

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Química y Farmacia
Cátedra de Bioquímica General

**ESTUDIOS SOBRE APIRASAS
DE PAPA**

APIRASA TIPO "B"

MEMORIA DE PRUEBA
PARA OPTAR AL TITULO
DE BIOQUIMICO

Hernán Chaimovich Guralnik

1962

SUMMARY

- 1.- Kinetic Studies show that apyrase A prepared in this laboratory and Krishnan's insoluble apyrase show a similar behavior.
- 2.- The first steps of a preparation of apyrase B are described in detail.
- 3.- The differences between apyrase A and B are discussed.

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

Se han descrito en la papa, enzimas que hidrolizan el ATP hasta AMP y Pi. Estas enzimas han sido estudiadas por diversos autores (1) (2) (3)(4)(5)(6)(7). Se ha denominado apirasa a la, o a las enzimas que efectúan esta hidrólisis, para distinguirlas de las ATPasas, que sólo hidrolizan el fosfato gamma o terminal del ATP (2). La apirasa hidroliza al ATP en dos etapas, siendo los primeros productos de la reacción ADP y Pi; luego el ADP es hidrolizado a AMP y otra molécula de Pi (7)(8). Ambos tipos de enzimas han sido usados como reactivos analíticos, (9)(10), ya sea para determinar ATP y ADP en mezcla, o bien, para hidrolizar estos nucleotidos en un sistema determinado hasta AMP y Pi.

A partir de un extracto de papas que posea la propiedad de hidrolizar el ATP hasta AMP y dos moles de Pi, es posible separar dos sistemas, que catalizando las mismas reacciones, tendrían propiedades cinéticas y físico-químicas diferentes. Dos grupos de autores se han preocupado de este aspecto del problema. Krishnan (4), separa dos enzimas, que se comportan en forma diferente cuando se dializan contra agua destilada y, que denomina "soluble" e "insoluble" respectivamente. La apirasa "soluble", permanece en solución por diálisis prolongada, mientras que la apirasa "insoluble" precipita. Una observación de los gráficos presentados por este autor (5) acerca de la hidrólisis del ATP por las apirasas "soluble" e "insoluble", muestra que la liberación de Pi es función

Abreviaturas usadas en este trabajo.

ATP: adenosin 5'trifosfato; ADP: adenosin 5' difosfato; AMP: adenosin 5' monofosfato; Pi: ión ortofosfato; Tris: tri (hidroximetil)-aminometano; ATPasa: adenosintrifosfatasa; a.e.: actividad específica; U : unidades de actividad enzimática.

lineal del tiempo en ambos tipos de aspirasa. En el gráfico que muestra los resultados obtenidos con aspirasa "insoluble", se observa, sin embargo, una ligera inflexión cuando se ha liberado más o menos un 50% del fósforo ácido lábil. Molnar y Lorand (6), describen también la preparación de dos tipos de aspirasa, que se comportan en forma diferente en una columna de dietilaminoetilcelulosa. Los autores las denominan A y B respectivamente. La aspirasa A, no es adsorbida por el intercambiador con una fuerza iónica de 0,1 M., en cambio, la aspirasa B es adsorbida y necesita una fuerza iónica de 0,1 hasta 0,25 para su elución. Datos cinéticos obtenidos por estos autores (6), muestran que la aspirasa A libera el fosfato gama del ATP, a una velocidad diez veces mayor que el fosfato beta o intermedio. La aspirasa B, en cambio, hidroliza ambos fosfatos a la misma velocidad. Se comprende entonces, que la relación entre las velocidades del hidrólisis del ATP y del ADP (razón ATP/ADP), sea mayor a uno para la aspirasa A (se dan valores hasta de 13) y del orden de 1,0 para la aspirasa B. Los autores afirman que la aspirasa B podría corresponder a la aspirasa "insoluble" de Krishnan. Nos parece, por la comparación de los datos de Molnar con los de Krishnan, que esta aseveración no se justifica.

Datos cinéticos obtenidos en este laboratorio (8), demuestran que la velocidad de liberación del fosfato gama del ATP por aspirasa "soluble" de Krishnan, es significativamente mayor que la velocidad de liberación del fosfato beta. Estos datos, comparados con los datos cinéticos descritos por Molnar y Lorand (6), permitirían homologar la aspirasa A con la aspirasa "soluble" de Krishnan, afirmación que parece subentenderse en el trabajo de Molnar, pero que no se plantea explícitamente.

