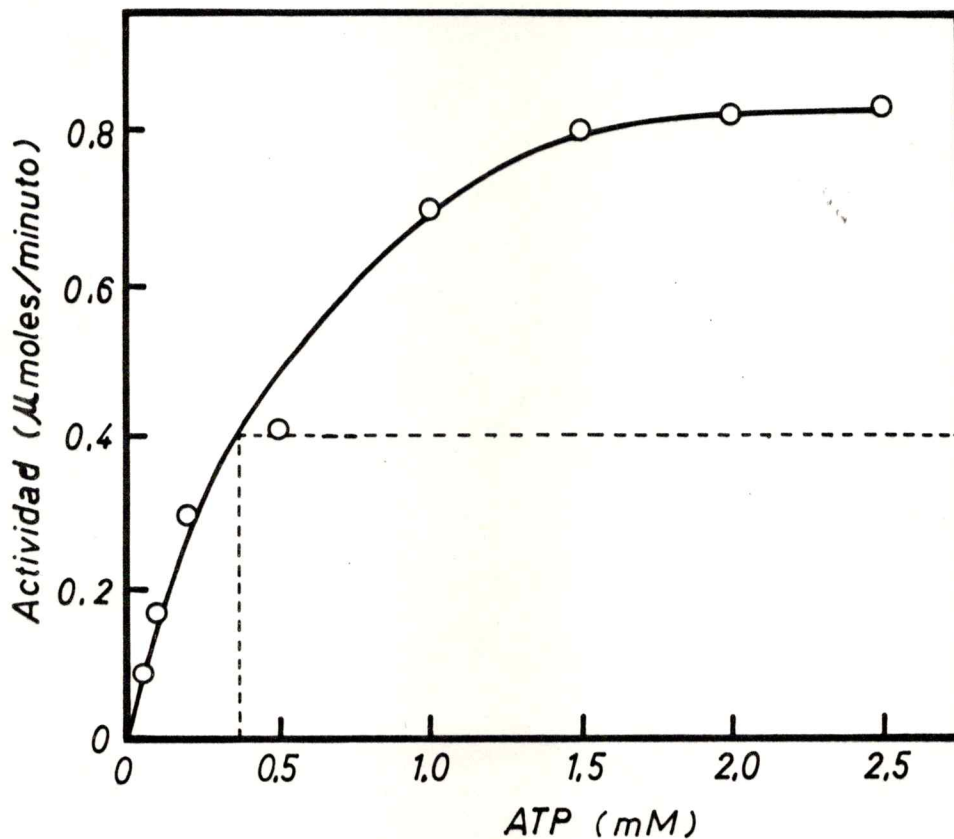


Figura 22. Efecto de la concentración de ATP en la reacción de la quinasa fosfovalónica.

El medio de reacción contenía NADH 0,24 mM; $MgCl_2$ 5 mM; PEP 2,5 mM; MVA-P 1 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; quinasa fosfovalónica 10 mU (act. esp. 4,2 U/mg de proteína), PK y LDH, 8 unidades de cada una, en tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7,5. La actividad enzimática se expresa como los μ moles de MVA-P fosforilados por minuto y por ml de la solución de enzima de la cual se tomaron las alícuotas para el ensayo de actividad. Las condiciones del ensayo se describen en Métodos.

máximo a una concentración de ATP de aproximadamente 2 mM. Del gráfico se puede estimar una K_m aparente para el ATP de 0,36 mM, valor del mismo orden de magnitud al de la K_m verdadera cuya determinación se describe más adelante. En estos experimentos se obtuvo la velocidad máxima con una razón $Mg^{+2}/ATP = 2$. Estos datos permiten suponer que el verdadero sustrato de la enzima es el complejo Mg-ATP.

Se ensayó además el efecto de GTP, UTP y CTP, a concentraciones 2,5 mM. No se observó con ninguno de ellos actividad enzimática.

5. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima.

Se determinó el efecto de incubar muestras de 0,1 ml de quinasa fosfovalónica (act. esp. 10,6 U/mg de proteína), durante 5 minutos a diferentes temperaturas. Después de enfriar en hielo se midió la actividad tomando alícuotas de 0,01 ml de cada muestra de enzima. El resultado se presenta en la tabla 4. Se observa que a pesar de su bajo peso molecular, la enzima es bastante inestable a temperaturas sobre 30^o.

6. Efecto de fuerza iónica.

Se probó el efecto sobre la actividad de la enzima, de concentraciones crecientes de fosfato de potasio y de KCl. El ensayo se hizo en tampón TES pH 7,5 conteniendo los demás componentes del ensayo espectrofotométrico normal y cantidades variables de fosfato de potasio o de KCl. Los datos representados en la figura 23 demuestran que

Tabla 4. Efecto de la temperatura en la estabilidad de la quinasa fosfomevalónica.

Temperatura (°C)	Actividad residual (%)
30	100,0
35	88,5
40	78,7
45	55,8
50	47,5
55	23,0
60	8,1

Se incubaron muestras de 0,1 ml de quinasa fosfomevalónica (actividad específica 10,6 U/mg de proteína) durante 5 minutos a las diferentes temperaturas, en tampón fosfato de potasio 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM, pH 7,5. Después de este tiempo se transfirieron las muestras a hielo y se determinaron las actividades enzimáticas tomando alícuotas de 0,01 ml para el ensayo espectrofotométrico, según se describe en Métodos.

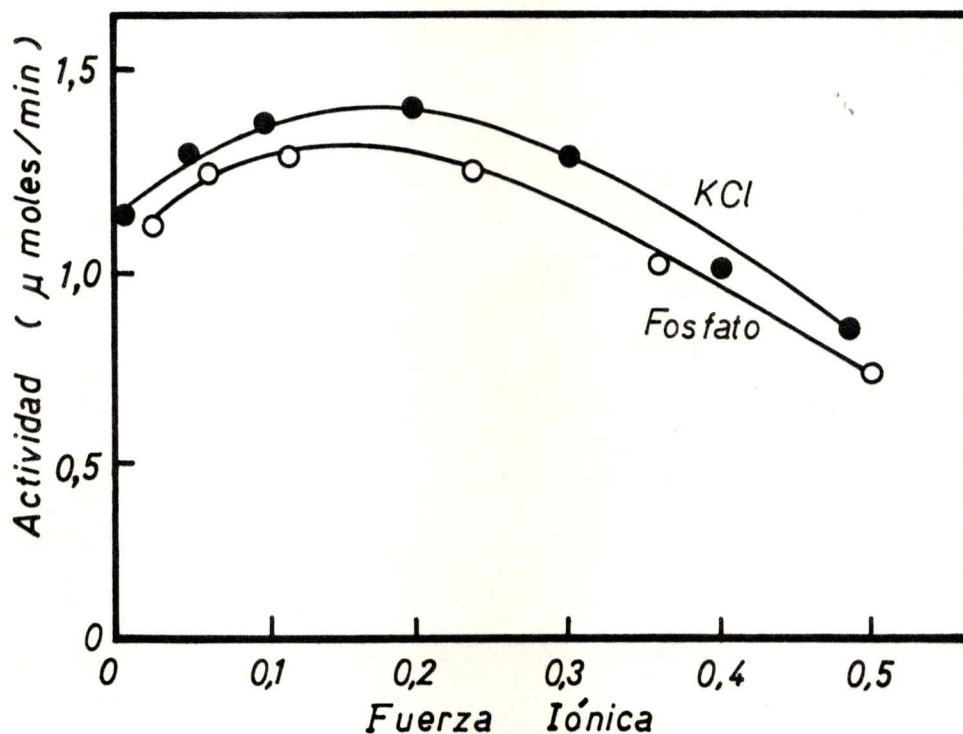


Figura 23. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica.

El medio de reacción contenía 11 mU de quinasa fosfomevalónica (act. esp. 2,3 U/mg de proteína); NADH 0,24 mM; ATP 2,5 mM; PEP 2,5 mM; $MgCl_2$ 5 mM; MVA-P 1 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; PK 8 unidades; LDH 8 unidades, en tampón TES 100 mM, pH 7,5 y cantidades variables de KCl o de fosfato de potasio pH 7,5. La actividad enzimática se expresa como los μ moles de MVA-P fosforilados por minuto y por ml de la solución de enzima de la cual se tomaron las alícuotas para el ensayo de actividad.

la máxima actividad se obtiene con fuerzas iónicas de 0,1 - 0,2. El resultado señala, además, que el fosfato no es inhibidor de la enzima y la caída de la actividad a altas concentraciones de fosfato se debe a un efecto de fuerza iónica. Esta propiedad se consideró en el ensayo de actividad de la enzima, el cual se hizo a la fuerza iónica óptima (0,2).

7. Efecto del pH.

Estos estudios se efectuaron utilizando una serie de tampones de Good (47) en el ensayo de la actividad enzimática. Ellos fueron los siguientes en el rango de pH que se indica: MES, pH 5,5-7,0; TES, pH 6,8-8,0; BICINE, pH 7,8-9,5; CAPS, pH 9,0-9,5. En cada ensayo se agregaron 0,01 ml de quinasa fosfomevalónica conteniendo entre 12 y 15 mU, a los componentes del ensayo normal en el respectivo tampón a concentración 100 mM. Se encontró que la velocidad de reacción aumenta desde pH 5,5 hasta 7,5 y luego se mantiene constante hasta pH 9,5 que fue el más alto probado (Fig. 24). El rango de pH investigado es el máximo que permite el ensayo espectrofotométrico acoplado. La estabilidad de la enzima a los diferentes pH se probó incubando una muestra de enzima de actividad específica 3,5 U/mg, durante 10 minutos a 0° en los diferentes tampones de Good. Con este tratamiento la enzima resultó ser perfectamente estable.

Como una aproximación a la determinación de residuos de amino-ácidos que participan en la reacción catalizada por la quinasa fosfomevalónica se hizo un estudio de la variación de las velocidades

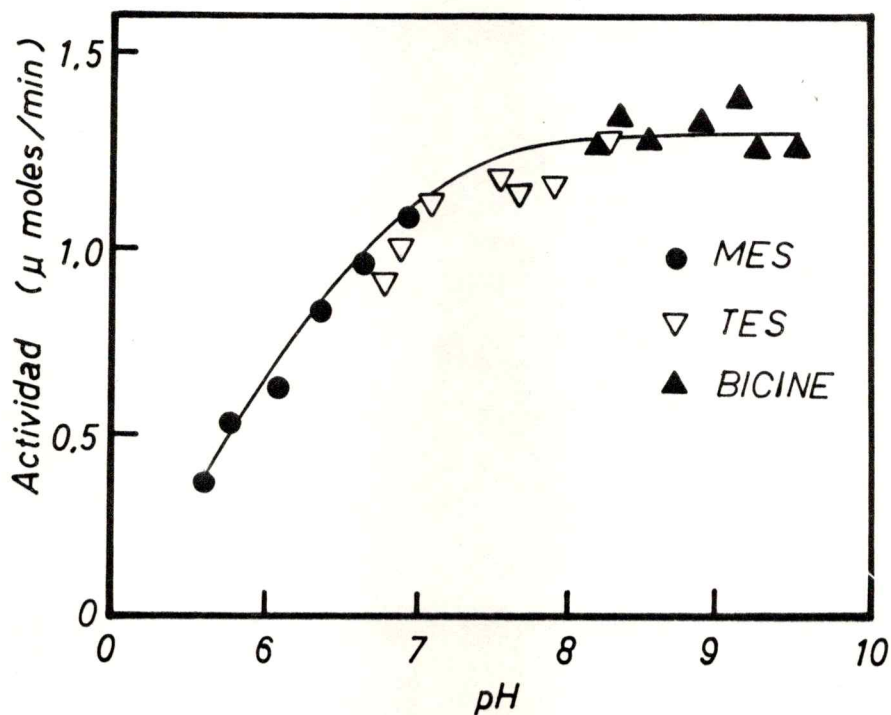


Figura 24. Efecto del pH sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica.

El medio de reacción contenía quinasa fosfomevalónica (12 mU, act. esp. 2,3 U/mg de proteína); NADH 0,24 mM; ATP 2,5 mM; PEP 2,5 mM; $MgCl_2$ 5 mM; MVA-P 1 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; PK y LDH, 8 unidades de cada una, en diferentes tampones a concentración 100 mM. La actividad enzimática se expresa como los μ moles de MVA-P fosforilados por minuto y por ml de la solución de enzima de la cual se tomaron las muestras para el ensayo de actividad.

máximas aparentes y de las constantes de Michaelis para el MVA-P y el ATP en función del pH. De acuerdo con Dixon (56), la representación del log de $V_{máx}$ o del pK_m en función del pH permite en algunos casos estimar el pK de grupos pertenecientes al complejo E-S, a la enzima libre, o al sustrato. En la determinación de las K_m aparentes para el MVA-P se varió la concentración de este sustrato entre 0,005 y 0,06 mM a concentración de ATP constante 2,5 mM. Los demás componentes fueron los del ensayo normal, excepto que se agregó también KCl 100 mM para proporcionar el K^+ necesario para la actividad de la quinasa pirúvica y que en el ensayo normal es aportado por el fosfato de potasio. Las K_m aparentes para el ATP fueron determinadas en condiciones similares, a concentración constante de MVA-P 0,75 mM, variando el ATP entre 0,1 y 1 mM. Los datos fueron procesados por un programa de computación hecho para datos obtenidos por el método de Lineweaver-Burk. Las $V_{máx}$ aparentes se obtuvieron de las intersecciones de los trazados calculados por el mismo programa. La figura 25 muestra el resultado al utilizar MVA-P como sustrato variable. La representación de $\log V_{máx}$ ap. en función del pH presentó una intersección de las tangentes a pH 6,55 con una pendiente de 0,57; el gráfico $\log 1/K_m$ presentó un quiebre positivo a pH 6,5 y un quiebre negativo a pH 7,9 con una pendiente de 0,23. Estos resultados no son fáciles de interpretar. La representación del log de $V_{máx}$ en función del pH puede dar información sobre grupos ionizables en el complejo ES y el gráfico pK_m en función del pH puede indicar la presencia de tales grupos en el complejo ES o en la enzima libre (o sustrato), dependiendo

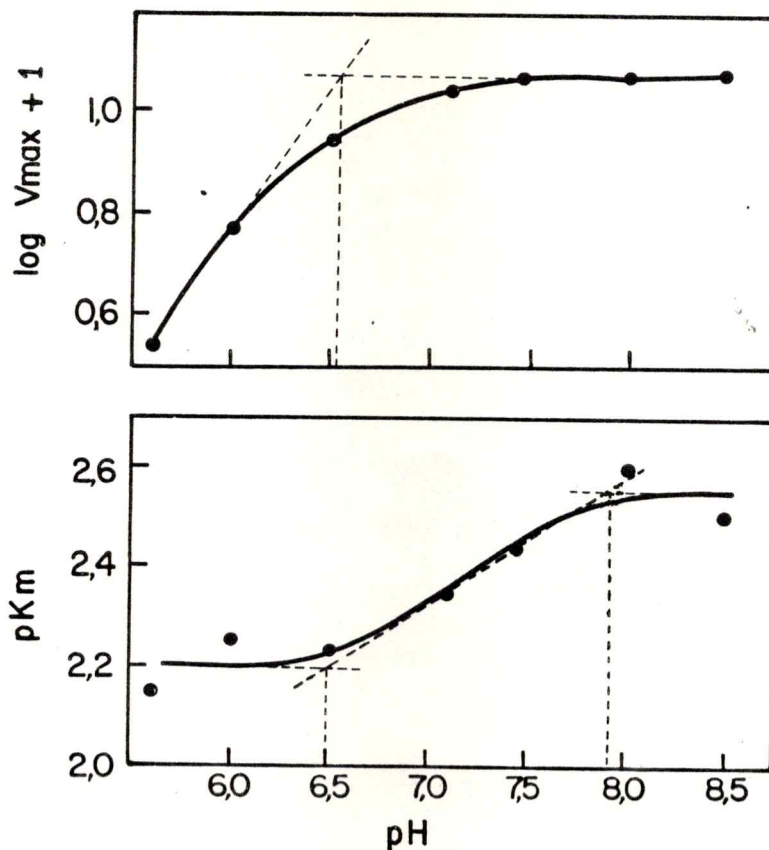


Figura 25. Efecto del pH sobre las velocidades máximas y constantes de Michaelis aparentes para el mevalonato-5-fosfato.

El medio de reacción contenía en un volumen de 1 ml: quina fosfomevalónica 14 mU (act. esp. 3,6 U/mg de proteína), NADH 0,24 mM; ATP 2,5 mM; PEP 2,5 mM; $MgCl_2$ 5 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; PK 8 unidades; LDH 8 unidades, y MVA-P a la concentración requerida, en tampón 100 mM (MES, pH 5,5-6,5; TES, pH 7,0-7,5; BICINE, pH 8,0-8,5). Las V_{max} fueron determinadas por extrapolación a concentración de MVA-P infinita, en la representación de Lineweaver-Burk, y se expresan como los μ moles de MVA-P fosforilados por minuto y por ml de solución de enzima de la cual se tomaron las alícuotas para el ensayo de actividad.

si la inflexión es positiva o negativa. En ambos tipos de representación se requiere que las pendientes sean números enteros, correspondiendo ellos al cambio de carga que se produce en el complejo enzima-sustrato o en la enzima libre en el rango de pH dado. Esta interpretación, por otra parte es aplicable si la enzima forma un solo intermediario enzima-sustrato. En la práctica, los valores de pK aparentes pueden o no coincidir con los pK verdaderos aún para los sistemas más simples de enzimas con un sustrato. En el caso de la quinasa fosfomevalónica, se trata de una enzima que cataliza una reacción entre dos sustratos en que ambos sustratos presentan grupos ionizables en el rango de pH estudiado. El ATP presenta un pK 6,97 y el MVA-P de 6,8 (Fig. 26). La disminución de K_m para el MVA-P sobre pH 6,5 podría simplemente revelar una mayor afinidad de la enzima por la forma disociada del MVA-P.

