

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

CATEDRA DE BIOQUIMICA GENERAL
PROFESOR OSVALDO CORI
DIRECTOR DE TESIS: AIDA TRAVERSO

INSTITUTO DE FISILOGIA
DIRECTOR PROF. SAMUEL MIDDLETON

"HIDROLISIS ENZIMATICA DE LOS ENLACES PIROFOSFORICOS.
CARACTERIZACION Y SEPARACION DE ADENILPIROFOSFATASA"

TESTS DE PRUEBA PARA OPTAR AL
TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO

ELIANA CANELO SANCHEZ

1960.

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

CATEDRA DE BIOQUIMICA GENERAL
PROFESOR OSVALDO GORI
DIRECTOR DE TESIS: AIDA GRAVERSO

INSTITUTO DE FISILOGIA
DIRECTOR PROF. SAMUEL MIDDLETON

SUMMARY

1) A preparation of potato sprouts contains hydrolytic enzymes which split ATP, ADP and inorganic pyrophosphate.

2) It is possible, by alcohol fractionation, to reduce greatly the two latter activities.

3) ADP is formed during the hydrolysis of ATP. A two-

"HIDROLISIS ENZIMATICA DE LOS ENLACES PIRUVICOS."

CARACTERIZACION Y SEPARACION DE ADENILPINOSEFATASA"

TESIS DE PRUEBA PARA OPTAR AL

TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO

ELIANA CANELO SANCHEZ

1960.

INTRODUCCION.

Seguiente la linea de trabajo de este laboratorio surgió la necesidad de obtener un preparado enzimático que hidrolizara tanto el fosfato β del ATP como el β y γ del AMP. El objeto de esta preparación era demostrar existencia de fosfo-esterasa a partir de las fosfoesterasas purificadas independientemente de ellas.

Se ha descrito en la papa una enzima que realiza la hidrólisis de ATP y AMP hasta AMP (10,12) la que se ha denominado "apirasa" (16). En este trabajo en otros laboratorios **SUMMARY** (1,18).

Al estudiar la relación entre velocidad de reacción y concentración de sustrato se fue posible establecer una función lineal con la preparación de apirasa (16). Esto hizo pensar que se podía tratar de una enzima de acción a dos etapas distintas a la descrita por Krishna.

1) A preparation of potato apyrase contains hydrolytic enzymes which split ATP, ADP and inorganic pyrophosphate.

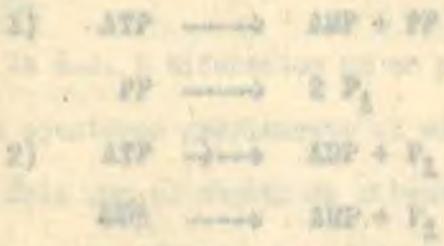
Trabaja (19) ha estudiado el mecanismo de reacción de la apirasa y concluye que el ATP es hidrolizado a AMP y fosfato β y que estas etapas son sucesivas y simultáneas.

2) It is possible, by alcohol fractionation, to reduce greatly the two latter activities.

En cambio la apirasa descrita por Lee y Miller (17) involucra al fosfato β y γ del ATP a temperaturas superiores a 7° y sólo el fosfato β bajo 7°. Estos autores (13) estudian el mecanismo de reacción y analizan la posibilidad que la hidrólisis intervenga en la hidrólisis de estos fosfatos.

3) ADP is formed during the hydrolysis of ATP. A two-step mechanism, possibly catalyzed by two different proteins is proposed.

Hasta ahora no se propone ningún mecanismo de acción y como, por otra parte, nuestra enzima difiere en muchos aspectos a la descrita por Lee-Miller hemos pensado proponer los siguientes mecanismos de reacción:



Este 2º mecanismo de acción puede ser realizado por una o dos enzimas. El 1º mecanismo requiere poder demostrar actividad hidrolítica frente al PP sin que esta actividad, por otra parte, permita preparar el AMP necesario.

