

Con todo cuidado por todos los
estímulos recibidos durante
el desarrollo de este trabajo.

Zona

ISOAPIRASAS DE TUBERCULO DE S. tuberosum: FUNCION DE LOS IONES METALICOS
EN LA CATALISIS Y REGULACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

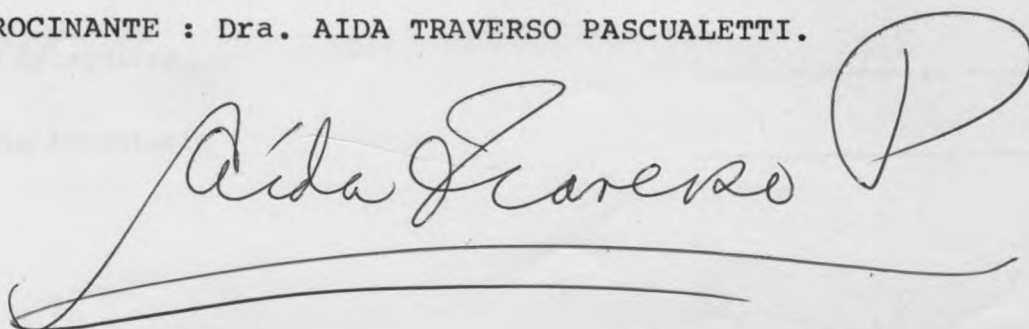
Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Bioquímica

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

por

MARIA ANTONIETA VALENZUELA PEDEVILA

PATROCINANTE : Dra. AIDA TRAVERSO PASCUALETTI.

A large, stylized handwritten signature in dark ink, reading 'Aida Traverso' followed by a large, circular flourish. The signature is written over a horizontal line.

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

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

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

MARIA ANTONIETA VALENZUELA PEDEVILA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 31 de Marzo de 1987.

Patrocinante de Tesis
Dra. Aída Traverso P.

Comisión Informante de Tesis

Dr. Mario Sapag (Presidente)

Dr. Emilio Cardemil

Dr. Catherine Connelly

Dr. Jaime Eyzaguirre

Dr. Octavio Monasterio

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica,
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad
de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile,
bajo el patrocinio de la Dra. Aída Traverso Pascualetti.

A G R A D E C I M I E N T O S

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

A la Dra. Aída Traverso Pascualetti por su constante estímulo, crítica e interés con que siguió el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeras de trabajo Ana María Kettlun y Marta Mancilla por su participación en el trabajo intelectual y de experimentación junto con el estímulo que siempre me han brindado.

A Javier Puente, por su aporte de ideas en el curso de la tesis.

A mis ex-memoristas Jorge Rivera, Víctor Calvo, Nora Fanta, Mario Anich quiénes contribuyeron entusiastamente con partes experimentales de esta tesis.

Al Profesor Osvaldo Cori, que con extraordinarias características intelectuales y espíritu de crítico, siempre ha colaborado con el desarrollo de la línea de investigación de nuestro grupo.

A los actuales miembros del Laboratorio de Bioquímica, Lilliana Chayet, Luz María Pérez, y también a mis ex-compañeras del Laboratorio Luz Uribe y especialmente a Cecilia Rojas por sus valiosas críticas.

Al resto de los colaboradores del Laboratorio, Guillermo Córdova, Rodolfo Pulgar y Patricia Fuentealba, por su gran apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Octavio Monasterio por su valiosa colaboración en el análisis y discusión de algunos resultados.

A Ester Norambuena, por su colaboración prestada en los experimentos de ESR.

A Betsabé Rubio, al Dr. Claudio Silva y al Dr. Eduardo Cortés por su ayuda en la determinación de metales.

A la Sra. Fresia Pérez de la asignatura de Inglés por su desinteresada ayuda.

Al Señor Hugo Gugliermetti por la donación del material biológico.

Esta tesis fue financiada a través de los subsidios de investigación otorgados por el DIB y por FONDECYT.

María Antonieta Valenzuela P.

Marzo, 1987.

A MI QUERIDA Y ABNEGADA
FAMILIA :

JAVIER
CLAUDIO
MARCELA
Y MADRE

LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT.....	XIX
1. INTRODUCCION.....	1
2. MATERIALES Y METODOS.....	17
2.1. Material biológico.....	17
2.2. Reactivos químicos y materiales cromatográficos.....	17
2.3. Determinación de proteínas.....	18
2.4. Determinación de la pureza de las fracciones proteicas.....	19
2.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 4,5.....	19
2.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.....	21
2.4.3. Electroenfoque en geles de poliacrilamida.....	22
2.5. Ensayo enzimático de la apirasa.....	24
2.6. Purificación de la apirasa.....	25
2.6.1. Preparación del extracto de tubérculo y fraccionamiento con sulfato de amonio.....	25
2.6.2. Cromatografía en Sephadex G-100.....	27
2.6.3. Cromatografía en azul de Cibacron Sephadex.....	27
2.6.3.1. Inmovilización del azul de Cibacron en Sephadex.....	28
2.6.3.2. Determinación de la K_i del azul de Cibacron- Sephadex para la apirasa.....	30
2.6.3.3. Columna cromatográfica de azul de Cibacron.....	30
2.7. Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_m	31
2.8. Determinación de la constante de asociación Ca-ADP a pH 6,0.....	33
2.8.1. Filtración en columna de Sephadex G-10.....	33
2.8.2. Titulación con electrodo selectivo para Ca^{++}	34
2.9. Efecto de cationes bivalentes sobre la actividad apirásica.....	35
2.10. Interacción de Cr(III)-ATP con la apirasa.....	36
2.10.1. Síntesis, purificación y cuantificación de Cr(III)-ATP.....	36
2.10.2. Identificación y pureza del Cr(III)-ATP..	37
2.10.3. Cr(III)-ATP como sustrato e inhibidor competitivo de las isoapirinas.....	43
2.11. Interacción de cationes bivalentes con	

1a apirasa.....	43
2.11.1. Espectros de resonancia del $^{2+}$ espín electrónico del $Mn(H_2O)_6$ en presencia de apirasa.....	44
2.11.2. Fenómeno de histéresis en la apirasa preincubada con iones metálicos bivalentes.....	45
2.11.3. Determinación de la masa molecular de la isoenzima Desirée en presencia de Ca^{2+}	45
2.12. Determinación del contenido de metales bivalentes en el tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Desirée.....	46
2.13. Determinación del contenido de ATP y ADP en el tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Desirée.....	47
2.14. Ensayo de la calmodulina.....	48
2.15. Purificación de calmodulina de tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Ultimus.....	49
2.15.1. Preparación del extracto, fraccionamiento con sulfato de amonio y tratamiento con calor.....	49
2.15.2. Cromatografía en trifluoperazina-Sepharese.....	50
2.15.2.1. Preparación de la TFP-Sepharese.....	50
2.15.2.2. Columna cromatográfica de TFP-Sepharese.....	51
2.16. Caracterización de la calmodulina de tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Ultimus.....	52
2.17. Efecto de distintas fracciones proteicas con actividad reguladora sobre apirasa.....	53
2.18. Caracterización de la fracción activadora de apirasa.....	54
3. RESULTADOS.....	55
3.1. Purificación de la apirasa a partir de tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Pimpernel y var. Desirée.....	55
3.1.1. Ruta de purificación.....	55
3.1.2. Determinación de la K_i del azul de Cibacron-Sepharese para la apirasa.....	60
3.1.3. Estimación de la pureza de la enzima.....	62
3.2. Propiedades cinéticas de las isoapirasas.....	62
3.2.1. Determinación de los parámetros K_m y V_m	66
3.2.2. Determinación de la constante de asociación $Ca-ADP$ a pH 6,0.....	68
3.2.3. Efecto de iones metálicos bivalentes sobre la actividad apirásica.....	75
3.3. Interacción de $Cr(III)-ATP$ con la apirasa.....	78
3.3.1. $Cr(III)-ATP$ como sustrato e inhibidor de las isoapirasas.....	80

3.4.	Interacción de cationes bivalentes con la apirasa.....	83
3.4.1.	Espectros de resonancia del espín electrónico del $Mn(H_2O)_6^{2+}$ en presencia de apirasa Desirée.....	83
3.4.2.	Fenómeno de histéresis en la apirasa preincubada con iones metálicos bivalentes.....	86
3.4.3.	Determinación de la masa molecular de la isoenzima Desirée en presencia de Ca^{2+}	88
3.4.4.	Factores que anulan la histéresis.....	91
3.4.5.	Cálculo de la constante de velocidad aparente para alcanzar el régimen estacionario del complejo apirasa- Ca^{2+}	93
3.5.	Determinación del contenido de metales bivalentes en el tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Desirée.....	100
3.6.	Determinación del contenido de ATP y ADP en el tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Desirée.....	103
3.7.	Purificación de calmodulina de <u>S. tuberosum</u> var. Ultimus.....	105
3.8.	Caracterización de la Fr-CaM de tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Ultimus.....	109
3.9.	Caracterización de la fracción activadora de las isoapirasas.....	115
4.	DISCUSION.....	120
4.1.	Ruta de purificación seguida para las isoapirasas.....	120
4.2.	Propiedades cinéticas de las isoapirasas Pimpernel y Desirée.....	123
4.2.1.	Parámetros cinéticos para ADP y Ca^{2+}	127
4.2.2.	Interacción del $Cr(III)$ -ATP con la apirasa.....	130
4.2.3.	Efecto de diversos iones metálicos bivalentes sobre la actividad apirásica.....	136
4.3.	Interacción de cationes bivalentes con la apirasa.....	141
4.4.	Interacción de apirasa con algunas proteínas reguladoras presentes en el tubérculo de <u>S. tuberosum</u>	148
5.	CONCLUSIONES.....	157
6.	BIBLIOGRAFIA.....	161

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Análisis cromatográfico y electroforético de Cr(III)-ATP.....	42
Tabla 2	Purificación de la apirasa de <u>S. tuberosum</u> var. Pimpernel.....	56
Tabla 3	Purificación de la apirasa de <u>S. tuberosum</u> var. Desirée.....	57
Tabla 4	Parámetros cinéticos de las apirasas Pimpernel y Desirée.....	67
Tabla 5	Determinación de la constante de asociación Ca-ADP por titulación con electrodo para Ca^{2+}	73
Tabla 6	Concentraciones de Ca-ADP calculadas a partir de la constante de asociación de este complejo.....	74
Tabla 7	Efecto de cationes bivalentes sobre las actividades enzimáticas de la apirasa Pimpernel...	77
Tabla 8	Efecto de cationes bivalentes sobre las actividades enzimáticas de la apirasa Desirée.....	78
Tabla 9	Inhibición por Cr(III)-ATP de la hidrólisis de ATP y ADP catalizada por las apirasas Pimpernel y Desirée.....	82
Tabla 10	Período de retardo presentado por la enzima Desiree preincubada con distintos cationes.....	90
Tabla 11	Valores de la intersección en la ordenada en la curva de progreso a las diferentes concentraciones de ATP y ADP.....	99

Tabla 12	Contenido de metales bivalentes en el tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Desirée.....	10
Tabla 13	Contenido de ATP y ADP comparado con el de Ca y Mg en el tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Desirée.	
Tabla 14	Efecto de la fracción 50 de tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Ultimus sobre la fosfodiesterasa de AMPc de corazón de bovino.....	107
Tabla 15	Efecto de las fracciones proteicas eluídas de la columna de TFP-Sepharose sobre la fosfodiesterasa de AMPc y la apirasa.....	108
Tabla 16	Caracterización de la calmodulina de tubérculo de <u>S. tuberosum</u> var. Ultimus.....	116
Tabla 17	Efecto de la fracción activadora sobre las distintas isoapirasas.....	117

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Purificación de Cr(III)-ATP.....	38
Fig. 2. Espectros de absorción de Cr(III)-ATP, ATP y Cr(NO ₃) ₃	41
Fig. 3. Purificación de la apirasa Desirée en columna de azul de Cibacron-Sepharose.....	58
Fig. 4. Determinación de la K _i del azul de Cibacron- Sepharose para la apirasa Desirée.....	61
Fig. 5. Fotografía de los geles de poliacrilamida de la apirasa Desirée eluída de la columna de azul de Cibacron-Sepharose.....	63
Fig. 6. Análisis densitométrico de los geles de poliacri- lamida de la apirasa mostrados en la Fig. 5.....	64
Fig. 7. Electroenfoque en geles de poliacrilamida de las isoapirastas.....	65
Fig. 8. Gráfico de Hanes-Woolf para la determinación de los parámetros cinéticos de ADP y Ca ²⁺ de la en- zima Desirée.....	69
Fig. 9. Determinación de la constante de asociación Ca-ADP mediante filtración en Sephadex G-10.....	70
Fig.10. Titulación del Ca ²⁺ libre seguido por medio de un electrodo selectivo para Ca ²⁺	72
Fig.11. Gráfico de Hanes-Woolf para la determinación de los parámetros cinéticos del complejo Ca-ADP.....	76
Fig. 12. Gráfico de Lineweaver-Burk para la determinación de la K _i del Cr(III)-ATP.....	81

Fig. 13. Espectroscopía de resonancia del espín electrónico del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$	84
Fig. 14. Cinética de hidrólisis de ATP y ADP catalizada por la isoapirasa Desirée preincubada con $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ o con Ca^{2+}	87
Fig. 15. Cinética de hidrólisis de ATP y ADP catalizada por la isoapirasa Desirée preincubada con cationes bivalentes.....	89
Fig. 16. Determinación de la masa molecular de la apirasa Desirée en condiciones de histéresis.....	92
Fig. 17. Efecto de la concentración del sustrato-metal sobre el tiempo de retardo de la apirasa Desirée preincubada con Ca^{2+}	94
Fig. 18. Anulación de la histéresis por análogos del sustrato.....	95
Fig. 19. Dependencia de la k_{ap} de las concentraciones de sustrato utilizadas para el ensayo enzimático....	101
Fig. 20. Fotografía de los geles de poliácridamida de la calmodulina eluída de la columna de TFP-Sepharose.	111
Fig. 21. Determinación de la masa molecular de la calmodulina de <u>S. tuberosum</u>	112
Fig. 22. Electroenfoque en gel de poliácridamida de la CaM.	113
Fig. 23. Electroforesis en geles de poliácridamida en SDS y electroenfoque de la fracción activadora de la apirasa.....	116
Fig. 24. Efecto de la concentración de la fracción activadora sobre la actividad apirásica.....	118

ABREVIATURAS

ATPasa	: ATP β, γ pirofosfohidrolasa
ADPasa	: ADP α, β pirofosfohidrolasa
AMPc	: adenosín monofosfato cíclico
AMP-PCP	: adenosín-5'-(β, γ -metilén)-trifosfato
Bisacrilamida	: N,N'-metilén-bisacrilamida
Bisoxirano	: éter 1,4-butanodiol diglicídico
BSA	: albúmina sérica de bovino
CaM	: calmodulina
Crt	: cromo total
Cr(III)-ATP	: adenosíntrifosfato de cromo III
DCCD	: diciclohexil-carbodiimida
DES	: dietilestilbestrol
EDTA	: ácido etiléndiamino tetraacético
EGTA	: ácido etilénglicol bis (β -aminoetil-éter)-N,N,N',N'-tetraacético
Epiclorhidrina	: 1-cloro-2,3-epoxipropano
ESR	: espectroscopía de resonancia del espín electrónico
HEPES	: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
M.M.	: masa molecular
MES	: ácido 2(N-morfolino)-etanosulfónico
PEP	: ácido fosfoenolpirúvico
Pi	: fosfato inorgánico
pI	: punto isoelectrico

Pt	: fósforo total
SDS	: dodecil sulfato de sodio
TCA	: ácido tricloroacético
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametilén-etilendiamina
Tris	: tris-(hidroximetil)-aminometano
TFP	: trifluoperazina

RESUMEN

En esta tesis se ha realizado un estudio de la apirasa (ATP:difosfohidrolasa E.C. 3.6.1.5.) obtenida de tubérculo de dos variedades de S. tuberosum, var. Pimpernel y var. Desirée. Se describe inicialmente la ruta de purificación para obtener una preparación estable y homogénea con la cual se realizaron los estudios cinéticos.

El presente trabajo tuvo dos objetivos principales. El primero fue analizar la posible función de los metales bivalentes en la reacción hidrolítica catalizada por esta enzima y el segundo estudiar algún mecanismo regulador de la actividad apirásica.

El primer objetivo se abordó tratando de conocer el esquema de coordinación de la enzima con el metal y con el sustrato. Esto se enfocó determinando los parámetros cinéticos para el sustrato ADP y el Ca^{2+} encontrándose una correspondencia en ambos valores de K_m y V_m . Se pudo concluir que el complejo nucleotido-metal sería el verdadero sustrato, además se podría proponer que este complejo nucleotido-metal no interactuaría con la enzima a través del metal sino a través de los átomos de oxígeno de la cadena pirofosfórica, hecho deducido del efecto inhibitorio de tipo competitivo del análogo del sustrato Cr(III)-ATP (compuesto inerte al intercambio de ligandos).

Con el propósito de calcular la concentración real del complejo Ca-ADP en las condiciones del ensayo enzimático, se

determinó la constante de asociación de este complejo en las mismas condiciones de pH y fuerza iónica. Esta determinación se realizó por filtración en gel en Sephadex G-10 y por titulación directa mediante un electrodo selectivo para Ca^{2+} .

Dentro de este primer punto se efectuó un estudio comparativo del efecto estimulador de diversos metales bivalentes aparte del Ca^{2+} . Lo que más llamó la atención de este análisis fue que algunos metales (en especial Mn^{2+} y Cd^{2+}) hacen cambiar el cociente hidrolítico ATPásico/ADPásico, comparado con el obtenido con Ca^{2+} .

Por espectroscopía de resonancia del espín electrónico (ESR) de $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ se encontró que la apirasa proveniente de *S. tuberosum* var. Désirée liga metal bivalente en ausencia de sustrato. El espectro del Mn^{2+} hexahidratado presentó la aparición de una transición a campo bajo al agregar la enzima. Esto indica que la apirasa se une a este metal en ausencia de sustrato, produciendo además una alteración en la simetría electrónica del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$. Por dificultades técnicas no fue posible seguir el espectro de ESR del complejo apirasa-Mn-AMP-PCP.

Se puso también en evidencia que la apirasa une otros metales bivalente además del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, por la aparición del fenómeno de histéresis, al preincubar esta enzima con los metales bivalentes en ausencia de nucleótidos (sustratos). Según Frieden (1970) este comportamiento puede deberse a agregación molecular, desplazamiento de un ligando firmemente unido a la enzima e isomerizaciones de formas enzimáticas.

De estas tres proposiciones de histéresis se descartó el cambio del estado de agregación por no encontrarse modificación de la masa molecular de la apirasa. En cambio, la que se ajusta bien a los datos experimentales es la segunda causa (desplazamiento de un ligando) puesto que concentraciones crecientes de sustrato (Ca-ATP y Ca-ADP) provocan una disminución del tiempo de retardo, hasta hacerlo desaparecer. Además los análogos de ATP, AMP-PCP y Cr(III)-ATP, impiden la aparición de histéresis en la enzima.

Se determinaron también las concentraciones tisulares de algunos metales como: Ca, Mg, Mn, Co, Zn y además de los nucleótidos di y trifosforados de adenina.

El segundo objetivo de esta tesis fue observar si la apirasa (ATPasa-ADPasa) es regulada por calmodulina, a semejanza de otras ATPasas de origen vegetal y animal. Para ello, se aisló y purificó a homogeneidad la calmodulina de tubérculo de S. tuberosum por técnicas ampliamente descritas. Se caracterizó la calmodulina proveniente de una columna de trifluoperazina-Sepharose, determinándose que correspondía a las características ya conocidas de la calmodulina de otras especies de origen animal y vegetal. Estas características son: masa molecular (17,5 kDa), pI (4,4), estabilidad al calor, capacidad de estimular a la fosfodiesterasa de AMPc en presencia de Ca^{2+} y la inhibición de su acción por trifluoperazina, efecto dependiente de Ca^{2+} .

La calmodulina aislada de S. tuberosum purificada a homogeneidad, no presentó ningún efecto sobre la apirasa. De

la columna de trifluoperazina-Sepharose eluyeron con fuerza iónica otras dos fracciones proteicas con propiedades moduladoras de las actividades ATPásica y ADPásica de la apirasa, siendo una de ellas activadora y la otra inhibidora.

De estas dos fracciones solo se caracterizó la fracción activadora, ya que la proteína inhibidora se obtuvo en bajas concentraciones siendo además muy inestable. La fracción activadora parcialmente purificada no depende de Ca^{2+} para su acción, y su efecto es revertido por trifluoperazina en ausencia de Ca^{2+} .

Se postula un posible papel de la apirasa en la célula y la acción de las proteínas que la regulan.

SUMMARY

The present thesis is a study of apyrase (ATP:diphosphohydrolase E.C. 3.6.1.5.) from potato tuber, isolated from two clonal varieties of S. tuberosum, var. Pimpernel and var. Desirée. The purification procedure described herein was followed in order to obtain a homogeneous and stable enzyme which was used to carry out the kinetic studies.

This work had two main purposes. The first one was the analysis of the possible role of bivalent metals in the hydrolytic reaction catalyzed by apyrase. The second purpose was to describe a possible regulating mechanism of this enzymatic activity.

The first objective was approached by undertaking a study of the enzyme-metal-substrate coordination scheme. The kinetic parameters for substrates ADP and Ca^{2+} were determined. K_m and V_m values were similar for both substrates. This fact lead us conclude that the real substrate of the enzyme is the metal-nucleotide complex. Cr(III)-ATP (inert to ligand exchange) is a substrate analogue, and it is a competitive inhibitor of the reaction. This fact suggests that the metal-nucleotide complex would interact with the enzyme through the pyrophosphate chain and not through the metal.

The association constant of the Ca-ADP complex was measured at the same pH and ionic strength as the enzymatic assay in order to calculate its real concentration (in the

medium). The association constant was determined by gel filtration through a Sephadex G-10 column and by direct titration with a selective Ca^{2+} electrode.

A comparative study between the stimulatory effect of Ca^{2+} and other bivalent metals was performed. The most relevant finding was that some metals, especially Mn^{2+} and Cd^{2+} , modify the hydrolytic ATPase/ADPase ratio.

$\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ spin resonance spectroscopy (ESR) showed that apyrase obtained from S. tuberosum var. Désirée binds to the bivalent metal in the absence of a substrate. The spectrum of Mn^{2+} hexahydrate showed a transition at low field after the addition of apyrase. This result indicates that the enzyme binds to this metal (Mn^{2+}) in the absence of substrates (ATP, ADP, etc) and that this binding produces a distortion in the electronic symmetry of $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$. Due to technical deficiencies, it was impossible to follow the ESR spectrum of the ternary complex : apyrase-Mn-AMP-PCP.

Apyrase binds to other bivalent metals. This conclusion was drawn from the finding that the hysteretic phenomenon appears when apyrase is preincubated with bivalent metals in the absence of a substrate (nucleotides). This hysteretic behavior may be due to: a) molecular aggregation of the enzyme, b) displacement of a ligand strongly bound to the enzyme or c) to isomerization of enzymatic forms (Frieden, 1970).

The molecular mass of apyrase was unmodified during the course of the experiments, so hysteresis due to molecular

aggregation was discarded. Displacement of a ligand strongly bound to the enzyme agrees well with experimental data since increasing amounts of substrate concentration (Ca-ATP or Ca-ADP) produce a decrease in the lag period until it is no longer observed. In addition, ATP analogues like AMP-PCP and Cr(III)-ATP prevent the enzyme hysteretic behavior of the enzyme.

The concentration of the metals ions like Ca , Mg , Mn , Co , Zn and of the adenine nucleosides di and tri-phosphate was determined in the tuber of S. tuberosum .

The second purpose of this thesis was to study the possibility of the regulation of apyrase (ATPase-ADPase) by calmodulin, as it has been seen in other animal and plant ATPases.

Calmodulin from S. tuberosum was isolated and purified to homogeneity by standard published techniques already described. Calmodulin purified using a trifluoperazine-Sepharose column was characterized. The molecular mass (17,5 kDa), pI (4,4), heat stability, stimulatory effect on cAMP phosphodiesterase in the presence of Ca^{2+} , and the Ca-dependent inhibition of calmodulinic activity by trifluoperazine correspond to the characteristics found for other calmodulins isolated from plant and animal tissues.

Homogeneous calmodulin extracted from potato tuber had no effect on apyrase. Two proteins however eluted from the trifluoperazine-Sepharose column showed regulatory activity,

one of which activated and the other inhibited both ATPase and ADPase hydrolytic activities of the enzyme.

Activation by the partially purified fraction is Ca^{2+} independent and its effect is reverted by trifluoperazine in the absence of Ca^{2+} . The inhibitory fraction could not be characterized because of its low protein concentration and high instability.

The possible role of apyrase and of its regulatory proteins in the cell is discussed.

INTRODUCCION

A.- ANTECEDENTES GENERALES SOBRE Ca^{2+} Y ATPasa.

El ión calcio en tejidos vegetales tiene un papel crucial en la regulación de procesos fisiológicos fundamentales. Se ha sugerido que este catión bivalente participa en diversos procesos como: movimientos de las hojas de la Mimosa ; fototaxis de las Chlamydomonas ; movimientos de los cloroplastos en la Mougeotia ; corrientes citoplasmáticas y despolarización de membranas en las células de Nitella ; crecimiento de las puntas de los granos de polen; secreción de materiales de la pared celular y acción hormonal sobre el desarrollo vegetal (Dieter y Marmé, 1980; Cormier y col., 1982; Dieter, 1984).

Aunque el mecanismo de acción del calcio en estos procesos es desconocido, se puede hacer una distinción clara entre el papel que desempeña este ión y el Mg^{2+} , que es el otro metal bivalente muy abundante que se encuentra en tejidos vegetales y animales inclusive en concentraciones más altas. El Ca^{2+} participa en múltiples funciones celulares, su concentración experimenta grandes cambios en los distintos compartimientos intracelulares frente a diversos estímulos fisiológicos, lo que le ha permitido la denominación de segundo mensajero. En cambio el Mg^{2+} , tiene un papel constitutivo en algunas enzimas y también una función importante en las reacciones de transferencia de fosforilos, activando el átomo de fósforo de los nucleótidos aumentando su electrofilia. Sobre el Mg^{2+} no hay

datos en la literatura acerca de cambios de su concentración intracelular.

Existen muchas pruebas de que el bajo nivel de Ca^{2+} citoplasmático de los vegetales puede aumentar por la acción de hormonas y de la luz, a través de una disminución de la actividad ATPásica relacionada con el transporte de este ión y/o la liberación de Ca^{2+} unido, o bien por cambios en la permeabilidad de la membrana por la posible existencia de canales para calcio (Dieter, 1984).

En varios de los procesos fisiológicos mediados por Ca^{2+} intervienen también proteínas que son receptores para este metal, formando un complejo Ca-proteína activo, como es el caso de la calmodulina, proteína muy ubicua en tejidos vegetales y animales. En tejidos vegetales el aumento del Ca^{2+} citoplasmático conduciría a la activación de la calmodulina, modulando en forma alostérica a todas las enzimas dependientes de este complejo Ca^{2+} -calmodulina, como por ejemplo, la Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa (Dieter y Marmé, 1981; Olah y col., 1983), la AD-quinasa (Anderson y col., 1980; Dieter y Marmé, 1984), la aspartato quinasa (Sane y col., 1984), etc.

Es un hecho conocido que la mitocondria concentra calcio a expensas del citosol en un orden de 10^4 y en menor grado lo hace también el retículo endoplásmico. La calmodulina no tiene ningún efecto en la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria, en cambio esta proteína aumenta la afinidad y velocidad de transporte de este catión en sistemas microsomales obtenidos de coleoptilos de maíz (Dieter y Marmé, 1983).

Gross y Marmé (1978) han demostrado la dependencia de ATP

para el transporte de Ca^{2+} en *Cryptomonas*, en cultivo de células y en vesículas membranosas de plantas superiores. Posteriormente, el mismo grupo (Dieter y Marmé, 1980) comparó los requerimientos energéticos y la sensibilidad a inhibidores relacionados con el transporte de Ca^{2+} en fracciones microsomales y mitocondriales. En estas investigaciones encontraron significativas diferencias en el transporte de Ca^{2+} entre las mitocondrias de diversos órganos de la misma planta, en cambio, no hubo diferencias en las preparaciones microsomales de los mismos órganos.