8. Determinación de parámetros cinéticos.

Con el objeto de determinar los parámetros cinéticos básicos de la quinasa fosfomevalónica se efectuó un estudio de velocidades iniciales. La enzima presentó comportamiento hiperbólico para ambos sustratos, el MVA-P y el ATP. Se midieron las velocidades iniciales variando la concentración de un sustrato a diferentes concentraciones fijas del otro sustrato. La quinasa fosfomevalónica (10 mU, act. esp. 2,3 U/mg de proteína), se hizo reaccionar en el medio de ensayo usual en que el MVA-P se varió entre 0,02 y 0,5 mM y el ATP entre 0,2 y 2 mM. Tanto con MVA-P como con ATP como sustrato variable se obtuvo

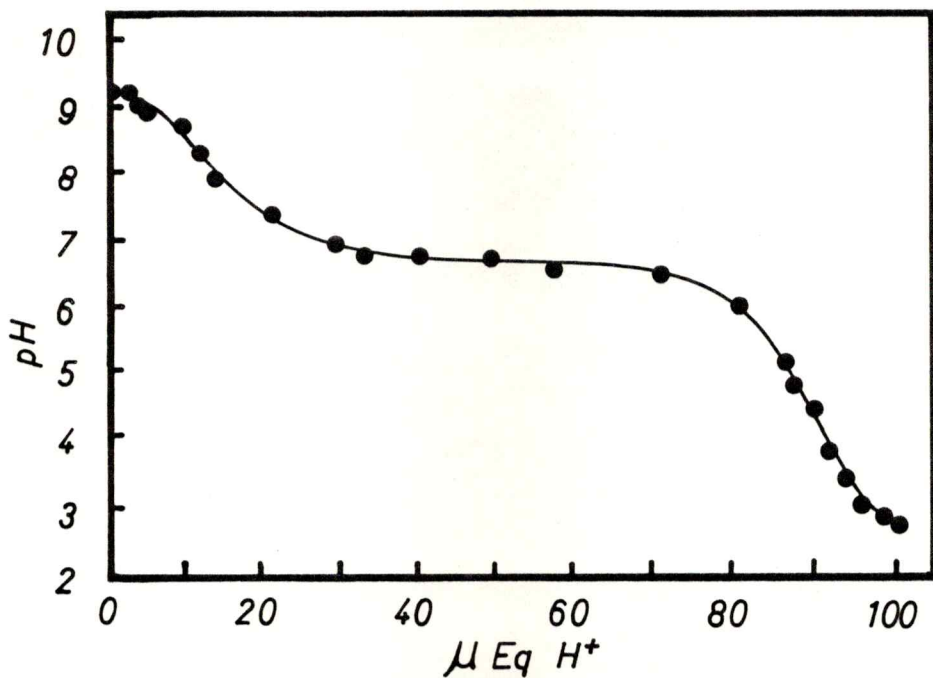


Figura 26. Titulación ácido-base del mevalonato-5-fosfato.

Una muestra de MVA-P se llevó a pH 9,2 con KOH y se tituló con H₂SO₄ en un pHmetro Radiometer utilizando un electrodo combinado. Se restaron los valores obtenidos al titular el solvente.

una familia de rectas que se cortaron a la izquierda de la ordenada y más arriba de la abscisa cuando los datos se representaron por el método de Lineweaver-Burk (Fig. 27). Este resultado es típico de un mecanismo secuencial de acuerdo a la terminología de Cleland (57). En la figura 28 están representados los valores de $1/V_{\text{máx}}$ y de las pendientes obtenidos por el método de Lineweaver-Burk, en función de los recíprocos de la concentración de ATP. Estos datos analizados mediante un programa de computación permitieron estimar un valor de K_m verdadero para el MVA-P de $7,5 \times 10^{-5}$ M y para el ATP de $4,6 \times 10^{-4}$ M. La constante de disociación para el primer sustrato se calculó en $1,08 \times 10^{-4}$. Este valor es mayor que la K_m del MVA-P y menor que la K_m del ATP. Como en el gráfico de los dobles recíprocos, tanto el MVA-P como el ATP como sustrato variable dan lugar a una intersección más arriba de la abscisa, esto significa que la K_{ia} es mayor que la K_m para el sustrato A, de ahí entonces que el sustrato A o primer sustrato debería ser el MVA-P. En las condiciones experimentales estudiadas, el porcentaje de Mg-ATP varió aproximadamente entre un 95 y un 99 %, de tal manera que la K_m verdadera calculada para el ATP debería ser muy parecida a la correspondiente al complejo Mg-ATP.

C. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato).

Se consideró de interés el estudio del centro activo de la quinasa fosfomevalónica, como una forma de abordar el mecanismo de la

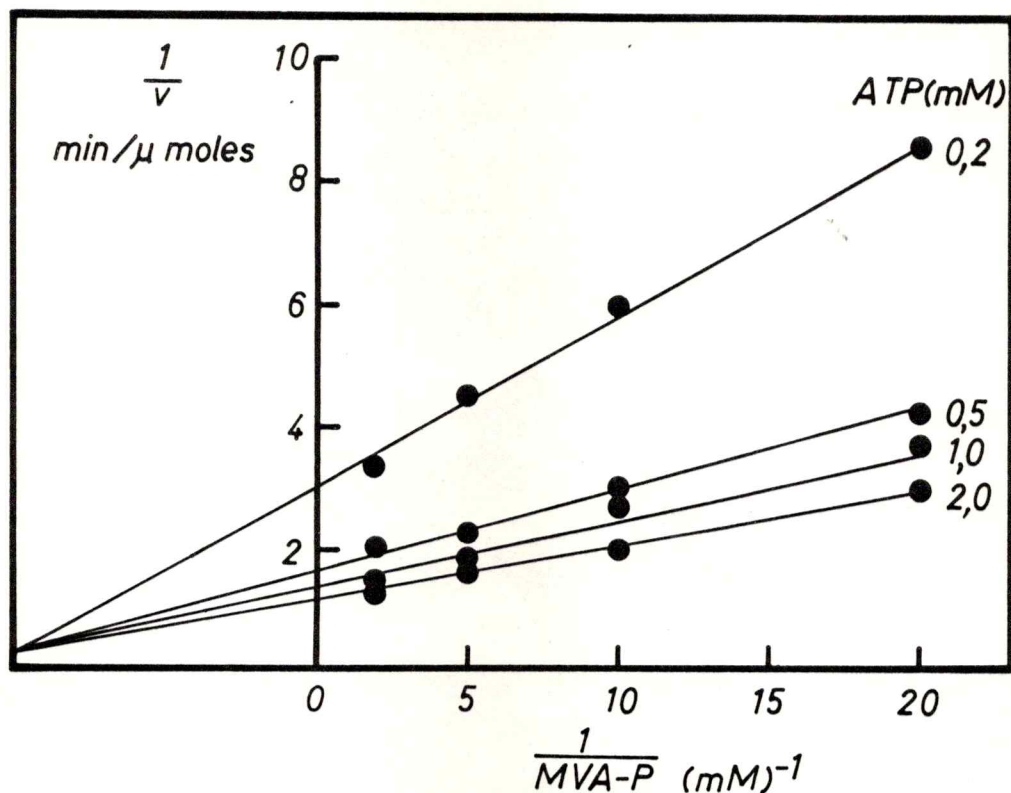


Figura 27. Efecto de la concentración de MVA-P a diferentes concentraciones fijas de ATP sobre la velocidad inicial de la reacción de la quinasa fosfomevalónica.

El medio de reacción contenía 10 mU de quinasa fosfomevalónica (act. esp. 2,3 U/mg de proteína); NADH 0,24 mM; PEP 2,5 mM; MgCl₂ 5 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; PK y LDH, 8 unidades de cada una, en tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7,5, además de las concentraciones requeridas de MVA-P y ATP. La actividad enzimática se expresa como los μ moles de MVA-P fosforilados por minuto y por ml de la solución de enzima de la cual se tomaron las alícuotas para el ensayo de actividad. Otras condiciones experimentales se describen en Métodos.

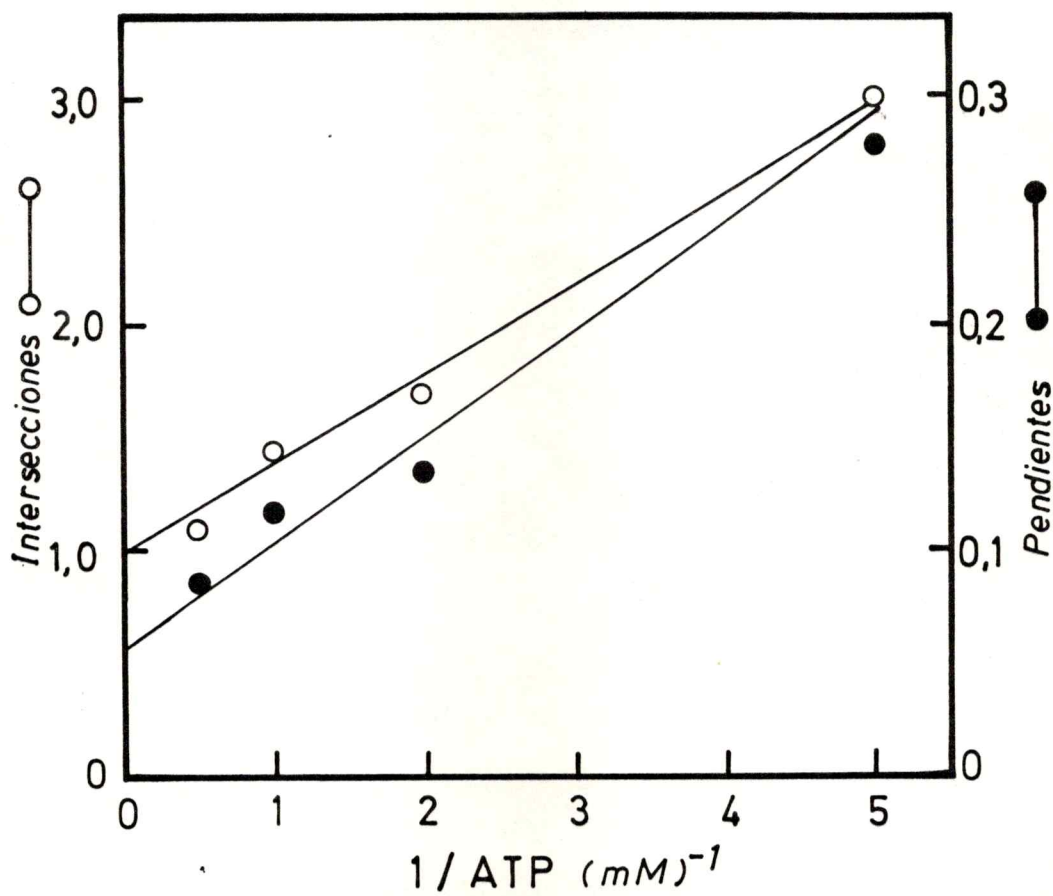


Figura 28. Representación de las pendientes e intersecciones en función de la concentración de ATP.

Se utilizaron los datos de la Fig. 27.

reacción catalizada. Como los estudios de pH descritos no permitieron establecer la identidad de grupos químicos importantes, el estudio de estos grupos se efectuó a base de otros antecedentes. El requerimiento de compuestos sulfhidrilos para la mantención de la actividad enzimática podía significar que el o los residuos de cisteína que posee la enzima estuvieran en el centro activo y fueran esenciales para la actividad.

Se utilizó como reactivo de grupos sulfhidrilos el 5,5'-ditio bis-(2-nitrobenzoato), (reactivo de Ellman, DTNB), el cual ha sido ampliamente utilizado en la titulación y modificación de grupos sulfhidrilos de proteínas y enzimas (49,58-64). Este reactivo reacciona de manera muy específica con los grupos -SH libres, generando 1 mol de 2-nitro-5-mercaptobenzoato por mol de -SH, quedando este último unido a través de un enlace -S-S- al otro grupo tionitrobenzoato del reactivo. El anión tionitrobenzoato libre presenta un intenso color amarillo el cual se utiliza para cuantificar los grupos -SH midiendo la absorbancia a 412 nm.

1. Reacción de inactivación.

La reacción se efectuó incubando la enzima previamente dializada (250 mU; act. esp. 2,5 U/mg de proteína), con el DTNB, en un baño a 30° en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5. A tiempos apropiados se sacaron alícuotas de 0,01 ml para el ensayo de actividad como se indica en Métodos. La Fig. 29 presenta el resultado de incubar la quinasa fosfomevalónica con diferentes concentraciones de DTNB. La

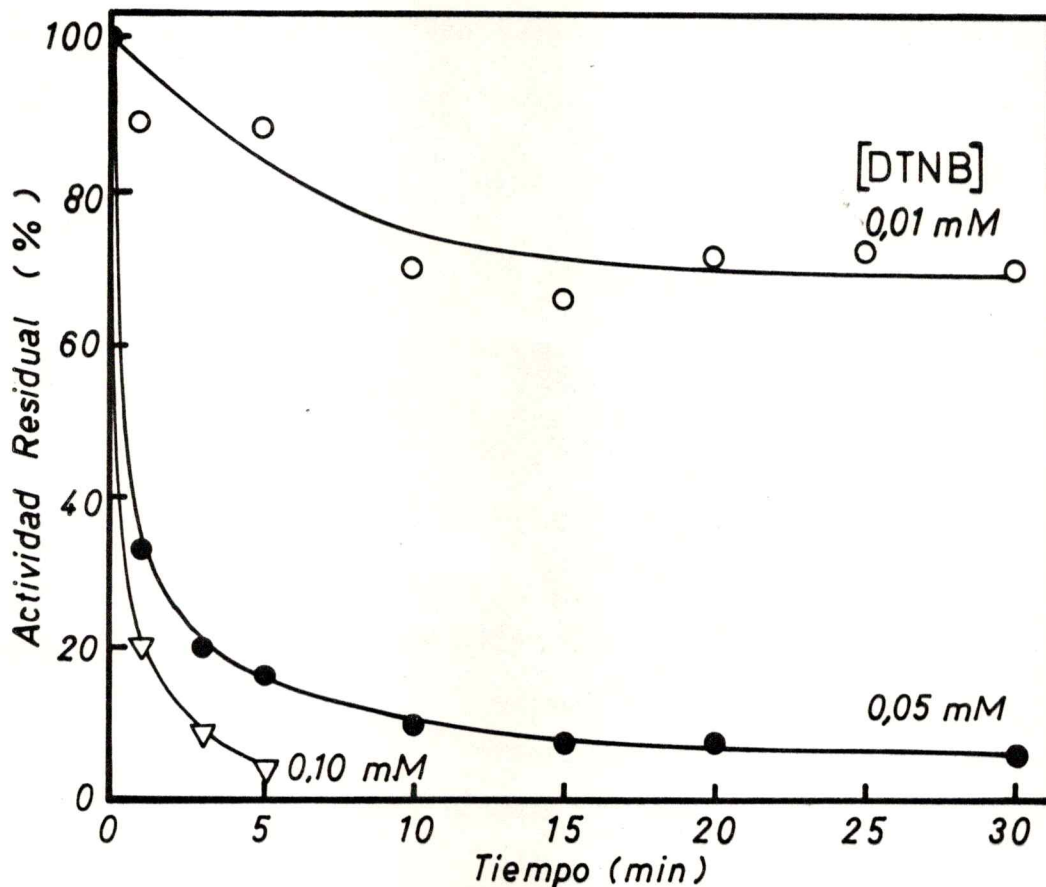


Figura 29. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica con 5,5'-ditio bis-(2-nitrobenzoato).

La reacción de inactivación se efectuó a 30^o incubando en un volumen de 0,1 ml la enzima (250 mU, act. esp. 2,5 U/mg de proteína), con DTNB a la concentración requerida, en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5. A los tiempos indicados en la figura se tomaron alícuotas de 0,01 ml para el ensayo espectrofotométrico de actividad, de acuerdo a lo indicado en Métodos.

inhibición ocurrió rápidamente en las condiciones señaladas, siendo máxima a los 10 minutos y el grado de inactivación dependió de la concentración de DTNB. A concentración de DTNB 0,1 mM la inactivación fue prácticamente total a los 6 minutos. Una muestra control, incubada en condiciones similares pero sin DTNB, no experimentó pérdida de actividad durante el tiempo en que se efectuó el experimento.

2. Reversión de la inactivación por compuestos sulfhidrilos.

Se probó la especificidad de la reacción entre DTNB y grupo(s) sulfhidrilo(s) de la enzima, determinando si era posible revertir la inactivación por concentraciones altas de compuestos sulfhidrilos. En la figura 30 se presenta el resultado de la adición de 2-mercaptoetanol y ditiotreitól, ambos a concentración 1 mM, en la reacción de inactivación. El 2-mercaptoetanol revirtió la actividad a un 30 % y el ditiotreitól a más de un 90 % a las concentraciones indicadas. Esto demuestra que la inactivación de la quinasa fosfomevalónica se produce debido a la reacción entre el DTNB y uno o más grupos sulfhidrilos de la enzima.

3. Efecto de los sustratos en la reacción de inactivación.

Se investigó el efecto que ejercía la presencia de MVA-P y de Mg-ATP en la mezcla de incubación con DTNB. Para ello se agregó el reactivo modificador a la enzima preincubada a 30^o con el respectivo sustrato. La figura 31 muestra que el MVA-P a concentración 1,5 mM protegió efectivamente a la quinasa fosfomevalónica de la inactivación

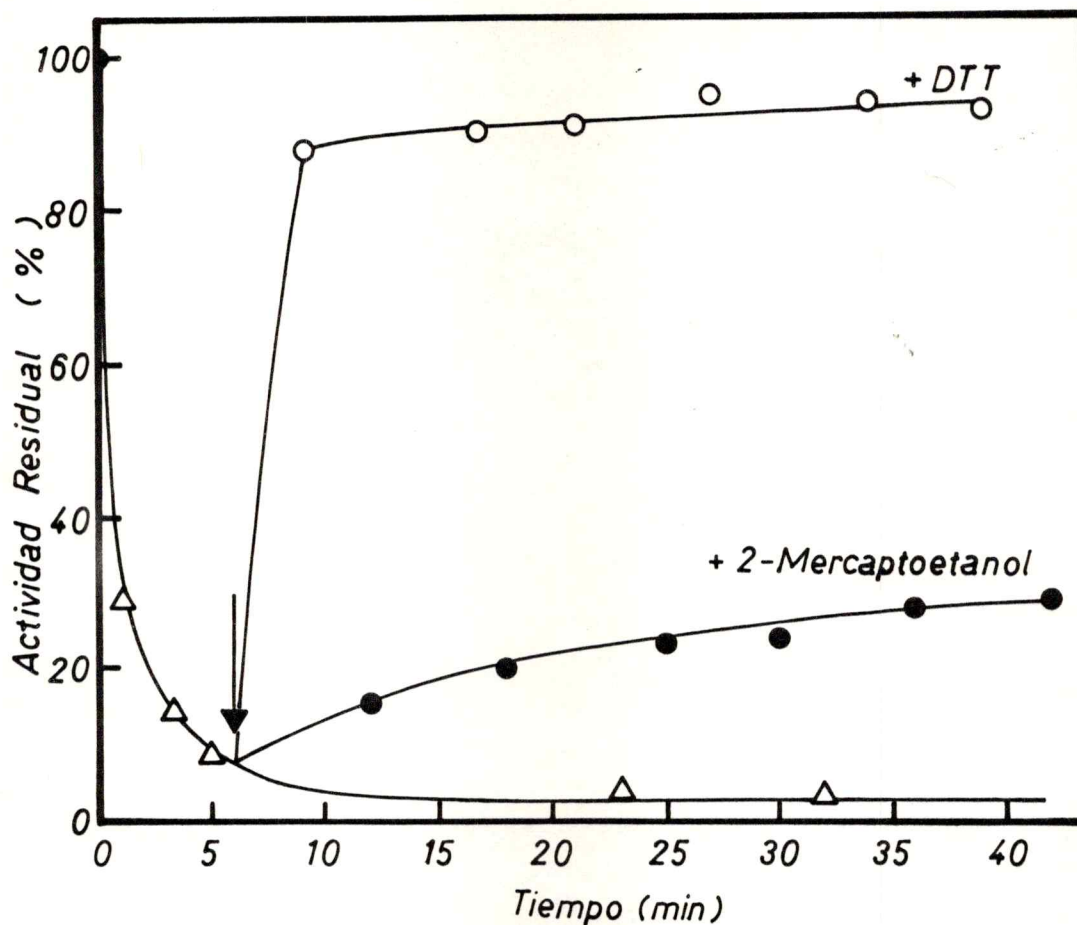


Figura 30. Efecto del 2-mercaptoetanol y ditiotreitól en la reacción de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por 5,5'-ditiobis-2(nitrobenzoato).