El objeto de esta tesis es estudiar las características de la enzima de hidrólisis del ATP, AMP y PP y relacionar las actividades de la enzima en diferentes etapas de purificación respecto a estos tres sustratos.

INTRODUCCION.

Siguiendo la línea de trabajo de este laboratorio surgió la necesidad de obtener un preparado enzimático que hidrolizara tanto el fosfato β del ADP como el β y γ del ATP. El objeto de esta preparación era demostrar síntesis de Fosfo-creatina a partir de fosfoenol-pirúvico independientemente de dichos nucleótidos (4).

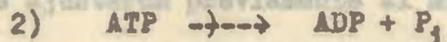
Se ha descrito en la papa una enzima que realiza la hidrólisis de ATP y ADP hasta AMP (10,12) la que se ha denominado "apirasa" (16). Ha sido usada en muchos laboratorios como reactivo analítico (1,18).

Al estudiar la relación entre velocidad de reacción y concentración de enzima no fué posible establecer una función lineal con la preparación de Krishnan (19). Esto hizo pensar que se podía tratar de una mezcla de enzimas o de una enzima distinta a la descrita por Krishnan.

Theal (19) ha estudiado el mecanismo de reacción de la apirasa y concluye que el ATP se desdobra a ADP y éste a AMP y que ambas etapas son sucesivas y no simultáneas.

En cambio la apirasa descrita por Lee y Eiler (12) hidroliza el fosfato γ y β del ATP a temperaturas superiores a 7° y sólo el fosfato γ bajo 7° . Estos mismos autores (13) estudian el mecanismo de reacción y excluyen la posibilidad que la mioquinasa intervenga en la hidrólisis de estos fosfatos.

Como Krishnan no propone ningún mecanismo de acción y como, por otra parte, nuestra enzima difiere en muchos aspectos a la descrita por Lee-Eiler hemos pensado proponer los siguientes mecanismos de reacción:



Este 2º mecanismo de acción puede ser realizado por una o dos enzimas. El 1º mecanismo requiere poder demostrar actividad hidrolítica frente al PP sin que esta evidencia, por otra parte, permita asegurar dicho mecanismo.

El objeto de esta tesis es estudiar las características de la cinética de hidrólisis del ATP, ADP y PP y relacionar las actividades de la enzima en diferentes etapas de purificación respecto a estos tres sustratos.

MATERIALES Y METODOS.

Todos los substratos proceden de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A. excepto el ác. 3 fosfoglicérico y el PP* que son de Schwarz Laboratories Inc. Mount Vernon, N.Y., U.S.A. y de Mallinckrodt, respectivamente. La Quinasa Pirúvica y la Dehidrogenasa Láctica se obtuvieron de Behringer-Söhne, Mannheim, Alemania.

El preparado enzimático se obtuvo según el método de Krishnan de un extracto de papa (obtenidas en diversos establecimientos comerciales) en solución de KCN 10^{-2} M a pH 7. Las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio entre 0 y 60% de saturación y se repitió esta etapa con el precipitado rediseuelto en agua destilada a 0° pero, a diferencia del procedimiento original, en esta 2ª etapa se separaron nuevamente las proteínas que precipitan entre 0 y 60% de saturación.

La actividad de la enzima se midió por la cantidad de P_1 liberado (6) en las condiciones que se indican en cada tabla.

En algunos experimentos se midió desaparición de ATP, ADP o PP por el P_7 , (15) o bien, desaparición de fosfocreatina (5).

Para la determinación de proteínas se siguió el método del Biuret (8).

Los resultados (a.e.) se expresan en μ moles de P_1 liberados por minuto y per mg. de proteína, salvo en la Fig. 2.

R E S U L T A D O S .

1) EFEECTO del pH.