Los argumentos antes expuestos, nos hicieron pensar que sería de interés estudiar en más detalle la solubilidad de la así llamada aspirasa "insoluble" de Krishnan y, observar si

la cinética de hidrólisis del ATP por esta enzima, era similar a la cinética de la α pirasa B de Molnar.

Se describirán después, algunas fases de un procedimiento que pretende separar y purificar la α pirasa B. Basándonos en lo anteriormente expuesto, definimos como tal a la α pirasa que presenta una baja razón ATP/ADP.

La obtención de una enzima suficientemente pura, es etapa indispensable en todo intento de investigación del mecanismo de una reacción enzimática.

Debe observarse sin embargo, que cualquier proceso de purificación que parta de un extracto de papas, va a dar un bajo rendimiento, ya que la actividad del extracto depende de la presencia de ambas α pirasas, la A y la B, siendo última la proporción menor (6), y debiéndose descartar la α pirasa A en el proceso de purificación.

Es posible encontrar en la literatura, preparaciones de α pirasa con actividades específicas bastante elevadas (3) (5)(6)(7), pero éstas no describen la metódica empleada con suficiente detalle, o bien, no presentan datos suficientes acerca de la evolución de las razones ATP/ADP en las diversas etapas de purificación.

El objetivo de esta parte del trabajo, es entonces, extraer y purificar parcialmente una α pirasa que posea una razón ATP/ADP que tienda a 1, a diferencia del trabajo anteriormente presentado (11) que se refería a la α pirasa A.

MATERIAL Y METODOS

Se usaron papas de cáscara roja, obtenidas al azar en diversos establecimientos comerciales. Los métodos de preparación se describen en la sección "Resultados".

Todos los reactivos empleados son "pro analysi". Los nucleótidos empleados provienen de la firma "Sigma Chemical Co".

St. Louis Mo. U.S.A.

Determinación de proteínas. Las proteínas se determinaron por el método de Biuret (12), empleando como referencia Standard una curva de calibración hecha con seroalbúmina cristalina. Los valores obtenidos por este método, concuerdan exactamente con determinaciones de proteínas hechas por el método de Kjeldahl para la apirasa (13).

Medio de ensayo. La incubación se efectuó a 30°, en un medio que en un volumen final de 1 ml. contenía: substrato 0,002 M., CaCl₂ 0,005 M., tampón succinato 0,10 M. y la enzima, diluída a una concentración adecuada para el ensayo en KCl 0,5 M. La reacción se detiene al agregar 2 ml. de ácido tricloroacético frío al 5% y se centrifuga a 800 x g durante 10 min. En el sobrenadante total se determina el Pi liberado por el método de Fiske y Subarrow (14). La concentración efectiva de los substratos se controló por medición espectrofotométrica y por el fósforo ácido lábil (15).

Unidad de enzima y actividad específica. La unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que libera 1 umol de Pi. por minuto, a 30°, en el medio de incubación descrito. La actividad específica (a.e.) se expresa en unidades de enzima/mg de proteína.

A menos que se indique expresamente, todas las operaciones se realizan entre 0 y 2°C.

RESULTADOS

A.- Propiedades de las apirasas.

I.- Acción de la dilución sobre el extracto.

Se han descrito (4)(6) apirasas insolubles que precipitan por diálisis contra agua destilada. Por las propiedades indicadas por los autores, estas enzimas parecen corresponder a la apirasa insoluble de Krishnan. Se pensó entonces, que este fenómeno se debía a una precipitación de un medio de

baja fuerza iónica, como en el caso de la miosina. (16).

A fin de comprobar esta hipótesis, el extracto acuoso se diluyó 250 veces en agua destilada, sin que se observara precipitación o enturbiamiento del medio. El extracto diluido cinco veces en agua destilada tampoco precipita y, conserva su actividad.