La enzima (750 mU, act. esp. 2,5 U/mg de proteína), se incubó con DTNB 0,055 mM a 30° en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5 en un volumen de 0,25 ml. Se midió la actividad residual durante 5 minutos. A los 6 minutos se apartaron 2 alícuotas de 0,09 ml; a una se agregó 2-mercaptoetanol y a la otra ditiotreitól, ambos a concentración 1 mM, y se continuó midiendo la actividad de las muestras tratadas, así como la de la no tratada con compuestos sulfhidrilos.

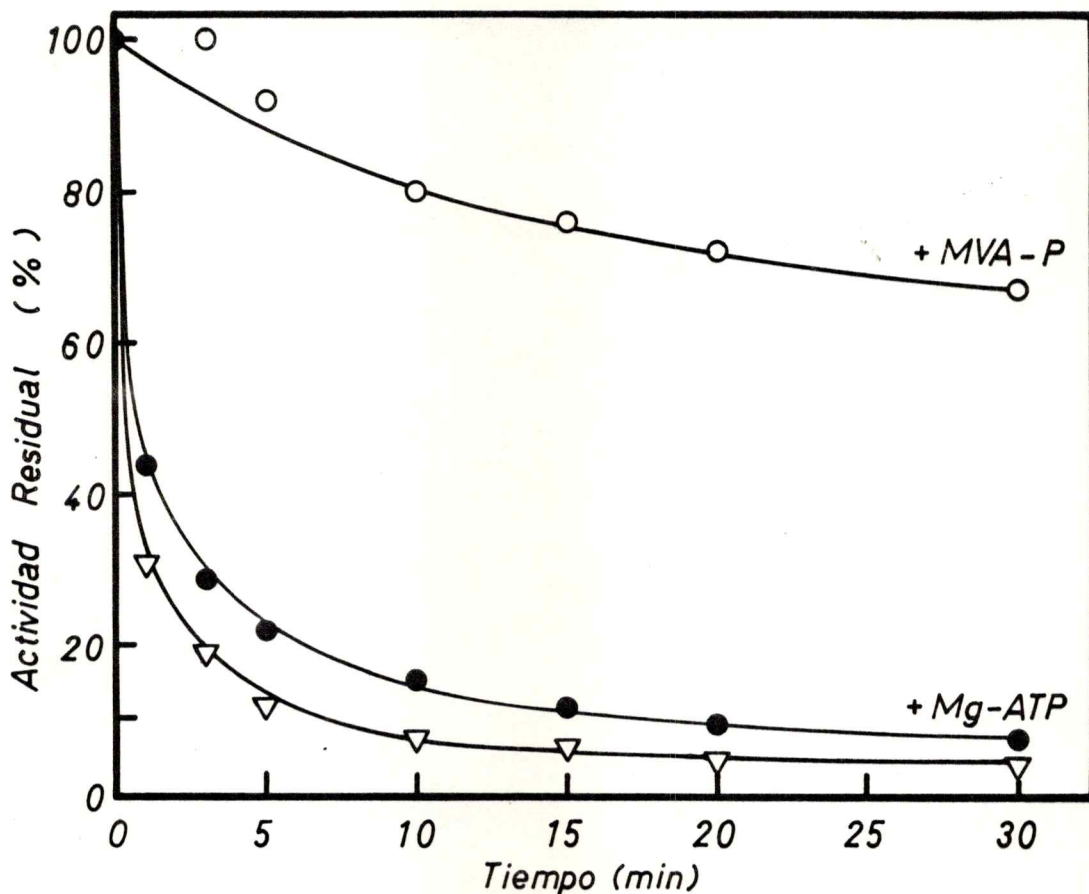


Figura 31. Efecto de los sustratos en la reacción de inactivación de la quinasa fosfovalónica por 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato).

La reacción se efectuó agregando DTNB 0,056 mM a la enzima (250 mU, act. esp. 2,5 U/mg de proteína), preincubada a 30° durante 5 minutos con MVA-P 1,5 mM o con ATP 2,3 mM + MgCl₂ 4,5 mM, en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5. A los tiempos indicados en la figura, después de la adición del DTNB, se tomaron muestras de 0,01 ml para el ensayo de actividad enzimática.

producida por DTNB. En ausencia de sustrato se produjo una pérdida casi completa de la actividad con DTNB 0,056 mM, en cambio en presencia de MVA-P la actividad se redujo sólo hasta un 70 % de la inicial al cabo de 30 minutos. En el mismo gráfico se aprecia que el Mg-ATP no ejerció ningún efecto protector sobre el grado de inactivación de la enzima. Estos resultados sugieren que la quinasa presenta al menos un grupo sulfhidrilo esencial para la actividad en o cerca del si tío de unión del MVA-P.

4. Determinación de las Km aparentes de la enzima modificada con 5,5'-ditiobis- (2 - nitrobenzoato).

Se determinaron las Km aparentes para el MVA-P y el ATP antes y después de modificar la enzima con DTNB 0,025 mM. Los resultados se presentan en la tabla 5. Las Km aparentes para ambos sustratos re sultaron iguales a las de la enzima nativa. Sólo las Vmáx aparentes se vieron disminuídas. La enzima modificada con DTNB usada en este experimento retuvo el 25 % de la actividad inicial. Estos resultados indicarían que el reactivo modificador ~~de~~ por resultado la formación de un producto totalmente inactivo; la enzima parcialmente inactivada constaría, por lo tanto, de dos poblaciones de moléculas, unas com pletamente activas y otras completamente inactivas. Esta suposición se confirmó determinando las constantes catalíticas de la enzima hom génea, antes y después de ser tratada con DTNB, de acuerdo a como se describe en la sección L de Métodos (titulación de grupos sulfhidri- los). La cantidad de enzima residual se estimó por diferencia,

Tabla 5. Constantes cinéticas de la quinasa fosfomevalónica modificada con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato).

Enzima	MVA-P		ATP	
	Km ap. (mM)	V máx. ap. (μ moles/min/ml)	Km ap. (mM)	V máx. ap. (μ moles/min/ml)
Control	0,084	2,67	0,256	2,20
Modificada	0,082	0,66	0,266	0,73

La quinasa fosfomevalónica (5,5 unidades, act. esp. 5,5 U/mg de proteína) se incubó con DTNB 0,025 mM a 30° durante 15 minutos a fin de inactivar la enzima en un 75 %. La incubación se efectuó en un volumen de 0,22 ml de fosfato de potasio 10 mM pH 7,5 introduciéndose enseguida los tubos en hielo. El control de enzima no modificada se preparó incubando la enzima en forma similar pero sin DTNB. Las Km aparentes fueron determinadas variando la concentración de MVA-P entre 0,02 - 0,125 mM a concentración de ATP constante 2,5 mM y variando la concentración de ATP entre 0,1 - 1 mM a concentración de MVA-P 1 mM.

restando de la inicial, la cantidad titulada con DTNB. Los valores calculados, expresados como moles de MVA-P fosforilados/minuto/mol de enzima, fueron respectivamente 609 y 635 para la enzima nativa y tratada con DTNB, valores que son esencialmente iguales.

5. Número de grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad catalítica.

El número de grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad se estimó con la enzima homogénea. Para ello se relacionó la pérdida de actividad con la modificación química de la enzima, después de tratar separadamente dos muestras de esta última con DTNB, de acuerdo a como se describe en la sección L de Métodos. En la figura 32 se muestra el resultado de graficar el porcentaje de actividad residual en función de los moles de -SH modificados por mol de enzima. La extrapolación de la línea a actividad cero, indica que la inactivación completa se produce cuando se modifica un promedio de 0,98 grupos sulfhidrilos por molécula de enzima. Para el cálculo se supuso un peso molecular de 22.000 para la quinasa fosfomevalónica.

D. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato.

La evidencia de que numerosas enzimas que requieren de sustratos fosforilados presentan grupos aminos en el sitio de unión de fosfato (65-71), orientaron los estudios hacia la búsqueda de grupos

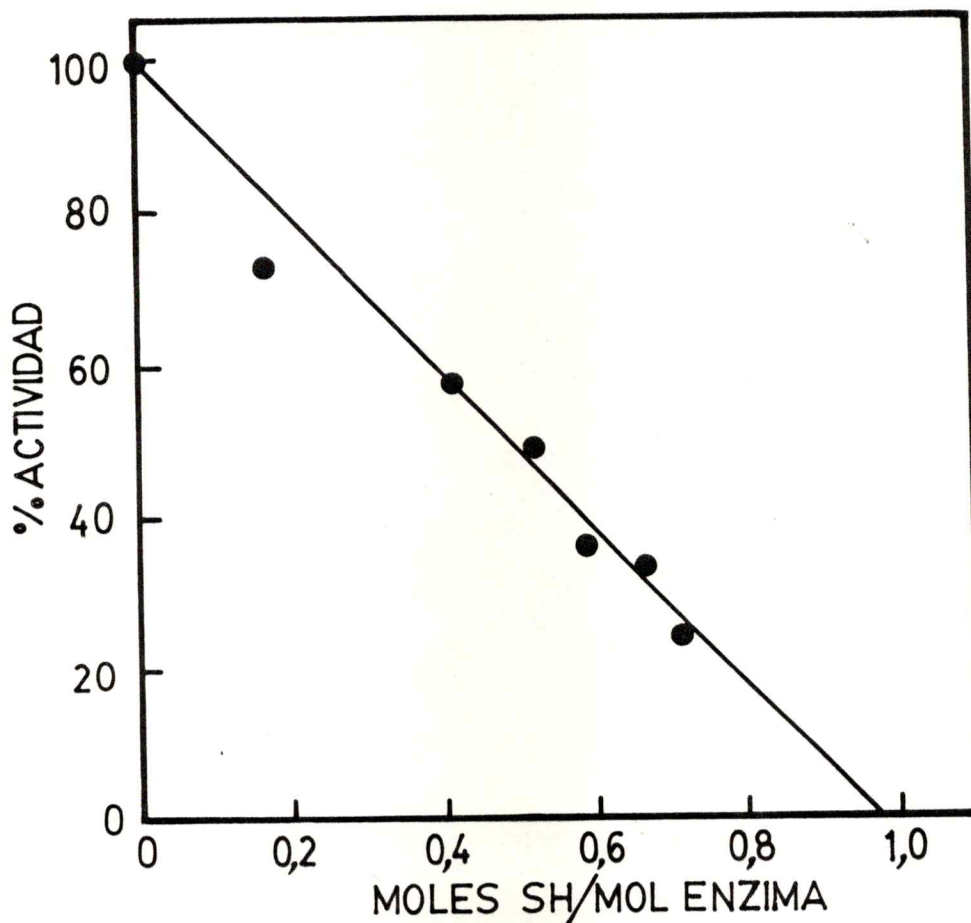


Figura 32. Determinación del número de grupos sulfhidrilos de la quinasa fosfomevalónica esenciales para la actividad.

En un volumen de 1 ml se incubaron a 30° , 4,48 unidades de quinasa fosfomevalónica homogénea (act. esp. 38,3 U/mg de proteína), en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5, con DTNB 0,040 mM y se midió la actividad residual durante 30 minutos. A otra muestra igual de enzima se agregó DTNB a la misma concentración y se registró la variación de absorbancia a 412 nm durante el mismo tiempo.

aminos esenciales. Se utilizó como reactivo modificador el piridoxal-5'-fosfato (PLP), el cual ha demostrado ser uno de los más específicos para estos estudios y el más utilizado.

1. Reacción de inactivación con piridoxal-5'-fosfato.

El efecto del PLP sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica se estudió incubando la enzima (170 mU, act. esp. 10,0 U/mg de proteína) a 30° con PLP en tampón fosfato de potasio 10 mM pH 7,5; 2-mercaptoetanol 10 mM, en un volumen de 0,1 ml. A tiempos adecuados se tomaron alícuotas de 0,01 ml para el ensayo de actividad como se indica en Métodos. En la Fig. 33 se muestra el resultado de incubar la enzima con diferentes concentraciones de PLP. Se observa que con una concentración del reactivo 0,024 mM, la actividad disminuyó hasta menos de un 40 % de la inicial, y con una concentración 0,045 mM la actividad disminuyó hasta un 35 % de la inicial en 10 minutos. Concentraciones mayores de PLP hasta 0,5 mM no produjeron la inactivación total de la enzima, permaneciendo un 25-30 % de actividad residual. Existe por lo tanto un efecto de saturación en la extensión o grado máximo de inactivación de la enzima por PLP. En un gráfico de dobles recíprocos, a concentración de PLP infinita se obtuvo un 23 % de actividad residual y se calculó una constante de disociación para el complejo enzima-PLP de 0,0072 mM.

A fin de probar el grado de especificidad de la reacción se estudió el efecto que producían análogos del PLP: el piridoxal (PL) que carece del grupo fosfato y la piridoxamina-5'-fosfato (PAP) que

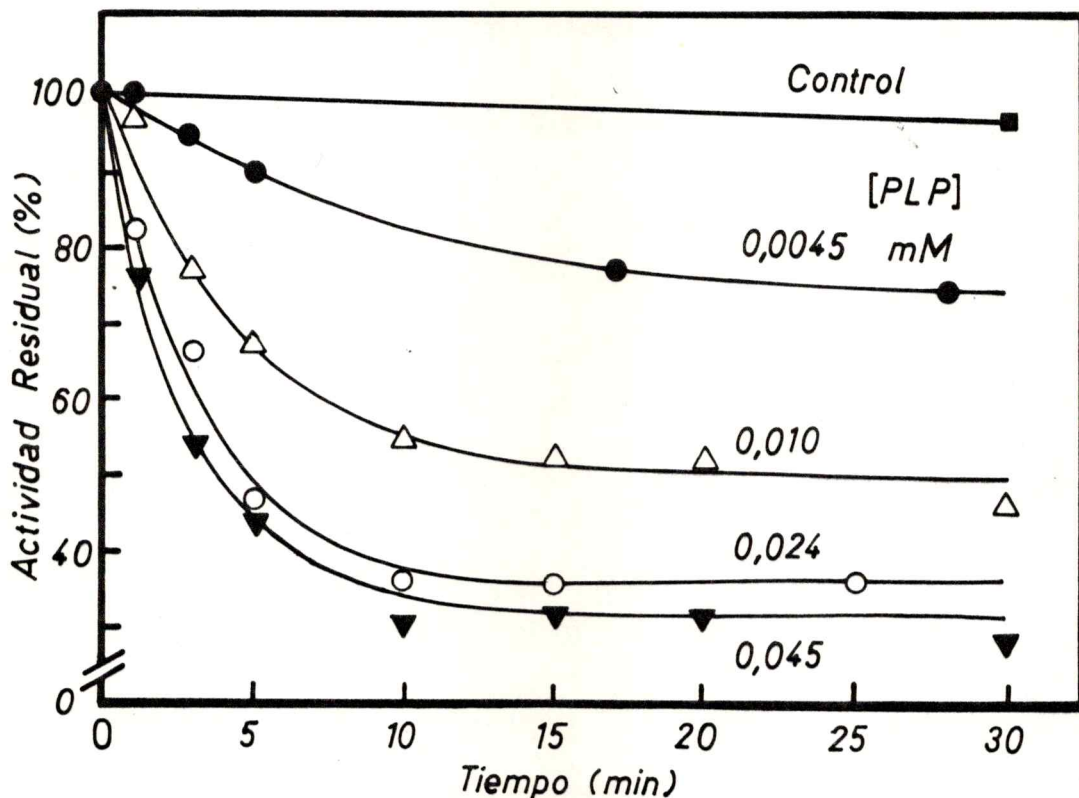


Figura 33. Inactivación de la quinasa fosfovalónica por piridoxal-5'-fosfato.

La reacción de inactivación se efectuó incubando 170 mU de enzima (act. esp. 10 U/mg de proteína), a 30° con PLP a las diferentes concentraciones, en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 10 mM, en un volumen de 0,1 ml. A los tiempos indicados en la figura, se tomaron alícuotas de 0,01 ml para el ensayo de la actividad residual de la enzima.

carece del grupo aldehído. En la figura 34 se muestra el efecto del piridoxal comparado con el PLP en un experimento hecho a pH 8,0 en tampón TES. El PLP, a una concentración 0,012 mM inhibió la quinasa fosfomevalónica en aproximadamente un 70 %; en cambio el PL a una concentración 20 veces superior, inhibió sólo en un 25 %. Por otra parte, la PAP a una concentración 0,25 mM logró inactivar la enzima en un valor cercano al 65 % a los 20 minutos . aunque con una velocidad más lenta en relación al PLP (figura 35).