Se determinó la a.e. a diferentes pH en presencia de iones Ca^{++} (Fig. 1) Los substratos se ajustaron previamente al mismo pH que el buffer. Se varió la naturaleza de éste con el objeto de obtener el máximo de amortiguación tratando de usar cada uno de ellos cerca de su pK.

* ABREVIATURAS USADAS.

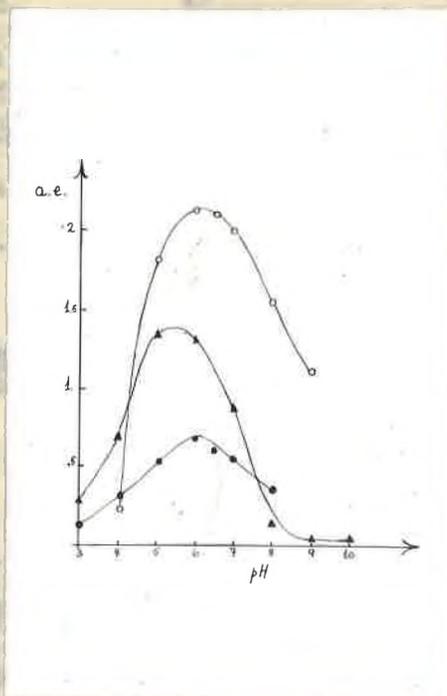
ATP adenosín trifosfato; AMP adenosín monofosfato; ADP adenosín difosfato; P-P pirofosfato de Na; P_1 ortofosfato inorgánico; P_7 fósforo orgánico liberado por hidrólisis en HCl; DPN difosfo piridín-nucleotido; DPNH difosfo piridín-nucleotido reducido; a.e. actividad específica; Km constante de Michaelis.

Fig.1. Efecto del pH en la hidrólisis enzimática de ATP, ADP y PP.

Buffer usado a pH 3 citrato; a pH 4 y 5 acetato; a pH 6 y 6.5 succinato; a pH 7 y 8 tri(hidroximetil)aminometano-HCl; a pH 9 glicina-NaOH; a pH 10 el sustrato (PP) actúa como buffer.

La mezcla a incubar contenía, en un vol. final de 2 ml, 20 µmoles de P_i y 100 µmoles del buffer respectivo. Incubación 10 minutos para ADP y PP o 5 minutos para ATP, a 30°, conc. final de Ca⁺⁺ 6.6x10⁻³ M.

○ ATP, ● ADP y ▲ PP.



2) ACTIVADORES. Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ y Mn⁺⁺.

Se vio el efecto de estos cationes sobre la velocidad de reacción, siendo el Ca⁺⁺ el más activo como se observa en Tabla I.

Sobre la PPassa ejerce el Mn⁺⁺, a la concentración usada, una acción francamente inhibitoria.

3) INHIBIDORES. F⁻ y CH₂I-COO⁻.

En todos los casos se produce inhibición en presencia de F⁻ (Tabla II)

Con CH₂I-COO⁻ las variaciones que se producen caen dentro del error experimental.

5) CONCENTRACIONES DE SUSTRATO.

Estudiamos el efecto de la actividad de la enzima por cada uno de los tres sustratos.

TABLA I. ACCION del Ca^{++} , Mg^{++} Y Mn^{++} sobre la VELOCIDAD de REACCION.

| SUBSTRATO | ACTIVADOR | a.e. | Cambio respecto a la a.e. sin catión agregado (%) |
|-----------|-----------|------|---|
| | - | 1.22 | - |
| ATP | Ca^{++} | 2.13 | +75 |
| | Mg^{++} | 1.49 | +22 |
| | Mn^{++} | 1.49 | +22 |
| ADP | - | .5 | - |
| | Ca^{++} | .55 | +10 |
| | Mg^{++} | .5 | 0 |
| P-P | - | .98 | - |
| | Ca^{++} | 1.22 | +10 25 |
| | Mg^{++} | 1.0 | 0 |
| | Mn^{++} | .41 | -58 |

20 μ moles de P_7 , en un vol. final de 2 ml, incubación 10 minutos (PP y ADP) o 5 minutos (ATP) a 30°, a los respectivos pH óptimos, conc. final de Ca^{++} , Mg^{++} y Mn^{++} 6.6×10^{-3} M, 8.5×10^{-3} M y 5.5×10^{-3} M, respectivamente.