Esto sugiere que la precipitación de la a pirasa "insoluble" de Krishnan, no se debe a un fenómeno de simple descenso de la fuerza iónica, y que probablemente se trate de un fenómeno de naturaleza diversa. Naturalmente, los resultados de dilución no son estrictamente comparables con la diálisis, ya que en ésta se modifica la fuerza iónica sin gran modificación de la concentración de proteínas.

II.- Extracción de la a pirasa "insoluble" de Krishnan con agua

A fin de observar hasta que punto la preparación de Krishnan respondía a su definición como insoluble, se procedió a extraer con agua destilada una preparación de a pirasa "insoluble" obtenida según lo indica el autor (4).

Se homogeniza una porción de la pasta de a pirasa "insoluble", con un volúmen igual de agua destilada durante 1 min. en un homogenizador de Potter. La suspensión obtenida se centrifuga durante 10 min. a 30.900 x g. El sobrenadante se guarda en frío. Luego se agregan dos volúmenes de agua destilada y se extrae en las mismas condiciones iniciales tres veces más.

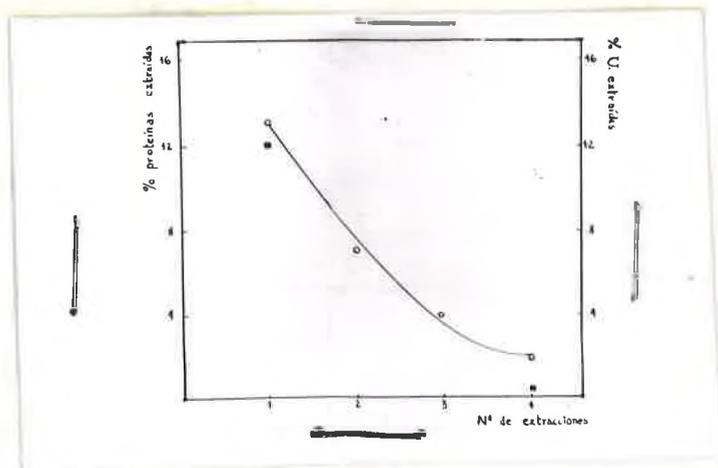


Figura I.- Extracción de a pirasa "insoluble" con agua.

○ = % de proteínas

■ = U.

III.- Cinética de la hidrólisis del ATP por a pirasa "insoluble" de Krishnan.

Para este experimento se usa una preparación de a pirasa insoluble de Krishnan, preparada según lo indica este autor (4). La dilución de la enzima empleada en cada caso, se indica bajo el gráfico.

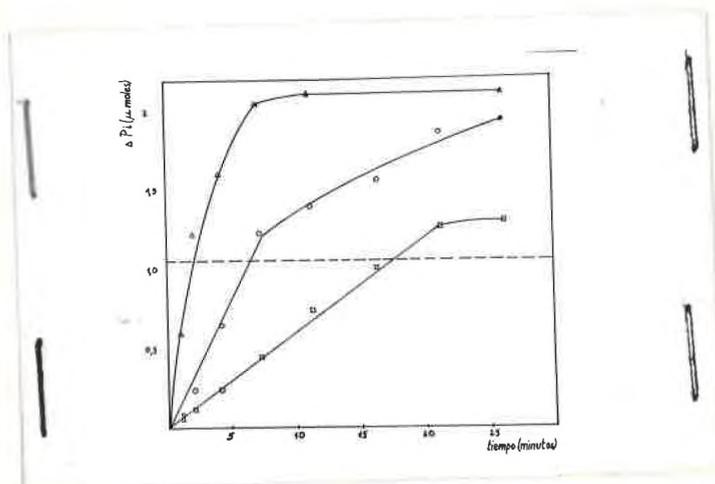


Figura II.- Cinética de la hidrólisis del ATP por "a-pirasa "insoluble" de Krishnan a diferentes diluciones de enzima. La incubación se realizó a 30° en un medio en que un vol. final de 5 ml. contenía: ATP 0,002 M., CaCl₂ 0,005 M., tampón succinato 0,10 M. y la enzima diluida hasta la concentración más abajo indicada. La línea quebrada (--- ---) indica el 50% de hidrólisis del fósforo ácido lábil. Dilución de la enzima: Δ = 5,22 mg/ml (1ml) O = 1,57 mg/ml (1 ml) □ = 0,522 mg/ml (1ml)

Como se puede apreciar en la figura II, hay una diferencia notable en el comportamiento cinético cuando se diluye la a pirasa "insoluble" de Krishnan. La cinética de la hidrólisis del ATP con la enzima diluida, es muy semejante a la de la a pirasa de Molnar, y no a la de la a pirasa B, como implica este último autor (6).

