

30C-B
C266d
C. A.

DESCARBOXILASA PIROFOSFOMEVALONICA

Purificación y propiedades de la enzima de hígado de pollo
y papel de la enzima de hígado de rata en la regulación de
la biosíntesis del colesterol

Tesis 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 Básicas y Farmacéuticas

por

EMILIO CARDEMIL URZUA

Diciembre, 1982

Patrocinante: DR. JAIME EYZAGUIRRE PHILLIPI

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

EMILIO CARDEMIL URZUA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 19 de Noviembre de 1982.

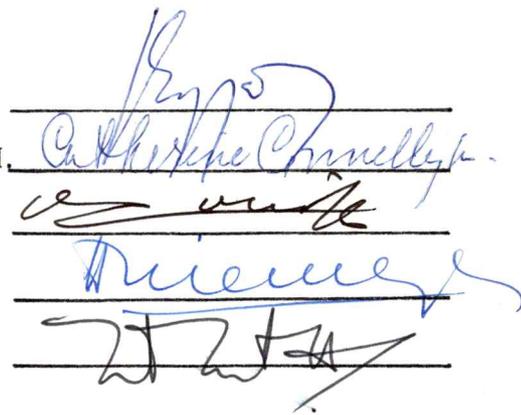
Patrocinante de Tesis : Dr. Jaime Eyzaguirre P.

Comisión de Tesis : Dra. Catherine Connelly M.

Dr. Osvaldo Cori M.

Dr. Hermann Niemeyer F.

Dr. Tito Ureta A.


The image shows four horizontal lines, each with a handwritten signature in blue ink above it. The signatures correspond to the names listed on the left: Jaime Eyzaguirre P., Catherine Connelly M., Osvaldo Cori M., and Hermann Niemeyer F. The signature of Tito Ureta A. is not clearly visible above a line.

Esta tesis fue realizada en la Unidad de Bioquímica,
Facultad de Medicina División Occidente, Universidad de Chile y en
el Departamento de Química, Facultad de Ciencia, Universidad de
Santiago de Chile, bajo el patrocinio del Dr. Jaime Eyzaguirre.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a Jaime Eyzáguirre, Ph.D., por el interés y generosidad con que aceptó patrocinar esta tesis y por su constante estímulo, crítica y ayuda durante su desarrollo; a Ana María Jabalquinto, por su participación en el trabajo intelectual y de laboratorio que aquí se describe; a Marysol Alvear, por su entusiasta colaboración en parte del desarrollo experimental y a Antonieta Valenzuela por su valiosa donación del azul de dextrano-sepharose. También agradezco a los colegas del laboratorio de Bioquímica de la Universidad Católica por la hospitalidad brindada al autor durante la realización de algunos experimentos.

Esta tesis fue financiada a través de subsidios de investigación otorgados por el Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional de la Universidad de Chile. (Proyectos B-402-797, B-402-802 y B-402-823F) y de la Dirección de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Santiago de Chile (Proyecto 28-03-1-1).

Emilio Cardemil Urzúa

Santiago, Diciembre de 1982.

A Maricarmen

A María Belén

A Javier

INDICE

	Pág.
LISTA DE TABLAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVII
ABREVIATURAS	XX
RESUMEN	XXII
ABSTRACT	XXVI
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	16
2.1. Materiales biológicos	16
2.1.1. Roedores	16
2.1.2. Hígados de cerdo	16
2.1.3. Hígados de pollo	16
2.2. Reactivos químicos y materiales cromatográficos	16
2.3. Preparación del mevalonato-5-pirofosfato	18
2.3.1. Preparación de las quinasa mevalónica y fosfomevalónica	18
2.3.2. Síntesis enzimática de [3- ¹⁴ C] mevalonato-5-pirofosfato	20
2.3.3. Purificación del mevalonato-5-pirofosfato	21
2.3.4. Identificación y pureza del mevalonato-5-pirofosfato	24

	Pág.
2.3.4.1. Cromatografía en papel e identificación mediante cómputo de radiactividad.....	24
2.3.4.2. Cromatografía en papel e identificación por reve- lado de fosfatos orgáni- nicos.....	24
2.3.4.3. Análisis del contenido de fósforo.....	26
2.3.4.4. Análisis de nucleótidos contaminantes.....	26
2.3.4.5. Análisis del mevalonato- 5-fosfato.....	26
2.3.4.6. Medición de la concentra- ción del mevalonato-5-pi- rofosfato.....	26
2.4. Ensayos enzimáticos.....	27
2.4.1. Ensayo espectrofotométrico de las quinasa mevalónica y fosfomevaló- nica de hígado de cerdo.....	27
2.4.2. Ensayo radiactivo de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica de hí- gado de rata.....	28
2.4.3. Ensayo espectrofotométrico de la descarboxilasa pirofosfomevalóni- ca de hígado de pollo.....	30

	Pág.
2.4.4. Ensayo radiactivo de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo.....	32
2.4.5. Ensayo radiactivo de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata	34
2.5. Determinación de proteínas.....	34
2.6. Medición de radiactividad	35
2.7. Estudios con ratas	35
2.7.1. Preparación de homogenizados de hígado de rata	36
2.7.2. Determinación de la glucosa sanguínea.....	36
2.7.3. Efecto de la diabetes en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.....	36
2.7.4. Efecto de la alimentación con dietas conteniendo 2% de colesterol o 3% de colestiramina en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica	37
2.7.5. Efecto del ayuno en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.....	37
2.7.6. Relación entre el sexo del animal y la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata	38

	Pág.
2.8. Análisis estadístico de los datos	38
2.9. Preparación de materiales para <u>cróma</u> tografía	38
2.10. Electroforesis en geles de poliacri- lamida	39
2.10.1. En condiciones no desnaturan <u>tes</u>	39
2.10.2. En condiciones desnaturantes.....	40
2.11. Determinación del peso molecular de la descarboxilasa pirofosfomevalóni <u>ca</u> de hígado de pollo	41
2.11.1. Por filtración en gel	41
2.11.2. Por gradiente de sacarosa	42
2.11.3. Por electroforesis en geles de poliacrilamida en presen <u>cia</u> de dodecilsulfato de sodio	43
2.12. Determinación del punto isoeléctrico de la descarboxilasa pirofosfomevaló <u>nica</u>	43
2.13. Determinación de parámetros cinéticos	44
2.14. Efecto de metales bivalentes	45
2.15. Efecto del pH sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica	45
2.16. Estabilidad de la descarboxilasa piro <u>fosfomevalónica</u> de hígado de pollo en función del pH	45
2.17. Inhibición de la descarboxilasa piro- fosfomevalónica de hígado de pollo por citrato, fosfato y ftalato.....	46

2.18. Efecto de compuestos sulfhidrilos sobre la estabilidad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo	46
2.19. Especificidad de nucleótido de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo.....	46
2.20. Modificación química de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo con fenilglioxal	47
2.20.1. Reacción de inactivación	
2.20.2. Efecto protector de los sustratos	47
2.20.3. Km aparentes para la enzima modificada	48
 3. RESULTADOS	
3.1. Efecto de la diabetes, diversas dietas y sexo del animal en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata	49
3.1.1. Efecto de la diabetes	49
3.1.2. Efecto de la alimentación con dietas conteniendo 2% de colesterol o 3% de colestiramina	51
3.1.3. Efecto del ayuno	54
3.1.4. Actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en homogeneizados de hígados de ratas hembras y machos	57

	Pág.
3.2. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo	59
3.2.1. Experimentos preliminares	59
3.2.2. Método de purificación adoptado	61
3.2.2.1. Preparación del <u>extra</u> cto crudo	61
3.2.2.2. Fraccionamiento con <u>su</u> lfato de amonio	62
3.2.2.3. Cromatografía en DEAE-celulosa	62
3.2.2.4. Cromatografía en Sephadex G-200	64
3.2.2.5. Cromatografía en fosfo-celulosa	66
3.2.2.6. Cromatografía en hidroxilapatita	68
3.2.2.7. Cromatografía en azul de dextrano-Sepharose	70
3.2.3. Estimación de la pureza de la enzima	73
3.2.4. Contenido de descarboxilasa <u>pi</u> rofosfomevalónica en el <u>extra</u> cto crudo	73
3.3. Propiedades de la descarboxilasa <u>piro</u> fosfomevalónica de hígado de pollo	77
3.3.1. Determinación del peso molecular	77
3.3.1.1. Cromatografía en Sephadex G-200	77

	Pág.
3.3.1.2. Gradiente de sacarosa.....	80
3.3.1.3. Electroforesis en ge- les de poliacrilamida en presencia de dode- cilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol.....	80
3.3.2. Efecto de compuestos sulfhidrilos sobre la actividad y estabilidad de la enzima.....	83
3.3.3. Estabilidad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	83
3.3.4. Requerimiento de metales y nucleó- tidos.....	85
3.3.5. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de la enzima.....	89
3.3.6. Efecto del pH y efecto inhibitorio del citrato sobre la actividad de la enzima.....	89
3.3.7. Estabilidad de la enzima en fun- ción del pH.....	92
3.3.8. Determinación del punto isoeléctrico de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	94
3.3.9. Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_m de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	94
3.4. Inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo con fenilglioxal.....	98

	Pág.
3.4.1. Reacción de inactivación	99
3.4.2. Efecto protector de los <u>sus</u> tratos en la reacción de <u>inac</u> tivación	104
3.4.3. Efecto de la concentración del ATP en la velocidad de <u>inac</u> tivación de la descarboxilasa <u>pi</u> rofosfomevalónica por <u>fenilglio</u> xal	106
3.4.4. Efecto de la concentración del MVA-PP en la velocidad de <u>inac</u> tivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por <u>fenil</u> glioxal	110
3.4.5. Determinación de las <u>Km</u> y <u>Vm</u> <u>apa</u> rentes de la descarboxilasa <u>piro</u> fosfomevalónica modificada con <u>fenilglioxal</u>	114
 4. DISCUSION	
4.1. Importancia de la descarboxilasa <u>pirofos</u> fomevalónica de hígado de rata en la <u>re</u> gulación de la biosíntesis del colesterol	118
4.2. Purificación y propiedades de la <u>descarbo</u> xilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo	123
4.2.1. Purificación de la enzima de <u>híga</u> do de pollo	125
4.2.2. Propiedades físico-químicas de la enzima	128

	Pág.
4.2.3. Propiedades generales de la enzima	129
4.2.4. Modificación química con fe nilglioxal	135
4.3. Conclusiones finales y proyecciones	139
5. APENDICE	142
6. BIBLIOGRAFIA	146

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Algunas propiedades de la descarboxilasa pirofosfomevalónica proveniente de diferentes fuentes.....	15
Tabla 2. Niveles de glucosa plasmática en ratas controles y diabéticas.....	50
Tabla 3. Efecto de la diabetes en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.....	52
Tabla 4. Efecto de la alimentación con dietas conteniendo colesterol o colestiramina en las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.....	53
Tabla 5. Efecto del ayuno en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.....	55
Tabla 6. Influencia del sexo de los animales en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.....	58
Tabla 7. Actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en función del pH empleado para precipitar proteínas del sobrenadante proveniente del tratamiento con sulfato de protamina.....	60
Tabla 8. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo.....	72

	Pág.
Tabla 9. Porcentaje del total de las proteínas de homogeneizados de hígado de pollo representados por algunas enzimas de la biosíntesis del colesterol.....	78
Tabla 10. Efecto del 2-mercaptoetanol sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	84
Tabla 11. Efecto de diversos cationes bivalentes sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	86
Tabla 12. Efecto de GTP, UTP y CTP en la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	88
Tabla 13. Constantes cinéticas obtenidas a partir de los experimentos de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica con fenilglioxal.....	113
Tabla 14. Km y Vm aparentes para el MVA-PP y el ATP de la enzima modificada con fenilglioxal.....	117
Tabla 15. Variación coordinada de las enzimas que catalizan etapas desde acetil-CoA a escualeno en hígado de rata.....	121

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Relación biogenética de algunos isoprenoides con el ácido mevalónico.....	2
Fig. 2. Etapas de la biosíntesis del colesterol desde acetil-CoA a escualeno.....	3
Fig. 3. Posibles mecanismos de descarboxilación del mevalonato-5-pirofosfato.....	12
Fig. 4. Cromatografía en papel de los productos de la fosforilación enzimática del [3- ¹⁴ C] MVA.....	22
Fig. 5. Determinación de la pureza radioquímica del [3- ¹⁴ C] MVA-PP, utilizando cromatografía en papel..	25
Fig. 6. Análisis radiactivo de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica de hígado de rata.....	29
Fig. 7. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en DEAE-celulosa.....	63
Fig. 8. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por filtración en Sephadex G-200.....	65
Fig. 9. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en fosfocelulosa.....	67
Fig. 10. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en hidroxilapatita.....	69
Fig. 11. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en azul de dextrano-Sepharose.....	71

Fig. 12.	Trazado densitométrico de gel de poliacrilamida de la descarboxilasa pirofosfomevalónica y actividad enzimática asociada.....	74
Fig. 13.	Trazado densitométrico de un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes de la descarboxilasa pirofosfomevalónica purificada en azul de dextrano-Sepharose.....	76
Fig. 14.	Determinación del peso molecular de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-200	79
Fig. 15.	Determinación del peso molecular de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en gradiente de sacarosa.....	81
Fig. 16.	Determinación del peso molecular de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.....	82
Fig. 17	Efecto de la concentración del ión magnesio en la reacción catalizada por la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	87
Fig. 18.	Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	90
Fig. 19.	Efecto del pH y efecto inhibitorio del citrato sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.	91

	Pág.
Fig. 20. Estabilidad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en función del pH.....	93
Fig. 21. Determinación del punto isoeléctrico de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	95
Fig. 22. Efecto de la concentración del ATP a diferentes concentraciones fijas de MVA-PP sobre la velocidad inicial de la reacción de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	96
Fig. 23. Gráficos secundarios utilizados para la obtención de los parámetros cinéticos de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	97
Fig. 24. Efecto de la concentración del fenilglioxal en la cinética de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	100
Fig. 25. Relación entre las constantes de pseudo-primer orden de velocidad de inactivación y las concentraciones de fenilglioxal.....	101
Fig. 26. Determinación del orden de la reacción entre la descarboxilasa pirofosfomevalónica y fenilglioxal..	
Fig. 27. Efecto de los sustratos y Mg^{+2} en la velocidad de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioxal.....	105

Fig. 28.	Efecto de la concentración de ATP en la velocidad de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioxal.....	107
Fig. 29.	Protección por sustratos de la inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioxal.....	108
Fig. 30.	Efecto protector del ATP en la inactivación con fenilglioxal de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	109
Fig. 31.	Efecto de la concentración del MVA-PP en la velocidad de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioxal.....	111
Fig. 32.	Efecto protector del MVA-PP en la inactivación con fenilglioxal de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.....	112
Fig. 33.	Gráficos de Hanes para la obtención de los parámetros cinéticos de la descarboxilasa pirofosfomevalónica con fenilglioxal.....	115

ABREVIATURAS

Bisacrilamida	: N,N'-metilen-bisacrilamida
CoA	: Coenzima A
DMAPP	: Dimetilalil pirofosfato
DEAE	: dietil aminoetil
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
FPP	: farnesil pirofosfato
GGPP	: geranil-geranil pirofosfato
GPP	: geranil pirofosfato
HMG-CoA	: β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA
IpOH	: isopentenol
IpPP	: isopentenilpirofosfato
LDH	: deshidrogenasa láctica
MVA	: ácido mevalónico
MVA-P	: ácido fosfomevalónico
MVA-PP	: ácido pirofosfomevalónico
MES	: ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico
PEP	: ácido fosfoenol pirúvico
Pi	: ortofosfato inorgánico
PPO	: 2,5-difeniloxazol
POPOP	: 1,4-bis-[2-(5-feniloxazolil)]-benceno
PK	: quinasa pirúvica
SDS	: dodecilsulfato de sodio
TCA	: ácido tricloroacético

TEA : trietanolamina
TEMED : tetrametilendiamina
Tris : Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

En esta tesis se ha realizado un estudio de la descarboxilasa pirofosfomevalónica (ATP: 5-difosfomevalonato carboxiliasa (deshidratante) EC 4.1.1.33), que tuvo dos objetivos. El primero fue aclarar su papel como enzima regulatoria secundaria en la biosíntesis del colesterol en hígado de rata, propuesto hacia fines de la década pasada, y el segundo obtener una preparación estable y altamente purificada de la enzima, con la que pudieran realizarse estudios sobre su estructura y mecanismo de acción.

El primer objetivo se logró midiendo la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en homogeneizados de hígado de ratas sometidas a condiciones experimentales en las que se sabe ocurren alteraciones en la velocidad de síntesis del colesterol a partir del ácido mevalónico. Las condiciones experimentales escogidas fueron ayuno por 48 horas, alimentación con dietas conteniendo colesterol al 2% o colestiramina al 3%, y diabetes inducida por estreptozotocina. En todos los casos se encontraron variaciones de similar magnitud en la actividad de las tres enzimas estudiadas, y no sólo variación en la actividad de la supuesta enzima regulatoria secundaria, con lo que no se sustenta la proposición que originó esta investigación. Los datos que aquí se obtuvieron son comparables, sin embargo, con los obtenidos por otros autores que han medido otras actividades enzimáticas de la biosíntesis del colesterol en condiciones similares a las nuestras. El conjunto de toda esta información permite concluir que la sugerencia de que existen posibles etapas regulatorias secundarias para el control de la biosíntesis

del colesterol puede englobarse en una proposición más general. Esta proposición es que existen variaciones en el mismo sentido en la actividad de todas las enzimas de la biosíntesis del colesterol que catalizan etapas desde acetil-CoA hasta, por lo menos, escualeno, y que éstas se producen después de la respuesta primaria de la reductasa de HMG-CoA (que es la enzima regulatoria de la vía metabólica) a las diversas condiciones experimentales a que se someten los animales.

El segundo objetivo de esta tesis se logró mediante la purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo. La enzima se purificó a través de tratamiento a pH 5,3, fraccionamiento con sulfato de amonio, y cromatografía en DEAE-celulosa, Sephadex G-200, fosfocelulosa, hidroxilapatita y azul de dextrano-Sepharose. La preparación obtenida, de actividad específica 6,3 unidades/mg de proteína, se encontró homogénea al analizarla por electroforesis en geles de poliacrilamida en ausencia de agentes desnaturantes, pero la electroforesis en condiciones desnaturantes reveló una contaminación de alrededor de 15-20%. La purificación y el rendimiento logrado fueron de 5.800 veces y 4,8, respectivamente. La enzima es estable durante por lo menos un mes en 20% glicerol a menos 20°, presenta una alta especificidad por el ATP y requiere de un ión metálico bivalente para la actividad, siendo Mg^{+2} y Mn^{+2} los mejores. El pI encontrado es de 4,8, el rango óptimo de pH se extiende de 4,0 a 6,5 y la enzima es inhibida por citrato a valores de pH inferiores a 5,0. La descarboxilasa pirofosfomevalónica purificada no requiere de reductores de grupos sulfhidrilos para su actividad ni estabilidad. Presenta un peso molecular de 85.400 ± 1.940 medido por filtración en Sephadex G-200, centrifugación en gradientes de sacarosa y electroforesis en geles de

poliacrilamida en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol, y está compuesta de dos unidades iguales o muy semejantes de peso molecular 43.500, según lo revela el último método nombrado.

La enzima presenta cinética hiperbólica para ambos sustratos, el mevalonato-5-pirofosfato (MVA-PP) y el ATP, con una Km verdadera de $1,41 \times 10^{-5}$ M para el primero y de $5,04 \times 10^{-4}$ M para el segundo. La representación gráfica de los datos cinéticos indica un mecanismo secuencial para la unión de los sustratos a la enzima.

La descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo es inactivada por fenilgloxal en amortiguador trietanolamina-HCl pH 8,15 a 30°. La inactivación es de pseudo-primer orden a todas las concentraciones del inactivador empleadas, encontrándose una constante de velocidad de segundo orden de $108 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. El orden de la reacción (respecto al inactivador) es próximo a 1, lo que sugiere que la modificación de un solo residuo de aminoácido por sitio activo es suficiente para producir la inactivación. La especificidad del reactivo y la alta constante de velocidad de inactivación encontrada sugieren que el residuo que se modifica es uno de arginina. Ambos sustratos protegen efectivamente a la enzima de la inactivación, pudiéndose calcular a partir de los experimentos de protección las constantes de disociación de los respectivos complejos enzima - sustrato. Se encontraron valores de $5,5 \times 10^{-5}$ M y $1,7 \times 10^{-6}$ M para los complejos enzima-ATP y enzima-MVA-PP respectivamente. El efecto protector de los sustratos es menor en presencia de Mg^{+2} , lo que sugiere que si bien Mg^{+2} es importante para la catálisis no lo es para la unión de los sustratos a la enzima. Estos experimentos de protección de la inactivación por los sustratos permitieron asimismo deducir que los complejos

enzima-sustrato también reaccionan con el fenilglioxal, lo que sugiere que el residuo que se modifica no tiene un papel importante en la unión de los sustratos sino en un paso de la catálisis posterior a la unión.

ABSTRACT

A study has been carried out on pyrophosphomevalonate decarboxylase (ATP: 5-diphosphomevalonate carboxy-lyase (dehydrating) EC 4.1.1.33) with a dual purpose. The first objective of this research has been to clarify its postulated role as a secondary regulatory enzyme of cholesterol biosynthesis, and the second one has been the obtainment of a stable and highly purified preparation of the enzyme, suitable for studies of its structure and mechanism of action.

The first objective was achieved by measuring the activities of mevalonate and phosphomevalonate kinases and pyrophosphomevalonate decarboxylase in liver homogenates from rats subjected to experimental conditions where the rate of cholesterol biosynthesis from mevalonate is known to be altered. The experimental conditions selected were 48-hours fasting, feeding diets containing 2% cholesterol or 3% cholestyramine, and streptozotocin-induced diabetes. In all four situations, variations in the activity of all three enzymes tested were found, instead of variations only in the supposedly secondary regulatory enzyme. These findings do not support the proposition that pyrophosphomevalonate decarboxylase is a secondary regulatory enzyme of cholesterol biosynthesis in rat liver. Nevertheless, when our data are analyzed together with published data on the activity of other enzymes of hepatic cholesterol biosynthesis in rats kept under experimental conditions like those used in this work, a more general view about the control of this metabolic pathway can be proposed. We suggest that variations in the same way in the activity of all enzymes of cholesterol biosynthesis from acetyl

CoA up to at least squalene synthase are produced after HMG-CoA reductase (the main regulatory enzyme of the whole pathway) adapts its activity to the physiological condition of the animal.

The second objective was achieved through the purification of pyrophosphomevalonate decarboxylase from chicken liver. The enzyme was purified by means of pH 5.3 treatment, ammonium sulphate fractionation, and DEAE-cellulose, Sephadex G-200, phosphocellulose, hydroxiapatite and blue-dextran-Sepharose chromatography steps. The preparation thus obtained was found to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis in non denaturing conditions, although a slight contamination (15-20%) was found in denaturing conditions. The enzyme had a specific activity of 6.3 units/mg of protein (5,800 times that of the crude liver extract) and was obtained in 4.8% yield. Purified pyrophosphomevalonate decarboxylase is stable at least one month in 20% glycerol at -20° , is highly specific for ATP, and requires a bivalent metal ion for activity (Mg^{+2} or Mn^{+2} being the best). The optimum pH range is from pH 4.0 to pH 6.5; the enzyme is inhibited by citrate below pH 5.0, and the pI is 4.8. Reagents containing sulfhydryl groups are not required either for activity or stability of the enzyme. The molecular weight (mean \pm S.E.M.) was found to be $85,400 \pm 1,940$, as measured by Sephadex G-200 filtration, sucrose gradient centrifugation, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme is composed of two identical, or nearly identical, subunits of molecular weight 43,500.

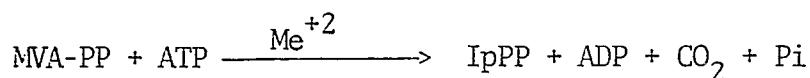
Pyrophosphomevalonate decarboxylase shows hyperbolic kinetics for both substrates, mevalonate-5-pyrophosphate (MVA-PP) and

ATP, with true K_m values of 1.41×10^{-5} M and 5.04×10^{-4} M, respectively. Graphical representation of the kinetic data shows a sequential mechanism for the binding of the substrates to the enzyme.

The enzyme is inactivated by phenylglyoxal in triethanolamine-HCl buffer pH 8.15 at 30° . Inactivation follows pseudo-first-order kinetics at all concentrations, with a second-order rate constant of $108 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. The reaction order for inactivation is close to 1, suggesting that the modification of a single amino acid residue per active site of the enzyme is enough to completely inactivate it. The specificity of the reagent and the high rate constant of inactivation obtained strongly suggest that the modified amino acid residue is arginine. Effective protection of inactivation is achieved by both substrates, making it possible to calculate the dissociation constants for the enzyme-substrate complexes. The values found were 5.5×10^{-5} M for the enzyme-ATP complex, and 1.7×10^{-6} M for the enzyme-MVA-PP complex. Substrate protection is less effective in the presence of Mg^{+2} , suggesting that although Mg^{+2} is needed for catalysis, it is not required for the binding of the substrates to the enzyme. Protection experiments also led to the conclusion that the enzyme-substrate complexes are also able to react with phenylglyoxal, indicating that the modified arginyl residue is not important for binding but for a later step in catalysis.

1. INTRODUCCION

La descarboxilasa pirofosfomevalónica [ATP: 5-difosfomevalonato carboxilasa (deshidratante) (EC 4.1.1.33)] cataliza la descarboxilación del MVA-PP en presencia de ATP y un metal bivalente para producir IpPP, ADP, Pi y CO₂, de acuerdo a la ecuación



Esta reacción corresponde a una de las primeras etapas de la biosíntesis de isoprenoides, sustancias que derivan del MVA y que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Algunos ejemplos de isoprenoides los constituyen los terpenos, esteroides, carotenoides, caucho, giberelinas, etc., y su relación biogenética con el MVA se esquematiza en la figura 1.

En los animales el colesterol representa uno de los isoprenoides cuantitativamente más importantes, y en la figura 2 se presentan algunas de las etapas de su biosíntesis a partir de acetil-CoA. Puede verse que el MVA se forma por la condensación sucesiva de tres moléculas de acetil-CoA, para luego experimentar dos fosforilaciones consecutivas. La primera es catalizada por la quinasa mevalónica y la segunda por la quinasa fosfomevalónica. El MVA-PP, producto de la reacción catalizada por la quinasa fosfomevalónica, es descarboxilado a IpPP, compuesto a partir del cual se originan todos los poliisoprenoides (Cori, 1976) y cuya biosíntesis se encuentra descrita en bacterias, levaduras, plantas superiores y mamíferos (Beytía & Porter, 1976).

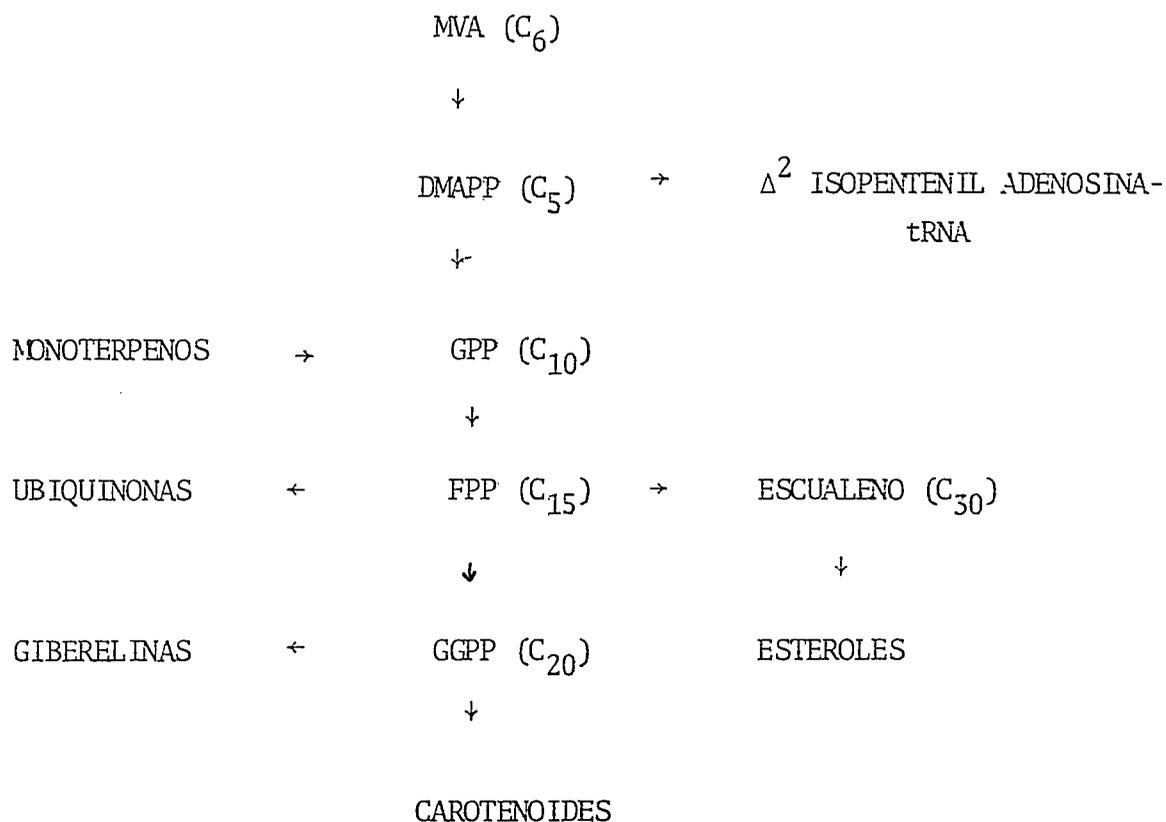


Figura 1. Relación biogenética de algunos isoprenoides con el ácido mevalónico.

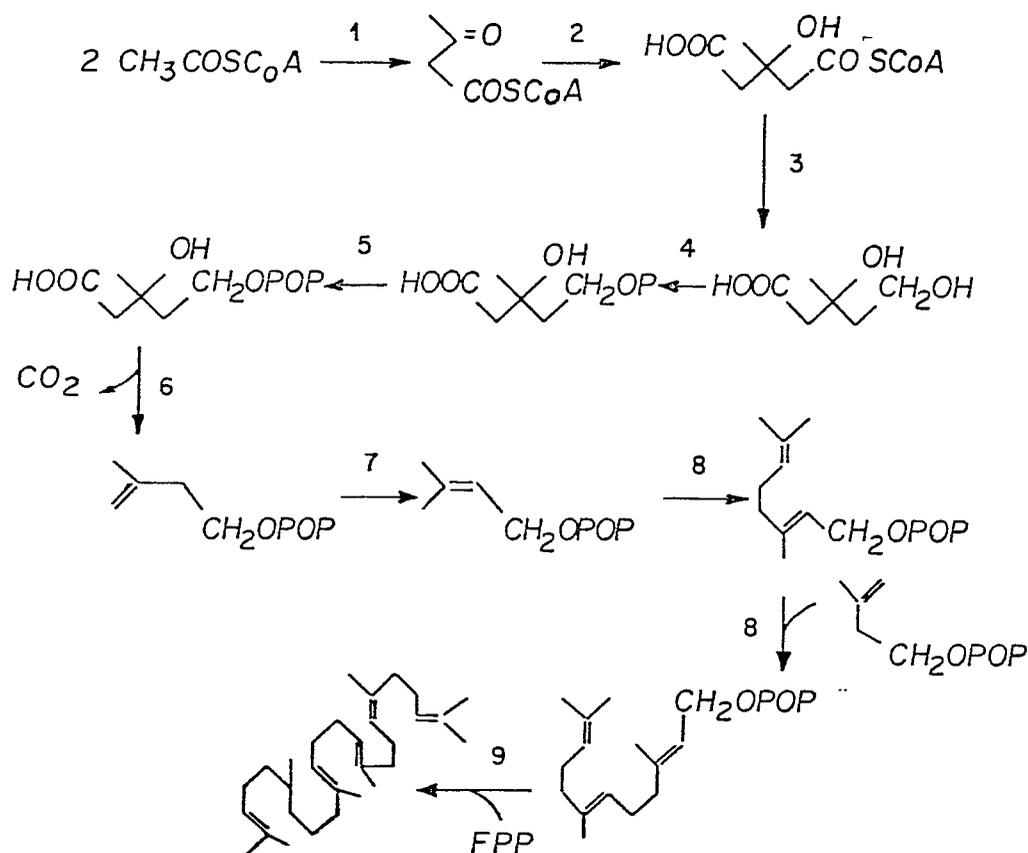


Figura 2. Etapas de la biosíntesis del colesterol desde acetil-CoA hasta escualeno.

Las enzimas que catalizan estas reacciones son: 1= tiolasa de acetoacetil-CoA; 2= sintetasa de HMG-CoA; 3= reductasa de HMG-CoA; 4= quinasa mevalónica; 5= quinasa fosfomevalónica; 6= descarboxilasa pirofosfomevalónica; 7= isomerasa de isopentenilpirofosfato; 8= preniltransferasa, y 9= sintetasa de escualeno.

Una de las razones por el constante interés en la biosíntesis del colesterol radica en que alteraciones de su metabolismo pueden tener consecuencias patológicas, siendo una de ellas la arterioesclerosis, hoy en día una de las principales causas de mortalidad humana (Goldstein & Brown, 1977).

La biosíntesis del colesterol es un proceso extramitocondrial en animales, siendo las enzimas que catalizan las etapas desde acetil-CoA a FPP solubles (permanecen en el sobrenadante de 105.000 g) excepto la enzima que cataliza la síntesis de MVA, la reductasa de HMG-CoA, que se encuentra unida a las membranas del retículo endoplásmico. A partir del FPP las enzimas vuelven a ser microsomales (Beytía & Porter, 1976). Aunque se ha visto que prácticamente todos los tejidos corporales tienen la capacidad de sintetizar colesterol, el hígado se ha identificado como la fuente biosintética principal, tanto en monos como en ratas (Dietschy & Wilson, 1970). Se sabe que en este órgano el metabolismo del colesterol está sometido a un complejo sistema de control y puede ser modificado por una serie de factores ambientales, nutricionales y hormonales siendo el colesterol mismo un eficaz inhibidor de su propia formación (Dempsey, 1974). Se encuentra bien establecido que la enzima reguladora de esta ruta es la reductasa de HMG-CoA. Al respecto, ya en 1959 Bucher & col. (1959) demostraron que la etapa limitante de esta biosíntesis se encontraba entre acetato y MVA, y luego Seperstein & Fagan (1966) aportaron evidencias experimentales de que esa etapa era en realidad la reducción de HMG-CoA a MVA. Posteriormente Shapiro & Rodwell (1971) y Dietschy & Brown (1974) confirmaron que en una amplia variedad de estados fisiológicos, los cambios en la velocidad de síntesis del colesterol eran estrictamente paralelos a los cambios en la actividad de la reductasa de HMG-CoA.

Debido a esta relación, generalmente se acepta que la actividad de la reductasa de HMG-CoA es un índice de la velocidad de síntesis del colesterol a partir de acetato (Dugan, 1981).

Se ha visto que tanto la reductasa de HMG-CoA como la síntesis del colesterol a partir de acetato (pero no de MVA) experimentan variaciones circadianas de entre 5 a 10 veces, con un máximo alrededor de la medianoche (Dugan & Porter, 1976). El aumento de actividad en la reductasa se debe a un aumento en la velocidad de síntesis de enzima, sin alterarse su velocidad de degradación (Dugan & col., 1972), siendo el período de semi-decaimiento para la enzima ($t_{1/2}$) de 2 a 3 horas (Rodwell & col., 1976). En los últimos años, algunos grupos de investigadores han sugerido que también podría ser fisiológicamente importante la interconversión de la enzima entre formas activas y poco activas a través de un mecanismo de fosforilación y desfosforilación dependiente de ATP (ver Schroepfer 1981, y las referencias allí citadas). Este último punto, sin embargo, ha sido severamente criticado por Ness & col (1982) quienes han demostrado que, por lo menos en algunos casos, lo que se había interpretado como disminución en la actividad de la enzima causada por fosforilación de la proteína mediada por una proteína-quinasa, no era sino el efecto de contaminación de quinasa mevalónica en el ensayo.

Aún cuando la reducción de HMG-CoA a MVA es el sitio primario para el control de la biosíntesis del colesterol, se ha visto que luego de alimentar ratas por períodos de varios días con dietas conteniendo colesterol, puede detectarse también una disminución en la velocidad de flujo de metabolitos en otros segmentos de la ruta, posteriores al MVA.

Así por ejemplo, Siperstein & Guest (1960) informaron que luego de alimentar ratas con dietas ricas en colesterol, la velocidad de conversión de [2-¹⁴C] MVA a colesterol en cortes de hígado disminuía al 35% de los valores controles, en tanto que la incorporación de [1-¹⁴C] acetato había bajado al 5%. Por consiguiente aquí se demostró que aún cuando la etapa limitante de la velocidad era anterior al MVA, también existía una marcada reducción en el flujo de metabolitos en el segmento de la vía posterior a él, y que ésta se producía en forma secundaria a la primera. Un poco después, Gould & Swyrd (1966) demostraron que luego de la alimentación prolongada con colesterol, se producía una disminución en la capacidad de convertir tanto MVA a colesterol como MVA a FPP y FPP a colesterol en homogeneizados de hígado de rata. Dentro del mismo contexto, Slakey & col. (1972) encontraron que se necesitan al menos dos puntos secundarios de regulación, uno entre MVA y escualeno y otro entre escualeno y colesterol, para poder explicar el flujo de materiales a través de la vía completa de biosíntesis del colesterol. Además de estos efectos nutricionales, se ha visto que en homogeneizados de hígado obtenidos de ratas diabéticas se produce también una disminución en la incorporación de [2-¹⁴C] MVA a colesterol 2 semanas después de la inyección de estreptozotocina (Cayen y col., 1975). Anteriormente ya se había demostrado que la actividad de la reductasa de HMG-CoA disminuye a valores bastante bajos en el hígado de ratas diabéticas (35 y 7% de los controles al cabo de 4 y 7 días después de la inyección de estreptozotocina) (Nepokroeff & col., 1974).

Ramachandran & Shah (1976) han presentado datos que sugieren que la descarboxilación del MVA-PP podría ser una etapa limitante en la conversión de MVA a colesterol en ciertos casos. Estos autores observaron que al destetar ratas se producía aumento en la velocidad de descarboxilación

de [1-¹⁴C] MVA, en tanto que no se producía variación en las velocidades de formación de MVA-P y MVA-PP. Este aumento en la velocidad de descarboxilación del MVA no se producía, en cambio, cuando luego del destete las ratas se alimentaban con una dieta conteniendo 1% de colesterol. Los datos obtenidos por estos autores respecto a la descarboxilación de MVA-PP son criticables ya que no fueron obtenidos en las mejores condiciones, puesto que el MVA-PP fue generado in situ a partir de MVA, y con ello la enzima distaba de estar saturada con su sustrato. Por otra parte, Shama Bhat & Ramasarma (1977) indican que tanto la conversión de [2-¹⁴C] MVA a esteroides como la descarboxilación de [1-¹⁴C] MVA presentan cambios circadianos en homogeneizados de hígado de rata. Estos últimos resultados, sin embargo, se encuentran en abierta contraposición con varios otros, ya que si bien es un hecho establecido que tanto la incorporación de acetato a colesterol como la actividad de la reductasa de HMG-CoA presentan fluctuaciones circadianas en hígado de rata, (Dempsey, 1974; Rodwell & col., 1976), existe un gran número de evidencias que indican que ni la incorporación de [2-¹⁴C] MVA a colesterol (Back & col., 1969) ni la actividad de las enzimas individuales ubicadas entre MVA y escualeno (Slakey & col., 1972; Jabalquinto & Cardemil, 1980) presentan variaciones circadianas en sus valores.