TABLA II. INFLUENCIA del F^- y CH_2I-COO^- sobre la VELOCIDAD de REACCION. Igualas condiciones que en Tabla I.

7) CINETICA de la HIDROLISIS del ATP a distintas temperaturas.

Con este experimento se quiso verificar la presencia de la enzima de liberar el fosfato a del ATP.

| SUBSTRATO | INHIBIDOR | conc. $\times 10^2$ (M) | a.e. | | % de inhibición | |
|-----------|---------------|-------------------------|------|-----------|-----------------|-----------|
| | | | - | Ca^{++} | - | Ca^{++} |
| ATP | - | 1.25 | 1.25 | 2.47 | - | - |
| | CH_2I-COO^- | .25 | 1.25 | 2.35 | 0 | 0 |
| | F^- | 6.0 | .66 | .73 | 44 | 70.5 |
| ADP | - | 1.25 | - | .53 | - | - |
| | CH_2I-COO^- | .25 | - | .51 | - | 0 |
| | F^- | 6.0 | - | .07 | - | 87 |
| P-P | - | 1.25 | .89 | 1.02 | - | - |
| | CH_2I-COO^- | .25 | .84 | .96 | 0 | 0 |
| | F^- | 6.0 | 0.0 | 0.0 | 100 | 100 |

4) EFEECTO de la TEMPERATURA.

Se determinaron las temperaturas óptimas para la hidrólisis de ATP, P-P y ADP siendo para los dos primeros substratos de 50°, y de 55° para el ADP en un ensayo de 10 minutos.

La experiencia se realizó a los respectivos pH óptimos y en presencia de una conc. final de 6.6×10^{-3} M de Ca^{++} .

5) CONCENTRACION de SUBSTRATO.

Interesa conocer la afinidad de la enzima por cada uno de los tres subs-

tratos estudiados. Con los datos obtenidos se calcularon las Km, según Lineweaver y Burk(14), obteniéndose para la actividad ATPásica una Km de 1.31×10^{-3} M, para la PPásica de 0.7×10^{-3} M y para la ADPasa de 0.49×10^{-3} M.

6) ESPECIFICIDAD.

La preparación enzimática obtenida no es específica para el ATP y ADP ya que hidreliza además, a mucho menor velocidad, Fosfocreatina, Fosfoenolpirúvico, α -3 fosfoglicérico, Ribosa 5-fosfato, DPN e inosín-trifosfato.

En el caso del DPN no hay liberación de P_i pero se comprobó un 20% de hidrólisis al medir la conc. del nucleótido por reducción con etanol y dehidrogenasa alcohólica (3).

No se produce liberación de P_i del AMP. El inosín-trifosfato es hidrolizado a una velocidad unas 8 veces menor que la del ATP.

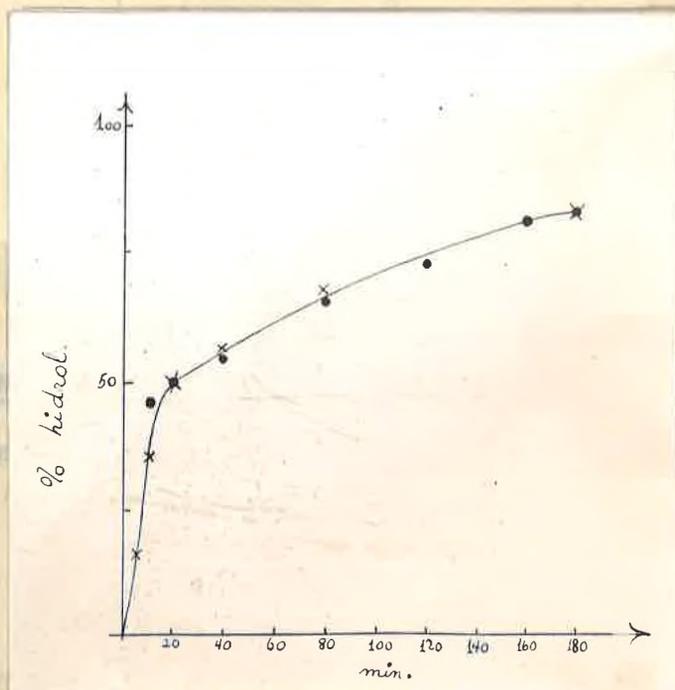
7) CINETICA de la HIDROLISIS del ATP a distintas temperaturas.