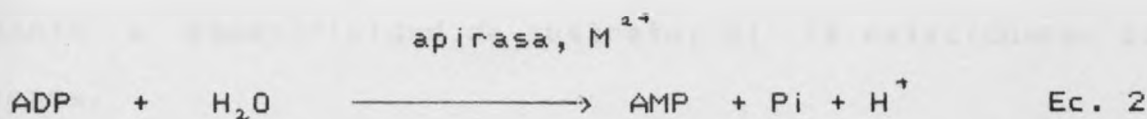
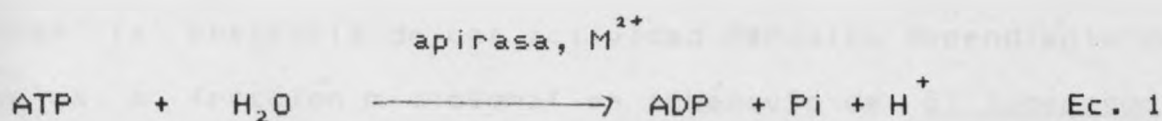
Rasi-Caldogno y colaboradores (1982) han descrito dos preparaciones de membranas no mitocondriales que participan en la concentración de Ca^{2+} dependiente de ATP en vesículas membranosas de los internodos de arvejas. Una de ellas, la fracción más liviana se caracteriza por ser un sistema de transporte antiparalelo $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ estimulado por K^+ y saturable a concentraciones bajas de Mg-ATP. La otra fracción membranosa más pesada requiere diez veces más Mg-ATP que la liviana, y es independiente de la gradiente electroquímica de protones. Según estos mismos autores esta última fracción membranosa más pesada contendría la Ca^{2+} -Mg $^{2+}$ -ATPasa descrita por Dieter y Marmé (1980a). Se conocen también fracciones microsomales de hipocotilos de poroto de soya (Kubovicz y col., 1982), raíces de maíz (Zocchi y Hanson, 1983) y fruto de manzana (Fukumoto y Venis, 1986) que presentan sistemas de transporte de Ca^{2+} dependientes de ATP.

Pohlman-Nepveu y colaboradores (1979) y Stok y colaboradores (1981) han correlacionado la incorporación y

transporte de Ca^{2+} y Mg^{2+} con la actividad ATPásica de fracciones microsomales de raíces de gramíneas. Este mismo tipo de correlación con respecto a Ca^{2+} ha sido encontrado por Buckhout (1984) en Lepidium sativum y presentado en una revisión por Sze (1984). Además se ha encontrado que los factores ambientales en que crecen algunas gramíneas, como temperatura y contenido salino de Ca^{2+} y Mg^{2+} , influirían en la actividad específica de la ATPasa dependiente de estos metales (Kähr y Müller, 1976; Pohlman-Nepveu y col., 1979; Kylin y Kähr, 1973).

Las ATPasas de tejidos vegetales de diferentes fracciones subcelulares han sido clasificadas como ATPasa de membrana plasmática, ATPasa mitocondrial, ATPasa vacuolar y apirasa (Serrano, 1983). Esta clasificación ha respondido a características de pH óptimo; especificidad de substratos, inhibidores y requerimientos de cationes bivalentes.

De todas estas ATPasas descritas, nuestro grupo ha estado interesado en la apirasa desde hace largo tiempo, la que fue denominada así por Meyerhoff (1945) porque hidroliza ATP y ADP produciendo finalmente AMP y P_i :



La acción de los inhibidores como vanadato, DCCD, DES

(Anich, 1984), oligomicina y azida (resultados no publicados) muestra un patrón de comportamiento de la apirasa que no corresponde a ninguna de las ATPasas antes mencionadas.

Esta tesis analiza la función del Ca^{2+} en la reacción catalizada por la apirasa de Solanum tuberosum y el posible mecanismo de acción y regulación de esta enzima.

B.- APIRASA (ATP-difosfohidrolasa E.C. 3.6.1.5.)

La apirasa o ATP-difosfohidrolasa se encuentra ampliamente distribuída en tejidos vegetales y se ha purificado a partir de preparaciones solubles de tubérculo y brote de S. tuberosum (Kalckar, 1944 y Anich, 1984), hoja de repollo (Mazelis, 1959), semillas de trébol (Sikka y Das, 1964), plúmula de arveja (Nishikawa, 1966). También algunas de las apirasas de tejidos vegetales como de tallo de arveja y raíz de garbanzo se han encontrado en forma insoluble asociada a membranas (Tognoli y Marré, 1981; Vara y Serrano, 1981).

A su vez Jolliot y col. (1976) y Fakrai y Hall (1984) describen la presencia de una actividad ATPásica dependiente de Ca^{2+} unida a fracción microsomal en tubérculo de S. tuberosum que podría corresponder a la apirasa. Desafortunadamente ninguno de estos dos grupos de investigadores caracterizó a esta enzima en cuanto a especificidad de sustrato, ni la relacionaron con la apirasa.

Oparka (1986) tratando de buscar la participación de una Ca^{2+} -ATPasa en el proceso de liberación de sacarosa en tubérculo de S. tuberosum observó, por estudios citoquímicos, que la actividad ATPásica se ubicaba en el plasmalema del parénquima de almacenamiento de almidón y también en el citoplasma de dichas células, pero no asociada a ningún organelo en particular.

En los tejidos animales también ha sido descrita esta enzima desde la misma época en que fue encontrada en tejidos vegetales, pero en esta tesis solo se hará mención de las preparaciones de apirasa, libres de mioquinasa o adenilquinasa que podrían enmascarar la acción catalítica de la apirasa, dado que tanto la apirasa (ATPasa-ADPasa) como un conjunto de adenilquinasa y ATPasa dan los mismos productos (AMP + 2P_i). Harper y colaboradores (1978) y Lebel y colaboradores (1980) encontraron apirasa en la fracción microsomal de páncreas de rata y cerdo respectivamente. Knowles y colaboradores (1983) la describen en membrana plasmática de los siguientes tejidos: hígado y cerebro de ratón, riñón de perro, sarcoma de ratón y en tres diferentes tumores humanos. También se la ha encontrado en glándulas salivales de ciertos mosquitos chupadores de sangre (Ribeiro y col., 1984; Sarkis y col., 1986).

En nuestro laboratorio se comenzó la investigación sobre las apirasas del tubérculo de S. tuberosum en 1958 y su propósito ha sido el llegar a conocer su mecanismo de acción y la función que podrían desempeñar en el metabolismo celular de los tejidos vegetales. Cabe hacer notar que nuestro grupo de

investigación ha sido pionero en la purificación y caracterización de estas enzimas pirofosfohidrolásicas del tubérculo y del brote de S. tuberosum (Valenzuela y col., 1973; Anich, 1984). Por ello se desarrolló inicialmente un esquema de purificación, para continuar después con los estudios de especificidad de sustrato, identificación de los residuos de aminoácidos del sitio activo y finalmente algunos estudios estructurales preliminares de esta enzima.

1.B. Especificidad. Desde los primeros experimentos sobre especificidad, se estableció que la apirasa no cataliza la hidrólisis de los enlaces fosfomonoésteres, ni la de los anhídridos mixtos como el acetilfosfato, ni la de los enlaces pirofosfóricos cuyas cadenas están esterificadas por ambos extremos (Cori y col., 1965; Aron y col., 1974). Con el empleo de ATP marcado en el fosforilo γ (Traverso-Cori y Cori, 1962) y ATP marcado en el fosforilo β (Traverso-Cori y col., 1965) se demostró que esta enzima hidroliza secuencialmente los fosforilos γ y β del ATP. Este hecho fue apoyado además por una fuerte inhibición de tipo competitivo por ATP sobre la hidrólisis de ADP (Traverso-Cori y col., 1965). Posteriormente se sintetizaron numerosos derivados di y trifosforados sintéticos (Del Campo y col., 1977). Es posible que en el sitio activo de la enzima exista una región apolar lo suficientemente inespecífica que pueda acomodar grupos tan diferentes en tamaño como es un protón, en caso de piro y trifosfato inorgánicos (Kettlun y col., 1982), metilo, octilo (Del Campo y col., 1977) o bien el complejo de Michaelis de treonil-tRNA sintetasa unido

a ATP (Allende y col., 1970). Se puede concluir que la apirasa tiene muy baja especificidad frente a la porción orgánica del sustrato, la cual puede estar inclusive ausente (pirofosfatos inorgánicos).

En cambio, es importante la estructura de la porción pirofosfórica del sustrato para la catálisis puesto que la sustitución del puente de oxígeno del grupo P-O-P por un metileno (-CH₂-) en posición α , β o bien β , γ impide la catálisis hidrolítica de estos análogos de ATP pero no su unión a la apirasa, porque son efectivos inhibidores competitivos (Del Campo y col., 1977; Kettlun y col., 1982). A su vez el reemplazo del átomo de oxígeno como puente por un átomo de nitrógeno, no impide la acción hidrolítica de la apirasa de S. tuberosum, como ha sido descrito por Horomy y colaboradores (1983). Estos autores utilizaron los análogos estructurales del ATP para demostrar la existencia de etapas en que ocurría la transferencia de protones en reacciones enzimáticas de transferencia de fosforilo.

Finalmente, cambios en el largo de la cadena pirofosfórica, como es el caso del adenosíntetrafosfato, reducen la velocidad de liberación del ortofosfato a valores menores de un 50% en comparación con la del ATP (Liebécq y col., 1962).

2.B. Sitio Activo. La obtención de apirasa de diferentes variedades clonales de S. tuberosum demostró la existencia de más de una forma molecular de esta enzima (isoenzimas) porque exhiben diferentes patrones electroforéticos junto con marcadas

diferencias en la velocidad de hidrólisis de los sustratos ATP y ADP (Traverso-Cori y col., 1970; Carrasco, 1974). Con el propósito de encontrar explicación a las diferencias cinéticas de los cuocientes hidrolíticos de las actividades ATPásica y ADPásica de las isoenzimas, se eligieron dos isoapirasa purificadas a partir de diferentes variedades clonales que sirvieron como modelo para este estudio. Una de ellas ha sido la apirasa Pimpernel de cuociente ATPásico/ADPásico 10 y la apirasa Desirée de cuociente hidrolítico 1,0.

El estudio de las diferencias en las velocidades de hidrólisis de los sustratos ATP y ADP se enfocó mediante el análisis comparativo de los aminoácidos del sitio activo que participarían tanto en la unión como en la catálisis.

Pruebas indirectas han sugerido la posible participación de residuos de tirosina en la actividad apirásica, puesto que las preparaciones que se efectuaban con inhibidores de la tirosinasa (cupferron, CN^- , mercaptoetanol, metabisulfito y ácido tioglicólico) mejoraban en cuanto a su actividad específica y estabilidad (Valenzuela y col., 1973). La adición de tirosinasa en presencia de pirocatecol a una fracción homogénea de apirasa produjo la inactivación de la ATPasa y ADPasa, junto con la aparición de dos nuevas bandas de proteínas que se separaron por electroforesis y que resultaron ser inactivas. Posteriormente se comprobó que la acción de la tirosinasa sobre la apirasa era indirecta, siendo a través de los productos de oxidación del catecol. Esto fue deducido al observar el mismo efecto inactivador al separar la apirasa de la tirosinasa a través de una membrana de diálisis, siempre que se

adicionara pirocatecol (Valenzuela y col., 1973).

Los estudios con modificadores nucleofílicos de proteínas, entre ellos yodo, N-acetilimidazol y tetranitrometano, que derivatizan en forma relativamente específica los residuos de tirosina, representaron las pruebas preliminares de la participación de este tipo de residuos en el sitio activo de las dos actividades enzimáticas de la apirasa (Valenzuela y col., 1973; Kettlun y col., 1981 y 1982). La participación de residuos de cisteína fue excluída por la insensibilidad de la apirasa frente a p-cloromercuribenzoato y al ácido bis-dithionitrobenzoico (Valenzuela y col., 1973; Kettlun y col., 1982).

La alquilación de la apirasa con el reactivo de Koshland (bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo) produjo la pérdida de ambas actividades hidrolíticas, lo que ha sugerido la presencia de residuos de triptofano en el sitio activo de la enzima (Valenzuela y col., 1973; Kettlun y col., 1981 y 1982). Probablemente el residuo de triptofano podría formar parte del sitio de unión de la parte orgánica (purinas) de los nucleótidos de adenina, puesto que modelos experimentales han demostrado que este aminoácido aromático puede interactuar con el anillo de la adenina (Siegel y Nauman, 1976).

La participación de residuos de aminoácidos ácidos y básicos en la acción catalítica de la apirasa Pimpernel, se enfocó inicialmente con el estudio del efecto del pH sobre los parámetros cinéticos, K_m y V_m , según Dixon y Webb (1979).

Los perfiles del logaritmo de V_m y pK_m en función del pH mostraron una sola inflexión significativa a pH entre 4,0 y 5,0 para las actividades ATPásica y ADPásica (Valenzuela y col., 1973), lo que permitió sugerir la participación de grupos carboxílicos. La importancia de estos grupos en la reacción catalizada por la apirasa se vio confirmada por la inactivación de las actividades ATPásica y ADPásica por acción de carbodi-imida soluble en agua (Valenzuela y col., Kettlun y col., 1981 y 1982).

Los perfiles de pH de Dixon y Webb no mostraron inflexiones que permitan sugerir una clara participación de residuos básicos en la acción catalítica de la hidrólisis de pirofosfatos por la apirasa (Valenzuela y col., 1973); sin embargo, experimentos efectuados con 2,3-butanodiona y fenilglioxal, apoyaron la participación de residuos de arginina en el sitio de unión de la apirasa a los sustratos ATP y ADP (Kettlun y col., 1981 y 1982). Esta sugerencia es apoyada por experimentos efectuados con modelos (Cotton y col., 1973) los cuales indican que los grupos guanidinio de los residuos de arginina neutralizarían las cargas negativas de los grupos pirofosfóricos facilitando así el ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo por algún grupo de la enzima o por el -OH del agua.

La acción de los inactivadores dirigidos hacia los aminoácidos del sitio activo, ha permitido concluir que tanto en la isoenzima Pimpernel (cuociente ATPásico/ADPásico = 10) como en la isoenzima Desirée (cuociente ATPásico/ADPásico = 1)

participarían residuos de tirosina, triptofano, arginina y grupos carboxílicos. Pero se han encontrado diferencias significativas en las velocidades relativas de inactivación de las actividades ATPásica y ADPásica con algunos modificadores (Kettlun y col., 1982). Por ejemplo, la isoapirasa Desirée presentó igual velocidad de inactivación para las actividades ATPásica y ADPásica con todos los modificadores usados; en cambio, en la isoapirasa Pimpernel la actividad ATPásica resultó ser mucho más sensible frente a la modificación de residuos de tirosina y triptofano (Valenzuela y col., 1973; Kettlun y col., 1982).

Hay varias formas de interpretar estas diferencias en la inactivación de las dos isoapirasas en cuestión. Entre ellas podemos señalar que podría haber un número diferente de residuos de tirosina y triptofano involucrados en las actividades ATPásica y ADPásica de la isoenzima Pimpernel, o bien una distinta distribución o accesibilidad de estos mismos en el sitio activo de las referidas actividades enzimáticas. Además los sitios de las actividades ATPásica y ADPásica podrían hacerse distintos por efecto de cambios conformacionales producidos por los sustratos ATP y ADP (Koshland, 1959) en isoenzimas con diferentes conformaciones iniciales. No se descarta la posibilidad que la explicación a las diferencias se deba también a todas las posibilidades mencionadas.

3.B. Características Estructurales. Las distintas variedades clonales de S. tuberosum contienen, en el tubérculo,

isoapirinasas que presentan propiedades fisicoquímicas y cinéticas características. Como se mencionó en la sección 2.B, en relación al sitio activo, los tipos de residuos de aminoácidos involucrados en la unión del sustrato y en la catálisis serían cualitativamente los mismos en las isoenzimas Pimpernel y Desirée que exhiben cuocientes ATPásico/ADPásico diferentes.

El cuociente ATPásico/ADPásico de 10 para la isoapirasa Pimpernel y de 1,0 para la Desirée, se debe exclusivamente a los distintos valores de V_m de estas actividades hidrolíticas y no a las respectivas K_m porque ambas isoenzimas presentan prácticamente la misma afinidad hacia los sustratos ATP y ADP (Kettlun y col., 1982).

Las energías de activación para ambas actividades hidrolíticas de las isoapirinasas fueron semejantes, lo que no permitió dar ninguna luz sobre los diferentes cuocientes entre las V_m de las actividades hidrolíticas de ambas isoenzimas; no obstante, la igualdad de los valores de la energía de activación sugeriría que el mecanismo catalítico de ambas isoenzimas es común (Kettlun y col., 1982).

Como no se pudo atribuir las diferencias cinéticas a los aminoácidos del sitio activo, se hizo una comparación entre la composición de aminoácidos totales y sus respectivos residuos amino-terminales de las isoapirinasas Pimpernel y Desirée. La proporción de residuos de aminoácidos básicos y ácidos encontrados para ambas enzimas fue esencialmente la misma (Mancilla y col., 1984), lo que tampoco permitió explicar las diferencias marcadas en los pI de la enzima Pimpernel (pI= 8,74)

y de la Desirée (pI= 6,69) (Kettlun y col., 1982).

Los residuos de ácido aspártico y glutámico de proteínas vegetales presentan frecuentemente un alto porcentaje de amidación con respecto a las proteínas de origen animal; este hecho sugirió que la diferencia de dos unidades de pI entre las isoapirásas podría deberse a un distinto grado de amidación de estos residuos ácidos. Al desaminar enzimáticamente estas enzimas, aparecieron poblaciones de proteínas con actividad apirásica cuyos valores de pI eran más ácidos, pero no se obtuvieron poblaciones de isoapirásas con el mismo punto isoeléctrico, lo que implica que las diferencias en el pI no se deben solamente a un distinto grado de amidación de ambas proteínas. Ha quedado aun en pie la incógnita en cuanto a que las diferencias físicoquímicas se deban a un distinto grado de amidación de los residuos de ácido aspártico y glutámico, o bien que estas diferencias se deban a una distinta exposición al solvente de los residuos polares (Mancilla y col., 1984).

C.- OBJETIVOS

Para el desarrollo de la línea de investigación de nuestro laboratorio sobre mecanismos enzimáticos de hidrólisis de enlaces pirofosfóricos, se ha escogido como modelo a la apirasa o ATP-difosfohidrolasa, por sus características de especificidad hacia el tipo de enlace que actúa, y por su fácil extracción del tubérculo de S. tuberosum. Dentro de la problemática planteada se ubica la hipótesis de trabajo que se puede enunciar a través

de las siguientes interrogantes:

1. ¿Cuál es la función que desempeñan los metales bivalentes, especialmente el Ca^{2+} en la hidrólisis de los sustratos ATP y ADP catalizada por las enzimas Pimperl y Desirée?
2. Existe algún mecanismo regulador de la actividad apirásica mediado por un catión bivalente y/o por una interacción proteína-proteína?

La primera pregunta se abordó mediante la dilucidación cinética entre dos posibles esquemas de coordinación en que el metal puede hacer de puente entre la enzima y el sustrato (E-M-S) o bien es el sustrato el que hace de puente entre la enzima y el metal (E-S-M) (Mildvan, 1970). Estos estudios cinéticos se basaron en la comparación de los parámetros K_m y V_m para los nucleótidos y para el metal, de acuerdo con lo propuesto por Dixon y Webb (1979). Como este método cinético no permite discriminar si el metal unido al sustrato interactúa también con la enzima haciendo de puente entre ambos, se utilizó además el complejo inerte Cr(III)-ATP descrito por Cleland y colaboradores (Janson y Cleland, 1973; Danenberg y Cleland, 1975). Se analizó también en la presente tesis la especificidad hacia metales bivalentes de las actividades ATPásica y ADPásica de las isoapirásas.

La pregunta se abordó también mediante estudios de unión de la apirasa a metales bivalentes, seguido por espectroscopía

de resonancia del espín electrónico del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$.

En la segunda interrogante enunciada en esta tesis sobre algun mecanismo regulador de la apirasa, se consideró la posibilidad de la existencia de la enzima unida a metales bivalentes como uno de los mecanismos reguladores existentes in vivo. Por esta razón se determinaron las concentraciones totales de algunos de los metales bivalentes: Ca, Mg, Mn, Co y Zn, y de los nucleótidos ATP y ADP en el tubérculo de S. tuberosum var. Désirée.

Se pensó también que la apirasa podría ser regulada por la calmodulina a semejanza de otras ATPasas vegetales involucradas en el transporte de iones (Dieter y Marmé, 1981; Olah y col., 1983; Dieter, 1984). Fue importante demostrar la existencia de esta proteína reguladora en el tejido del tubérculo de S. tuberosum porque la breve mención hecha en la revisión de Wang y Waisman (1979) no fue estimada concluyente por la autora de esta tesis. Con este propósito se purificó y caracterizó la calmodulina del tubérculo de S. tuberosum y se estudió su efecto sobre la apirasa.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Material Biológico

Se utilizaron tubérculos de S. tuberosum de las siguientes variedades: Desirée, Pimpernel y Ultimus cedidos gentilmente por el Sr. Hugo Gugliermetti del Instituto de Investigaciones Agropecuarias "La Platina".

2.2. Reactivos químicos y materiales cromatográficos

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A.) se obtuvieron los siguientes productos: ATP (A 5394), ADP grado III (A 2754), NADP (N 0505), NADH grado III (N 8129), PEP (P 7002), α -D(+)-glucosa (G 5000), AMPc (A 6885), BSA (A 4378), MES, HEPEŞ, Trizma base, CaCl_2 , SDS, azul de Cibacron (F3G-A), azul de Coomassie R, acrilamida, bis-acrilamida, éter 1,4-butanodiol diglicidílico, Sephadex G-10, Sephadex G-100, Sepharose 4B, reactivo de Folin Ciocalteu, anfolitos rango de pH 3-10, glicil-glicina, pironina B, trifluoperazina, estándares de masa molecular para geles en SDS, Dowex 50W-X2 (H^+), calmodulina de corazón de bovino, hexoquinasa (EC 2.7.1.1.) tipo III de levadura de panadería, G-6-P-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49.) tipo VII de levadura de

panadería, piruvato quinasa (EC 2.7.1.4.) tipo III de músculo de conejo, lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27.) tipo IX de músculo de conejo, fosfodiesterasa de AMPc (EC 3.1.4.17.) de corazón de bovino deficiente de activador y 5'-adenilato-desaminasa (EC 3.5.4.6.) de músculo de conejo.

De Merck (Darmstadt, R.F.A.) se obtuvieron los siguientes productos de grado pro análisis: ácido succínico, ácido tioglicólico, sulfato de amonio para fines bioquímicos, cloruro de sodio, TCA, epiclorhidrina, β -alanina, glicina, EDTA, EGTA, MnSO_4 , MnCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , CdCl_2 , CuCl_2 , $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ y benceno.

El ácido sulfosalicílico se adquirió de Riedel de Hein (Seelze-Hannover, R.F.A.); el alcohol isobutílico fue de Carlo Erba y el Chelex-100 se obtuvo de Bio-Rad Laboratories (California U.S.A.). Finalmente de Miles Laboratories (Indiana U.S.A.) se adquirió: persulfato de amonio, TEMED, riboflavina y azul de bromofenol.

El agua utilizada fue destilada, excepto para los estudios con cationes bivalentes en que se trató previamente con Chelex-100.

2.3. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por los siguientes métodos: a) absorbancia a 280 nm para el análisis relativo de eluidos de columnas cromatográficas; b) método de

Warburg y Christian (1941) en las diversas etapas de purificación; y c) método de Lowry (Lowry y col., 1951) para las fracciones proteicas más puras.

2.4. Determinación de la pureza de las fracciones proteicas

El control del estado de pureza de las distintas fracciones proteicas (apirasa, calmodulina y fracción activadora de la apirasa) se siguió al menos por dos de los siguientes criterios: electroforesis a pH ácido, electroforesis en presencia de SDS y por electroenfoque. En todos los casos en que se trató de una proteína altamente purificada, los geles se cargaron con aproximadamente 20 a 40 μ g de proteínas determinadas por el método de Lowry. Los registros densitométricos de los geles teñidos con azul de Coomassie fueron efectuados a 540 nm en un densitómetro marca Helena Laboratories.

2.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 4,5

La electroforesis en condiciones no desnaturantes se realizó de acuerdo con la técnica de Reisfield y col. (1962). Este tipo de electroforesis se utilizó solo para estimar la pureza de las fracciones de apirasa. Se prepararon geles de poliacrilamida en tubos de vidrio de 0,6 cm de diámetro interno y 6 cm de largo. El gel concentrador de pH 6,8 (0,2

mL) contenía acrilamida al 2,5%; bis-acrilamida al 0,625%; TEMED al 0,058% (v/v) y riboflavina al 0,0005%. El gel espaciador de pH 4,3 (1,7 mL), se preparó en acrilamida al 7% y bis-acrilamida al 0,2% conteniendo TEMED al 0,5% (v/v) y persulfato de amonio al 0,07%. La muestra se aplicó en sacarosa al 20% siendo el volumen máximo aplicado 0,15 mL. Se utilizó pironina B como colorante indicador del frente electroforético.

El amortiguador de electroforesis fue β -alanina 35 mM y ácido acético 14 mM a pH 4,5. La corrida se efectuó en cámara fría a 8°. Se aplicó una corriente constante de 2,5 mA por tubo, hasta que la pironina llegó al fondo del tubo de gel. El polo positivo estaba en la cámara superior.

Los geles se tiñeron por dos horas a temperatura ambiente con azul de Coomassie R al 0,25% en metanol 45% (v/v), ácido acético 9% (v/v) según Weber y Osborn (1969). El destañido se realizó por difusión en etanol 5% (v/v) y ácido acético 7,5% (v/v) (Weber y Osborn, 1969).

Para la detección de la actividad enzimática en los geles, estos se cortaron transversalmente en segmentos de 0,2 mm de espesor y se extrajeron con 1 mL de NaCl 200 mM a lo menos por una hora a 4°. El ensayo enzimático se efectuó como se describe en la sección 2.5., tomando 0,1 mL de cada fracción eluída del gel y determinando el Pi liberado por el método colorimétrico de Fiske-SubbaRow (1925).

2.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

La electroforesis en condiciones desnaturalantes se realizó de acuerdo a Laemmli (1970). La muestra (apirasa, calmodulina o fracción activadora de apirasa) se incubó a 100° por un minuto y medio en proporción 1:2 (v/v) con amortiguador Tris-HCl 62,5 mM, conteniendo SDS 3%, 2-mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,02%. Estas muestras así tratadas fueron aplicadas en geles cilíndricos de 0,6 cm de diámetro interno y 10 cm de largo que contenían un volumen de 2,7 mL de acrilamida al 10%, bis-acrilamida al 0,27%, TEMED al 0,05% (v/v), SDS al 0,2% y persulfato de amonio al 0,04%.

El amortiguador de la electroforesis fue Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM y SDS al 0,1% a pH 8,3. La electroforesis se realizó a 8 mA por tubo hasta que el indicador electroforético, azul de bromofenol, llegó hasta el fondo del tubo. El polo positivo estaba en la cámara inferior. Durante la corrida la temperatura se mantuvo entre 8 y 12° mediante una doble cámara refrigerada por agua corriente.

El proceso de tinción y desteñido se efectuó de acuerdo a la metodología descrita en el Catálogo LKB (1980). Los geles se fijaron y tiñeron al mismo tiempo con ácido acético 5% (v/v), etanol 50% (v/v) y azul de Coomassie R 0,125% durante 16 h a

temperatura ambiente. El desteñido se hizo por difusión, cambiando cada 2 h las siguientes soluciones: a) etanol 40% (v/v) y ácido acético 3% (v/v); b) etanol 30% (v/v) y ácido acético 3,5%; esta solución se uso por dos veces consecutivas; c) etanol 20% (v/v) y ácido acético 4% (v/v). Cuando fue necesario se dejó toda la noche en ácido acético 3,5% (v/v) y finalmente en ácido acético 3,5% (v/v) y etanol 5% (v/v).

Se utilizó también la electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturantes para determinar la masa molecular de la calmodulina.

Del gráfico del logaritmo de las masas moleculares en función de la migración electroforética relativa se determinó la masa molecular según Weber y Osborn (1969)

2.4.3. Electroenfoque en geles de poli(acrilamida)

Los geles para electroenfoque fueron preparados de acuerdo con la técnica descrita por Pearce y col., (1972). Los anfolitos usados fueron de rangos de pH entre 3,5 y 10; 7 y 10; y 5 y 9, dependiendo del pI de la proteína en estudio. Los geles se prepararon en tubos de vidrio de 0,6 cm de diámetro interno y 10 cm de largo. El gel se preparó en acrilamida al 10%, bis-acrilamida al 0,15%, conteniendo TEMED al 0,088% (v/v), riboflavina al 0,0001% y anfolitos de uno de los rangos de pH antes mencionados al 1%. Se agregaron 2,7 mL de esta mezcla por tubo. La muestra (apirasa, calmodulina o fracción

activadora de apirasa) se aplicó en sacarosa al 20% en un volumen máximo de 300 μ L. Sobre la muestra se adicionaron 50 μ L de sacarosa al 10% en NaCl 50 mM. En general todas las muestras proteicas se dializaron contra NaCl 100 mM antes de aplicarlas a los geles de electroenfoque pues generalmnte provenían de soluciones de fuerzas iónicas muy altas, las que al tener que adicionarse en volúmenes superiores a 20 μ L producían una alteración del gradiente de pH.

Cuando se trabajó con las distintas apirasas se modificó la posición de los polos descrita en la ref. de Pearce y col. (1972). Colocando en la cámara superior NaOH 20 mM (polo negativo) y en la camara inferior H_2SO_4 0,2% (v/v) se consiguió mayor linealidad en los perfiles de pH en la zona entre pH 6 y 9, que era el rango de los pI de estas isoenzimas. En cambio en el electroenfoque de las muestras de calmodulina y de la fracción activadora de la apirasa, se ubicó el polo positivo arriba, igual que lo descrito por Pearce, puesto que estas fracciones proteicas presentaron valores de pI menores que 7.