Los resultados anteriormente comentados respecto al posible segundo punto de control para la biosíntesis del colesterol hacen de especial interés un análisis sistemático de la actividad de las tres enzimas que catalizan etapas entre MVA e IpPP en hígado de ratas sujetas a distintas situaciones nutricionales u hormonales. Un estudio de esta naturaleza debería dar evidencias a favor o en contra del posible papel regulador sugerido para la descarboxilasa pirofosfomevalónica (Ramachandran &

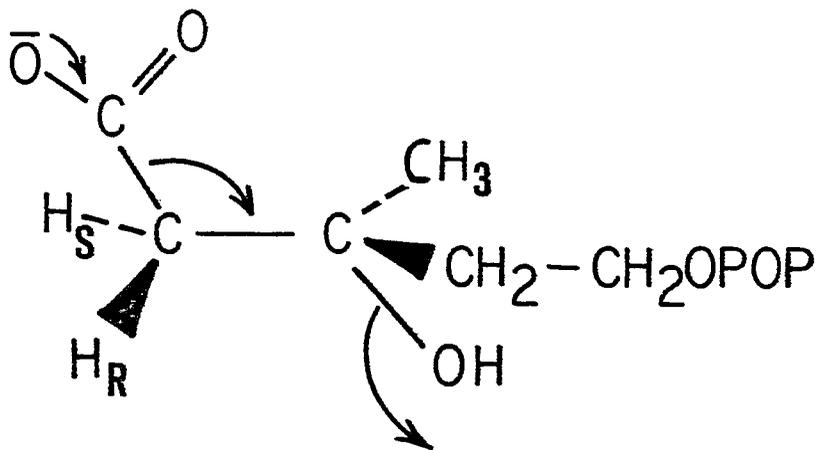
Shah, 1976). Así, podría esperarse de antemano que cuando el animal está en condiciones como ayuno, alimentación con dietas con o sin colesterol, o en estado diabético, se produzcan variaciones en la actividad de esta enzima y no en la de las quinasas que la preceden. Uno de los propósitos de esta tesis ha sido, justamente, la de contribuir al esclarecimiento del papel regulador de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata en la biosíntesis del colesterol. Con este objeto, se decidió medir la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en homogeneizados de hígado de ratas sometidas a diferentes condiciones fisiológicas.

Independientemente del papel regulatorio que pueda tener la descarboxilasa pirofosfomevalónica en la biosíntesis del colesterol, la enzima presenta un gran interés desde el punto de vista de su estructura y mecanismo de acción.

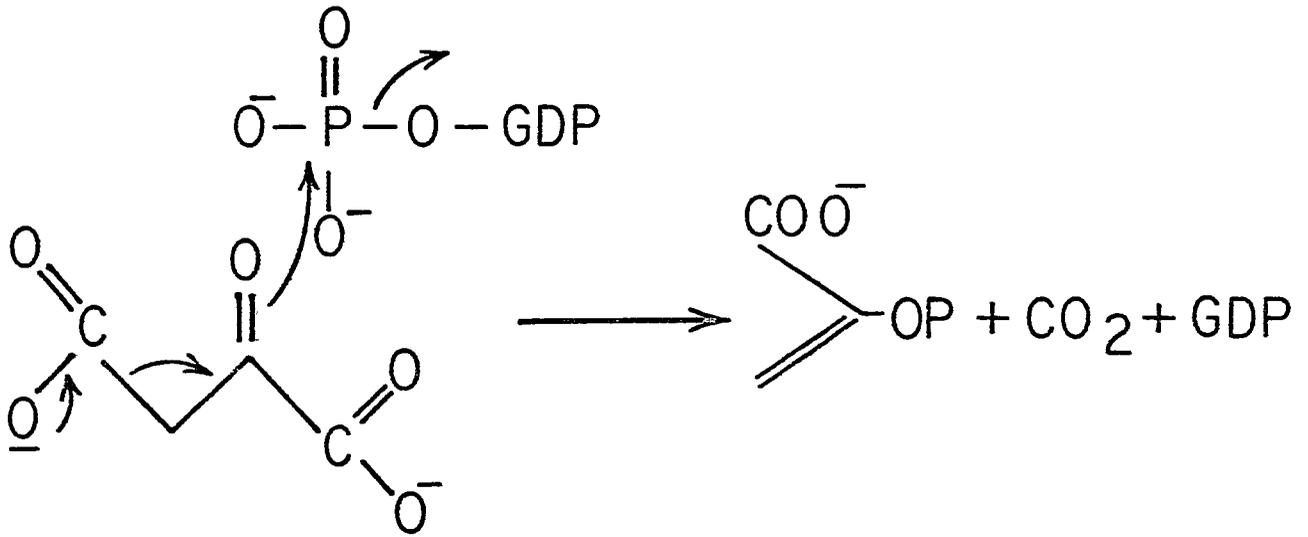
Como se dijo en la parte inicial de esta Introducción, la enzima cataliza la reacción bimolecular entre el MVA-PP y el ATP para generar cuatro productos: IpPP, ADP, CO_2 y P_i . Todo indica que la reacción debería ser estereoespecífica para el (3R)-MVA-PP, pues la quinasa mevalónica lo es para el (3R)-MVA (Popják, 1970), la quinasa fosfomevalónica lo es para el (3R)-MVA-P (Hellig & Popják, 1961), y es sabido que la síntesis estereoespecífica es la regla en la biosíntesis de isoprenoides (Popják, 1970).

El conocimiento que se tiene de la descarboxilasa pirofosfomevalónica es extremadamente pobre. Cuando se inició este trabajo, la enzima no había sido obtenida en forma homogénea de ningún tejido, ni

animal ni vegetal. Tan sólo se habían obtenido preparaciones parcialmente purificadas de las enzimas de levadura (Bloch & col., 1959), hígado de cerdo (Popják, 1969; Beytía, 1972), y látex de Hevea brasiliensis (Skilleter & Kekwick, 1971), con aumentos en su actividad específica de 111, 34, y 29 veces, respectivamente. Usando estas preparaciones, se ha determinado que la estequiometría de la reacción es la mostrada al comienzo de este capítulo. Se ha encontrado, además, que la pérdida de los grupos carboxilo e hidroxilo se realiza a través de una eliminación anti, como se muestra a continuación (Cornforth & col., 1966):

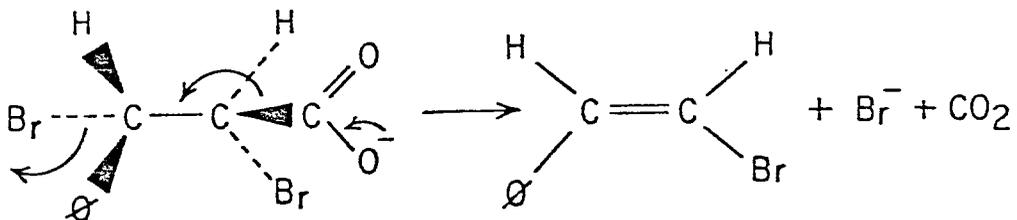


La reacción que cataliza esta enzima es de sumo interés ya que existen pocas descarboxilaciones similares a ésta descritas hasta ahora. La reacción catalizada por la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica pudiera considerarse una de las más similares, aún cuando en este caso se libera un producto fosforilado, el fosfoenolpiruvato:



Esta enzima ha sido obtenida en forma homogénea de hígado de rata, y se ha establecido la presencia de un grupo ditiol vecinal esencial para la catálisis (Colombo & col., 1978).

Desde el punto de vista de la química orgánica, la descarboxilación del MVA-PP podría considerarse una reacción análoga a la descarboxilación en acetona en medio alcalino del derivado dibromado del ácido trans-cinámico (el 2,3-dibromo-3-fenilpentanoico) para dar β -bromoestireno (Cristol & Norris, 1953):



En este caso, la descarboxilación produce exclusivamente cis- β -bromoestireno, lo que indica una eliminación del carboxilo y del bromo de tipo anti, en analogía a la eliminación de los grupos carboxilo e hidroxilo del MVA-PP en la reacción catalizada enzimáticamente.

El mecanismo de la reacción catalizada por la descarboxilasa pirofosfomevalónica continúa siendo un interrogante, a pesar de que los primeros estudios al respecto se hicieron hace ya 20 años. En esos estudios, Konrad Bloch y su grupo (Lindberg & col., 1962), usando una preparación obtenida de levaduras, pudieron demostrar con $[5-^{18}O]$ MVA-PP que el oxígeno del grupo hidroxilo en la posición tres del MVA-PP se transfiere, luego de la descarboxilación, al fosfato inorgánico liberado. Sobre la base principalmente de este experimento, los autores sugirieron dos posibles mecanismos para la reacción de descarboxilación, como puede verse en la figura 3. Los dos mecanismos propuestos difieren en que en uno de ellos (Fig. 3a) hay formación de un intermediario trifosforilado, y en el otro (Fig. 3b) la descarboxilación, la rotura del enlace C-O, y la formación del enlace O-P son procesos concertados. En este último caso el ATP no está actuando como un agente fosforilante sino que sólo está proporcionando, a través de su fosforilo terminal, un agente electrófilo capaz de atraer electrones desde el enlace C_3-O del MVA-PP para generar de esa manera un centro de cargas positivas en el C_3 y favorecer entonces la descarboxilación y formación del doble enlace. Respecto a estos mecanismos, es de interés hacer notar que Popják (1969) informa que, usando una preparación de descarboxilasa de hígado de cerdo, la aparición de CO_2 y ADP son procesos sincronizados en un amplio rango de pH, lo que apoya el mecanismo concertado de la Fig. 3b. Sin embargo, aun cuando el mecanismo fuese el de la

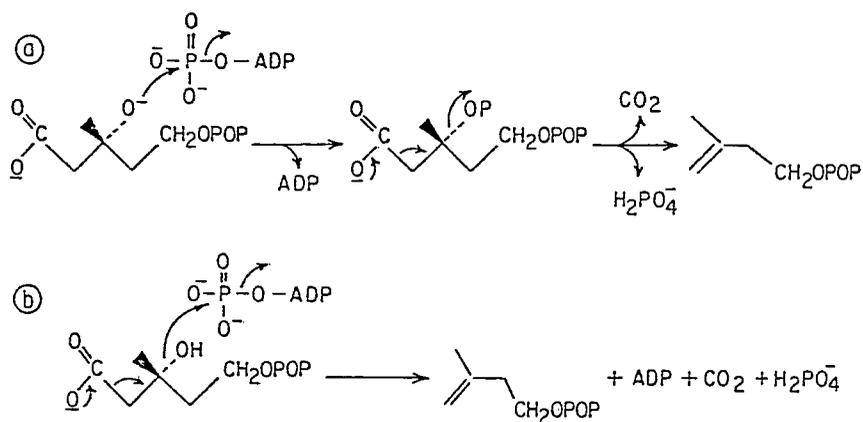


Figura 3. Posibles mecanismos de descarboxilación del mevalonato-5-pirofosfato.

Se representan los mecanismos (a) a través de un intermediario trifosforilado y (b) concertado, sugeridos por Lindberg & col. (1962).

Fig. 3a, sería muy difícil demostrar que existe un retraso entre la producción de ADP y la de CO_2 con el equipo descrito por Popják (1969). Un intento de atrapar un posible intermediario trifosforilado usando un análogo del MVA-PP no descarboxilable dió resultados negativos (Hellig, 1962).

El mecanismo de esta reacción es frecuentemente mal interpretado en los textos corrientes de bioquímica (Cardemil & Jabalquinto, 1983). Así por ejemplo, Lehninger (1978) indica que "Una tercera fosforilación en el átomo de carbono 3 (del MVA-PP) rinde un producto intermedio muy inestable, que pierde ácido fosfórico y se descarboxila para formar 3-isopentenil-pirofosfato....". Por otra parte, Stryer (1981) acota que "...el mevalonato es convertido a 3-fosfo-5-pirofosfomevalonato a través de tres fosforilaciones sucesivas, y este intermediario inestable pierde CO_2 y Pi para generar 3-isopentenilpirofosfato". En gran medida esta reacción no ha podido ser estudiada en mayor detalle debido tanto a la baja pureza e inestabilidad de las preparaciones enzimáticas obtenidas, como al inconveniente que representa la síntesis del MVA-PP, que no se encuentra disponible en forma comercial.

Durante el desarrollo de esta tesis apareció una publicación (Shama Bhat & Ramasarma, 1980) dando cuenta de la obtención en forma homogénea de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata. Los autores informan un peso molecular de 126.000 para la enzima, estando ésta formada de 4 subunidades de peso molecular de 35.000 cada una. Se obtuvo un pH óptimo cercano a 5,2, ATP resultó ser el mejor nucleótido, y un metal bivalente uno de los requisitos importantes para la catálisis. Esta preparación, sin embargo, es extremadamente inestable, ya que pierde un 99,5% de su actividad en 12 horas. Los autores lograron recuperar un 52%

de actividad en el mismo período de tiempo guardando la enzima en presencia de concentraciones 0,5 M de MVA-PP, ATP, Mg^{+2} y 2-mercaptoetanol. Debido a estos problemas de estabilidad esta preparación no es útil para efectuar estudios del mecanismo de acción de la enzima.

En la tabla 1 se resumen las propiedades de las distintas preparaciones de descarboxilasa pirofosfomevalónica realizadas hasta la fecha. Además de los datos que se presentan en esa tabla, cabe hacer notar que todas las preparaciones obtenidas requieren de un metal bivalente para la catálisis, y que la enzima de H. brasiliensis es inhibida por IpPP y ADP.

Como puede apreciarse de lo expuesto, el conocimiento que se tiene de esta enzima es insuficiente y de carácter muy preliminar. Esta falta de conocimientos de la enzima y de sus propiedades cinéticas y moleculares básicas, hizo plantearnos la necesidad de obtener una preparación estable y de alto grado de pureza con la que se pudieran posteriormente realizar estudios tendientes a aclarar su mecanismo de acción. Como posibles fuentes de enzima se pensó en los hígados de cerdo o de pollo, ya que ambos pueden ser obtenidos fácilmente y se han purificado también otras enzimas de la biosíntesis del colesterol de ambas fuentes. Finalmente optamos por intentar la purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo (Alvear & col., 1982), ya que era posible tener acceso a hígados provenientes de pollos alimentados con una dieta constante y uniforme, y sacrificados todos a la misma edad, cosas muy difíciles de controlar en cerdos.

Tabla 1. Algunas propiedades de la descarboxilasa pirofosfomevalónica proveniente de diferentes fuentes.

Origen	Actividad específica ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Km ap. MVA-PP (μM)	Km ap. ATP (mM)	pH óptimo
H. brasiliensis ¹	0,7	4	0,12	5,5-6,5
Levadura ²	0,61	-	-----	5,5-7,4
Hígado de cerdo ³	0,145	1,2	0,40	5,6
Hígado de rata ⁴	0,056	10	-----	5,2

¹Skilleter & Kekwick (1971); ²Lindberg & col. (1962); ³Beytía (1972);

⁴Shama Bhat & Ramasarma (1980).

MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales biológicos

2.1.1. Roedores

Se usaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley proporcionadas por el vivero del Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas Oriente, Universidad de Chile.

2.1.2. Hígados de cerdo

Los hígados de cerdo utilizados como fuente de las quinasa mevalónica y fosfomevalónica se obtuvieron frescos 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 (12-13 horas después).

2.1.3. Hígados de pollo

Los hígados de pollo (pollos Broiler, 60 días de edad) se adquirieron extraídos de las aves en "Pollos Ariztía", Planta Panamericana Sur. Inmediatamente se colocaron en hielo, luego se limpiaron eliminando la mayor cantidad posible de grasa, y se guardaron a continuación a -80° hasta su procesamiento (2 a 15 días después).

2.2. Reactivos químicos y materiales cromatográficos

NADH, ATP, ADP, GTP, UTP, CTP, PEP, quinasa pirúvica tipo II de músculo de conejo, deshidrogenasa láctica tipo II de músculo de conejo, lactona del ácido R,S mevalónico, 2-mercaptoetanol, sulfato

de protamina grado X de salmón, azul de dextrano, fosfatasa alcalina tipo I-S de intestino de ternero, albúmina de suero de bovino, reactivo Folin-Ciocalteu, citocromo c de corazón de buey, Tris base, hemoglobinas entrecruzadas liofilizadas, 2,3-butanodiona, fenilgioxal, Dowex 50 WX8, agarosa-ribosil (amino hexil) adenosina 5'-trifosfato, agarosa-N₆ (amino hexil) carbamoil metil-adenosina 5'-trifosfato, agarosa-C₈ (amino hexil) amino adenosina 5'-trifosfato, Sepharose 4B, se obtuvieron de Sigma Chemical Co., Saint Louis, EE.UU.; Bio Gel P-150, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, glicina, persulfato de amonio, azul de bromofenol, azul de Coomassie, hidroxilapatita, de Bio Rad Laboratories, California, EE.UU.; colesterol (ColesterineTM), citrato de sodio, ácido cítrico, ácido acético, mNCl₂, CoCl₂, CdCl₂, ZnCl₂, EDTA, TCA, hexano (p.e. 40-60°) fueron productos de Merck A.G., Darmstadt, Alemania; colestiramina (CuemidTM) se obtuvo de Merck, Sharp and Dohme, EE.UU.; R₁S-[2-¹⁴C] MVA DL-[2-¹⁴C] MVA (sal dibenzoil etilendiamina)), PPO, POPOP, se obtuvieron de Amersham-Searle, Radio Chemical Center, Inglaterra; Sehadex G-10 y G-200, PBE-94 y Polybuffer 74 para cromatofoco de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia; DEAE-celulosa (DE-22 y DE-52) y fosfocelulosa fueron productos de Whatman Ltd., Springfield Mill, Kent, Inglaterra; deshidrogenasa alcohólica de levadura provino de Worthington, New Jersey, EE.UU.; sulfato de amonio ultrapuro se obtuvo de Schwarz/Mann, Orangeburg, New York, EE.UU.; azul de dextrano-Sepharose fue gentilmente proporcionado por el Laboratorio de Bioquímica General, Departamento Químico Biológico, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile; glicerol provino de PROLABO,

París, Francia; R[3-¹⁴C] MVA (lactona) de New England Nuclear, Boston, EE. UU. El resto de los reactivos empleados fue de grado análítico. La estreptozotocina fue donada gentilmente por el Dr. W. Dulin, de Upjohn Chemical Co., EE.UU.

2.3. Preparación del mevalonato-5-pirofosfato

El MVA-PP utilizado en este trabajo fue sintetizado en el laboratorio, ya que no se encuentra disponible comercialmente. Hasta el momento no se ha descrito su síntesis química. Popják (1969) ha descrito un método enzimático que consiste en fosforilar el MVA utilizando una mezcla de quinasas mevalónica y fosfomevalónica, con lo que se obtiene un rendimiento adecuado de MVA-PP. El método adoptado fue esencialmente el anterior, con algunas modificaciones (Jabalquinto & Cardemil, 1980), con lo que se consiguió obtener un producto sin restos de MVA o nucleótidos contaminantes y solo con una pequeña contaminación (entre un 0,5 a un 2%) de MVA-P.

2.3.1. Preparación de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica

Estas enzimas se prepararon de hígado fresco de cerdo, por una modificación del método de Bazáes & col. (1980) para la purificación de la quinasa fosfomevalónica. Un kilogramo de hígado de cerdo se homogeneizó por 1 minuto en dos volúmenes de amortiguador fosfato de potasio 100 mM pH 7,4 ⁽¹⁾ en un homogeneizador Waring Blendor. Esta

(1) Todos los amortiguadores empleados en la purificación de estas enzimas fueron de pH 7,4 y contenían 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 0,1 mM, a menos que se indique lo contrario.

operación y todas las siguientes se realizaron entre $-0-4^{\circ}$. El homogeneizado se filtró a través de varias capas de gasa y se centrifugó sucesivamente a $27.000 \times g$ durante 30 minutos y a $48.000 \times g$ durante 60 minutos, descartando en cada caso las pellas. El último sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio. La filtración que precipitó entre 30 y 60% de saturación de la sal se disolvió en amortiguador fosfato de potasio 1 mM y se dializó contra 50 volúmenes del mismo amortiguador durante 16 horas. La solución de proteínas dializadas se adsorbió en una columna de DEAE-celulosa (DE-22, 6,5 x 22 cm) equilibrada en el mismo amortiguador. La columna se lavó a continuación con amortiguador fosfato 50 mM hasta que la absorbancia a 340 nm del eluido fue alrededor de 0,3 unidades (aproximadamente 4 litros). Se aplicó enseguida una gradiente de fosfato de potasio entre 60 y 250 mM (1,6 litros de cada uno) con lo cual se produjo la elución de las enzimas. La actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica del eluido se detectó como se describe en la sección 2.4.1. El eluido seleccionado se concentró con sulfato de amonio al 80% y se redisolvió en amortiguador fosfato 1 mM.

La mezcla de quinasas mevalónica y fosfomevalónica obtenida de la columna DEAE-celulosa se aplicó a continuación a una columna de Bio Gel P-150 (5 x 75 cm) equilibrada en amortiguador fosfato 10 mM, con un flujo invertido de 20 ml/hora. Este polímero separa completamente las quinasas mevalónica y fosfomevalónica, por su diferencia en el peso molecular. Los eluidos seleccionados fueron concentrados por ultrafiltración usando una membrana Pellicon UM-10. Las fracciones enzimáticas concentradas fueron lavadas al 50% con glicerol y

guardadas a -10° . En estas condiciones la quinasa mevalónica retiene un 70% de actividad al cabo de 35 días, en tanto que la quinasa fosfomevalónica en ese plazo retiene el total de su actividad. Se obtuvo un total de aproximadamente 54 y 58 unidades de quinasa mevalónica y fosfomevalónica, respectivamente. Ambas preparaciones enzimáticas estaban prácticamente libres de actividades fosfatásicas.

2.3.2. Síntesis enzimática del $[3-^{14}\text{C}]$ mevalonato-5-pirofosfato

Se describe a continuación la síntesis y caracterización de $[3-^{14}\text{C}]$ MVA-PP. En otras ocasiones se sintetizó $[2-^{14}\text{C}]$ MVA-PP por una metodología similar, obteniéndose también resultados análogos a los que a continuación se informan.

La lactona racémica del MVA se convirtió en la sal de potasio con un exceso de KOH, incubando a 37° por 30 min, y luego su concentración se ajustó a alrededor de 0,1 M, titulándose espectrofotométricamente con un exceso de quinasa mevalónica y utilizando PK y LDH como enzimas auxiliares (ver sección 2.4.1). Esta solución de MVA se mezcló con otra de (R) $[3-^{14}\text{C}]$ MVA (proveniente de la (R) $[3-^{14}\text{C}]$ lactona) en las proporciones adecuadas para tener radiactividades específicas de 25 o 3000 cpm/nmol, según se deseara.

La síntesis enzimática del MVA-PP se realizó a través de una modificación de la técnica descrita por Popják (1969), con lo cual se consiguió disminuir a un mínimo la concentración de ATP necesaria, eliminando así en gran medida, la posibilidad de contaminación con nucleótidos del producto obtenido. Se incubó a 30° en un volumen final de 500 ml repartidos en dos matraces Erlenmayer de 1 lt. con

250 ml cada uno: (3R)-[3-¹⁴C] MVA 4,8 mM; ATP 2 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; MgCl₂ 5 mM; PEP 14,4 mM; KCl 38 mM; PK 1240 unidades; quinasa mevalónica 48 unidades y quinasa fosfomevalónica 52 unidades, en amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 8,2. La reacción se incubó 90 minutos, y se detuvo calentando en bañomaría hirviente por 3 minutos; se enfrió en hielo y se eliminó la proteína precipitada centrifugando 15 minutos a 35.000 x g en el rotor SS-34 de la centrífuga Sorvall. El análisis por cromatografía en papel del líquido sobrenadante obtenido (ver sección 2.3.4.1.) reveló la formación de un 80% de [3-¹⁴C] MVA-PP, quedando un 15% de [3-¹⁴C] MVA y un 5% de [3-¹⁴C] MVA-P como contaminantes radiactivos (Fig. 4). Es conveniente hacer notar que también se encuentra presente el (5S)-MVA no utilizado por la quinasa mevalónica.

2.3.3. Purificación del mevalonato-5-pirofosfato

El líquido sobrenadante obtenido como se describió en el punto anterior se ajustó a pH 9,0 con amoníaco concentrado, se diluyó con agua destilada para bajar su conductividad al nivel adecuado, y se aplicó con un flujo de 400 ml/hora a una columna de DEAE-celulosa (DE-52, 3 x 25 cm) equilibrada con NH₄ HCO₃ 10 mM, pH 9,0, de acuerdo a Dugan & col. (1968). La columna se lavó sucesivamente con soluciones de NH₄HCO₃ pH 9,0 de concentración creciente: 1000 ml 20 mM; 1500 ml 40 mM, 2000 ml 60 mM. Se colectaron fracciones de 22 ml y se midió la radiactividad en alícuotas de 1,0 ml cada cinco fracciones. Se encontró elución de radiactividad significativa en la aplicación de la muestra y lavado con NH₄HCO₃ 20 mM, niveles bajos en la elución con NH₄HCO₃ 40 mM, y gran cantidad en la elución con NH₄HCO₃ 60 mM.

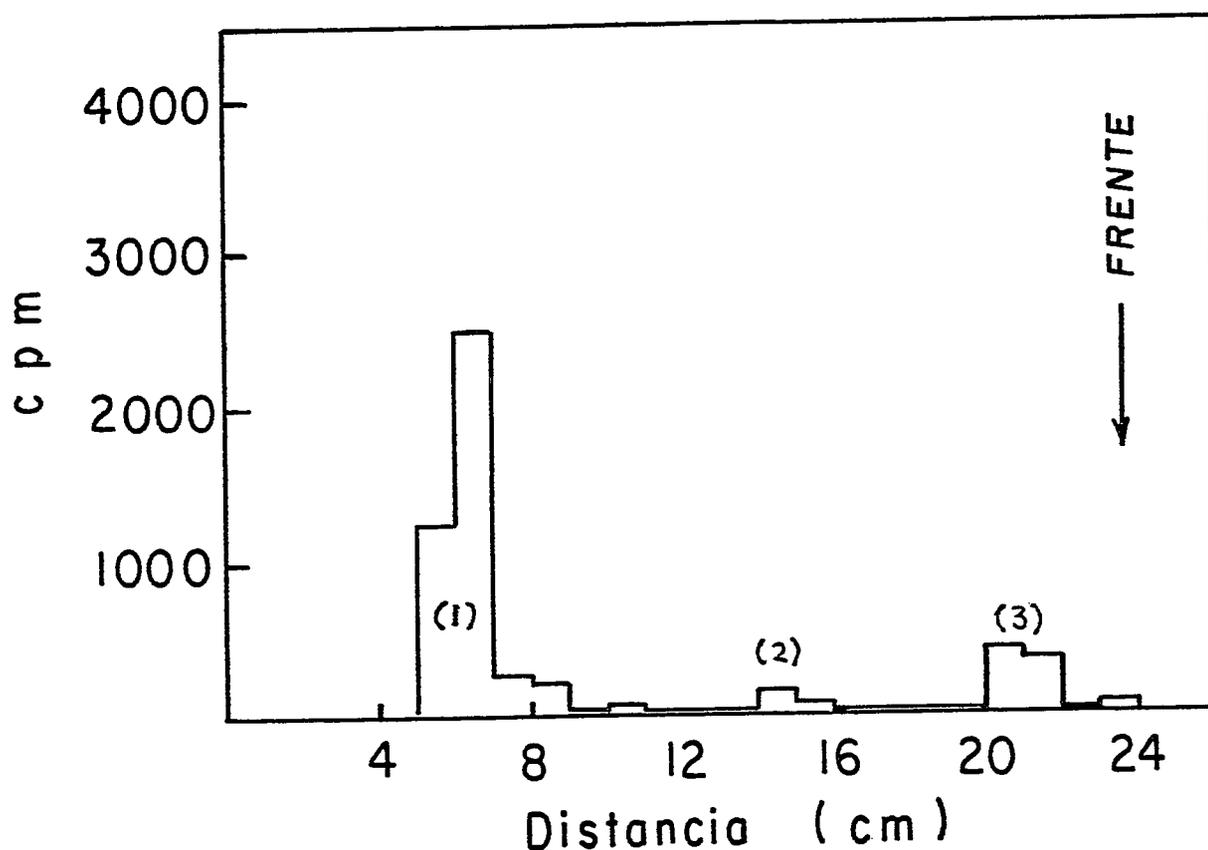


Fig. 4. Cromatografía en papel de los productos de la fosforilación enzimática del $[3-^{14}\text{C}]$ MVA.

Se aplicaron 40 μl del líquido sobrenadante obtenido luego de centrifugar el medio de incubación que contenía la mezcla de quinasas mevalónica y fosfomevalónica en papel Whatman N°1. La cromatografía se desarrolló y reveló como se encuentra descrito en la sección 2.3.4.1. Los valores de R_f determinados para los picos 1, 2 y 3 fueron 0,26, 0,63 y 0,90, respectivamente. En este sistema, el pico 1 corresponde al MVA-PP, el 2 al MVA-P y el 3 al MVA.

Lo primero corresponde en este sistema al MVA, lo segundo al MVA-P, y lo tercero al MVA-PP.

Se combinaron las fracciones correspondientes al $[3-^{14}\text{C}]$ MVA-PP, liofilizándose a sequedad. El residuo obtenido se disolvió en un pequeño volumen de agua destilada y se eliminaron los iones NH_4^+ y el CO_2 aplicando la solución a una columna de 3,5 x 8 cm de Dowex 50WX8 en forma H^+ . El NH_4^+ es retenido, en tanto que el CO_2 se libera. El eluido se ajustó inmediatamente a pH 7,0 con KOH.

Debido a que el producto obtenido de la columna de DEAE-celulosa contiene aún una cierta cantidad de nucleótidos contaminantes, fue necesario tratar el producto purificado con carbón activado (que previamente había sido tratado con HCl 1 M por una hora y luego lavado exhaustivamente con agua destilada hasta pH 5,0). Este proceso se realizó agregando alícuotas de la suspensión de carbón activado a la solución agitada mediante un agitador magnético, y controlando la disminución de absorción a 260 nm de tal modo de no agregar un exceso, ya que en algunas ocasiones en que esto ocurrió se pudo comprobar pérdida de MVA-PP por adsorción. El carbón activado se eliminó por centrifugación a 35.000 x g en el rotor SS-34 de la centrifuga Sorvall y posterior filtración a través de papel Whatman N° 1. El filtrado se liofilizó y redisolvió en agua destilada a una concentración de alrededor de 30 mM, guardándose a -10° . El producto guardado en estas condiciones es estable y no se descompone a MVA-P ni MVA durante por lo menos 8 meses. El rendimiento total del proceso fue de un 65%.

2.3.4. Identificación y pureza del mevalonato-5-pirofosfato

Se utilizaron diversos criterios para identificar el MVA-PP y establecer su pureza.

2.3.4.1. Cromatografía en papel e identificación mediante cómputo de radiactividad.

El producto se analizó por cromatografía en papel Whatman N° 1. El cromatograma se desarrolló en forma ascendente durante 16 horas a temperatura ambiente en t-butanol: ácido fórmico:agua (20:5:8), según lo descrito por García-Peregrín & col. (1972). El cromatograma se cortó en trozos de 1 cm, y la cantidad de radiactividad se determinó en cada pedazo poniéndolo en un frasco de contador con 3 ml de líquido de centelleo para soluciones hexánicas (sección 2.6). El examen del cromatograma reveló que el producto obtenido tenía una pureza radioquímica del 98%, con una pequeña contaminación de MVA-P, como se muestra en la figura 5.

2.3.4.2. Cromatografía en papel e identificación por revelado para fosfatos orgánicos.

Las tiras de papel se revelaron de acuerdo a la técnica descrita por Hanes & Isherwood (1949). Se encontró concordancia entre la zona radiactiva asignada al MVA-PP y la posición de la mancha azul que indica fosfato, en el sistema descrito en la sección anterior. No se encontraron indicios de fosfato inorgánico u otros compuestos fosforilados.

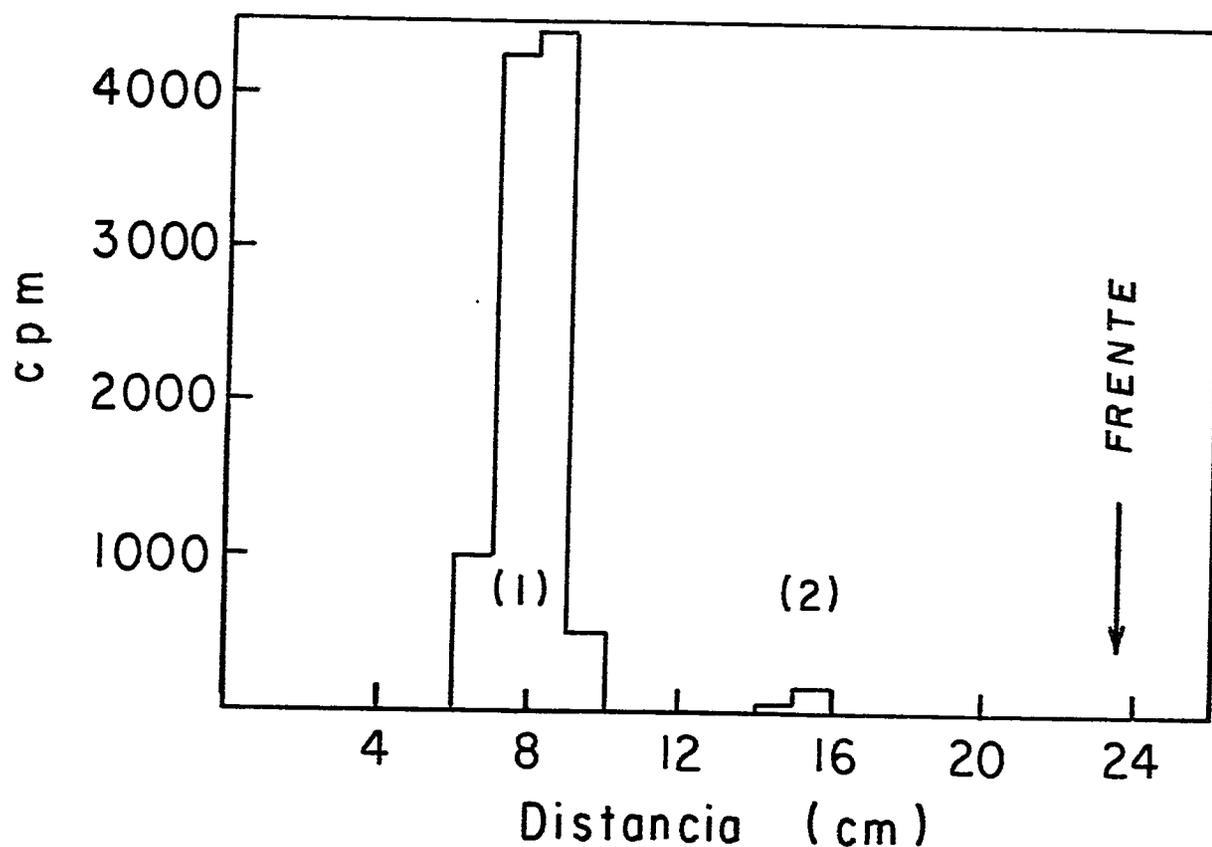


Figura 5. Determinación de la pureza radioquímica del $[3-^{14}\text{C}]$ MVA-PP, utilizando cromatografía en papel.

Se aplicaron 25 μl (13.000 cpm) del $[3-^{14}\text{C}]$ MVA-PP purificado en papel Whatman N°1. La cromatografía se desarrolló y reveló como se describe en la sección 2.3.4.1. Los R_f determinados para los picos 1 y 2 son de 0,33 y 0,65, respectivamente.

2.3.4.3. Análisis del contenido de fósforo

Se determinó el contenido de fósforo total del MVA-PP sintetizado, tratando una muestra con HNO_3 0,6 N y H_2SO_4 1,4 N y calentando a 180° por 1 hora (Umbreit & col., 1957), y analizando el ortofosfato liberado por el método de Fiske & Subbarow, según lo describe también Umbreit & col. (1957). Se encontró que por cada mol de MVA-PP titulado enzimáticamente por el método espectrofotométrico había 2,15 moles de Pi.

2.3.4.4. Análisis de nucleótidos contaminantes

El sustrato obtenido después de la columna de Dowex 50W contenía sustancias que absorben a 260 nm; sin embargo, después del tratamiento con carbono activado se pudo comprobar la desaparición total de estos contaminantes. Por consiguiente el MVA-PP utilizado se encontraba totalmente libre de nucleótidos.

2.3.4.5. Análisis de ácido mevalónico y fosfomevalónico

La preparación purificada del MVA-PP no contenía MVA detectable utilizando el ensayo espectrofotométrico para la quinasa mevalónica descrito en la sección 2.4.1. El ensayo espectrofotométrico de la quinasa fosfomevalónica reveló trazas de MVA-P contaminantes (entre 2 y 3%, aproximadamente).

2.3.4.6. Medición de la concentración del mevalonato-5-pirofosfato

Se tituló la concentración del MVA-PP mediante el ensayo para la descarboxilasa pirofosfomevalónica que se describe en la sección

2.4.3., utilizando alrededor de 80 mU de enzima. Midiendo la variación de absorbancia a 340 nm, que es proporcional a la cantidad de ADP producido, se estimó la concentración de MVA-PP. Se determinó también la radiactividad de la solución según lo descrito en la sección 2.6., encontrándose buena concordancia entre la radiactividad específica del [3-¹⁴C] MVA utilizado y la radiactividad específica del [3-¹⁴C] MVA-PP obtenido.

2.4. Ensayos enzimáticos

2.4.1. Ensayo espectrofotométrico de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica de hígado de cerdo.

Se utilizó el método espectrofotométrico descrito por Popják (1969), que 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 mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: NADH 0,24 mM; ATP 2,5 mM; PEP 0,5 mM; MgCl₂ 5 mM; amortiguador fosfato de potasio pH 7,0, 0,10 M; 2-mercaptoetanol 10 mM; PK y LDH, 8 unidades de cada una. A 0,96 ml del medio de reacción a 30° se agregaba 0,01 ml de solución de quinasas mevalónica o fosfomevalónica. Después de registrar la línea base por 2-3 minutos se agregaban 0,015 ml de DL-MVA 100 mM ó 0,03 ml de (R)-MVA-P 20 mM para iniciar la reacción. Las velocidades iniciales se determinaron de las pendientes de los trazados densitométricos.

2.4.2. Ensayo radiactivo de las quinasa mevalónica y fosfomevalónica de hígado de rata.

Para el ensayo de las quinasa mevalónica y fosfomevalónica en el líquido sobrenadante de 43.000 x g de hígado de rata se utilizó un método radiactivo que consistió en cuantificar mediante cromatografía en papel las cantidades de $[2-^{14}\text{C}]$ MVA-P y $[2-^{14}\text{C}]$ MVA-PP formados a partir de $[2-^{14}\text{C}]$ MVA.