Con este experimento se quiso verificar la presencia de la apirasa de Eiler que por debajo de 7° sólo libera el fosfato γ del ATP.

Los datos obtenidos en condiciones análogas a las de este autor revelan, tanto a 1° como a 30° , una liberación continua de P_i constituyendo éste al cabo de 180 minutos el 83% del P_i (Fig.2). Esto indica que se hidroliza tanto el fosfato γ como el β del ATP.

Fig.2. Cinética de la hidrólisis del ATP a 1° y 30° .

Vol. 2 ml, Ca^{++} 6.6×10^{-3} M, buffer succinato pH 6, apirasa 0.1 ml (3.5 mg/ml), ATP 0.005 M para el experimento a 30° y 0.001 M para el experimento a 1° . Los resultados se expresan en % del P ácido-lábil liberado como P_i .

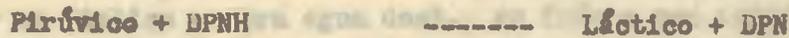
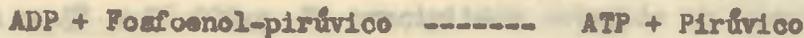


• a 1°
x a 30°

8) APARICION de ADP como 1^{er} producto de la HIDROLISIS

ENZIMATICA del ATP.

A fin de detectar aparición de ADP como primer producto de reacción en la hidrólisis del ATP se acopló al sistema siguiente:



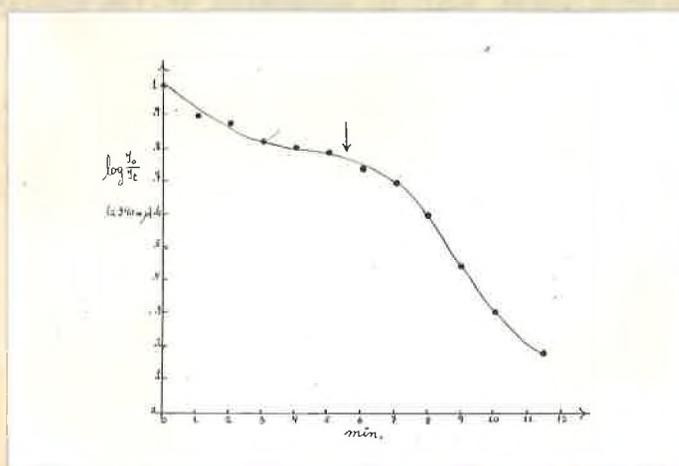
La disminución en la absorción de luz a 340 m μ es criterio de aparición de ADP ya que la oxidación del DPNH no se realiza en ausencia de este nucleótido.

En los primeros 5 minutos no se agrega apirasa y la pequeña disminución en D.O se debe a presencia de pequeñas cantidades de ADP en los reactivos. Al cabo de este tiempo, cuando la aguja del espectrofotómetro prácticamente se ha estabilizado, se agrega 0.1 ml. de apirasa (3.5 mg de prot./ml) y entonces se aprecia un franco aumento en la velocidad de desaparición de DPNH.