2. Reversión de la inactivación por lisina y por diálisis.

La reacción entre el PLP y la quinasa fosfomevalónica podría ocurrir entre un grupo amino de la enzima y el grupo aldehído del piridoxal-5'-fosfato, con formación de una base de Schiff. De ser así, la reacción debería ser revertida agregando una amina primaria que compitiera con los grupos aminos de la enzima por el PLP. Además, la base de Schiff debería estabilizarse por reducción con boro-hidruro. Otra manera de revertir una base de Schiff es por diálisis, con lo cual se desplaza el equilibrio de la reacción, que es muy reversible, en la dirección de ruptura del complejo. En la figura 36 se muestra que la adición de lisina 2mM a la enzima inactivada con PLP a un 50 % de la actividad inicial produjo una reversión a un 80 % de dicha actividad en 50 minutos. En el mismo gráfico se muestra el efecto de agregar lisina después de la adición de NaBH_4 ; en este caso, ya no fue posible reactivar la enzima. La enzima inactivada con PLP recuperó casi totalmente la actividad inicial después de ser dializada. En cambio, tal reactivación no se produjo si previo a la

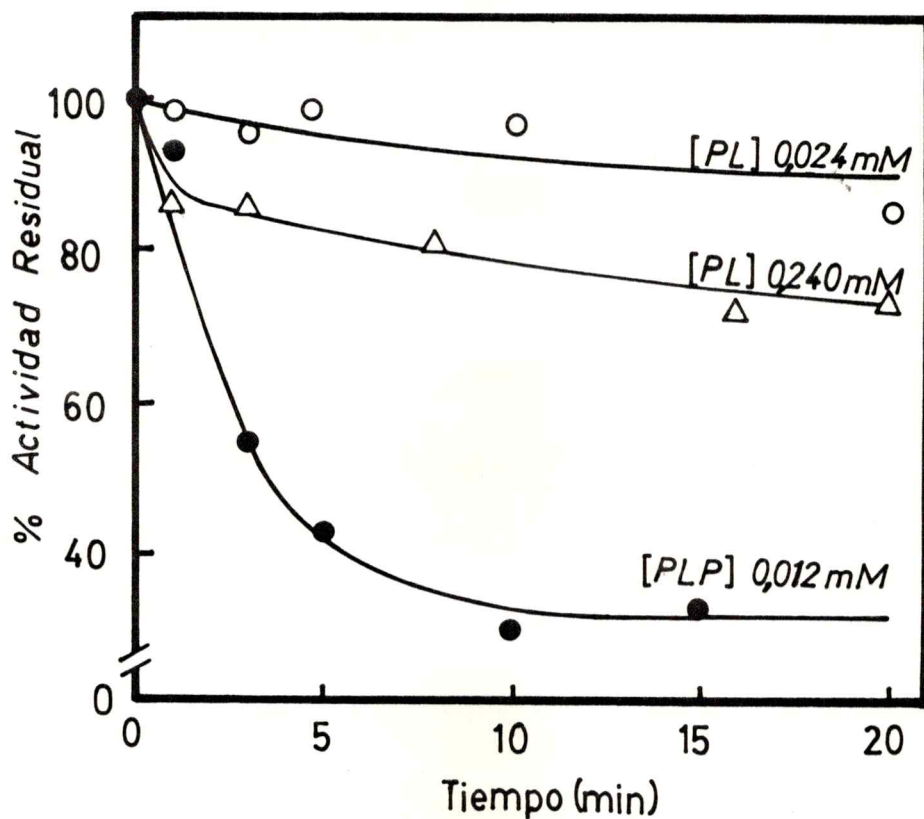


Figura 34. Efecto del piridoxal sobre la actividad de la quinasa fosfovalónica.

La reacción se efectuó incubando a 30° la enzima (288 mU, act. esp. 3,5 U/mg de proteína), en tampón TES 100 mM, pH 8,0; 2-mercaptoetanol 10 mM, con piridoxal o piridoxal-fosfato, en un volumen de 0,25 ml. Después de la adición de uno u otro reactivo, se tomaron muestras de 0,01 ml para el ensayo de la actividad enzimática, a los tiempos señalados en la figura.

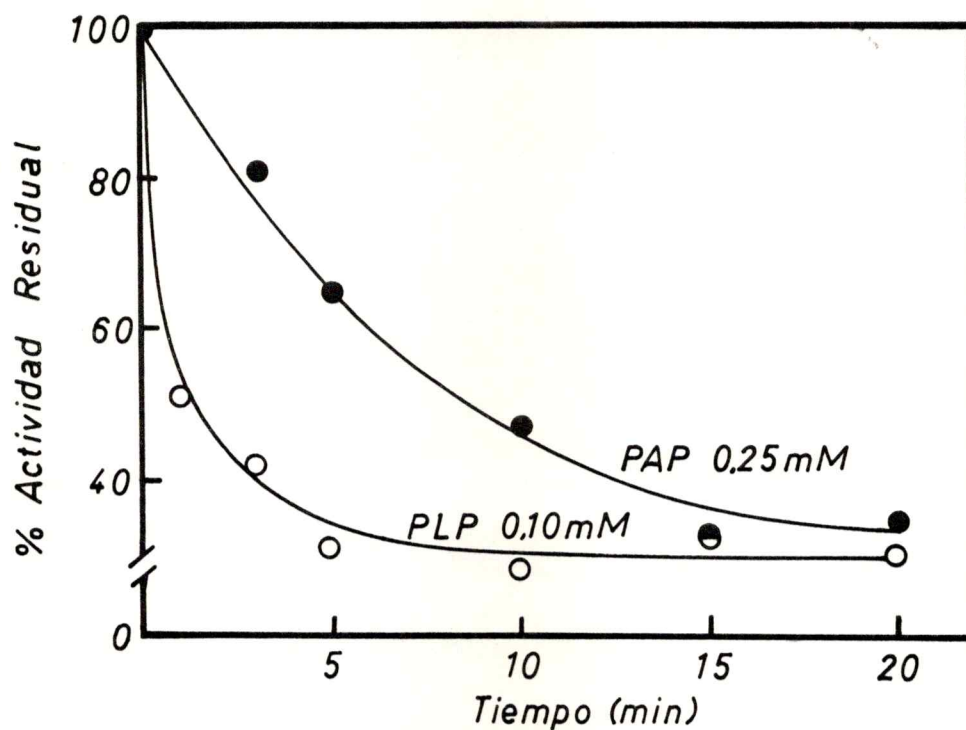


Figura 35. Efecto de la piridoxamina-5'-fosfato sobre la actividad de la quinasa fosfomevalónica.

La reacción se efectuó incubando a 30° la enzima homogénea (704 mU, act. esp. 32 U/mg de proteína), en fosfato de potasio 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM, pH 7,5 con piridoxamina-5'-fosfato o piridoxal-5'-fosfato, en un volumen de 0,1 ml. A los tiempos señalados en la figura, se registró la actividad enzimática tomando alícuotas de 0,01 ml para el ensayo espectrofotométrico.

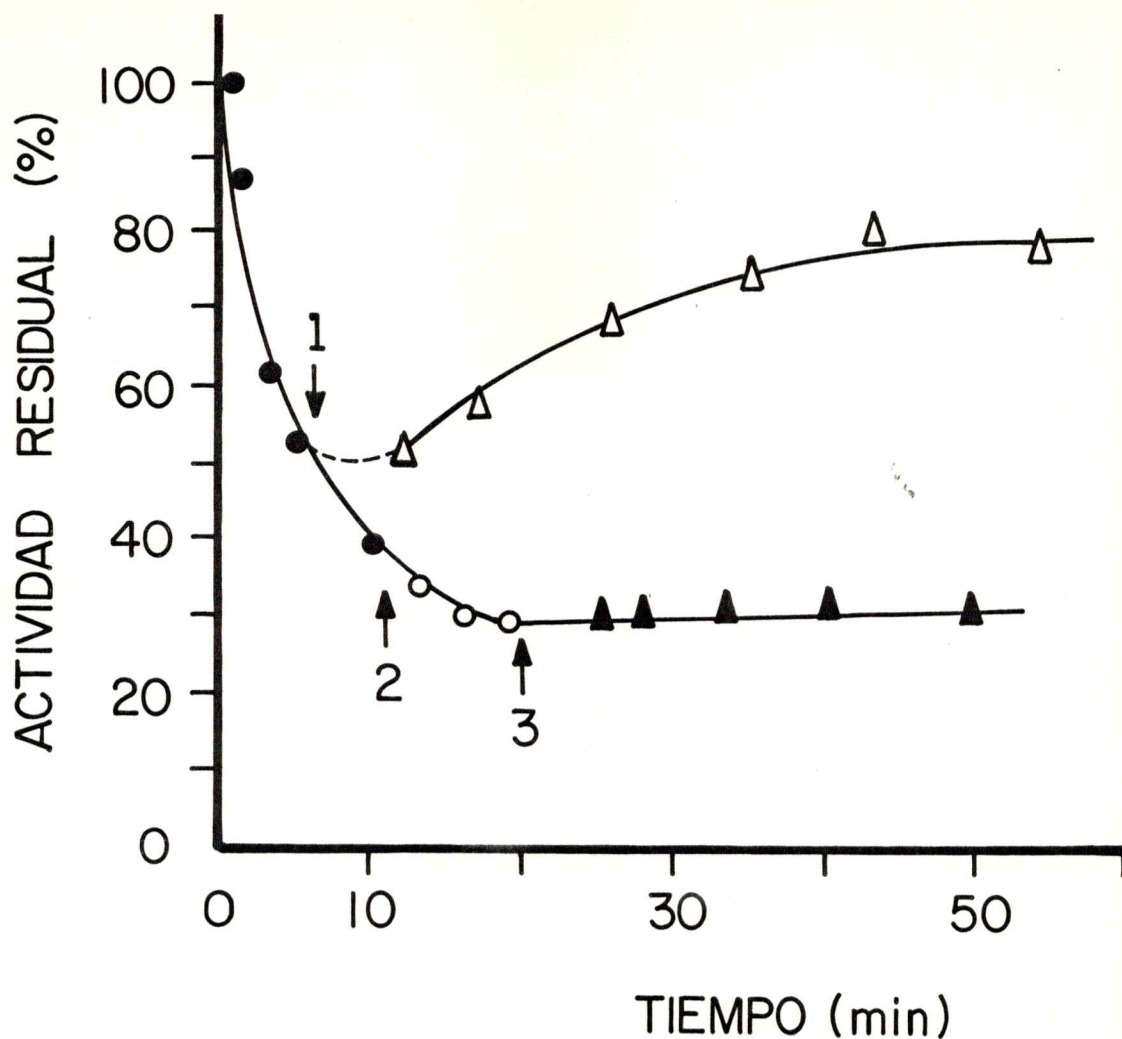


Figura 36. Efectos de la lisina y borohidruro de sodio en la cinética de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato.

Se incubó la enzima (340 mU, act. esp. 9,9 U/mg de proteína) a 30° con PLP 0,025 mM, en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 10 mM, en un volumen de 0,2 ml, y se midió la actividad residual durante 5 minutos (●). A los 6 minutos se agregó lisina 2 mM (1) y se continuó midiendo la actividad (△). A otra muestra de enzima tratada con PLP a la misma concentración se agregó NaBH₄ 1 mM a los 11 minutos (2), se midió la actividad por otros 9 minutos (○), y a los 20 minutos se agregó lisina 2 mM (3) continuándose con el ensayo de actividad (▲). La actividad enzimática se midió tomando alícuotas de 0,01 ml del medio de incubación.

diálisis se trató la enzima inactivada con NaBH_4 (Tabla 6). El NaBH_4 a la concentración 1 mM probada, no afectó la actividad enzimática. Los resultados señalados apuntan claramente a que la **reacción** de inactivación de la quinasa fosfoevlaónica por PLP se produce debido a la formación de una base de Schiff entre el reactivo y uno o más grupos aminos primarios de la enzima.

Dado el hecho que no fue posible inactivar completamente la quinasa fosfoevalónica **aún** con concentraciones de PLP tan altas como 0,5 mM, ya que sobre 0,045 mM el grado de inactivación prácticamente se mantuvo constante, se hizo un ensayo adicional probando si era posible inactivar más la enzima con un segundo tratamiento con PLP. Para ello se incubó la quinasa fosfoevalónica con PLP 0,045 mM a 30° en tampón fosfato de acuerdo al método usual. Después de registrar la actividad residual durante un cierto tiempo, se agregó NaBH_4 1,4 mM y se dializó durante 3 horas contra tampón fosfato. A la enzima dializada se agregó nuevamente PLP a la misma concentración anterior y se registró la actividad enzimática por otros 30 minutos. En la figura 37 se observa que el segundo tratamiento con PLP no produjo un efecto posterior significativo sobre la enzima.

3. Efecto protector de los sustratos en la reacción de inactivación.

Se probó si el MVA-P y el Mg-ATP ejercían algún efecto protector sobre la enzima, agregando el PLP a la enzima preincubada con uno u otro sustrato, de acuerdo a como se indica en Métodos. La figura

Tabla 6. Efecto de diálisis sobre la quinasa fosfomevalónica modificada con piridoxal-5'-fosfato.

	Actividad específica (unidades/mg)	Actividad residual (%)
1. Control	4,8	100,0
2. Tratada con piridoxal-P sin diálisis	2,25	46,9
3. Tratada con piridoxal-P y diálisis	4,4	91,7
4. Tratada con piridoxal-P, NaBH ₄ y diálisis	1,9	39,6
5. Tratada con NaBH ₄ y diálisis	4,9	102,0

Se incubó la enzima (0,18 U, act. esp. 10,0 U/mg de proteína) con PLP 0,025 mM a 30° durante 30 minutos en un volumen de 1,1 ml en fosfato de potasio 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM, pH 7,5. Se dividió la muestra en dos partes, una se dializó contra tampón fosfato (3) y la otra no (2). En forma paralela se dializó: una muestra de enzima sin PLP (1), otra tratada con NaBH₄ 1 mM (5) y una tercera incubada con PLP en condiciones similares a las descritas, pero agregando NaBH₄ 1 mM después de la incubación (4).

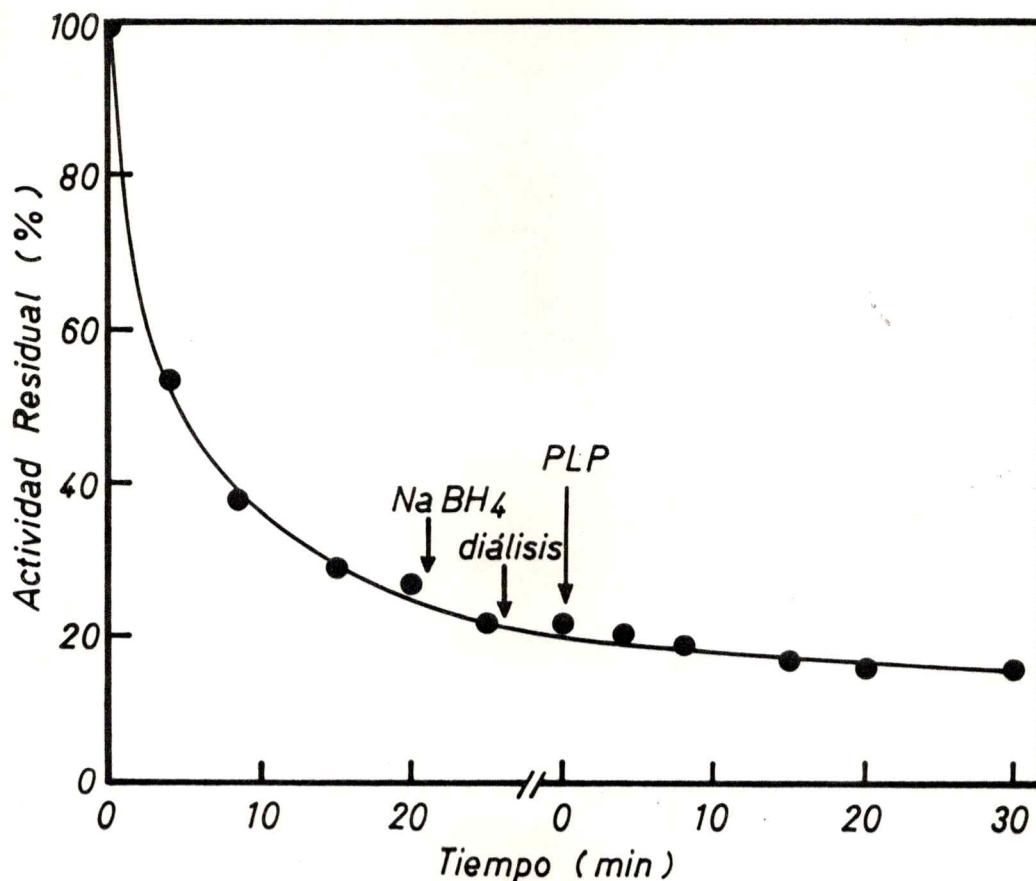


Figura 37. Tratamiento de la quinasa fosfomevalónica por dos ciclos de inactivación con piridoxal-5'-fosfato.

Se incubó la enzima a 30° (1,72 U, act. esp. 9,9 U/mg de proteína), con PLP 0,045 mM en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 10 mM, en un volumen de 1 ml. Se midió la actividad residual durante 21 minutos y luego se agregó NaBH₄ 1,4 mM, efectuándose otro registro de la actividad a los 25 minutos. La enzima se dializó enseguida contra 500 ml del tampón fosfato durante 3 horas, se midió la actividad (tiempo 0, segunda parte de la abscisa) y se agregó PLP a la misma concentración anterior, continuándose con la medición de la actividad por 30 minutos más.

38 muestra claramente que el.MVA-P a concentración 0,9 mM protegió de manera muy efectiva a la quinasa fosfomevalónica de la inactivación producida por PLP 0,024 mM, ya que la enzima conservó más del 80 % de su actividad inicial. El Mg-ATP, en cambio, a una concentración 2,4 mM no protegió a la enzima en el grado de inactivación alcanzado, aunque se observó una menor velocidad de inactivación que en ausencia de este sustrato.

4. Efecto de la concentración de piridoxal-5'-fosftao.

Se estudió la cinética de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por PLP, midiendo la velocidad de inactivación a 30^o a concentración constante de enzima en tampón fosfato 10 mM pH 7,5 conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM. Se utilizó una preparación enzimática procedente de la purificación por hidroxilapatita con una actividad específica de 9 U/mg de proteína. Las concentraciones de PLP fueron variadas entre 0,005 mM y 0,025 mM. La figura 39 muestra que la reacción presenta cinética de pseudo primer orden dependiente de la concentración de PLP. Las constantes aparentes de velocidad de primer orden se obtuvieron multiplicando por 2,3 las pendientes respectivas. La figura 40 muestra que tales constantes son proporcionales a las concentraciones de PLP en el rango de concentración empleado, indicando que la reacción obedece a una cinética de segundo orden. La constante de velocidad de segundo orden, calculada dividiendo cada constante aparente de primer orden por la concentración de PLP dio un valor de $7,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, en las condiciones del experimento.