IV.- Cinética de la hidrólisis del ATP por a pirasa A. (11)

Se pensó que ya había una diferencia notable de comportamiento cinético al diluir la a pirasa "insoluble" de Krishnan, la a pirasa A. de estar en una etapa más avanzada de purificación, debería conservar sus propiedades cinéticas al ser diluida.

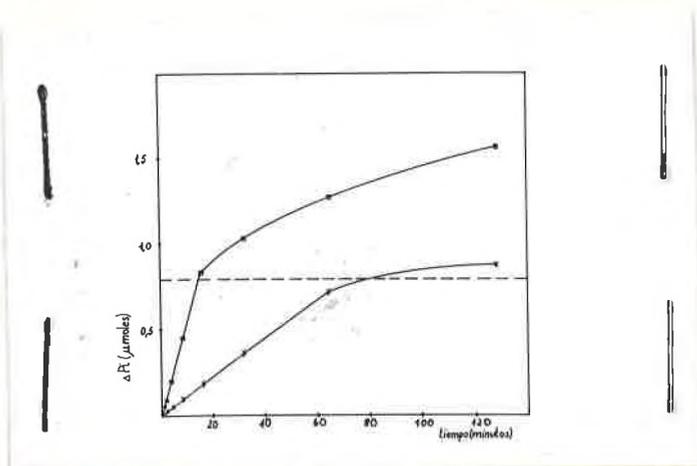


Figura III.- Cinética de la hidrólisis de ATP por la pirasa A. (11) La incubación se realizó a 30° en un medio que en un volumen final de 10 ml. contenía: ATP 0,001 M.; Ca Cl₂ 0,006 M.; Tampón succinato 0,05 M. La pirasa A empleada proviene de la etapa III de la purificación de este laboratorio (11). Alícuota de 1 ml. La línea quebrada indica el 50% de hidrólisis de fósforo ácido lábil. Dilución de la enzima (en seroalbúmina (11)

$$\square = 4,7 \mu\text{g/ml. (2 ml.)} \quad \times = 0,92 \mu\text{g/ml (2ml)}$$

Como se puede observar en la figura III, no hay variación en la forma de acción sobre el ATP al diluir la aspirasa A.

B.- Preparación de la pirasa de tipo "B".

Etapa I.-

a) Extracción.- Papas peladas y trozadas se homoge - nizan durante 1 min. en la juguera sin agregar líquido. A esta papilla se le agrega un volumen igual a su peso de KCl 0,5 M. y se agita durante 5 min. Se pasa por tela y se centrifuga a 11.700 x g durante 20 min. para clarificar el extracto obtenido, el precipitado se descarta.

Se puede observar, que la cantidad de unidades totales presentes en los extractos efectuados a diferentes fuerzas iónicas es sensiblemente constante, lo que concuerda con los datos obtenidos por otros autores (4).

b) Tratamiento del extracto a diferentes pH. Al tratar un extracto, preparado según se indica anteriormente, con tampones de diferentes pH o, al acidular con ácido clorhídrico; esto último para mantener la fuerza iónica de extracción; se observa la aparición de precipitado cuando el pH es inferior a 5.

La actividad la pirásica se reparte generalmente entre el precipitado y el sobrenadante, sin que se pueda evidenciar de esta manera, una fracción que contenga a.pirasa con una razón ATP/ ADP menor que el extracto.

c) Fraccionamiento del extracto con sulfato de amonio
El fraccionamiento con sulfato de amonio, del extracto preparado según se indica anteriormente, tampoco da resultados que permitan apreciar la cantidad de a.pirasa B presente en el extracto.

d) Fraccionamiento con alcohol. El extracto se trata con alcohol redistilado de 95% (v/v), que se agrega a 18%, lentamente. La solución se mantiene con agitación lenta y la temperatura se disminuye gradualmente hasta alcanzar 1° sobre el punto de congelación de la solución hidroalcoholica correspondiente (17). Luego de agregar la cantidad deseada de alcohol, la suspensión se deja 20 min. con agitación, a fin de que se equilibren solución y precipitado. Se centrifuga luego a 34.800 x g a -10° durante 20 min. Se deja escurrir el alcohol del tubo invertido durante 30 min., para eliminar del precipitado todo el líquido que sea posible. El precipitado se disuelve en KCl o, 5 M., la solución obtenida es semitransparente, homogénea y del color amarillo claro.