La temperatura de corrida fue constante, 12°, obtenida por flujo de agua corriente, igual como se describió en la sección 2.4.2. Durante la corrida se aplicó un voltaje constante de 300 V y se demoró alrededor de 100 min en alcanzarse una corriente constante.

Terminado el proceso de electroenfoque se midió el pH de los geles cada 0,5 cm por medio de un electrodo de superficie

Broadley-James Corp. (U.S.A.). La tinción de proteínas se realizó fijando por una hora los geles en ácido sulfosalicílico 3,46% y ácido tricloroacético 11,5% (v/v) (Winter y Andersson, 1977). Luego se colocaron los geles ya fijados en etanol 25% (v/v) y ácido acético 8% (v/v) por media hora y finalmente se tiñeron por 15 min a 60° con una solución de azul de Coomassie 0,115% en etanol 25% (v/v) y ácido acético 8% (v/v).

En los experimentos de electroenfoque de las distintas isoapirinasas se determinó también la actividad enzimática eluyendo la enzima de la misma manera descrita en la electroforesis a pH 4,5 (sección 2.4.1.) excepto que el Pi liberado del sustrato se cuantificó por el método de Ernster (sección 2.5.).

2.5. Ensayo enzimático de la apirasa

La actividad ATPásica y ADPásica de la apirasa se siguió midiendo el Pi liberado por la hidrólisis enzimática de los sustratos ATP o ADP. El Pi se cuantificó por el método de Fiske y SubbaRow (1925) o el de Ernster y col. (1950) según la sensibilidad requerida. El método de Ernster y col. se usó con la siguiente modificación: el complejo fosfomolíbdico se extrajo con 3 mL de isobutanol-benceno, en vez de 5 mL, y se tomaron posteriormente alícuotas de 2 mL de esta capa para llevarlas finalmente a un volumen total de 5 mL con el SnCl_2 y alcohol-ácido.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 mL: ATP o ADP 2,0 mM; CaCl 5 mM y amortiguador succinato de sodio 100 mM pH 6,0. La temperatura de incubación fue de 30° y en cuanto al tiempo de incubación y dilución de la enzima en BSA (0,2 mg/mL) variaron según la actividad de la fracción enzimática a ensayar. Se lograron condiciones de velocidad inicial hasta una liberación de Pi máxima de 0,5 μ moles totales. La reacción enzimática se detuvo agregando molibdato de amonio en medio ácido, que era a su vez uno de los reactivos necesarios para el desarrollo de color del Pi en ambos métodos colorimétricos mencionados.

Una unidad enzimática (U) definida en Katal, es la cantidad de enzima que cataliza la formación de un mol de Pi a partir de ATP o ADP por s a 30° en las condiciones del ensayo.

2.6. Purificación de la apirasa

Las apirasas fueron obtenidas a partir de tubérculos de tres variedades de S. tuberosum, Desirée, Pimpernel y Ultimus. Para todas las apirasas se aplicó la misma ruta de purificación.

2.6.1. Preparación del extracto de tubérculo de S. tuberosum y fraccionamiento con sulfato de amonio

Cada kilo de tubérculo se homogeneizó con 2 L de una solución de ácido tioglicólico 20 mM a pH 4,0. Se usó ácido

tioglicólico para impedir la acción de la tirosinasa (Valenzuela y col., 1973). La homogeneización se efectuó en una juguera Waring Blendor por 30 s en cada una de las posiciones de velocidad baja, media y alta. El homogeneizado se centrifugó a 1300 rpm en una centrífuga de canasto de acero inoxidable (Centrífuga Broadbent type 86, U.K.) por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante así obtenido se denominó extracto. Antes de cada precipitación con sulfato de amonio, este extracto y cada una de las fracciones proteicas A y B que se obtuvieron posteriormente, se ajustaron a pH 4,0 y a una concentración de proteínas de 10 mg/mL, determinadas por el método de Warburg y Christian (1941). La apirasa precipita en la fracción 40-70 de saturación con sulfato de amonio. Al extracto se le agregó sulfato de amonio sólido hasta una saturación de 40% con agitación constante y a 4°. Después de equilibrar por una hora, se dejó decantar el precipitado en columnas de vidrio de 10,5 x 110 cm, durante 16 h en cámara fría a 4°. El precipitado decantado se extrajo de las columnas, se centrifugó a 14.700 x g durante 20 min a 4° y el sobrenadante se juntó con el correspondiente sobrenadante obtenido posteriormente de las columnas de decantación. A este sobrenadante se le agregó sulfato de amonio hasta alcanzar un 70% de saturación. Esta fracción 40-70 se separó por centrifugación a 14.700 x g durante 20 min a 4°. Esta fracción se denominó fracción A, la que se resuspendió en la misma solución de extracción. Este procedimiento de

precipitación con sulfato de amonio se repitió dos veces consecutivas más, obteniéndose así las fracciones B y C respectivamente. Las únicas diferencias con las precipitaciones recién descritas fueron que el precipitado 0-40% se separó también por centrifugación en las mismas condiciones anteriores y que la fracción C se redisolvió en el amortiguador de equilibrio de la columna de Sephadex G-100 (sección 2.6.2.).

2.6.2. Cromatografía en Sephadex G-100

La fracción C, proveniente de aproximadamente 35 kg de tubérculo, se sometió a filtración en columnas de Sephadex G-100 (malla 40/120) de 2,95 cm de diámetro interior y 140 cm de largo. La columna fue equilibrada en la cámara fría a 8° con amortiguador succinato de sodio 50 mM pH 4,0, NaCl 300 mM y ácido tioglicólico 20 mM. Se eluyó la muestra con un flujo de 30 mL/h. El perfil de proteínas se siguió por la absorbancia a 280 nm y la actividad apirásica como se describe en la sección 2.5., detectándose el Pi por el método de Fiske y SubbaRow. El eluido seleccionado se concentró por ultrafiltración en Amicon a través de una membrana PM 10 con una presión de nitrógeno de 40 psi.

2.6.3. Cromatografía en azul de Cibacron-Sepharose

La última etapa de purificación utilizada para la

apirasa fue una cromatografía a través de azul de Cibacron-Sepharose en analogía con la preparación de una gran variedad de quinasas y deshidrogenasas (Thompson y col., 1975).

2.6.3.1. Inmovilización del colorante azul de Cibacron en Sepharose

La conjugación del colorante azul de Cibacron F3G-A a Sepharose se efectuó de acuerdo a Travis y col. (1976). Como el acoplamiento hay que realizarlo calentando a 80° el gel según ha sido descrito por Böhme y col. (1972), se utilizó Sepharose entrecruzada (Sepharose CL) por sus mejores propiedades de estabilidad química y térmica (Porath y col., 1971). Además la Sepharose entrecruzada es excepcionalmente resistente a la degradación biológica aunque haya desarrollo microbiano en suspensiones acuosas. La preparación de azul de Cibacron-Sepharose CL-4B a partir de Sepharose 4B se comenzó entrecruzándola por medio de epiclorhidrina y posteriormente se inmovilizó el colorante a esta matriz de polidextrano. Se mezclaron 500 mL de Sepharose 4B con igual volumen de NaOH 1 M y con 2,5 g de NaBH_4 . A esta mezcla que se estaba agitando en forma suave se le agregaron 10 mL de epiclorhidrina al 97% y se calentó a 60° por una hora. El gel entrecruzado se lavó luego exhaustivamente con agua caliente hasta que el agua de lavado alcanzara la neutralidad.

Un volumen de 250 mL de Sepharose entrecruzada diluída en igual volumen de agua, se calentó a 60° y se le adicionó gota a gota el colorante disuelto en agua (250 mg en 25 mL de agua) con agitación energética; después de 15 min se agregaron 25 mL de NaCl. Luego se aumentó la temperatura a 80° , se adicionaron 5 g de Na_2CO_3 y después de 30 min el gel se lavó con agua caliente, seguido por Tris-HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo NaCl 50 mM hasta desaparición de absorbancia a 610 nm (máximo de absorción del azul de Cibacron, ϵ , de $8.227 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, determinado en el laboratorio).

La cantidad de colorante inmovilizado se midió espectrofotométricamente a 610 nm solubilizando previamente la matriz incubándola a 100° por 15 min con HCl 100 mM (Easterday y Easterday, 1974). Luego de neutralizar con NaOH 1 M, se concentró por ultrafiltración en Amicon a través de una membrana PM 30, con una presión de nitrógeno de 40 psi. El polímero solubilizado se lavó repetidas veces sobre esta misma membrana con agua destilada hasta que el filtrado salió incoloro. Se determinó la unión de 25 μmoles de azul de Cibacron por mL de Sepharose CL-4B, considerando que el colorante era homogéneo con una masa molecular de 748,7 y con el mismo coeficiente de extinción molar antes mencionado de $8.227 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 610 nm.

2.6.3.2. Determinación de la K_i del azul de Cibacron-Sepharose para la apirasa

La determinación de la K_i para el azul de Cibacron unido a Sepharose CL-4B previamente solubilizado, se realizó midiendo la actividad ATPásica de la apirasa Desirée en las mismas condiciones utilizadas en la determinación de los parámetros cinéticos (sección 2.7). El colorante unido a la matriz de polidextrano no interfirió con el método de Ernster utilizado para la determinación del Pi liberado, puesto que no era extraído por el solvente isobutanol-benceno. El azul de Cibacron-Sepharose fue utilizado en un rango de concentraciones entre 0,024 a 0,074 mM. La K_i se obtuvo en forma gráfica según Dixon (Dixon y Webb, 1979).

2.6.3.3. Columna cromatográfica de azul de Cibacron

La fracción enzimática concentrada proveniente de la columna de filtración Sephadex G-100, se sometió a una cromatografía a través de una columna de azul de Cibacron-Sepharose CL-4B (1,5 x 65 cm) diluída 1:1 con Sepharose CL-4B con el objeto de disminuir la capacidad ligante del colorante por la proteína y permitir así una mejor distribución de la enzima en la columna (Comunicación personal del Dr. Ian P. Trayer, Universidad de Birmingham, Inglaterra). La cromatografía se efectuó en cámara fría a 8°. La capacidad

de esta columna de aproximadamente 110 mL de volumen fue cerca de 600 μ kat de actividad ATPásica. El amortiguador de equilibrio de esta columna contenía succinato de sodio 50 mM pH 6,0. Antes de cargar la enzima a la columna, se diluyó entre 4 a 6 veces con agua destilada para disminuir la fuerza iónica. La muestra retenida en la columna se lavó con el amortiguador de equilibrio hasta que la absorbancia a 280 nm del eluído bajara a 0,005. La actividad enzimática se eluyó con un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 3 M (aproximadamente 300 mL de cada uno). El flujo de la columna fue de 10 mL/h. El máximo de la actividad apirásica se centra aproximadamente en 1,0 M de NaCl. Las fracciones eluídas que presentaban actividad enzimática se concentraron por el método de ultrafiltración por Amicon ya mencionado en la cromatografía en Sephadex G-100 (sección 2.6.2.).

2.7. Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_m

Los estudios para determinar los valores de K_m y V_m de ATP, ADP y Ca^{2+} se hicieron midiendo el P_i liberado por el método de Ernster descrito en la sección 2.5. Los ensayos enzimáticos se realizaron a 30° en amortiguador MES 100 mM pH 6,0 durante un período en el cual la aparición de producto fue lineal en el tiempo en todo el rango de concentraciones de cada uno de los sustratos variables. Cuando el sustrato variable fue ATP (entre 0,025 y 0,1 mM) o ADP (entre 0,025 y

0,3 mM) la concentración del ión calcio se mantuvo constante en 5 mM. Se determinaron los valores de K_m y V_m de ATP y ADP tanto de la apirasa proveniente de S. tuberosum var. Pimpernel como la de var. Desirée. Por otra parte se determinaron los parámetros cinéticos de Ca^{2+} de la isoenzima proveniente de var. Desirée, puesto que ya se tenían los correspondientes a la enzima Pimpernel (Donoso, 1975). Por la dificultad de descontaminar el medio de ensayo de metales bivalentes, se pudo determinar solo los parámetros cinéticos de Ca^{2+} utilizando ADP como sustrato fijo (2,0 mM). La concentración de Ca^{2+} varió entre 0,025 y 0,3 mM. En este caso además de descontaminar todos los reactivos empleados para el ensayo enzimático, amortiguador MES, ADP y BSA (necesaria para diluir la enzima) por tratamiento con la resina quelante Chelex-100, se agregó EDTA 0,065 mM para reducir al máximo la actividad ADPásica basal en ausencia de metal agregado. Por espectrofotometría de absorción atómica se verificó que la concentración remanente de Ca^{2+} era menor de 3 ppm (70 μM de Ca^{2+}); por su parte la concentración presente de Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} era menor de 0,1 ppm.

El análisis de los resultados cinéticos se hizo a través de métodos gráficos, empleando las transformaciones lineales de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934) o la de Hanes-Woolf (Hanes, 1932). Las curvas se ajustaron a los valores experimentales por medio del método de regresión lineal y de allí se estimaron los valores de los parámetros

cinéticos.

2.8. Determinación de la constante de asociación Ca-ADP a pH 6,0

Para la determinación de la constante de asociación Ca-ADP se utilizaron dos métodos: a) mediante filtración en columna de Sephadex G-10 y b) por titulación directa del Ca^{2+} liberado mediante un electrodo selectivo para ión calcio (F2112Ca, Radiometer).

2.8.1. Filtración en columna de Sephadex G-10

Se siguió la técnica descrita por Hummel y Deyer (1962). Se equilibró una columna de Sephadex G-10 (1,5 x 46 cm) con amortiguador MES 100 mM, CaCl_2 0,125 mM y se aplicaron 1,78 μmoles de ADP. La concentración de calcio total en cada fracción eluída se siguió por espectrofotometría de absorción atómica y el ADP total por absorbancia a 259 nm (ϵ 15.700 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, según Hulbert, 1957).

Para el cálculo de la constante de asociación se aplicó la ecuación 3.

$$K_{as} = \frac{(\text{Ca-ADP})}{(\text{ADP})_{\text{libre}} (\text{Ca}^{2+})_{\text{libre}}} \quad (\text{Ec. 3})$$

La concentración de calcio libre correspondió al valor de Ca^{2+} basal en que se equilibró la columna de Sephadex. La concentración de Ca-ADP se calculó por diferencia entre el Ca total encontrado en las fracciones eluídas que presentaron absorbancia a 259 nm y el Ca basal; y finalmente el ADP libre se determinó restándole a la cantidad de ADP total la cantidad de Ca-ADP encontrada en cada punto.

2.8.2. Titulación con electrodo selectivo para Ca^{2+}

La calibración del electrodo de Ca^{2+} se efectuó en presencia de MES (llevado a pH 6,0 con NaOH) para descontar la interferencia del Na^+ y el efecto de fuerza iónica. Para la calibración se utilizaron 4 mL de una solución amortiguadora de MES 100 mM pH 6,0 que contenía BSA 0,01 mg/mL. Ambos reactivos fueron tratados previamente con Chelex-100. A esta solución se le fueron adicionando alícuotas crecientes de una solución de Ca^{2+} 100 mM (estándar S3606/10 de Radiometer) y se fueron siguiendo los cambios en mV en un medidor de pH Radiometer PM 62. En los cálculos se consideró la contaminación inicial de Ca^{2+} , aproximadamente 65 μM , determinada por espectrofotometría de absorción atómica. Los datos obtenidos se graficaron como mV en función del pCa. La constante de asociación Ca-ADP se determinó titulando posteriormente con Ca^{2+} en presencia de ADP 2,0 mM (también

tratado con Chelex-100). Los datos experimentales mostraron un desplazamiento hacia la izquierda en el gráfico mV en función del pCa. La constante de asociación se calculó de acuerdo a la ecuación 3.

La concentración de Ca-ADP se calculó en cada punto por diferencia con la curva estándar en ausencia de ADP, es decir Ca^{2+} total agregado menos el Ca^{2+} libre en presencia de ADP obtenido directamente de la lectura del electrodo selectivo de calcio. El ADP libre era igual al ADP total agregado menos el ADP unido a calcio.

2.9. Efecto de cationes bivalentes sobre la actividad apirásica

Se tomaron las mismas precauciones de tratamiento con la resina quelante Chelex-100 para evitar la contaminación con otros metales bivalentes. Las actividades ATPásica y ADPásica de ambas isoapirasas se ensayaron en amortiguador MES 100 mM pH 6,0. Los metales ensayados aparte de Ca^{2+} fueron Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ni^{2+} , y Cu^{2+} a una concentración final de 2 mM. Todos se agregaron en forma de cloruro. El Pi liberado se determinó por el método de Ernster (1941) por la interferencia que producían en el método de Fiske y SubbaRow algunas de las sales coloreadas que se utilizaron. Para reducir al máximo la actividad enzimática basal (en ausencia de metal agregado) de la apirasa Desirée hubo que adicionar EDTA (50 mM).

2.10. Interacción de Cr(III)-ATP con la apirasa

El complejo de coordinación estable Cr(III)-ATP se sintetizó y posteriormente se purificó en el laboratorio de acuerdo a la técnica descrita por De Pamphilis y Cleland (1973).

2.10.1. Síntesis, purificación y cuantificación de Cr(III)-ATP

Se mezcló en un volumen final de 50 mL, ATP 50 mM y $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 25 mM a pH 3,0. Esta solución se mantuvo a 80° por 12 min, después de los cuales se enfrió rápidamente a 4° . El Cr(III)-ATP se purificó y concentró por absorción en una columna de Dowex 50W-X8 (H), de malla 100-200 (1,5 x 18 cm). La columna se lavó con suficiente agua para eliminar los nucleótidos que no reaccionaron. Después se eluyó el Cr(III)-ATP con un gradiente de HClO_4 compuesta de 300 mL de HClO_4 2 M y 300 mL de agua. En cada una de las fracciones eluidas de la columna se determinó la presencia y cantidad de Cr(III)-ATP midiendo las concentraciones totales de Cr, Pi y adenina.

La cuantificación de Cr se efectuó según Postmus y King, 1955. El método se basa en la conversión del Cr^{3+} en Cr^{5+} (cromato) por oxidación con H_2O_2 1,5% v/v en NaOH 0,5 M, calentando a 100° por 4 min y enfriando posteriormente con agua a 4° . El cromato producido se cuantificó

espectrofotométricamente a 375 nm (ϵ 4.815). La concentración de ATP se cuantificó por la absorbancia a 259 nm y el contenido de fósforo total (Pt) se determinó según Ames y Dublin (1960). Para la determinación del Pt se calcinó la muestra agregando $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ al 10% en etanol, después de enfriar se procedió a hidrolizar los pirofosfatos inorgánicos formados por la calcinación, calentando a 100° por 15 min con HCl 1 M. Finalmente el Pi se determinó por el método de Fiske y SubbaRow (1925).

El HClO_4 proveniente de la columna se eliminó agregando KHCO_3 sólido hasta alcanzar un pH 3,0. Luego de dejar equilibrar por 1 h a 4° se filtró a fin de descartar el KClO_4 insoluble. La solución de $\text{Cr}(\text{III})$ -ATP se conservó a -20° .

En la fig. 1 se muestra la purificación del complejo $\text{Cr}(\text{III})$ -ATP a través de la columna de Dowex 50W-X8 (H^+). Se seleccionaron las fracciones que presentaron una relación de adenina:Pt:Cr de 1:3:1 porque correspondían al valor teórico del complejo de cromo. Este complejo se obtuvo con un 50% de rendimiento, valor similar al descrito en la literatura (DePamphilis y Cleland, 1973).

2.10.2. Identificación y pureza del $\text{Cr}(\text{III})$ -ATP

Se utilizaron diversos criterios para identificar y establecer la pureza del $\text{Cr}(\text{III})$ -ATP.

a) Cromatografía en papel: Se aplicaron entre 50 a 80 nmoles

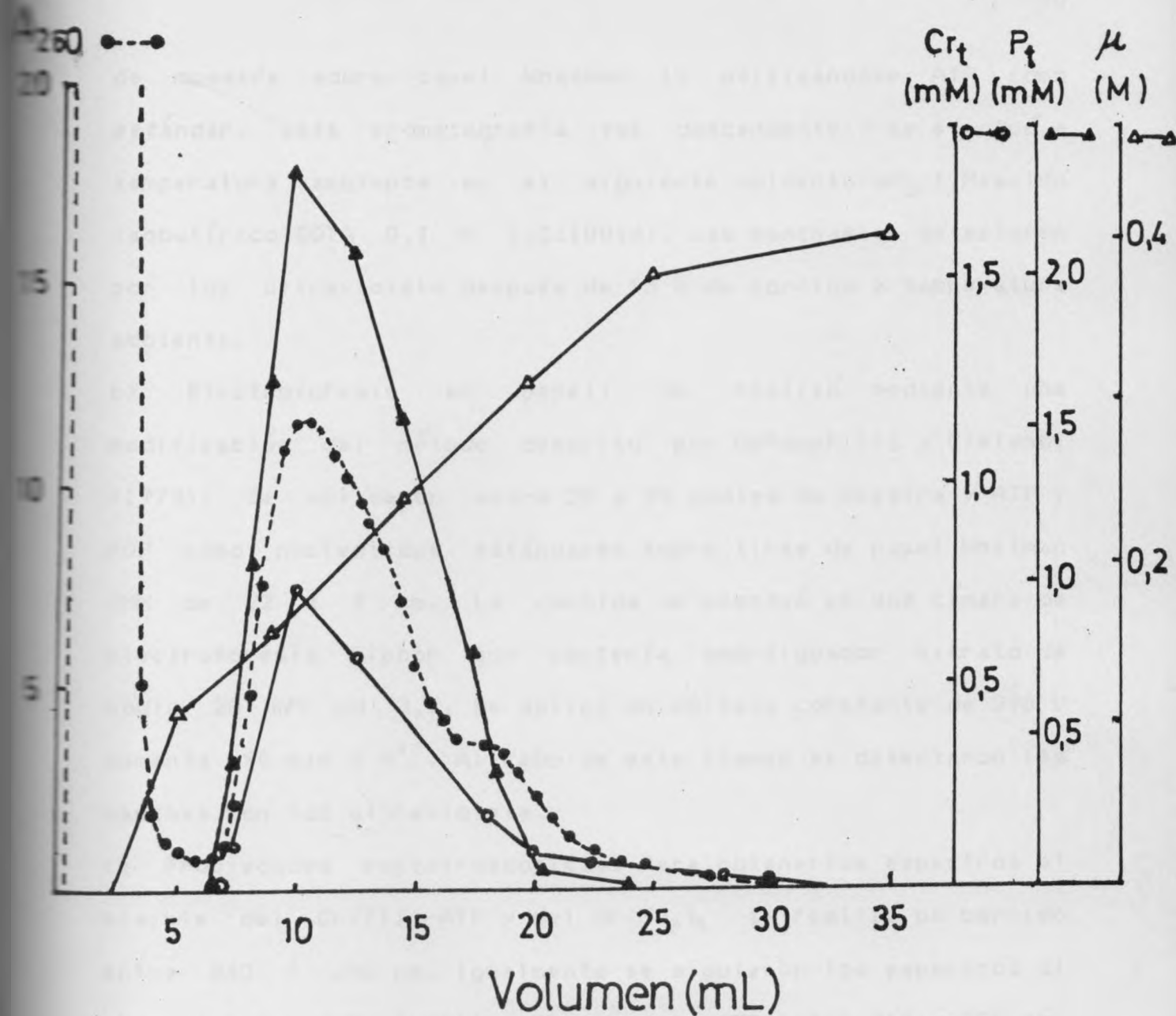


Fig. 1: Purificación de Cr(III)-ATP.

La mezcla de reacción proveniente de la incubación a pH 3,0, 80° por 12 min de ATP 50 mM y Cr (NO₃)₃ 25 mM, fue absorbida en una columna (1,5 x 18 cm) de Dowex 50-x8 (H⁺), malla 100-200 equilibrada con agua. El Cr(III)-ATP se eluyó por medio de un gradiente de HClO₄. En las fracciones eluidas se les determinó la presencia de: adenina por absorción a 260 nm; de fósforo total (P_t) por el método de Ames y Dublin y posteriormente Fiske y SubbRow; de cromo total (Cr_t) cuantificada es pectrofotométricamente a 375 nm por su conversión a cromato.

de muestra sobre papel Whatman 1, utilizándose ATP como estándar. Esta cromatografía fue descendente y se efectuó a temperatura ambiente en el siguiente solvente NH_3 1 M:ácido isobutírico:EDTA 0,1 M (60:100:6). Las manchas se detectaron por luz ultravioleta después de 15 h de corrida a temperatura ambiente.

b) Electroforesis en papel: Se realizó mediante una modificación del método descrito por DePamphilis y Cleland, (1973). Se aplicaron entre 50 a 80 nmoles de muestra y ATP y ADP como nucleótidos estándares sobre tiras de papel Whatman 3MM de 32 x 9 cm. La corrida se efectuó en una cámara de electroforesis Elphor que contenía amortiguador citrato de sodio 25 mM pH 3,6. Se aplicó un voltaje constante de 290 V durante 90 min a 4°. Al cabo de este tiempo se detectaron las manchas con luz ultravioleta.

c) Propiedades espectroscópicas: Para obtenerlos espectros al visible del Cr(III)-ATP y del $\text{Cr(NO}_3)_3$ se realizó un barrido entre 340 y 650 nm. Igualmente se siguieron los espectros al ultravioleta del Cr(III)-ATP y del ATP entre 210 y 330 nm. Todas estas determinaciones se efectuaron en amortiguador succinato 50 mM pH 6,0.

Se corroboró que el compuesto salido de la columna de Dowex seleccionado por criterios químicos, era el complejo Cr(III)-ATP porque cumplía además con las características descritas por estos criterios físicos (UV-VIS, electroforesis y cromatografía). Esto permitió también controlar el estado de

pureza del complejo.

El espectro de absorción en la zona UV con un máximo a 259 nm no presentó cambios significativos con respecto al del ATP (fig. 2A). En el espectro de la zona del visible del Cr(III)-ATP que se aprecia en la fig. 2B, se encontraron dos máximos, uno a 430 y otro a 650 nm respectivamente, en cambio los máximos del nitrato de cromo (sal de la cual se partió) fueron 415 y 575 nm. Estos resultados espectrales son coincidentes con los descritos en la literatura por DePamphilis y Cleland (1973).

Como no se dispuso de un estándar de Cr(III)-ATP para la cromatografía y electroforesis en papel, en ambos casos se aplicaron ATP y ADP como referencias. La cromatografía descendente de Cr(III)-ATP en ácido isobutírico-NH₃-EDTA mostró la presencia de una sola mancha que se observó mediante luz ultravioleta. Los valores de R_f encontrados se presentan en la tabla 1 donde se puede observar también la coincidencia con los datos de la literatura. La movilidad electroforética del complejo de Cr(III) en la electroforesis a pH 3,6 está de acuerdo con la carga neta calculada a ese pH (tabla 1).