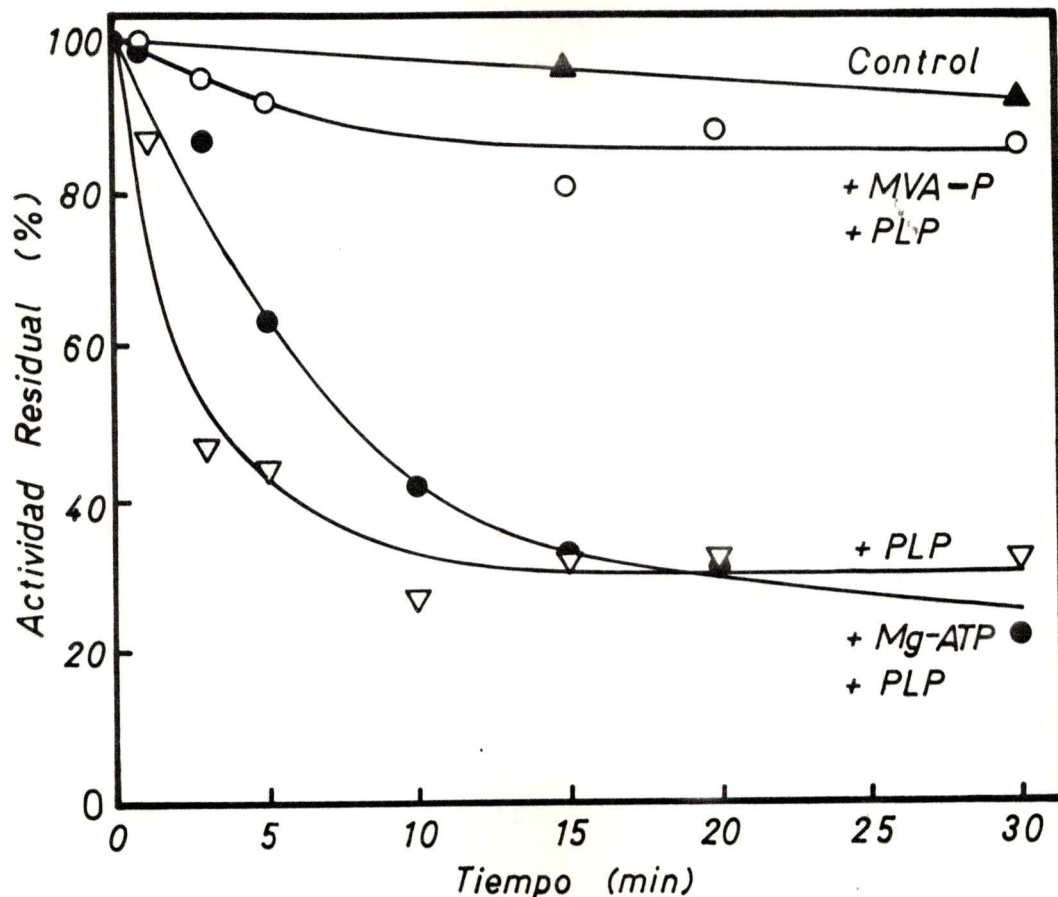


Figura 38. Efecto de los sustratos en la reacción de inactivación la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato.

Se incubó a 30° la quinasa fosfomevalónica (170 mU, act. esp. 9,9 U/mg de proteína), en presencia de MVA-P 0,9 mM o de ATP 2,4 mM + $MgCl_2$ 4,8 mM, con PLP 0,024 mM. La incubación se efectuó en un volumen de 0,1 ml en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 10 mM. A los tiempos señalados en la figura, se tomaron alícuotas de 0,01 para el ensayo de actividad de la enzima.

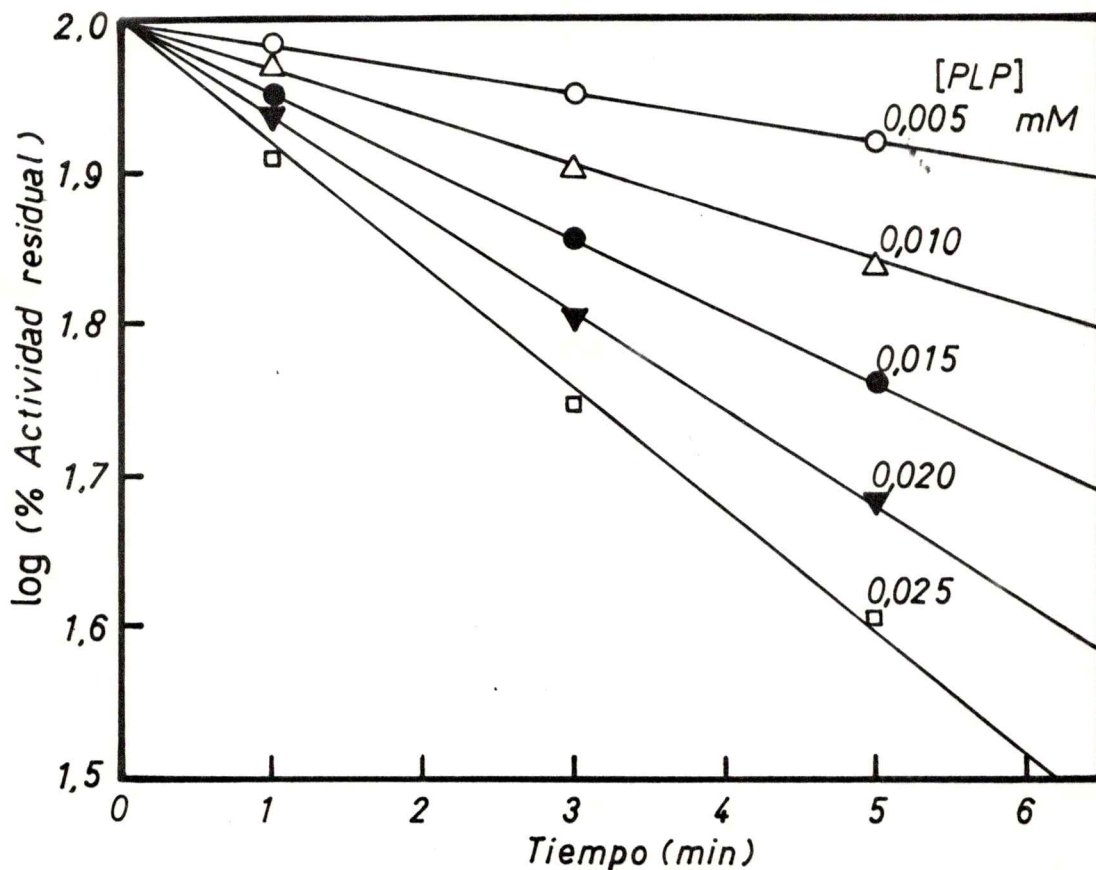


Figura 39. Efecto de la concentración de piridoxal-5'-fosfato en la cinética de inactivación de la quinasa fosfomevalónica.

La reacción se efectuó incubando la enzima (320 mU, act. esp. 3,6 U/mg de proteína) a 30° con diferentes concentraciones de PLP, en tampón fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5; 2-mercaptoetanol 10 mM, en un volumen de 0,3 ml. A tiempos apropiados se tomaron alícuotas de 0,01 ml del medio de reacción para el ensayo de actividad.

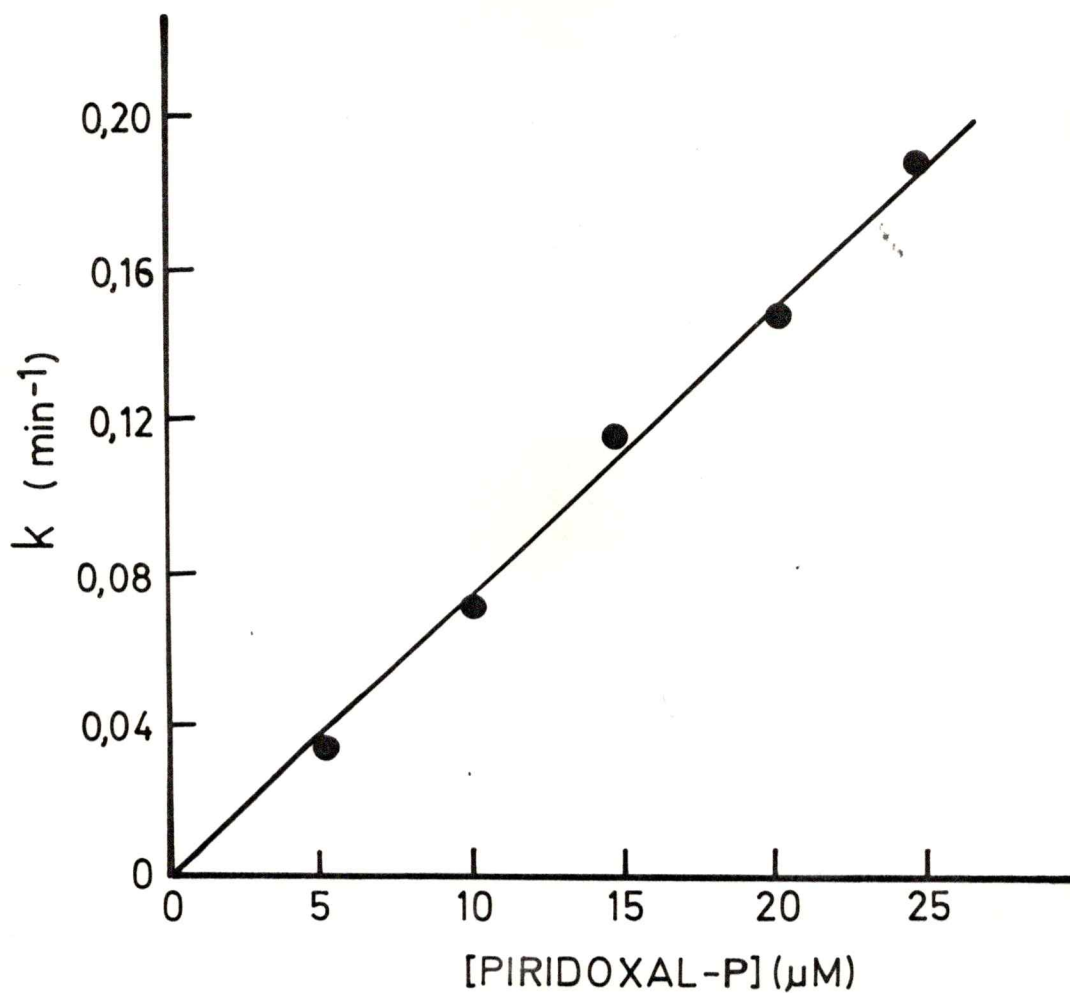
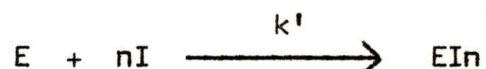


Figura 40. Relación entre las constantes de pseudo primer orden de velocidad de inactivación y las concentraciones de piridoxal-5'-fosfato.

Se utilizaron los datos de la Figura 39. Las constantes de pseudo primer orden se obtuvieron multiplicando las pendientes co rrespondientes por 2,3.

El hecho que la reacción presente cinética de segundo orden podría indicar que la inactivación de la enzima se produce debido a la reacción de un grupo amino reactivo de la enzima con una molécula de PLP.

El proceso de inactivación se puede representar por la siguiente ecuación:



en que E representa la enzima libre, I el inhibidor, n el número de moles del inhibidor, y EIn el complejo enzima-inhibidor. La velocidad de esta reacción se puede escribir de la siguiente forma:

$$v = \frac{d(E)}{dt} = k' (E) (I)^n$$

Como la concentración del inhibidor está en exceso sobre la de la enzima, se observa cinética de pseudo primer orden, y la constante de velocidad de pseudo primer orden, k, es igual a:

$$k = k' (I)^n$$

Tomando logaritmos de ambos miembros de la ecuación resulta:

$$\log k = \log k' + n \log(I)$$

Por lo tanto, el orden de la reacción se puede determinar experimentalmente de un gráfico de log de k en función del log de la concentración del inhibidor, siendo n la pendiente del gráfico, en que n es igual al número de moléculas del inhibidor que reaccionan con cada unidad activa de enzima para producir un complejo enzima-inhibidor. Este método ha sido utilizado por diversos autores para

determinar el orden de la reacción entre diversas enzimas e inhibidores (72-78).

El resultado de graficar el log de k en función del log de la concentración de PLP se muestra en la figura 41. La pendiente del gráfico resultó ser exactamente 1,0. Esto significa que cuando se produce la inactivación, sólo una molécula de PLP reacciona con una molécula de quinasa fosfomevalónica.

5. Efecto del pH en la velocidad de inactivación.

Se estudió el efecto del pH incubando una concentración constante de enzima y de PLP en una serie de tampones de Good en el rango de pH entre 6,5 y 9,5 como se describe en Métodos. El objeto de estos experimentos fue determinar el pK del grupo amino primario que reacciona con PLP. El razonamiento es que la velocidad a la cual el reactivo reacciona con tal grupo debe depender del estado de disociación del mismo. Se midió la velocidad de inactivación a 24^o y a 31^o. En la figura 42 se presenta el resultado de la inactivación realizada a 24^oC. A todos los pH la reacción siguió una cinética de pseudo primer orden. La relación entre el pH y las constantes calculadas de las pendientes correspondientes se muestran en la figura 43. Puede apreciarse que la velocidad de inactivación entre pH 6,5 y 7,0 es muy pequeña, pero sobre pH 7,5 aumenta rápidamente hasta llegar a un máximo a pH 9,0 - 9,5. En el mismo gráfico se incluyen los valores obtenidos a 31^o. La forma sigmoídea de las curvas se parece a la titulación de un grupo ionizable y se puede interpretar como la dependencia en la velocidad de

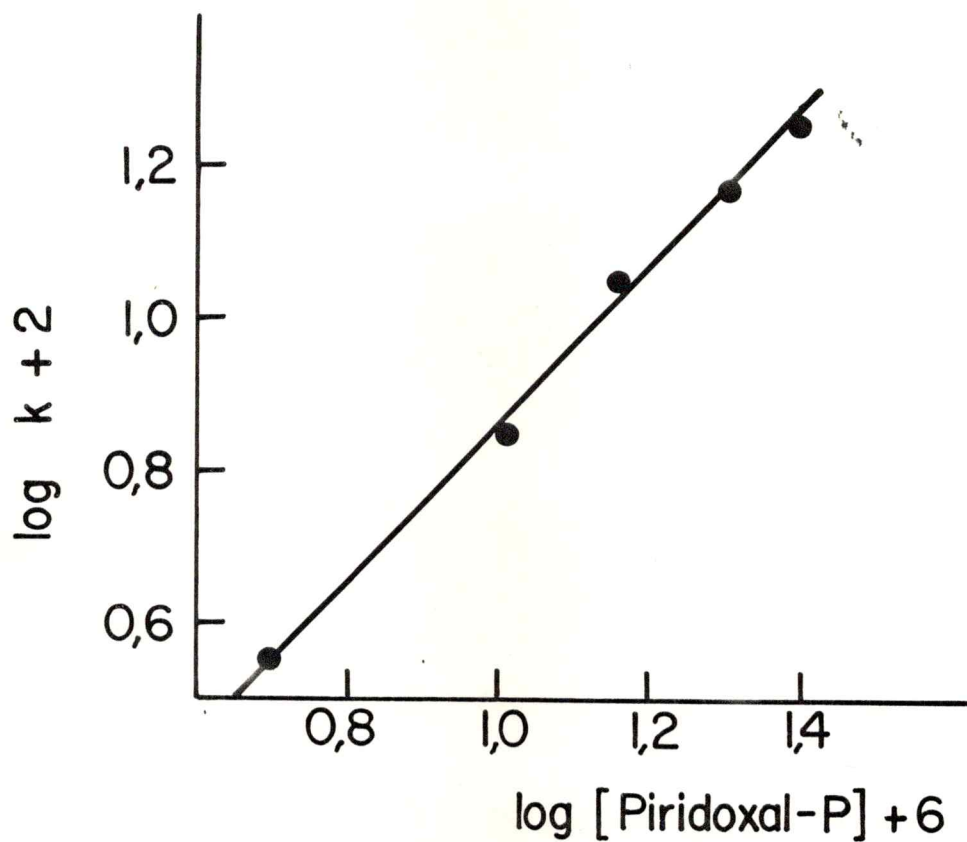


Figura 41. Determinación del orden de la reacción entre quinasa fosfomevalónica y piridoxal-5'-fosfato.

Se utilizaron los datos de las Figuras 39 y 40. La pendiente del gráfico es 1,0.

Figura 42. Efecto del pH sobre la velocidad de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal 5'-fosfato.

La reacción de inactivación se efectuó a 24^o con PLP 0.015 mM y quinasa fosfomevalónica (actividad específica 3,65 U/mg de proteína). Se utilizaron los siguientes tampones de Good 100 mM conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM; MES (pH 6,5), TES (pH 7,0-8,0), BICINE (pH 8,5-9,0) y CAPS (pH 9,5). La reacción entre pH 6,5-8,0 se efectuó incubando en un solo tubo la enzima (90 mU) y el PLP, en un volumen de 0,12 ml y tomando muestras a diferentes tiempos para el ensayo de actividad. Entre pH 8,5-9,5, el experimento se hizo incubando en diferentes tubos, muestras de enzima (40 mU) con PLP en un volumen de 0,05 ml y deteniendo la reacción a los tiempos apropiados con NaBH₄ 1 mM.