El medio de ensayo (descrito por Ramachandran & Shah, 1976) contenía, en un volumen final de 0,6 ml: R,S- $[2-^{14}\text{C}]$ MVA (0,51 Ci/mol) 0,90 mM; MgCl_2 10 mM; ATP 5 mM; 2-mercaptoetanol 9,3 mM; amortiguador fosfato de potasio pH 7,4, 100 mM y proteína 0,5-0,75 mg/ml. Las incubaciones se realizaron por 30 minutos a 37° en tubos cónicos de centrífuga cerrados con tapones de goma, y la reacción se detuvo sumergiendo los tubos por 3 minutos en un baño de agua hirviente. Los tubos se enfriaron en hielo, se centrifugaron 10 min a 1500 x g, y las cantidades formadas de $[2-^{14}\text{C}]$ MVA-P y $[2-^{14}\text{C}]$ MVA-PP se determinaron analizando una alícuota del líquido sobrenadante en cromatografía ascendente en papel Whatman N°1 desarrollada en t-butanol: ácido fórmico:agua (20:5:8), en forma similar a lo descrito por García-Peregrín & col. (1972). El cromatograma se analizó según lo ya descrito en la sección 2.3.4.1. La actividad de la quinasa mevalónica se calculó a partir de las cantidades formadas de MVA-P (Rf 0,69) más la de MVA-PP (Rf 0,31), en tanto que la actividad de la quinasa fosfomevalónica se determinó en base solo al MVA-PP formado. En la figura 6 se muestra la distribución de radiactividad en un

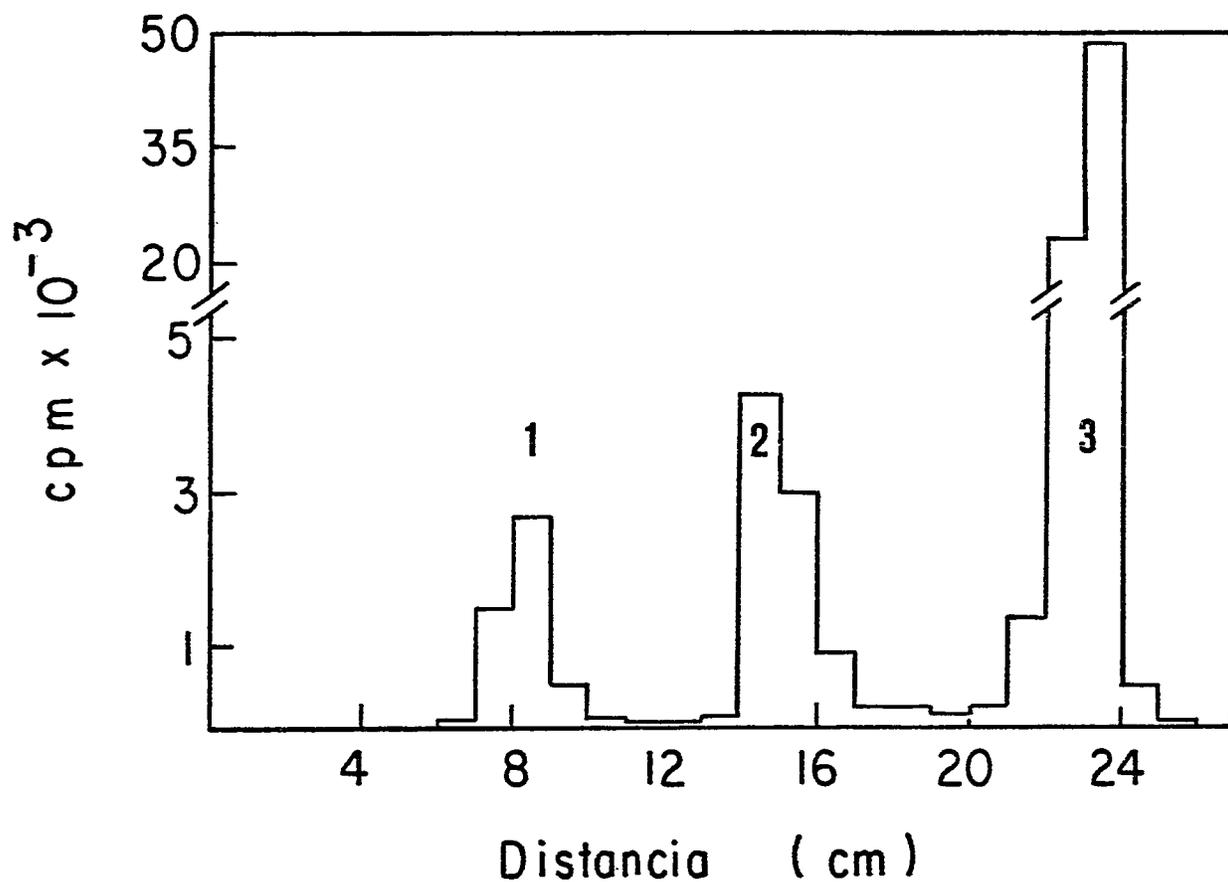


Figura 6. Análisis radiactivo de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica de hígado de rata.

Se aplicaron 100 μ l del líquido sobrenadante obtenido según lo descrito en la sección 2.4.2, en papel Whatman N°1, desarrollándose en forma ascendente en t-butanol: ácido fórmico: agua (20: 5: 8) y analizándolo como se detalla en la misma sección. Los picos 1, 2 y 3 corresponden a MVA-PP, MVA-P y MVA, respectivamente.

cromatograma, al analizar de esta manera las actividades enzimáticas anteriores. En experimentos preliminares se determinó que la actividad de cada enzima era lineal con respecto al tiempo hasta 60 min, y con respecto a la concentración de proteínas hasta 1,2 mg/ml, en las condiciones del ensayo. Las unidades de actividad enzimática de las condiciones del ensayo. Las unidades de actividad enzimática de las quinasa mevalónica y fosfomevalónica se definen como las cantidades de enzima que catalizan la formación de 1 nmol de MVA-P más MVA-PP, o de 1 nmol de MVA-PP, respectivamente, por minuto a 37° y en las condiciones de ensayo descritas. El ensayo de la quinasa fosfomevalónica presenta el inconveniente, naturalmente, de que el sustrato es generado in situ.

2.4.3. Ensayo espectrofotométrico de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo.

El método usado consistió en medir el ADP generado en la reacción mediante el acoplamiento de las reacciones catalizadas por la PK y la LDH, y que ha sido extensamente usado antes para medir esta y otras reacciones enzimáticas en que se produce ADP (Tchen, 1962; Popják, 1969; Cleland, 1979). Experimentalmente se siguió la desaparición de NADH a 30° y 340 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 550 o en uno Carl Zeiss DMR-22, provistos ambos de registrador, utilizando cubetas de cuarzo de 1 ml de volumen y 1 ml de paso óptico.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: Tris-HCl pH 7,0, 100 mM; KCl 100 mM; ATP 5 mM; MgCl₂ 5 mM; PEP 0,5 mM; PK 6,5 unidades y LDH 11,8 unidades. NADH se agregaba en forma sólida hasta que la A₃₄₀ fuese aproximadamente 1,4, lo que

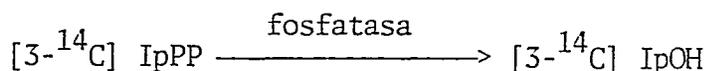
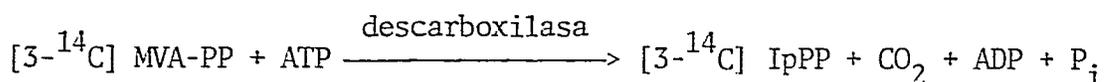
corresponde a 0,23 mM. A 0,9 ml de la mezcla de reacción se agregaba entre 0,005 y 0,1 ml de la solución de descarboxilasa pirofosfomevalónica. Después de registrar la línea base por 1 a 2 minutos se agregaba 0,015 ml de MVA-PP (0,118 μ moles) con lo cual se iniciaba la reacción. La velocidad de consumo de NADH, proporcional a la producción de ADP, se calculó de la pendiente del trazado densitométrico y del coeficiente de extinción milimolar ($6,22 \text{ cm}^2 \cdot \text{mmol}^{-1}$) del NADH (Horecker & Kornberg, 1948).

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que descarboxila un μ mol de MVA-PP por minuto a 30° , en las condiciones del ensayo. La actividad específica de una preparación de descarboxilasa pirofosfomevalónica se define como el número de unidades por mg de proteína. Todos los valores que se informan son el promedio de por lo menos dos determinaciones.

El ensayo se efectuó siempre en condiciones tales que la actividad de las enzimas auxiliares no fuera limitante de la velocidad bajo ninguna condición usada. De igual modo, se comprobó que la reacción variaba linealmente con respecto al tiempo y a la concentración de proteínas en el ensayo. Este método es útil entre pH 5,1 y 8,5; bajo pH 5,0 el NADH se destruye rápidamente (Lowry & col., 1961). En preparaciones muy crudas en que existen actividades fosfáticas y oxidasas de NADH este ensayo no es utilizable, y debe entonces usarse el método radiactivo que se describe a continuación.

2.4.4. Ensayo radiactivo de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo

El método consiste en medir la radiactividad del $[3-^{14}\text{C}]$ IpOH liberado luego de tratar el $[3-^{14}\text{C}]$ IpPP con un exceso de fosfatasa alcalina después de haber incubado la descarboxilasa pirofosfomevalónica con $[3-^{14}\text{C}]$ MVA-PP, como se ve en las siguientes ecuaciones:



Este ensayo se hace necesario cuando: a) se desea detectar actividad descarboxilásica en preparaciones muy crudas, en que el contenido de fosfatasas y NADH oxidasas es muy alto y por lo tanto no puede emplearse el ensayo espectrofotométrico descrito más arriba, y b) cuando se desea medir la actividad de la enzima en condiciones en que no puede usarse el ensayo espectrofotométrico, como por ejemplo bajo pH 5. Este ensayo radiactivo ha sido utilizado anteriormente para medir la descarboxilasa pirofosfomevalónica en homogeneizados de hígado de cerdo (Beytía, 1972) y de rata (Slakey & col., 1972). La posible presencia de isomerasa de IpPP no invalida el ensayo, ya que la fosfatasa agregada debería hidrolizar también al DMAPP.

La mezcla de reacción contenía un volumen final de 0,6 ml: amortiguador Tris-HCl pH 7,0, 100 mM; ATP 5 mM; MgCl_2 5 mM;

MVA-PP 0,41 mM ($2,45 \times 10^5$ cpm/ μ mol). La mezcla anterior, contenida en tubos cónicos cerrados con tapones de goma, se preincubaba 5 min a 30°, y la reacción se iniciaba agregando entre 0,005 y 0,10 ml de descarboxilasa pirofosfomevalónica. Posteriormente se incubaba 10 min a la misma temperatura, y la reacción se detenía agregando 5,5 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternero disuelta en 0,5 ml de Tris-HCl 1 M pH 8,4 e incubando por otras dos horas en iguales condiciones de temperatura. Al término de las dos horas, los tubos se ponían en hielo y enseguida se procedía a extraer con dos volúmenes de 1 ml de éter de petróleo (p.eb. 40-60°). Los tubos se agitaban vigorosamente en un agitador Vortex y se centrifugaban por 5-10 min a 1500 x g en una centrífuga de sobremesa a temperatura ambiente. La radiactividad se medía en 1 ml de las fases hexánicas adicionándolo a un frasco de cómputo de 20 ml de capacidad que contenía 3 ml de líquido de centelleo. Todos los valores que se informan son el promedio de por lo menos dos determinaciones. Los controles de tiempo cero fueron inactivos.

Se comprobó, usando descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo de actividad específica 6,3 U/mg de proteína, que este ensayo era lineal hasta los 20 min y los 5 μ g de proteína. Se debe hacer notar, respecto a este ensayo, que mide sólo una fracción de la actividad descarboxilásica debido a la volatilidad del IpOH. Un gran número de observaciones realizadas permite concluir que la actividad medida por el ensayo radiactivo es, aproximadamente, un 20% de la medida usando el ensayo espectrofotométrico descrito

antes. Las unidades de actividad enzimática son las mismas que las usadas en el ensayo espectrofotométrico.

2.4.5. Ensayo radiactivo de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.

Este ensayo era esencialmente igual al ensayo radiactivo utilizado para la enzima de hígado de pollo, excepto que el medio de reacción contenía en un volumen final también de 0,6 ml: amortiguador acetato de sodio pH 4,9 100 mM; $MgCl_2$ 5 mM; ATP 5 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; $[2-^{14}C]$ MVA-PP 0,68 mM ($2,45 \times 10^5$ cpm/ μ mol), y 0,4 a 0,6 mg de proteína. El ensayo se realizaba durante 15 min a 37° , al igual que la posterior hidrólisis de dos horas con fosfatasa alcalina. El ensayo es lineal hasta los 30 min y 1,2 mg de proteína (Jabalquinto & Cardemil, 1980). Se comprobó que la adición de mayor cantidad de fosfatasa no generaba mayor radiactividad soluble en el hexano, por lo que debía ser suficiente para hidrolizar todo el IpPP formado. La unidad de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima necesaria para producir 1 nmol de IpPP/min en las condiciones del ensayo.

2.5. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por los siguientes métodos: a) método del biuret (Gornall, 1949) en la estimación del contenido de proteínas de extractos crudos, fracciones precipitadas por sulfato de amonio (previamente dializadas), fracciones obtenidas luego del paso por columnas de DEAE-celulosa, y sobrenadante de $43.000 \times g$ de homogeneizados de hígado de rata;

b) absorbancia a 280 nm, para el análisis relativo de eluidos de columnas cromatográficas; y c) micrométodo, que permite analizar muestras con bajo contenido de proteínas o que contienen contaminantes como glicerol, Tris-HCl, 2-mercaptoetanol, que interfieren con el método de Lowry. Se utilizó el método de Bensadown y Weinstein (1976) según lo describe Alvear (1981), y que consiste en precipitar las proteínas con TCA en presencia de desoxicolato cuantificándolas luego por el método de Lowry.

2.6. Medición de radiactividad.

Las mediciones de radiactividad se efectuaron en un contador de centelleo líquido Beckman 3150P. Se utilizaron frascos de cómputo de 20 ml de capacidad, con 3 ó 10 ml de líquido de centelleo para muestras hexánicas o acuosas, respectivamente. El líquido de centelleo fue una solución compuesta de PPO 4 g, POPOP 0,125 g, 100 ml de etanol y 1 litro de tolueno (para muestras hexánicas), o bien de PPO 4 g; POPOP 0,125 g; 400 ml de etanol y 1 litro de tolueno (para muestras acuosas). Las muestras contadas fueron de hasta 1 ml para los volúmenes arriba mencionados. No se realizaron curvas de calibración para [^{14}C] por no disponer de patrones radiactivos, y debido a ésto todas las radiactividades se expresan en cpm.

2.7. Estudios con ratas.

En todos los estudios, salvo que se indique lo contrario, se usaron ratas machos cuyo peso fluctuaba entre 150 - 250 g de la cepa Sprague-Dawley, mantenidas con un período de luz desde las 8:00 a.m. a las 8:00 p.m. Los animales se alimentaron con una dieta basal conteniendo aproximadamente 20% de

proteína, 3,5% de lípidos, 6% de fibras, 67% de hidratos de carbono, y una mezcla de minerales y vitaminas (Alimentos Balanceados, Santiago). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical.

2.7.1. Preparación de homogeneizados de hígado de rata

Los hígados se extrajeron de los animales inmediatamente después de muertos, se lavaron con fosfato de potasio 100 mM pH 7,0, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, y se homogeneizaron en dos volúmenes del mismo amortiguador durante 30 segundos en una juguera con vaso de acero. Los homogeneizados se filtraron por varias capas de gasa y lana de vidrio y se centrifugaron a 43.000 x g durante 1 hora a 4°. Los sobrenadantes se filtraron por lana de vidrio para remover material lipídico, y se usaron inmediatamente.

2.7.2. Determinación de la glucosa sanguínea

Para la determinación de la concentración de la glucosa sanguínea, se extrajo sangre por punción cardíaca de los animales ligeramente anestesiados con éter etílico, y se analizó por el método de la neocuproína (Bittner y Manning, 1967) en un analizador automático Technicon Auto Analyzer II.

2.7.3. Efecto de la diabetes en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata

Un grupo de ratas se inyectó con 2 ml de amortiguador citrato de sodio 30 mM, pH 4,5. Un segundo grupo se inyectó con estreptozotocina (60 mg/kg) en el mismo amortiguador que

arriba, según lo descrito por Nepokroeff & col. (1974). Al cabo de 9 días, se tomaron 6 ratas de cada grupo, y se analizó la glucosa sanguínea como se describió antes. Al décimo día, se sacrificaron los restantes animales y se analizaron las actividades enzimáticas como se describió en la sección 2.4.2.

2.7.4. Efecto de la alimentación con dietas conteniendo 2% de colesterol o 3% de colestiramina en las actividades de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata

Para este experimento, se tomaron 3 grupos de ratas de 6 animales cada uno. El grupo control recibió su alimentación usual descrita más arriba, excepto que se ofreció molida a los animales. El grupo con colesterol recibió su alimento molido conteniendo 2% de colesterol. El grupo con colestiramina recibió su alimento molido y mezclado con un 3% de colestiramina. Al cabo de 6 días, todos los animales se sacrificaron y se analizó la actividad de las enzimas hepáticas como se describió en la sección 2.4.2.

2.7.5. Efecto del ayuno por 48 horas en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata

Para este experimento, se tomó un grupo de ratas control que recibió la dieta normal, y otro grupo que fue ayunado que sólo tuvo acceso al agua. Los dos grupos se sacrificaron a las 48 horas, y se

analizó la actividad de las enzimas hepáticas como se describió en la sección 2.4.2.

2.7.6. Relación entre el sexo del animal y la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.

Para ver la relación entre el sexo de las ratas y la actividad de las enzimas en estudio, se analizaron estas actividades en un grupo de ratas machos y otro de hembras. Las actividades enzimáticas se analizaron como ya se describió en la sección 2.4.2.

2.8. Análisis estadístico de los datos.

Todos los datos para los cuales hay 3 o más experimentos individuales se expresan como la media \pm error estándar y, cuando es apropiado, se usa la prueba de significación del t de Student.

Todas las rectas representadas en los gráficos han sido trazadas por el método de los cuadrados mínimos, salvo que se indique lo contrario.

2.9. Preparación de materiales para cromatografía

Todos los materiales usados se procesaron según las instrucciones que dan los fabricantes: DEAE-celulosa y fosfocelulosa (Catálogo Whatman); Sephadex G-10, G-25 y G-200 (Catálogo Pharmacia Fine Chemicals, 1979); hidroxilapatita (Catálogo Bio Rad, 1976).

Azul de dextrano-Sepharose fue donado gentilmente por la Sra. Antonieta Valenzuela (Laboratorio de Bioquímica General, Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile) quien lo sintetizó de acuerdo al método de Ryan y Vestling (1974). Con este polímero se preparó una columna de 10 x 2,5 cm en la cual se le puso abajo lana de vidrio y sobre ésta papel filtro. Se cargó la columna con el azul de dextrano-Sepharose que se encontraba suspendido en agua destilada, y una vez alcanzada la altura deseada se lavó con varios volúmenes de amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,0 y EDTA 0,1 mM. Luego se llevó a la cámara fría, donde se lavó con 1 a 2 volúmenes del mismo amortiguador pero conteniendo además glicerol al 20%. El polímero se regeneró lavándolo con 5 volúmenes de KCl 2 M, luego con 5 volúmenes de urea 4 M, y finalmente con agua destilada hasta una conductividad aproximada de al rededor de 0,01 mmho.

2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

2.10.1. En condiciones no desnaturantes.

La electroforesis en condiciones no desnaturantes se realizó de acuerdo con las técnicas usuales (Gabriel, 1971). Se prepararon geles de poliacrilamida en tubos de vidrio de 13 cm de largo y 0,5 cm de diámetro interno, utilizándose un aparato Hoeffler Scientific Instruments 101. El gel se preparó en acrilamida al 7,5% y bisacrilamida al 0,02% conteniendo TEMED al 0,0325 % (v/v) y persulfato de amonio al 0,025 %. La muestra se aplicó en glicerol al 20% (v/v), conteniendo además 0,002 ml de azul de bromofenol

al 0,05%.

El amortiguador de electroforesis consistía en Tris 25 mM y glicina 192 mM, pH 8,3. Se aplicó corriente constante de 2,5 mA por gel. Los geles se tiñeron 2 horas con azul de Coomassie al 0,25% en metanol 45% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y se destiñeron por difusión en metanol 5% (v/v), ácido acético 7,5% (v/v), durante 24 a 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 25 mm/min.

Para la detección de la actividad enzimática en los geles, éstos se extrajeron rápidamente y se cortaron transversalmente con un bisturí en segmentos de 1,0 cm los primeros 4 cm desde el frente, y luego de 0,33 cm hasta el origen. Cada trozo, cortado en pequeños pedazos, se transfirió a un tubo cónico, el que contenía 0,6 ml del medio para el ensayo radiactivo (sección 2.4.4.), pero sin [3-¹⁴C] MVA-PP. Después de preincubar los tubos 5 min a 30°, se inició la reacción agregando [3-¹⁴C] MVA-PP 0,024 mM 3×10^6 cpm/ μ mol), y se incubó 30 min a la misma temperatura. Luego se detuvo la reacción como se describe en la sección 2.4.4.

2.10.2. En condiciones desnaturantes.

La electroforesis en condiciones desnaturantes se realizó de acuerdo a Weber & Osborn (1969). Las proteínas se incubaron a 37° por 2 horas en amortiguador fosfato de Na 10 mM pH 7,0 conteniendo 1% de SDS, 1% (v/v) de 2-mercaptoetanol y 20% (v/v) de

glicerol, y luego fueron depositadas en geles cilíndricos de 0,5 x 13 cm que contenían acrilamida al 10%; bisacrilamida 0,27%; TEMED al 0,15% (v/v); y persulfato de amonio al 0,075%. La electroforesis se realizó a corriente constante de 8 mA por gel, con el electrodo positivo en la cámara inferior. Los geles se fijaron en metanol 40% (v/v) y ácido acético glacial 7% (v/v) durante 14 a 16 horas, y se tiñeron durante dos horas con azul de Coomassie al 0,25% en metanol al 5% (v/v). El desteñido se hizo por difusión durante 24-48 horas contra metanol 5% (v/v), ácido acético glacial 7,5% (v/v). Los registros densitométricos de los geles fueron efectuados como se describió para los geles en condiciones nativas (sección 2.10.1.).

2.11. Determinación del peso molecular de la descarboxilasa pirofosfomavalónica de hígado de pollo.

2.11.1. Por filtración en gel

El peso molecular de la enzima se determinó de acuerdo a Andrews (1965). Se empacó una columna Pharmacia de 2,6 cm de diámetro con Sephadex G-200 (previamente desaireado) en amortiguador fosfato de potasio 0,025 M pH 7,0; KCl 0,20 M; EDTA 0,1 mM hasta una altura de 83 cm, a temperatura ambiente. Una vez empacado el polímero se puso en la cámara fría y se equilibró con el mismo amortiguador a una velocidad de 18 ml/hora durante 72 horas; luego se invirtió el flujo dejándose a una velocidad de 13,4 ml/hora con la ayuda de una bomba peristáltica, durante 24 horas. Al momento de aplicar las muestras el flujo se mantuvo a la misma velocidad.

Se aplicaron sucesivamente 2,0 ml de una solución de azul-dextrano (2 mg/ml), y luego proteínas de peso molecular conocido: citocromo c de corazón de buey (12.400) (Andrews, 1964), quinasa pirúvica de músculo de conejo (237.000) (catálogo Worthington, 1979); seroalbúmina de bovino (67.000) (Andrews, 1964) y deshidrogenasa alcohólica de levadura (141.000) (catálogo Worthington, 1979). Todas las muestras fueron aplicadas en un volumen de 2 ml, colectándose fracciones de 2,4 ml. Las posiciones de elución de los diferentes marcadores se determinaron midiendo la absorbancia a 600 nm para el azul de dextrano, a 412 nm para el citocromo c y a 280 nm para la seroalbúmina. La posición de elución tanto para la quinasa pirúvica como para la deshidrogenasa alcohólica se determinó por el ensayo espectrofotométrico de actividad (catálogo Worthington, 1979).

2.11.2. Por gradientes de sacarosa.

Los gradientes de sacarosa fueron preparados entre 5 y 20% en amortiguador fosfato de potasio 10 mM pH 7,0; EDTA 0,1 mM; KCl 0,1 M en tubos de nitrocelulosa de 5 ml para el rotor SW 50L de la ultracentrífuga Beckman. Como marcadores se utilizaron citocromo c de corazón de buey (12.400) (Andrews, 1964), seroalbúmina de bovino (67.000) (Andrews, 1964), deshidrogenasa láctica de corazón de bovino (140.000) (catálogo Worthington, 1979) deshidrogenasa alcohólica de hígado de caballo (83.000) (Reed & Rilling, 1975). Las muestras se aplicaron en amortiguador Tris-HCl 10 mM; pH 7,0 KCl 0,1 M; EDTA 0,1 mM, en un volumen de 0,1 ml. La descarboxilasa pirofosfomevalónica fue aplicada separadamente; citocromo

c y deshidrogenasa láctica se aplicaron juntas en un mismo tubo, al igual que la seroalbúmina de bovino y la deshidrogenasa alcohólica. Se centrifugó durante 20 horas a 135.000 x g en una ultracentrífuga Beckman modelo L5-40 a 4°. Terminada la centrifugación se pincharon los tubos y se colectaron fracciones de aproximadamente 0,2 ml (12 gotas) de cada uno de los 3 tubos. Esta operación se realizó en pieza fría a 4°. A cada fracción se agregaron 0,8 ml de amortiguador fosfato de potasio 10 mM pH 7,0; EDTA 0,1 mM; KCl 0,1 M, procediéndose a determinar la posición de cada proteína en el gradiente. Citocromo c y seroalbúmina de bovino fueron determinados por su absorción a 412 y 280 nm, respectivamente; la deshidrogenasa alcohólica, la deshidrogenasa láctica y la descarboxilasa pirofosfomevalónica se determinaron por ensayo enzimático de actividad usando en los tres casos un espectrofotómetro Cary 118C provisto de registrador.

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

Se usó la técnica descrita en la sección 2.10.2. Se utilizaron como marcadores de peso molecular mezclas de hemoglobinas entrecruzadas de pesos moleculares 16.000, 32.000, 48.000 y 64.000, obtenidas de Sigma Chemical Company, EE.UU.

2.12. Determinación del punto isoeléctrico de la descarboxilasa pirofosfomevalónica

Para la determinación del punto isoeléctrico se utilizó la técnica del cromatoenfoco en columna. El polímero (PBE 94,

Pharmacia Fine Chemicals) se suspendió en imidazol 25 mM pH 6,4; EDTA 0,1 mM, se desgasificó, y luego se montó una columna de 1 x 14 cm, que posteriormente se equilibró a 4°, lavándola con 15 volúmenes del mismo amortiguador. La muestra (6,6 unidades de descarboxilasa pirofosfomevalónica proveniente de la etapa de P-celulosa conteniendo 10 mg de proteína, en un volumen de 25 ml del mismo amortiguador) se aplicó con un flujo de 50 ml/hora, para luego eluir la columna con 100 ml de Polibuffer 74 pH 4,0, al mismo flujo. Se recogieron fracciones de 3 ml en las que se midió el pH y a las cuales inmediatamente después se les agregó 0,5 ml de fosfato de potasio 1 M pH 7,0. Luego, se determinó la absorbancia a 280 nm y la actividad enzimática a cada fracción.

2.13. Determinación de parámetros cinéticos.

Los estudios se hicieron ensayando la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por el ensayo espectrofotométrico, descrito en la sección 2.4.3. Las K_m verdaderas para el MVA-PP y el ATP fueron determinadas preparando varios medios de reacción que contenían cantidades constantes de amortiguador Tris-HCl pH 7,0, KCl, NAD, PEP, PK y LDH (ver sección 2.4.3.) y cantidades variables de ATP y Mg^{+2} (este último se mantuvo siempre 5 mM sobre el ATP, de modo que la concentración de Mg^{+2} libre en el medio fuera constante, según lo descrito por Storer & Cornish-Bowden, 1976).

2.14. Efecto de metales bivalentes

El efecto de la concentración del Mg^{+2} se determinó variando la concentración del metal a concentraciones constantes de ATP y de MVA-PP. En este caso, se usó el ensayo radiactivo descrito en la sección 2.4.4., ya que la quinasa pirúvica requiere de Mg^{+2} para su actividad, y esto imposibilita el uso del ensayo espectrofotométrico. Para establecer si otros iones metálicos podían reemplazar a Mg^{+2} en la reacción, se reemplazó éste por los cloruro de Mn^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} o Ba^{+2} , los que se probaron a una concentración de 5 mM. Se realizaron controles con EDTA 2 mM y 16 mM.

2.15. Efecto del pH sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo.

El efecto del pH en la actividad enzimática se determinó efectuando el ensayo radiactivo en amortiguadores 100 mM entre pH 2,18 y 8,85. Se utilizaron los siguientes amortiguadores: glicina-HCl, ácido ortofosfórico-KOH, ácido fórmico-KOH, ácido cítrico-citrato de sodio, MES-HCl, Tris-HCl.

2.16. Estabilidad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo en función del pH.

La enzima se incubó 10 min a 0° en un volumen final de 0,06 ml conteniendo los siguientes amortiguadores 100 mM entre pH 2,12 y 8,85: KCl-HCl, glicina-HCl, ácido fórmico-KOH, ácido cítrico-citrato de sodio, MES-HCl, Tris-HCl. La actividad remanente se ensayó en una alícuota de 25 μ l por el método radiactivo.

2.17. Inhibición de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo por citrato, fosfato y ftalato

La actividad enzimática se midió por el método radiactivo en presencia de amortiguadores ácido cítrico-citrato de Na (pH 3-6,4), ácido ftálico-KOH (pH 2,65-4) o fosfato de K (pH 6-7,4), a concentración 100 mM.

2.18. Efecto de compuestos sulfhidrilos sobre la estabilidad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo

El efecto de 2-mercaptoetanol se estudió con enzima proveniente de azul-dextrano-Sepharose (act. esp. 3,9 U/mg), en amortiguador fosfato de K 10 mM pH 7,0; EDTA 0,1 mM. Se tomaron alícuotas de 1 ml conteniendo 40 mU, que se dejaron en presencia y ausencia de 2-mercaptoetanol 10 mM a 4°. Se realizaron duplicados conteniendo 0,68 mg de albúmina de bovino, con el efecto de ver la influencia de la concentración de proteínas en la estabilidad de la enzima. La actividad se ensayó por el método espectrofotométrico en alícuotas de 0,05 a 0,1 ml.

2.19. Especificidad de nucleótido de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo.

Para establecer si otros nucleótidos podían reemplazar al ATP, se reemplazó este por GTP, UTP o CTP en el ensayo radiactivo usual.

2.20. Modificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo por fenilglioxal

2.20.1. Reacción de inactivación

La enzima se dializó 4 horas contra varios cambios de TEA-HCl 100 mM, pH 8,15 conteniendo 0,1 mM EDTA. El fenilglioxal se preparó en el mismo amortiguador y se guardó congelado. A la solución de enzima en amortiguador TEA, preincubada a 30°, se le agregó el fenilglioxal a la concentración requerida. A tiempos adecuados se tomaron alícuotas de 0,025 ml para el ensayo inmediato de la actividad por el método espectrofotométrico. El control consistió en otra muestra de enzima tratada en forma similar a la cual se agregó el mismo volumen de solvente en vez de fenilglioxal. El efecto de la concentración del reactivo se determinó incubando la enzima con concentraciones de fenilglioxal que variaron desde $1,29 \times 10^{-4}$ M a $1,03 \times 10^{-3}$ M.

2.20.2. Efecto protector de los sustratos

El efecto de los sustratos en la reacción de inactivación se probó incubando la enzima con MVA-PP o con ATP en presencia y ausencia de Mg^{+2} . Paralelamente se vió el efecto de Mg^{+2} en la velocidad de inactivación y se hicieron controles de la enzima tratada con fenilglioxal y de la enzima incubada con cada uno de los sustratos en ausencia de fenilglioxal.

El efecto de la concentración de los sustratos en la reacción de inactivación se determinó variando su concentración en ausencia de Mg^{+2} . El MVA-PP se varió entre $1,1 \times 10^{-6}$ M y $1,68 \times 10^{-5}$ M,

y el ATP entre $1,95 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $4,88 \times 10^{-3} \text{ M}$.

2.20.3. K_m aparentes para la enzima modificada

Se determinaron las K_m aparentes para ambos sustratos con la descarboxilasa pirofosfomevalónica parcialmente inactivada por fenilgloxal. Para ello, la enzima se trató con fenilgloxal a una concentración final de $4,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ y se incubó a 30° durante 10 minutos. La reacción se detuvo filtrándola inmediatamente por una columna de Sephadex G-10 de $20 \times 1 \text{ cm}$ equilibrada en Tris-HCl $0,1 \text{ M}$ pH 7,8, conteniendo $0,1 \text{ mM}$ EDTA. La columna se eluyó a temperatura ambiente, recogiendo fracciones de 1 ml en las que se analizó la actividad enzimática. La misma columna, una vez lavada con 10 volúmenes del mismo amortiguador, se usó para filtrar otra alícuota de enzima (no tratada con fenilgloxal), la que se colectó y analizó de igual manera que antes y constituyó el control.

Las K_m aparentes se determinaron en las muestras de enzima eluidas de la columna. En la determinación de la K_m aparente para el MVA-PP, su concentración varió entre $3,3 \times 10^{-6} \text{ M}$ y $9,9 \times 10^{-5} \text{ M}$, manteniendo las concentraciones de ATP y Mg^{+2} fijas en $4,9 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $1 \times 10^{-2} \text{ M}$, respectivamente. Cuando se determinó la K_m aparente para ATP, éste se varió entre $1,96 \times 10^{-4} \text{ M}$ y $4,9 \times 10^{-5} \text{ M}$, manteniendo la concentración de Mg^{+2} $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ sobre la de ATP, y la de MVA-PP fija a $9,9 \times 10^{-5} \text{ M}$.

RESULTADOS

3.1. Efecto de la diabetes, diversas dietas, y sexo del animal en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.

3.1.1. Efecto de la diabetes

Para estudiar el efecto de la diabetes en las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y en la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata, se tomó un grupo de 12 animales a los que se inyectó estreptozotocina (60 mg/Kg), y otro grupo también de 12 animales a los que se inyectó citrato 30 mM, pH 4,5, como control, según se describe en Materiales y Métodos (sección 2.7.3.). Un tratamiento similar a éste produce una disminución significativa en la velocidad de incorporación de $[2-^{14}\text{C}]$ MVA a colesterol por homogeneizados de hígado de ratas diabéticas, a los 14 días después de haber inyectado estreptozotocina, acompañada de altos niveles de glucosa plasmática (Cayen & col., 1975).

Para comprobar que efectivamente en el caso que se describe se había producido un estado diabético, se midió el nivel de glucosa sanguínea en 6 ratas control y 6 tratadas a los 9 días después de haber inyectado la estreptozotocina. Los niveles encontrados (tabla 2) indican que el grupo tratado tenía niveles de glucosa circulante significativamente aumentados. Por lo demás, el estado diabético ya se había apreciado por el gran consumo de agua y poliuria de los animales tratados. En vista de estos resultados, se decidió

Tabla 2. Niveles de glucosa plasmática en ratas controles y diabéticas.

Grupo	Peso ratas (g)	Glucosa plasmática (mg/100 ml)
Control (6)	225 \pm 3,6	136 \pm 6,8
Diabético (6)	190 \pm 14	545 \pm 45,2*

Los dos grupos de ratas se inyectaron ya sea con una solución de estreptozotocina en amortiguador citrato (grupo diabético) o sólo con amortiguador citrato (grupo control), como se describe en la sección 2.7.5. Al cabo de 9 días, se extrajo sangre de los animales por punción cardíaca bajo anestesia suave con éter etílico, y se determinó la concentración de glucosa según se describe en la sección 2.7.2. El número de animales se expresa entre paréntesis.

* Significativamente diferente del control ($P < 0,001$)

sacrificar los animales al día siguiente (10 días después de iniciado el tratamiento). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3, en la que puede apreciarse que la actividad de las tres enzimas disminuye significativamente en ratas diabéticas. Disminuciones esencialmente similares se obtienen si se expresan las actividades enzimáticas como U/hígado o U/100 g de rata. Las disminuciones observadas en las tres actividades enzimáticas medidas son comparables a la disminución en la velocidad de síntesis de esteroides a partir de [2-¹⁴C] MVA en homogeneizados de hígados de ratas diabéticas (Cayen & col., 1975), pero no son tan marcadas como la disminución en la actividad de la reductasa de HMG-CoA observada en homogeneizados de hígado de ratas 7 días después de la inyección de estreptozotocina (Brown & col., 1979), que cae al 7%.

3.1.2. Efecto de la alimentación con dietas conteniendo 2% de colesterol o 3% de colestiramina

Para estudiar el efecto de las distintas dietas en las tres actividades enzimáticas de hígado, se alimentaron tres grupos de animales con dieta normal, o conteniendo ya sea 2% de colesterol o 3% de colestiramina, como se describe en la sección 2.7.4. Los animales se sacrificaron al cabo de 6 días, y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4. Puede verse que todas las actividades enzimáticas analizadas aumentan sobre el valor del grupo control en el caso de las ratas alimentadas con 3% de colestiramina, en tanto que se aprecia el efecto opuesto cuando se comparan los valores del grupo control con los del grupo alimentado con 2% de

Tabla 3. Efecto de la diabetes en la actividad de las quininas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.

Grupo	Peso animales (g)	Peso hígados (g)	Proteínas sobre nadante 43.000xg (mg)	Quinasa mevalónica	Actividad enzimática (nmoles·min ⁻¹ ·mg de proteína ⁻¹)	
					Quinasa fosfomevalónica	Descarboxilasa pirofosfomevalónica
Control (5)	233 ± 7,0	10,9 ± 0,5	377 ± 34	3,91 ± 0,62	1,09 ± 0,40	0,77 ± 0,10
Diabético (6)	189 ± 13	9,3 ± 0,4	387 ± 34	2,37 ± 0,33*	0,46 ± 0,11*	0,21 ± 0,07**

Los dos grupos de ratas se inyectaron ya sea con una solución de estreptozotocina en amortiguador citrato (grupo diabético) o sólo con amortiguador citrato (grupo control) como se describe en Métodos (sección 2.7.3.). Los animales se sacrificaron luego de 10 días, y las actividades enzimáticas se ensayaron como se describe en las secciones 2.4.2. y 2.4.5., excepto que las quininas se incubaron 45 minutos. El número de animales se indica entre paréntesis. Los pesos iniciales de los grupos control y diabético fueron 159 ± 3,4 g y 153 ± 8,8 g, respectivamente.

* Significativamente diferente del control (P < 0,002)

** Significativamente diferente del control (P < 0,001)

Tabla 4. Efecto de la alimentación con dietas conteniendo colesterol o colestiramina en las quinazas mevalónica y fosfomevalónica y la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.

Grupo	Peso animales (g)	Peso hígados (g)	Proteínas sobrenadante 43.000xg (mg)	Quinasa mevalónica	Actividad enzimática (nmoles·min ⁻¹ · mg proteína ⁻¹)	
					Quinasa fosfomevalónica	Descarboxilasa pirofosfomevalónica
Control (6)	208 ± 13,3	11,1 ± 0,92	541 ± 48	6,25 ± 0,45	1,61 ± 0,11	0,76 ± 0,03
2% Colesterol (6)	221 ± 9,3	11,5 ± 0,61	629 ± 33	3,48 ± 0,32*	0,69 ± 0,06*	0,28 ± 0,03*
3% Colestiramina (6)	226 ± 9,5	11,9 ± 0,59	556 ± 32	8,16 ± 0,35**	2,84 ± 0,12*	2,12 ± 0,16*

Los grupos de ratas se alimentaron con dietas conteniendo colesterol al 2% o colestiramina al 3% durante 6 días, como se describe en la sección 2.7.4. Las actividades enzimáticas se midieron como se indica en las secciones 2.4.2. y 2.4.5. El número de animales se indica entre paréntesis. Los pesos iniciales de los grupos control, 2% colesterol y 3% colestiramina fueron, respectivamente; 165 ± 9,5 g, 169 ± 9,1 g, y 172 ± 8,3 g.