Debido a que se usó en este laboratorio una fuente de poder de menor potencia que la empleada en el trabajo de DePamphilis y Cleland, los valores de movilidad electroforética expresados en cm de migración, no son coincidentes; pero si, en cambio lo son los cuocientes entre

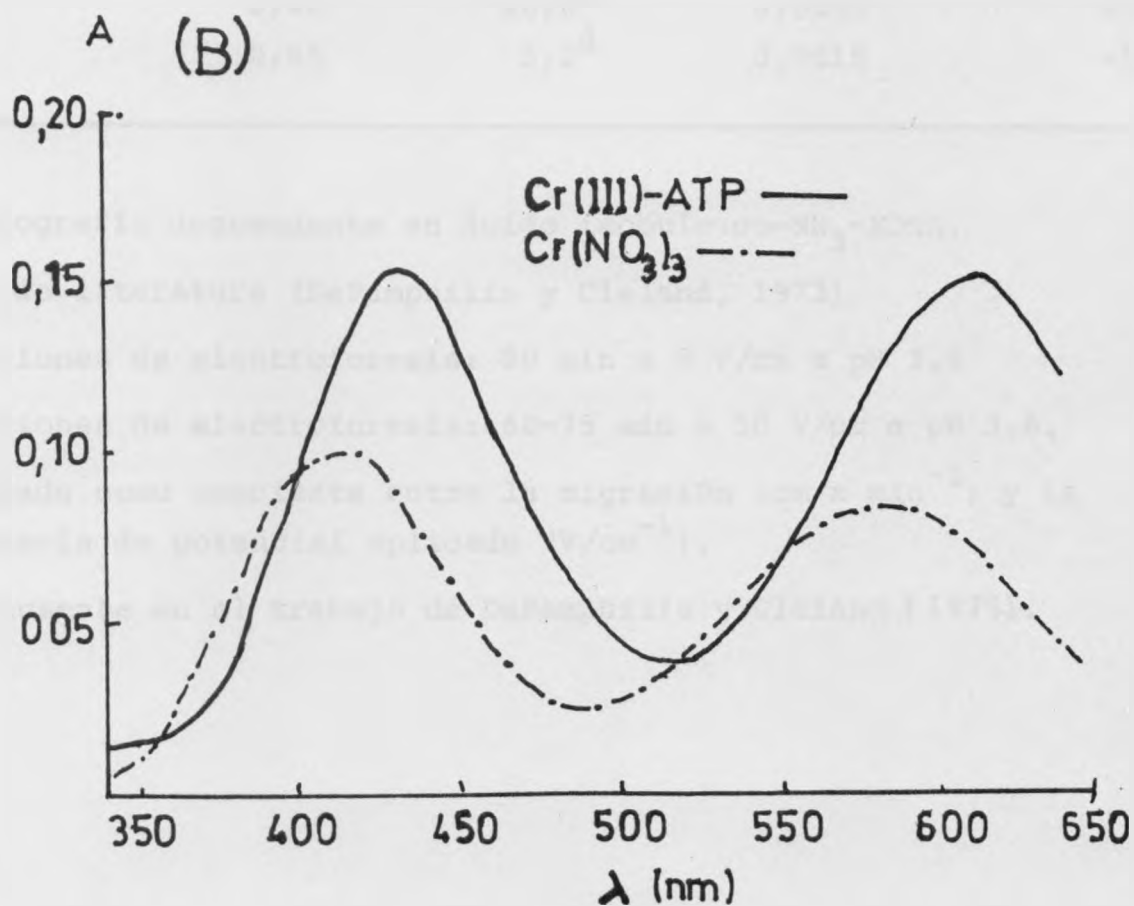
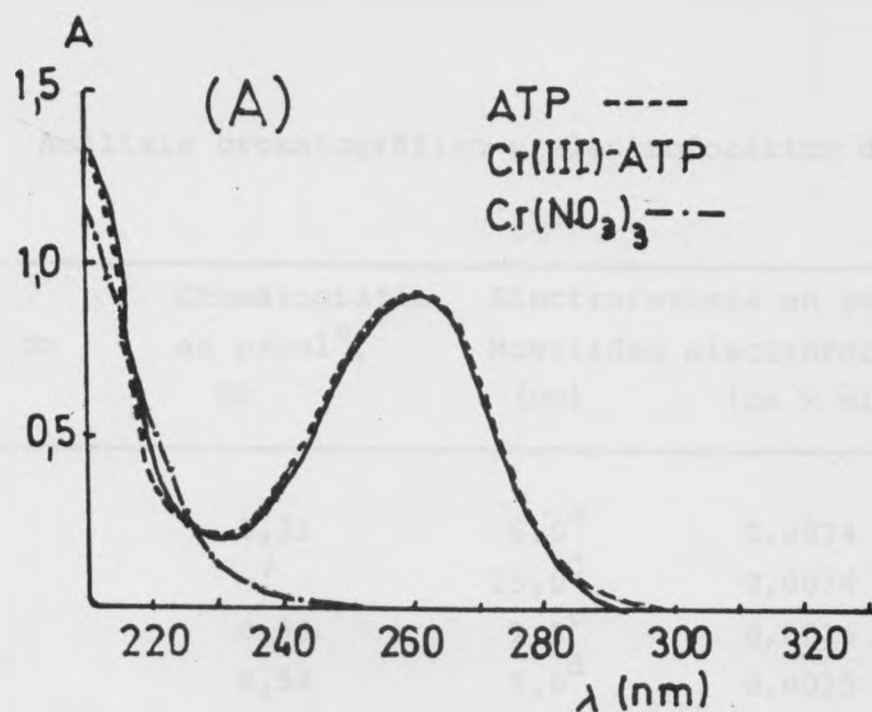


Fig. 2 : Espectros de absorción de Cr(III)-ATP v Cr (NO₃)₃.

(A) : región UV

(B) : región visible.

Los espectros se efectuaron en amortiguador succinato 50 mM pH 6,0.

TABLA 1: Análisis cromatográfico y electroforético de Cr-ATP.

Nucleotido	Cromatografía	Electroforesis en papel		Carga net a pH 3,6 ^b
	en papel ^a . Rf	Movilidad electroforética (cm)	(cm x min ⁻¹) ^e	
ATP	0,31	6,0 ^c	0,0074	-2,25
ATP ^b	- ^f	25,0 ^d	0,0074	-2,25
Cr-ATP	0,53	1,3 ^c	0,0016	-0,47
Cr-ATP ^b	0,54	5,0 ^d	0,0015	-0,47
ADP	0,40	5,2 ^c	0,0064	-0,63
ADP ^b	0,48	20,0 ^d	0,0059	-0,63
AMP ^b	0,65	5,0 ^d	0,0015	-0,47

^aCromatografía descendente en ácido isobutírico-NH₃-EDTA.

^bDatos de literatura (DePamphilis y Cleland, 1973).

^cCondiciones de electroforesis: 90 min a 9 V/cm a pH 3,6

^dCondiciones de electroforesis: 60-75 min a 50 V/cm a pH 3,6.

^eExpresado como cociente entre la migración (cm x min⁻¹) y la diferencia de potencial aplicado (V/cm⁻¹).

^fDato ausente en el trabajo de DePamphilis y Cleland (1975).

la migración electroforética y la diferencia de potencial aplicada.

2.10.3. Cr(III)-ATP como sustrato e inhibidor competitivo de las isoapirinasas

El Cr(III)-ATP se ensayó en primer lugar como sustrato de las apirinasas Desirée y Pimpernel, realizando el ensayo enzimático típico descrito en la sección 2.5. utilizando el Cr(III)-ATP a una concentración final de 0,6 mM en vez de ATP o ADP. Este ensayo se probó tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} .

Se determinó el efecto inhibitorio del Cr(III)-ATP tanto para la actividad ATPásica como para la ADPásica, empleando las mismas condiciones de ensayo descritas en la sección 2.7 (determinación de los parámetros cinéticos de la apirasa). El Cr(III)-ATP se adicionó en concentraciones que fluctuaron entre 0,06 a 0,28 mM.

Los valores de los parámetros cinéticos K_m y V_m se obtuvieron por el gráfico de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk. La constante de inhibición se obtuvo del gráfico secundario de la pendiente en función de la concentración del inhibidor según el método de Dixon (1953).

2.11. Interacción de cationes bivalentes con la apirasa

La apirasa puede unir metales bivalentes en ausencia de

sustrato de acuerdo a los resultados obtenidos por medio de ESR y por la aparición del fenómeno de histéresis en esta enzima.

2.11.1. Espectros de resonancia del espín electrónico del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ en presencia de apirasa Desirée

Los espectros de ESR del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ se registraron en un espectrómetro Varian V-4502; se midió la banda X del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ a temperatura ambiente (Basosi y col., 1976). Para obtener la curva de calibración se utilizó MnSO_4 en un rango entre 0,1 a 10 mM en amortiguador TES 100 mM pH 8,0. Este amortiguador fue previamente tratado con Chelex-100. De acuerdo a Cohn y Townsend (1954), la altura de las señales corresponde a la concentración del ión $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ libre, por lo que se procedió a promediar la altura (amplitud) de las 6 líneas obtenidas para cada concentración de $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ usado. Antes de realizar el espectro del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ en presencia de apirasa Desirée, se trató esta enzima con EDTA 0,1 mM en amortiguador TES 100 mM, el quelante se eliminó posteriormente lavando exhaustivamente con TES 100 mM, concentrando repetidamente a través de membrana de Amicon como se ha descrito anteriormente (sección 2.6.2.). El espectro del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ en presencia de apirasa se efectuó mezclando una solución de $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ con esta enzima, quedando el metal a una concentración final de 0,495 mM y la apirasa 0,46 mM. También se registraron los espectros

resultantes al adicionar además CaCl_2 2,5 y 5,0 mM y EDTA 10 mM.

2.11.2. Fenómeno de histéresis en la apirasa preincubada con iones metálicos bivalentes

Una solución 0,08 mM de apirasa Pimpernel o Desirée se preincubó a 4° separadamente con cada uno de los siguientes metales bivalentes: Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} . La concentración final de cada uno de estos metales fue 0,25 mM en amortiguador MES 100 mM pH 6,0. Después de aproximadamente 1 h se diluyó la enzima con BSA (0,2 mg/mL) y se siguió la cinética de liberación de Pi por el método de Ernster y col. (1950) a partir de ATP y ADP en presencia de Ca^{2+} 5,0 mM en MES 100 mM pH 6,0 y a 30°. Los sustratos se emplearon a concentraciones entre 0,025 y 0,1 mM. La cantidad de Pi se siguió por el método de Ernster y col. (1950). Como control se preincubó la enzima con NaCl 0,75 mM (a fuerza iónica equivalente con respecto a los metales bivalentes) o con Ca^{2+} 0,25 mM más EDTA 10 mM.

2.11.3. Determinación de la masa molecular de la isoenzima Desirée en presencia de Ca^{2+}

Esta determinación se efectuó por filtración en gel

según Andrews (1964). Se equilibró una columna de Sephadex G-100 de 1,4 x 50 cm con CaCl_2 0,25 mM en amortiguador MES 100 mM pH 6,0. Esta columna se calibró con citocromo c (M.M. 12,5 kDa), quimotripsinógeno (M.M. 24,5 kDa), ovalbúmina (M.M. 43,0 kDa) y BSA (M.M. 67,0 kDa). La apirasa se detectó por su actividad ATPásica y ADPásica y las demás proteínas estándares por su absorbancia a 280 nm.

2.12. Determinación del contenido de metales bivalentes en el tubérculo de S. tuberosum var. Désirée

La determinación se realizó por análisis de activación neutrónica en la Comisión Nacional de Energía Nuclear, gracias a la gentileza de los Drs. Claudio Silva y Eduardo Cortés. Como este método determina elementos independientemente de su estado físico o químico, se analizó el contenido total de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} en el tubérculo deshidratado y calcinado. Las muestras (en sextuplicado) de tubérculo pelado se deshidrataron primero a 100° por 24 h y luego se calcinaron en mufla a 450° por 12 h.

El bombardeo neutrónico se efectuó con neutrones térmicos utilizando como fuente de ellos el reactor nuclear RECH-1 de 5 MW de potencia.

2.13. Determinación del contenido de ATP y ADP en el
tubérculo de S. tuberosum var. Désirée

La extracción de los nucleótidos de adenina se realizó según la técnica descrita por Barua y col. (1981).

Alrededor de 5 g de cortes muy delgados de tubérculo pelado se recibieron en 20 mL de HClO_4 2,5 N, previamente enfriado a -10° . La homogeneización se realizó en un Omni-Mixer (4 veces por 15 s a velocidad máxima), manteniendo el vaso sumergido en etanol enfriado a -10° con el propósito de mantener la temperatura del homogeneizado bajo 0° . El homogeneizado, previo arrastre con 5 mL de HClO_4 enfriado a 0° se centrifugó a $27.000 \times g$ por 30 min a 4° . La pella se extrajo nuevamente con otros 5 mL de HClO_4 y después de una nueva centrifugación en las mismas condiciones recién descritas, se juntaron ambos sobrenadantes y se neutralizaron con KOH 8 M. El KClO_4 precipitado se descartó por centrifugación (30 min a $27.000 \times g$ a 4°). El sobrenadante neutralizado se concentró por liofilización. El producto liofilizado se arrastró cuantitativamente con agua destilada y el material que no se solubilizó se separó por centrifugación (30 min a $12.000 \times g$ a 4°). El sobrenadante se mantuvo congelado a -30° hasta la determinación espectrofotométrica del ATP y ADP.

El proceso de extracción de ATP y ADP en el tejido del tubérculo se controló paralelamente agregando a otra alícuota

del mismo homogeneizado de tubérculo, una concentración conocida de ATP y ADP. La recuperación de los nucleótidos fluctuó entre 93 y 108%.

Se confirmó además la inactivación completa de la actividad apirásica que podría alterar los resultados, ensayando tanto el sobrenadante ácido como el neutralizado.

Los nucleótidos se determinaron por métodos enzimáticos de reacciones acopladas (Lamprecht e Ivar, 1974 y Jaw wek y col., 1974).

El medio de ensayo para la cuantificación de ATP, en un volumen final de 1 mL, contenía: amortiguador glicil-glicina 25 mM pH 7,5; $MgCl_2$ 1,0 mM; glucosa 2,0 mM; NADP 0,5 mM; hexoquinasa 2 U y G-6-P-deshidrogenasa 4 U. Se siguió la formación de NADPH a 340 nm (ϵ 6.200 M⁻¹ cm⁻¹).

En la determinación de ADP, el medio de ensayo en un volumen final de 1 mL estaba compuesto de: amortiguador HEPES 50 mM pH 7,5; $MgCl_2$ 1,0 mM; PEP 50 mM; NADH 0,32 mM; piruvato-quinasa 2 U y lactato-deshidrogenasa 7,7 U. Se determinó la desaparición de NADH a 340 nm.

2.14. Ensayo de la calmodulina

La actividad calmodulínica se siguió en base a su capacidad de estimular la actividad de la fosfodiesterasa que cataliza la hidrólisis del AMPc (Wang y Waisman, 1979). Las condiciones del ensayo enzimático fueron las siguientes: AMPc

1,6 mM; amortiguador Tris-HCl 30 mM pH 8,0; CaCl_2 4 mM; MgCl_2 4 mM y 100 μg de fosfodiesterasa de AMPc de corazón de bovino deficiente de activador (0,08 U). Después de 20 min a 30° la reacción se detenía calentando por 2 min a 100°. El AMP producido se midió por un ensayo enzimático acoplado a la desaminación a IMP catalizada por la 5'-adenilato-desaminasa. La desaminación se siguió espectrofotométricamente por el descenso en la absorbancia a 265 nm (ϵ 8.100 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Lee, 1963). Este ensayo acoplado se efectuó agregando 0,38 U de esta desaminasa en amortiguador citrato de sodio 10 mM pH 6,5; luego de 5 min a 25° la reacción estaba completa.

2.15. Purificación de calmodulina de tubérculo de S. tuberosum var. Ultimus

2.15.1. Preparación del extracto, fraccionamiento con sulfato de amonio y tratamiento con calor

Un kilo de tubérculo pelado proveniente de S. tuberosum var. Ultimus se homogeneizó por 3 veces a máxima velocidad (durante 30 s cada vez) en una juguera Waring en 2 L de Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Este homogeneizado se filtró al vacío a través de papel Whatman 4. El filtrado se precipitó con sulfato de amonio hasta una saturación de un 50%. Este corte 0-50 se separó por centrifugación a 17.300 x g por 30 min a 4° luego se resuspendió en 200 mL del mismo amortiguador de

extracción y se sometió a un calentamiento a 100° por 5 min. Después de un rápido enfriamiento, el material insoluble producido por el calentamiento se separó por centrifugación a $17.300 \times g$ durante 30 min a 4° . El sobrenadante fue concentrado por liofilización y resuspendido finalmente en 80 mL de agua destilada. Para el posterior ensayo, una alícuota de esta fracción denominada Fr-50, se dializó contra NaCl 100 mM para disminuir la fuerza iónica que contenía. Esta resultó ser una preparación estable conservada a -30° .

El resto de la muestra se dializó contra Tris-HCl 10 mM pH 7,0 en presencia de CaCl_2 0,5 mM (amortiguador de equilibrio de la columna de trifluoperazina-Sepharose). En los casos que esta fracción proteica no quedó suficientemente clara después de la diálisis, se centrifugó antes de aplicarla a la columna de cromatografía de afinidad.

2.15.2. Cromatografía en trifluoperazina-Sepharose

Esta columna de cromatografía de afinidad para calmodulina se preparó en el Laboratorio, a partir de trifluoperazina y Sepharose 4B.

2.15.2.1. Preparación de trifluoperazina-Sepharose

La trifluoperazina se acopló a la Sepharose usando el método del bisoxirano (Sundberg y Porath, 1974), según la

secuencia descrita por Charbonneau y Cormier (1979). Se lavó la Sepharose 4B con agua destilada y se secó al vacío. Se tomaron 45 g de esta resina seca y se procedió a activarla con una mezcla de 45 mL de NaOH 0,6 N y 135 mg de NaBH_4 a la que se le adicionaron 45 mL de bisoxirano (éter 1,4-butanodiol diglicidílico), este proceso de activación se realizó agitando lentamente durante 8 h a temperatura ambiente.

La etapa del acoplamiento consistió en mezclar la Sepharose activada, previamente lavada con unos 500 mL de agua destilada, con 6,4 mL de amortiguador Na_2CO_3 100 mM pH 11 y 16,2 mg de trifluoperazina. Este acoplamiento se realizó calentando 48 h a 70° con agitación lenta. Desde el proceso de acoplamiento, el polidextrano se mantuvo cubierto con un papel de aluminio por la fotosensibilidad de la trifluoperazina. Finalmente se lavó con 100 mL de acetona y 100 mL de etanol, dejándose resuspendida en agua destilada hasta su posterior utilización.

2.15.2.2. Columna cromatográfica de trifluoperazina-Sepharose

Una alícuota de 15 mL de la Fr-50 dializada contra el amortiguador de equilibrio de la columna de afinidad (Tris-HCl 10 mM pH 7,0; CaCl_2 0,5 mM), se aplicó a una columna de 1,5 x 27 cm de trifluoperazina-Sepharose equilibrada con el mismo amortiguador recién mencionado. La columna se lavó con amortiguador hasta la disminución de la absorbancia a 280 nm a

un valor menor que 0,005. Luego se le agregó NaCl 0,5 M al amortiguador de equilibrio hasta que bajara nuevamente la absorbancia a 280 nm. La calmodulina fue eluída finalmente con un pulso de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EGTA 5 mM. Esta cromatografía se realizó a temperatura ambiente.

Para caracterizar las fracciones obtenidas de esta columna, se empleó el efecto que producían sobre la fosfodiesterasa de AMPc y la apirasa. Las proteínas de las fracciones de esta columna se siguieron por la absorbancia a 280 nm. Las tres fracciones que se encontraron con actividad biológica, se concentraron por liofilización y después de una diálisis contra NaCl 100 mM (para reducir la fuerza iónica) se mantuvieron congeladas a -30° .

2.16. Caracterización de la calmodulina del tubérculo de S.tuberosum var. Ultimus

La fracción purificada, obtenida de la columna de trifluoperazina-Sepharose, activadora de la fosfodiesterasa, se caracterizó en cuanto a:

- a) su masa molecular, por electroforesis en acrilamida en presencia de SDS (ver sección 2.4.2.);
- b) su pI, determinado por electroenfoque según la metodología descrita en la sección 2.4.3.;
- c) su efecto estimulador de la fosfodiesterasa de AMPc en

presencia y ausencia de TFP y EGTA (ver ensayo de calmodulina, sección 2.14.);

d) su efecto sobre apirasa, como se describe en la sección siguiente (2.17.).

2.17. Efecto de distintas fracciones proteicas con actividad reguladora sobre apirasa

Se ensayó el efecto de la calmodulina y de las fracciones denominadas activadora e inhibidora, eluídas de la columna de TFP-Sepharose sobre las actividades ATPásica y ADPásica de la apirasa. El estudio se efectuó preincubando a 0° esta enzima con cada una de estas fracciones proteicas en presencia de NaCl 100 mM. Como control se preincubó la apirasa con BSA a la misma concentración de proteínas que la fracción ensayada. En las fracciones eluídas de la columna se determinó la concentración de proteínas por la absorción a 280 nm; en cambio, en los experimentos realizados posteriormente con las fracciones concentradas se utilizó el método de Lowry y col. (1950). Se tomaron alícuotas de estas mezclas de preincubación y se ensayó la actividad apirásica en las condiciones estándares del ensayo enzimático descritas en la sección 2.5., cuantificando el Pi producido por el método de Fiske y SubbaRow (1925).

2.18. Caracterización de la fracción activadora de apirasa

Se estudió el efecto de esta fracción sobre apirasa de distintas variedades de S. tuberosum y sobre la fosfodiesterasa de AMPc, según los ensayos descritos recientemente, secciones 2.5. y 2.14., respectivamente.

Para apreciar la homogeneidad de esta fracción activadora de apirasa se utilizó tanto la electroforesis en presencia de SDS (sección 2.4.2.) como electroenfoque (sección 2.4.3.).

También se estudió el efecto que producían el EGTA y la trifluoperazina sobre la acción estimuladora de apirasa realizando el ensayo ya mencionado, adicionando a la mezcla de preincubación EGTA y TFP.

RESULTADOS

3.1. Purificación de la apirasa a partir de tubérculo de S. tuberosum var. Pimpernel y var. Desirée

Se describe solo la preparación de las apirasas provenientes de tubérculo de S. tuberosum var Pimpernel y Desirée. Del tubérculo de var. *Ultimus* se han aislado dos formas enzimáticas que presentan diferencias en el pI y en el cociente de hidrólisis ATP/ADP. Estas dos formas enzimáticas solo se utilizaron para los ensayos con la fracción activadora de la apirasa (sección 3.9.).

3.1.1. Ruta de purificación

El esquema de purificación presentado en las tablas 2 y 3, resume las etapas seguidas para el aislamiento de las isoapirasas provenientes del tubérculo de S. tuberosum var. Pimpernel y var. Desirée. Esta ruta de purificación ha resultado ser la más adecuada para obtener preparaciones homogéneas y estables de ambas isoapirasas.

La fig. 3 muestra el perfil de elución de proteínas y actividad apirásica de la isoenzima Desirée en columna de azul de Cibacron-Sepharose, que es la última etapa de purificación. La cromatografía de la isoenzima Pimpernel presentó el mismo

TABLA 2

Purificación de la apirasa de S. tuberosum var. Pimpernel

Fracción	Proteína Total ^a (mg)	Actividad Total (μ kat)		Actividad específica (μ kat x 10 ² /mg)		Rendimiento %		Purificación		ATPasa
		ATPasa	ADPasa	ATPasa	ADPasa	ATPasa	ADPasa	ATPasa	ADPasa	ADPasa
Extracto	36.800	208,3	29,2	0,57	0,08	100	100	1,0	1,0	7,1
Fracción A 60	5.170	86,1	14,5	1,67	0,28	41	50	2,9	3,5	5,9
Fracción B 6	480	63,1	9,7	13,20	2,00	30	33	23,1	25,0	6,5
Fracción C 11.5	120	61,3	7,4	52,00	6,30	29	25	91,2	78,8	8,3
Sephadex G-100	11,4	47,5	4,5	417,00	39,00	23	15	731,6	487,5	10,6
F3G-A-Sepharose	1,9	21,2	1,7	1100,0	87,20	10	6	1930,0	1090,0	12,5

^a Todos los datos están referidos a un kilo de tubérculo pelado.

1110
11.1000
10 ml 2 1:10 → 100

TABLA 3

Purificación de la apirasa de S. tuberosum var. Desirée

Fracción	Proteína Total ^a (mg)	Actividad Total (μkat)		Actividad específica (μkat x 10 ⁻² /mg)		Rendimiento %		Purificación		ATPasa
		ATPasa	ADPasa	ATPasa	ADPasa	ATPasa	ADPasa	ATPasa	ADPasa	ADPasa
Extracto	30.000	67,9	65,7	0,21	0,22	100	100	1,0	1,0	1,0
Fracción A	1.730	64,3	49,9	3,10	2,80	80	76	14,8	12,7	1,2
Fracción B	304	47,5	47,9	15,50	15,80	70	73	73,8	71,8	1,0
Fracción C	120	40,7	38,1	34,00	31,70	60	58	161,9	144,0	1,1
Sephadex G-100	9,5	20,2	19,0	215,00	201,70	30	29	1023,8	916,8	1,1
F3G-A-Sepharose	0,8	8,8	10,3	1110,0	1210,0	13	16	5086,0	5500,0	0,9

^a Todos los datos están referidos a un kilo de tubérculo pelado.

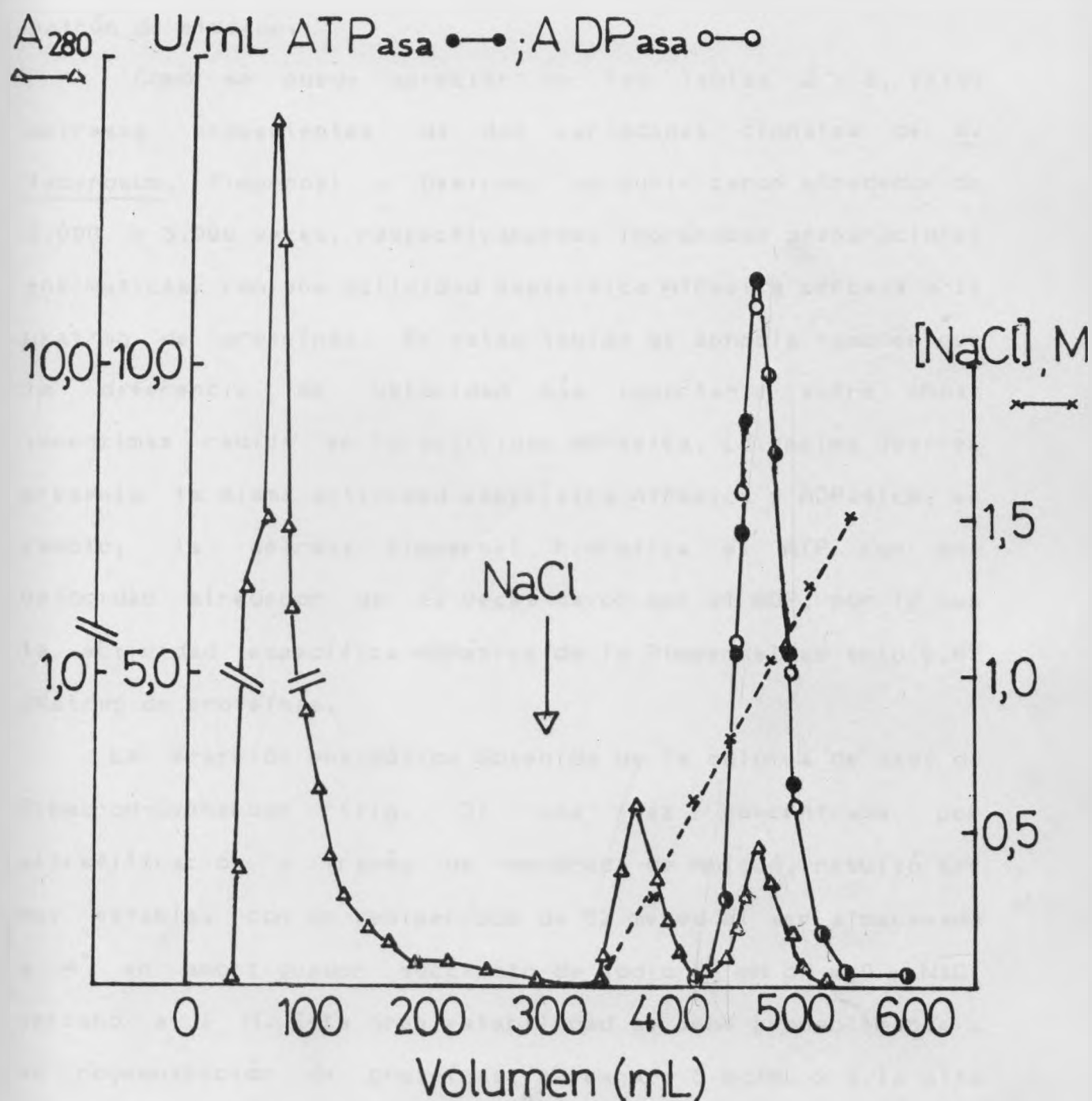


Fig. 3: Purificación de la apirasa Desirée en columna de azul de Cibacrón-Sephadex.

La enzima proveniente de una columna de filtración se aplicó a una columna de azul de Cibacrón-Sephadex CL-4B (1,5 x 65 cm) diluida 1:1 con Sephadex CL-4B, amortiguador de equilibrio succinato de Na 50 mM pH 6,0; a partir de la flecha comenzó la elución con un gradiante salino de NaCl (sección 2.6.3.2.).

La fracción enzimática aplicada contenía:

U Totales (ATPasa) = 30.932 μ kat

U Totales (ADPasa) = 30.641 μ kat

Proteínas totales = 74 mg.

patrón de elución.

Como se puede apreciar en las tablas 2 y 3, estas apirinasas provenientes de dos variedades clonales de S. tuberosum, Pimpernel y Desirée, se purificaron alrededor de 2.000 y 5.000 veces, respectivamente, lográndose preparaciones enzimáticas con una actividad específica ATPásica cercana a 11 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ de proteínas. En estas tablas se aprecia también que la diferencia de velocidad más importante entre ambas isoenzimas radica en la actividad ADPásica. La enzima Desirée presenta la misma actividad específica ATPásica y ADPásica, en cambio, la apirasa Pimpernel hidroliza el ATP con una velocidad alrededor de 12 veces mayor que el ADP, por lo que la actividad específica ADPásica de la Pimpernel es solo 0,87 $\mu\text{kat}/\text{mg}$ de proteínas.

La fracción enzimática obtenida de la columna de azul de Cibacron-Sepharose (fig. 3) una vez concentrada por ultrafiltración a través de membrana de Amicon, resultó ser muy estable, con un semiperíodo de 52 meses al ser almacenada a 4° en amortiguador succinato de sodio 50 mM pH 6,0 y NaCl cercano a 1 M. Esta gran estabilidad se debe probablemente a su concentración de proteínas, cercana a 5 mg/mL y a la alta fuerza iónica presente proveniente del gradiente de NaCl con que eluyó en la última etapa de purificación, entre 0,8 y 1,3 M de NaCl.

3.1.2. Determinación de la K_i del azul de Cibacron-Sepharose para la apirasa

La determinación de este parámetro cinético se efectuó con el colorante azul de Cibacron unido a Sepharose, previa solubilización de esta matriz como se describe en la sección 2.6.3.1.