Fig.3, MEDICION ESPECTROFOTOMETRICA de ADP como producto en

la HIDROLISIS ENZIMATICA del ATP.

Vol. total 2 ml, temperatura aproximada 22°, longitud del paso de luz 1 cm.
Conc. de ATP 3.3×10^{-3} M, pH 7.5, conc. KCl y fosfoenol-pirúvico 6.6×10^{-4} M,
Quinasa pirúvica 10 μ g, dehidrogenasa láctica 10 μ g. DPNH?
La flecha indica el momento en que se agregó la apirasa.



9) FRACCIONAMIENTO con ETANOL.

Se intentó separar la fracción apirásica de la PPásica fraccionándolas con alcohol (7).

A un determinado volumen de sol. enzimática (3.5 mg.de prot./ml) a 0° se va agregando, gota a gota y con agitación mecánica, etanol de 95% a -15° bajando gradualmente la temperatura de la mezcla hasta -5°. Después de completar el % deseado (v/v) se continúa agitando unos 5' y luego se centrifuga a -5° y 25.000xg. El precipitado obtenido se disuelve en agua dest. fría y se dializa contra agua dest., en frío y con agitación.

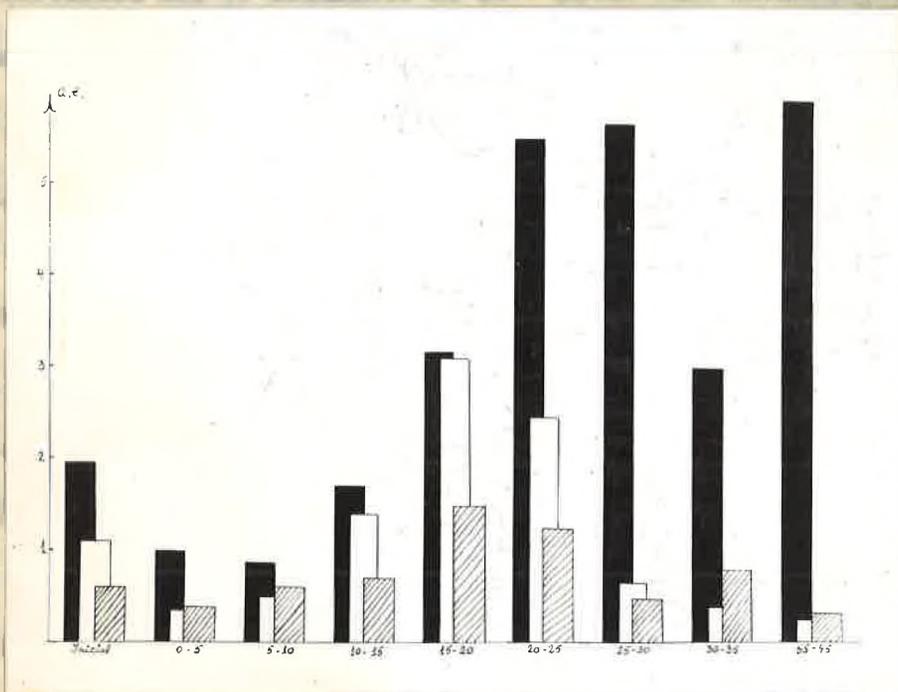
DISCUSION.

El ensayo se hace en 5 minutos a 30° con 20 µmoles P₇, en 2 ml. y Ca⁺⁺ en conc. final de 6.6x10⁻³ M.

Se define una fracción por los límites superior e inferior de concentración de alcohol, en vol. de alcohol de 95% por 100 ml, entre los cuales precipita la proteína.

Se hicieron precipitaciones de modo de obtener fracciones entre límites relativamente estrechos de conc. de alcohol (Fig.4). Rección en la fracción (25-30) empieza a disminuir la actividad PPásica y continúa bajando, a la vez que sube la actividad ATPásica hasta presentar en la fracción (35-45) una razón ATPasa/PPasa de 24.6.