El fraccionamiento del extracto, indicó que en los precipitados obtenidos por sobre un 22% de alcohol, había más unidades totales de apirasa que en las fracciones descritas más adelante, pero tenían a la vez una razón ATP/ADP bastante más alta que dichas fracciones. Por ello se analizó en más detalle los precipitados obtenidos entre 0 y 22%.

TABLA N° 1.-

Fraccionamiento del extracto de papas en alcohol.

Fracción	Volu- men (ml)	U. totales		U. Totales %		a.e		Razón ATP/ADP	Proteínas (mg)
		ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP		
Extracto	45	281	135	(100)	(100)	1,04	0,50	2,08	315
0-14% de etanol	6	5	3	2	2	0,26	0,16	1,62	20
0-17% de etanol	10	7	5	3	4	0,26	0,19	1,37	27
0-22% de etanol	10	21	19	8	14	0,46	0,37	1,24	50

En la tabla se puede apreciar que entre 0 y 22% de alcohol, se obtiene una fracción con el máximo rendimiento en U. totales, que posee además de una baja razón ATP/ADP.

Esta fase de la preparación, tiene por objeto disponer de un criterio para evaluar la cantidad de apirasa B del extracto. Sólo ahora es posible analizar las condiciones óptimas para la obtención de ésta.

e) Extracción a diferentes pH. A un peso determinado de la pasta de papas, preparada según se ha descrito anteriormente, se le agrega un volumen de una solución de KCl 0,3 M.- tampón 0,2 M. al pH deseado. Esta suspensión se agita durante 5 min., se pasa por tela y se centrifuga a 11.700 x g durante 20 min., el precipitado se descarta. El extracto resultante se trata con alcohol en las condiciones descritas. Cada precipitado alcohólico se ensaya una vez disuelto.

La extracción se realizó con una gama de pH que iba desde 4,65 a 8,6; los mejores resultados se obtuvieron en la zona 6-7,4, por lo que se procedió a estudiarla en más detalle.

TABLA N° 2

Extracción de a pirasa B a diferentes pH

Fracción	Volu- men (ml)	U.Totales		%		a.e.		Razón ATP/ADP	Prote- ínas (mg)
		ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP		
<u>a pH 6,3</u>									
Extracto	45	250	78	(100)	(100)	0,50	0,14	3,62	540
0-22%Aic.	12	14	6	6	18	0,35	0,34	1,03	40
<u>a pH 6,5</u>									
Extracto	45	245	66	(100)	(100)	0,46	0,12	3,75	535
0-22% Aic.	12	14	12	6	16	0,41	0,35	1,18	36
<u>a pH 6,8</u>									
Extracto	45	247	75	(100)	(100)	0,76	0,23	3,28	330
0-22%Aic.	12	23	22	9	30	0,33	0,33	1,00	67
<u>A pH 7,4</u>									
Extracto	45	286	118	(100)	(100)	0,52	0,16	3,25	495
0-22%Aic.	12	21	12	7	10	0,38	0,21	1,78	54

Como se puede apreciar en la tabla 2, el máximo de extracción se obtiene a pH 6,8, con una solución de Tris-HCl 0,2M-KCl 0,3 M. Esta fracción tiene además una razón ATP/ADP que está de acuerdo con nuestra definición de a pirasa B.

f) Estudio del tiempo óptimo de extracción. Como se puede apreciar por la metodología descrita, el tiempo de extracción juega un papel importante en la obtención del máximo de unidades totales.

Una papilla, fué sometida a extracción durante tiempos variables, con un volumen de solución de KCl 0,5 M.-Tris-HCl 0,2 M. pH6,8 igual a su peso. Hay que cuidar que la parte inferior del recipiente esté bien agitada, puesto que de otra manera, el almidón que sedimenta fácilmente arrastra otras partículas, que de esta forma sufren una extracción deficiente.