En el recuadro de la fig. 4 en que se presenta el gráfico de Cornish-Bowden (Cornish-Bowden, 1974) se puede apreciar que el colorante unido covalentemente a Sepharose resultó ser un excelente inhibidor de tipo competitivo de la actividad ATPásica de la enzima Desirée. La K_i se calculó por el método de Dixon (Dixon y Webb, 1979) en que se grafica $1/v$ en función de la concentración del inhibidor (fig. 4). La constante de inhibición se encuentra directamente en el punto de intersección de la serie de líneas obtenidas al determinar la velocidad de la reacción en presencia de distintas concentraciones de sustrato. El valor promedio de K_i del azul de Cibacron fue $20 \pm 4 \mu\text{M}$, que es muy cercano al de la K_m del ATP (véase la sección 3.2.). No se realizaron los experimentos para determinar la K_i para la actividad ADPásica de esta enzima ni tampoco para las actividades hidrolíticas de la apirasa Pimpernel, porque no se consideraron necesarios.

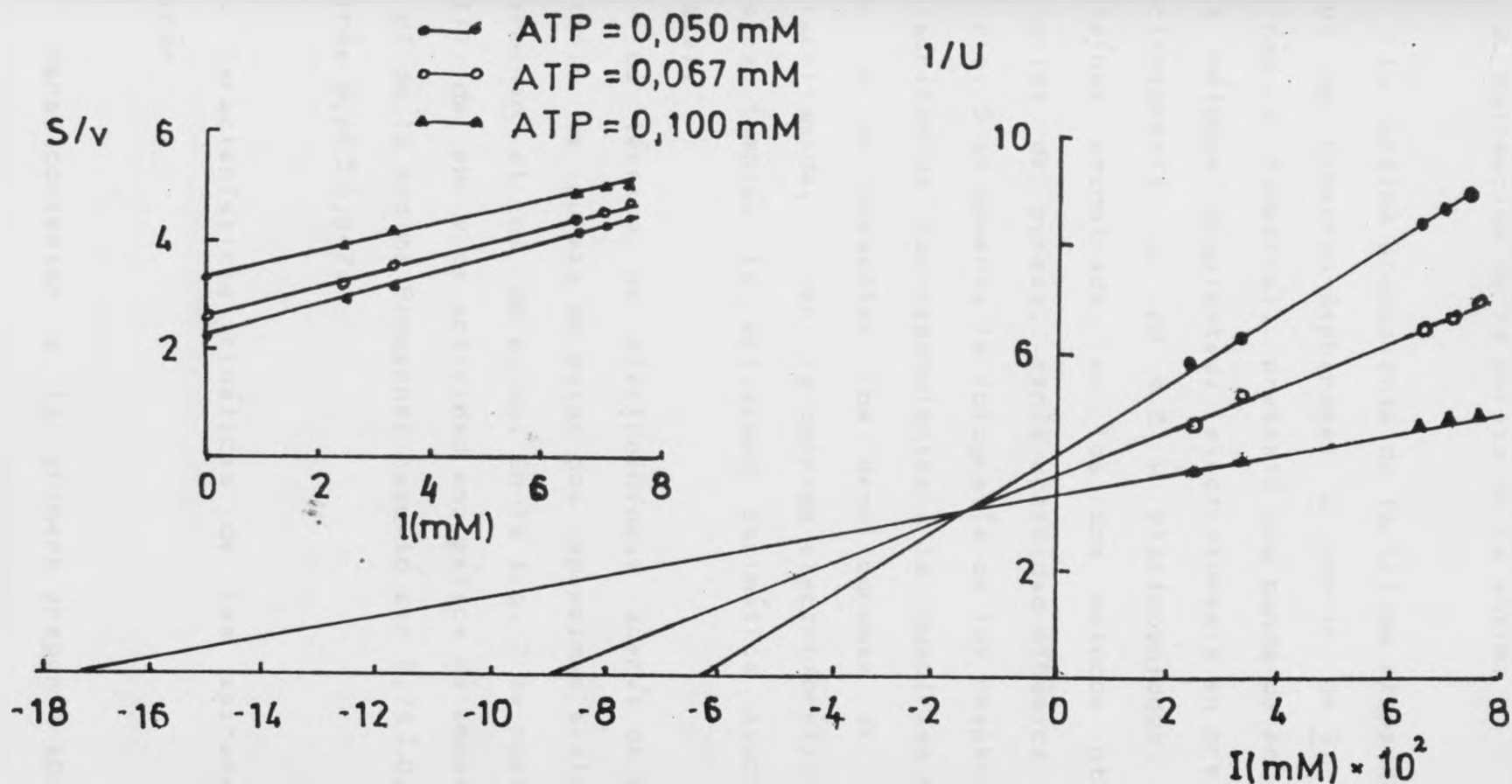


Fig. 4: Determinación de K_i del azul de Cibacrón-Sepharose para la apirasa.

Gráfico de $1/v$ ($1/U$) en función de la concentración de azul de Cibacrón-Sepharose (I). El medio de reacción contenía amortiguador MES 100 mM pH 6,0, CaCl_2 5 mM. Se utilizaron tres concentraciones diferentes de ATP.

En el recuadro se presenta el gráfico de S/v en función de I (Cornish Bowden, 1973).

3.1.3. Estimación de la pureza de la enzima

La enzima proveniente de la última etapa de purificación (azul de Cibacron-Sepharose) a partir de S. tuberosum var. Desirée o Pimpernel, presentó una banda de proteínas por los tres métodos siguientes: electroforesis en presencia de SDS, electroforesis a pH 4,5 y electroenfoque. La banda de proteínas encontrada, en los dos métodos utilizados como criterios de pureza, tenía actividad ATPásica y ADPásica. En la fig. 5 se observa la fotografía de los respectivos geles de poliacrilamida correspondientes a la isoapirasa Desirée. En la fig. 6 se presentan los densitogramas de los geles de poliacrilamida, y en la corrida electroforética a pH 4,5, se muestra también la actividad enzimática asociada (ATPasa, ADPasa).

La técnica de electroenfoque además de servir como un criterio de pureza de estas dos isoenzimas aisladas, permitió determinar el pI de ellas. En la fig. 7 se puede apreciar el perfil de pH y de actividad enzimática de ambas isoapirasas. El pI de la enzima Pimpernel resultó ser $8,74 \pm 0,05$ y el de la Desirée $6,69 \pm 0,047$.

3.2. Características cinéticas de las apirasas Pimpernel y Desirée

Para contestar a la primera pregunta abordada en esta

a

b

GAL

FB

BSA

OVO

AC

IT

LA

AB

Polo inferior: (+) (+) (-) (+)

Fig. 5 : Fotografía de los geles de poliacrilamida de la apirasa Desirée eluida de la columna de azul de Cibacrón-Sepharose.

- (A) Electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. a) Estándares de masa molecular:
 β -Galactosidasa (GAL) de M.M. 116,0 kDa.
 Fosforilasa B (FB) de M.M. 94,0 kDa.
 Seroalbúmina (BSA) de M.M. 67,0 kDa.
 Ovoalbúmina (OVO) de M.M. 43,0 kDa.
 Anhidrasa carbónica (AC) de M.M. 30,0 kDa.
 Inhibidor de tripsina (IT) de M.M. 20,0 kDa.
 α -Lactoalbúmina (LA) de M.M. 14,4 kDa.
 Azul de bromofenol (AB).
 b) Apirasa (Rf 0,48).
- (B) Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7,5% a pH 4,5
- (C) Electroenfoque en geles de poliacrilamida al 10% con anfolitos de rango de pH entre 3,5 y 10.

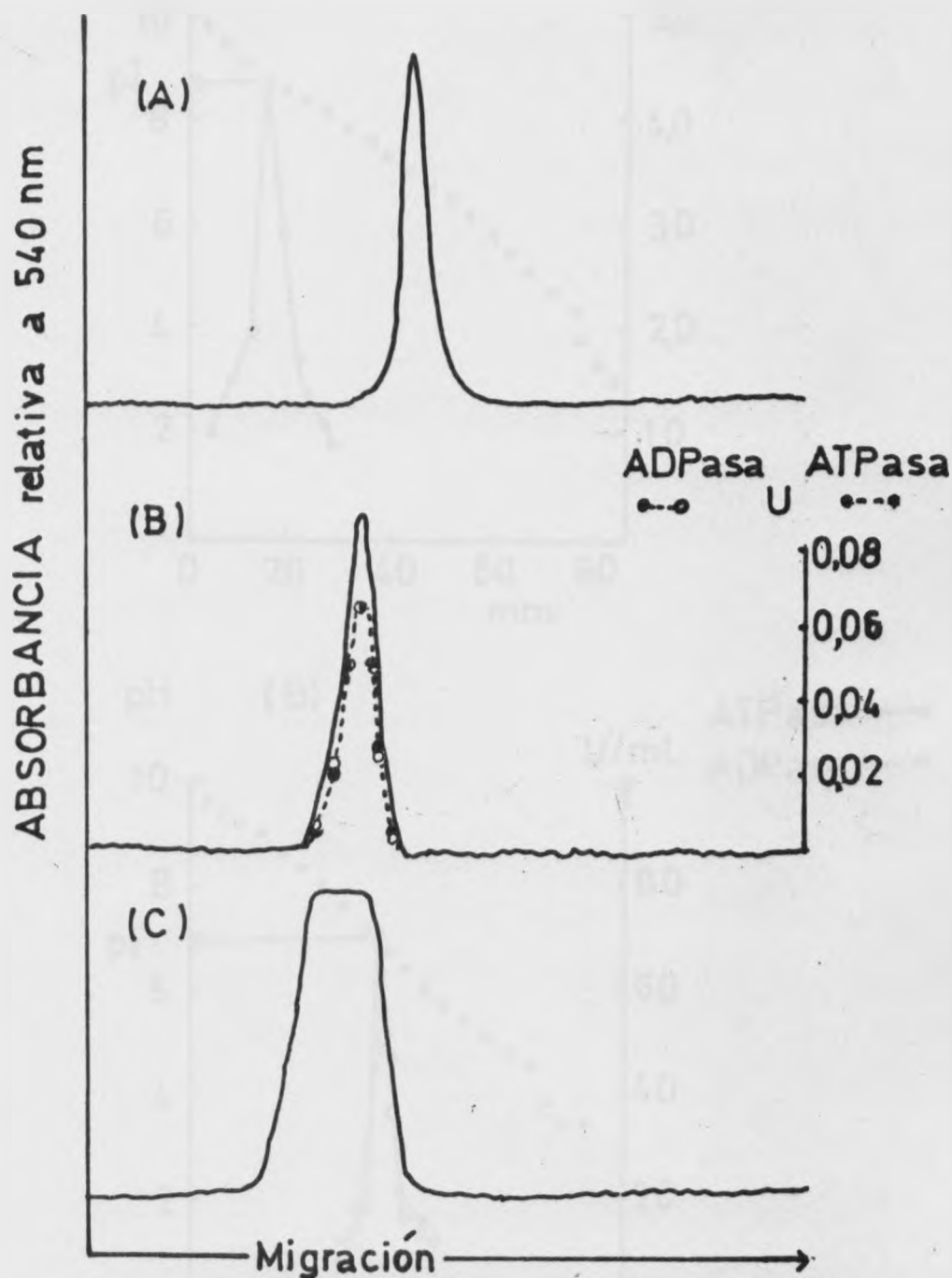


Fig. 6 : Análisis de los geles de poliacrilamida de la apirasa mostrados en la Fig. 5.

- (A) Geles de poliacrilamida en presencia de SDS.
- (B) Geles de poliacrilamida en condiciones nativas a pH 4,5 en que se muestra las actividades ATPásica (•---•) y la ADPásica (o---o) asociadas.
- (C) Electroenfoque de rango de pH entre 3,5 y 10.

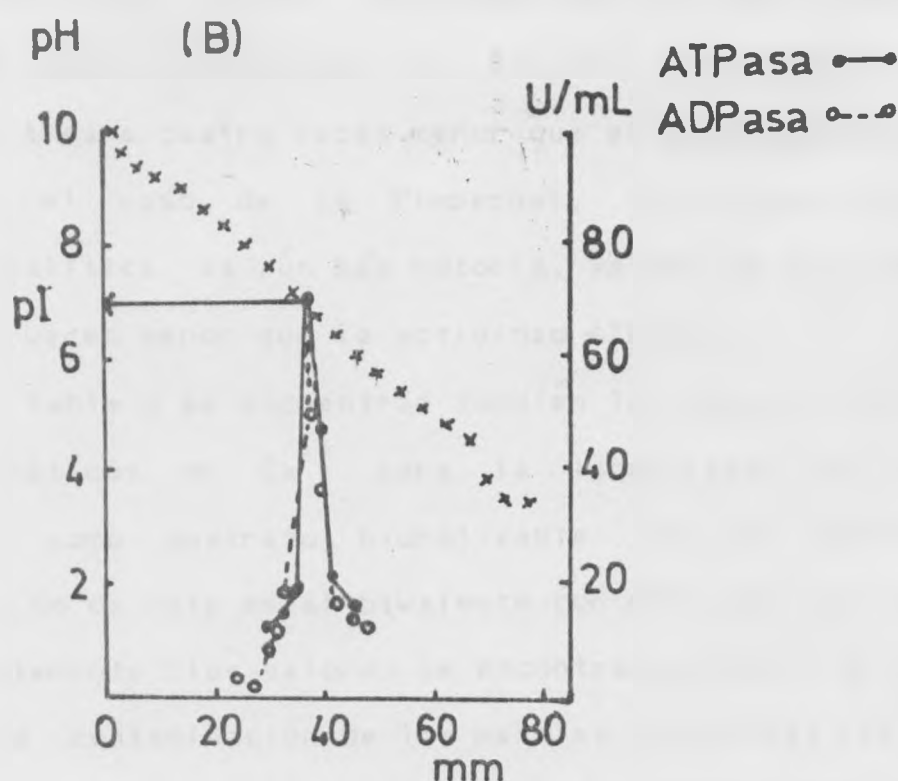
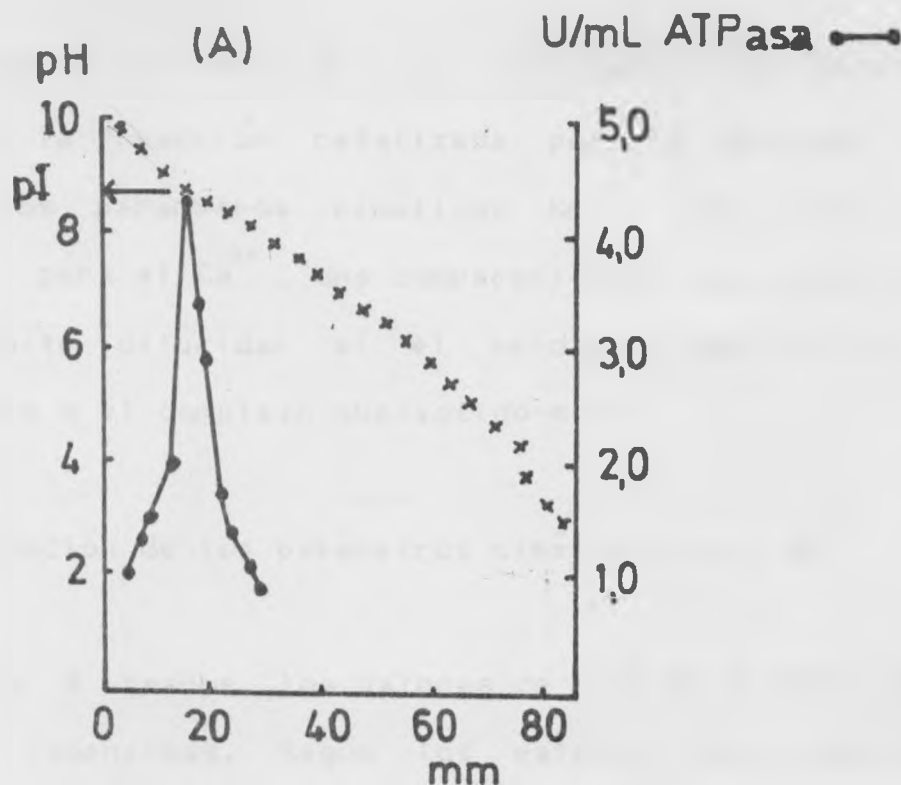


Fig. 7 : Electroenfoque en geles de poliacrilamida de las apirasas.

(A) Apirasa Pimpernel.

(B) Apirasa Desirée.

Rango de anfolitos pH 3-10. Perfil de pH x x ; actividad ATPásica (●—●); actividad ADPásica (○---○). Tiempo de corrida 100 min a 300 V y a 12°.

tesis respecto a la función que desempeñan los metales divalentes en la reacción catalizada por la apirasa, se determinaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para los nucleótidos y para el Ca^{2+} . Una comparación de los parámetros cinéticos permite dilucidar si el verdadero sustrato es el nucleótido libre o el complejo nucleótido-metal.

3.2.1. Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_m

La tabla 4 resume los valores de K_m y V_m de ATP y ADP para ambas isoenzimas. Según los valores calculados de eficiencia catalítica, V_m/K_m , se puede concluir que el mejor sustrato para ambas isoenzimas es el ATP, que presenta un valor de K_m tres a cuatro veces menor que el correspondiente para ADP. En el caso de la Pimpernel, la diferencia en eficiencia catalítica es aún más notoria, ya que la actividad ADPásica es 12 veces menor que la actividad ATPásica.

En la tabla 4 se encuentran también los valores de los parámetros cinéticos de Ca^{2+} para la isoapirasa Desirée, empleando ADP como sustrato hidrolizable. No fue factible determinar la K_m de este metal bivalente con ATP como sustrato porque aparentemente los valores se encontraban dentro de los límites de la contaminación de los metales divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}). Esta contaminación no se logró disminuir a pesar del tratamiento con Chelex-100 de todos los reactivos usados (amortiguador, sustrato y solución de BSA utilizada para

TABLA 4: Parámetros cinéticos de las apirastas Pimpernel y Desirée.

Variable (mM)	Fijo (mM)	Km (mM)	Vm (μ kat)	Vm/Km s^{-1}
Enzima Pimpernel.				
1- ATP (0,050-0,15)	Ca ²⁺ (5,0)	0,060	20,2	336,0
2- ADP (0,125-0,66)	Ca ²⁺ (5,0)	0,250	1,7	6,8
Enzima Desirée.				
3- ATP (0,025-0,10)	Ca ²⁺ (5,0)	0,025	15,5	620,0
4- ADP (0,125-0,66)	Ca ²⁺ (5,0)	0,100	14,7	147,0
5- ADP (0,025-0,30) ^a	Ca ²⁺ (2,0)	0,065	9,1	136,0
6- Ca ²⁺ (0,025-0,30) ^a	ADP (2,0)	0,062	8,7	134,0
7- Ca-ADP (0,0137-0,160) ^b		0,037 ^c	8,9 ^c	240,5

^a Enzima utilizada proviene de una preparación enzimática distinta a la de los experimentos 3 y 4.

^b Concentraciones calculadas a partir del valor de la K_{as} igual a $638 M^{-1}$ (sección 3.2.2)

^c Estos valores se calcularon a partir de las concentraciones calculadas del complejo Ca-ADP y de los promedios de las velocidades obtenidas de los experimentos 5 y 6.

diluir la enzima). Tampoco se obtuvo una buena reproducibilidad experimental al agregar EDTA para quelar los contaminantes.

En la fig. 8 se presenta el gráfico de Hanes-Woolf al variar el ADP o el Ca^{2+} , manteniendo constante uno de ellos con respecto al otro. Se puede apreciar que tanto para Ca^{2+} como para ADP, los valores de los parámetros cinéticos son muy semejantes (véase nuevamente la tabla 4, experimentos 5 y 6). Estos resultados sugieren que al igual que en todas las reacciones enzimáticas en que participan los nucleótidos de adenina, el verdadero sustrato sería el complejo nucleotido-metal.

3.2.2. Determinación de la constante de asociación Ca-ADP a pH 6,0

Con el propósito de conocer la concentración real del complejo Ca-ADP presente en los experimentos cinéticos recién mencionados, se determinó la constante de asociación de este complejo por el método de filtración en gel y por el método de titulación directa con un electrodo selectivo para Ca^{2+} .

La fig. 9 muestra el perfil de elución de la columna de Sephadex G-10 en que se fue midiendo la concentración de ADP total a 259 nm, y a la vez la concentración de Ca^{2+} total por espectrofotometría de absorción atómica. Los máximos

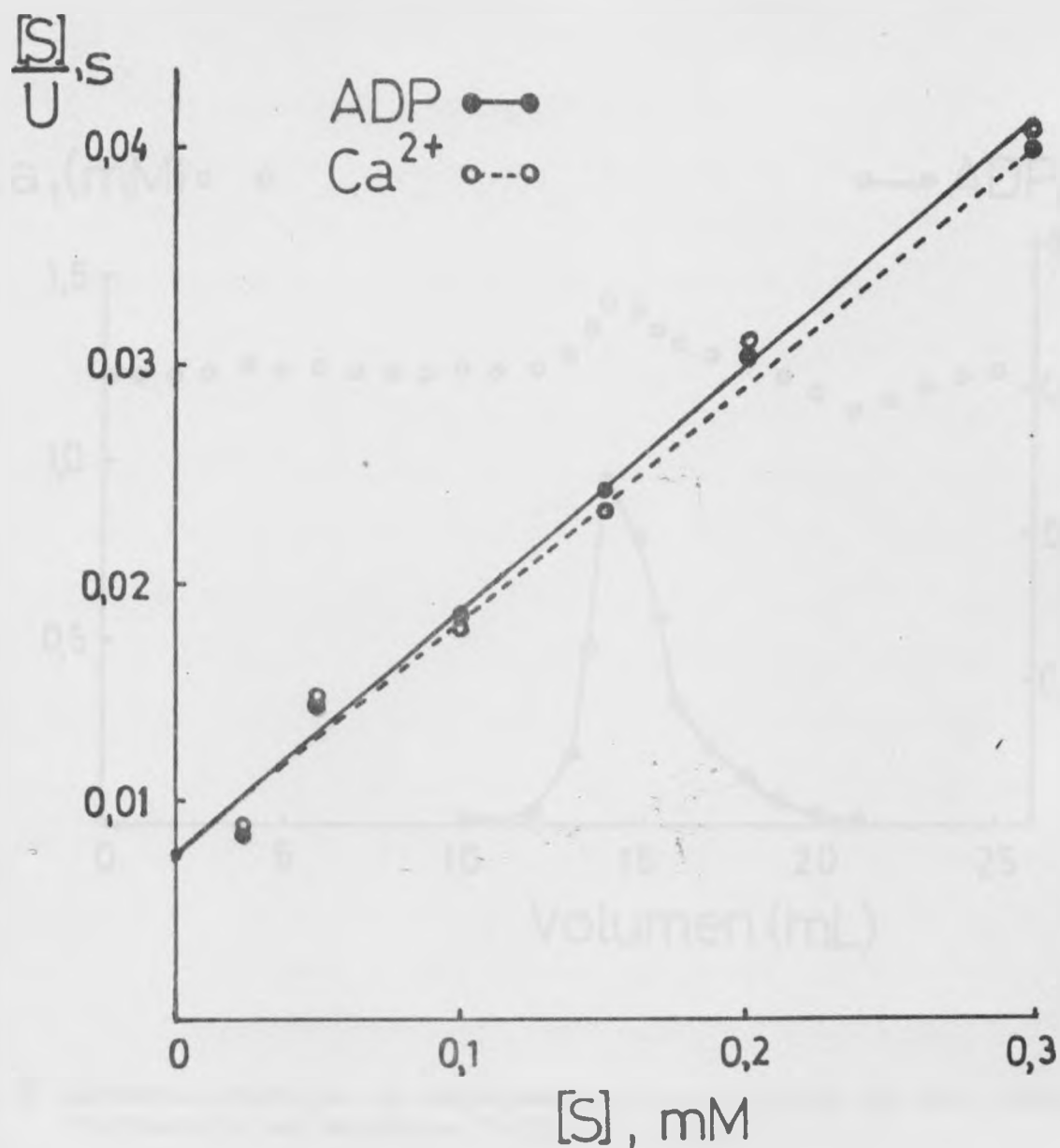


Fig. 8 : Gráfico de Hanes-Woolf para la determinación de los parámetros cinéticos de ADP y Ca^{2+} de la enzima Desirée.

El medio de reacción contenía amortiguador MES 100 mM pH 6,0; EDTA 0,065 mM; ADP y Ca^{2+} variables.

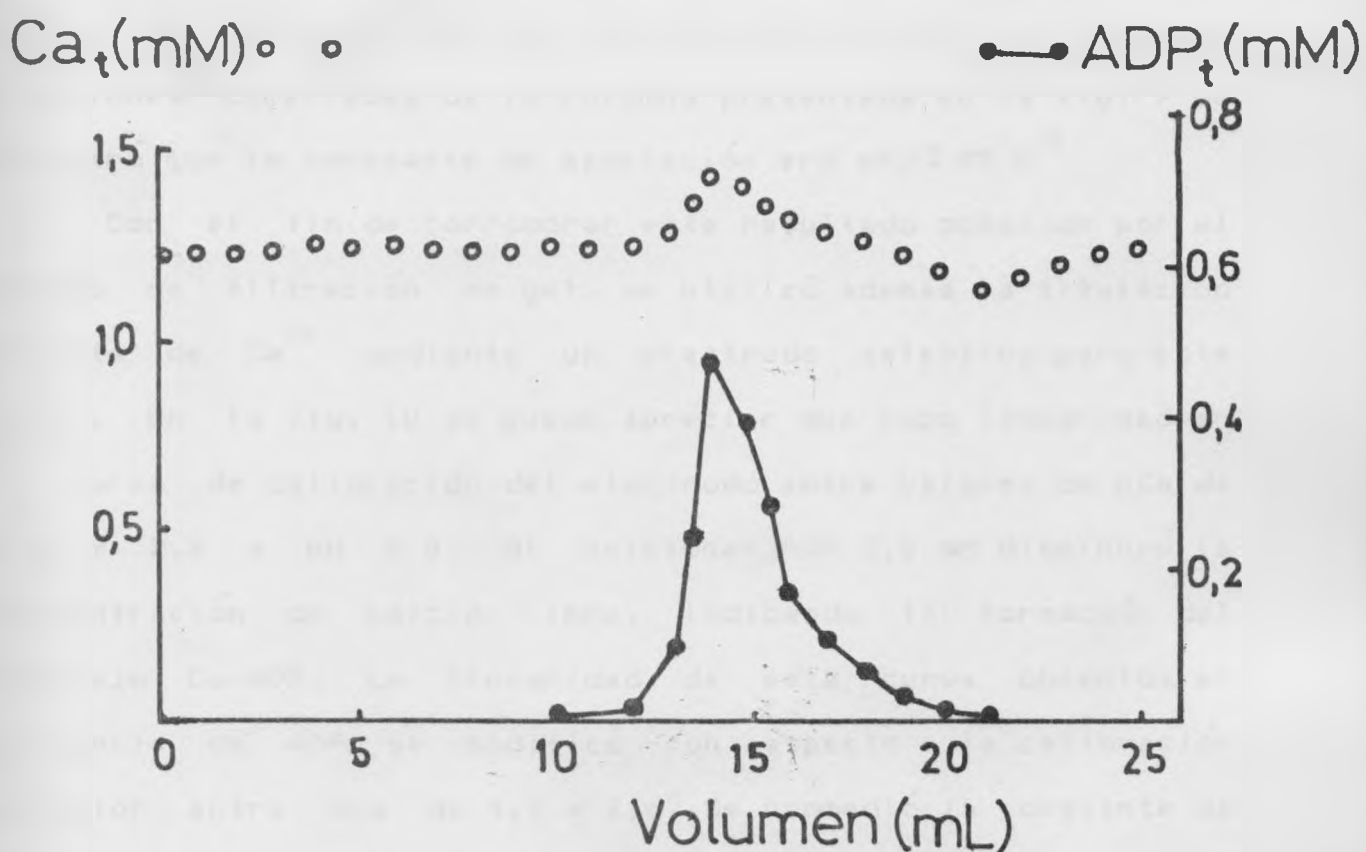


Fig. 9 :Determinación de la constante de asociación Ca-ADP mediante filtración en Sephadex G-10.

Se aplicaron 1,78 μ moles de ADP a una columna de Sephadex G-10 (1,5 x 46 cm) equilibrada con amortiguador MES 100 mM pH 6,0; CaCl₂ 0,125 mM. La concentración total de calcio se determinó por espectrofotometría de absorción atómica y la de ADP por su absorción a 259 nm.

coincidentes en los perfiles de elución de calcio y ADP totales corresponden a la presencia del complejo Ca-ADP. A partir del promedio de los valores obtenidos de las diversas fracciones colectadas de la columna presentada en la fig. 9 se encontró que la constante de asociación era $643 \pm 95 \text{ M}^{-1}$.

Con el fin de corroborar este resultado obtenido por el método de filtración en gel, se utilizó además la titulación directa de Ca^{2+} mediante un electrodo selectivo para este metal. En la fig. 10 se puede apreciar que hubo linealidad en la curva de calibración del electrodo entre valores de pCa de 4,5 y 2,9 a pH 6,0. Al adicionar ADP 2,0 mM disminuyó la concentración de calcio libre, indicando la formación del complejo Ca-ADP. La linealidad de esta curva obtenida en presencia de ADP se modificó con respecto a la calibración anterior entre pCa de 4,2 y 2,6. Se promedió la constante de equilibrio calculada para cada punto de esta curva de titulación, obteniéndose un valor de $626 \pm 76 \text{ M}^{-1}$ (véase tabla 5). El valor promedio de cuatro experimentos de titulación fue $633 \pm 73 \text{ M}^{-1}$.