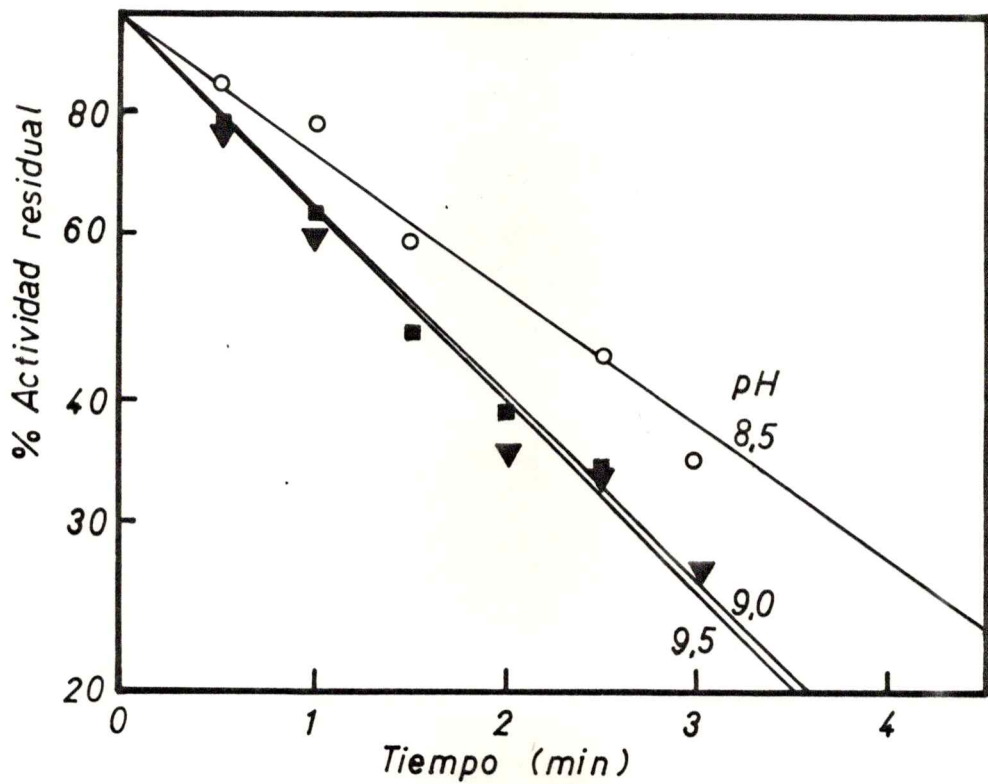
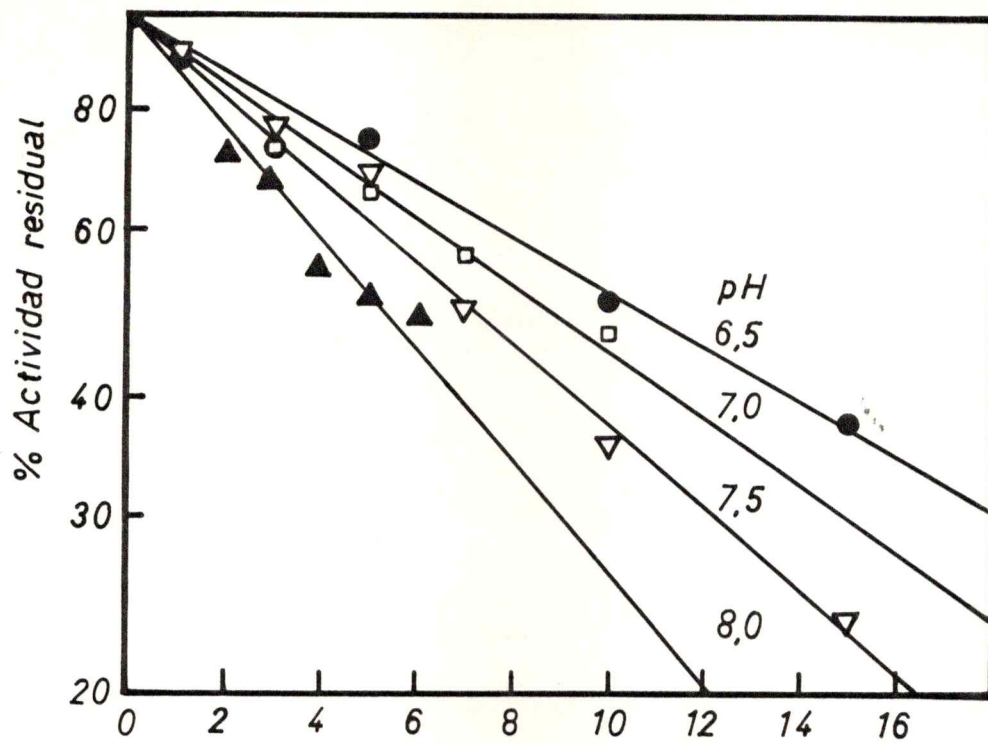


Figura 42

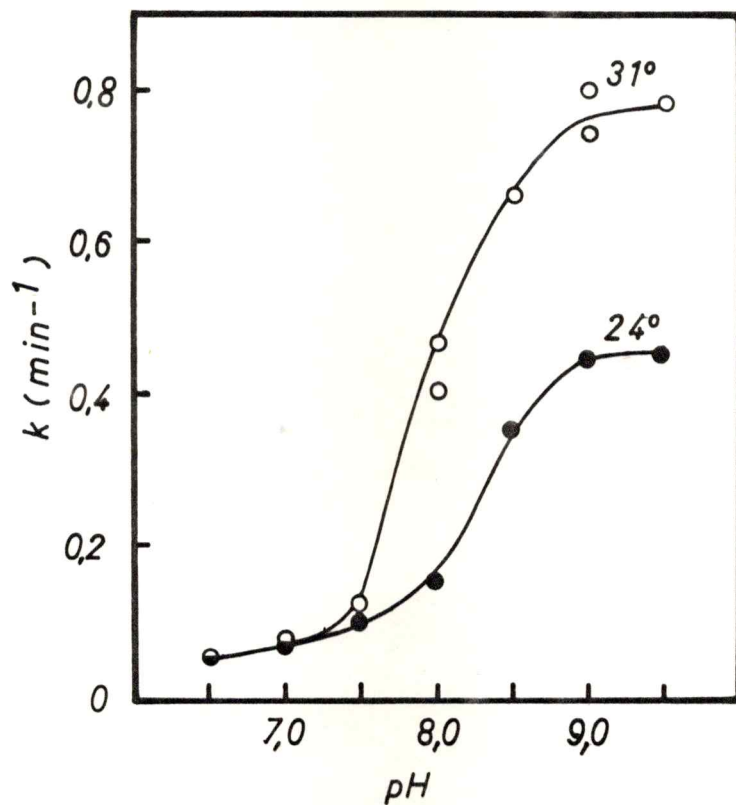


Figura 43. Relación entre el pH y las constantes de pseudo primer orden en la cinética de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por piridoxal-5'-fosfato.

Las reacciones de inactivación fueron efectuadas a 24° y a 31° en la forma descrita en la leyenda de la Figura 42. Se calcularon las constantes de velocidad de inactivación de pseudo primer orden, de las pendientes de los gráficos de log de actividad en función del tiempo.

inactivación, de la concentración de la base conjugada de ese grupo. Los valores de pK obtenidos del gráfico se estimaron en 8,25 a 24⁰ y de 7,95 a 31⁰.

6. Determinación de las Km aparentes de la quinasa fosfomevalónica modificada con piridoxal-5'-fosfato.

Se determinaron las Km aparentes para el MVA-P y el ATP en la enzima modificada con PLP, reducida con NaBH₄ y dializada, como se indica en Métodos. Como controles se utilizaron una muestra de enzima tratada con NaBH₄ y otra sin adiciones. La concentración de MVA-P se varió entre 0,02 mM y 0,125 mM, a concentración constante de ATP 2,5 mM y de Mg⁺² 5 mM. El ATP se varió entre 0,1 y 1 mM, a concentración constante de Mg⁺² 5 mM y de MVA-P 1 mM. Los resultados, analizados en un programa de computación basado en el método de Eadie-Hofstee se muestran en la tabla 7. Puede apreciarse que la Km para el MVA-P, en la enzima modificada presenta un valor de 0,021 ± 0,0086 mM, y en la enzima nativa un valor de 0,041 ± 0,0085 mM. Para el ATP, la enzima modificada dio un valor de 0,350 ± 0,079 mM, y la enzima no tratada uno de 0,503 ± 0,046 mM. De acuerdo con el rango de variación, es significativa la diferencia en valores de Km para el MVA-P, pero no para el ATP.

Estos resultados indicarían que la quinasa fosfomevalónica modificada por PLP, presenta una mayor afinidad por el MVA-P que la enzima nativa, y podrían interpretarse como que la pérdida de actividad se debe a la alteración de un paso posterior a la unión del MVA-P.

Tabla 7. Constantes cinéticas de la quinasa fosfomevalónica modificada con piridoxal-5'-fosfato.

Enzima	MVA-P		ATP	
	Km ap. (mM)	V máx. ap. (μ moles/min/ml)	Km ap. (mM)	V máx. ap. (μ moles/min/ml)
Control	0,041 \pm 0,0085	0,580 \pm 0,063	0,503 \pm 0,046	0,78 \pm 0,048
+ borohidruro	0,052 \pm 0,020	0,69 \pm 0,15	0,394 \pm 0,078	0,75 \pm 0,093
+ PLP + borohidruro	0,021 \pm 0,0086	0,14 \pm 0,021	0,350 \pm 0,079	0,16 \pm 0,022

La quinasa fosfomevalónica (0,18 U, act. esp. 10,0 U/mg de proteína), se incubó en un volumen de 1,1 ml a 300 durante 30 minutos con PLP 0,045 mM, en fosfato de potasio 10 mM, pH 7,5 conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM. Se redujo luego con NaBH₄ 1,4 mM y se dializó contra tampón fosfato. Otra muestra de enzima se trató en forma similar pero omitiendo el PLP, y una tercera se incubó sin adiciones. Se determinaron las Km aparentes para ambos sustratos de acuerdo a como se describe en Métodos. La variación de los valores indicados se refiere al rango de valores que con una probabilidad de 0,975 podría tener el parámetro respectivo.

E. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por 2,3-butanodiona.

Se utilizó 2,3-butanodiona como reactivo modificador de residuos de arginina, en tampón borato de acuerdo a Riordan (5). La quinasa fosfomevalónica se dializó contra tampón borato de sodio 60 mM pH 7,89. La enzima dializada se incubó con 2,3-butanodiona 7 mM en un volumen de 0,3 ml a 25⁰, y a tiempos adecuados se tomaron alícuotas de 0,01 ml para el ensayo inmediato de actividad. La enzima experimentó inactivación, la cual fue dependiente del tiempo y llegó hasta un 41 % de la actividad inicial en 30 minutos a la concentración indicada del reactivo. Cuando la enzima se preincubó con MVA-P 2,6 mM antes de la adición de butanodiona, la velocidad de inactivación fue claramente reducida y a los 30 minutos la enzima presentó un 85 % de la actividad inicial. La incubación de la enzima con Mg-ATP 3,7 mM redujo también la velocidad de inactivación aunque en menor grado que el MVA-P, llegando la actividad a un 58 % de la inicial a los 30 minutos. La reacción de inactivación siguió claramente cinética de pseudo primer orden. La constante de velocidad de inactivación en las condiciones señaladas y en ausencia de sustratos se estimó en 0,0296 min⁻¹; en presencia de MVA-P, en 0,0035 min⁻¹ (Fig. 44). Hasta los 30 minutos en que se efectuó la reacción de inactivación, no parece haberse alcanzado el equilibrio. No se estudió la reacción a tiempos más prolongados. La observación de cinética de pseudo primer orden durante el proceso de inactivación indica que no se producen cambios conformacionales importantes junto con la modificación. La conocida especificidad de la butanodiona para grupos guanidino, sugiere

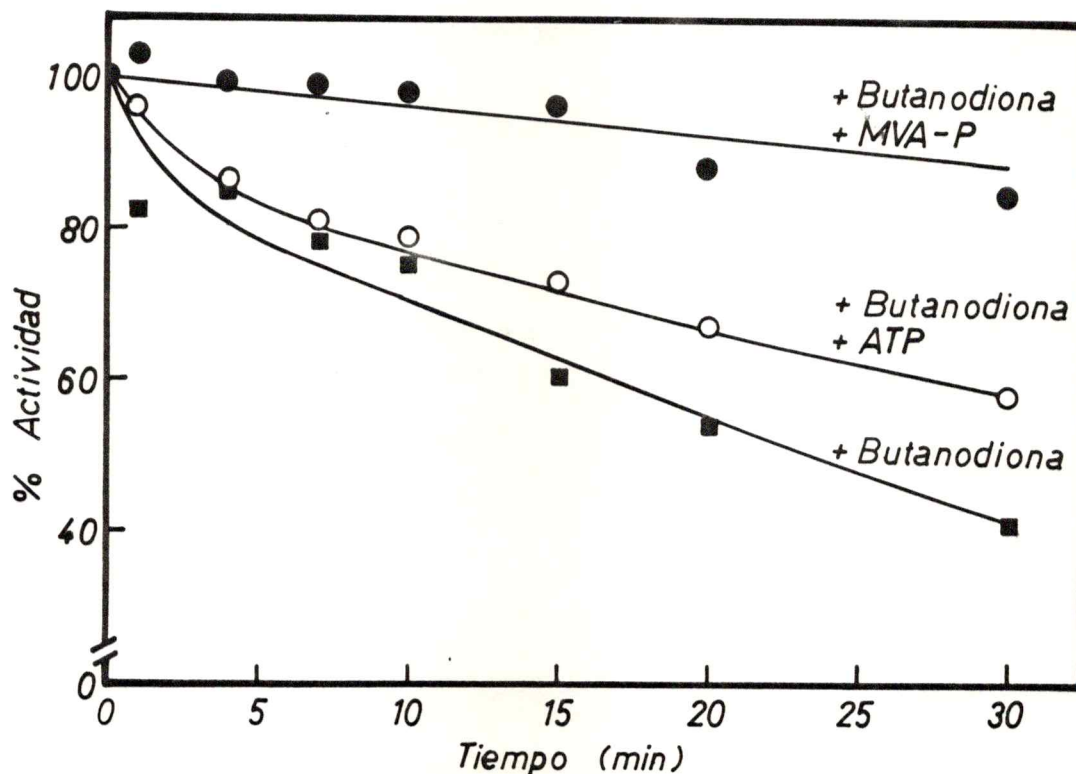


Figura 44. Inactivación de la quinasa fosfomevalónica por 2,3 butanodiona.

La enzima (150 mU, act. esp. 6,5 U/mg de proteína) se incubó a 25° con butanodiona 7 mM en tampón borato 60 mM, pH 7,89, en un volumen de 0,3 ml, en ausencia o en presencia de MVA-P 2,6 mM o de ATP 3,7 mM + MgCl₂ 7,4 mM. A los tiempos señalados en la Figura, se tomaron muestras de 0,01 ml para el en sayo de la actividad residual.

que la quinasa fosfomevalónica posee al menos 1 residuo de arginina esencial para su actividad, y que este o estos residuos podrían estar asociados preferentemente a la unión del MVA-P.

DISCUSION

La quinasa fosfomevalónica se ha encontrado en diversas fuentes tales como levadura (1, 16, 17), látex del árbol de caucho (15, 18) e hígado de rata (19) y de cerdo (2, 20). Todas las preparaciones descritas han sido muy crudas con actividades específicas que no han sobrepasado 0,3 unidades/milígramo de proteína. Tales investigaciones datan de hace más de 15 años, no habiéndose publicado trabajos posteriores sobre esta enzima. Excepción la constituye la purificación de la quinasa fosfomevalónica del árbol del caucho por Skil^leter y Keckwick en 1971 (15) quienes obtuvieron una preparación más purificada pero aún lejos de estar pura si se supone que debe tener una constante catalítica similar a la enzima de hígado de cerdo (15).

La reacción catalizada por esta enzima - fosforilación del fosfomevalonato a pirofosfomevalonato - está situada en un segmento lineal de la vía biosintética de los isoprenoides, precursores del colesterol y derivados. Pese a que no habría razón de antemano para asignarle un papel importante en mecanismos de regulación, no han faltado quienes han supuesto para esta enzima u otras situadas después de la quinasa mevalónica, un papel secundario en la regulación de la biosíntesis del colesterol (2, 14, 20). El conocimiento actual que se tiene sobre las enzimas que producen la conversión del mevalonato a colesterol es realmente insuficiente. Una de estas enzimas, la quinasa mevalónica ha sido purificada a homogeneidad por Beytía y col.

(15) quienes estudiaron sus propiedades cinéticas. El proceso global de una vía metabólica no se puede comprender bien a menos que se tenga un conocimiento suficiente de las propiedades de las enzimas participantes, De ahí entonces que sea de real interés el estudio sistemático de las enzimas que producen la síntesis del colesterol. El propósito de esta tesis ha sido obtener una preparación homogénea de la quinasa fosfomevalónica de hígado de cerdo con el objeto de efectuar el estudio de sus propiedades. Tales estudios se orientaron hacia la determinación de las condiciones óptimas de la reacción catalizada, parámetros cinéticos, peso molecular y estructura cuaternaria, además de estudios de su centro activo.

A. Purificación de la quinasa fosfomevalónica.

El método de purificación adoptado consistió en preparar un extracto soluble de hígado de cerdo, centrifugando el homogeneizado a $100.000 \times g$. Este extracto fue sometido sucesivamente a fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía en DEAE-celulosa, Bio-Gel P-150, hidroxilapatita y azul-dextrano-Sepharose. A partir de 1 kilogramo de hígado fresco de cerdo se obtuvo 1-2 mg de enzima purificada, homogéneo según criterio de electroforesis en geles de poli-acrilamida en condiciones nativas y desnaturantes.

El contenido de quinasa fosfomevalónica del extracto crudo fue variable y en las diversas preparaciones fluctuó entre 250 y 750 unidades por kilogramo de hígado. Es posible que el contenido de esta

enzima y de otras de la vía biosintética del colesterol dependa del estado nutricional o de factores genéticos de los cerdos, parámetros sobre los cuales no fue posible tener control. El rendimiento del proceso completo de purificación fue sin embargo similar, independiente del número de unidades de partida del extracto crudo y fluctuó entre 6 y 10 %.

El fraccionamiento con sulfato de amonio entre 30 y 60 % de saturación se adoptó por ser el que precipitó en forma más cuantitativa la enzima presente en el extracto crudo. Este tratamiento, sin embargo, precipita también una buena parte de quinasa mevalónica que también se encuentra en el extracto y cuyo rango óptimo de precipitación es entre 15 y 40 % de saturación de la sal (23).

En los trabajos iniciales de Popják en que se describió y purificó la quinasa fosfomevalónica aún en forma muy cruda, se utilizaba sulfato de protamina (1,5 mg/ml de extracto) para precipitar un extracto crudo obtenido homogeneizando el hígado de cerdo en una solución que contenía sacarosa 0,35 M y algunas sales. El sobrenadante obtenido de la precipitación con sulfato de protamina se fraccionaba con sulfato de amonio obteniéndose la precipitación de la quinasa fosfomevalónica entre 30 y 45 % de saturación. Esta fracción, luego de dializarla, se trataba con gel de fosfato de calcio (1,4 mg/mg de proteína), el cual adsorbía casi toda la quinasa mevalónica dejando la quinasa fosfomevalónica en el sobrenadante (2, 19). En este trabajo, en que se fraccionó directamente el extracto crudo con sulfato de amonio, el tratamiento con gel de fosfato de calcio no dio un rendimiento

satisfactorio: parte de la quinasa fosfomevalónica fue adsorbida por el gel y parte quedó en el sobrenadante. La fracción de la enzima adsorbida se pudo eluir con fosfato de potasio pH 7,5, 0,025 M pero hubo pérdida considerable de unidades de enzima, además la purificación alcanzada (alrededor de 2 veces) no compensaba tal operación, y la preparación contenía todavía una gran cantidad de actividad fosfatásica.

Se optó, en consecuencia, por tratar la fracción obtenida al precipitar el extracto crudo con sulfato de amonio entre 30 y 60 %, por una columna de DEAE-celulosa de tamaño y capacidad suficiente para ser cargada con alrededor de 50 gramos de proteína, cantidad que contenía dicha fracción. Esto significó un ahorro de tiempo por una parte, y por otra, la obtención de un producto con un grado de purificación de alrededor de 30 veces y un rendimiento del 50 - 56 % con respecto al extracto crudo de partida, además que estaba libre de fosfatasas, como lo reveló el ensayo espectrofotométrico de actividad.

El material obtenido contenía sin embargo, como contaminante, quinasa mevalónica, la cual se pudo separar completamente de la quinasa fosfomevalónica en la siguiente etapa de purificación, la filtración en Bio-Gel P-150. El producto obtenido de esta última etapa representó una purificación de 450-600 veces con una actividad especifica de 3,2-3,6 unidades/milígrano de proteína. Esta preparación resultó bastante estable ya que se pudo guardar sin pérdida de actividad durante 3 meses a 4^o. Cuando se tuvo que almacenar por períodos iguales o superiores a 60 días se prefirió guardarla en glicerol al 50 %

a -20° . La enzima en este grado de purificación se utilizó en diversos estudios en que no se requería su pureza total.

El material obtenido de la columna de Bio-Gel P-150 se trató luego por hidroxilapatita, polímero en el cual no se retuvo la quinasa fosfomevalónica pero sí otras proteínas contaminantes, con lo cual la purificación subió a 1.000 - 1.700 veces con una actividad específica de 6-9 unidades/milígramo de proteína.