La suspensión se pasa por una tela, se centrifuga y se fracciona con alcohol en las condiciones descritas. Los resultados se indican en la tabla N° 3.-

TABLA N° 3.

Extracción de aspirasa B en distintos tiempos.

Tiempo de extracción.	(ml) Volumen	U. totales		%		a .e.		Razón ATP/ADP	(mg) Proteínas.
		ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP		
<u>5 min.</u>									
Extracto	45	247	75	(100)	(100)	0,76	0,23	3,3	330
0-22 Alc	20	22	22	9	30	0,35	0,33	1,01	66
<u>10 min.</u>									
Extracto	45	164	38	(100)	(100)	0,49	0,11	4,3	336
0-22 Alc.	20	21	14	13	37	0,41	0,27	1,5	47
<u>40 min.</u>									
Extracto	45	133	38	(100)	(100)	0,41	0,12	3,5	326
0-22% Alc.	20	30	21	22	55	0,37	0,26	1,4	81
<u>60 min.</u>									
Extracto	45	209	73	(100)	(100)	0,54	0,19	2,81	387
0-22% Alc.	20	22	19	11	26	0,40	0,35	1,14	56
<u>90 min.</u>									
Extracto	45	234	79	(100)	(100)	0,60	0,20	3,00	387
0-22% Alc.	20	22	21	10	27	0,44	0,42	1,05	51

Como se puede apreciar. la extracción de aspirasa B va en aumento hasta los 40 min., eligiéndose este tiempo como el óptimo.

g) Fuerza iónica de extracción. A una papilla preparada según se ha indicado, se le agrega un volumen equivalente a su peso de una solución que contiene: tampón Tris-HCl 0,2 M. pH6,8 y KCl de concentración variable. Se procede a agitar durante 40 min. y a precipitar con alcohol en la forma ya descrita.

TABLA N° 4

Extracción de papirasa B con diferentes fuerzas iónicas.

Concen- tración de KCl.	Volu- men (ml)	U. totales		%		a.e.		Razón ATP/ADP	Prote- ínas (mg)
		ATP	ADP	ATP	ADP	ATP	ADP		
<u>0,06 M.</u> Extracto	45	225	61	(100)	(100)	0,67	0,18	3,70	337
0-22% Alc.	20	30	16	14	27	0,45	0,25	1,86	67
<u>0,30 M.</u> Extracto	45	219	58	(100)	(100)	0,59	0,16	3,65	374
0-22% Alc.	20	19	15	9	26	0,39	0,31	1,36	48
<u>0,45 M.</u> Extracto	45	216	55	(100)	(100)	0,57	0,14	3,95	380
0-22% Alc.	20	12	10	6	18	0,28	0,25	1,09	40
<u>0,60 M.</u> Extracto	45	250	72	(100)	(100)	0,64	0,18	3,5	387
0-22% Alc.	20	8	7	3	10	0,23	0,20	1,15	35

Los datos obtenidos en la tabla 4, reflejan algunas de las características fisicoquímicas del sistema, impuestas por las variaciones de la fuerza iónica. Cuanto menor es la constante dieléctrica del medio, debido a una baja fuerza iónica en la precipitación con alcohol, tanto mayor es la cantidad de proteínas precipitadas. A menor fuerza iónica se obtiene una mayor cantidad de unidades totales, pero junto con esto, la razón ATP/ADP de esa fracción es relativamente alta. Es por esto que se elige la concentración de KCl 0,3 M. como la óptima, puesto que si bien no es la condición de mayor rendimiento, es la que permite obtener la mayor cantidad de unidades totales de papirasa de baja razón ATP/ADP, vale decir de papirasa B.

RESUMEN DE LA ETAPA DE EXTRACCION.

Se homogenizan durante 1 min. en la juguera papas peladas y trozadas. La papilla obtenida se extrae con igual volumen de tampón Tris-HCl 0,2 M. pH 6,8 - KCl 0,3 M. La suspensión obtenida se agita durante 40 min., se pasa por tela y se centrifuga. Se utiliza el sobrenadante para las operaciones posteriores.