* Significativamente diferente del control (P < 0,001)

** Significativamente diferente del control (P < 0,01)

colesterol.

Los cambios en las actividades enzimáticas medidas siguen la misma dirección que los observados para la reductasa de HMG-CoA (Brown & col., 1979), y para la tiolasa de acetoacetyl-CoA y la sintetasa de HMG-CoA citosólicas (Clinkenbeard & col., 1975), medidas en el hígado de ratas en condiciones similares de alimentación.

3.1.3. Efecto del ayuno

En este caso, se analizaron las tres actividades enzimáticas en hígado de ratas controles y de ratas ayunadas por 48 horas, tal como se describe en la sección 2.7.5. Los resultados obtenidos (tabla 5) evidencian que tanto para las quinasas mevalónica y fosfo mevalónica como para la descarboxilasa pirofosfomevalónica los niveles de actividad son significativamente menores con respecto al control en el grupo ayunado.

El hallazgo de la menor actividad para las quinasas mevalónica y fosfomevalónica en hígado de ratas ayunadas se contrapone con lo comunicado por Slakey & col. (1972), quienes no observaron variación en estas dos actividades enzimáticas hepáticas en ratas sometidas a una situación similar. Es de hacer notar, sin embargo, que el ensayo utilizado por Slakey & col. (1972) fue diferente al empleado por nosotros, ya que ellos usaron un ensayo espectrofotométrico para medir estas enzimas y en este trabajo se ha usado un ensayo radiactivo. El ensayo de Slakey y col. (1972) es esencialmente igual al ensayo utilizado en esta tesis para la medición espectrofotométrica de la actividad de las quinasas mevalónica y

Tabla 5. Efecto del ayuno en la actividad de las quinasa mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.

Grupo	Peso animales (g)	Peso hígados (g)	Proteínas sobre-nadante 43.000xg (mg)	Actividad enzimática ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$)		
				Quinasa mevalónica	Quinasa fosfomevalónica	Descarboxilasa pirofosfomevalónica
Control (8)	196 ± 20	9,73 ± 1,0	498 ± 56	6,60 ± 0,45	1,70 ± 0,11	0,69 ± 0,08
Ayuno (6)	178 ± 5,5	5,92 ± 0,33	330 ± 17	4,63 ± 0,24*	0,43 ± 0,04**	0,30 ± 0,02**

Las ratas se ayunaron por 48 horas antes del experimento, y las actividades enzimáticas se midieron según lo descrito en las secciones 2.4.2. y 2.4.5. El número de animales se indica entre paréntesis. Los pesos iniciales de los grupos control y ayuno fueron 181 ± 16,8 g, 206 ± 7 g, respectivamente.

* Significativamente diferente del control ($P < 0,01$)

** Significativamente diferente del control ($P < 0,001$).

fosfomevalónica en eluidos de DEAE-celulosa (sección 2.3.1.), y presenta el grave inconveniente de ser interferido por la presencia de fosfatasas y oxidasas de NADH presentes en extractos crudos. En un intento por tratar de explicar la discrepancia entre nuestros datos y los de Slakey & col. (1972), tratamos de medir las quinasas mevalónica y fosfomevalónica tanto en el sobrenadante de 43.000 x g usado por nosotros o en el de 105.000 x g empleado por los autores anteriores, utilizando exactamente las condiciones experimentales descritas por ellos. Este intento, sin embargo, no tuvo éxito ya que la velocidad de consumo de NADH debida a la presencia de enzimas contaminantes no permitió la detección de la actividad de las quinasas. Los valores de actividad de la quinasa mevalónica que se ven en la tabla 5 representan alrededor de un 8% de la actividad de las enzimas contaminantes, de acuerdo a la velocidad de consumo de NADH medida en varios ensayos (las velocidades de consumo de NADH variaron entre 110 y 135° nmoles min⁻¹ mg⁻¹). Estos datos sirven para visualizar las dificultades e inexactitud del ensayo espectrofotométrico cuando se usa en extractos crudos, y explica la amplia aceptación del ensayo radiactivo cuando se han analizado estas enzimas en extractos de hígado de rata (Ramachandran & Shah, 1976), de hígado de conejo (Markley & Smallman, 1961), de hígado o riñón de pollo (García-Peregrín & col., 1978; Linares & col., 1980), de tejidos vegetales (Gray & Kekwick, 1973; Loomis & Battaile, 1963) o de glándulas suprarrenales de rata (Balasubramaniam & col., 1978).

La menor actividad observada para la descarboxilasa pirofosfomevalónica en los extractos hepáticos provenientes de ratas

ayunadas observadas en este trabajo es perfectamente comparable con los valores dados por Slakey & col. (1972) para esta enzima en una situación similar en que, además, se usó básicamente el mismo ensayo para su medición.

Con los datos presentados en la tabla 5 se completa la información respecto al efecto del ayuno sobre la actividad de todas las enzimas que catalizan etapas de la ruta biosintética del colesterol entre acetil CoA y escualeno (Clinkenbeard & col., 1975; Brown & col., 1979; Slakey & col., 1972). Todas estas actividades enzimáticas presentan valores bajo los basales en el hígado de ratas ayunadas por 48 horas.

3.1.4. Actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en hígado de ratas machos y hembras.

El análisis de estas actividades enzimáticas reveló marcadas diferencias entre los valores obtenidos, dependiendo del sexo del animal. Como se ve en la tabla 6, la quinasa fosfomevalónica y la descarboxilasa pirofosfomevalónica tienen mayor actividad en el hígado de ratas hembras, en tanto que no hay variación en la actividad de la quinasa mevalónica. Los datos obtenidos para la quinasa fosfomevalónica y para la descarboxilasa pirofosfomevalónica en ratas hembras son comparables a la mayor actividad de la reductasa de HMG-CoA en homogeneizados hepáticos provenientes de ratas hembras tanto normales como alimentadas con una dieta conteniendo colestiramina (Carlson & col., 1978), y sugieren que otras enzimas

Tabla 6. Influencia del sexo de los animales en la actividad de las quinasa mevalónica y fosfomevalónica y descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata.

Grupo	Peso animales (g)	Peso hígados (g)	Proteínas sobre-nadante 43.000xg (mg)	Actividad enzimática ($\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$)		
				Quinasa mevalónica	Quinasa fosfomevalónica	Descarboxilasa pirofosfomevalónica
Machos (10)	202 ± 16,5	10,4 ± 0,96	519 ± 54	6,45 ± 0,37	1,66 ± 0,09	0,75 ± 0,06
Hembras (8)	171,4 ± 5,4	8,7 ± 0,30	444 ± 17,5	6,48 ± 0,24	2,35 ± 0,17*	1,01 ± 0,01*

Las actividades enzimáticas se midieron como se describe en las secciones 2.4.2. y 2.4.5. El número de animales se indica entre paréntesis.

* Significativamente distinto del control ($P < 0,01$)

del metabolismo del colesterol hepático pudieran tener también mayor actividad en ratas hembras que en ratas machos. La razón fisiológica de estas diferencias no se conoce.

3.2. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo

3.2.1. Experimentos preliminares

El método de purificación que se escogió para la obtención de la descarboxilasa pirofosfomevalónica fue el resultado de un gran número de experimentos en pequeña escala. En estos experimentos se pudo comprobar que la inclusión de sulfato de protamina previa a la centrifugación del homogeneizado, daba como resultado una pella perfectamente adherida a las paredes del tubo luego de centrifugar a 23.500 x g durante 15 minutos. Un estudio realizado acerca del efecto de pH ácidos en este sobrenadante reveló (tabla 7) que podía lograrse un aumento en la actividad específica de la enzima de casi 2 veces ajustando el pH a 5,3 con ácido acético glacial y centrifugando después las proteínas precipitadas, sin pérdida de actividad.

Otros sistemas de purificación ensayados fueron los siguientes:

--- Sepharose 4B y carboximetil-celulosa no resultaron útiles, pues no se logró purificación de la enzima.

--- Cromatoenfoco en columna no resultó tampoco un buen sistema ya que la recuperación de la enzima fue extremadamente baja (8%, sección 3.3.9.), con muy poco aumento de la actividad específica.

Tabla 7. Actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en función del pH empleado para precipitar proteínas del sobrenadante proveniente del tratamiento con sulfato de protamina.

pH	Actividad específica (mU/mg)	Unidades totales (mU/ml)
7,0	1,06	28,4
5,3	1,84	30,2
5,0	1,60	27,5
4,7	0,95	16,9
4,1	0,02	0,8

A diferentes alícuotas a 4° de una solución de proteínas provenientes del tratamiento con sulfato de protamina y posterior centrifugación del homogeneizado de hígado de pollo, se les agregó ácido acético glacial hasta los pH indicados. Inmediatamente después se centrifugó a 10,500 x g durante 5 minutos, y se determinó la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en el sobrenadante. Se empleó el ensayo radiactivo descrito en la sección 2.4.4, excepto que se incubó a 37° durante 15 minutos en amortiguador ácido acético-acetato de sodio 100 mM pH 5,0.

--- Columnas de ATP-agarosa. Se pasaron alícuotas de enzima provenientes de la etapa de Sephadex G-200 por 3 tipos diferentes de columnas ATP-agarosa (uniones ATP-agarosa a través del grupo amino N_6 , del C_8 y de los hidroxilos de la ribosa). La enzima no fue retenida en ningún caso, así como tampoco las proteínas contaminantes.

--- Elución con ATP de la columna de azul de dextrano-Sepharose resultó ineficaz, usando una concentración de ATP 1 mM. No se probaron concentraciones mayores.

3.2.2. Método de purificación adoptado.

Todas las operaciones se efectuaron a $0-4^\circ$ y todas las soluciones contenían 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 0,1 mM, a menos que se indique lo contrario.

3.2.2.1. Preparación del extracto crudo.

Un kilogramo de hígado de pollo se cortó en trozos pequeños y se homogeneizó con 3 volúmenes de amortiguador fosfato de potasio 100 mM pH 7,0 conteniendo EDTA 1mM en un homogeneizador Waring Blendor a máxima velocidad durante 1 minuto. El homogeneizado se filtró a través de capas de gasa y lana de vidrio, y al filtrado se le agregó una solución de sulfato de protamina (30 mg/ml en el mismo amortiguador) de modo de obtener una concentración final de 1,5 mg/ml. Se agitó luego por 2 minutos y se centrifugó por 15 minutos a $23.500 \times g$. El sobrenadante se filtró a través de gasa y lana de vidrio y se ajustó a pH 5,3 con ácido acético glacial, centrifugándolo de inmediato a la misma velocidad

durante 5 minutos. El sobrenadante se filtró nuevamente a través de gasa y lana de vidrio, y el pH se reajustó a 7,0 con KOH 10 M.

3.2.2.2. Fraccionamiento con sulfato de amonio.

Al sobrenadante de la etapa anterior se le agregó lentamente y con agitación suave sulfato de amonio sólido hasta una concentración de 35% de saturación, y manteniendo el pH en 7,0 con KOH 10 M. Terminada la adición de sal, se dejó agitando suavemente 30 minutos y luego se centrifugó a 23.500 x g durante 15 minutos. Al sobrenadante se agregó más sulfato de amonio de modo de elevar su concentración a 60% de saturación, procediéndose en forma similar al paso anterior. El precipitado 35-60% se suspendió en 400 ml de fosfato de potasio 1 mM pH 7,0, y se dializó por 18 horas contra 8 litros del mismo amortiguador.

3.2.2.3. Cromatografía en DEAE-celulosa.

El material dializado de la etapa anterior se diluyó con fosfato de potasio 1 mM pH 7,0 de modo de bajar su conductividad a 1,5 mmho, y se aplicó en una columna de DEAE-celulosa de 27 x 6,5 cm equilibrada con amortiguador fosfato de potasio 10 mM pH 7,0, con un flujo de aproximadamente 650 ml/hora. Una vez aplicada la muestra, se lavó la columna con 4 litros de amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 al mismo flujo, y enseguida se aplicó una gradiente lineal del mismo amortiguador entre 60 y 140 mM

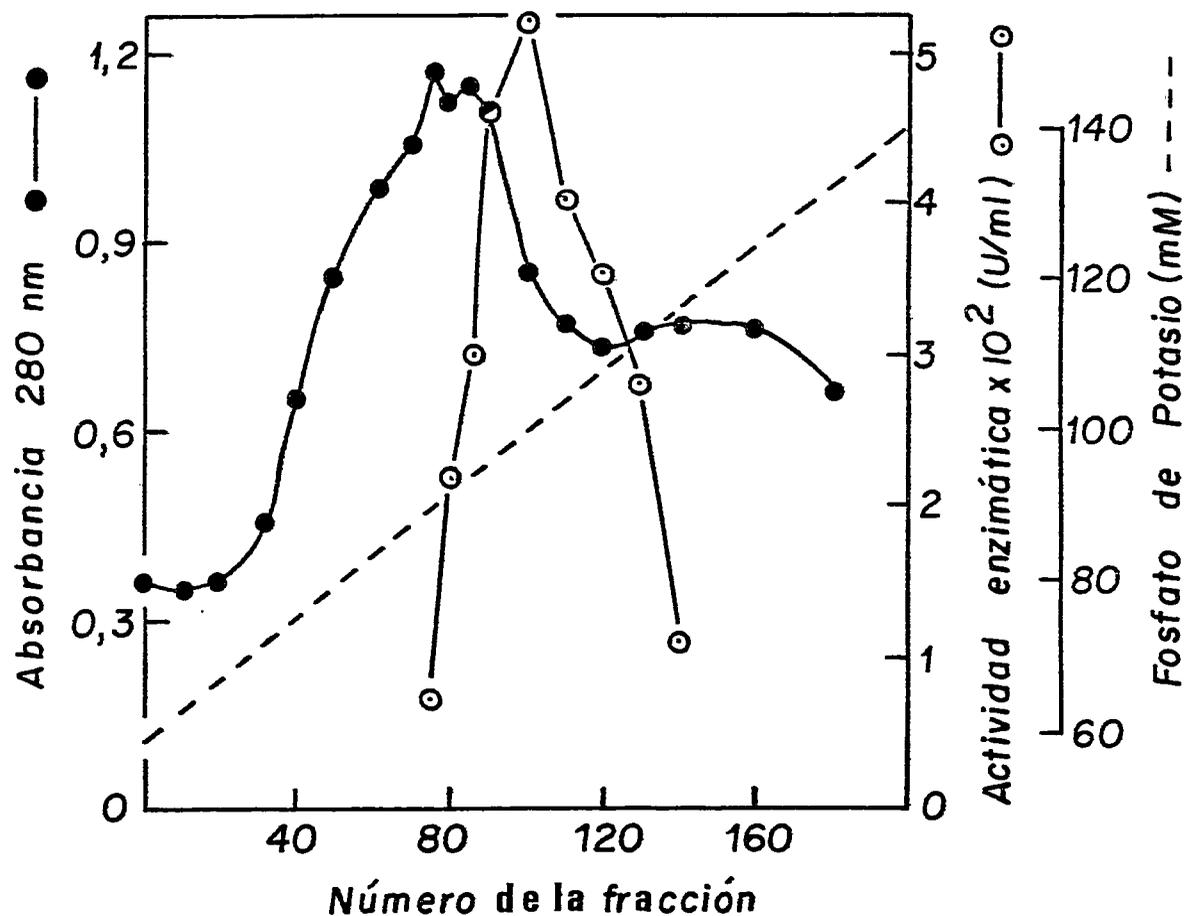


Figura 7. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en DEAE-celulosa.

Se utilizó una columna de 6,5 x 27 cm, equilibrada en amortiguador fosfato de potasio 10 mM pH 7,0, y a ella se aplicó la solución proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó con 4 litros del mismo amortiguador 50 mM, y se hizo pasar enseguida un gradiente de fosfato de potasio entre 60 y 140 mM (2 litros de c/u) al mismo pH. Se colectaron fracciones de 20 ml a un flujo de 200 ml/hora. En el gráfico se presenta solo la elución con la gradiente. Se mezclaron las fracciones cuya razón $\frac{U/ml}{A_{280}}$ era mayor de 0,050.

(2 litros de cada uno), colectándose fracciones de 20 ml con un flujo de 200 ml/hora mantenido con ayuda de una bomba peristáltica. El resultado de esta elución se presenta en la figura 7. El eluido seleccionado se concentró agregando sulfato de amonio hasta un 80% de saturación y EDTA 1 mM. Después de centrifugar a 23.500 x g durante 15 minutos, el sedimento se suspendió en 50 ml de fosfato de potasio 10 mM pH 7,0 conteniendo KCl 200 mM.

El grado de purificación y el rendimiento hasta esta etapa son alrededor de 51 veces y 50%, respectivamente, según mediciones realizadas usando el método de ensayo radioactivo (sección 2.4.4.). El método espectrofotométrico (sección 2.4.3.), utilizando en el análisis de la columna de DEAE-celulosa y en todas las etapas que siguen no puede emplearse antes de esta etapa debido a la gran cantidad de actividades enzimáticas contaminantes, como ya se indicó en Materiales y Métodos al describir el ensayo espectrofotométrico.

3.2.2.4. Cromatografía en Sephadex G-200

La solución enzimática de la etapa anterior se aplicó a una columna de Sephadex G-200. Una vez aplicada la muestra, se eluyó con el mismo amortiguador y se recogieron fracciones de 20 ml. El perfil cromatográfico

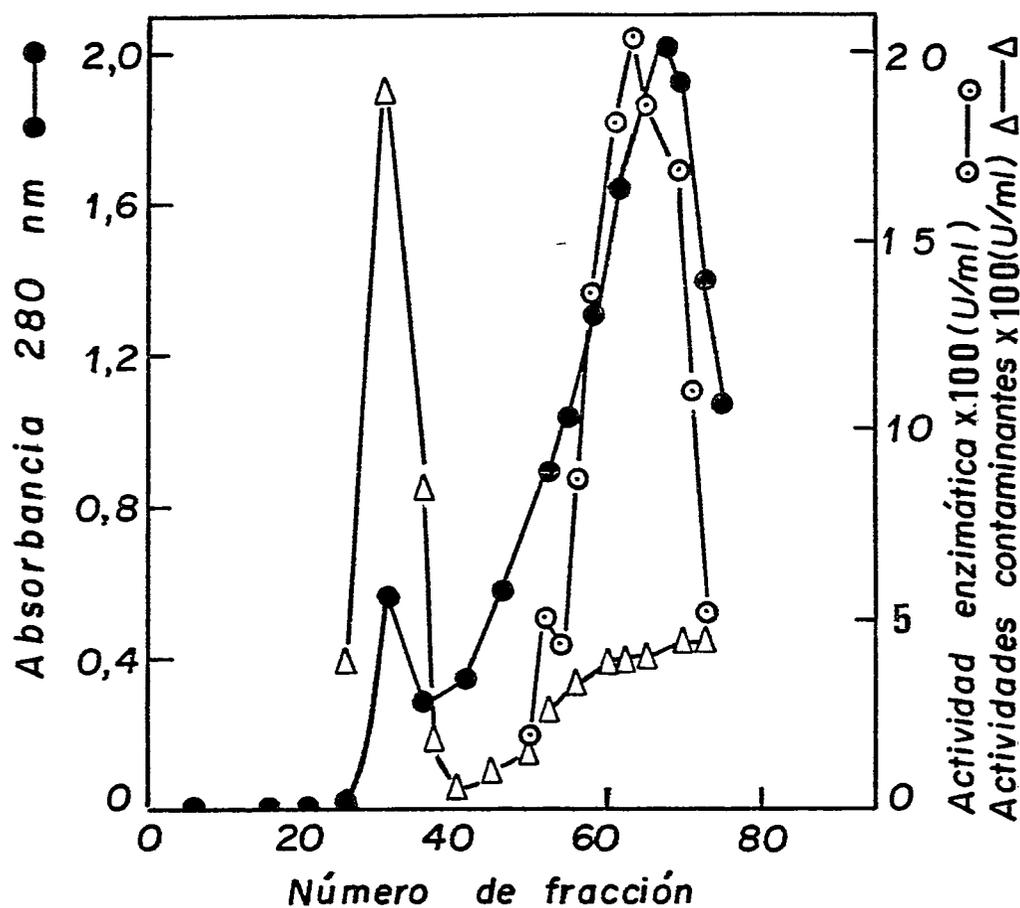


Figura 8. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por filtración en Sephadex G-200.

La descarboxilasa pirofosfomevalónica proveniente de la etapa de DEAE-celulosa, se aplicó a una columna de 5 x 90 cm de Sephadex G-200 equilibrada con amortiguador fosfato de potasio 10 mM pH 7,0 conteniendo KCl 200 mM. Se eluyó con el mismo amortiguador y se colectaron fracciones de 20 ml con flujo invertido de 50 ml/hora. En la figura se representan también las actividades enzimáticas contaminantes del ensayo espectrofotométrico (fosfatasas y oxidasas de NADH), cuantificadas a través de la velocidad de consumo del NADH antes de agregar el MVA-PP, durante el ensayo espectrofotométrico de la descarboxilasa pirofosfomevalónica descrito en la sección 2.4.5.

obtenido se muestra en la figura 8. Se juntaron las fracciones con la más alta actividad específica (razón $U/ml/A_{280} > 0,080$), se agregó EDTA 1 mM y la enzima se concentró agregando sulfato de amonio al 75% de saturación. Después de centrifugar a $23.500 \times g$ durante 15 minutos, el sedimento se suspendió en fosfato de potasio 5 mM pH 7,0 y se dializó por 18 horas contra 2 litros del mismo amortiguador.

Mediante esta filtración en Sephadex G-200 se logró eliminar gran parte de las actividades enzimáticas que interferían con el ensayo espectrofotométrico. Puede apreciarse en la figura 8 que una fracción importante de estas actividades contaminantes sale asociada a proteínas de alto peso molecular.

3.2.2.5. Cromatografía en fosfoCelulosa

Al dializado proveniente de la etapa anterior se le agregó glicerol 20%, y se ajustó a pH 6,0 con HCl concentrado. Luego se centrifugó 10 minutos a $23.500 \times g$, se ajustó la conductividad del sobrenadante a 0,7 mmho mediante amortiguador fosfato de potasio 1 mM pH 6,0 conteniendo glicerol al 20%, y se aplicó a una columna de fosfoCelulosa.

La enzima se eluyó con una gradiente lineal de fosfato de potasio pH 6,0 desde 20 a 250 mM conteniendo glicerol al 20%

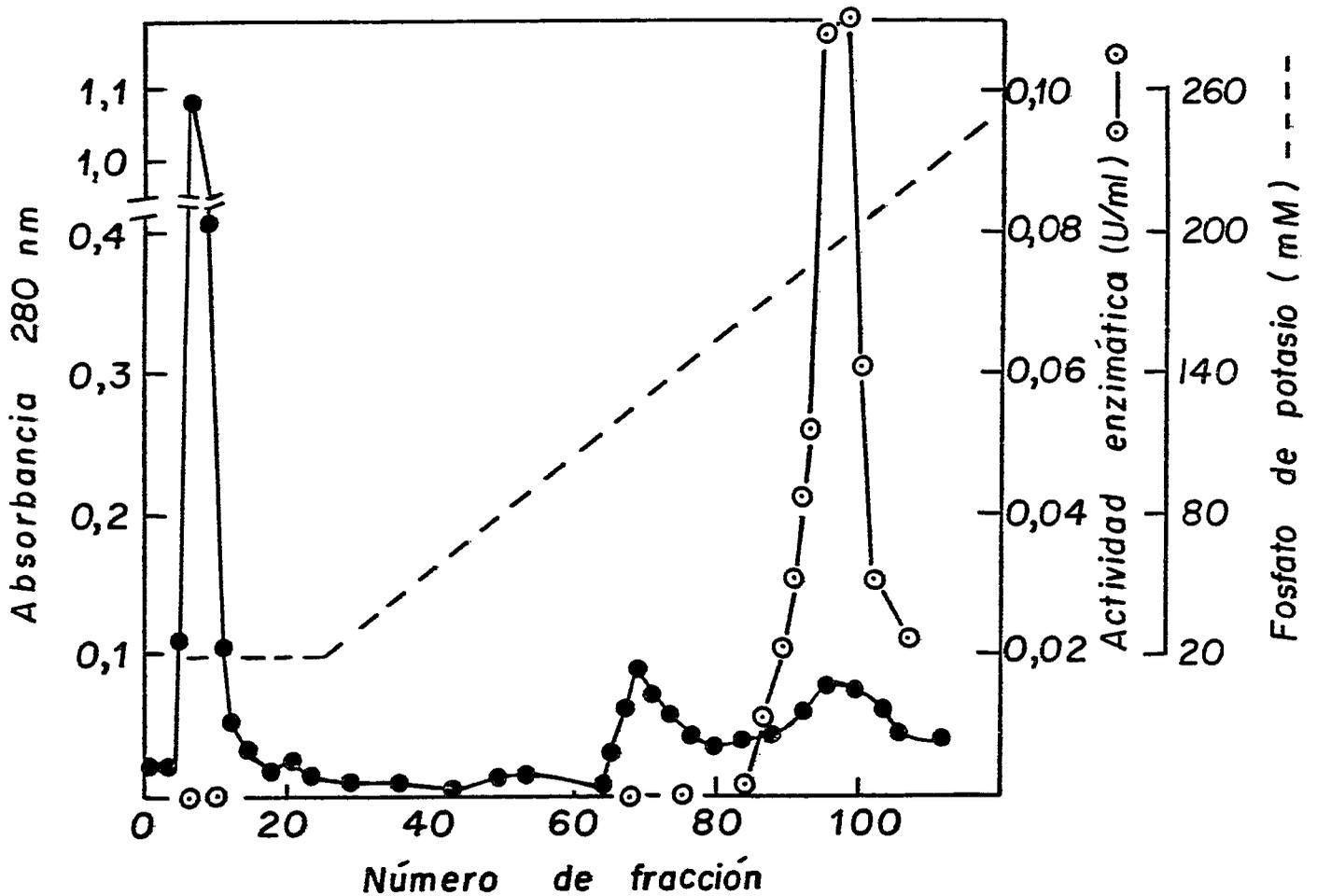


Figura 9. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en fosfocelulosa.

Se utilizó una columna de 3,7 x 21 cm equilibrada en amortiguador fosfato de potasio 10 mM pH 6,0 conteniendo glicerol al 20%. A ella se aplicó la solución enzimática proveniente de la etapa de Sephadex G-200. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó con 350 ml del mismo amortiguador, y se eluyó con un gradiente de fosfato de potasio pH 6,0 desde 20 a 250 mM (750 ml de c/u) conteniendo glicerol al 20%. Se colectaron fracciones de 18 ml a un flujo de 60 ml/hora.

(figura 9). Se recogieron fracciones de 18 ml con un flujo de 60 ml/hora. Al eluido seleccionado (razón $U/ml/A_{280} > 0,20$) se le reajustó el pH a 7,0 con KOH 10 M, y se concentró por ultrafiltración en una celda Amicon utilizando una membrana UM 10. La enzima concentrada se diluyó con fosfato de potasio 1 mM pH 7,0 y se concentró como antes. Por último se agregó glicerol a una concentración final de 20% y se ajustó la conductividad de la solución a un valor de 15% sobre la conductividad del amortiguador de elución de la columna de hidroxilapatita (que se describe a continuación) mediante adición de amortiguador fosfato de potasio pH 7,0 de la concentración adecuada.

3.2.2.6. Cromatografía en hidroxilapatita

La enzima se aplicó a una columna de hidroxilapatita equilibrada en amortiguador fosfato de potasio 13 mM pH 7,0 conteniendo glicerol al 20%. El volumen de la columna se calculó de modo que el cociente ml de hidroxilapatita/mg de proteínas aplicadas fuera de 0,4. En el caso que se describe, el volumen de la columna fue de 2,0 ml. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó con el mismo amortiguador con un flujo de aproximadamente 20 ml/hora. La enzima no es retenida por la hidroxilapatita en estas condiciones y sale junto con el lavado. Otras proteínas, sin embargo, sí son retenidas (figura 10).

En esta etapa es importante tanto que la conductividad de la muestra esté 15% por sobre la del amortiguador de

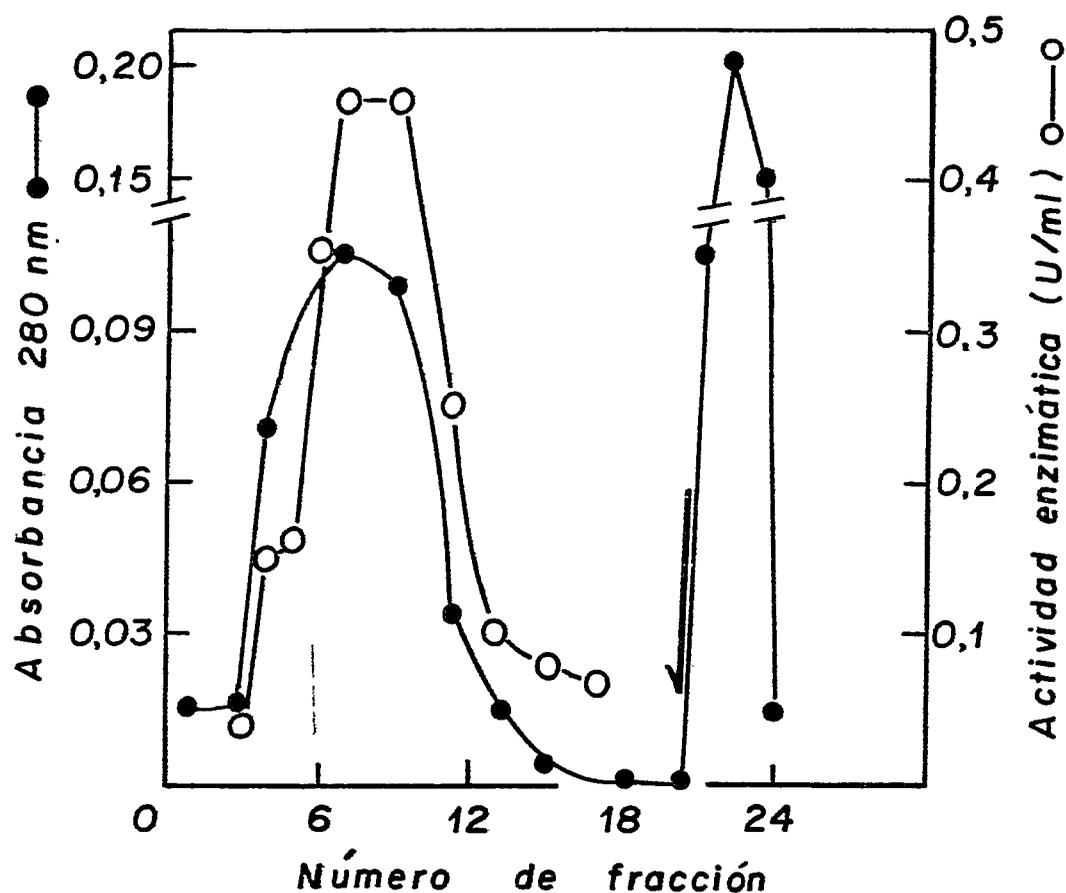


Figura 10. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en hidroxilapatita.

La enzima purificada por cromatografía en fosfocelulosa se aplicó a una columna de hidroxilapatita (1,3 x 1,5 cm) equilibrada en amortiguador fosfato de potasio 13 mM pH 7,0 conteniendo glicerol al 20%. Se colectaron fracciones de 1,2 ml a un flujo de aproximadamente 20 ml/hora. En el punto indicado por la flecha, se lavó la columna con fosfato de potasio 200 mM pH 7,0, con lo cual eluyen proteínas contaminantes.

elución de la columna, como que la razón ml hidroxilapatita/mg de proteínas sea de 0,4. En circunstancias en que estos parámetros no se ajustaron adecuadamente, la enzima fue retenida en la columna, eluyendo solo al aumentar la concentración del amortiguador de lavado a 30 mM. En estos casos, sin embargo, la purificación y el rendimiento fueron menores.

3.2.2.7. Cromatografía en azul de dextrano-Sepharose.

La enzima proveniente de la columna de hidroxilapatita (en un volumen de 17 ml) se aplicó directamente a una columna de azul de dextrano equilibrada en amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 0,1 mM; glicerol 20%, pero sin 2-mercaptoetanol. La columna se lavó con el mismo amortiguador hasta que la absorbancia a 280 nm se hizo nula, y eluyéndose enseguida con el mismo amortiguador conteniendo KCl 75 mM (Figura 11). Las fracciones activas se concentraron por ultrafiltración en una celda Amicon utilizando una membrana UM 10, y la enzima se guardó congelada a -20° .

Los resultados obtenidos en la purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo se muestran en la tabla 8, en la que se registran solo las etapas a partir de la cromatografía en DEAE-celulosa, ya que el método de ensayo radiactivo no puede emplearse en las etapas anteriores debido a la presencia de actividades enzimáticas que interfieren con este ensayo. Un gran número

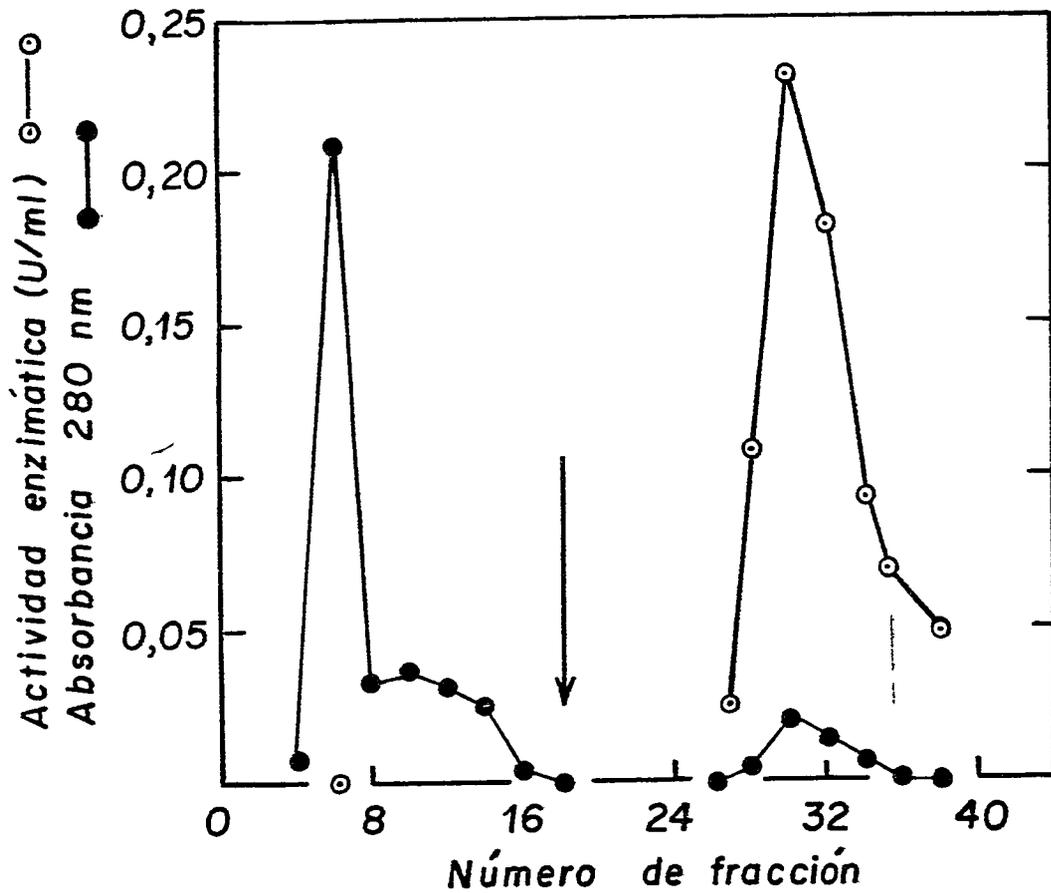


Figura 11. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en azul de dextrano-Sepharose.

La descarboxilasa pirofosfomevalónica, purificada por hidroxilapatita, se aplicó a una columna de azul de dextrano-Sepharose de 2,5 x 10 cm equilibrada con Tris-HCl 10 mM pH 7,0; EDTA 0,1 mM; glicerol 20%. Se colectaron fracciones de 5 ml con un flujo de 25 ml/hora. Una vez aplicada la muestra se lavó con 75 ml del mismo amortiguador. En el punto indicado por la flecha se eluyó con el mismo amortiguador conteniendo además KCl 75 mM.

Tabla 8. Purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo*.

Fracción	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Unidades totales	Actividades específica (U/mg)	Purificación	Rendimiento (%)
DEAE-celulosa	850	1142	64,6	0,055	----	100
Sephadex G-200	230	246	40,4	0,164	3,0	62,3
Fosfocelulosa	194	8,3	14,0	1,68	30,5	21,7
Hidroxiapatita	17	1,8	7,6	4,14	75,3	11,7
Azul de dextrano-						
Sepharose	58	1,0	6,2	6,26	114,0**	9,6**

* La enzima se purificó a partir de 1 kg de hígado de pollo. La medición de actividad se realizó por el método espectrofotométrico, que puede ser usado sólo a partir de la etapa de DIAE-celulosa.

** La purificación y el rendimiento totales de la purificación resultan ser de 5.800 veces y 4,8%, respectivamente, al tomar en cuenta que hasta la etapa de DEAE-celulosa ambos parámetros son 51 veces y 50% respectivamente, según determinaciones hechas con el método de ensayo radiactivo.

de preparaciones, sin embargo, indican que cuando se usa el método de ensayo radiactivo en estas etapas iniciales (sección 3.2.2.3) la purificación y el rendimiento total de la purificación son 5800 veces y 4,8%, respectivamente.

3.2.3. Estimación de la pureza de la enzima.

La figura 12 muestra tanto el barrido densitométrico de un gel de poliacrilamida en que se aplicó una muestra de la enzima obtenida de la columna de azul de dextrano-Sepharose, como la actividad enzimática a lo largo de otro gel corrido en idénticas condiciones. Puede apreciarse que hay una correspondencia perfecta entre la actividad enzimática y la proteína asociada.