Para el cálculo de la concentración del complejo Ca-ADP en los experimentos cinéticos para la determinación de V_m y K_m (sección 3.2.1.) se utilizó una constante de asociación para este complejo de 638 M^{-1} que se obtuvo del promedio de los valores calculados a partir de las dos metodías descritas. En la tabla 6 se presentan las correspondientes concentraciones reales del complejo Ca-ADP para cada uno de los experimentos

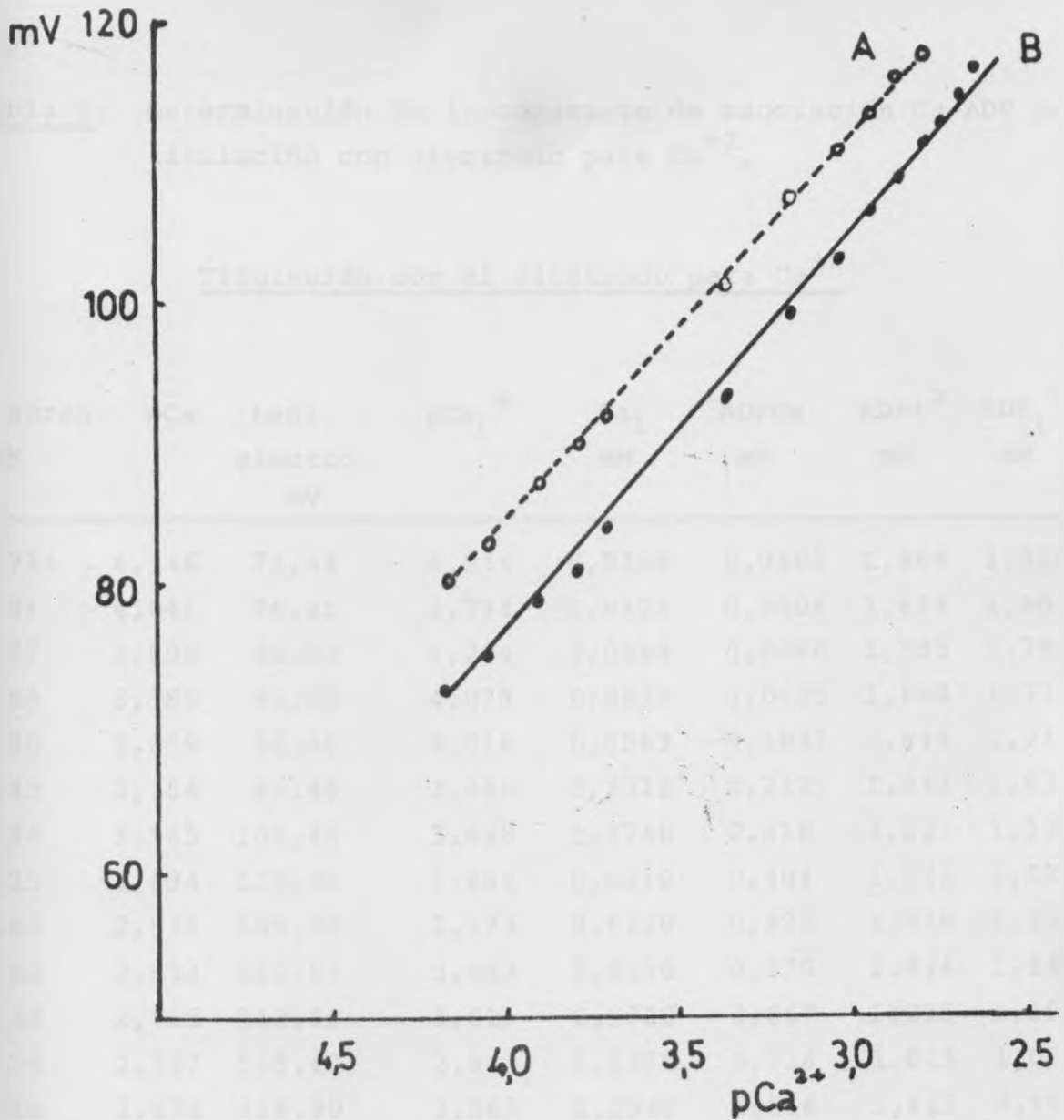


Fig. 10 : Titulación del Ca^{2+} libre seguido por medio de un electrodo selectivo para Ca^{2+} .

Curva (A): curva de calibración del electrodo en amortiguador MES 100 mM pH 6,0; BSA 0,01 mg/mL 0,01 mg.

Curva (B): titulación en presencia de ADP 2 mM en las mismas condiciones que curva A.

Tabla 5: Determinación de la constante de asociación Ca-ADP por titulación con electrodo para Ca^{+2} .

Titulación con el electrodo para Ca^{+2}

Ca agreg. mM	pCa	Lect. electro. mV	pCa_1^a	Ca_1 mM	ADPCa mM	ADPt^b mM	ADP_1^c mM	Kas mM^{-1}
0,0714	4,146	73,44	4,510	0,0309	0,0405	1,864	1,824	0,719
0,091	4,041	76,55	4,394	0,0404	0,0506	1,859	1,808	0,693
0,127	3,896	80,83	4,234	0,0584	0,0686	1,855	1,786	0,658
0,164	3,785	85,00	4,078	0,0835	0,0805	1,850	1,770	0,545
0,200	3,699	86,66	4,016	0,0963	0,1037	1,840	1,742	0,618
0,443	3,354	96,86	3,636	0,2312	0,212	1,841	1,629	0,563
0,684	3,165	102,44	3,428	0,3740	0,310	1,837	1,527	0,543
0,925	3,034	106,30	3,283	0,5210	0,404	1,832	1,528	0,507
1,164	2,934	109,30	3,173	0,6720	0,492	1,828	1,336	0,548
1,400	2,853	111,67	3,083	0,8250	0,575	1,824	1,249	0,561
1,639	2,785	113,56	3,013	0,9720	0,667	1,819	1,152	0,596
1,875	2,727	115,40	2,944	1,1370	0,738	1,815	1,077	0,603
2,110	2,676	116,90	2,888	1,2940	0,816	1,811	0,995	0,634
2,340	2,631	118,20	2,839	1,4500	0,890	1,806	0,916	0,670
2,576	2,590	119,40	2,793	1,6100	0,966	1,802	0,836	0,717
2,808	2,550	120,62	2,749	1,7820	1,026	1,798	0,772	0,745

Promedio de los valores de $\text{Kas} = 626 \pm 76 \text{ M}^{-1}$

^a pCa_1 = logaritmo negativo de la concentración de Ca libre

^b ADPt = concentración de ADP total

^c ADP_1 = concentración de ADP libre

TABLA 6 : Concentraciones de Ca-ADP calculadas a partir de la constante de asociación de este complejo.

Concentración de ADP o Ca^{2+} agregado (mM) .	Concentración de Ca-ADP cal culada (mM)	Porcentaje de Ca-ADP formado a partir de ADP y Ca^{2+} agregado
0,025	0,0140	56,4
0,05	0,0279	55,8
0,10	0,0550	55,0
0,20	0,1090	54,5
0,30	0,1600	53,0

^aConsiderado un valor de 638 M^{-1} para la constante de asociación Ca-ADP.

en que se varió la concentración de ADP y Ca^{2+} . Como se puede ver la cantidad de Ca-ADP formado correspondía entre un 53 y 56,4% de las concentraciones iniciales de nucleótido o metal.

En el gráfico de Hanes-Woolf de la fig. 11, la abscisa representa las concentraciones reales del complejo Ca-ADP y la ordenada el cociente S/v . Estas velocidades son un promedio de los experimentos graficados en la fig. 8. El valor de K_m obtenido del gráfico de la fig. 11, en que se consideró el complejo Ca-ADP como el verdadero sustrato de la apirasa, disminuyó en 40% como se aprecia en la tabla 4, número 7.

3.2.3. Efecto de iones metálicos bivalentes sobre la actividad apirásica

Las tablas 7 y 8 muestran que no es muy estricta la especificidad de las isoapirasas en cuanto a metales bivalentes en la hidrólisis enzimática de nucleosidos di y trifosfatos. Las actividades hidrolíticas de la isoenzima Pimpernel fueron menores a un 10% en ausencia de metal agregado; en cambio, la apirasa Desirée presentó actividades enzimáticas residuales más altas que sólo se pudieron disminuir adicionando EDTA. La interpretación más simple de este hecho es que la K_m para el metal en las reacciones catalizadas por la enzima Desirée estaría cercana a la concentración de los metales contaminantes después del tratamiento con Chelex-100.

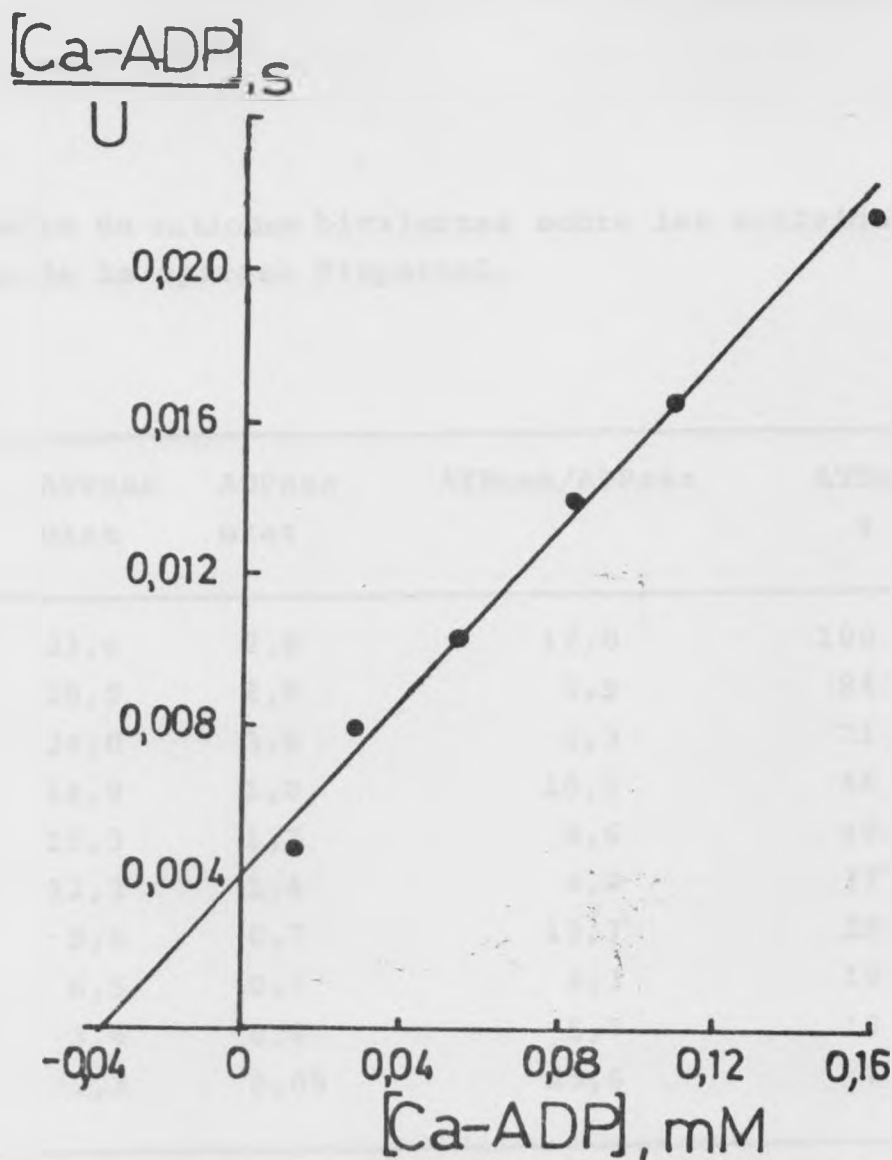


Fig. 11: Gráfico de Hanes-Woolf para la determinación de los parámetros cinéticos del complejo Ca-ADP.

Se graficaron los valores de las concentraciones reales del complejo Ca-ADP provenientes del experimento presentado en la Fig. 8. Las velocidades graficadas son el producto del valor promedio de los resultados obtenidos al variar ADP y al variar Ca^{2+} (véase fig. 8).

Tabla 7: Efecto de cationes bivalentes sobre las actividades enzimáticas de la apirasa Pimpernel.

Metal (2 mM)	ATPasa μkat	ADPasa μkat	ATPasa/ADPasa	ATPasa %	ADPasa %
Ca ²⁺	33,6	2,8	12,0	100	100
Mn ²⁺	28,5	4,8	5,9	84	171
Cd ²⁺	24,0	3,8	6,3	71	136
Mg ²⁺	18,9	1,8	10,5	56	64
Co ²⁺	16,3	1,7	9,6	49	61
Zn ²⁺	12,3	1,4	8,8	37	50
Sr ²⁺	9,6	0,7	13,7	29	25
Ni ²⁺	6,5	0,7	9,3	19	25
Cu ²⁺	3,4	0,6	5,7	10	21
---	2,3	0,09	25,6	7	3

Amortiguador usado: MES 100 mM pH 6,0.

Sustrato ATP y ADP : 2 mM.

Tiempo de ensayo : entre 3 y 15 min dependiendo del metal agregado.

El Pi liberado se detectó por el método de Ernster y col. (1950).

TABLA 8 : Efecto de cationes bivalentes sobre las actividades enzimáticas de la apirasa Desirée.

Metal (2 mM)	ATPasa μkat	ADPasa μkat	ATPasa/ADPasa	ATPasa %	ADPasa %
Ca ²⁺	9,3	9,2	1,0	100	100
Mn ²⁺	11,3	8,9	1,3	121	97
Cd ²⁺	11,6	8,3	1,4	125	90
Mg ²⁺	7,9	6,7	1,2	85	73
Co ²⁺	7,9	8,0	1,0	85	87
Zn ²⁺	6,7	9,5	0,7	72	103
Sr ²⁺	4,2	3,2	1,3	45	35
Ni ²⁺	2,6	3,5	0,7	28	38
Cu ²⁺	2,2	3,3	0,7	27	36
----	2,5	1,5	1,7	27	16

Amortiguador usado : MES 100 mM pH 6,0

Sustratos ATP y ADP : 2 mM.

Tiempo de ensayo : entre 5 y 15 min dependiendo del metal agregado.

El Pi liberado se detectó por método de Ernster y col (1950).

En las tablas 7 y 8 se encuentran además estos mismos valores de velocidad de hidrólisis referidos porcentualmente a la velocidad en presencia de Ca^{2+} ; aunque no siempre resultó ser el Ca^{2+} el metal más efectivo. Los metales Ca^{2+} , Mn^{2+} y Cd^{2+} en diferentes casos fueron los mejores activadores de las velocidades de ambas enzimas. Este mismo hecho produjo una variación significativa de los cuocientes hidrolíticos (ATPasa/ADPasa) de estas enzimas (tablas 7 y 8).

En la apirasa Pimpernel, estos cuocientes variaron entre 12 y 5,7 y en la apirasa Desirée la fluctuación fue entre 1,0 y 0,7. Los mismos metales no siempre modificaron en igual sentido estos cuocientes hidrolíticos en ambas isoenzimas, por ejemplo Mn^{2+} y Cd^{2+} .

3.3. Interacción de Cr(III)-ATP con la apirasa

El complejo nucleotido-metal al interactuar con la enzima lo puede hacer a través de la cadena pirofosfórica y/o por algún ligando del metal. Para dar alguna luz en este aspecto se utilizó un complejo inerte de cromo (III), el complejo Cr(III)-ATP, descrito por DePamphilis y Cleland (1973).

De acuerdo a datos de la literatura el análogo de ATP, Cr(III)-ATP es inhibidor competitivo cuando la interacción con la enzima se efectúa a través de los oxígenos de la cadena pirofosfórica (Janson y Cleland, 1973; Dannenberg y Cleland, 1975; Sperow y Butler 1976).

3.3.1. Cr(III)-ATP como sustrato e inhibidor competitivo de las isoapirinasas

Al incubar las distintas apirinasas con el complejo Cr(III)-ATP en presencia o ausencia de Ca^{2+} no se observó liberación de P_i (medido por el método de Ernster). Pero en cambio resultó ser excelente inhibidor, competitivo de la hidrólisis de los sustratos Ca-ATP y Ca-ADP para ambas isoenzimas. En las figuras 12A y 12B están graficados los valores recíprocos de las velocidades de hidrólisis y de las respectivas concentraciones de los sustratos en ausencia y en presencia de dos concentraciones de Cr(III)-ATP, exclusivamente para la isoenzima Pimpernel. En los recuadros de la fig. 12 se presentan los gráficos secundarios de los valores de la intersección y de la pendiente en función de la concentración del Cr(III)-ATP. Estas regraficaciones permitieron comprobar que la inhibición era de tipo competitivo y además, por la linealidad del gráfico de la pendiente en función del inhibidor, se puede decir que existe un solo tipo de sitio de unión con la enzima.

Las constantes de inhibición de Cr(III)-ATP de las actividades enzimáticas de ambas isoapirinasas junto con las K_m de los sustratos ATP y ADP se encuentran en la tabla 9. Si se comparan los valores de K_i de este análogo de sustrato de ambas isoapirinasas, se puede estimar que el Cr(III)-ATP se une

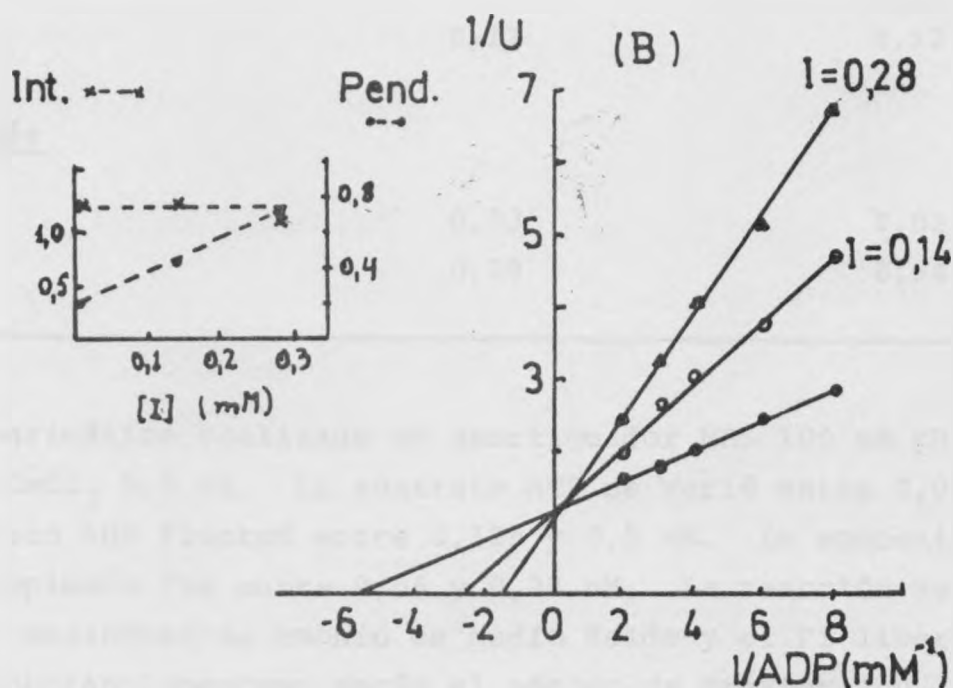
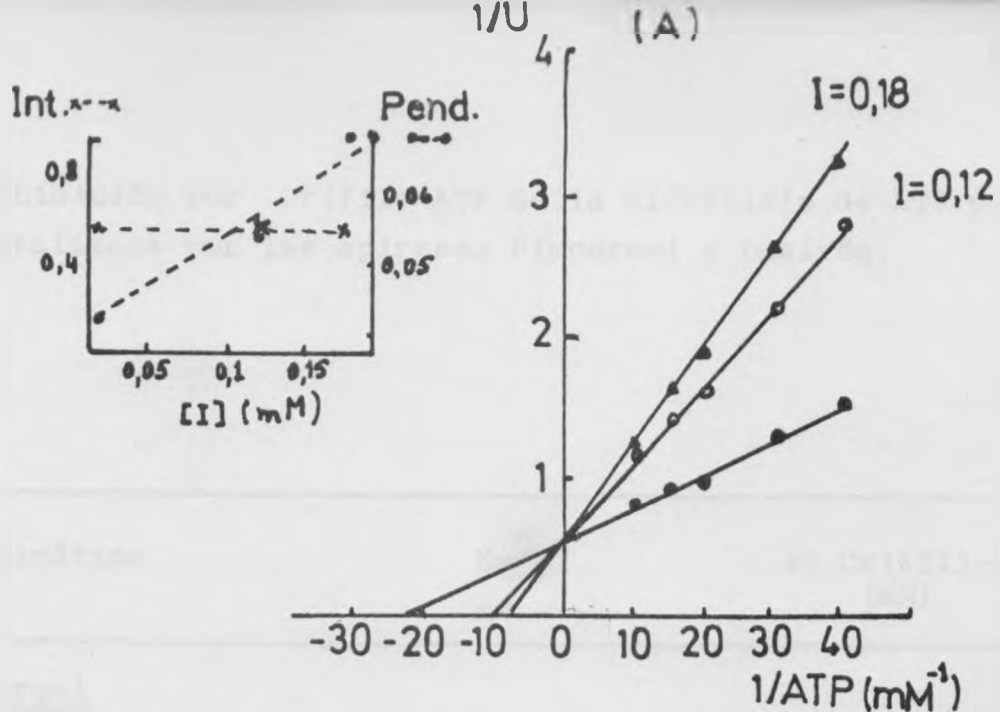


Fig. 12 : Gráfico de Lineweaver-Burk para la determinación de la K_i del Cr(III)-ATP.

El medio de reacción contenía amortiguador MES 100 mM pH 6,0; CaCl_2 5 mM y 60 ng de apirasa Pimpernel.

(A) : actividad ATPásica

(B) : actividad ADPásica

En el recuadro se presenta el gráfico secundario de los valores respectivos de la intersección y de la pendiente obtenidos al trabajar a distintas concentraciones de I (Cr(III)-ATP).

Tabla 9: Inhibición por Cr(III)-ATP de la hidrólisis de ATP y ADP catalizada por las apirasa Pimpernel y Desirée.

Actividad enzimática	Km mM	Ki Cr(III)-ATP (mM)
<u>Apirasa Pimpernel</u>		
ATPasa	0,05	0,33
ADPasa	0,17	0,12
<u>Apirasa Desirée</u>		
ATPasa	0,03	0,02
ADPasa	0,09	0,04

Ensayo enzimático realizado en amortiguador MES 100 mM pH 6,0, en presencia de CaCl_2 5,0 mM. El sustrato ATP se varió entre 0,025 y 0,1 mM y el sustrato ADP fluctuó entre 0,125 y 0,5 mM. La concentración de Cr(III)-ATP empleada fue entre 0,06 y 0,28 mM. La reacción se detuvo a los 4 min con molibdato de amonio en medio ácido y el Pi liberado se extrajo en isobutanol-benceno según el método de Ernster.

con mayor afinidad a la isoenzima Desirée (tabla 9).

3.4. Interacción de cationes bivalentes con la apirasa

El esquema de coordinación apirasa:sustrato:metal sugerido a través de datos cinéticos (secciones 3.2.2. y 3.3.1.) se trató de confirmar por espectroscopía de resonancia del espín electrónico (ESR).

3.4.1. Espectros de resonancia del espín electrónico del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ en presencia de apirasa Desirée

Como se describió en la sección 3.2.3. ambas apirasas requieren indistintamente Ca^{2+} o Mn^{2+} como activadores de la hidrólisis de los nucleótidos. Por esta razón se aprovecharon las propiedades paramagnéticas del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, el cual se usó en reemplazo del Ca^{2+} . Estos experimentos se hicieron solo con la enzima Desirée porque se dispuso de una preparación homogénea en cantidades suficientes de esta enzima.

El espectro de ESR del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ aparece en la fig 13A mostrando el sexteto típico de este metal hexahidratado. En la fig. 13C, se observa la curva de calibración obtenida al graficar el promedio de las amplitudes (en cm) de las 6 señales del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ referidas a un mismo nivel de señal del instrumento, en función de la concentración del catión (Cohn y Townsend, 1954). La preparación de apirasa Desirée (0,46 mM) no

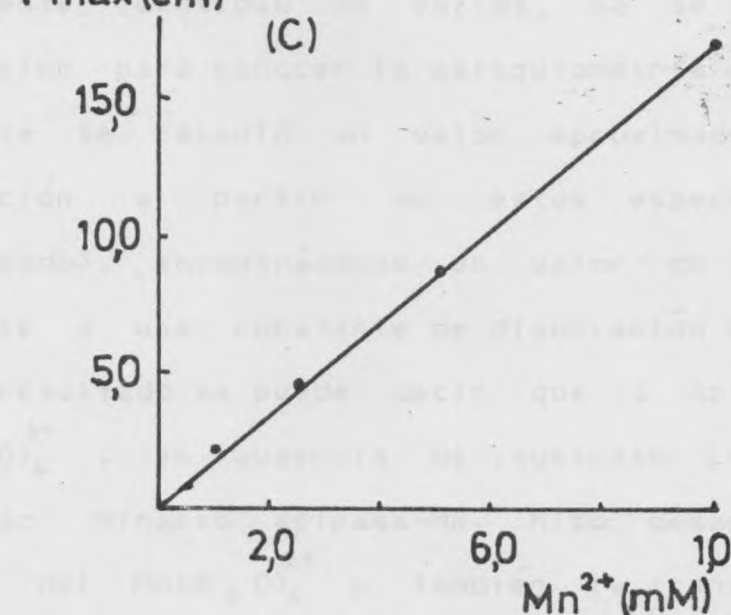
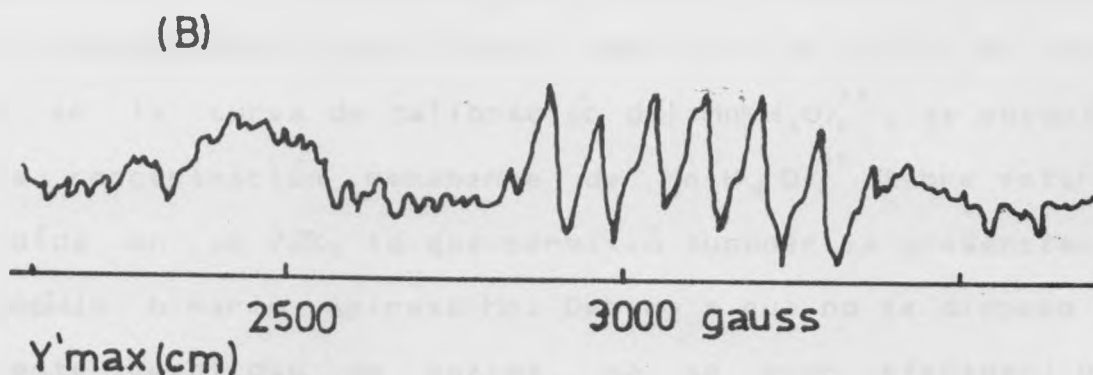
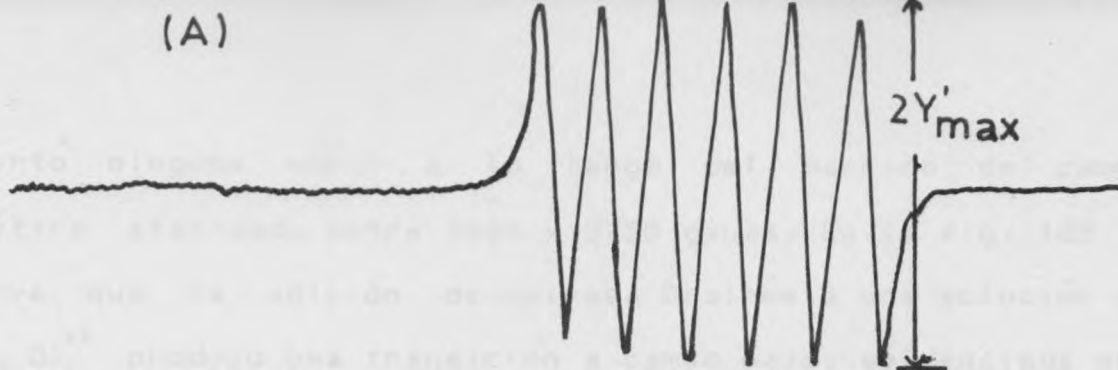


Fig. 13: Espectroscopía de resonancia del espín electrónico del $Mn(H_2O)_6^{2+}$.

Los espectros se efectuaron en amortiguador TES 100 mM a una temperatura de $27 \pm 2^\circ$ y con una modulación de amplitud del instrumento de 80.