Etapa II.

a) Precipitación con alcohol. Una vez determinadas las condiciones óptimas de extracción, se repitió el fraccionamiento con alcohol en las nuevas condiciones de extracción. Los resultados obtenidos, son en todo similares a los del primer fraccionamiento. Usando la metódica descrita se elige el corte 0-22% como óptimo.

RESUMEN DE LA ETAPA II.

El extracto se precipita a -6° con alcohol hasta una concentración de 22% (v/v). Se centrifuga durante 20 min. y se descarta el sobrenadante. El precipitado se disuelve en un 40% de volumen del extracto con una solución de KCl 0,5 M.

Etapa III.-

a) Fraccionamiento con Sulfato de Amonio. La fracción alcohólica preparada según se ha descrito, se sometió luego a un fraccionamiento con sulfato de amonio a pH constante.

En todos los casos el pH se controló potenciométricamente en una muestra diluida 10 a 20 veces.

Se toma un volumen de la solución obtenida por fraccionamiento alcohólico y se fracciona con sulfato de amonio agregando en forma sólida; el pH se mantiene constante a lo largo de cada fraccionamiento. El ajuste de pH se efectúa con amoníaco concentrado. Después de agregar la cantidad deseada de sulfato de amonio, se mantiene la suspensión durante 15 a 20 min. con agitación a fin de que se equilibren solución y precipitado. Los precipitados se separan por centrifugación a $34.000 \times g$ durante 20 min. Todas las fracciones se disuelven en KCl 0,5 M. a fin de ser ensayadas.

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos con las fracciones de más alta actividad específica y rendimiento, para cada uno de los pH estudiados.

TABLA N° 5

Fraccionamiento de apirasa B con Sulfato de Amonio a dife-
rentes pH.

Fracción	% de U. recuperadas de fracción alcohólica.		a.e.		Razón ATP/ADP	Producto de purificación	
	ATP	ADP	ATP	ADP		ATP	ADP
22-61 a pH 7,0	93	83	2,51	1,46	1,71	2,32	1,23
25-70 a pH 6,4	77	70	3,00	2,45	1,22	4,76	4,27
20-60 a pH 5,8	79	74	2,22	2,00	1,11	1,75	1,48

Para facilitar la comparación de los resultados obtenidos, se ha preferido emplear la expresión de "producto de purificación" (11) ya que esta expresión refleja simultáneamente rendimiento y purificación obtenidos en una etapa.

Como se puede apreciar en la tabla 5, la fracción 25-70% de saturación con Sulfato de Amonio obtenida a pH 6,4 es la que da mejores resultados, teniendo el mayor "producto de purificación" y una baja razón ATP/ADP.

RESUMEN DE LA ETAPA III

La fracción alcohólica obtenida en la etapa II se fracciona entre un 25% y un 75% de saturación con sulfato de amonio, manteniendo el pH constante en 6,4. El precipitado se disuelve en un volumen de KCl 0,5 M. correspondiente a un 8% del volumen de la fracción alcohólica.

DISCUSION

Propiedades de la apirasa de baja razón ATP/ADP

Datos obtenidos por Kalkar (1) indican que la apirasa de papa, obtenida por el método de este mismo autor, puede adsorberse a miosina de músculo y coprecipitar a baja fuerza iónica. Esta coprecipitación de la apirasa con otras proteínas, podría explicar los resultados obtenidos tanto en la extracción de la apirasa "insoluble" de Krishnan con agua, como en la variación de la cinética de esta preparación al diluir. Se puede suponer que al separar la apirasa "insoluble" de Krishnan por diálisis,

una parte de la apirasa "soluble" presente en el extracto co-precipitaría.

Si aceptamos estas premisas, la dilución de la enzima para el ensayo cinético (ver pag. 6.-), no sería otra cosa que la extracción de la apirasa "soluble" del precipitado, obteniéndose entonces una variación del comportamiento cinético de la preparación.