La purificación final se efectuó en una columna de azul-dextrano-Sepharose. Este material se ha utilizado con éxito en la purificación de varias deshidrogenasas y quinasas que presentan lo que se ha denominado "pliegue dinucleótido". Esta estructura se sabe que forma el sitio de unión de NAD de varias deshidrogenasas (79,80) y el sitio de unión de ATP de diversas quinasas (81, 82). Las enzimas que presentan esta estructura se unen a columnas de azul-dextrano y se pueden eluir con bajas concentraciones del ligando nucleotídico. La unión a la resina se produce debido a que el cromóforo azul (Cibacron Blue F3 GA) presenta una estructura similar a la del NAD (83, 84). La columna de azul-dextrano-Sepharose logró retener la quinasas fosfomevalónica y no las proteínas que contaminaban a la enzima de la preparación de hidroxilapatita. Esta retención tiene al parecer un cierto carácter específico, por cuanto la enzima pudo ser eluida con ATP 10 mM y no por KCl de la misma fuerza iónica. No se intentó eluirla con concentraciones menores de ATP. La enzima obtenida de esta última etapa demostró estar homogénea por electroforesis en geles de

poliacrilamida.

El hecho que la quinasa fosfomevalónica se una a azul-dextrano Sepharose, estaría sugiriendo que ella como otras quinanas presenta el mencionado "pliegue dinucleotídico". Con los antecedentes disponibles, sin embargo, no se puede hacer tal aseveración. Sería necesario estudiar el grado de especificidad de la unión, probando de eluir la enzima con concentraciones menores de ATP que la 10 mM utilizada en este estudio. Estudios cinéticos, en que se pruebe el carácter competitivo del colorante con respecto al ligando nucleotídico, pueden dar información valiosa respecto a la afinidad de la unión (83, 85, 86). Una comprobación adicional de tal estructura se podría efectuar por mediciones espectrofotométricas en regiones espectrales distantes de la absorción intrínseca de la proteína cuando interactúa el colorante Cibacron Blue con la quinasa, como ha sido hecho con algunas enzimas (85). Estos datos darían información adicional sobre el sitio activo de la quinasa fosfomevalónica. Por otra parte, la poca eficiencia de unión de la enzima a una columna de ATP o ADP-Sepharose no excluye la existencia del pliegue nucleotídico en ella, ya que bien podría ocurrir que para que exista unión del nucleótido se requiera que la ribosa esté intacta: los polímeros de ATP o de ADP-Sepharose que se prepararon, se hicieron oxidando la ribosa con peryodato y haciendo reaccionar luego el nucleótido oxidado a la Sepharose con el espaciador previamente unido.

B. Propiedades físico-químicas de la quinasa fosfomevalónica.

La quinasa fosfomevalónica demostró ser una enzima de peso molecular desusadamente bajo, el cual se determinó por diversos métodos, los que dieron resultados bastante concordantes: cromatografía en Bio-Gel P-60, 22.500; gradiente de sacarosa, 22.000; electroforesis en geles de poliacrilamida, con SDS y 2-mercaptoetanol, 21.000. El bajo peso molecular de la enzima se aprovechó con ventaja en la purificación a través de Bio-Gel P-150, etapa que resultó altamente satisfactoria, y permitió separarla completamente de la quinasa mevalónica cuyo peso molecular es 90.000-98.000 (23).

La enzima presentó una gran movilidad electroforética en geles de poliacrilamida nativos al 7 %, corridos en el sistema usual en tampón Tris-glicina a pH 8,3 quedando ella muy próxima al colorante. Aumentando la concentración de acrilamida al 10-12 % se logró al mismo pH obtener una menor migración de la enzima, de modo que quedara ubicada en los geles en una zona de mejor resolución. Este comportamiento en geles nativos es compatible con el bajo peso molecular de la quinasa y con el alto porcentaje de aminoácidos ácidos (aspártico 17, glutámico, 26) que ella posee. Es posible que varios residuos de aminoácidos estén en forma de sus amidas, asparagina y glutamina, por cuanto el análisis de aminoácidos reveló una cierta cantidad de amoníaco que no fue cuantificada, pero parecería probable que muchos de ellos presenten el grupo carboxilo distal libre.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol, además de permitir la

determinación del peso molecular, reveló que la quinasa fosfomevalónica está estructurada como una sola cadena polipeptídica.

El análisis de aminoácidos de la enzima reveló que además del alto contenido de aminoácidos ácidos ya comentado, ella presenta 9 lisinas y 12 argininas por molécula de enzima. Se demostró que uno de los residuos de lisina y al menos uno de arginina son importantes para la actividad. Además, la quinasa presenta 1 residuo de metionina y uno de cisteína. La suma del número de residuos da un peso molecular de 20.803, concordante con los pesos moleculares estimados por otros métodos.

La presencia de un solo residuo de cisteína en la quinasa fosfomevalónica presenta un alto interés por ser éste al parecer, esencial para la actividad catalítica. La enzima se inactiva espontáneamente en ausencia de reactivos sulfhidrilos como 2-mercaptoetanol o ditiotreitól y ella es inhibida por DTNB, siendo la inhibición revertida por reactivos sulfhidrilos.

C. Propiedades generales de la quinasa fosfomevalónica.

El requerimiento de compuestos sulfhidrilos para la mantención de la actividad catalítica de la quinasa fosfomevalónica confirma observaciones preliminares efectuadas con la enzima de hígado de cerdo y de otras fuentes. Del mismo modo, estos estudios confirman la ventaja del ión magnesio sobre otros iones metálicos divalentes y el requerimiento absoluto de ATP en la reacción catalizada (1, 2, 15).

Se encontró que la actividad enzimática es dependiente del pH

entre 5,5 y 7,5, presentando un rango óptimo que se extiende al menos desde pH 7,5 hasta 9,5 que fue el valor más alto probado. Este resultado no concuerda con las observaciones descritas en que se publica un pH óptimo entre 7,0 y 7,3 para la enzima de hígado de cerdo (2) y de 7,0 para la quinasa de látex del árbol de caucho (15). Los resultados se parecen más al publicado para la quinasa fosfomevalónica de levadura, en que se describe no un pH óptimo sino un rango óptimo de pH que se extiende entre pH 5,5 y 10,0 (1).

La enzima presenta cinética hiperbólica para ambos sustratos, el MVA-P y el ATP. Los trazados de Lineweaver-Burk para un sustrato a diferentes concentraciones fijas del otro dan en ambos casos una familia de líneas que se cortan más arriba de la abscisa y a la izquierda de la ordenada. Este comportamiento es propio de un mecanismo secuencial para una reacción con dos sustratos en que K_{ia} , la constante de disociación para el primer sustrato es mayor que K_a , la constante de Michaelis para ese sustrato (57). Las K_m verdaderas determinadas para ambos sustratos en el ensayo efectuado a pH 7,5 en fosfato de potasio 0,1 M fueron 0,075 mM para el MVA-P y 0,46 mM para el ATP. Como en las condiciones experimentales estudiadas, la concentración del complejo Mg-ATP varió entre un 95 y un 99 %, la K_m calculada para el ATP debería corresponder o ser muy similar a la del complejo Mg-ATP, el cual es el verdadero sustrato de la enzima. La constante de disociación para el primer sustrato de la enzima resultó ser 0,11 mM. Como el valor de esta última constante es mayor que la K_m del MVA-P y menor que la del ATP, si se supone un mecanismo secuencial ordenado,

el MVA-P debería ser el primer sustrato que se une a la enzima y el Mg-ATP el segundo. Sin embargo, los datos cinéticos disponibles no permiten establecer qué clase de mecanismo secuencial cataliza la enzima.

El mecanismo de la reacción de la quinasa fosfomevalónica podría ser similar al presentado por la quinasa mevalónica, en la cual el MVA es el primer sustrato y el Mg-ATP el segundo, el MVA-P el primer producto y ADP el segundo producto (23). En el caso de la quinasa fosfomevalónica el MVA-P sería el primer sustrato pudiendo ser el MVA-PP el primer producto.

En los experimentos de inactivación de la quinasa fosfomevalónica por DTNB, por PLP y por butanodiona, se encontró que en todos los casos el MVA-P se comporta como un efectivo protector de la enzima, no así el Mg-ATP que no presenta efecto protector frente al DTNB y al PLP y protege en menor grado que el MVA-P frente a la butanodiona. Si se necesita que el MVA-P se una primeramente a la enzima para que enseguida pueda hacerlo el Mg-ATP, es explicable la falta de efecto protector de este último. Esta suposición no excluye la posibilidad que la enzima tenga dos sitios diferentes, uno para cada sustrato y que la falta de protección del Mg-ATP se deba a que los reactivos modificadores interactúan con el sitio de unión del MVA-P y no del Mg-ATP.

D. Estudios del centro activo de la quinasa fosfomevalónica.

Se consideró de interés el estudio de residuos de aminoácidos esenciales para la actividad de la quinasa fosfomevalónica como una forma de abordar la comprensión de las bases químicas del mecanismo de catálisis. Una manera de enfocar este problema es estudiar la dependencia del pH en la actividad enzimática.

Usualmente el sitio activo de las enzimas incluye residuos ionizables de aminoácidos, los cuales deben presentar una determinada forma iónica para mantener su conformación, unir los sustratos, o catalizar la reacción. Por otra parte, si los sustratos son también ionizables, ellos deben presentar una determinada forma iónica para unirse a la enzima, o ser transformados en la reacción. La representación del log de $V_{m\acute{a}x}$ o de pK_m en función del pH permite en algunos casos la identificación de residuos ionizables en el complejo ES o en la enzima libre (56, 87).

Este tipo de estudios no proporcionó información valiosa para la quinasa fosfomevalónica en las condiciones experimentales ensayadas: el gráfico log $V_{m\acute{a}x}$ en función del pH presentó un punto de inflexión a pH 6,55 con una pendiente de 0,57, y el gráfico pK_m aparente para el MVA-P, dio un quiebre positivo a pH 6,5 y uno negativo a pH 7,9, con una pendiente de 0,23, valores estimados por inspección visual de los gráficos. Para obtener información relativa a grupos ionizables de la enzima o del complejo ES se requiere que las pendientes de tales representaciones sean número enteros, los cuales

corresponden al cambio de carga que se produce en el rango de pH estudiado.

Dado que la quinasa fosfo-mevalónica cataliza una reacción entre dos sustratos, presentando ambos un pK entre 6 y 7, los resultados obtenidos pueden interpretarse como debidos a una situación compleja en que interactúan con la enzima diferentes formas iónicas de los sustratos, además que la enzima misma puede presentar diferentes estados de ionización a los diferentes pH.

La disminución de la K_m aparente para el MVA-P sobre pH 6,5 podría deberse a que este sustrato en su forma disociada presenta una mayor afinidad por la enzima que la forma no disociada. La representación de pK_m para el Mg-ATP en función del pH fue menos informativa aún y no fue posible obtener de ella ninguna conclusión relativa a grupos ionizables de la enzima.

Otra forma de abordar el estudio de residuos esenciales de aminoácidos para la actividad catalítica consiste en utilizar reactivos modificadores específicos de grupos químicos. La quinasa fosfo-mevalónica requiere la presencia de compuestos sulfhidrilos para la mantención de su actividad. Estudios previos realizados con preparaciones crudas de la enzima de hígado de cerdo señalan que la quinasa se inactiva con p-cloromercuribenzoato siendo este efecto revertido por 2,3-dimercaptopropanol o glutatión (2).

Sobre la base de estos antecedentes, se hizo un estudio de modificación de la enzima con DTNB. Este reactivo es uno de los más selectivos para grupos sulfhidrilos y ha sido extensamente utilizado en la modificación y titulación de estos grupos (49, 58-64). Se demostró que el DTNB inactiva rápidamente a la enzima, siendo la

inactivación dependiente de la concentración del reactivo, de modo que a 0,1 mM, la enzima pierde totalmente su actividad en 10 minutos. En ausencia de sustratos se demostró que el DTNB reacciona con un grupo sulfhidrilo de la quinasa fosfomevalónica produciendo su completa inactivación. La reversión de la inactivación por 2-mercaptoetanol o ditioneitol confirma que la pérdida de actividad se debe a la reacción entre DTNB y un grupo sulfhidrilo. La protección que ejerce el MVA-P sugiere que el grupo sulfhidrilo reactivo está en o en las proximidades del sitio activo, posiblemente en relación al sitio de unión del MVA-P. La falta de efecto protector del Mg-ATP estaría indicando que el grupo sulfhidrilo está en un sitio diferente del sitio de unión de este sustrato, o bien que para que el Mg-ATP se una a la enzima es necesaria la unión previa del MVA-P, como lo sugieren los resultados cinéticos discutidos más arriba.

El efecto protector de un sustrato en una reacción de inactivación no descarta, sin embargo, la posibilidad que el grupo reactivo esté en otro sitio distinto al sitio de unión de ese sustrato y la protección ejercida por él se deba a que produce un cambio conformacional en la enzima que determine que el grupo reactivo de la enzima ya no sea accesible al reactivo modificador. Sin embargo, la correlación que existe entre pérdida de actividad y formación de 2-nitro-5-mercaptobenzoato, sugiere que la reacción está ocurriendo con un grupo sulfhidrilo catalíticamente importante. No es probable que se produzca inhibición estequiométrica de la enzima si el residuo participante en la reacción tiene sólo el papel de mantener la conformación

activa de la proteína (88).

La quinasa fosfomevalónica modificada parcialmente por DTNB presenta inalteradas las K_m aparentes para los dos sustratos. Además, la constante catalítica de la enzima parcialmente inactivada con DTNB es igual a la de la enzima no modificada. Este hecho señala que la enzima modificada es totalmente inactiva y en tales circunstancias sólo son activas las moléculas de enzima no modificadas por el reactivo. La pérdida de actividad puede deberse a que el grupo modificado esté implicado en la catálisis y no en la unión de sustratos (88). Sin embargo, los datos disponibles no permiten decidir si la inactivación se debe a la alteración de la unión del MVA-P o bien a un paso posterior a la catálisis.

Otro estudio de residuos de aminoácidos esenciales para la actividad catalítica se hizo investigando la presencia de grupos aminos primarios de la enzima. Para ello se utilizó piridoxal-5'-fosfato como reactivo modificador, el cual en combinación con borohidruro de sodio se ha utilizado bastante en el último tiempo para identificar residuos de lisina reactivos. Se ha encontrado que diversas enzimas que utilizan sustratos fosforilados presentan lisina en el sitio de unión de fosfato (65-71).

En este trabajo se demuestra que el PLP inhibe a la quinasa fosfomevalónica rápidamente y a concentraciones bastante bajas del reactivo. El grado de inactivación es dependiente de la concentración de PLP, llegándose a un máximo de pérdida de actividad con un 25-30 % de actividad residual. Este resultado se obtiene incluso con concentraciones de PLP 5×10^{-4} M, representando un exceso

de 350 veces sobre la concentración de la enzima.

La inactivación producida por PLP puede ser revertida por diálisis o agregando un compuesto que presente un grupo amino primario como lisina, no siendo posible efectuar la reversión si previo a la diálisis o a la adición de lisina se agrega borohidruro de sodio. Estos resultados demuestran que la reacción de inactivación se produce debido a la formación de una base de Schiff entre el grupo aldehído del PLP y un grupo amino primario de la enzima. Uno de los sustratos, el MVA-P protege a la quinasa fosfo-mevalónica de la inactivación, sugiriendo que el grupo amino reactivo se encuentra en o en las proximidades del sitio de unión del MVA-P. La velocidad de inactivación presenta cinética de pseudo primer orden a bajas concentraciones de PLP, observándose una dependencia lineal entre las constantes de pseudo primer orden observadas y la concentración de PLP. Este resultado es característico de una reacción de segundo orden. A pH 7,5 el valor de la constante de segundo orden se estimó en $7,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Este resultado se confirmó determinando el orden de la reacción con respecto a la concentración del inhibidor graficando el logaritmo de la constante de velocidad observada en función del logaritmo de la concentración de PLP. Este método fue descrito primeramente por Levy y Ryan quienes demostraron que 3 moléculas de 2,4-dinitrofenol se unen a una molécula de miosina produciendo su inactivación (72) y ha sido posteriormente utilizado por varios autores para establecer el número de moléculas de diversos inhibidores que reaccionan con el sitio activo de enzimas (72-78). En este trabajo, tal

representación dio una pendiente de 1,0, indicando que cuando se produce la inactivación de la quinasa fosfomevalónica por PLP, una molécula del reactivo reacciona con una molécula de enzima.

Como una manera de establecer el pK del grupo reactivo de la enzima que reacciona con PLP, se estudió la dependencia de la velocidad de inactivación en función del pH. Se encontró que la velocidad de inactivación es profundamente afectada por el pH y al representar las constantes de velocidad en función del pH, el gráfico (figura 43) se parece a una curva de titulación con un pK de 8,25 a 24^o y de 7,95 a 31^o. Estos valores podrían atribuirse a un grupo ionizable del PLP o de la enzima. El PLP presenta varios grupos ionizables: fosfato (pK 2,12), grupo hidroxilo (pK 4,14) y nitrógeno aromático (pK 8,69)(90). El pK del nitrógeno aromático se aproxima al pK determinado para la reacción de inactivación pero su participación no es probable ya que su desprotonación determinaría no un aumento sino una disminución de la velocidad por la menor electrofilicidad del grupo carbonilo. Parece probable entonces que los pK encontrados correspondan a un grupo amino primario de la enzima que reacciona con PLP. Tal grupo podría ser un α amino primario o un ϵ amino de lisina. Este último ha sido demostrado que está presente en diversas enzimas que reaccionan con PLP. Si fuera un grupo ϵ amino de lisina significaría que se trata de un grupo muy reactivo. Los residuos de lisina en los péptidos presentan valores de pK de alrededor de 10. Muchas proteínas, sin embargo, tienen residuos de lisina desusadamente reactivos con pK anómalos que pueden ser tan bajos como 5,9 para la oxaloacetato descarboxilasa (91) y

de 7,7 en la deshidrogenasa glutámica (92).

El valor de pK de un grupo reactivo queda determinado por el microambiente que lo rodea. Así, un bajo pK para un grupo amino puede deberse a que el microambiente que rodea este grupo presenta cargas positivas. Por otra parte, la interacción entre grupos de carga opuesta se puede favorecer en un microambiente de baja polaridad.

La presencia de una carga positiva en las proximidades del grupo ϵ amino podría explicar la mayor eficiencia del PLP en la inactivación de la quinasa fosfovalónica en relación al piridoxal. Este hecho concuerda con observaciones recientes, en que se ha encontrado que varias enzimas que requieren de sustratos con grupos cargados negativamente como carboxilos o fosfatos presentan arginina en el centro activo (94-102). Algunas enzimas presentan en el sitio de unión de sustratos cargados negativamente tanto lisina como arginina, como la deshidrogenasa láctica (98) y fructosa -1,6-di-fosfato fosfatasa (79-99) entre otras. La fructosa -1,6-di-fosfato aldolasa presenta un residuo de lisina implicado en el sitio de unión de fosfato del carbono 6, demostrado por estudios con PLP (59), mientras que presenta un residuo de arginina que participa en la unión de fosfato del carbono 1 del sustrato, revelado por estudios de modificación con butanodiona (64).