- (A) Espectro correspondiente a una solución a 2,5 mM de $Mn(H_2O)_6^{2+}$. Nivel de señal: 1000;
- (B) Espectro correspondiente a una solución de $Mn(H_2O)_6^{2+}$ 0,495 mM en presencia de apirasa 0,46 mM. Nivel de señal: 3200.
- (C) Curva de calibración del espectro de ESR de la banda del $Mn(H_2O)_6^{2+}$ (Véase sección 2.11.1). El nivel de señal fue variable según la concentración del metal paramagnético.

presentó ninguna señal a lo largo del barrido de campo magnético efectuado entre 2000 y 3750 gauss. En la fig. 13B se observa que la adición de apirasa Desirée a una solución de $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ produjo una transición a campo bajo, evidenciada por la aparición de una nueva señal a la izquierda del sexteto, y una disminución de la altura de las seis líneas del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ libre. Interpolando esta nueva amplitud de señal de las 6 líneas en la curva de calibración del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, se encontró que la concentración remanente de $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ libre estaría disminuída en un 72%, lo que permitió suponer la presencia de un complejo binario apirasa-Mn. Debido a que no se dispuso de suficiente cantidad de enzima, no se pudo efectuar una titulación para conocer la estequiometría de este complejo. No obstante se calculó un valor aproximado de la constante de asociación a partir de estos espectros (obtenidos en triplicado), encontrándose un valor de 25.000 M^{-1} , lo que equivale a una constante de disociación cercana a $40 \text{ } \mu\text{M}$. Por este resultado se puede decir que la apirasa se uniría al $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, en ausencia de sustrato. La adición de EDTA al complejo binario apirasa-Mn, hizo desaparecer el sexteto típico del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ y también la transición a campo bajo, reflejo del complejo apirasa-Mn. No se observó cambio en el espectro de la enzima- Mn^{2+} al añadir CaCl_2 entre 2,5 y 5,0 mM; además al invertir el orden de adición de los cationes, es decir, equilibrar primero la apirasa con Ca^{2+} y luego agregar $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ se repitió nuevamente la transición a campo bajo.

Estos resultados indicarían que el Ca^{2+} tal vez no interacciona con la enzima, o bien se uniría a un sitio distinto al cual lo haría el $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$; o si ambos se unieran al mismo sitio, el Mn^{2+} tendría mayor afinidad por la enzima que el Ca^{2+} .

3.4.2. Fenómeno de histéresis en la apirasa preincubada con iones metálicos bivalentes

La apirasa Desirée homogénea preincubada con $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, presentó una cinética alterada de liberación de Pi al ser ensayada con ATP o con ADP a concentraciones inferiores de saturación por sustrato (alrededor de Km). Esta alteración consistió en un período de retardo en la liberación del producto como se puede apreciar en la fig. 14A. En la misma figura se muestra la cinética de la enzima Desirée no tratada con $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (fig. 14B) y que en su reemplazo se preincubó con NaCl o con $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ en presencia de EDTA 10 mM. Frieden (1970) introdujo el concepto de histéresis en enzimología; según su definición las enzimas histeréticas son aquellas que presentan un período de retardo en la liberación de productos. Este mismo autor interpreta este fenómeno enzimológico como consecuencia de lo siguiente:

- a) Cambios en el estado de agregación de la enzima.
- b) Desplazamiento de un ligando fuertemente unido a la enzima.
- c) Procesos de isomerización de los complejos catalíticos.

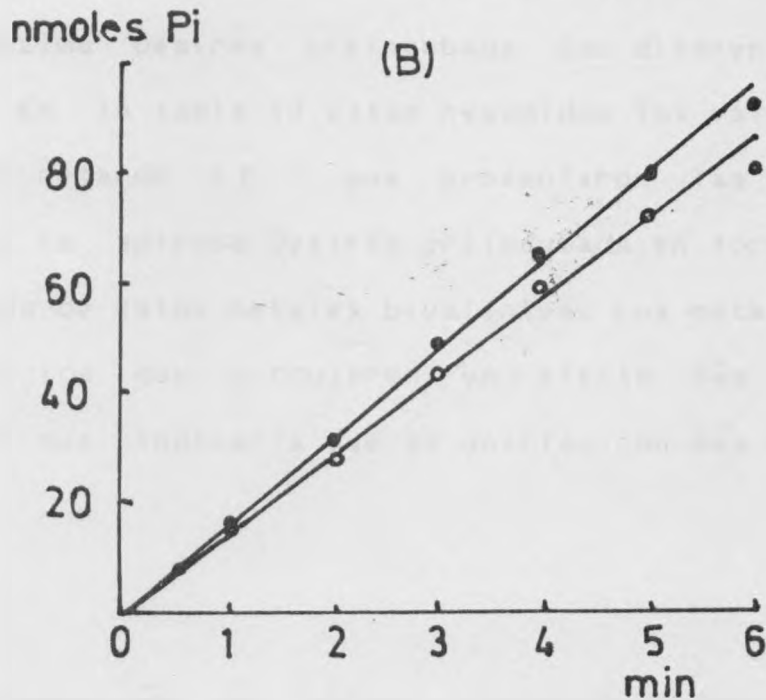
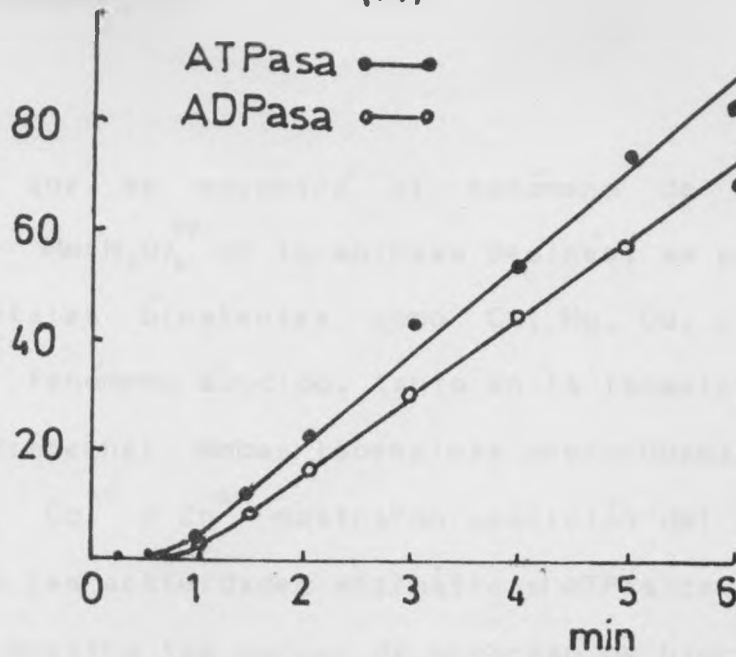


Fig. 14: Cinética de hidrólisis de ATP y ADP catalizada por la isoapirasa Desirée preincubada con $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ o con Na^+ .

La preincubación se realizó en ambos casos en amortiguador MES 100 mM pH 6,0.

(A) Preincubación con $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ 0,25 mM.

(B) Preincubación con Na^+ 0,75 mM o bien con Ca^{2+} 0,25 mM en presencia de EDTA 10 mM.

Al cabo de una hora a 4° se diluyó con BSA (0,2 mg/mL) y se siguió la cinética de liberación de Pi a partir de ATP y de ADP respectivamente.

El medio de ensayo enzimático contenía ATP o ADP 0,05 mM; CaCl_2 5 mM; amortiguador MES 100 mM pH 6,0. El Pi liberado se cuantificó por el método de Ernster y col. (1950).

Después que se encontró el fenómeno de histéresis, provocado por $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ en la apirasa Desirée, se probó si los siguientes metales bivalentes como Ca, Mg, Co, y Zn también producían el fenómeno aludido, tanto en la isoapirasa Desirée como en la Pimpernel. Ambas isoenzimas preincubadas con Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} mostraron aparición del fenómeno de histéresis en las actividades enzimáticas ATPásica y ADPásica. La figura 15 muestra las curvas de progreso de hidrólisis solo de la isoenzima Desirée preincubada con diferentes metales bivalentes. En la tabla 10 están resumidos los valores de los períodos de retardo (τ) que presentaron las curvas de progreso de la apirasa Desirée preincubada en forma separada con cada uno de estos metales bivalentes. Los metales Mn^{2+} y Co^{2+} fueron los que produjeron un efecto más marcado de retardo, lo que indicaría que se unían con más fuerza a la enzima.

3.4.3. Determinación de la masa molecular de la isoenzima Desirée en presencia de Ca^{2+}

Se estudió la posibilidad de que el fenómeno histerético en la apirasa se debiera a cambios en su estado de agregación molecular, como ha indicado Frieden, cuando esta enzima se encontraba en presencia de metales bivalentes y en ausencia de

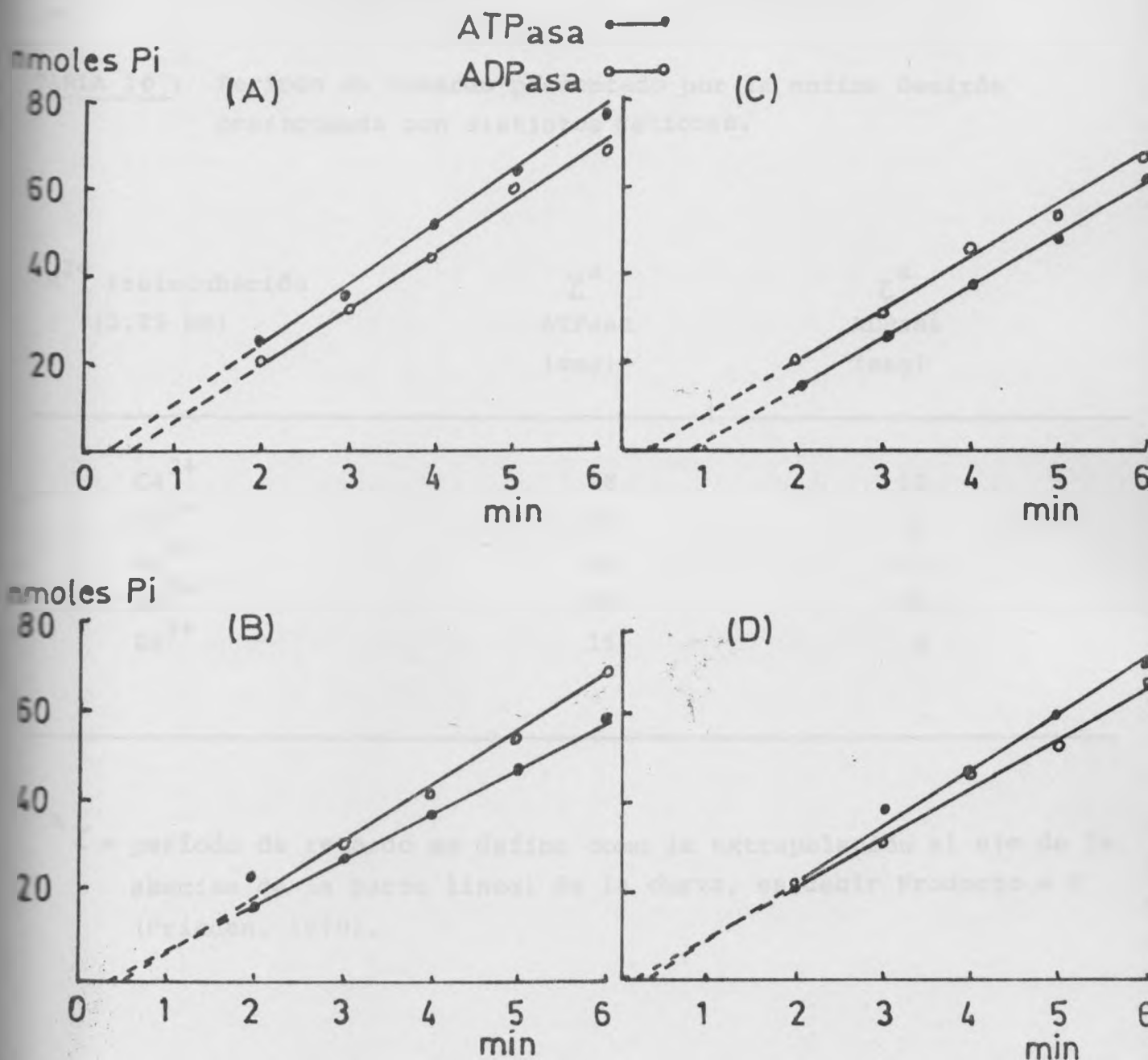


Fig. 15: Cinética de hidrólisis de ATP y ADP catalizada por la isoapirasa Desirée preincubada con cationes bivalentes.

Se utilizaron las mismas condiciones de preincubación y posterior ensayo enzimático descritas en la Fig. 14.

(A) Preincubación con Ca^{2+} (B) Preincubación con Mg^{2+} ; (C) Preincubación con Co^{2+} y (D) Preincubación con Zn^{2+} .

TABLA 10 : Período de retardo presentado por la enzima Desirée preincubada con distintos cationes.

M ²⁺ Preincubación (0,25 mM)	τ^a ATPasa (seg)	τ^a ADPasa (seg)
Ca ²⁺	18	12
Mg ²⁺	21	30
Mn ²⁺	42	42
Co ²⁺	51	21
Zn ²⁺	15	9

^a τ = período de retardo se define como la extrapolación al eje de la abscisa de la parte lineal de la curva, es decir Producto = 0 (Frieden, 1970).

sustrato. Se determinó la masa molecular de la apirasa, en condiciones en que se ha observado la histéresis (pH, temperatura y presencia del ión calcio, en ausencia de nucleótidos), mediante filtración en una columna de Sephadex G-100. En la fig. 16 se muestran los volúmenes de elución de las distintas proteínas estándares en función del logaritmo de la respectiva masa molecular (Andrews, 1964). Por el volumen de elución de la apirasa Desirée detectada por su actividad enzimática, se pudo estimar una masa molecular de 47,8 kDa, valor semejante al obtenido con anterioridad (49 kDa) por el mismo método, pero en ausencia de Ca^{2+} (Kettlun y col., 1982). En consecuencia, la histéresis no sería producto de la agregación de la enzima.

3.4.4. Factores que anulan la histéresis

Una vez descartada la agregación molecular de la apirasa como causal de la histéresis, se enfocaron los estudios hacia otra de las interpretaciones que da Frieden (1970) sobre la aparición de este fenómeno. Según este autor, el período de retardo cinético podría deberse a desplazamiento de una forma enzimática inactiva a una forma activa por acción de un ligando. En este caso la forma inactiva de la apirasa estaría representada por la apirasa-metal, la cual se reactivaría por

Volumen de elución (mL)

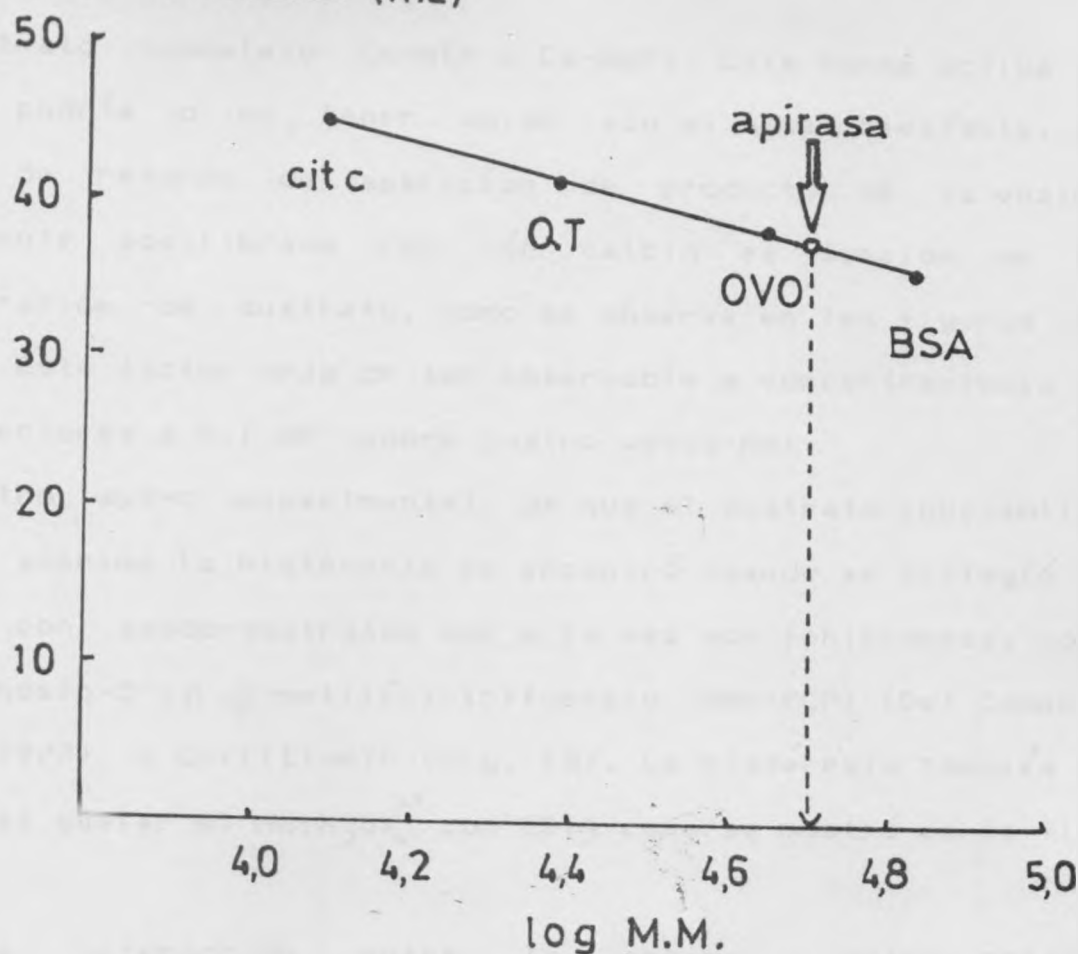


FIG. 16 :Determinación de la masa molecular de la apirasa Desirée en condiciones de histéresis.

Esta determinación se hizo por filtración en una columna de Sephadex G-100 (1,4 x 50 cm) equilibrada con MES 100 mM pH 6,0; CaCl_2 0,25 mM.

La columna se calibró con: citocromo c (Cit c); M.M. 12,5 kDa, quimotripsinógeno (QT), M.M. 24,5 kDa, ovoalbúmina (OVO), M.M. 43,0 kDa, seroalbúmina (BSA), M.M. 67,0 kDa.

La apirasa se detectó por sus actividades ATPásica y ADPásica. y las proteínas estándares por su absorción a 280 nm.

el sustrato (complejo Ca-ATP o Ca-ADP). Esta forma activa de enzima podría o no, tener unido aún el metal bivalente. El tiempo de retardo de aparición de producto de la enzima previamente equilibrada con ión calcio es función de la concentración de sustrato, como se observa en las figuras 17A y 17B. Este factor deja de ser observable a concentraciones de ATP superiores a 0,1 mM (sobre cuatro veces K_m).

Otro apoyo experimental de que el sustrato (nucleotido metal) suprime la histéresis se encontró cuando se protegió la enzima con pseudo-sustratos que a la vez son inhibidores, como el adenosín-5'(β, γ -metilén)-trifosfato (AMP-PCP) (Del Campo y col., 1977) y Cr(III)-ATP (fig. 18). La histéresis también se anula al quelar el $Mn(H_2O)_6^{2+}$ con EDTA como se mostró en la fig. 14.

La interacción entre la enzima y estos metales bivalentes que provocan el fenómeno de histéresis, el cual se visualiza a bajas concentraciones de sustratos, no es abolido por dilución de la enzima (1000 veces) en BSA 0,02% ni por diálisis exhaustiva en NaCl 100 mM (tratado con Chelex-100).

3.4.5. Cálculo de la constante de velocidad aparente para alcanzar el régimen estacionario del complejo apirasa- Ca^{2+}

Por los resultados experimentales de ESR y cinéticos se puede suponer que la causal de histéresis que presenta la apirasa sería un cambio conformacional de la enzima a una

30

20

10

0

1

2

3

4

5

6

min

nmols Pi

(B)

67 μ M50 μ M33 μ M25 μ M

20

10

5

0

1

2

3

4

5

6

min

Fig. 17 : Efecto de la concentración del sustrato-metal sobre el tiempo de retardo de la apirasa Desirée preincubada con Ca^{2+} .

Las condiciones de preincubación fueron: una hora a 4° en amortiguador MES 100 mM pH 6,0; Ca^{2+} 0,25 mM y distintas concentraciones de sustrato.

(A) ATP varió entre 25 y 100 μ M.

(B) ADP varió entre 25 y 67 μ M.

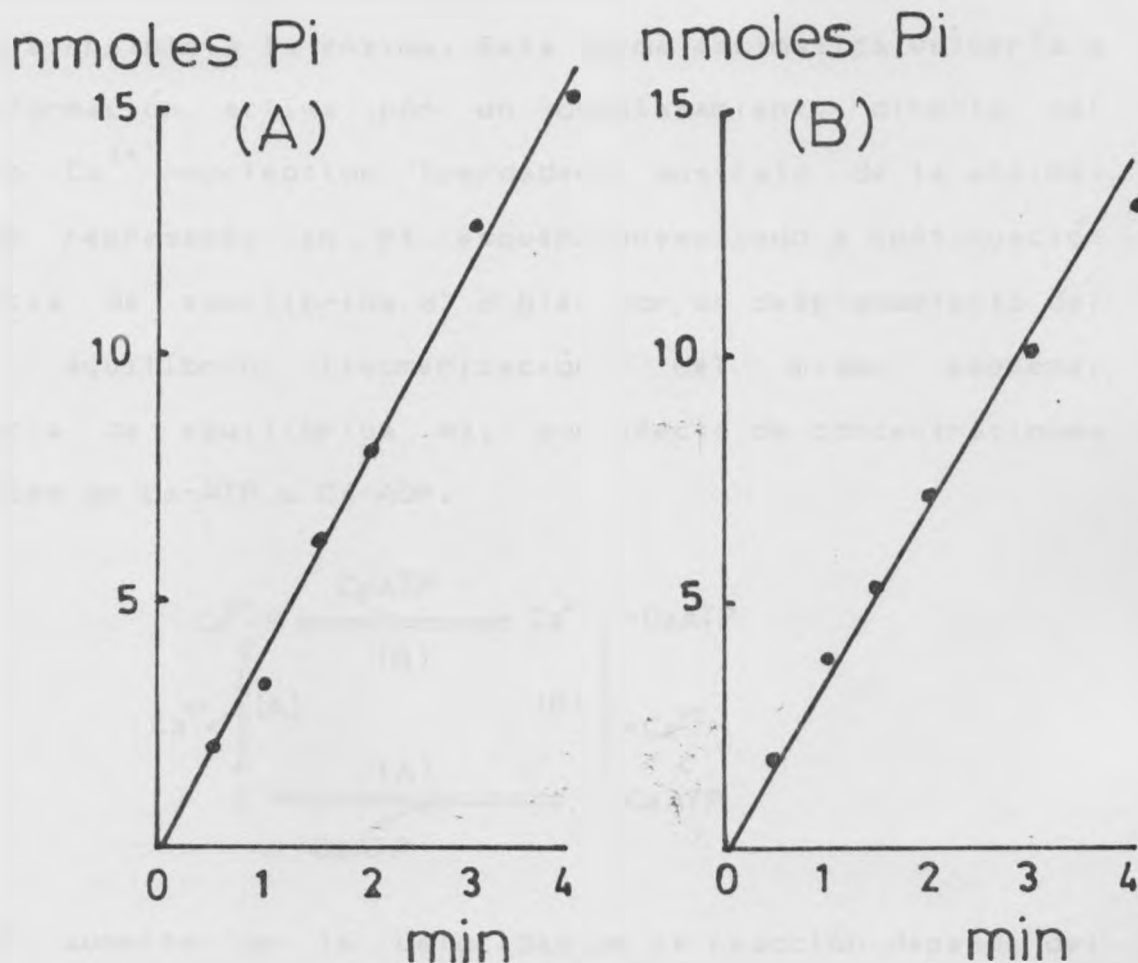
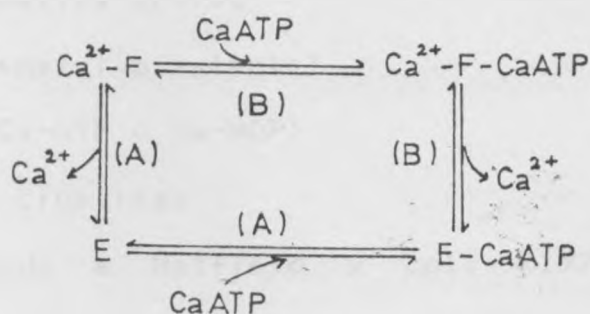


Fig. 18 : Anulación de la histéresis por análogos de sustratos.

La apirasa Desirée se preincubó a 4° por una hr en MES 100 mM con Mn^{2+} 0,25 mM previa adición de : (A) Cr(III)-ATP (0,225 mM). (B) AMP-PCP (0,25 mM).

Después de diluir en BSA (0,2 mg/mL) se siguió la cinética de liberación de Pi a partir de ATP 0,05 mM en amortiguador MES 100 mM pH 6,0; $CaCl_2$ 5 mM.

forma menos activa o inactiva al unirse el metal bivalente en forma reversible a la enzima. Esta forma enzimática volvería a la conformación activa por un desplazamiento directo del complejo Ca^{2+} -nucleotido (verdadero sustrato de la enzima) como se representa en el esquema presentado a continuación (secuencia de equilibrios B) o bien por un desplazamiento del primer equilibrio (isomerización) del mismo esquema, (secuencia de equilibrios A), por efecto de concentraciones crecientes de Ca-ATP o Ca-ADP.



El aumento de la velocidad de la reacción depende del tiempo que se demora el metal (inhibidor) en liberarse de la superficie de la enzima (Frieden, 1970).

Hatfield y col. (1970) presentan dos modelos cinéticos que permiten explicar el período de retardo característico de la reacción catalizada por la desaminasa de la treonina. A) Modelo de equilibrio espontáneo; involucra dos formas enzimáticas, una activa y la otra inactiva que están en equilibrio rápido en ausencia de ligandos, la unión preferencial de un ligando efector (activador o inhibidor) produce un desplazamiento rápido del equilibrio. B) El otro

espera en ausencia del período de retardo, $v_{\infty} t$, y la duración de este período expresado en términos del producto no formado por el retardo (segundo término de la ec. 4). Este último término se hace cero a $t = 0$, y alcanza su valor máximo v_{∞} / K_{ap} cuando t es muy grande. En consecuencia en el gráfico de producto en función del tiempo, la intersección en el eje de las $\underline{\hspace{1cm}}$ de la línea extrapolada de la fase de régimen estacionario de la reacción, es igual a este valor máximo (v_{∞} / K_{ap}).

La constante presente en el término exponencial presenta una dependencia distinta de las concentraciones del sustrato y del inhibidor según de cual de los dos modelos se trate. En la tabla 11 aparecen los valores de K_{ap} calculados de las curvas de progreso a diferentes concentraciones de sustrato (Fig. 17). De los dos modelos generales propuestos por Hatfield y col., (1970) el segundo de ellos, que presenta una inducción por el sustrato, predice una dependencia lineal de la K_{ap} con respecto a la concentración de sustrato (Ca-ATP o Ca-ADP) y a su vez es independiente de la concentración del inhibidor (Ca^{2+}) donde:

$$K_{ap} = \frac{K_1 K_3 V_m (S)}{(K_{-1} + K_3) v_{\infty}} \quad (\text{Ec. 5})$$

Cabe hacer notar que este modelo supone sitios distintos para el sustrato y para el inhibidor y un equilibrio rápido de

TABLA 11 : Valores de la intersección en la ordenada con la curva de progreso a diferentes concentraciones de ATP y ADP.

Sustrato mM	Intersección en eje y^c v_{∞} / K_{ap}	v μkat	K_{ap} s^{-1}
ATP^a			
0,025	2,07	901	435
0,033	1,82	1101	605
0,050	1,54	1270	824,7
0,067	1,24	1526	1230,6
0,100	0,801	1652	2065,0
ADP^b			
0,025	0,907	374,9	413,3
0,033	0,802	451,4	562,8
0,050	0,698	532,4	762,8
0,067	0,608	624,2	1026,6

^aLr 0,993, intersección en eje $y = 154 s^{-1}$, pendiente $21.578 s^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

^bLr 0,998, intersección en eje $y = 71,3 s^{-1}$, pendiente $14.174 s^{-1} \text{ mM}^{-1}$

^cSe toma el módulo de la intersección.

las formas enzimáticas a las que están unidos tanto el sustrato como el inhibidor (especies entre paréntesis en el modelo B). Sin embargo, si las velocidades de isomerización son cinéticamente significativas, la dependencia de la k_{ap} con respecto a la concentración de sustrato obedece a una ecuación semejante. Por lo tanto no se puede discriminar entre ellas.

En la fig. 19 se encuentran graficados los valores de k_{ap} en función directa de las concentraciones de ATP y ADP usadas en dos series de ensayos enzimáticos de la enzima preincubada con Ca^{2+} . En ambos casos se observa una relación lineal entre la concentración del sustrato y la k_{ap} , como lo predice el modelo. Dentro del error experimental se puede concluir que los valores de k_{ap} , en ausencia de sustrato (Ca-nucleotido) no son significativos.

No se efectuó ningún estudio para corroborar que este modelo se ajusta al del complejo apirasa- Ca^{2+} en relación a si existe o no dependencia de la concentración del metal inhibidor.