Fig.4. Distribución de la ATPasa, ADPasa y PPasa en diferentes precipitados etanólicos.



Barra negra act. ATPásica
 " achurada " ADPásica

En otro fraccionamiento se llevó primeramente hasta 30% de saturación con alcohol para precipitar la mayor parte de la PPasa. En la fracción (30-36) pudo apreciarse un leve aumento de la a.e. de la ATPasa y una disminución notable de la PPasa, ambas con respecto a las a.e. iniciales. En esta fracción la razón ATPasa/PPasa fué de 6.6.

DISCUSION .

a) pH óptimo.

Para el sistema hidrolítico del ATP y ADP se encontró un pH óptimo cercano a 6.0. En cambio Eiler da para la ADPasa un pH óptimo de 4.4 y para la ATPasa uno de 6.5.

El pH óptimo para la hidrólisis del PP es de 5.0 y tiene un brusco descenso en la zona alcalina, descripción que coincide con la de Naganna y col(17)

b) Efecto de los iones bivalentes.

Encontramos para la reacción ATPásica una activación por Ca^{++} de alrededor de 75% lo que concuerda con los valores encontrados por Kalckar, Krishnan y Eiler (9,11,12). El Mg^{++} y el Mn^{++} solo estimulan un 20% contrariamente a lo citado por Theai (19) cuya preparación es insensible al Ca^{++} , Mg^{++} y Mn^{++} .

No hubo una activación apreciable por estos tres iones de la hidrólisis enzimática del ADP.

En la hidrólisis del PP solamente el Ca^{++} actúa como estimulante; el Mn^{++} , en cambio, inhibe en más de un 50% (17) lo cual podría esperarse dada la baja solubilidad del pirofosfato de Mn^{++} .

c) Acción de los inhibidores.

El á.c. moneoyde-acético no es inhibidor lo que excluye la participación de grupos SH- en la hidrólisis enzimática de ATP, ADP y PP (2).

Por el contrario el F^{-} inhibe la hidrólisis de los tres substratos. Esto era de esperar para la actividad ATPásica que requiere iones alcalinotérreos (Mg^{+}) pero llama la atención, sin embargo, que la actividad hidrolítica que más requiere estos iones como es la del ATP sea la menos afectada por el F^{-} .

d) Afinidad per el substrate.

La Km a 30° para el ATP no coincide con los datos de Eiler (13). Esta constante tiene un valor de 0.49×10^{-3} M para el ADP y no ha sido calculada per otros autores.

e) Fraccionamiento con etanol.

Este procedimiento muestra una tendencia a separar la ATPasa de la PPasa y ADPasa lo que hace pensar que estas tres actividades puedan ser catalizadas per proteínas diferentes.

f) Efecto de la temperatura.

Las temperaturas óptimas para la hidrólisis enzimática del ATP, ADP y PP no han sido descritas en la literatura.

Experimentos cinéticos a 1° y a 30° demuestran que nuestra apirasa difiere en su comportamiento de la enzima de Eiler, ya que a ambas temperaturas continúa la liberación de P_i por sobre el 50% del P ácido-lábil. Esto demuestra que hay hidrólisis del fosfato β. Se ve claramente en la Fig, 2 que la cinética es un fenómeno bifásico, lo podría estar de acuerdo con la descripción de Thoai (19). La primera fase (rápida) correspondería a la transformación total del ATP en ADP, en tanto que la segunda, mucho más lenta, podría representar la liberación del fosfato β del ADP.

El experimento espectrofotométrico, que demuestra la formación de ADP como intermediario, apoya también la segunda de la dos hipótesis de trabajo enunciadas en la introducción. La desaparición de la ADPasa en el fraccionamiento con etanol parece contradecir la hipótesis de Thoai (19) de que el desdoblamiento del ATP pase per la etapa de ADP. Sin embargo, puede pensarse que se trate de dos proteínas, una que hidrolice el ATP hasta ADP y otra que continúe la hidrólisis hasta AMP. Como tanto los experimentos cinéticos como los espectrofotométricos fueron hechos con preparaciones más crudas cabe pensar que estaban presentes en ellas ambas enzimas en tanto que en la fracción etanólica se encontraba predominantemente la ATPasa .