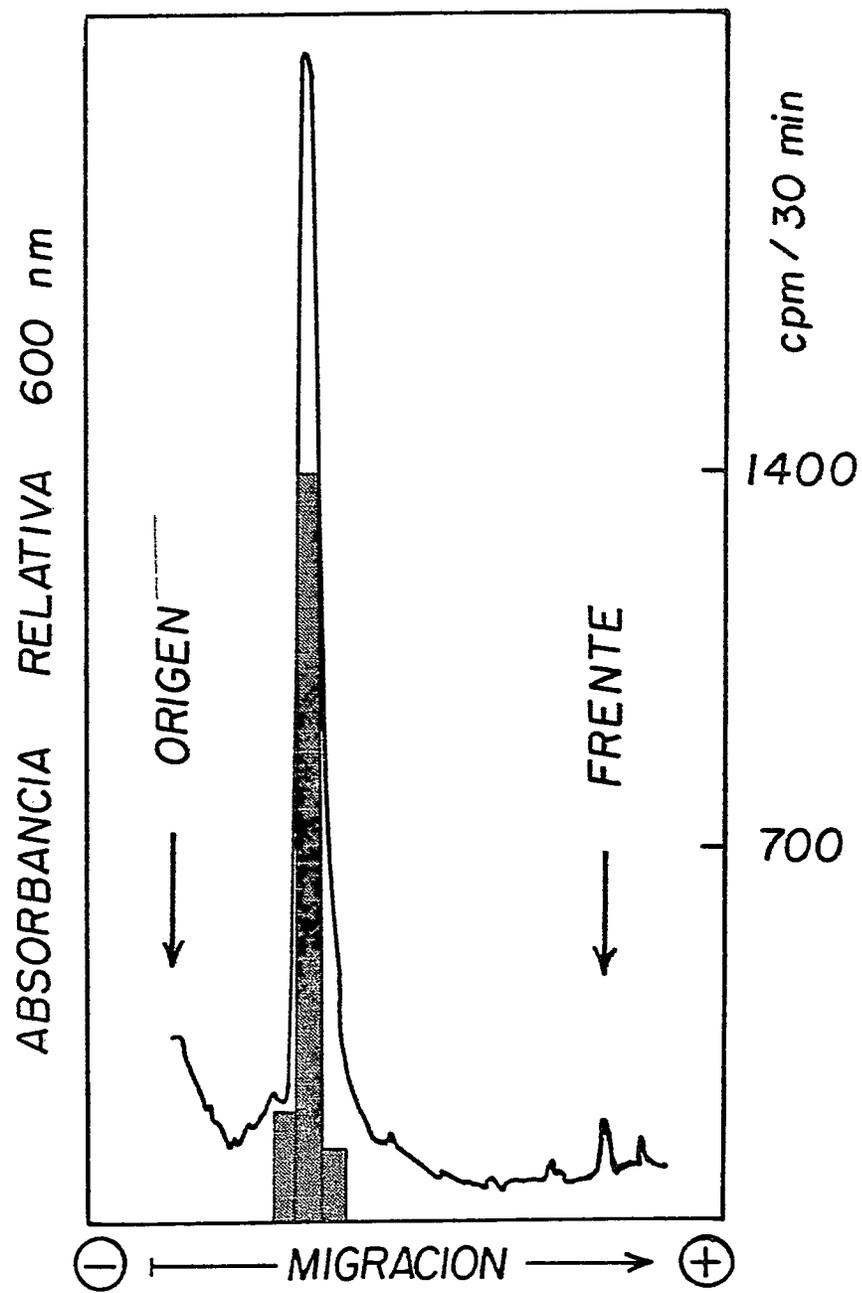
La electroforesis en presencia de SDS de la descarboxilasa pirofosfomevalónica purificada (figura 13), demostró presentar una banda principal correspondiente al 80% del total de la proteína del gel, y una banda secundaria correspondiente a 20% de dicho total. Se concluye entonces, en base a los argumentos que se dan mas adelante en la sección 3.3.1.3, que la enzima obtenida se encontraría con un grado de pureza del 80%, de acuerdo a este criterio.

3.2.4. Contenido de descarboxilasa pirofosfomevalónica en el extracto crudo.

De acuerdo a los datos presentados en la sección 3.2.2.7 el rendimiento total de la purificación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo es de 4,8%, obteniéndose 1 mg de proteína a partir de 1 Kg de material de partida. Esto significa que del total de 63.900 mg de proteína del homogeneizado obtenido

Figura 12. Trazado densitométrico de gel de poliacrilamida de la descarboxilasa pirofosfomevalónica y actividad enzimática asociada.

Dos muestras de enzima conteniendo 10 μg de proteína (act. esp. 6,26) se sometieron a electroforesis en tubos cilíndricos de 0,5 cm de diámetro con acrilamida al 7,5%. Uno de los geles se cortó en secciones para el ensayo de actividad enzimática y el otro se tiñó con azul de Coomassie. El trazado densitométrico se efectuó utilizando un accesorio de registro para geles acoplado a un espectrofotómetro Varian Techtron 635, a 600 nm y a una velocidad de 25 mm/minuto. La actividad enzimática se expresa como la radiactividad (cpm) recuperada en las fases hexánicas del ensayo radiactivo al cabo de 30 minutos de incubación. Mayores detalles de este ensayo en la sección 2.4.4 de Métodos.



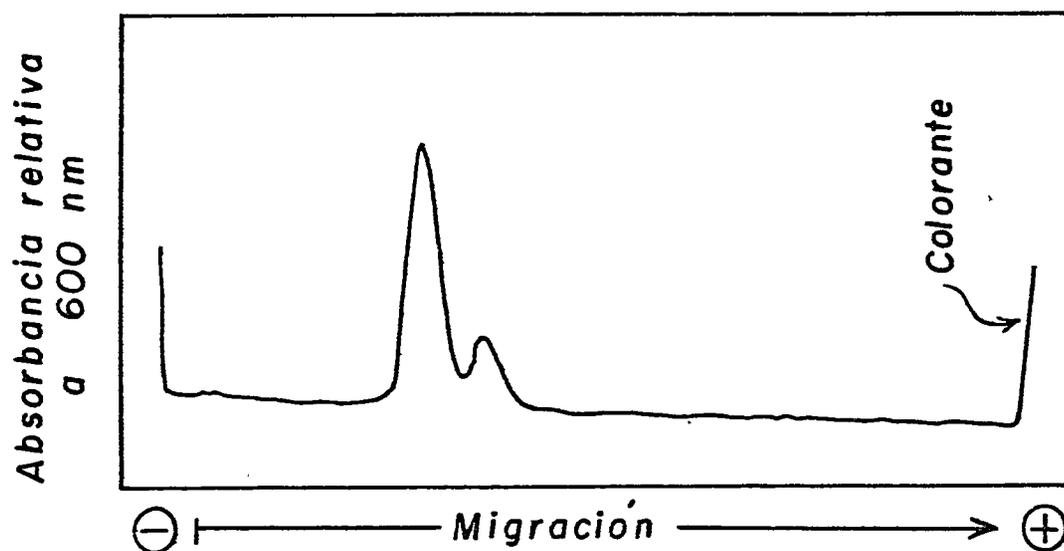


Figura 13. Trazado densitométrico de un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes de la descarboxilasa pirofosfomevalónica purificada en azul de dextrano-Sepharose.

La electroforesis se efectuó en geles de acrilamida al 10%, y se aplicaron 10 μ g de proteína. Las condiciones experimentales se describen en la sección 2.10.2. El registro densitométrico se efectuó a 600 nm y a una velocidad de 25 mm/min, con una escala de absorbancia de 0 a 1,0.

luego de la precipitación con sulfato de protamina, la descarboxilasa pirofosfomevalónica contribuye con 20,8 mg, lo que representa un 0,033% del total. Este valor se compara en la tabla 9 con los valores obtenidos al realizar un cálculo similar con los datos presentados por otros autores que han purificado otras enzimas de la ruta de la biosíntesis del colesterol a partir de hígado de pollo.

3.3. Propiedades de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo.

3.3.1. Determinación del peso molecular.

El peso molecular de la enzima se determinó por tres métodos diferentes: cromatografía en Sephadex G-200, gradiente de sacarosa y electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol.

3.3.1.1. Cromatografía en Sephadex G-200.

Se usó una columna de Sephadex G-200, y la figura 14 muestra el resultado de representar los cuocientes entre los volúmenes de elución (V_e) y el volumen de exclusión (V_o) (Andrews, 1964) en función de los pesos moleculares. Se puede estimar un peso molecular de 87.000 para la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

Tabla 9. Porcentaje del total de las proteínas de homogeneizados de hígados de pollo representados por algunas enzimas de la biosíntesis del colesterol.

Enzima	Porcentaje	Referencia
Reductasa de HMG-CoA	0,004	Beg & col. (1979)
Descarboxilasa pirofosfomevalónica	0,033	Este trabajo
Preniltransferasa	0,15	Reed & Rilling (1975)

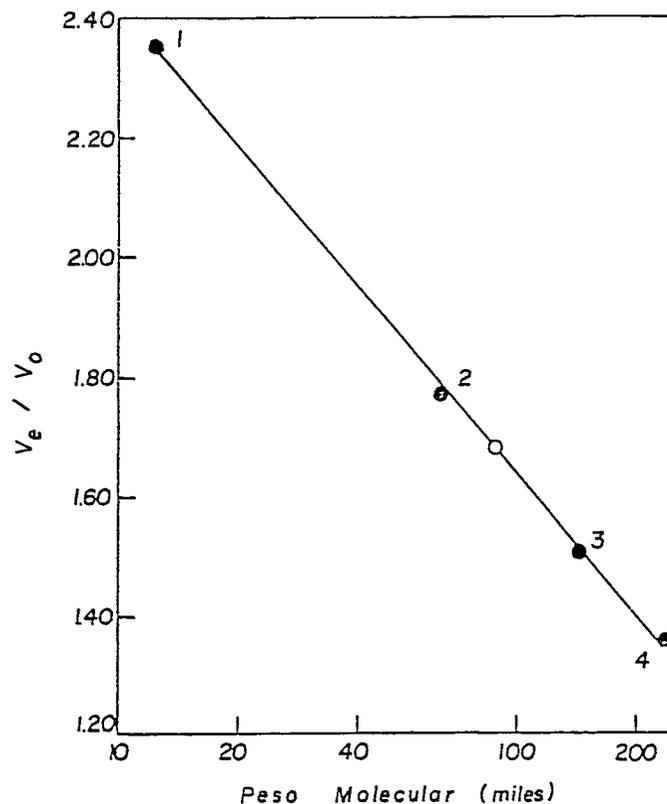


Figura 14. Determinación del peso molecular de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-200.

Se utilizó una columna de Sephadex G-200, de 2,6 x 83 cm equilibrada con amortiguador fosfato de potasio 25 mM pH 7,0; KCl 200 mM; EDTA 0,1 mM. Las muestras fueron aplicadas en un volumen de 2 ml conteniendo: 1, citocromo c (2,5 mg); 2, seroalbúmina de bovino (9,7 mg); 3, deshidrogenasa alcohólica de levadura (4,3 mg); 4, quinasa pirúvica de músculo de conejo (0,2 mg). Se aplicaron 12,8 unidades de descarboxilasa pirofosfomevalónica (act. esp. 6,5 U/mg de proteína) y se colectaron fracciones de 2,4 ml con un flujo invertido de 15,4 ml/hora. V_e = volumen de elución; V_o = volumen de exclusión de la columna. En el gráfico, (o) representa el cociente V_e/V_o para la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

3.3.1.2. Gradiente de concentración de sacarosa

Los gradientes de sacarosa, preparados como se describe en la sección 2.11.2, mostraron una relación lineal entre los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como patrones, y los logaritmos de sus migraciones correspondientes, deducidas del número de fracciones (figura 15). El peso molecular estimado a partir del gráfico es de 81.500.

3.3.1.3. Electroforesis en geles de poli-acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol.

La electroforesis se efectuó en columnas de poli-acrilamida en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol, como se describe en Métodos (sección 2.11.3.). Del gráfico del logaritmo de los pesos moleculares en función de la migración relativa (figura 16) se determinó su peso molecular. La preparación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica mostró en esta electroforesis una banda principal (80% de la proteína aplicada) correspondiente a un peso molecular de 43.500, y un contaminante (20% de la proteína aplicada) correspondiente a una proteína de peso molecular 37.200 (figura 12). La banda correspondiente a la descarboxilasa pirofosfomevalónica debe ser la de mayor peso molecular ya que en una preparación en que, por problemas técnicos en la etapa de DEAE-celulosa, se obtuvo una

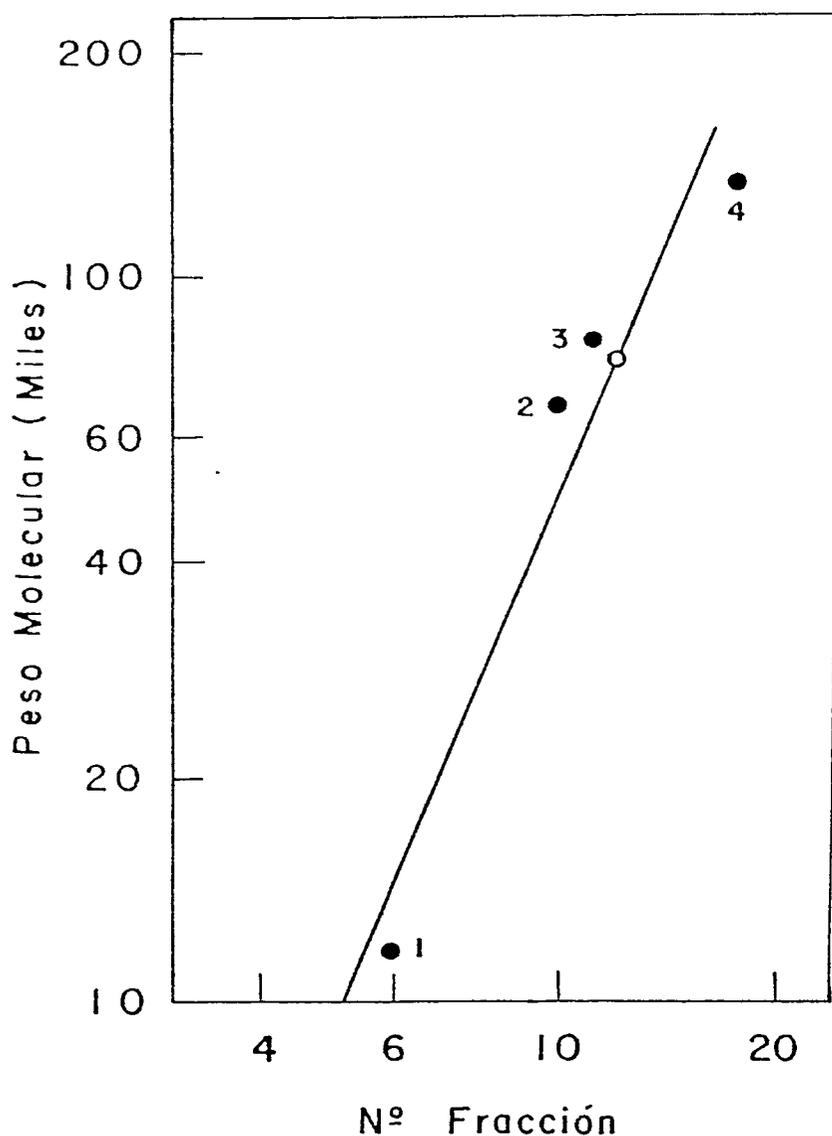


Figura 15. Determinación del peso molecular de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en gradiente de concentración de sacarosa.

Las gradientes se prepararon entre 5 y 20%, en amortiguador fosfato de potasio 10 mM; EDTA 0,1 mM; KCl 100 mM. Se colocaron los siguientes marcadores: 1, citocromo c de corazón de buey (2,5 mg); 2, seroalbúmina de bovino (2,5 mg); 3, deshidrogenasa alcohólica de corazón de caballo (59 mU); 4, deshidrogenasa láctica de corazón de bovino (3 U). Se aplicaron 230 mU de descarboxilasa pirofosfomevalónica (act. esp. 6,3 U/mg de proteína). Para detalles experimentales ver Métodos (sección 2.11.2). En el gráfico, (o) representa la fracción en la que eluyó la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

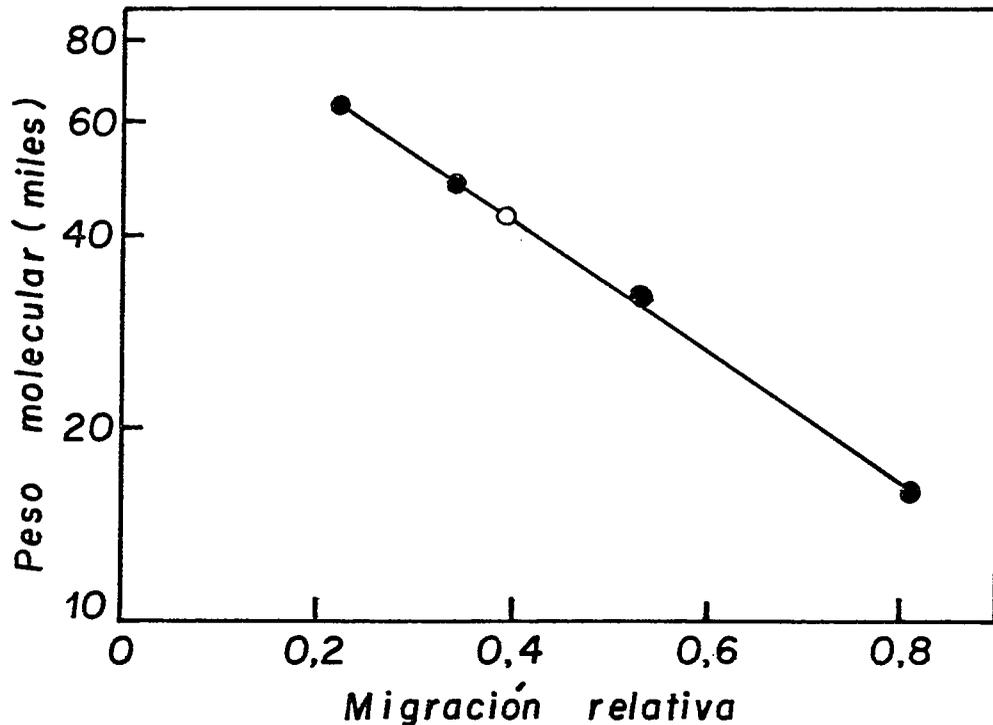


Figura 16. Determinación del peso molecular de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol.

La electroforesis se efectuó en tubos cilíndricos de 0,5 cm de diámetro con una concentración de acrilamida de 10%, en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol al 0,1%. Se aplicaron muestras en tubos separados conteniendo tanto 9 μg de hemoglobina entrecruzada de pesos moleculares 16.000, 32.000, 48.000 y 64.000, y conteniendo 10 μg de descarboxilasa pirofosfomevalónica (act. esp. 6,3 U/mg de proteína). Otros detalles experimentales se describen en Métodos en la sección 2.11.3.

En el gráfico, (o) representa la migración relativa de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

preparación con una act. esp. final de 5,2 U/mg de proteína, se pudo comprobar una disminución en la banda de peso molecular 43.500 con un aumento concomitante de la banda de peso molecular 37.200 y la aparición de indicios de contaminantes de mayor peso molecular.

3.3.2. Efecto de compuestos sulfhidrilos sobre la actividad y estabilidad de la enzima.

La presencia de 2-mercaptoetanol 10 mM no afecta la estabilidad de la enzima purificada, ya sea en presencia o ausencia de seroalbúmina (tabla 10). La presencia de albúmina, sin embargo, tiene un efecto estabilizador apreciable.

La actividad de la enzima determinada por los ensayos espectrofotométrico o radiactivo no varía en presencia o ausencia de 2-mercaptoetanol 10 mM. Puede concluirse, entonces, que la enzima de hígado de pollo no requiere de reductores de grupos sulfhidrilos para su actividad ni para su estabilidad.

3.3.3. Estabilidad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

La enzima obtenida después de la columna de DEAE-celulosa se guardó hasta por períodos de tres meses en amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,0 conteniendo 0,1 mM EDTA y 50% glicerol, a -20°. En estas condiciones la enzima retiene el 100% de su actividad. La enzima altamente purificada se guardó por períodos de hasta 30 días en amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,0 conteniendo KCl 75 mM, EDTA 0,1 mM y glicerol al 20% a -20°. En este caso también se encontró retención prácticamente total de la actividad

Tabla 10. Efecto del 2-mercaptoetanol sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

Tiempo (días)	Actividad (mU/ml)			
	A	B	C	D
0	40	40	42	42
2	24	28	38	35
5	21	21	44	50
7	20	21	34	41
9	15	16	42	44
12	7	8	31	31

Se tomaron 4 alícuotas de la enzima (act. esp. 3,9 U/mg de proteína) conteniendo 0,035 mg de proteína, y se dejaron en un volumen final de 1 ml de amortiguador fosfato de potasio 10 mM pH 7,0; EDTA 0,1 mM a 4° con los siguientes agregados: A = control; B = 2-mercaptoetanol 10 mM; C = albúmina de bovino 0,68 mg/ml; D = 2-mercaptoetanol 10 mM y albúmina de bovino 0,68 mg/ml. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de cada solución y se ensayó la actividad enzimática en amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7,0; ATP 5 mM; MgCl₂ 5 mM; PEP 0,5 mM; PK 6,5 unidades, LDH 11,8 unidades; NADH 0,23 mM y MVA-PP 0,035 mM. Para más detalles ver la sección 3.3.2. La actividad remanente a los distintos tiempos se expresa como los μ moles de MVA-PP descarboxilados por minuto y por ml de la solución de la cual se tomaron las alícuotas.

enzimática.

3.3.4. Requerimiento de metales y nucleótidos.

Todas las descarboxilasas pirofosfomevalónicas descritas hasta la fecha requieren un metal bivalente para su actividad, siendo generalmente el Mg^{+2} el mejor activador (Bloch & col., 1959; Skilleter & Kekwick, 1971; Beytía, 1972; Shama Bhat & Ramasarma, 1980). En la tabla 11 puede apreciarse que el Mg^{+2} presenta, a una concentración 5 mM, el mejor efecto activante de la enzima, seguido luego por Mn^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Ca^{+2} y Ba^{+2} , manteniendo el ATP constante a concentración 5 mM. A la misma concentración de ATP, la actividad enzimática aumenta hasta 1 mM de Mg^{+2} y luego se mantiene constante hasta por lo menos 6,4 mM (figura 17). A concentraciones mayores hay un ligero efecto inhibitorio del metal, ya que cuando su concentración es de 12,8 mM la actividad enzimática disminuye al 80%. No se probaron concentraciones superiores.

Se ensayó además el efecto de GTP, UTP y CTP, a concentraciones 5 mM. Como se aprecia en la tabla 12, la actividad en presencia de GTP es un 8,7% de la observada en el control, en tanto que en presencia de CTP o UTP es de alrededor de un 5%. Para la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata se ha informado que su actividad en presencia de GTP es un 29% de la observada en presencia de ATP, y que éste no puede ser reemplazado por UTP o CTP (Shama Bhat &

Tabla 11. Efecto de diversos cationes bivalentes sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

Metal	Actividad relativa
MgCl ₂	100
MnCl ₂	96,7
CoCl ₂	89,5
ZnCl ₂	85,1
CdCl ₂	56,9
CaCl ₂	29,0
BaCl ₂	16,2
-----	10,4
----- + EDTA 2 mM	1,6
----- + EDTA 16 mM	0,16

En un volumen de 0,59 ml se preincubaron a 30°: [3-¹⁴C] MVA-PP 0,41 mM (140 cpm/nmol); ATP 5 mM, y el correspondiente metal 5 mM, en amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,0. Se efectuaron controles sin metal y conteniendo EDTA 2 mM y 16 mM. La reacción se inició agregando 0,01 ml de descarboxilada pirofosfomevalónica (13 mU, act. esp. 4,37 U/mg de proteína). A los 10 minutos se detuvo la reacción agregando 5,5 mg de fosfatasa alcalina de intestino de ternero en 0,5 ml de Tris-HCl 1 mM pH 8,4, conteniendo MgCl 10 mM en los casos en que esta sal no estaba presente inicialmente. Luego se procedió según lo descrito para el ensayo radiactivo en la sección 2.4.4. Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad obtenida con Mg⁺².

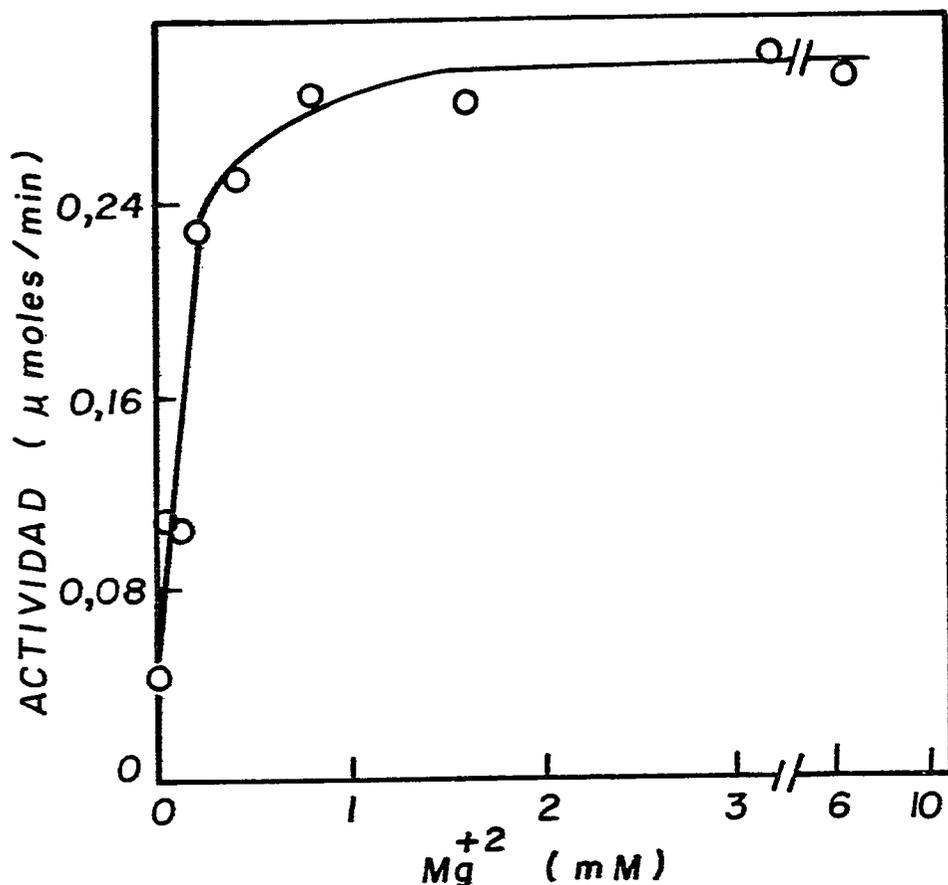


Figura 17. Efecto de la concentración del ión magnesio en la reacción catalizada por la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

En un volumen de 0,59 ml se preincubaron a 30°: $[3-^{14}C]$ MVA-PP 0,41 mM (140 cpm/nmol); ATP 5 mM; $MgCl_2$ a la concentración requerida, todo en amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,0. La reacción se inició agregando 0,01 ml de descarboxilasa pirofosfomevalónica [13 mU; act. esp. 4,37 U/mg de proteína). A los 10 minutos se detuvo la reacción agregando 5,5 mg de fosfatasa alcalina de intestino de ternero en 0,5 ml de Tris-HCl 1 M pH 8,4, con suficiente $MgCl_2$ de modo que su concentración final durante la hidrólisis fosfatásica fuera de alrededor de 5 mM. Luego se procedió según lo descrito para el ensayo radiactivo en la sección 2.4.4.

Tabla 12. Efecto de GTP, UTP y CTP en la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

Nucleótido	Actividad relativa
ATP	100
GTP	8,7
UTP	5,2
CTP	4,6

Los diferentes nucleótidos se probaron a una concentración 5 mM en el medio de ensayo radiactivo usual pero sin ATP, usando 10 unidades de descarboxilasa pirofosfomevalónica de act. esp. 6,3 U/mg de proteína. Los resultados se expresan en por ciento de la actividad obtenida con ATP.

Ramasarma, 1980), en tanto que ninguno de estos nucleótidos puede reemplazar al ATP al ensayar la enzima parcialmente purificada del látex del árbol del caucho (Skilleter & Kekwick, 1971).

3.3.5. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

El efecto de la fuerza iónica se probó usando concentraciones crecientes de KCl en el medio. El ensayo se hizo en amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,0 conteniendo los demás componentes del ensayo espectrofotométrico normal y cantidades variables de KCl. En la figura 18 se ve que la máxima actividad se obtiene alrededor de KCl 0,2 M. Este resultado es similar al obtenido antes por Bazaes (1977) para quinasa fosfomevalónica.

3.3.6. Efecto del pH y efecto inhibitorio del citrato sobre la actividad de la enzima.

Estos estudios se efectuaron utilizando diversos amortiguadores en el ensayo de la actividad enzimática. Estos fueron los siguientes en el rango de pH que se indica: glicina-HCl, pH 2,3-3,8; ácido fosfórico-KOH, pH 2,9-3,5; ácido fórmico-KOH, pH 4,1-5,0; ácido cítrico-citrato de sodio, pH 3,0-6,1; MES-HCl, pH 5,4-6,9; Tris-HCl, pH 6,4-8,9. En cada ensayo se agregaron 0,01 ml de descarboxilasa pirofosfomevalónica conteniendo 15 mU, a los componentes del ensayo radiactivo en el correspondiente amortiguador a concentración 100 mM. Se encontró que la velocidad de reacción aumenta

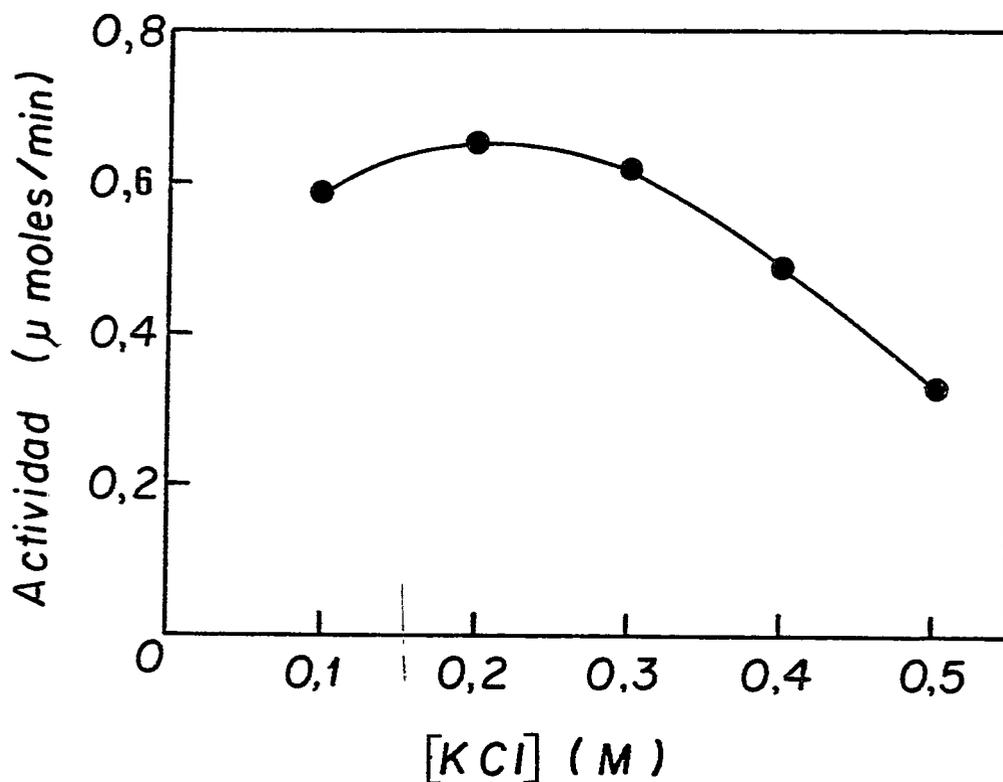


Figura 18. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

El medio de reacción contenía 5,3 mU de descarboxilasa pirofosfomevalónica (act. esp. 3,8 U/mg de proteína); NADH 0,23 mM; ATP 5 mM; PEP 0,5 mM; $MgCl_2$ 5 mM; MVA-PP 0,118 mM; PK 6,5 unidades y LDH 11,8 unidades, en amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,0 y cantidades variables de KCl. La actividad enzimática se expresa como los μ moles de MVA-PP descarboxilados por minuto y por ml de la solución de enzima de la cual se tomaron las alícuotas para el ensayo de actividad.

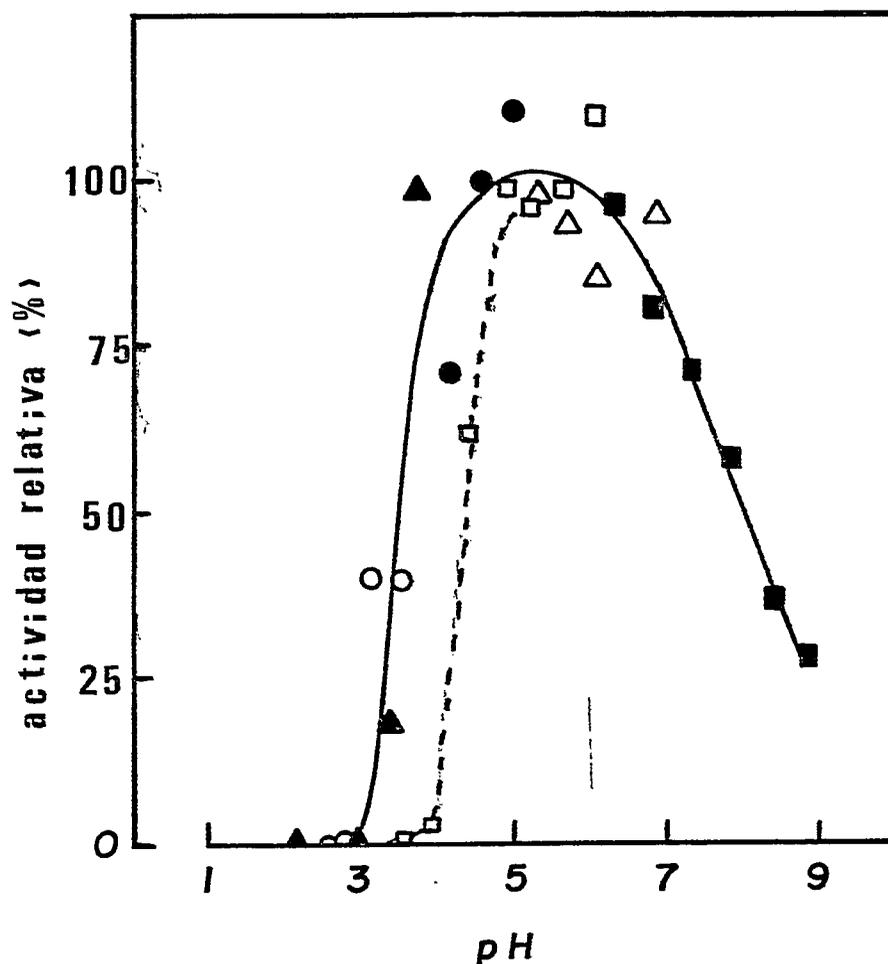


Figura 19. Efecto del pH y efecto inhibitorio del citrato sobre la actividad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

El medio de reacción contenía descarboxilasa pirofosfomevalónica (15 mU, act. esp. 4,37 U/mg de proteína); ATP 5 mM; $MgCl_2$ 5 mM; $[3-^{14}C]$ MVA-PP 0,41 mM (140 cpm/nmol), en diferentes amortiguadores a concentración 100 mM en un volumen final de 0,6 ml. La actividad enzimática se midió por el método radiactivo descrito en la sección 2.4.4. Los amortiguadores usados fueron glicina-HCl (▲); ácido fosfórico-KOH (○); ácido fórmico-KOH (●); ácido cítrico-citrato de sodio (◻); MES-HCl (Δ); Tris-HCl (■).

Desde pH 3 hasta pH 4,0, se mantiene constante hasta pH 6, y luego disminuye hasta pH 8,9, que fue el valor más alcalino ensayado (figura 19). Los valores de pH para un 50% de actividad son, aproximadamente, 5,5 y 8,1. Al efectuar estos estudios se encontró que diversos compuestos generalmente empleados como amortiguadores eran capaces de inhibir la enzima, y en misma figura puede apreciarse que, a una concentración 100 mM, el citrato inhibe la actividad enzimática bajo pH 4,8. Puede apreciarse un 50% de inhibición a pH 4,4 valor al cual la enzima retiene un 100% de actividad al ser ensayada en presencia de amortiguador ácido fórmico-KOH. Cuando la enzima se ensayó con amortiguador ácido ftálico-KOH 100 mM en el intervalo de pH 2,6 a 4 no se detectó actividad, y en presencia de amortiguador fosfato de potasio 100 mM la actividad fue solo entre un 50% y un 75% de la observada en amortiguadores MES-HCl o Tris-HCl entre pH 6 y 7,4.

5.3.7. Estabilidad de la enzima en función del pH.

La estabilidad de la enzima a los diferentes pH se probó incubando una alícuota de enzima de act. esp. 4,34 U/mg de proteína, durante 10 minutos a 0° en los diferentes amortiguadores usados en la curva de pH. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20 e indican que la enzima pierde rápidamente su actividad en estas condiciones bajo pH 5.

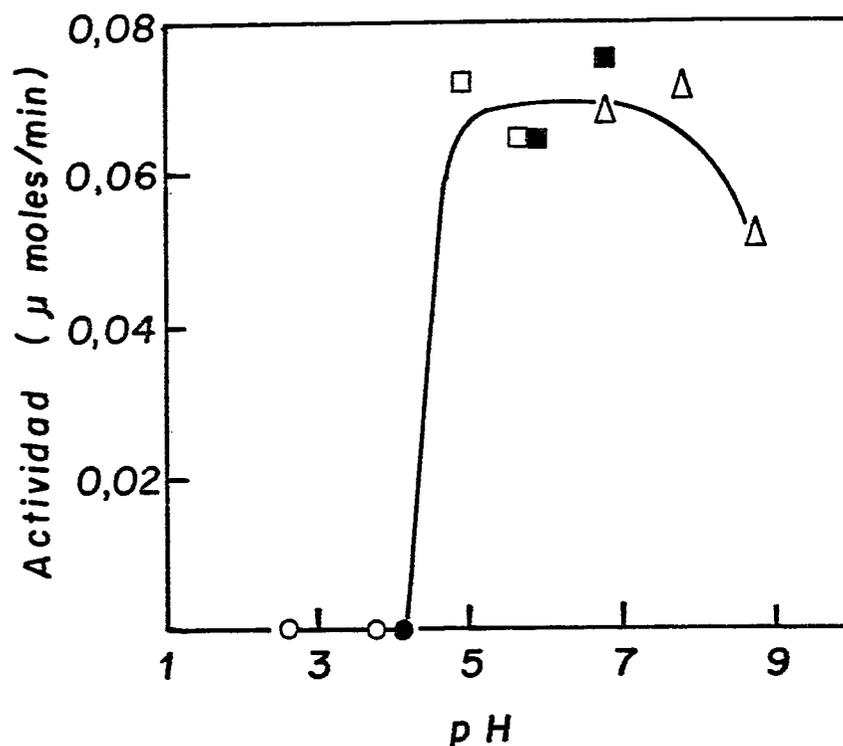


Figura 20. Estabilidad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica en función del pH.

La enzima (5 mU; act. esp. 4,37 U/mg de proteína) se incubó a 0° en un volumen de 0,06 ml conteniendo amortiguadores glicina-HCl (○); ácido fórmico-KOH (●); ácido cítrico-citrato de sodio (□); MES-HCl (■); o Tris-HCl (△), a una concentración 100 mM. Al cabo de 10 minutos se tomaron alícuotas de 0,025 ml, que se ensayaron con el método de ensayo radiactivo usual descrito en la sección 2.4.4. La actividad enzimática se expresa como los μmoles de MVA-PP descarboxilados por minuto y por ml de la solución de enzima de la cual se tomó la alícuota.

3.3.8. Determinación del punto isoeléctrico de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

Para este experimento se procedió según lo descrito en la sección 2.12. Los resultados se muestran en la figura 21, en la que se ve que la actividad enzimática eluye en un solo componente con un máximo a pH 4,8, que corresponde al punto isoeléctrico de la enzima. Este experimento se realizó con enzima proveniente de la etapa de fosfocelulosa, y se recuperaron solo 8% de las unidades aplicadas. Este bajo rendimiento indica que la enzima es inestable en valores de pH cercanos a su pI, e impide la utilización de este método como etapa de purificación.