Sabemos que la apirasa "soluble" de Krishnan, o la A de Molnar, poseen una cinética bien particular. Los datos existentes (6)(8), indican que la velocidad de hidrólisis del ATP disminuye bruscamente al alcanzarse un 50% de hidrólisis de fósforo ácido lábil agregado. Pero lo más sugestivo es que con métodos de preparación tan distintos como los de este laboratorio (11) y el de Krishnan(4) y, empleando enzimas de actividad también diferentes, se obtienen comportamientos cinéticos totalmente similares (Ser(8) y pag.7). Estos datos parecen indicar que la apirasa A o "soluble" es una entidad enzimática totalmente definida. No ocurre lo mismo para la apirasa descrita como "insoluble". Como ya hemos visto, en una misma preparación se pueden inducir diferencias notables en el comportamiento cinético, por simple dilución. El estudio cinético de la preparación de Krishnan descrito en este trabajo, sugiere una aparente no homogeneidad en ella. Por otra parte, el trabajo de Molnar carece de un análisis completo de la hidrólisis del ATP en función del tiempo y a diferentes diluciones de apirasa B. Para poder realizar un estudio cinético era indispensable contar con una preparación de apirasa de baja razón ATP/ADP. Sólo en etapas más avanzadas de purificación se justificará dicho estudio cinético completo de esta enzima.

El método elaborado tiene la ventaja de separar apirasa de baja razón ATP/ADP directamente a partir de un extracto. De este modo, eliminamos en la primera etapa del método la mayor cantidad del contaminante que más falsearía los resultados, como es la apirasa A. Si bien en las primeras etapas de la separación se obtienen rendimientos bajos, por las razones

indicadas en la introducción del trabajo, ya en la tercera etapa se ve una purificación apreciable, con un alto rendimiento.

Cabe señalar, sin embargo, que tanto nuestros resultados como los de Krishnan o los de Molnar, podrían explicarse proponiendo la existencia sólo de la apirasa A; la apirasa B sería un artefacto, debido a la coprecipitación de la apirasa A con un inhibidor de la actividad ATPásica. Solo aislando totalmente una de las dos apirastas y preparando el suero inmune respectivo se podría realmente probar la existencia de dos apirastas. Por esta razón, insistimos una vez más en la importancia de elaborar un método adecuado para obtener una de las apirastas totalmente pura.

RESUMEN

1.- Se realiza un estudio cinético de la apirasa insoluble de Krishnan y de la apirasa A preparada en este laboratorio.

2.- Se describen las primeras etapas de un método de extracción de apirasa de baja razón ATP/ADP (Apirasa B).

3.- Las etapas (extracción, precipitación con alcohol, fraccionamiento con sulfato de amonio) se analizan en detalle.

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

- 1.- Kalkar H.M. J. Biol.Chem. 153,355(1944)
- 2.- Meyerhof O. J. Biol.Chem. 157,105(1945)
- 3.- Szekely M. Acta Chim. Acad.Sci.Hung.
1,325 (1951)
- 4.- Krishnan P.S. Arch.Biochem.20,261(1949)
- 5.- Krishnan P.S. Arch.Biochem.20,272(1949)
- 6.- Molnar J.,Lorand L. Arch.Biochem.Biophys.93,353
(1961)
- 7.- Thoni N.v.,Roche J.,An T.t. Bull.Soc.Chem.Biol.Paris.36
529(1954)
- 8.-Traverso-Cori A.,Cori O. Biochim.et Biophys.Acta.57,
158(1962)
- 9.- Kalkar H.M. J.Biol.Chem.167,455(1947)
- 10.- Cori O,Traverso-Cori A.,
Marcus F.,Tetas M.,Muñoz
M.,Lagarigue M. Biochim.et Biophys.Acta.42
560(1960)
- 11.- Israel Y. Memoria de prueba para optar
al título de Bioquímico.(1962)
- 12.- Gornall A.G.Bardwill C. J. J. Biol. Chem. 177,75(1949)
David M.M.
- 13.- Marcus D. Comunicación personal
- 14.- Fiske C.H.,Subarrow Y. J.Biol.Chem.66,375(1925)
- 15.- Lohman K.,Jendrassik L. Biochem.Z.178,419(1926)
- 16.- Perry S.V. Colowick S.P.,Kaplan N.O.
"Methods in Enzymology"Vol.2.
A.P.Inc.N.Y.1955 p. 582.
- 17.- Colowick S.P.Kaplan N.O. "Methods in Enzimology" Vol. 1
A.P.Inc.N.Y. 1955 p. 84