La posible existencia de intermediarios combinados a la enzima puede oscurecer, sin embargo, dicha interpretación. Experimentos con P³² pueden aclarar este problema.

RESUMEN.

- 1) Se elabora una preparación enzimática de apirasa de papa que hidroliza los dos fosfatos ácido-lábiles del ATP.
- 2) Se caracterizan en esta preparación tres sistemas enzimáticos responsables de la hidrólisis de ATP, ADP y PP.
- 3) Se discute el posible mecanismo de la hidrólisis de ATP por esta preparación. Los datos experimentales parecen apoyar la siguiente secuencia de reacciones:



y parecen indicar la participación de dos enzimas diferentes.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Bailey, K. The Enzimic Degradation of Adenosintriphosphate. Biochem. J. 45, 479, 1949.
- 2) Bárány, M. y Bárány, K. Gifwirkungen auf die Kartoffel-Apyrase. Bioch. Bioph. Acta, 35, 544, 1959.
- 3) Clotti, M.M. y Kaplan, N.O. DPN determination by alcohol dehydrogenase. (En Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. "Methods in Enzymology". vol. III, 891, New York, Academic Press, 1955)
- 4) Cori, O., Traverso-Cori, A., Marcus, F., Tetaz, M., Maffoz, M. y Lagarrigue, M. Bioch. Bioph. Acta, 1960 (en prensa).
- 5) Cori, O., Traverso-Cori, A. y Marcus, F. *Lagarrigue M.* Biochem. J. 70, 633, 1958.
- 6) Fiske, C.H. y Subbarow, Y. J. Biol. Chem. 66, 375, 1925.
- 7) Green, A.A. y Hughes, W.L. Protein Fractionation on the Basis of Solubility in Aqueous Solutions of Salts and Organic Solvents. (En Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. "Methods in Enzymology" Vol. I, 82, New York, Academic Press, 1955)
- 8) Hawk, Oser y Summerson. "Practical Physiological Chemistry", 171, 1954.
- 9) Kalokar, H.M. J. Biol. Chem. 153, 355, 1944.
- 10) Krishnan, P.S. Studies on Apyrases. I. Purification of Potato Apyrase by Fractional Precipitation with Ammonium Sulfate. Arch. Biochem. 20, 261, 1949.
- 11) Krishnan, P.S. Studies on Apyrases. II. Some Properties of Potato Apyrase. Arch. Biochem. 20, 272, 1949.

- 12) Lee, K-H. y Eiler, J.J. Temperature-dependent Characteristics of a
Adenylpyrophosphatase Preparation from Potato. *Science*, **114**,
394, 1951.
- 13) Lee, K-H., Kresanoski, J.Z. y Eiler, J.J. Mode of Action of Potato Apy-
rase, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **94**, 193, 1957.
- 14) Lineweaver, H. y Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658, 1934.
- 15) Lohmann, y Jendrassik. *Biochem. Z.* **178**, 419, 1926.
- 16) Mayerhöf, O. *J. Biol. Chem.* **157**, 107, 1945.
- 17) Naganna, B., Raman, A., Venugopal, B. y Sripathi, C.E. Potato Pyrophospha-
tase. *Biochem. J.* **60**, 215, 1955.
- 18) Rowles, S.L. y Stocken, L.A. The estimation of Adenosintriphosphate.
Biochem. J. **47**, 489, 1950.
- 19) Theai, N-v., Roche, J. y An, T.T. Sur la purification et le mécanisme d'
action de l'apyrase de pomme de terre. *Bull. Soc. Chim. Biol.*
Paris, **36**, 529, 1954.