3.3.9. Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_m de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

Con el objeto de determinar los parámetros cinéticos básicos de la descarboxilasa pirofosfomevalónica se efectuó un estudio de velocidades iniciales. La enzima presentó comportamiento hiperbólico para ambos sustratos, el MVA-PP y el ATP. Se midieron las velocidades iniciales variando la concentración de un sustrato a concentraciones fijas del otro sustrato. La descarboxilasa pirofosfomevalónica (9 mU, act. esp. 2,67 U/mg de proteína) se hizo reaccionar en el medio

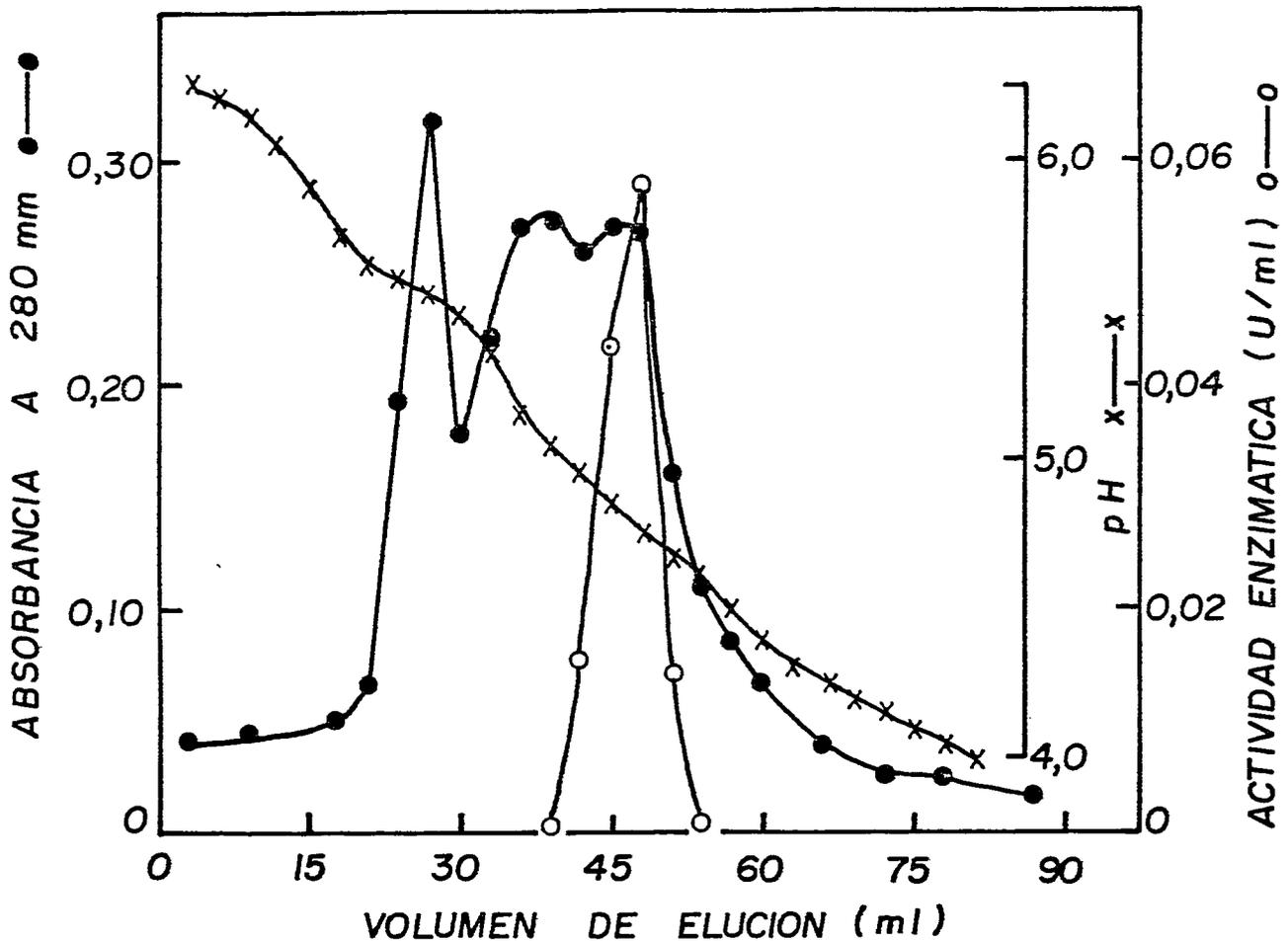


Figura 21. Determinación del punto isoelectrico de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

Se aplicaron 5,15 unidades de descarboxilasa pirofosfomevalónica (act. esp. 0,63 U/mg de proteína) en un volumen de 25 ml de amortiguador imidazol-HCl 25 mM pH 6,4 conteniendo EDTA 0,1 mM, a una columna de PBE 94 (1 x 14 cm) equilibrada en el mismo amortiguador. La columna se eluyó con 100 ml de Polybuffer 74 pH 4,0 con un flujo de 50 ml/hora, como se describe en la sección 2.12.

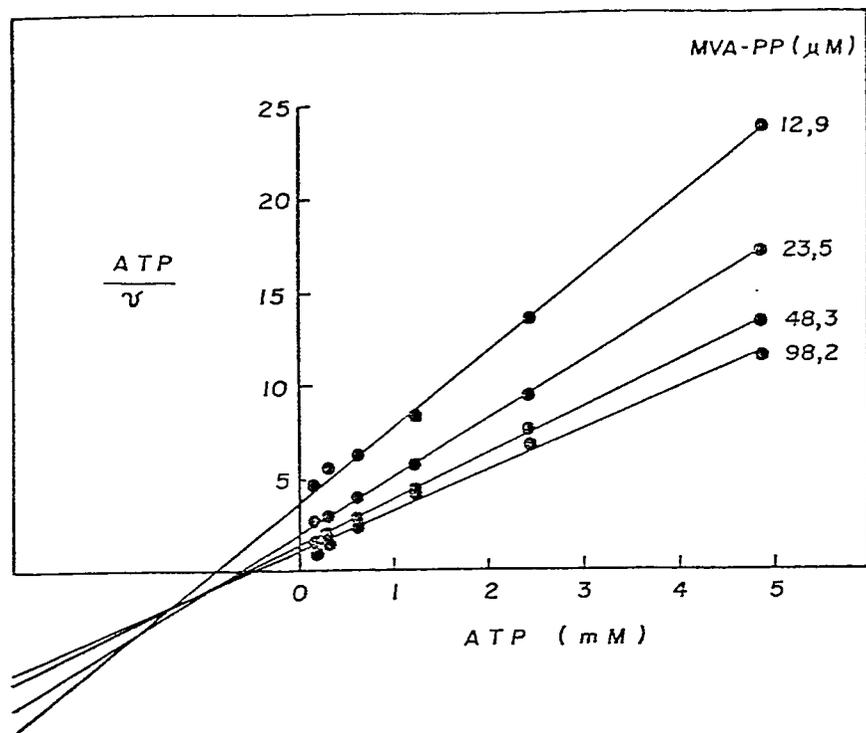


Figura 22. Efecto de la concentración de ATP a diferentes concentraciones fijas de MVA-PP sobre la velocidad inicial de la reacción de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

El medio de reacción contenía 9 mU de descarboxilasa pirofosfomevalónica (act. esp. 2,37 U/mg de proteína); NADH 0,23 mM; PEP 0,5 mM, KCl 100 mM; $MgCl_2$ 5 mM sobre la concentración de ATP; PK 6,5 unidades; LDH 11,8 unidades, en amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 7,0, además de las concentraciones requeridas de MVA-PP y ATP. La actividad enzimática se expresa como los μ moles de MVA-PP descarboxilados por minuto y por ml de la solución de enzima de la cual se tomaron las alícuotas para el ensayo. Otras condiciones experimentales se describen en la sección 2.13 de Métodos.

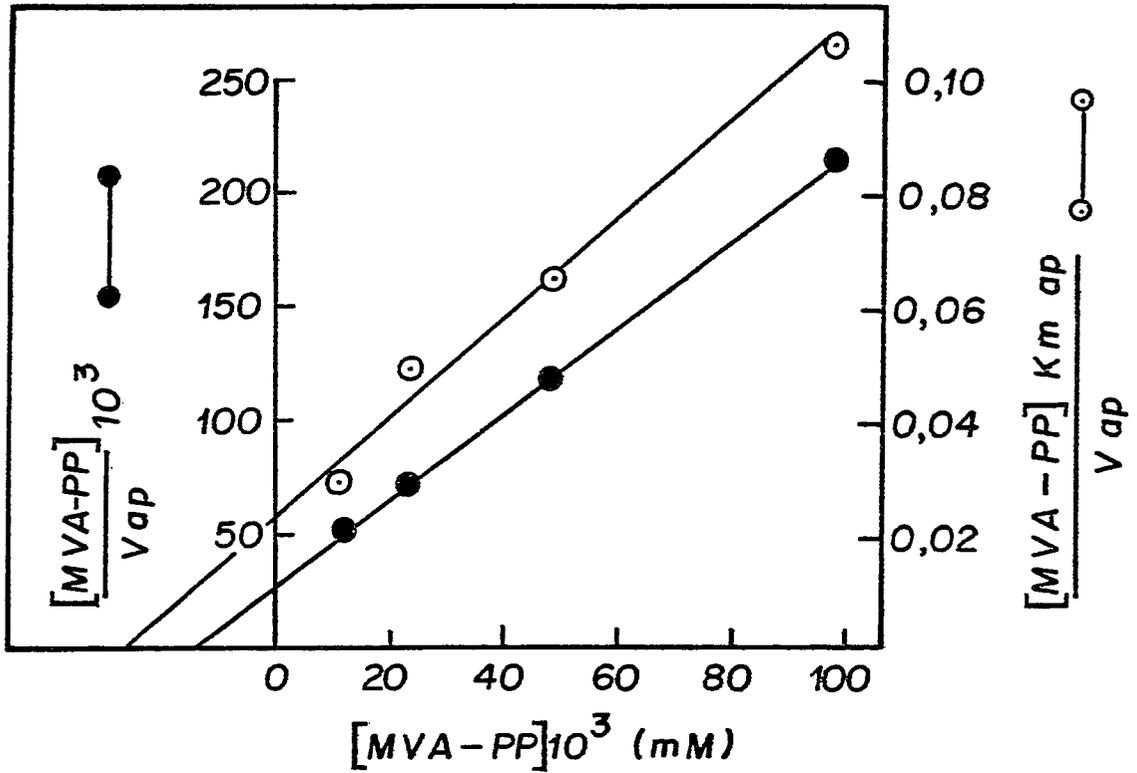


Figura 23. Gráficos secundarios utilizados para la obtención de los parámetros cinéticos de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

Se representan tanto los valores de $[MVA-PP]/V_{max ap}$ como los de $[MVA-PP] (K_m ap./V_{max ap.})$ en función de la concentración del MVA-PP. Se utilizaron los datos de la figura 24.

de ensayo espectrofotométrico usual, en que el MVA-PP se varió entre 0,013 y 0,098 mM y el ATP entre 0,18 y 4,9 mM. En todos los casos se mantuvo la concentración de Mg^{+2} siempre 5 mM sobre la concentración de ATP, de modo que la concentración de Mg^{+2} libre en el medio fuera constante, según lo descrito por Storer & Cornish-Bowden (1976). Tanto con MVA-PP como con ATP como sustrato variable, se obtuvo una familia de rectas que se cortaron a la izquierda de la ordenada y más abajo de la abscisa cuando los datos se representaron por el método de Hanes (figura 22). Este resultado es típico de un mecanismo secuencial (Cornish-Bowden, 1979). En la figura 23 están representados tanto los valores de MVA-PP/ V_{max} ap. como los de MVA-PP (K_m ap./ V_{max} ap.) en función de la concentración de MVA-PP. Estos datos permitieron estimar valores de K_m verdaderos para el MVA-PP y el ATP de 0,0141 mM y 0,504 mM, respectivamente.

3.4. Inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo con fenilglioxal.

Dentro del estudio de la estructura de una enzima y la relación que ésta tiene con su mecanismo de acción, es de especial interés la identidad de los residuos de aminoácidos del sitio activo involucrados ya sea en la catálisis o en la unión de los sustratos. En vista que mediante estudios de modificación química se ha probado que los residuos de arginina juegan un papel esencial en muchas enzimas que catalizan reacciones en que participan sustratos aniónicos (Riordan, 1979), decidimos estudiar este aspecto como una forma de abordar el mecanismo de acción de la descarboxilasa

pirofosfomevalónica.

Se utilizó como reactivo para residuos de arginina al fenilglioal, el cual ha sido ampliamente utilizado en situaciones similares (Riordan, 1979), y que se sabe es altamente específico.

3.4.1. Reacción de inactivación.

La reacción de inactivación se efectuó incubando la enzima previamente dializada (75 mU; act. esp. 0,76 U/mg de proteína) con fenilglioal, en un baño a 30° en amortiguador TEA-HCl 100 mM pH 8,15. A tiempos apropiados se sacaron alícuotas de 0,025 ml para el ensayo de actividad espectrofotométrico descrito en la sección 2.4.3. La figura 24 muestra los resultados obtenidos al incubar la descarboxilasa pirofosfomevalónica con diferentes concentraciones de fenilglioal. La inhibición ocurrió rápidamente en las condiciones descritas, siguiendo una cinética de pseudo-primer orden a todas las concentraciones de inactivador ensayadas. Esta cinética de inactivación se observó hasta por lo menos 4 semiperíodos a la mayor concentración de fenilglioal utilizada. Las constantes aparentes de velocidad de primer orden (k_{obs}) se obtuvieron mediante la relación

$$k_{obs} = \frac{0,692}{\tau_{1/2}}$$

y éstas resultaron ser proporcionales a las concentraciones de fenilglioal en el rango de concentración empleado (figura 25), lo que indica que la reacción de inactivación obedece a una cinética de segundo orden (Cardemil & Eyzaguirre, 1981). La constante de

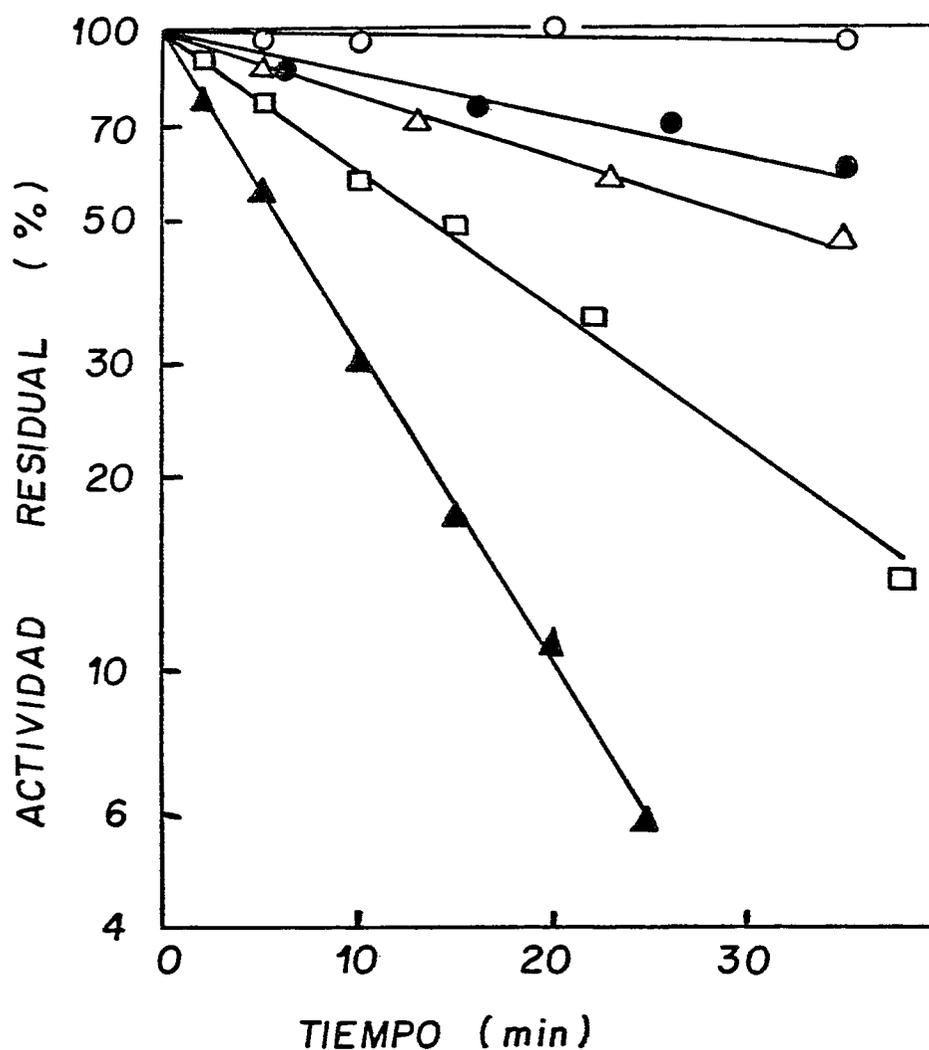


Figura 24. Efecto de la concentración del fenilgloxal en la cinética de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

La reacción se efectuó incubando la enzima (75 mU; act. esp. 0,76 U/mg de proteína) a 30° en ausencia (o) o en presencia de fenilgloxal 0,129 mM (●); 0,258 mM (△); 0,517 mM (□) y 1,05 mM (▲), en amortiguador TEA-HCl 100 mM pH 8,15, en un volumen de 0,21 ml. A tiempos apropiados se tomaron alícuotas de 0,025 ml del medio de reacción para el ensayo de actividad.

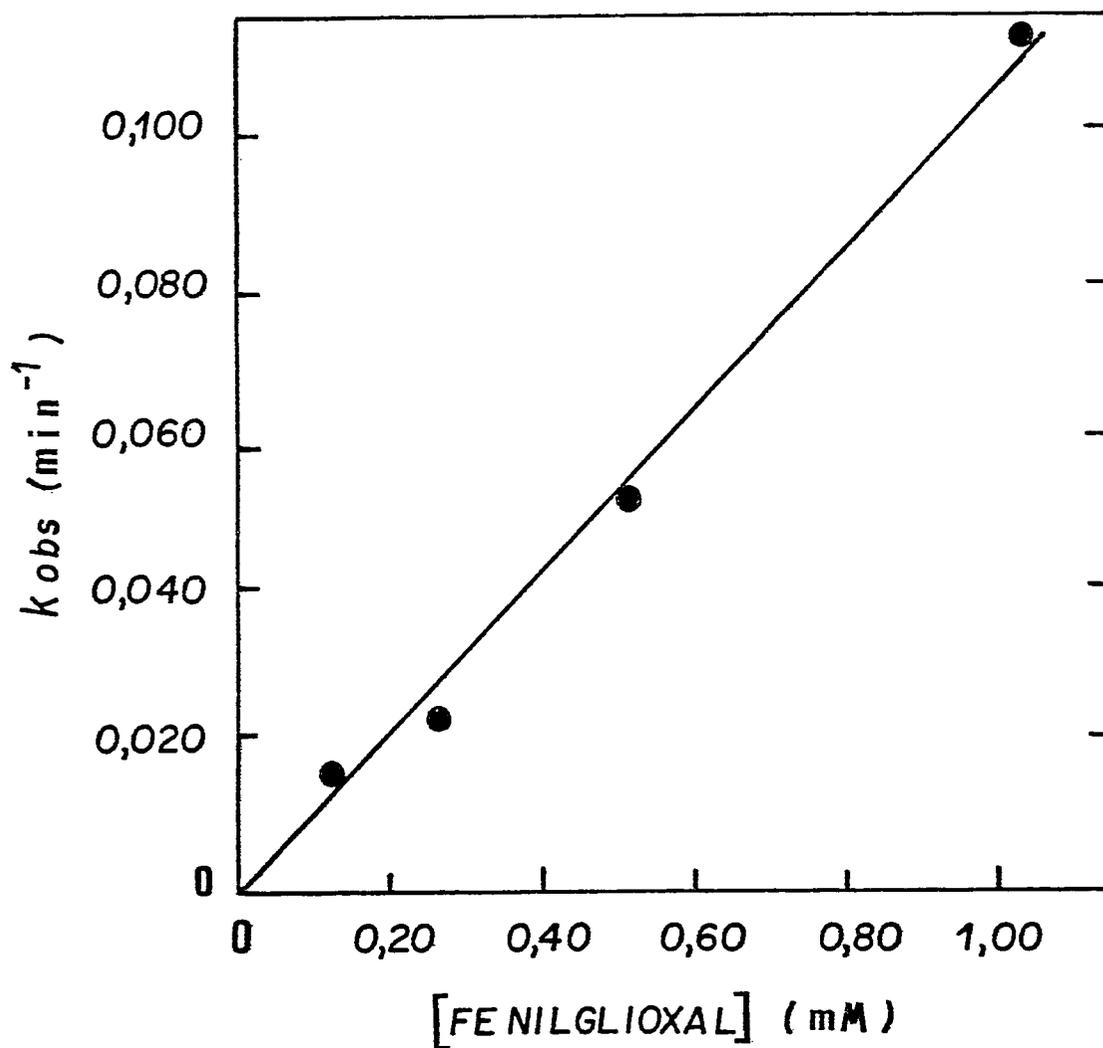
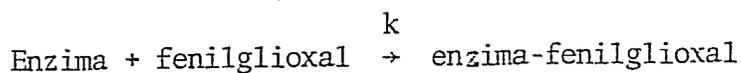


Figura 25. Relación entre las constantes de pseudo-primero orden de velocidad de inactivación y las concentraciones de fenilglioxal.

Se utilizaron los datos de la figura 26. Las constantes de pseudo-primero orden se obtuvieron como se describe en la sección 3.4.1.

velocidad de segundo orden, calculada de la pendiente del mismo gráfico, dió un valor de $108 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$, en las condiciones del experimento. Por consiguiente, la reacción de inactivación puede esquematizarse por la ecuación:



$$\text{en que } k = 108 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$$

El hecho de haber obtenido una línea recta que pasa por el origen al graficar k_{obs} en función de la concentración de fenilgloxal (fig. 25) indica ya que la reacción de una sola molécula de fenilgloxal por sitio activo basta para inactivar la enzima (Cardemil & Eyzaguirre, 1981). Esto es corroborado también al graficar el logaritmo de k_{obs} en función del logaritmo de la concentración del inactivador. Este método, que ha sido utilizado por muchos autores para determinar el orden de la reacción entre diversas enzimas e inactivadores (Hollenberg & col., 1971; Cardemil & Eyzaguirre, 1979; Scrutton & Utter, 1965), se muestra en la figura 26. La pendiente de este gráfico resultó ser 1,07, lo que apoya lo comentado anteriormente y debe ser interpretado como indicación que una molécula de fenilgloxal es suficiente para inactivar a la enzima.

Una demostración concluyente del número total de moléculas de fenilgloxal que reaccionan con la enzima podría lograrse efectuando la reacción de inactivación con [^{14}C] fenilgloxal y cuantificando su unión a la proteína, como ha sido efectuado antes con otras enzimas (Riordan, 1979; Barnard & Popják, 1980). Esto no fue intentado en nuestro caso debido a que la proteína que se

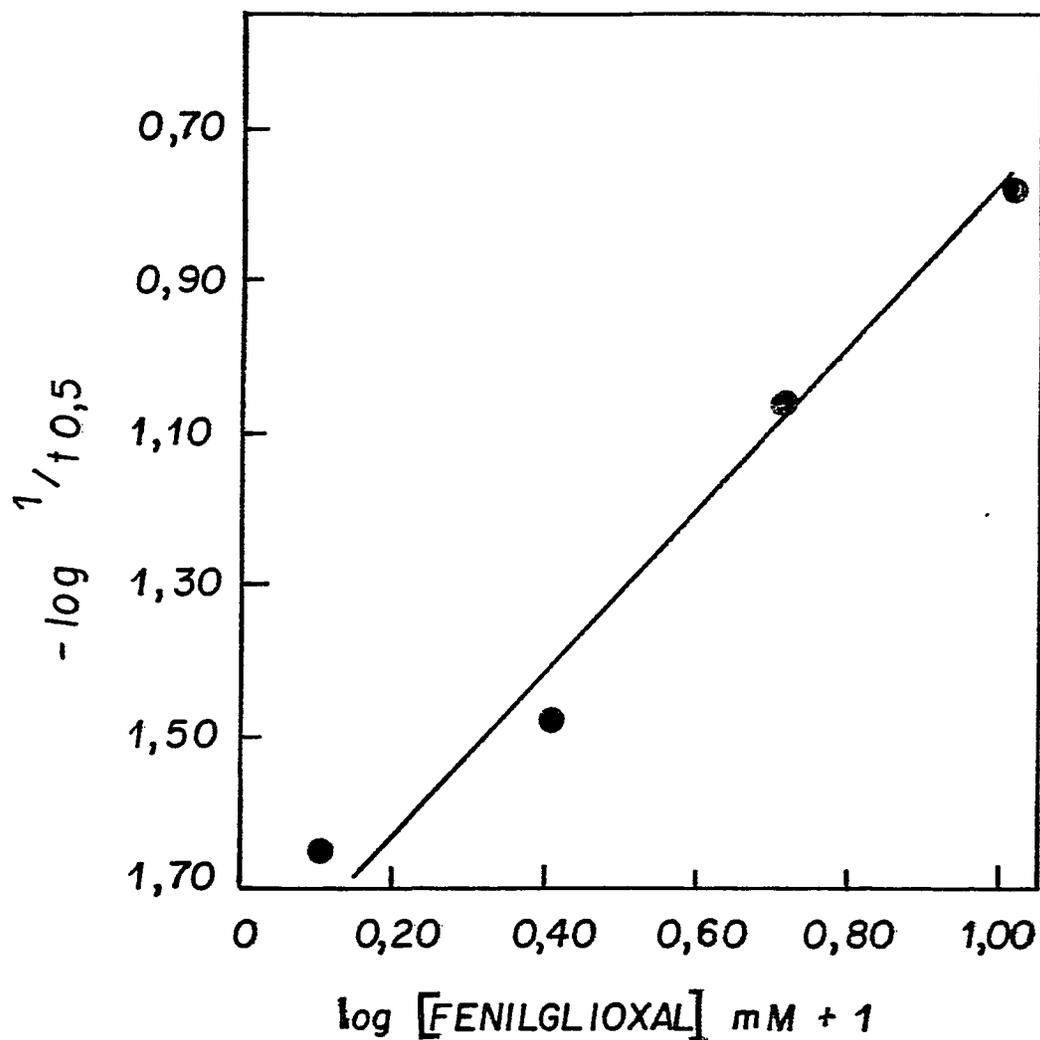


Figura 26. Determinación del orden de la reacción entre la descarboxilasa pirofosfomevalónica y fenilglioal con respecto a este último.

Se utilizaron los datos de la figura 24. La pendiente del gráfico es 1,07.

necesita para un experimento de esta índole requiere estar con una pureza muy próxima al 100%, en tanto que la preparación obtenida en este trabajo pareciera tener aún hasta un 20% de proteína contaminante, como se discutió en la sección 3.5.1.3. Esta contaminación impidió también el intentar identificar el aminoácido modificado mediante análisis de aminoácidos (Peters & col., 1981) o por hidrólisis con proteasas de la enzima modificada con [^{14}C] fenilglioxal, como lo realizaron Bergäuser & Falderbaum (1971) en el caso de la quinasa adenílica.

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

Se probó si el MVA-PP y el ATP ejercían algún efecto protector sobre la enzima, agregando el fenilglioxal a la enzima preincubada con uno u otro sustrato, tanto en presencia como ausencia de Mg^{+2} . La figura 27 muestra que tanto el MVA-PP como el ATP a concentraciones 0,017 mM y 4,9 mM, respectivamente, protegieron efectivamente la inactivación producida por fenilglioxal 1,03 mM. En ambos casos puede apreciarse que la protección ejercida por la presencia combinada del sustrato y MgCl_2 5 mM es bastante menor. La presencia solo de MgCl_2 5 mM causa un aumento en la velocidad de inactivación. Este aumento, si bien no muy grande, se observó sistemáticamente en numerosos experimentos.

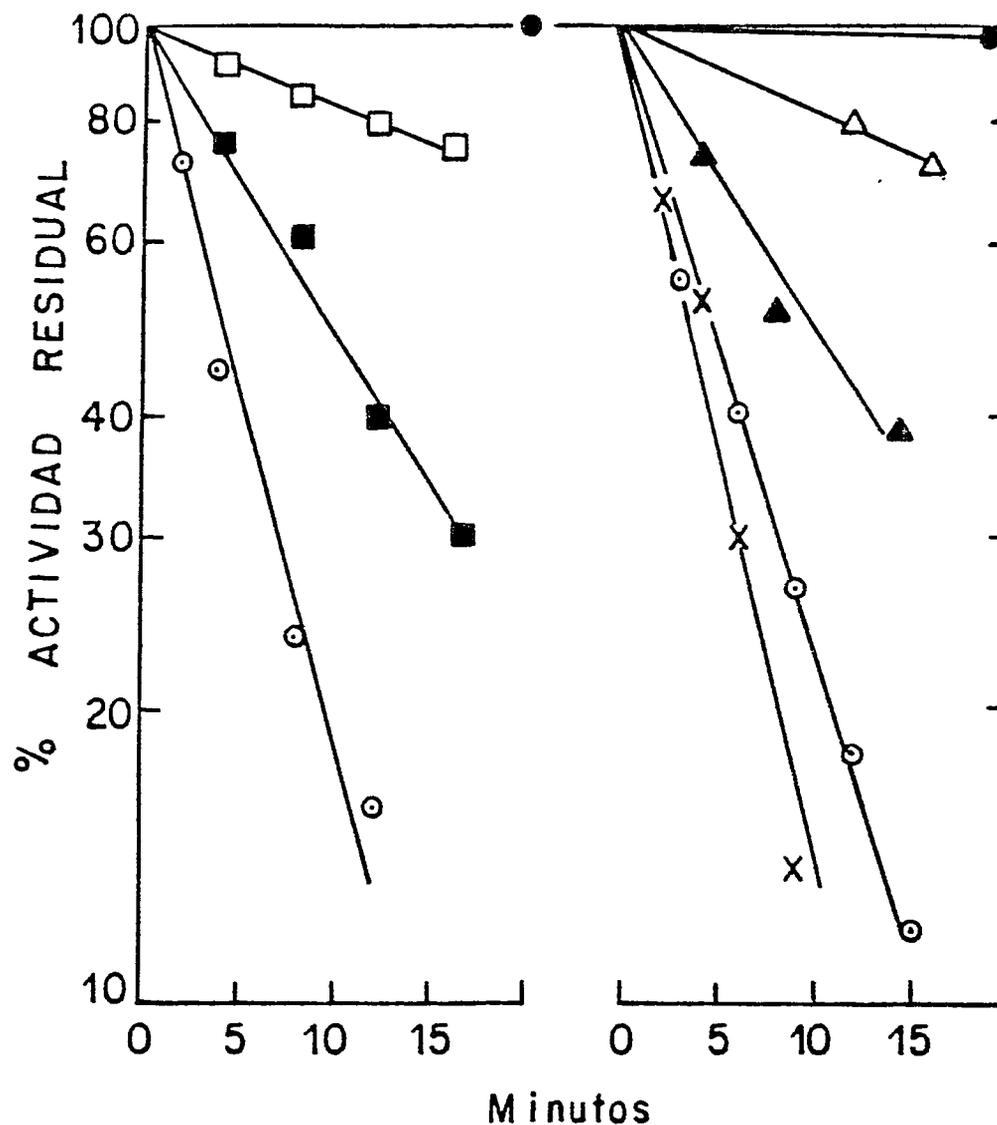
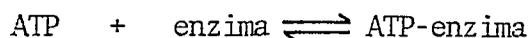


Figura 27. Efecto de los sustratos y Mg^{+2} en la velocidad de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilgloxal.

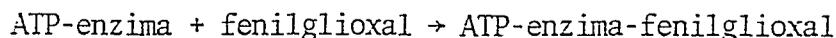
Se incubó a 30° la descarboxilasa pirofosfomevalónica (67,5 mU, act. esp. 5,26 U/mg de proteína), en presencia de MVA-PP 0,017 mM con (■) o sin (□) $MgCl_2$ 5 mM, de ATP 4,9 mM con (▲) o sin (△) $MgCl_2$ 5 mM, o de $MgCl_2$ 5 mM (x). Los símbolos (○) representan la actividad de la enzima en ausencia de protectores, en tanto que (●) son controles que no contienen fenilgloxal. La incubación se efectuó en un volumen de 0,21 ml en amortiguador TEA-HCl 100 mM pH 8,1. A los tiempos señalados en la figura, se tomaron alícuotas de 0,025 ml para el ensayo de la enzima. La concentración de fenilgloxal empleada para inactivar la enzima fue de 1,03 mM. Las rectas fueron trazadas a mano.

3.4.3. Efecto de la concentración del ATP en la velocidad de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioal.

En las figuras 28 y 29 puede verse que el efecto protector del ATP en la inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioal depende de su concentración. A partir de estos datos es posible calcular la constante de disociación del complejo ATP-enzima si se grafica la constante de pseudo-primer orden para la reacción de inactivación en presencia de ATP, en función del cociente que resulta de dividir las diferencias entre las constantes de pseudo-primer orden para las reacciones de inactivación en ausencia y presencia de ATP por la concentración de ATP (ver Apéndice). En la figura 30 se presenta este gráfico, cuya pendiente permite estimar la constante de disociación para la reacción.



la que resulta ser $5,5 \times 10^{-5}$ M. El hecho que la recta no pase por el origen debe interpretarse como que la unión de ATP a la enzima no impide totalmente que ésta reaccione a su vez con el inactivador. A partir de la intersección en el eje de las ordenadas, puede calcularse la constante de velocidad de segundo orden para la reacción



y ésta resulta ser $27 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$

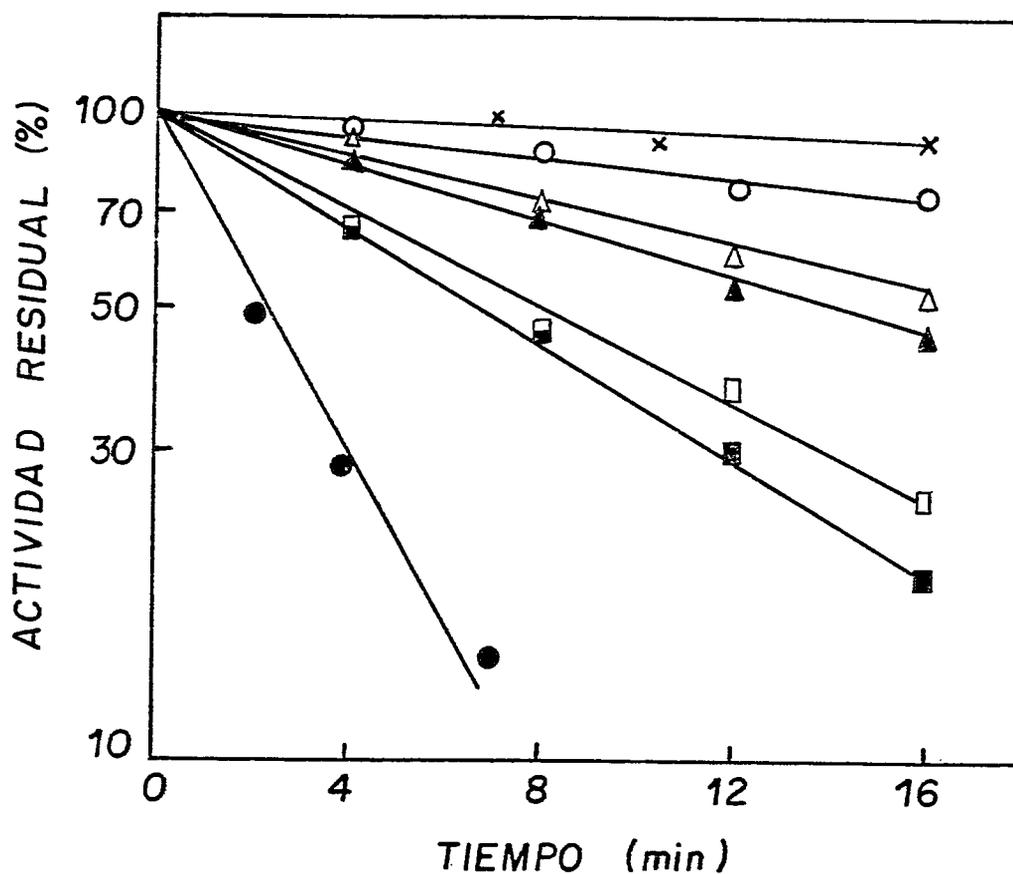


Figura 28. Efecto de la concentración de ATP en la velocidad de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioxal.

Se incubó a 30° la descarboxilasa pirofosfomevalónica (69 mU; act. esp. 5,26 U/mg de proteína) en ausencia (●) o en presencia de ATP 0,150 mM (■); 0,305 mM (□); 0,610 mM (▲); 2,44 mM (Δ) y 4,9 mM (o). Los símbolos (x) son controles que no tienen fenilglioxal. La incubación se efectuó en un volumen de 0,21 ml en amortiguador TEA-HCl 100 mM pH 8,1; EDTA 0,1 mM, conteniendo fenilglioxal 1,03 mM. A los tiempos indicados en la figura, se tomaron alícuotas de 0,025 ml para el ensayo de la enzima.

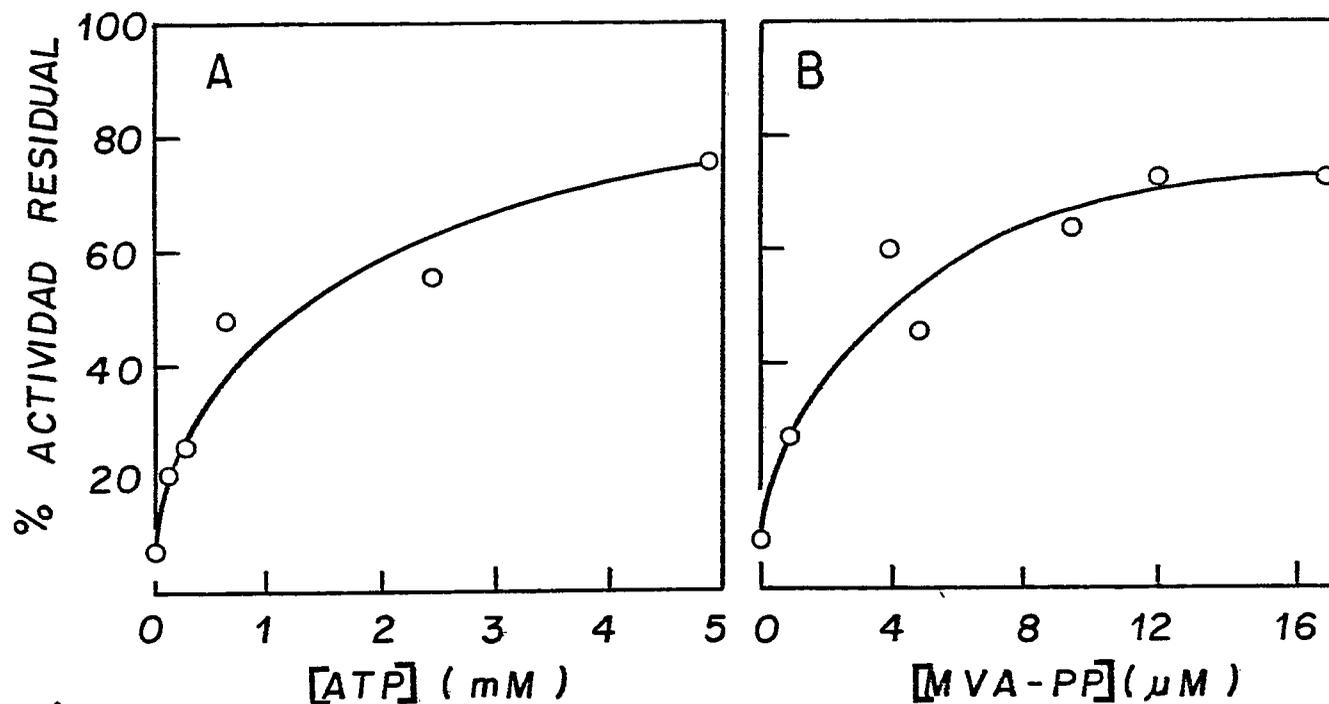


Figura 29. Protección por sustratos de la inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioxal.