El estudio de las K_m aparentes determinadas en la enzima modificada con PLP revelaron una K_m disminuída en aproximadamente un 50 % para el MVA-P en relación a la enzima nativa, mientras que la K_m aparente para el ATP no se modificó. Este resultado fue un

tanto inesperado por cuanto en principio podría esperarse que la afinidad de la enzima por el MVA-P disminuyera con el grupo amino bloqueado o al menos se mantuviera inalterada.

La enzima no es totalmente inactivada por PLP, aún aumentando la concentración del reactivo hasta 0,5 mM en que la actividad llega a un 25-30 % de la inicial. Por otra parte, un segundo tratamiento con PLP después de reducir la base de Schiff formada en el primer tratamiento tampoco logra una inactivación adicional. Estos hechos sugieren que el PLP produce como resultado una enzima aún activa con propiedades catalíticas alteradas. El grupo amino primario reactivo, presumiblemente de lisina, estaría ubicado en el centro activo cerca del sitio de unión del MVA-P, como lo demuestra la alteración de su Km aparente, y tal grupo no tendría un papel esencial en el proceso catalítico propiamente tal como lo demuestra el hecho que la enzima modificada siga siendo aún activa.

La mayor eficacia del PLP en relación a PL o PAP, indica que el fosfato debe interactuar específicamente con la enzima, contribuyendo la base de Schiff sólo en parte a la energía libre favorable de unión (103).

La PAP podría ocupar el sitio físico de la enzima donde se une el PLP, pudiendo producir inactivación aún sin formarse una base de Schiff. Con respecto al PL, se debe tener presente que este compuesto se encuentra en gran proporción en forma hemiacetálica a cualquier pH (104,105) mientras que el PLP es 100 % aldehído. En consecuencia, la inactivación producida por una determinada concentración de PL puede no reflejar el grado real de inactivación que

produciría la forma aldehídica del compuesto.

Es posible que la especificidad de la reacción con PLP sea atribuible a un efecto directo del grupo fosfato. Esta conclusión es apoyada fuertemente por el hecho que el MVA-P puede proteger a la enzima de la inactivación. Por otra parte, las bajas concentraciones de PLP necesarias para la inactivación, y el hecho que un solo grupo amino participe en la reacción, apoyan la sugerencia que se trata de un efecto específico, y no pérdida de actividad debido a desnaturalización por cantidad de reactivo.

La menor K_m aparente encontrada para el MVA-P en la enzima modificada, podría explicarse por el hecho que a pH 7,5, en que se hizo la determinación, el PLP presenta una carga positiva en el nitrógeno aromático cuyo pK es 8,69 (90) favoreciendo de esta manera la interacción del MVA-P negativamente cargado.

Para probar si la quinasa fosfomevalónica tiene residuos esenciales de arginina, se estudió el efecto de la incubación con butanodiona sobre la actividad. Este reactivo ha sido extensamente utilizado en los últimos años para modificar selectivamente residuos de arginina (50, 77, 78, 95-102). El reactivo se usa en condiciones relativamente suaves, de preferencia en tampón borato, y en estas condiciones la butanodiona condensa reversiblemente con los grupos aminos del grupo guanidino. El producto de condensación forma un complejo, también reversible con borato, lo cual hace que la reacción en presencia de este último sea más rápida. Al retirar el borato, el producto de condensación se disocia lentamente para regenerar el grupo guanidino (50). La quinasa fosfomevalónica

experimentó inactivación con el reactivo, y esta inactivación fue dependiente del tiempo, siguiendo la reacción cinética de pseudo primer orden. La enzima fue claramente protegida de la inactivación por MVA-P y en menor grado por Mg-ATP. Estos resultados sugieren que la quinasa fosfomevalónica posee, al menos, un residuo de arginina esencial para la actividad ubicado en el sitio activo o en sus proximidades. Este hecho confirma los resultados ya comentados obtenidos con otras enzimas que requieren de sustratos a ni ón icos.

E. Consideraciones finales.

El estudio de la quinasa fosfomevalónica de hígado de cer do se abordó fundamentalmente con el objeto de que con el conocimiento de sus propiedades se pudiera determinar en mejor forma el pa pel que esta enzima desempeña en la biosíntesis del colesterol. La enzima demostró ser una proteína de bajo peso molecular, monomérica y presenta cinética hiperbólica para sus dos sustratos. Estos datos permiten suponer que ella no debe tener un papel regu lador importante en la vía biosintética. Debe agregarse a esto que la K_m verdadera para el MVA-P determinada en esta tesis (0,075 mM) no concuerda con la K_m aparente de 0,3 mM obtenida en estudios preliminares de Hellig y Popjak (2), autores que sugirieron un posi ble papel regulador de esta enzima por la alta K_m aparente determi nada por ellos. La quinasa fosfomevalónica demostró además que su actividad no es modificada por AMP, MVA, fosfato, pirofosfato ni NH_4^+ . Estas consideraciones no excluyen la posibilidad que la enzima

tenga un papel regulador a través de la modulación de su síntesis, ya sea sola o coordinada con otras enzimas. La notable diferencia en cantidad de enzima encontrada en algunos casos en diferentes hígados, procesados todos de idéntica forma, permite suponer que el nivel de síntesis de quinasa fosfomevalónica puede estar sometido a un sistema de control, posiblemente influido por factores nutricionales, quizás por el nivel de colesterol mismo.

Independientemente del rol regulador que la quinasa fosfomevalónica pueda tener, ella presenta un interés de orden general: es una quinasa de pequeño tamaño a la cual se le ha determinado un sólo residuo de cisteína siendo éste esencial para la actividad catalítica. Además presenta un residuo de lisina al parecer en las proximidades del sitio de unión del MVA-P y posiblemente también tenga arginina en este sitio. En los últimos años se ha publicado una serie de trabajos sobre residuos importantes para la catálisis de diversas quinasas y deshidrogenasas, observándose una gran similitud entre enzimas de una misma clase.

La quinasa fosfomevalónica presenta características estructurales semejantes a otras quinasas en el centro activo. Los hallazgos hasta ahora producidos, permiten suponer la existencia de mecanismos comunes en determinadas reacciones enzimáticas. El hecho que enzimas que catalizan reacciones parecidas, presenten elementos estructurales semejantes, aparece como algo natural dentro del principio de economía molecular que caracteriza a la materia viva. En la medida en que fenómenos aislados han podido ser integrados bajo patrones comunes, el avance en el conocimiento de esos

fenómenos ha sido enormemente incrementado. Desde este punto de vista, el conocimiento de mecanismos de catálisis promete un rápido avance en un futuro próximo.

BIBLIOGRAFIA

1. K. Bloch, S. Chaykin, A. H. Phillips y A. de Waard, *J. Biol. Chem.* 234, 2595 - 2604 (1959)
2. H. Hellig y G. Popják, *J. Lipid Res.* 2, 235 - 243 (1961)
3. E. D. Beytía y J. W. Porter, *Ann. Rev. Biochem.* 45, 113 - 142 (1976)
4. P. A. Edwards y A. M. Fogelman, *Fed. Proc.* 35, 1472 (1976)
5. P. A. Edwards, G. Poják, A. M. Fogelman y J. Edmond, *J. Biol. Chem.* 252, 1057 - 1063 (1977)
6. L. W. White y H. Rudney, *Biochemistry* 2, 2725 - 2731 (1970)
7. M. Higgins y H. Rudney, *Nature, New Biol.* 246, 60 - 61 (1973)
8. V. W. Rodwell, J. L. Nordstrom y J. J. Mitschelen, *Adv. Lipid Res.* 14, 1 - 74 (1976)
9. N. L. R. Bucher, K. Mc Garrahan, E. Gould y A. V. Loud, *J. Biol. Chem.* 234, 262 - 267 (1969)
10. R. G. Gould y E. A. Swyryd, *J. Lipid Res.* 7, 698 - 707 (1966)
11. L. L. Slakey, M. C. Craig, E. Beytía, A. Briedis, D. H. Feldbruegge, R. E. Dugan, A. A. Qureshi, C. Subbarayan y J. W. Porter, *J. Biol. Chem.* 247, 3014 - 3022 (1972)
12. Shama Bhat y T. Ramasarna, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 74, 785 - 788 (1977)
13. J. K. Dorsey y J. W. Porter, *J. Biol. Chem.* 243, 4667 - 4670 (1968)
14. C. K. Ramachandran y S. N. Shah, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69, 42 - 47 (1976)
15. D. N. Skilleter y R. G. O. Kekwick, *Biochem. J.* 124, 407 - 417 (1971)
16. S. Chaykin, J. Law, A. H. Phillips, T. T. Tchen y K. Bloch, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 44, 998 - 1004 (1958)

17. U. Henning, E. M. Möslein y F. Lynen, Arch. Biochem. Biophys. 83, 259 - 267 (1959)
18. D. N. Skilleter, I. P. Williamson y R. G. O. Kelwick, Biochem. J. 98, 27p (1966)
19. H. R. Levy y G. Popják, Biochem. J. 75, 417 - 428 (1960)
20. H. C. Rilling y K. Bloch, J. Biol. Chem. 234, 1424 - 1432 (1959)
21. W. D. Loomis y J. Battaile, Biochim. Biophys. Acta 67, 54 - 63 (1963)
22. P. Valenzuela, E. Beytía, O. Cori y A. Yudelevich, Arch. Biochem. Biophys. 113, 536 - 539 (1966)
23. E. Beytía, J. K. Dorsey, J. Marr, W. W. Cleland y J. W. Porter, J. Biol. Chem. 245, 5450 - 5458 (1970)
24. C. D. Foote y F. Wold, Biochemistry 2, 1254 - 1258 (1963)
25. R. E. Dugan, E. Rasson y J. W. Porter, Anal. Biochem. 22, 249 - 259 (1968)
26. H. Rosenberg, J. Chromatogr. 2, 487 - 489 (1959)
27. T. R. Green y D. J. Baisted, Anal. Biochem. 38, 130 - 138 (1970)
28. E. J. King, Biochem. J. 26, 292 - 297 (1932)
29. T. T. Tchen, Methods in Enzimology (S. P. Colowick y N. O. Kaplan, editores), Vol V, 489 - 499, Academic Press, New York 1962
30. B. L. Horecker y A. Kornberg, J. Biol. Chem. 175, 385 - 390 (1948)
31. O. H. Lowry, J. V. Passenneau y M. K. Pock, J. Biol. Chem. 236, 2756 - 2759 (1961)
32. A. B. Gornall, C. J. Bradawill y M. M. David, J. Biol. Chem. 177, 751 - 760 (1949)
33. A. Bensadoun y D. Weinstein, Anal. Biochem. 70, 241 - 250 (1976)
34. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall, J. Biol. Chem. 193, 265 - 276 (1951)

35. Advanced ion exchange celluloses. Folleto Whatman IL 2
36. Chromatography, Electrophoresis and Membrane Filtration. Catálogo Bio Rad Laboratories, Abril 1976
37. L. D. Ryan y C. S. Vestling, Arch. Biochem. Biophys. 160, 279 - 284 (1974)
38. S. C. March, I. Parik y P. Cuatrecasas, Anal. Biochem. 60, 149 - 152 (1974)
39. D. Gabriel, Methods in Enzymology (S. P. Colowick y N. O. Kaplan, editores), Vol. XXII, 565 - 578, Academic Press, New York 1971
40. P. Andrews, Biochem. J. 91, 222 - 232 (1964)
41. P. Andrews, Biochem. J. 96, 595 - 606 (1965)
42. Catálogo Worthington Biochemical Co., Freehold, New Jersey, 1971
43. T. Blundell, G. Dodson, D. Hodgkin y D. Mercola, Advances in Protein Chemistry (C. B. Anfinsen, J. T. Edsall y F. M. Richards, editores), Vol. 26, 279 - 402, Academic Press, New York 1972
44. U. K. Laemmli, Nature 227, 680 - 685 (1970)
45. P. Valenzuela, F. Weiberg, G. Bell y W. Rutter, J. Biol. Chem. 25, 1464 - 1470 (1976)
46. F. J. Castellino y R. Barker, Biochemistry 7, 2207 - 2217 (1968)
47. N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa y R. M. M. Singh, Biochemistry 5, 467 - 477 (1966)
48. K. M. Plowman y A. R. Krall, Biochemistry 4, 2809 - 2814 (1965)
49. G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 - 77 (1959)
50. J. F. Riordan, Biochemistry 12, 3915 - 3923 (1973)
51. H. Edelhoch, Biochemistry 6, 1948 - 1954 (1967)
52. R. Lamed, Y. Levin, y M. Wilchek, Biochim. Biophys. Acta 304, 231 - 235 (1973)

53. P. Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245, 3059 - 3065 (1970)
54. D. Failla y D. V. Santi, Anal. Biochem. 52, 363 - 368 (1973)
55. A. Hirotochi Nishikawa y P. Bailon, Arch. Biochem. Biophys. 168, 576 - 584 (1975)
56. M. Dixon, Biochemistry 55, 161 - 170 (1953)
57. W. W. Cleland, Biochim. Biophys. Acta. 67, 104 - 137 (1963)
58. J. Sedlak y R. H. Lindsay, Anal. Biochem. 25, 192 - 205 (1968)
59. R. F. Colman, Biochemistry 8, 888 - 898 (1969)
60. R. G. Kemp y P. B. Foret, Biochemistry 7, 2596 - 2603 (1968)
61. K. Mizuta y M. Tokushiga, Biochim. Biophys. Acta 403, 221 - 231 (1975)
62. B. Gomes, H. G. Kloefer, S. OI, K. T. Yasunobu, Biochim. Biophys. Acta 438, 347 - 357 (1976)
63. H. M. S. Bittencourt y H. Chaimovich, Biochim. Biophys. Acta 438, 153 - 158 (1976)
64. T. Nagaoka, A. Hachimori, A. Takeda y T. Samejina, J. Biochem. 81, 71 - 78 (1977)
65. M. Rippa, L. Spanio y S. Pontremoli, Arch. Biochem. Biophys. 118, 48 - 57 (1967)
66. S. Shapiro, M. Enser, E. Pugh y B. L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys. 128, 554 - 562 (1968)
67. K. D. Schnackerz y E. A. Noltmann, Biochemistry 10, 4837 - 4843 (1971)
68. G. E. Means y R. E. Feeney, J. Biol. Chem. 246, 5532 - 5533 (1971)
69. P. Greenwell, S. L. Jewett y G. R. Stark, J. Biol. Chem. 248, 5994 - 6001 (1973)
70. G. Colombo y F. Marcus, Biochemistry 13, 3085 - 3091 (1974)
71. M. Anai, C. Y. Lai y B. L. Horecker, Arch. Biochem. Biophys. 156, 712 - 719 (1973)

72. H. M. Levy, P. D. Leber y E. M. Ryan, J. Biol. Chem. 238, 3654 - 3659 (1963)
73. M. C. Scrutton y M. F. Uter, J. Biol. Chem. 240, 3714 - 3723 (1965)
74. J. B. Edwards y D. B. Keech, Biochim, Biophys. Acta 146, 576 - 583 (1967)
75. D. B. Keech y R. K. Farrant, Biochim, Biophys. Acta. 151, 493 - 503 (1968)
76. P. F. Hollenberg, M. Flashner y M. J. Coon, J. Biol. Chem. 246, 946 - 953 (1971)
77. T. Hjelmgreen, L. Strid y L. Arvidsson, FEBS Letters 68, 137 - 140 (1976)
78. F. Marcus, S. M. Schuster y H. A. Lardy, J. Biol. Chem. 251, 1775 - 1780 (1976)
79. M. J. Adams, A. Mc Pherson, M. G. Rossman, R. W. Schevitz y A. J. Wonacott, J. Mol. Biol. 51, 31 - 38 (1970)
80. E. Hill, D. Tsernoglou, L. Webb y L. J. Banaszak, J. Mol. Biol. 72, 577 - 591 (1972)
81. G. E. Schulz, M. Elzinga, F. Marx y R. H. Schirmer, Nature 250, 120 - 123 (1974)
82. T. N. Bryant, H. C. Watson y P. L. Wendell, Nature 247, 14 - 17 (1974)
83. S. T. Thompson, K. H. Cass y E. Stellwagen, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 72, 669 - 672 (1975)
84. J. E. Wilson, Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 816 - 823 (1976)
85. S. T. Thompson y E. Stellwagen, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 73, 361 - 365 (1976)
86. R. Kobayashi y V. S. Fang, Biochem. Biophys. Res. Comm. 69, 1080 - 1087 (1976)
87. K. J. Laidler, Trans. Faraday Soc. 51, 550 - 561 (1955)
88. T. A. Mahowald, E. A. Noltmann y S. A. Kuby, J. Biol. Chem. 237, 1535 - 1548 (1962)
89. J. R. Knowles, Biochem. J. 95, 180 - 190 (1965)

90. D. Piszkiwicz y E. L. Smith, *Biochemistry* 10, 4544 - 4552 (1971)
91. D. E. Schmidt y F. H. Westheimer, *Biochemistry* 10, 1249 - 1253 (1971)
92. F. M. Veronesa, D. Piszkiwicz y E. L. Smith, *J. Biol. Chem.* 247, 754 - 759 (1972)
93. L. A. Cohen, *The Enzymes* (P. Boyer, editor), Vol. I, 3a. edición, 147 - 211, Academic Press, New York (1970)
94. M. M. Werber, M. Moldovar y M. Sokolovsky, *Eur. J. Biochem.* 53, 207 - 216 (1975)
95. R. R. Lobb, A. M. Stokes, H. A. O. Hill, y J. F. Riordan, *FEBS Letters* 54, 70 - 72 (1975)
96. C. L. Borders, Jr., J. F. Riordan y D. S. Auld, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 66, 490 - 495 (1975)
97. L. G. Lange III, J. F. Riordan y B. L. Valle, *Biochemistry* 13, 4361 - 4370 (1974)
98. P. C. Yang y G. W. Schwertz, *Biochemistry* 11, 2218 - 2224 (1972)
99. F. Marcus, *Biochemistry* 15, 3505 - 3509 (1976)
100. C. L. Borders y J. F. Riordan, *Biochemistry* 14, 4699 - 4704 (1975)
101. J. F. Riordan y R. Scandurra, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 66, 417 - 424 (1975)
102. J. J. H. M. de Pont, B. M. Schoot, A. Vanprooijen-VanEeden y S. L. Benting, *Biochim. Biophys. Acta* 482, 213 - 227 (1977)
103. D. S. Sigman y G. Mooser, *Ann. Rev. Biochem.* 44, 889 - 931 (1975)
104. D. E. Metzler y E. E. Shell, *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 2431 - 2437 (1955)
105. K. Nakamoto y A. E. Martell, *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 5863 - 5869 (1959)