Se representa la actividad residual de la enzima a los 15 minutos de reacción con fenilglioxal, en presencia de distintas concentraciones de (A) ATP y, (B) MVA-PP. Los datos se tomaron de las figuras 28 y 31

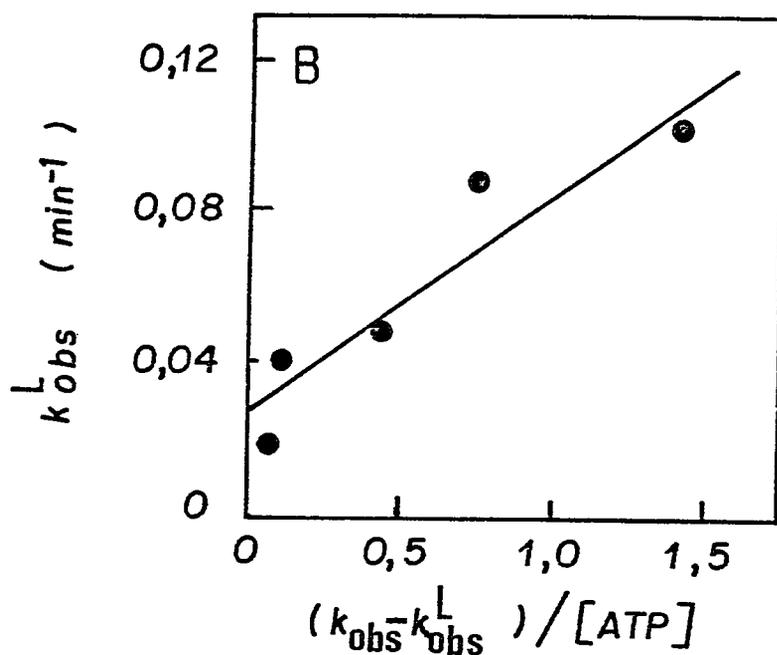
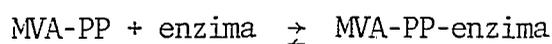


Figura 30. Efecto protector del ATP en la inactivación con fenilglioxal de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

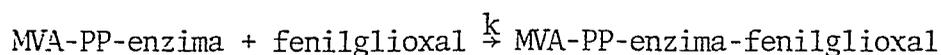
Se representan en el gráfico los valores de k_{obs} (constante de inactivación de pseudo-primer orden en ausencia de ATP) y los de k_{obs}^L (constante de inactivación de pseudo-primer orden en presencia de ATP), determinados a partir de los datos presentados en la figura 28.

3.4.4. Efecto de la concentración del MVA-PP en la velocidad de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioxal.

En las figuras 29 y 31 se observa que el efecto protector del MVA-PP en la inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioxal depende de su concentración. A partir de los valores calculados con estos datos para las constantes de pseudo-primer orden para la reacción de inactivación se hizo el gráfico secundario que se presenta en la figura 32, y del cual es posible determinar que el valor para la constante de disociación para la reacción:



es de $1,7 \times 10^{-6}$ M. Se aprecia también en la figura que la recta no pasa por el origen, lo que está indicando que la unión del MVA-PP a la enzima no protege totalmente a ésta de su reacción con fenilglioxal. Tal como se hizo antes en el caso de la protección de la inactivación con ATP (sección 3.4.3), a partir de la intersección en el que de las ordenadas puede calcularse el valor de la constante de velocidad de segundo orden para la reacción



resultando esta constante igual a $10 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Las razones teóricas para este tratamiento se presenta en el Apéndice al final de este trabajo, y en la tabla 13 se presenta un resumen con los valores calculados para las constantes.

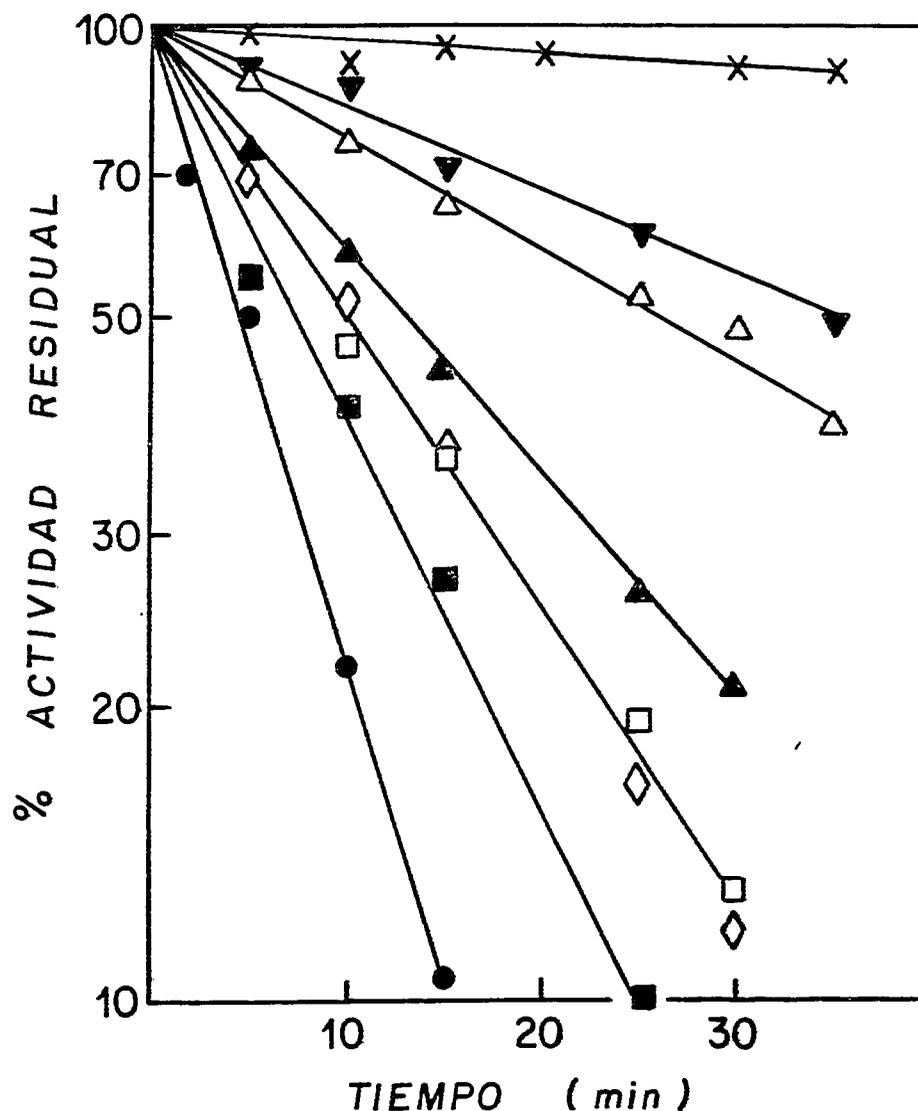


Figura 31. Efecto de la concentración del MVA-PP en la velocidad de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilgloxal.

Se incubó a 30° la descarboxilasa pirofosfomevalónica (100,5 mU; act. esp. 6,5 U/mg de proteína) en ausencia (●) o en presencia de MVA-PP 0,0011 mM (■); 0,0040 mM (◇); 0,0047 mM (□); 0,0096 mM (▲); 0,012 mM (△) y 0,0168 mM (▼). Los símbolos (x) son controles que no contienen fenilgloxal. La incubación se efectuó en un volumen de 0,31 ml en amortiguador TEA-HCl 100 mM pH 8,2; EDTA 0,1 mM, conteniendo fenilgloxal 1,05 mM. A los tiempos indicados en la figura, se tomaron alícuotas de 0,020 ml para el ensayo de la enzima.

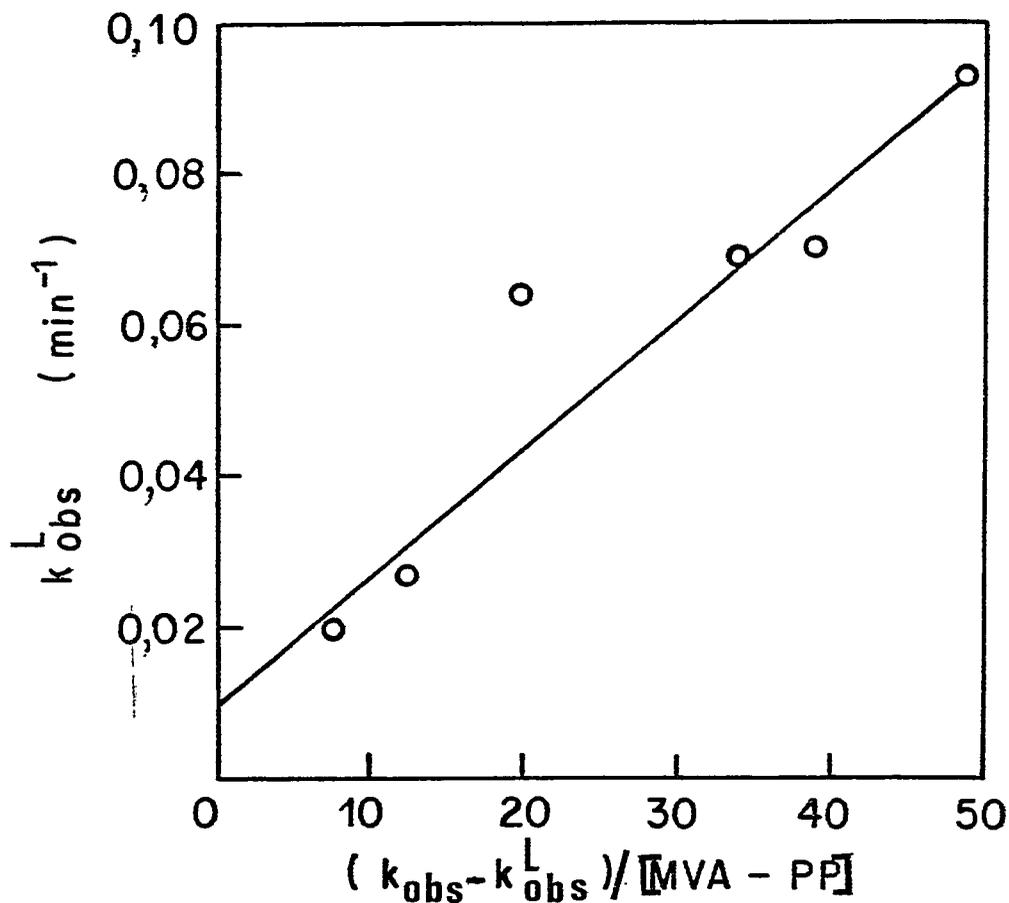


Figura 32. Efecto protector del MVA-PP en la inactivación con fenilglioxal de la descarboxilasa pirofosfomevalónica.

Se representan en el gráfico los valores de k_{obs} (constante de pseudo-primero orden en ausencia de MVA-PP) y de k_{obs}^L (constante de pseudo-primero orden en presencia de MVA-PP), determinados a partir de los datos presentados en la figura 31.

Tabla 13. Constantes cinéticas obtenidas a partir de los experimentos de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica con fenilglioxal.

Constante cinética	Magnitud
k_1	$108 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$
k_2 (E · ATP)	$27 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$
k_2 (E · MVA-PP)	$10 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$
K_d (E · ATP)	$55 \times 10^{-6} \text{ M}$
K_d (E · MVA-PP)	$1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$

k_1 es la constante de segundo orden para la reacción de la enzima con fenilglioxal; k_2 (E·ATP) y k_2 (E·MVA-PP) son las constantes de segundo orden para la reacción de los complejos E·ATP y E·MVA-PP con fenilglioxal, respectivamente; K_d (E·ATP) y K_d (E·MVA-PP) son las constantes de disociación de los complejos E·ATP y E·MVA-PP, respectivamente. Las constantes se obtuvieron como se describe en el texto.

3.4.5. Determinación de las K_m y V_m aparentes de la descarboxilasa pirofosfomevalónica modificada con fenilglioxal.

Se determinaron las K_m y V_m aparentes para el MVA-PP y el ATP en la enzima modificada con fenilglioxal, como se indica en la sección 2.20.3 de Métodos. Como controles se utilizó una muestra de enzima sin tratar con el reactivo. La concentración del MVA-PP se varió entre 0,0033 mM y 0,099 mM, a concentración constante de ATP 4,9 mM y de $MgCl_2$ 10 mM. El ATP se varió entre 0,20 mM y 4,9 mM, a concentración constante de MVA-PP 0,099 mM y manteniendo el $MgCl_2$ 5 mM sobre la concentración de ATP. Los datos obtenidos se presentan en la figura 33. Los valores de K_m y V_m aparentes determinados a partir de esa figura se muestran en la tabla 14, donde puede verse que prácticamente no hay variación en las K_m aparentes determinadas en la enzima modificada. Las disminuciones de las V_m aparentes son comparables al grado de inactivación experimentado por la enzima (42% de actividad residual).

Figura 33. Gráficos de Hanes para la obtención de los parámetros cinéticos de la descarboxilasa pirofosfomevalónica modificada con fenilglioxal.

La descarboxilasa pirofosfomevalónica (100 mU; act. esp. 5,26 U/mg de proteína) se incubó en un volumen de 2,03 ml a 30° durante 10 minutos con fenilglioxal 0,45 mM, en amortiguador TEA-HCl 100 mM pH 8,15 conteniendo EDTA 0,1 mM. Luego se filtró por una columna Sephadex G-10, como se describe en la sección 2.20.4. Otra muestra de enzima se trató de manera similar pero omitiendo el fenilglioxal. Se determinaron las K_m aparentes para ambos sustratos de acuerdo con lo descrito en la sección 3.4.4. En la figura se representan los valores obtenidos para la enzima modificada (●) y control (○).

Según la ecuación de Hanes ($\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{S}{V_m}$), los valores de K_m pueden obtenerse de la intersección en las abscisas y las de V_m a partir de la pendiente.

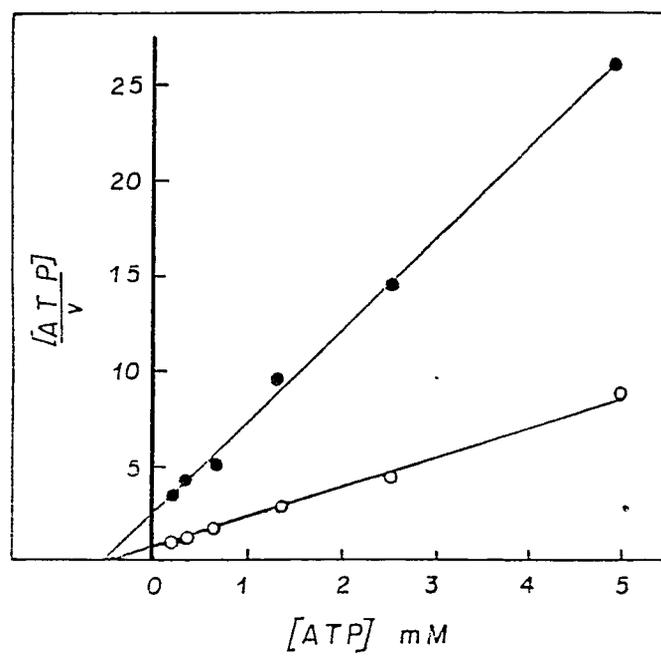
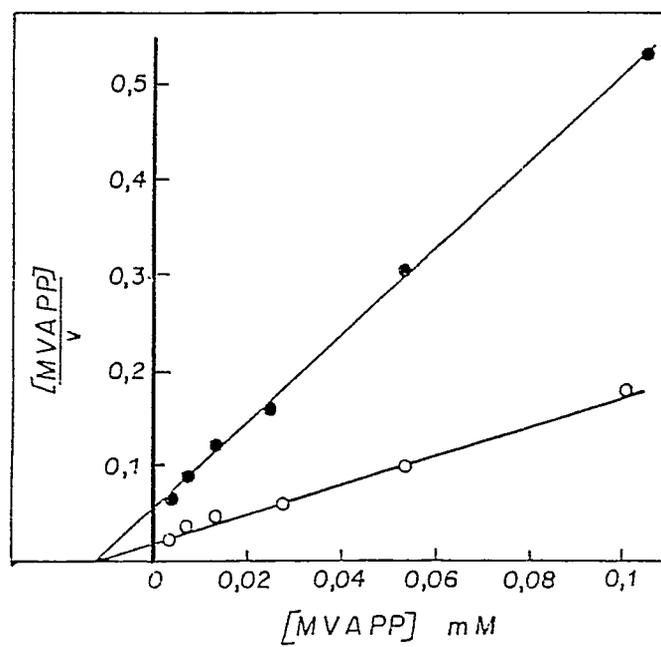


Tabla 14. Km y Vm aparentes para el MVA-PP y el ATP de la enzima modificada con fenilglioxal.

	MVA-PP		ATP	
	Km ap (mM)	Vm ap (U/ml)	Km ap (mM)	Vm ap (U/ml)
Control	0,014 ± 0,0008	0,62 ± 0,024	0,41 ± 0,090	0,66 ± 0,018
Modificada	0,013 ± 0,0005	0,23 ± 0,010	0,52 ± 0,039	0,20 ± 0,009

Se determinaron los Km y Vm aparentes para ambos sustratos usando los datos de la figura 33. Para el cálculo de los errores se utilizaron las desviaciones estándares de las intersecciones y de las pendientes de la línea de regresión.

DISCUSION

En el presente trabajo se ha efectuado un estudio de la descarboxilasa pirofosfomevalónica desde dos puntos de vista. Por una parte se ha tratado de esclarecer su posible función como enzima regulatoria en la biosíntesis del colesterol en hígado de rata, sugerido por Ramachandran & Shah (1976) y Shama Bhat & Ramasarma (1977), y por otra parte se ha intentado obtener una preparación estable y altamente purificada de esta enzima con la que fuera posible realizar estudios acerca de su estructura y mecanismo de acción.

4.1. Importancia de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata en la regulación de la biosíntesis del colesterol.

Los datos presentados en este trabajo indican que tanto las quinasas mevalónica y fosfomevalónica como la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata responden en igual forma frente a las distintas situaciones fisiológicas a que se expusieron los animales. Estos resultados no apoyan la hipótesis planteada por Ramachandran & Shah (1976), quienes sugirieron, basados en experimentos realizados en ratas lactantes y destetadas, que la descarboxilasa pirofosfomevalónica sería una enzima regulatoria en la biosíntesis de escualeno a partir de MVA en hígado de rata. En el caso que esta enzima hubiese tenido características regulatorias, se deberían haber observado variaciones solo en su actividad y no en la de las enzimas que la preceden en la ruta metabólica, a menos que a éstas también se les asigne un papel regulatorio.

Por otra parte, la comparación de nuestros resultados con los obtenidos por otros autores que han determinado otras actividades enzimáticas de la biosíntesis del colesterol en hígado de ratas sometidas a condiciones fisiológicas similares a las usadas en este trabajo, es de indudable interés y permite postular un mecanismo más general para la regulación de la biosíntesis del colesterol.

Al comparar nuestros resultados acerca de la disminución en las actividades de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica luego de un ayuno de 48 horas (tabla 5) con los obtenidos tanto por Clinkenbeard & col. (1975) como con los de Slakey & col. (1972), podemos concluir que el ayunar ratas por 48 horas tiene como consecuencia una disminución de todas las enzimas ubicadas en el segmento de la vía de la biosíntesis del colesterol ubicadas entre acetil-CoA y escualeno, siendo la reductasa de HMG-CoA la enzima que experimenta el mayor descenso de actividad.

Si consideramos ahora el efecto de la alimentación con dietas conteniendo colesterol o colestiramina, podemos llegar también a una conclusión similar. En este caso nuestros resultados (tabla 4) junto con los de Clinkenbeard & col. (1975) y los de Brown & col. (1979), indican que hay una respuesta rápida (dentro de las 12 horas) de la reductasa de HMG-CoA, seguida posteriormente de una alteración en el mismo sentido de las otras enzimas que catalizan etapas desde acetil-CoA hasta, por lo menos, IpPP.

Por último, se sabe que en el caso de la diabetes experimental hay un descenso de 14 veces al cabo de 7 días en la actividad de la reductasa de HMG-CoA hepática (Nepokroeff & col., 1974), seguido de una

disminución más lenta en la velocidad de incorporación de $[2-^{14}\text{C}] \text{MVA}$ a colesterol, que se informa es de 3,6 veces al cabo de 14 días (Cayen & col., 1975).

La comparación de la información acumulada hasta este momento acerca de las variaciones en su actividad experimentadas por enzimas que catalizan etapas desde acetyl-CoA hasta escualeno en hígado de rata, de acuerdo a la condición fisiológica del animal, ofrece una explicación para la regulación de este segmento de la biosíntesis del colesterol. Parece ser que el control del flujo de metabolitos en esta ruta (por lo menos desde la etapa catalizada por la tiolasa de acetyl-CoA hasta la sintetasa de escualeno, (ver figura 2) lo realiza la reductasa de HMG-CoA y que luego (dentro de un período de tiempo de varios días y si la alteración original persiste), las otras enzimas adaptan sus actividades de acuerdo a la nueva situación. Un resumen general de los datos que permitieron llegar a esta conclusión (tanto de los presentados en este trabajo como de los de otros autores), se muestra en la tabla 15.

Otros experimentos, que apuntan en la misma dirección, se han informado en pavos alimentados con colesterol, donde las actividades hepáticas de la reductasa de HMG-CoA, de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica, y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica disminuyen con respecto a las de los animales control (Hunter & Mitchell, 1978). De igual forma, resulta de interés hacer notar que en varios estudios recientes realizados en diversos tejidos en cultivo tales como células de ovario de hamster chinos (Chang & Limanek, 1980), fibroblastos humanos (Faust & col., 1979; Mitchell & Avigan, 1981), y

Tabla 15. Variación coordinada de las enzimas que catalizan etapas desde acetyl CoA a escualeno en hígado de rata.

	Alimentación con colestiramina	Alimentación con colecsterol (% de la actividad basal)	Ayuno 48 hrs.	Diabetes
Tiolasa de acetoacetyl-CoA ¹	173 ^a	29 ^d	46	---
Sintetasa de HMG-CoA ¹	246 ^a	15 ^d	24	---
Reductasa de HMG-CoA ²	342 ^b	11 ^e	9	78, ³
Quinasa mevalónica ⁴	131 ^c	56 ^f	70	61 ^h
Quinasa fosfomevalónica ⁴	176 ^c	43 ^f	25	42 ^h
Descarboxilasa pirofosfomevalónica ⁴	278 ^c	37 ^f	44	27 ^h
Isomerasa de isopentenilpirofosfato ⁵	---	---	20	---
Preniltransferasa ⁵	---	---	29	---
Sintetasa de escualeno ⁵	---	---	25	---

^a 3% por 3 días, ^b 2% por 3 días, ^c 3% por 6 días, ^d 1% por 7 días, ^e 1% por 12 horas, ^f 2% por 6 días;

^g 7 días después de inyección de estreptozotocina, ^h 10 días después de inyección de estreptozotocina.

¹ Clinkenbeard & col. (1975); ² Brown & col. (1979); ³ Nepokroeff & col. (1974); ⁴ Este trabajo;

⁵ Slakey & col. (1972).

células Hela (Cavanee & Melnykovich, 1977) se ha visto que la remoción de lípidos del medio de cultivo da como resultado un aumento significativo en las actividades de la tiolasa de acetoacetyl-CoA y de la sintetasa de HMG-CoA citosólicas, y de la reductasa de HMG-CoA, de la quinasa mevalónica, de la descarboxilasa pirofosfomevalónica y de la sintetasa de escualeno. En estos sistemas, el aumento en la actividad de la reductasa de HMG-CoA se detecta antes que los de las otras enzimas, lo que está de acuerdo con su papel de enzima regulatoria de la biosíntesis del colesterol. El conjunto de todos estos experimentos indica, entonces, que las variaciones en el mismo sentido en la actividad de las enzimas de la biosíntesis del colesterol son un fenómeno más general de lo que antes se pensaba.

En tejidos en los que no existe una síntesis importante de colesterol a partir de acetyl-CoA, como el renal, también se han observado variaciones en el mismo sentido en la actividad de las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y de la descarboxilasa pirofosfomevalónica (Jabalquinto & Cardemil, 1981). En este tejido, sin embargo, y dado a que prácticamente no hay estudios realizados en otras enzimas de esta ruta (Jabalquinto & Cardemil, 1982), no es posible aún postular un mecanismo como el propuesto para la biosíntesis del colesterol en hígado de rata.

Los cambios en la actividad de la reductasa de HMG-CoA hepática parecen deberse a cambios en la cantidad de proteína y, posiblemente, a interconversión de la enzima entre especies activas y poco o no activas (Rodwell & col., 1973; Hardgrave & col., 1979). Los

mecanismos responsables de los cambios en la actividad de las otras enzimas no se conocen. Parece probable, sin embargo, que éstos puedan deberse a cambios en la cantidad neta de las enzimas, en vista del tiempo que se necesita para visualizarlos. Sería de gran interés determinar si también existen variaciones concertadas en la actividad de estas enzimas en estados en los que la reductasa de HMG-CoA ya no es responsable del control de la biosíntesis del colesterol, tales como en ciertos estados tumorales malignos (Siperstein, 1970), o en otras situaciones (Nervi & col., 1976; Volpe & Obert, 1981).

Se encuentran descritos en la literatura diversos otros casos de fluctuaciones coordinadas en la actividad de varias enzimas de una misma ruta metabólica. Algunos ejemplos los constituyen las observaciones realizadas en las enzimas de la biosíntesis de los ácidos grasos en hígado de pollos en desarrollo (Fischer & Goodridge, 1978) y en las enzimas del ciclo de la urea en hígado de rata (Snodgrass & col., 1978).

4.2. Purificación y propiedades de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo.

La descarboxilasa pirofosfomevalónica se ha purificado parcialmente de diversas fuentes, pero sólo se la ha obtenido en forma homogénea de hígado de rata (Shama Bhat & Ramasarma, 1980). La enzima obtenida de hígado de rata, sin embargo, es extremadamente inestable, lo que impide su utilización en estudios acerca de su mecanismo de acción. Además, la actividad específica que se informa para la enzima homogénea ($0,056 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) es menor que la de una

preparación poco purificada de la enzima de hígado de cerdo ($0,145 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; Beytía, 1972) y considerablemente más baja que la de otra preparación semipurificada proveniente del látex del árbol del caucho ($0,7 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; Skilleter & Kekwick, 1971). Estas grandes diferencias en actividad específica hacen pensar que la preparación homogénea proveniente de hígado de rata pudiera contener una fracción importante de enzima inactiva.

En vista de los inconvenientes que presenta la preparación homogénea de la enzima de hígado de rata y de la inestabilidad de una preparación de descarboxilasa pirofosfomevalónica parcialmente purificada de hígado de cerdo (actividad específica $0,145 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$; factor de purificación aprox. 34) (Beytía, 1972), se optó por intentar la purificación de la enzima de hígado de pollo ya que, por una parte, este es un material de fácil obtención y, por otra, existía el antecedente que ya se habían obtenido otras enzimas de la misma ruta metabólica a partir de esta fuente, como la sintetasa de HMG-CoA (Clinkenbeard & col., 1975), la reductasa de HMG-CoA (Beg & col., 1979) y la preniltransferasa (Reed & Rilling, 1975).

Esta última enzima, además, resultó ser considerablemente más estable que la misma enzima aislada de levaduras (Eberhardt & Rilling, 1974).

4.2.1. Purificación de la enzima de hígado de pollo

En diversas preparaciones se obtuvo siempre alrededor de 1 mg de proteína a partir de 1 Kg de hígado de pollo. La enzima obtenida se encontró homogénea de acuerdo a electroforesis en geles de poli-acrilamida en condiciones nativas, pero se encontró hasta un 20% de contaminación de acuerdo a electroforesis en condiciones desnaturantes.

Se encontró que el contenido de descarboxilasa pirofosfomevalónica del extrano crudo fluctuó entre 100 y 150 unidades/Kg de hígado. Esta variación relativamente pequeña probablemente se deriva del hecho que los hígados provinieron siempre de animales de la misma variedad, alimentados de manera uniforme y sacrificados a la misma edad. Es posible que en pollos alimentados con distintas dietas se produzcan variaciones en la actividad de ésta y otras enzimas de la biosíntesis del colesterol, en analogía con lo observado en este trabajo para las quinasas mevalónica y fosfomevalónica y descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de rata. El rendimiento del proceso completo de purificación resultó ser también bastante reproducible y la actividad específica final fluctuó entre 4,85 y 6,67 U/mg de proteína.

La inclusión de sulfato de protamina en el extracto inicial resultó imprescindible ya que de otra manera el sedimento obtenido al centrifugar este extracto a 25.500 x g durante 15 minutos resultaba

difícil de separar del sobrenadante. Por razones prácticas no resultaba conveniente incluir aquí una etapa de centrifugación a mayor velocidad, ya que en este caso los volúmenes que se podían manejar eran comparativamente pequeños. Los resultados obtenidos con la inclusión del sulfato de protamina fueron bastante reproducibles, a diferencia de los observados por Beytía (1972), quien no logró buenos resultados con un tratamiento similar al diseñar un método para purificar la quinasa mevalónica de hígado de cerdo. El ajuste a pH 5,3 y posterior centrifugación del extracto permite eliminar alrededor de un 40% de las proteínas, sin ninguna pérdida de unidades de actividad enzimática. Este tratamiento es especialmente ventajoso debido al poco tiempo necesario para su realización. Al respecto es interesante mencionar que Skilleter & Kekwick (1971) incluyen también una etapa similar en su purificación parcial de la descarboxilasa pirofosfo mevalónica de H. brasiliensis.

La última etapa de purificación consistió en pasar la muestra por una columna de azul de dextrano-Sepharose. Este material, que ha sido utilizado con éxito en la purificación de varias deshidrogenasas y quinasas (Beissner & Rudolph, 1978; Edwards & Woody, 1979), resultó también efectivo en nuestro caso. La enzima no pudo ser eluida con ATP 1 mM pero sí con KCl 75 mM, lo que puede ser tomado como indicación que la unión azul de Cibacrón-proteína no es a través del sitio de unión del ATP. Al parecer, alteraciones en la estructura del ATP hacen que éste sea incapaz de unirse a la enzima, ya que tampoco se logró retención de ella en diversas columnas de ATP-agarosa ensayadas. Por lo demás, y de acuerdo a las constantes

de disociación de los complejos enzima-sustratos determinadas a través de los experimentos de modificación química con fenilglioxal, la enzima presenta una afinidad por el MVA-PP por lo menos un orden de magnitud mayor que por el ATP. Esta información es útil si se desea preparar un derivado de agarosa que contenga un ligando altamente específico para la enzima, susceptible de usarse en cromatografía de afinidad de la descarboxilasa pirofosfomevalónica. En este caso, se deberían buscar ligandos que fueran análogos estructurales del MVA-PP. En la purificación de la enzima de hígado de rata, Shama Bhat & Ramasarma (1980) emplearon como última etapa una columna de Sepharose 4B unida a ácido p-cumárico (ácido trans-3-(p-hidroxifenil) propenoico). Este ligando - si bien no puede considerarse un análogo del MVA-PP - resultó de utilidad, pudiendo eluirse la enzima con MVA 10 mM, que los autores anteriormente nombrados demuestran se comporta como un inhibidor competitivo del MVA-PP.

Aún cuando la enzima purificada no requiere de reductores de grupos sulfhidrilos para su actividad o estabilidad, nosotros encontramos que era conveniente mantener 2-mercaptoetanol 10 mM en todas las soluciones usadas en la purificación de la enzima por lo menos hasta la etapa de Sephadex G-200, ya que así se lograba un mayor rendimiento en la purificación. La razón para este hecho no está clara, aunque podría deberse a inhibición por el mercaptoetanol de actividades enzimáticas inactivantes de la descarboxilasa pirofosfomevalónica presentes en las primeras etapas. Estas posibles actividades enzimáticas inactivantes no parecer ser proteasas sensibles a

inhibición por fluoruro de fenilmetanosulfonato ya que en una preparación en que se incluyó este compuesto no se logró ni mayor actividad específica ni mejor rendimiento en la purificación.

La inclusión de glicerol al 20% en las etapas de purificación posteriores a Sephadex G-200 significó aumentar el rendimiento de ellas. Este efecto estabilizador de glicerol sobre diversas enzimas ha sido observado en muchos casos si bien, como acota Monasterio (1980), el mecanismo de protección ha sido poco estudiado en cada caso. Para la ribonucleasa se ha postulado (Gerlsma, 1968) que el efecto estabilizante del glicerol se debería en gran parte al reforzamiento de las interacciones hidrofóbicas y a la menor ruptura de enlaces de hidrógeno de la proteína ocasionada por el medio. Estudios recientes de Lee & Timasheff (1981) realizados usando α -quimotripsina, quimotripsinógeno y ribonucleasa, indican que la estabilización de estas enzimas por sacarosa parece deberse en gran parte al efecto de la sacarosa sobre la tensión superficial de agua. Al aumentar la fuerza de cohesión entre las moléculas del solvente se estabilizaría la estructura de la proteína ya que el estado desnaturado se hace termodinámicamente menos favorable aún en estas condiciones. Tal explicación también podría extenderse al efecto del glicerol.

4.2.2. Propiedades físico-químicas de la enzima.

El peso molecular de la enzima nativa se determinó por filtración en Sephadex G-200 y en gradiente de sacarosa. Los valores encontrados (87.600 y 81.500, respectivamente) son aproximadamente

el doble del peso molecular determinado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo SDS y 2-mercaptoetanol (43.500) lo que permite concluir que la enzima estaría estructurada a base de 2 subunidades idénticas o muy semejantes. La estructura de esta enzima es, entonces, bastante diferente de la estructura de la enzima de hígado de rata, que se ha informado tiene un peso molecular de 126.000 y cuatro subunidades iguales de peso molecular 35.000 cada una (Shama Bhat & Ramasarma, 1980). Es relativamente frecuente encontrar diferencias estructurales de esta índole en enzimas aisladas de diversos organismos (Darnall & Klotz, 1975).

El pI encontrado (4,8) se encuentra a un valor de pH ácido, lo que es bastante frecuente (Malamud & Drysdale, 1978; Giana zza & Righetti, 1980), y está de acuerdo con el comportamiento de la enzima durante la cromatografía en DEAE-celulosa a pH 7,0, pues a ese pH la enzima debe presentar carga neta negativa pudiendo de esa forma unirse a los grupos cargados positivamente en la celulosa. Es posible que esta etapa de purificación pueda mejorarse si la cromatografía se hace a un pH menor.

4.2.3. Propiedades generales de la enzima.

Nuestros resultados indican que la descarboxilasa pirofosfo mevalónica de hígado de pollo no requiere de la presencia de reductores de grupos sulfhidrilos para su actividad ni para su estabilidad. Al respecto, Skilleter & Kekwick (1971) informan que para la enzima parcialmente purificada de látex de H. brasiliensis la presencia de N-acetilcisteína no influye en su estabilidad, mientras que tanto

la enzima parcialmente purificada de hígado de cerdo como la purificada a homogeneidad de hígado de rata requieren de la presencia de reductores de grupos sulfhidrilos para su actividad óptima (Popják, 1969; Shama Bhat & Ramasarma, 1980).

Otras enzimas de la biosíntesis de isoprenoides también presentan diferencias en cuanto al requerimiento de reductores de grupos sulfhidrilos para su actividad o estabilidad. Así, por ejemplo, se sabe que las quinasas mevalónicas y fosfomevalónica de hígado de cerdo requieren 2-mercaptoetanol para su estabilidad (Beytía & col., 1970; Bazaes & col., 1980), mientras que no ocurre otro tanto en el caso de las mismas enzimas presentes en homogeneizados de hígado de pollos recién nacidos (García-Martínez & col., 1978).

Los estudios acerca del efecto de diversos iones metálicos bivalentes en la actividad de la enzima reflejan resultados esencialmente similares a los encontrados por otros investigadores usando descarboxilasas pirofosfomevalónicas de otras fuentes, en que Mg^{+2} o Mn^{+2} son casi igualmente efectivos (Popják, 1969; Skilleter & Kekwick, 1971; Shama Bhat & Ramasarma, 1980). En cuanto al requerimiento de nucleótidos, la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo presenta una marcada preferencia por el ATP, a diferencia de la enzima de hígado de rata, en que la actividad en presencia de GTP es un 29% de la encontrada usando ATP (Shama Bhat & Ramasarma, 1980).

Encontramos que la actividad de la enzima depende del pH, presentando actividad máxima entre pH 4,0 y pH 6,5. Este óptimo de pH es algo diferente del encontrado para la enzima de hígado de rata (Shama Bhat & Ramasarma, 1980), la que tiene un óptimo de actividad alrededor de pH 5,2 y presenta solo un 18% de actividad a pH 4,0. Referente a este punto es de interés recalcar que los autores anteriormente nombrados emplearon sólo amortiguadores citrato y fosfato para sus determinaciones, y nosotros hemos demostrado que el citrato inhibe tanto a la enzima altamente purificada de hígado de pollo (figura 19) como a la enzima ensayada en homogeneizados de hígado de rata (A.M. Jabalquinto & E. Cardemil, resultados no publicados) a valores de pH inferiores a 5,0. Por lo tanto, es posible que los datos de Shama Bhat & Ramasarma (1980) referentes a este punto no sean definitivos.

El hecho que el efecto inhibitorio de citrato sea dependiente del pH y sea de un 50% alrededor de pH 4,4 hace suponer que la especie responsable del efecto sea el monoanión en que los dos grupos carboxílicos primarios se encuentran protonados, ya que los pK para el ácido cítrico son 3,08, 4,74 y 5,40 (Handbook of Chemistry and Physics, 1968). El efecto inhibitorio encontrado para ftalato hace pensar en los efectos inhibitorios informados para una serie de compuestos aromáticos sobre la descarboxilasa pirofosfomevalónica de homogeneizados de hígado de rata (Shama Bhat & Ramasarma, 1979). Es posible que estos efectos estén reflejando un cierto grado de similitud estructural de ambas enzimas, aún cuando difieren tan drásticamente en sus estructuras cuaternarias.

La enzima presenta cinética hiperbólica para ambos sustratos. Los trazados de Hanes para un sustrato a diferentes concentraciones fijas del otro dan en ambos casos rectas que se cortan a la izquierda de la ordenada. Este comportamiento es típico para un mecanismo secuencial para dos sustratos, aunque no establece si se trata de una adición de ellos ordenada o al azar. El hecho que además se corten bajo la abscisa debe interpretarse como indicación de que la constante de disociación para el primer sustrato (si es un mecanismo secuencial ordenado) o para ambos (si es un mecanismo secuencial al azar) es mayor que la constante de Michaelis para ese sustrato (Cornish-Bowden, 1979), lo que también se ha visto en otros casos. Así, para la quinasa fosfomevalónica de hígado de cerdo, Bazaes (1977) encontró también que la constante de disociación para el primer sustrato era mayor que su K_m .

En los experimentos de inactivación de la descarboxilasa pirrofosfomevalónica por fenilgloxal, se encontró que ambos sustratos son capaces de proteger efectivamente a la enzima, y podría ser indicativo de un mecanismo cinético en que la unión de los sustratos es al azar. Si esta suposición es válida, pueden calcularse entonces a partir de los gráficos secundarios de los datos cinéticos las respectivas constantes de disociación. Al efectuar este cálculo, las constantes resultaron ser 0,035 mM y 0,85 mM para los complejos enzima-MVA-PP y enzima-ATP, respectivamente. Estos valores son mayores que las constantes de Michaelis para cada sustrato, que fueron estimadas en 0,014 mM y 0,504 mM para el MVA-PP y el ATP, respectivamente.

De acuerdo a las condiciones en que se hicieron los experimentos cinéticos, la concentración del complejo MgATP^{-2} fue alrededor de un 90% (Storer & Cornish-Bowden, 1976) y por lo tanto, si el sustrato verdadero de la enzima fuera el complejo MgATP^{-2} , las constantes de Michaelis y de disociación determinadas para el ATP deberían ser muy similares a las de dicho complejo. Existen razones, sin embargo, que hacen pensar que la enzima presenta mayor afinidad por ATP libre que por el complejo MgATP^{-2} . Estas razones derivan de que en los experimentos de inactivación de la descarboxilasa pirofosfomevalónica por fenilglioxal se encontró que el efecto protector de los sustratos era siempre mayor en ausencia de Mg^{+2} que en su presencia. Esto podría significar que Mg^{+2} , si bien es necesario para la catálisis, no lo fuera para la unión de los sustratos a la enzima. De esta forma, las constantes de disociación de los complejos enzima-sustrato determinadas en presencia de Mg^{+2} podrían ser mayores que las determinadas en su ausencia. Desde este punto de vista, resultaría lógico que las constantes de disociación para estos complejos determinadas a partir de los experimentos de inactivación con fenilglioxal (realizados en ausencia de Mg^{+2}) fueran menores que las encontradas por los métodos cinéticos. En efecto, las constantes de disociación para los complejos enzima-ATP y enzima-MVA-PP determinadas por estos experimentos de inactivación resultaron ser $5,5 \times 10^{-5}$ M y $1,7 \times 10^{-6}$ M, respectivamente (Tabla 15). Debe tomarse en cuenta, sin embargo, que las condiciones experimentales en cada caso fueron diferentes en cuanto a la composición del medio y el pH. Tampoco puede

descartarse, por supuesto, que la menor protección ejercida por ATP en presencia de Mg^{++} se deba a que el complejo formado entre ellos se une a la enzima de una forma diferente a la que se une el ATP solo.

Otro aspecto interesante que llama la atención referente a este punto es la forma de la curva de pH, que indica que la enzima presenta actividad máxima hasta pH 4,0, en el cual, de acuerdo a las condiciones del ensayo, existe sólo un 4% de la especie $ATPMg^{-2}$ presente a pH 7, con el aumento correspondiente de las especies $HATP^{-3}$, H_2ATP^{-2} y $MgHATP^{-}$ (Storer & Cornish-Bowden, 1976).

En el caso de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica que, como se analizó en la Introducción, cataliza una reacción hasta cierto punto similar a la catalizada por la descarboxilasa pirofosfomevalónica, se ha encontrado que la constante de disociación del complejo enzima-IDP es un orden de magnitud mayor en presencia de Mn^{+2} que en su ausencia (Miller & col., 1968). En este caso se ha demostrado mediante técnicas de resonancia paramagnética del electrón (EPR) y mediante la velocidad de relajación de los protones del agua (PRR) que el Mn^{+2} se une a la enzima libre y que el complejo activo sería del tipo enzima-metal-sustrato. Estudios usando las técnicas mencionadas serían de gran utilidad para dilucidar el tipo de interacción entre la descarboxilasa pirofosfomevalónica y sus sustratos, aprovechando el hecho que Mn^{+2} sea casi tan efectivo como Mg^{+2} para la catálisis.

4.2.4. Modificación química con fenilglioxal.

Una de las formas de abordar el estudio de los residuos esenciales de aminoácidos para la actividad catalítica de una enzima consiste en emplear reactivos modificadores específicos para ellos. En vista de que muchas enzimas que catalizan reacciones en que participan sustratos aniónicos presentan residuos de arginina esenciales (Riordan, 1979), decidimos averiguar si ocurría lo mismo en el caso de la descarboxilasa pirofosfomevalónica ya que sus sustratos deben presentar carga negativa a pH fisiológico. Como reactivo modificador se escogió a fenilglioxal, ya que se trata de un reactivo altamente específico para arginina (Takahashi, 1968).

Nosotros encontramos que el fenilglioxal inactiva rápidamente la enzima siguiendo una cinética de pseudo-primer orden. La inactivación es dependiente de la concentración del reactivo, y se observa una relación lineal entre las constantes de pseudo-primer orden y la concentración del fenilglioxal. Este resultado es característico de una reacción de segundo orden. A pH 8,15 el valor de la constante de segundo orden se estimó en $108 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$. La dependencia lineal de las constantes de pseudo-primer orden en función de la concentración del fenilglioxal, y la pendiente cercana a 1 encontrada al graficar el logaritmo de esas constantes en función del logaritmo de las concentraciones del fenilglioxal, sugieren que la reacción de una molécula de fenilglioxal por sitio activo de la enzima es suficiente para inactivarla totalmente (Cardemil & Eyzaguirre, 1981). De acuerdo al trabajo de Takahashi (1968) se supone que el fenilglioxal reacciona con los residuos de arginina para dar un producto

conteniendo dos residuos de fenilglioal/arginina modificada. Si tal es el caso con la descarboxilasa pirofosfomevalónica, debemos suponer que la segunda molécula de fenilglioal reacciona con el complejo enzima-fenilglioal ya inactivo y por lo tanto su unión no se puede detectar con la metodología empleada. Este tipo de situación es relativamente común, aunque también se encuentran casos como el de la monooxigenasa láctica en que la inactivación de la enzima es de primer orden con respecto a la enzima y de segundo orden con respecto al fenilglioal (Peters & col., 1981).

La descarboxilasa pirofosfomevalónica modificada parcialmente por fenilglioal no presenta variación significativa en las K_m aparentes para los dos sustratos. La interpretación más simple de este hecho es que la enzima modificada es totalmente inactiva, de modo que en tales circunstancias solo son activas las moléculas de enzima no modificadas por el reactivo.

La protección de la inactivación ejercida por los sustratos sugiere que el grupo reactivo está en o cerca del sitio activo. El aumento de la velocidad de inactivación en presencia de Mg^{+2} 5 mM indica que Mg^{+2} podría unirse a la enzima provocando con ello un cambio conformacional en la proteína que haría más accesible al reactivo el residuo que reacciona, en forma análoga a lo sugerido antes por Cardemil & Eyzaguirre (1979) para la quinasa pirúvica. La menor protección de los sustratos en presencia del metal bivalente podría estar reflejando diferencias en las constantes de disociación de los complejos enzima-sustrato en presencia y ausencia de Mg^{+2} .

Los residuos de arginina de algunas enzimas reaccionan con reactivos dicarbonílicos mucho más rápido que la arginina libre, lo que hace a estos reactivos altamente específicos. La dependencia de la reacción entre arginina y fenilgloxal u otros reactivos dicarbonílicos con el pH ha hecho postular a Patthy & Thész (1980) que la forma reactiva de arginina es la desprotonada. Por consiguiente los autores anteriores han sugerido que la gran reactividad de los residuos de arginina en algunas enzimas se debe a una disminución de su pK. Una revisión de la literatura indica que la reacción de la descarboxilasa pirofosfomevalónica con fenilgloxal se cuenta entre las más rápidas que se han descrito, siendo la constante de velocidad de segundo orden de $108 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ en las condiciones de la inactivación. Este valor es sólo comparable a la constante de velocidad para la reacción de inactivación de la creatina-quinasa por fenilgloxal en amortiguador veronal 50 mM pH 8,7 a 30° , que se informa tiene un valor de $169 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y es 15 veces mayor que la determinada para la reacción de la arginina libre en las mismas condiciones (Borders & Riordan, 1975). Esta reactividad tan alta de fenilgloxal hace muy poco probable que pudiera estar reaccionado con algún residuo diferente de arginina.

El hecho que el efecto protector de los sustratos sea función de su concentración, permitió determinar las constantes de disociación de los complejos enzima-sustrato. Si se postula que tanto la enzima libre como el complejo enzima-ligando reaccionan con el inactivador, y tomando en cuenta que la reacción de inactivación es

de segundo orden, es posible aplicar la ecuación

$$k_{\text{obs}}^L = k_2 M + \left[\frac{k_{\text{obs}} - k_{\text{obs}}^L}{L} \right] K_d$$

donde k_{obs}^L es la constante de inactivación observada en presencia de un ligando protector L; k_2 corresponde a la constante de velocidad de segundo orden para la reacción del complejo enzima-ligando con el modificador; M es la concentración del modificador; k_{obs} es la constante de inactivación observada en ausencia de ligando protector, y K_d la constante de disociación para el complejo enzima-ligando. Esta ecuación corresponde al modelo de inactivación presentado en el Apéndice.

Al graficar k_{obs}^L en función de $(k_{\text{obs}} - k_{\text{obs}}^L)/L$ se obtiene una línea recta cuya intersección en la ordenada corresponde a $k_2 M$, de tal modo que si $k_2 = 0$ (en que el complejo enzima-ligando no reacciona con el modificador) la recta pasa por el origen. En cualquier caso, la pendiente de la recta corresponde a K_d .

En el caso que aquí se analiza, se encontró que los valores de las constantes de disociación de la enzima con ATP y con MVA-PP fueron $5,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $1,7 \times 10^{-6} \text{ M}$, respectivamente, y que los datos se ajustan a un mecanismo en que la unión de los sustratos a la enzima no protege totalmente a ésta de su reacción con el fenilgloxal, sino que sólo tiene el efecto de disminuir las constantes de velocidad de inactivación de $108 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $27 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (para el caso del complejo enzima-ATP) y a $10 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (para el caso del complejo

enzima-MVA-PP). Estos hechos sugieren que el residuo que se modifica no está directamente involucrado en la unión de los ligandos sino más bien es importante en otras fases del proceso catalítico. Una conclusión similar se ha obtenido al hacer un estudio como el aquí descrito para la inactivación de la sacaropina-deshidrogenasa por 2,3-butanodiona (Fujioka & Takata, 1981). Antes ya Davidson & Flynn (1979) habían concluido que en el caso de la aldehído-reductasa dependiente de NADPH de riñón de cerdo el residuo de arginina que se modifica con 2,3-butanodiona no es importante en la unión del nucleótido sino que probablemente juega un papel importante en la orientación de la coenzima para su unión y formación posterior del complejo ternario enzima-NADPH-aldehído. Por lo tanto, los residuos de arginina esenciales, además a participar en la unión de los sustratos a un gran número de enzimas (Riordan, 1979), pueden también desempeñar otro papel dentro de la catálisis.

4.3. Conclusiones finales y proyecciones.

La primera parte de este trabajo ha permitido presentar una hipótesis general sobre algunos aspectos del control de la biosíntesis del colesterol en hígado de rata. Se sugiere que, luego de producirse una alteración en la actividad de la reductasa de HMG-CoA hepática, y si las condiciones que originaron el cambio se mantienen, se produce una alteración en la actividad de muchas otras enzimas de la ruta, en el mismo sentido del de la reductasa (Jabalquinto & Cardemil, 1981). Esta hipótesis permite explicar observaciones anteriores que sugerían a enzimas específicas- entre ellas la

descarboxilasa pirofosfomevalónica-como puntos secundarios de regulación de la biosíntesis del colesterol en hígado de rata. Sería de interés en el futuro ver si estas variaciones concertadas de actividad se producen también en órganos de la rata que no biosintetizan normalmente colesterol, como el riñón (Jabalquinto & Cardemil, 1982), o bien en el hígado en situaciones en las cuales la reductasa de HMG-CoA no se comporta ya como la enzima regulatoria de la vía metabólica, como en algunos cánceres (Dugan & Porter, 1976). Bajo otro punto de vista, sería interesante averiguar también el mecanismo a través del cual se producen estos cambios de los niveles de actividad y si se trata de variaciones en la concentración o sólo en la actividad de las enzimas, utilizando técnicas como la inmunotitulación.

En la segunda parte de esta tesis se ha obtenido una preparación estable y altamente purificada de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo. Usando esta preparación se determinaron sus características moleculares y catalíticas básicas (Alvear & col., 1982), así como también se demostró que la enzima presenta un residuo de arginina esencial para su actividad.

La enzima obtenida difiere en algunos aspectos importantes de la enzima de hígado de rata, lo que constituye otro ejemplo de las distintas formas moleculares que puede tener una misma enzima, dependiendo de la especie o del órgano del cual se aísla.

Parecen de especial interés los resultados que apuntan a que el ATP^{-4} presentaría una mayor afinidad por la enzima que el complejo ATPMg^{-2} a pH 8,15. Esto la diferenciaría en gran medida de otras enzimas

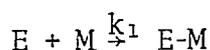
que utilizan nucleótidos, y podría ser indicativo de que el metal fuera necesario más bien para estabilizar una cierta conformación activa de la enzima. Sin duda que este es un aspecto que merece estudiarse en el futuro, tal vez haciendo uso de técnicas como la resonancia paramagnética del electrón, aprovechando que Mn^{+2} sustituye eficazmente al Mg^{+2} en la catálisis.

La obtención de esta preparación estable y altamente purificada de la descarboxilasa pirofosfomevalónica permitirá enfocar también el problema del mecanismo químico de la reacción, que no ha avanzado más allá de donde lo dejaron los estudios iniciales de los grupos de Bloch (Lindberg & col., 1962) y de Popják y Cornforth (Hellig, 1962; Cornforth & col., 1966). Aunque la evidencia actual indica que el mecanismo de descarboxilación del mevalonato-5-pirofosfato queda mejor representado por un proceso concertado, no puede ciertamente descartarse la existencia de un intermediario trifosforilado. Más aún, el grupo $OPO_3H_2^-$ debería ser mejor grupo saliente que el OH^- , por lo que en ese caso la deficiencia electrónica en el C_3 sería mayor, facilitando la descarboxilación. Además de la posible aislación e identificación de un intermediario de este tipo, también podrían usarse análogos del sustrato en los que se encuentre alterado el pK del grupo hidroxilo terciario. Como se ve en la figura 3, el mecanismo a través del intermediario trifosforilado se vería favorecido con una disminución de ese pK, y no ocurriría lo mismo en la alternativa concertada.

APENDICE

Cinética de inactivación por fenilglioxal en presencia de un ligando protector.

La protección por un ligando contra la inactivación de una enzima por un reactivo modificador se analizará de acuerdo al mecanismo de inactivación. Como se describió en Resultados, la descarboxilasa pirofosfomevalónica parece inactivarse a través de una reacción bimolecular de segundo orden con el fenilglioxal:



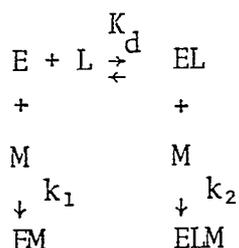
en que E = enzima; M = modificador ; E-M = complejo inactivo enzima-modificador, y $k_1 = 108 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$

Para este mecanismo, pueden darse dos situaciones diferentes al considerar la protección de la inactivación por un ligando:

- a) El ligando al unirse a la enzima libre evita totalmente la inactivación, o
- b) El ligando al unirse a la enzima libre no evita totalmente la inactivación.

Analizaremos en detalle sólo el segundo caso ya que el caso a) es una situación límite del b).

La situación puede esquematizarse de la siguiente manera:



donde E, EL, EM y ELM son la enzima libre, el complejo enzima-ligando, los complejos inactivos enzima-modificador y enzima-ligando-modificador, respectivamente; M es el modificador (fenilglioxal); L es el ligando (sustrato u otro); k_1 y k_2 son las constantes de velocidad de formación de los complejos inactivos EM y ELM, respectivamente, y K_d la constante de disociación del complejo EL.

En el caso que el equilibrio entre E, L y EL sea rápido en comparación con el proceso de inactivación, la velocidad de inactivación en presencia del ligando se puede expresar a través de la siguiente ecuación diferencial:

$$- \frac{d(Ea)}{dt} = k_1(E)(M) + k_2(EL)(M) \quad (1)$$

donde Ea = enzima activa = E + EL.

Al dividir la ecuación anterior por Ea resulta:

$$- \frac{d(Ea)}{dt(Ea)} = \frac{k_1(E)(M) + k_2(EL)(M)}{(E) + (EL)} \quad (2)$$

Reemplazando EL en función de su constante de disociación

$$K_d = \frac{(E)(L)}{(EL)} \quad (3)$$

y reordenando tenemos:

$$- \frac{d(Ea)}{(Ea)} = \frac{(M)(k_1K_d + k_2(L))}{K_d + (L)} dt \quad (4)$$

Como la velocidad de inactivación de la enzima es:

$$- \frac{d(Ea)}{dt} = k_{obs}^L (Ea) \quad (5)$$

resulta que a partir de la ecuación (4) se obtiene que la constante de inactivación de pseudo-primer orden en presencia de ligando (k_{obs}^L) es:

$$k_{obs}^L = \frac{(M) [K_d k_1 + k_2(L)]}{K_d + (L)} \quad (6)$$

Al tomar recíprocos y reordenar se obtiene:

$$\frac{1}{k_{obs}^L} = \frac{K_d}{(M) [K_d k_1 + k_2(L)]} + \frac{(L)}{(M) [K_d k_1 + k_2(L)]} \quad (7)$$

que se reduce a la ecuación de Mildvan & Leigh (1964) para el caso en que $k_2 = 0$, es decir, si EL no reacciona con M:

$$\frac{1}{k_{obs}^L} = \frac{1}{(M)k_1} + \frac{(L)}{(M)K_d k_1} \quad (8)$$

A partir de la ecuación (6), Scrutton & Utter (1965) derivaron la expresión:

$$\frac{k_{obs}^L}{k_{obs}} = \frac{k_2}{k_1} + \frac{1 - \frac{k_{obs}^L}{k_{obs}}}{(L)} K_d \quad (9)$$

$$\text{en que } k_{obs} = M k_1 \quad (10)$$

representa la velocidad de inactivación en ausencia de ligando protector.

Por lo tanto, un gráfico de $\frac{k_{obs}^L}{k_{obs}}$ en función de

$$\frac{1 - \frac{k_{obs}^L}{k_{obs}}}{(L)}$$

es una línea recta con pendiente = K_d e intersección en el eje de las orde

nadas = $\frac{k_2}{k_1}$. Esta expresión, si bien permite la determinación de K_d , no permite una estimación de las constantes k_1 y k_2 . El cálculo de k_2 es posible, sin embargo, ya sea determinando en forma independiente el valor de k_1 o bien reordenando la ecuación (6) a:

$$k_{\text{obs}}^L = \frac{K_d k_{\text{obs}}}{K_d + (L)} + \frac{Mk_2 (L)}{K_d + (L)} \quad (11)$$

para obtener finalmente

$$k_{\text{obs}}^L = k_2 (M) + \left[\frac{k_{\text{obs}} - k_{\text{obs}}^L}{(L)} \right] K_d \quad (12)$$

de tal modo que al graficar k_{obs}^L en función de $\frac{k_{\text{obs}} - k_{\text{obs}}^L}{(L)}$ se obtiene una línea recta cuya pendiente es K_d y cuya intersección en el eje de las ordenadas es k_2M . Si $k_2 = 0$, la recta pasa por el origen y esto significa que el complejo enzima-ligando no reacciona con el modificador. Esta expresión ha sido utilizada por Fujioka & Takata (1981), si bien los autores, erróneamente, interpretan la intersección en el eje de las ordenadas como k_2 y no como k_2M .

Para los casos más generales en que la reacción del modificador con la enzima sea reversible o ésta se inactive pasando a través de un intermediario, el cálculo de K_d es posible utilizando las expresiones derivadas por Horiike & McCormick (1980) o por Carrillo & col. (1981).

BIBLIOGRAFIA

Alvear, M. (1981) Purificación y algunas propiedades de la descarboxilasa pirofosfomevalónica de hígado de pollo. Tesis para optar al título de Bioquímico, Universidad de Chile.

Alvear, M., Jabalquinto, A.M., Eyzaguirre, J. & Cardemil, E. (1982) Purification and characterization of chicken liver mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Biochemistry*, en prensa.

Andrews, P. (1964) Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91, 222-232.

Back, P., Hamprecht, B. & Lynen, F. (1969) Regulation of cholesterol biosynthesis in rat liver: diurnal changes of activity and influence of bile acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 133, 11-21.

Balasubramaniam, S., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1977) Regulation of cholesterol synthesis in rat adrenal gland through coordinate control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and reductase activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1421-1425.

Barnard, G.F. & Popják, G. (1980) Characterization of liver prenyl transferase and its inactivation by phenylglyoxal. *Biochim. Biophys. Acta* 617, 169-182.

Bazaes, S. (1977) Purificación y propiedades de la quinasa fosfomevalónica de hígado de cerdo. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Bazaes, S., Beytía, E., Jabalquinto, A.M., Solís de Ovando, F., Gómez, I. & Eyzaguirre, J. (1980) Pig liver phosphomevalonate kinase. I. Purification and properties. *Biochemistry* 19, 2300-2304.

Beg, Z.H., Stonik, J.A. & Brewster, H.B. Jr. (1979) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from avian liver. Catalytic properties. *Biochim. Biophys. Acta* 572, 83-94.

Beissner, R.S. & Rudolph, F.B. (1978) Interaction of Cibacron blue 3G-A and related dyes with nucleotide-requiring enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 189, 76-80.

Bensadoun, A. & Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering substrates. *Anal Biochem.* 70, 241-250.

Berghäuser, J. & Falderbaum, I. (1971) Modifizierung eines essentiellen Argininrestes in Lactat-Dehydrogenase mit Phenylglyoxal. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 1189-1194.

Beytía, E. (1972) Purification and properties of the enzymes catalyzing the intermediate reactions in the conversion of mevalonate to squalene. Tesis para optar al grado de Doctor (Ph.D), Universidad de Wisconsin, EE.UU.

- Beytía, E., Dorsey, J.K., Marr, J., Cleland, W.W. & Porter, J.W. (1970) Purification and mechanism of action of hog liver mevalonic kinase. *J. Biol. Chem.* 245, 5450-5458.
- Beytía, E. & Porter, J.W. (1976) Biochemistry of polyisoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 45, 113-142.
- Bittner, D.L. & Manning, J. (1967) Automation in analytical chemistry. *Technicon Symposia 1966*, pp 33-36, Mediad, Nueva York, EE.UU.
- Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A.H. & deWaard, A. (1959) Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 234, 2595-2604.
- Borders, C.L. & Riordan, J.F. (1975) An essential arginyl residue at the nucleotide binding site of creatine kinase. *Biochemistry* 14, 4699-4704.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L. & Dietschy, J.M. (1979) Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat. *J. Biol. Chem.* 254, 5144-5149.
- Bucher, N.L.R., McGarrahan, K., Gould, E. & Loud, A.V. (1959) Cholesterol biosynthesis in preparations of liver from normal, fasting, X-irradiated, cholesterol-fed, triton or Δ^4 -cholesten-3-one treated rats. *J. Biol. Chem.* 234, 262-267.
- Cardemil, E. & Eyzaguirre, J. (1979) Evidence of essential arginyl residues in rabbit muscle pyruvate kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 533-538.
- Cardemil, E. & Eyzaguirre, J. (1981) Chemical modification of arginyl residues in rabbit muscle pyruvate kinase. *Arch. Biol. Med. Exp.* 14, 123-128.
- Cardemil, E. & Jabalquinto, A.M. (1983) Text-book error. The mechanism of action of mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Trends Biochem. Sci.*, en prensa.
- Carlson, S.E., Mitchell, A.D. & Goldfarb, S. (1978) Sex-related differences in diurnal activities and development of hepatic microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 531, 115-124.
- Carrillo, N., Arana, J.L. & Vallejos, R.H. (1981) An essential carboxyl group at the nucleotide binding site of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* 256, 6823-6828.
- Catálogo Bio-Rad (1976) Chromatography, electrophoresis and membrane filtration.

Catálogo Pharmacia Fine Chemicals (1979) Gel filtration, theory and practice. Uppsala, Suecia.

Catálogo Whatman, Advanced ion exchange celluloses. Folleto Whatman IL-2.

Catálogo Worthington (1979) Enzymes and related biochemicals. New Jersey, EE.UU.

Cavane, W.K. & Melnykovich, G. (1977) Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in HeLa cells by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 252, 262-267.

Cayen, M.N., Dubue, J. & Dvornik, D. (1975) Effect of clofibrate on lipid metabolism in streptozotocin diabetic rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 752-757.

Chang, T.Y. & Limanek, J.S. (1980) Regulation of cytosolic acetoacetyl coenzyme A thiolase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and mevalonate kinase by low density lipoprotein and by 25-hydroxycholesterol in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 255, 7787-7795.

Cleland, W.W. (1979) Optimizing coupled enzyme assays. *Anal. Biochem.* 99, 142-145.

Clinkenbeard, K.D., Sugiyama, T., Reed, W.D. & Lane, M.D. (1975) Cytoplasmic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase from liver. *J. Biol. Chem.* 250, 3124-3135.

Colombo, G., Carlson, G.M. & Lardy, H.A. (1978) Phosphoenol pyruvate carboxykinase (guanosine triphosphate) from rat liver cytosol. Separation of homogenous forms of the enzyme with low activity by chromatography on agarose-hexane-guanosine triphosphate. *Biochemistry* 17, 5321-5329.

Cori, O. (1976) Biosíntesis de los núcleos de las hormonas de estructura isoprénica, en "Bases moleculares de la acción hormonal", editores: M. Perretta, J. Minguell, G. Swaneck; pp 11-29, Ediciones Universidad de Chile.

Cornforth, J.W., Cornforth, R.H., Popják, G. & Yengoyan, L. (1966) Studies on the biosynthesis of cholesterol. XX. Steric course of decarboxylation of 5-pyrophosphomevalonate and of the carbon to carbon bond formation in the biosynthesis of farnesyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 241, 3970-3987.

Cornish-Bowden, A. (1979) Fundamentals of enzyme kinetics, pp 111-112. Butterworth & Co (Publishers) Ltd, Londres, Inglaterra.

- Cristol, S.J. & Norris, W.P. (1953) Mechanisms of elimination reactions. IX. The spontaneous decomposition of salts of β -halo acids. trans-Cinnamic acid dibromide. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 2645-2646.
- Darnall, D.W. & Klotz, I.M. (1975) Subunit constitution of proteins: a table. *Arch. Biochem. Biophys.* 166, 651-682.
- Davidson, W.S. & Flynn, T.G. (1979) A functional arginine residue in NADPH-dependent aldehyde reductase from pig kidney. *J. Biol. Chem.* 254, 3724-3729.
- Dempsey, M.E. (1974) Regulation of steroid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 967-990.
- Dietschy, J.M. & Brown, M.S. (1974) Effect of alterations of the specific activity of the intracellular acetyl CoA on apparent rates of hepatic cholesterogenesis. *J. Lipid Res.* 15, 508-516.
- Dietschy, J.M. & Wilson, M.D. (1970) Regulation of cholesterol metabolism. *New England. J. Med.* 282, 1128-1138.
- Dugan, R.E. (1981) Regulation of HMG-CoA reductase en "Biosynthesis of isoprenoid compounds", Vol. 1, pp. 95-159, editado por J.W. Porter y S.L. Spurgeon, John Wiley and Sons, New York.
- Dugan, R.E. & Porter, J.W. (1976) Membrane-bound enzymes of sterol metabolism. En "The Enzymes of Biological Membranes", Plenum Publishing Corporation, New York, 161-206.
- Dugan, R.E., Rasson, E. & Porter, J.W. (1968) Separation of water-soluble steroid and carotenoid precursors by DEAE-cellulose column chromatography. *Anal. Biochem.* 22, 249-259.
- Eberhardt, N.L. & Rilling, H.C. (1974) Prenyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification to homogeneity and molecular properties. *J. Biol. Chem.* 250, 863-866.
- Edwards, R.A. & Woody, R.W. (1979) Spectroscopic studies of cibacron blue and congo red bound to dehydrogenases and kinases. Evaluation of dyes as probes of the dinucleotide fold. *Biochemistry*, 18, 5197-5204.
- Faust, J.R., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1979) Squalene synthase activity in human fibroblasts: regulation via the low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5018-5022.
- Fischer, P.W.F. & Goodridge, A.G. (1978) Coordinate regulation of acetyl coenzyme A carboxylase and fatty acid synthase in liver cells of the developing chick in vivo and in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 332-344.
- Fujioka, M. & Takata, Y. (1981) Role of arginine residue in saccharopine dehydrogenase (L-lysine forming) from baker's yeast. *Biochemistry* 20, 468-472.

- Gabriel, O. (1971) Analytical disc gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 22, 565-578.
- García-Martínez, J., Segovia, J.L., Suárez, M.D. & García-Peregrín, E. (1978) Characterization of mevalonate-activating enzymes in the neonatal chick liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 61B, 275-279.
- García-Peregrín, E., Suárez, M.D., Aragón, M.C. & Mayor, F. (1972) Mevalonate phosphorylation in *Agave americana*. *Phytochemistry* 11, 2495-2498.
- Gerlisma, S.Y. (1968) Reversible denaturation of ribonuclease in aqueous solutions as influenced by polyhydric alcohols and some other additives. *J. Biol. Chem.* 243, 957-961.
- Gianazza, E. & Righetti, P.G. (1980) Size and charge distribution of macromolecules in living systems. *J. Chromatog.* 193, 1-8.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1977) The low-density lipoprotein pathway and its relation to arteriosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 897-930.
- Gould, R.G. & Swyryd, E.A. (1966) Sites of control of hepatic cholesterol biosynthesis. *J. Lipid. Res.* 7, 698-707.
- Gray, J.C. & Kekwick, R.G.O. (1973) Mevalonate kinase in green leaves and etiolated cotyledons of the french bean *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. J.* 133, 335-347.
- Handbook of Chemistry and Physics (1968). Editado por R.C. Weast, 49° edición, publicado por The Chemical Rubber Co., Ohio, pp D-90.
- Hanes, C.S. & Isherwood, F.A. (1948) Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature* 164, 1107-1112.
- Hardgrave, J.E., Heller, R.A., Herrera, M.G. & Scallen, T.J. (1979) Immunotitration of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in various physiological states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3834-3838.
- Hellig, H.R. (1962) Enzymic studies on the biosynthesis of cholesterol from mevalonic acid. Tesis para optar al grado de Doctor (Ph.D.), Universidad de Londres, Inglaterra.
- Hellig, H. & Popják, G. (1961) Studies on the biosynthesis of cholesterol: XIII. phosphomevalonic kinase from liver. *J. Lipid Res.* 2, 235-243.
- Hollenberg, P.F., Flashner, M. & Coon, M.J. (1971) Role of lysyl E-amino groups in adenosine diphosphate binding and catalytic activity of pyruvate kinase. *J. Biol. Chem.* 246, 946-953.
- Horecker, B.L. & Kornberg, A. (1948) The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175, 385-390.

Horiike, K. & McCormick, D.B. (1980) Effect of ligand on chemical modification of dissociation constant and number of essential residues affected by ligand binding. *J. Theor. Biol.* 84, 691-708.

Hunter, C.F. & Mitchell, E.D. Jr. (1978) HMG-CoA reductase, MVA kinase, MVAP kinase and MVAPP decarboxylase activities in liver and kidney from cholesterol fed turkeys. *Federation Proc.* 37, 1449.

Jabalquinto, A.M. & Cardemil, E. (1980) Secondary regulatory sites in rat liver cholesterol biosynthesis: role of 5-pyrophosphomevalonate decarboxylase. *Lipids* 15, 196-199.

Jabalquinto, A.M. & Cardemil, E. (1981) The effect of diabetes, nutritional factors and sex on rat liver and kidney mevalonate kinase, mevalonate-5-phosphate kinase and mevalonate-5-pyrophosphate decarboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 132-139.

Jabalquinto, A.M. & Cardemil, E. (1982) Comparative aspects of mevalonate metabolism in rat liver and kidney. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B, 181-187.

Lee, J.C. & Timasheff, S.N. (1981) The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* 256, 7193-7201.

Lehninger, A. (1978) *Bioquímica*. 2^a edición en Castellano, pp 694. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España.

Linares, A., García-Martínez, J., Suárez, M.D. & García-Peregrín, E. (1980) Postnatal development of mevalonate phosphorylation in the chick brain and kidney. *Biol. Neonate* 38, 25-29.

Lindberg, M., Yuan, C., de Waard, A. & Bloch, K. (1962) On the mechanism of formation of isopentenylpyrophosphate. *Biochemistry* 1, 182-188.

Loomis, W.D. & Battaile, J. (1963) Biosynthesis of terpenes. III. Mevalonic kinase from higher plants. *Biochim. Biophys. Acta* 67, 54-63.

Lowry, O.H., Passanneau, J.W. & Pock, M.K. (1961) The stability of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 236, 2756-2759.

Malamud, D. & Drysdale, J.W. (1978) Isoelectric points of proteins: a table. *Anal. Biochem.* 86, 620-647.

Markley, K. & Smallman, E. (1961) Mevalonic kinase in rabbit liver. *Biochim. Biophys. Acta* 47, 327-335.

Mildvan, A.S. & Leigh, R.A. (1964) Determination of co-factor dissociation constants from the kinetics of inhibition of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 89, 393-397.

Miller, R.S., Mildvan, A.S., Chang, H-C., Easterday, R.L., Maruyama, H. & Lane, M.D. (1968) The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate IV. The binding of manganese and substrates by phosphoenolpyruvate carboxykinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 243, 6030-6040.

Mitchell, E.D. Jr. & Avigan, J. (1981) Control of phosphorylation and decarboxylation of mevalonic acid and its metabolites in cultured human fibroblast and in rat liver *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 256, 6170-6173.

Monasterio, O. (1980) Mecanismo cinético de la glucoquinasa. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Nepokroeff, C.M., Lakshmanan, M.R., Ness, G.C., Dugan, R.E. & Porter, J. W. (1974) Regulation of the diurnal rhythm of rat liver β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase activity by insulin, glucagon, cyclic AMP and hydrocortisone. *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 387-393.

Nervi, F.G., Carella, M. & Dietschy, J.M. (1976) Dissociation of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase activity from overall rate of cholesterol synthesis in the liver following the intravenous administration of lipid. *J. Biol. Chem.* 251, 3831-3833.

Ness, G.C., Benton, G.A., Deiter, S.A. & Wickham, P.S. (1982) Influence of mevalonate kinase on studies of the MgATP-dependent inactivator of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 705-713.

Patthy, L. & Thesz, J. (1980) Origin of the selectivity of α -dicarbonyl reagents for arginyl residues of anion-binding sites *Eur. J. Biochem.* 105, 387-393.

Peters, R.G., Jones, W.C. & Cromartie, T.H. (1981) Inactivation of L-lactate monooxygenase with 2,3-butanedione and phenylglyoxal. *Biochemistry*, 20, 2564-2571.

Popják, G. (1969) Enzymes of sterol biosynthesis in liver and intermediates of sterol biosynthesis. *Methods Enzymol.* 15, 393-494.

Popják, G. (1970) Stereospecificity of enzymic reactions. En *The Enzymes*, 3^a edición, Vol. 2, pp 115-215. Editado por Paul Boyer (Academic Press).

Ramachandran, C.K. & Shah, S.N. (1976) Decarboxylation of mevalonate pyrophosphate is one rate-limiting step in hepatic cholesterol synthesis in suckling and weaned rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 42-47.

Ramachandran, C.K. & Shah, S.N. (1977) Studies on mevalonate kinase, phosphomevalonate kinase and pyrophosphomevalonate decarboxylase in developing rat brain. *J. Neurochem.* 28, 751-757.

Reed, B.C. & Rilling, H.C. (1975) Crystallization and partial characterization of prenyltransferase from avian liver. *Biochemistry* 14, 50-54.

- Riordan, J.F. (1979) Arginyl residues and anion binding sites in proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 26, 71-92.
- Rodwell, V.W., McNamara, D.J. & Shapiro, D.J. (1973) Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Adv. Enzymol.* 38, 373-412.
- Rodwell, V.W., Nordstrom, J.L. & Mitschelen, J.J. (1976) Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid Res.* 14, 1-74.
- Ryan, L.D. & Vestling, C.S. (1974) Rapid purification of lactate dehydrogenase from rat liver and hepatoma: a new approach. *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 279-284.
- Schroepfer, G.J. Jr. (1981) Sterol biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 585-621.
- Scrutton, M.C. & Utter, M.F. (1965) Pyruvate carboxylase. V. Interaction of the enzyme with adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 240, 3714-3723.
- Shama Bhat, C. & Ramasarma, T. (1977) Rhythmic activity of utilization of mevalonate for biosynthesis of cholesterol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 785-788.
- Shama Bhat, C. & Ramasarma, T. (1979) Inhibition of rat liver mevalonate pyrophosphate decarboxylase and mevalonate phosphate kinase by phenyl and phenolic compounds. *Biochem. J.* 181, 143-151.
- Shama Bhat, C. & Ramasarma, T. (1980) Purification and properties of mevalonate pyrophosphate decarboxylase of rat liver. *Indian J. Biochem. Biophys.* 17, 249-254.
- Shapiro, D.J. & Rodwell, V.W. (1971) Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* 246, 3210-3216.
- Siperstein, M.D. (1970) Regulation of cholesterol biosynthesis in normal and malignant tissues. *Curr. Top. Cell. Reg.* 2, 65-110.
- Siperstein, M.D. & Guest, M.J. (1960) Studies on the site of the feedback control of cholesterol synthesis. *J. Clin. Inv.* 39, 642-652.
- Siperstein, M.D. & Fagan, V.M. (1966) Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol. *J. Biol. Chem.* 241, 602-609.
- Skilleter, D.N. & Kekwick, R.G.O. (1971) The enzymes forming isopentenylpyrophosphate from 5-phosphomevalonate (mevalonate-5-phosphate) in the latex of *Hevea brasiliensis*. *Biochem. J.* 124, 407-417.
- Slakey, L.L., Craig, M.C., Beytía, E., Briedis, A., Feldbruegge, D.H., Dugan, R.E., Qureshi, A.A., Subbarayan, C. & Porter, J.W. (1972) The effects of fasting, refeeding, and time of the day on the levels of enzymes effecting the conversion of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A to squalene. *J. Biol. Chem.* 247, 3014-3022.

- Snodgrass, P.J., Lin, R.C., Muller, W.A. & Aoki, T.T. (1978) Induction of urea cycle enzymes of rat liver by glucagon. *J. Biol. Chem.* 253, 2748-2753.
- Storer, A.C. & Cornish-Bowden, A. (1976) Concentration of $MgATP^{-2}$ and other ions in solution. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochem. J.* 159, 1-5.
- Stryer, L. (1981) *Biochemistry*. 2^a edición, pp 466, W.H. Freeman and Co., San Francisco, EE.UU.
- Takahashi, K. (1968) The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* 243, 6171-6179.
- Tchen, T.T. (1962) Enzymes in sterol biogenesis. *Methods Enzymol.* 5, 489-499.
- Umbreit, W.W., Burris, R.H. & Stauffer, J.F. (1957). *Manometric Techniques*. Burgess Publishing Co., pp 270-273, Minneapolis.
- Volpe, J.J. & Obert, K.A. (1981) Coordinate regulation of cholesterol synthesis and 5-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase but not 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in C-6 glia. *Arch. Biochem. Biophys.* 212, 88-97.
- Weber, K. & Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.