3.5. Determinación del contenido de metales bivalentes en el tubérculo de S. tuberosum var. Desirée

La tabla 12 presenta el resultado del análisis por activación neutrónica del contenido de algunos metales bivalentes del tejido del tubérculo de S. tuberosum var. Desirée. Los datos están expresados como mg de metal por 100 g

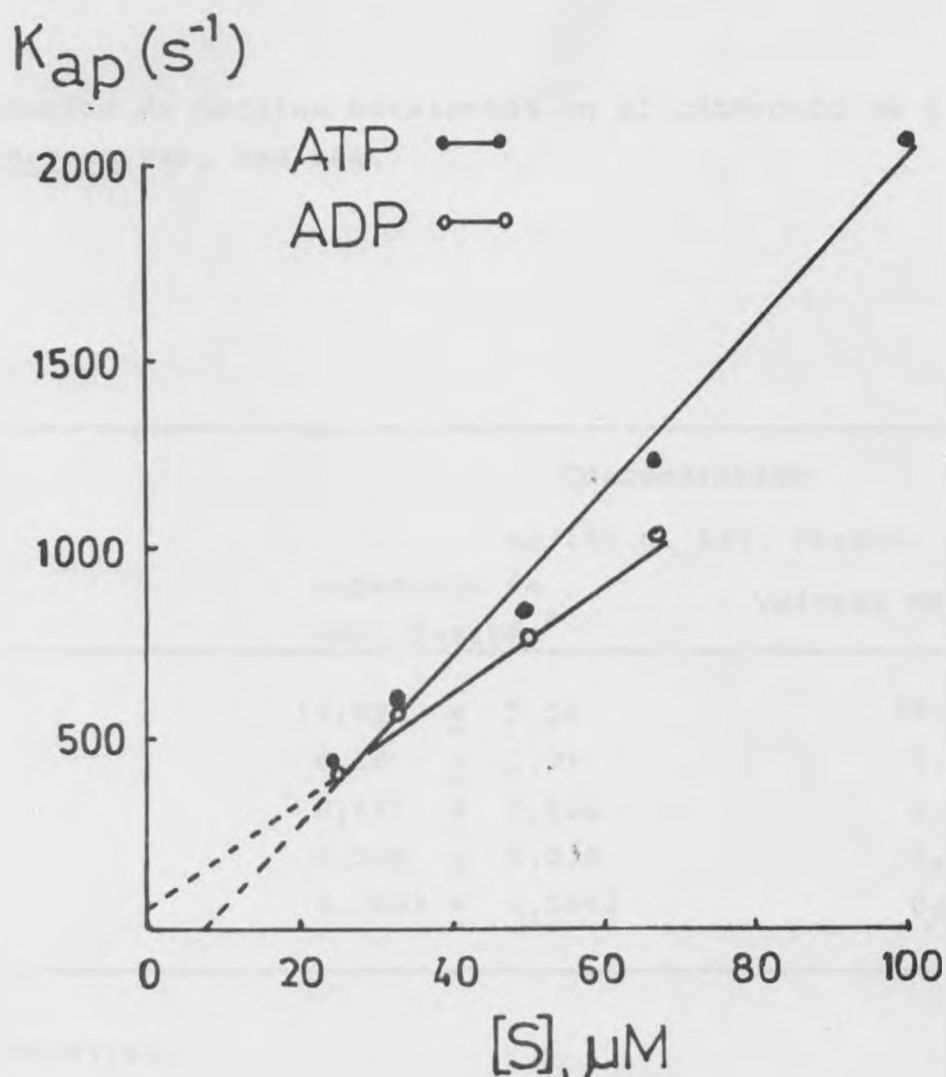


Fig. 19: Dependencia de la K_{ap} de las concentraciones de sustrato utilizadas para el ensayo enzimático.

Graficación directa de los valores de la constante de velocidad aparente para alcanzar el régimen estacionario del complejo apirasa-Ca^{2+} en función de las concentraciones de ATP y ADP utilizadas para el ensayo enzimático de la apirasa-Ca^{2+} .

La K_{ap} representa la velocidad con que alcanza el régimen estacionario correspondiendo a una cinética exponencial. El cálculo de K_{ap} se encuentra en la Tabla 11.

TABLA 12: Contenido de metales bivalentes en el tubérculo de S. tuberosum var. Desirée.

Metal	Concentración			Valores de literatura
	mg/100 g. tej. fresco			
	tubérculo de var. Desirée ^a			
Mg	18,02	+	2,24	20,0
Ca	6,56	+	1,27	7,6
Mn	0,141	+	0,026	0,22
Zn	0,308	+	0,038	0,12
Co	0,0024	+	0,0012	0,010

^aPromedio de 6 muestras.

Valores extraídos de Souci, S.W., Fachmann, W. y Kraut, H (1979) en *Die Zusammensetzung der Lebensmittel*. Ed. Wissenschaftliche verlagsgesellschaft M.B.H. Stuttgart.

La cuantificación del contenido total de estos metales se efectuó por análisis de activación neutrónica de muestras calcinadas (véase la sección 2.12).

de tejido fresco. Las concentraciones encontradas de Mg y de Ca indican que son los metales que están en mayor cantidad en el tejido del tubérculo. Fue importante conocer el contenido de humedad en el tejido del tubérculo de las diversas muestras de S. tuberosum para una expresión adecuada de los resultados. El valor promedio del contenido de humedad fue de 77,92% ± 0,91. Esta variación inferior al 1% no afecta la expresión de los resultados en peso seco o en peso húmedo.

En la tabla 12 se encuentran también los valores de la literatura de estos mismos metales (Souci y col., 1979). En general, los valores informados por estos autores son bastante coincidentes con los encontrados para la var. Desirée, con la excepción del Zn y del Co.

3.6. Determinación del contenido de ATP y ADP en el tubérculo de S. tuberosum var. Desirée

En la tabla 13 se presenta el promedio de los valores de concentración de ATP y ADP del tejido fresco de tubérculo de S. tuberosum var. Desirée. Cabe hacer notar que esta determinación de nucleótidos se hizo en las mismas muestras de tubérculo en que se determinó el contenido de los metales. En esta misma tabla se volvieron a poner las concentraciones determinadas para Ca y Mg expresadas en micromoles, con el propósito de hacer una comparación en los órdenes de magnitud en que se encuentran los metales y los nucleótidos en el

TABLA 13: Contenido de ATP y ADP comparado con el de Ca y Mg en el tubérculo de S. tuberosum var. Desirée.

µmoles/g tej. fresco

ATP	0,148 ^a	+	0,011
ADP	0,103 ^a	+	0,008
Ca	2,70 ^b	+	0,052
Mg	4,49 ^b	+	0,56

^aPromedio de 3 muestras.

^bPromedio de 6 muestras.

La cuantificación de los nucleótidos fue hecha por medio de ensayos enzimáticos y la de los metales por análisis de activación neutrónica (véase las secciones 2.13 y 2.12).

tejido fresco. Se puede concluir que la concentración de estos metales bivalentes es por lo menos un orden de magnitud mayor que la de los nucleótidos.

3.7. Purificación de calmodulina de tubérculo de S. tuberosum var. Ultimus

La purificación de la CaM de tubérculo de S. tuberosum se basó en las características descritas para CaM de otras fuentes como son: la estabilidad al calor, la precipitación con un 50% de saturación de sulfato de amonio y su afinidad por trifluoperazina (Dieter, 1984). Se aisló a partir de S. tuberosum var. Ultimus y var. Desirée. Se describe solo la preparación y posterior caracterización de la CaM y otras dos proteínas que resultaron ser moduladoras de la apirasa, a partir de S. tuberosum var. Ultimus.

El procedimiento de purificación de CaM de S. tuberosum no correspondió a ninguna de las descritas en la literatura a partir de tejidos vegetales (Muto y Miyahi, 1977; Charbonneau y Cormier, 1979; Watterson y col., 1980; Jarret y col., 1982; Olah y col., 1983; Sane y col., 1984). Fue imprescindible concentrar primero las proteínas del extracto de S. tuberosum con sulfato de amonio, antes de realizar el proceso de calentamiento.

La fracción proteica proveniente de S. tuberosum parcialmente purificada a través de precipitación con sulfato

de amonio (0-50%) y calentamiento a 100° ha sido denominada Fr-50. Esta fracción presentó características de calmodulina como se muestra en la tabla 14. En esta tabla se observa que la Fr-50 es capaz de estimular a la fosfodiesterasa de AMPc, además este efecto es dependiente de Ca^{2+} puesto que EGTA 2 mM disminuyó su acción. En la tabla 14 se aprecia también que la TFP revierte el efecto activador de la Fr-50 en la actividad fosfodiesterásica. En la misma tabla se observa que esta actividad calmodulínica se pierde al calentar la Fr-50 a 100° y pH 1,0 (Fr-50 desnaturalada).

Esta Fr-50 activó una preparación de isoapirasa de S. tuberosum var. Ultimus (cuociente ATPásico/ADPásico cercano a 10) como se observa a continuación en la tabla 15.

La siguiente etapa de purificación de esta fracción proteica con actividad calmodulínica fue una cromatografía en TFP-Sepharose, considerada una cromatografía de afinidad para la CaM (Charbonneau y Cormier, 1979).

Las fracciones eluídas de la columna de TFP-Sepharose se analizaron en cuanto a si tenían acción sobre la fosfodiesterasa de nucleotidos cíclicos y la apirasa. De esta columna se obtuvieron tres fracciones de proteínas, de las cuales dos eluyeron con fuerza iónica de NaCl 0,5 M y las tercera eluyó con una solución de EGTA 5 mM, como se resume en la tabla 15. La primera fracción que salió a los 0,84 volúmenes de columna al eluir con NaCl 0,5 M, presentó sólo efecto activador sobre la apirasa y fue inactiva frente a la

Tabla 14: Efecto de la fracción 50 sobre la fosfodiesterasa de AMPc de corazón de bovino.

	Aumento de la actividad fosfodiesterásica (%)
1.- Más Fr-50 (0,8 mg)	200
2.- Más Fr-50 (0,8 mg)desnaturada ^a	0
3.- Igual que 1. más EGTA (1 mM) ^b	41
4.- Igual que 1. más EGTA (2 mM) ^b	25
5.- Igual que 1. más TFP ^c (1 mM)	81
6.- Igual que 1. más TFP (2 mM)	41
7.- Igual que 1. más TFP (3 mM)	10

El ensayo de la fosfodiesterasa se efectuó a 30° en amortiguador tris-HCl 30 mM pH 8,0; CaCl₂ 4 mM; MnCl₂ 4 mM; AMPc 1,6 mM y 0,08 U de enzima deficiente de activador. El AMP producido en la reacción se cuantificó espectrofotométricamente por el descenso de absorción a 265 nm por transformación del AMP a IMP mediante el ensayo acoplado a la 5'-adenilato-desaminasa (0,38 U) en amortiguador citrato de Na 10 mM pH 6,5 a 25° hasta que se alcanza el equilibrio.

^aFr-50 calentada a 100° por 10 min a pH 1.

^b El ensayo se efectuó sin adicionar CaCl₂.

^c TFP = trifluoperazina.

TABLA 15

Efecto de las fracciones proteicas eluidas de la columna de TFP-Sepharose sobre la fosfodiesterasa de AMPC y la apirasa.

Fracción Proteica	Volúmenes ^c de columna	Actividad fosfodiesterásica ^a			Actividad apirásica ^b		
		µg de frac- ción proteica.	(AMP) liber. µmoles.	Aumento actividad %	µg de frac- ción proteica.	(Pi) liber. µmoles.	aumento de la actividad %
-	-	-	0,0247	-	-	0,35	-
Fr-50	-	142	0,0490	98	140	0,61	74
Fr-A	0,84	220	0,0250	1	22	0,53	51
Fr-I	2,60	10	0,0247	0	10	0,26	-26 ^d
CaM	0,84	4,9	0,0370	50	20	0,35	0

^aFosfodiesterasa de AMPC de corazón de bovino, 0,08 U (100 µg de proteínas / tubo). Alcanza su máxima activación con 34 ng de CaM de bovino (190%).

^bIsoapirasa A proveniente de S. tuberosum var. Ultimus, 29,5 U ATPásica (10 µg de proteína / tubo). Esta enzima es una de las isoapirasas presente en esta variedad de S. tuberosum, una de cuyas características es hidrolizar el ATP y el ADP con un cuociente cercano a 10.

^cElución de la columna de cada fracción proteica considerando, en los dos primeros casos que la elución es con NaCl 0,5 M y en el tercero es con EGTA (5 mM).

^dPorcentaje de disminución de la actividad apirásica.

fosfodiesterasa. Una segunda fracción proteica que eluyó a los 2,6 volúmenes de columna al eluir con NaCl 0,5 M no presentó acción sobre la fosfodiesterasa, en cambio, inhibió a la apirasa; y el tercer máximo que salió a los 0,84 volúmenes de columna al eluir con EGTA, activó la fosfodiesterasa y no la apirasa. Estas tres fracciones proteicas eluidas de esta columna de TFP-Sepharose fueron denominadas sucesivamente, fracción activadora de la apirasa (Fr-A); fracción inhibidora de esta misma enzima (Fr-I) y fracción calmodulínica (Fr-CaM).

La fracción con actividad calmodulínica y la fracción activadora sobre la apirasa eluidas de esta columna cromatográfica fueron caracterizadas posteriormente, no obstante no fue posible hacer lo mismo con la fracción inhibidora de la apirasa que probablemente por su bajo contenido de proteínas resultó muy inestable.

3.8. Caracterización de la Fr-CaM de tubérculo de S. tuberosum var. Ultimus

La caracterización de esta proteína se basó en las propiedades generales descritas para la CaM de origen animal y vegetal, resumidas en la publicación de Anderson y col., (1980). Se determinó la masa molecular, el pI, su efecto estimulador sobre la fosfodiesterasa, la dependencia de este efecto de la presencia de Ca^{2+} y finalmente la interacción con el inhibidor TFP, en presencia de Ca^{2+} .

En la fotografía de la fig. 20 se aprecian dos geles de poliacrilamida. El gel A es el resultado de una electroforesis en condiciones desnaturalantes, y el gel B representa un electroenfoque entre pH 3,5 y 10,0. En ambos geles se observa que la Fr-CaM eluída de la columna de TFP-Sepharose presentó una sola banda de proteínas, correspondiente a una proteína de M.M. 17,5 kDa y de pI 4,4 (gel B).

La fig. 21 muestra la determinación de la masa molecular de la Fr-CaM de S. tuberosum según el método de Weber y Osborn (1969). En la fig. 22 se puede apreciar el densitograma del gel de electroenfoque teñido con azul de Coomassie junto con el correspondiente gradiente de pH.

La tabla 16 muestra los resultados obtenidos al agregar la CaM pura de S. tuberosum a la fosfodiesterasa de AMPc. La acción estimuladora de esta CaM vegetal se comparó con la producida por la CaM de corazón de bovino, encontrándose que producía un efecto marcadamente menor. Por el escaso material que se disponía no se hizo una curva de titulación completa del efecto estimulador de la CaM de S. tuberosum sobre la fosfodiesterasa, por esta razón en la tabla 16 se presenta solo el efecto producido por tres concentraciones crecientes de esta Fr-CaM. De estos datos se puede deducir en forma aproximada, que una concentración de 15 µg de esta CaM vegetal produce un 50% de la activación máxima que alcanza la fosfodiesterasa en presencia de concentraciones saturantes de CaM de bovino (34 ng). En la tabla 16 se aprecia también que

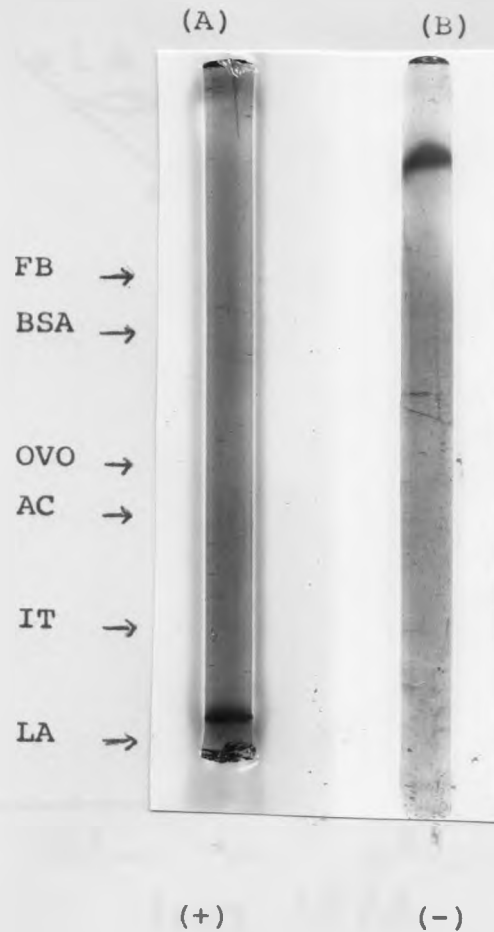


Fig. 20 : Fotografía de los geles de poliacrilamida de la fracción eluida de la columna de TFP-Sepharose con 0,5 mM EGTA.

- A) Electroforesis geles poliacrilamida al 10% en presencia de SDS.
Estándares de M.M. usados:
 FB = fosforilasa B (M.M., 94,0 kDa)
 BSA = albúmina sérica de bovino (M.M. 67,0 kDa)
 OVO = ovoalbúmina (M.M. 43,0 kDa)
 AC = anhidrasa carbónica (M.M. 30,0 kDa)
 IT = inhibidor de la tripsina del poroto de soya (M.M. 20 kDa)
 LA = α -lactoalbúmina (M.M. 14,4 kDa).
- B) Electroenfoque en geles de poliacrilamida al 10% con anfolitos de rango de pH entre 3,5 y 10.

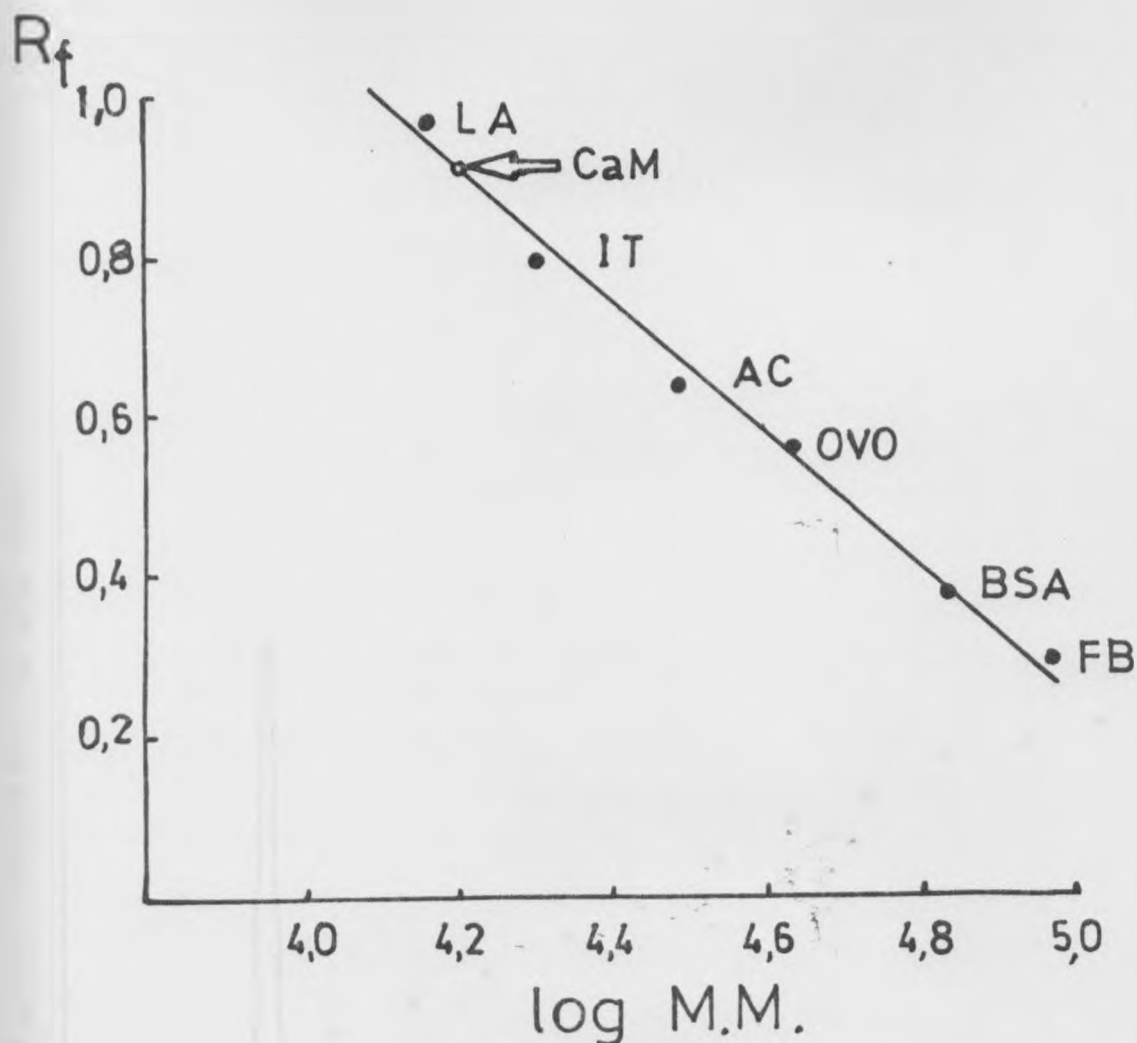


Fig. 21 : Determinación de la masa molecular de la calmodulina de S. tuberosum.

Electroforesis en geles de acrilamida en presencia de SDS. Como proteínas marcadoras de masa molecular se usó:

Fosforilasa B (FB) de M.M. 94,0 kDa.

Seroalbúmina (BSA) de M.M. 67,0 kDa.

Ovoalbúmina (OVO) de M.M. 43,0 kDa.

Anhidrasa carbónica (AC) de M.M. 30,0 kDa.

Inhibidor de tripsina (IT) de M.M. 20,0 kDa.

α-Lactoalbúmina (LA) de M.M. 14,4 kDa.

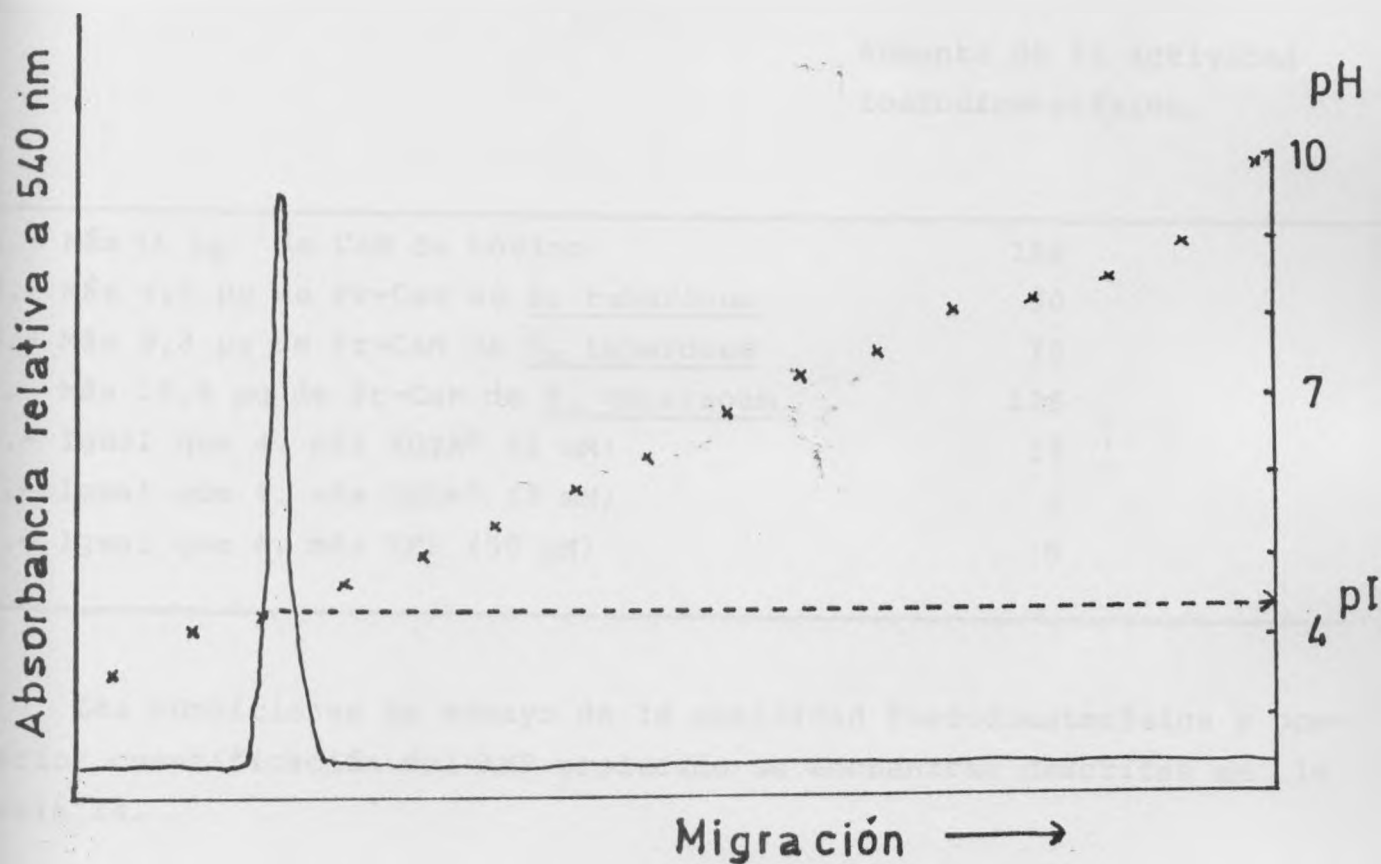


Fig. 22 : Electroenfoque en gel de poliacrilamida de la CaM.

Trazado densitométrico del gel teñido con azul de coomassie (—).

Perfil de pH (x x).

Tabla 16: Caracterización de la calmodulina de tubérculo S. tuberosum var. Ultimus.

Aumento de la actividad
fosfodiesterásica.

1.- Más 34 ng de CaM de bovino	188
2.- Más 4,9 µg de Fr-CaM de <u>S. tuberosum</u>	50
3.- Más 9,8 µg de Fr-CaM de <u>S. tuberosum</u>	75
4.- Más 19,5 µg de Fr-CaM de <u>S. tubersoum</u>	125
5.- Igual que 4. más EGTA ^a (1 mM)	28
6.- Igual que 4. más EGTA ^a (2 mM)	0
7.- Igual que 4. más TFP (50 µM)	0

Las condiciones de ensayo de la actividad fosfodiesterásica y posterior cuantificación del AMP producido se encuentran descritas en la Tabla 14.

^aEn el ensayo se eliminó el CaCl₂.

la acción de EGTA, o bien de TFP suprimen el efecto de la CaM de S. tuberosum sobre la fosfodiesterasa.

3.9. Caracterización de la Fr-A de las isoapirinasas

La Fr-A de la apirasa obtenida de la columna de TFP-Sepharose con NaCl 0,5 M, fue analizada en cuanto a su pureza, a su especificidad frente a otras isoapirinasas y al efecto del EGTA y TFP sobre su acción estimuladora.

La Fr-A presentó varias bandas de proteínas por electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS y por electroenfoque entre pH 3,5 y 10 (fig. 23).

Esta fracción proteica estimuló las actividades ATPásica y ADPásica de las isoapirinasas Desirée, Pimpernel, Ultimus A y Ultimus B (dos isoenzimas presentes en el tubérculo de S. tuberosum var. Ultimus). Como se puede apreciar en la tabla 17, el efecto activador fue muy semejante en todos los casos, estimulando en forma pareja a las dos actividades enzimáticas, ATPásica y ADPásica de cada isoapirasa.

El efecto de cantidades crecientes de esta Fr-A sobre la apirasa Desirée se puede apreciar en la fig. 24. Ambas actividades enzimáticas, ATPásica y ADPásica, son estimuladas en forma creciente hasta una concentración de 50 µg de proteínas de la Fr-A agregada. Al adicionar una cantidad mayor, se produjo una inhibición del efecto inicial hasta llegar casi al valor basal de la apirasa. Estos resultados



Fig. 23 : Electroforesis en geles de poliacrilamida en SDS y electroenfoque de la fracción activadora de la apirasa.

- (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS.
- (B) Electroenfoque en gel de poliacrilamida al 10% con anfólitos de rango de pH entre 3,5 y 10.

TABLA 17: Efecto de la fracción activadora sobre las distintas isoapirasa.

Apirasa	Aumento de la Actividad	
	ATPasa %	ADPasa %
Desirée (1,2 µg) más Fr-A (40 µg)	76	59
Pimpernel (3,0 µg) más Fr-A (40 µg)	68	82
Ultimus A ^a (1,1 µg) más Fr-A (40 µg)	75	77
Ultimus B ^b (0,1 µg) más Fr-A (40 µg)	75	83
Ultimus (1,1 µg) A más Fr-A (40 µg) más EGTA 10 mM.	75	80
Desirée (1,2 µg) más Fr-A (40 µg) más TFP 0,5 mM.	18	24

Se realizó un control para cada enzima preincubando con 40 µg de BSA.

^a Isoapirasa aislada de S. tuberosum var. Ultimus de cuociente ATPásico/ADPásico cercano a 10.

^b Isoapirasa aislada de S. tuberosum var. Ultimus de cuociente ATPásico/ADPásico cercano a 2.

ACTIVACION

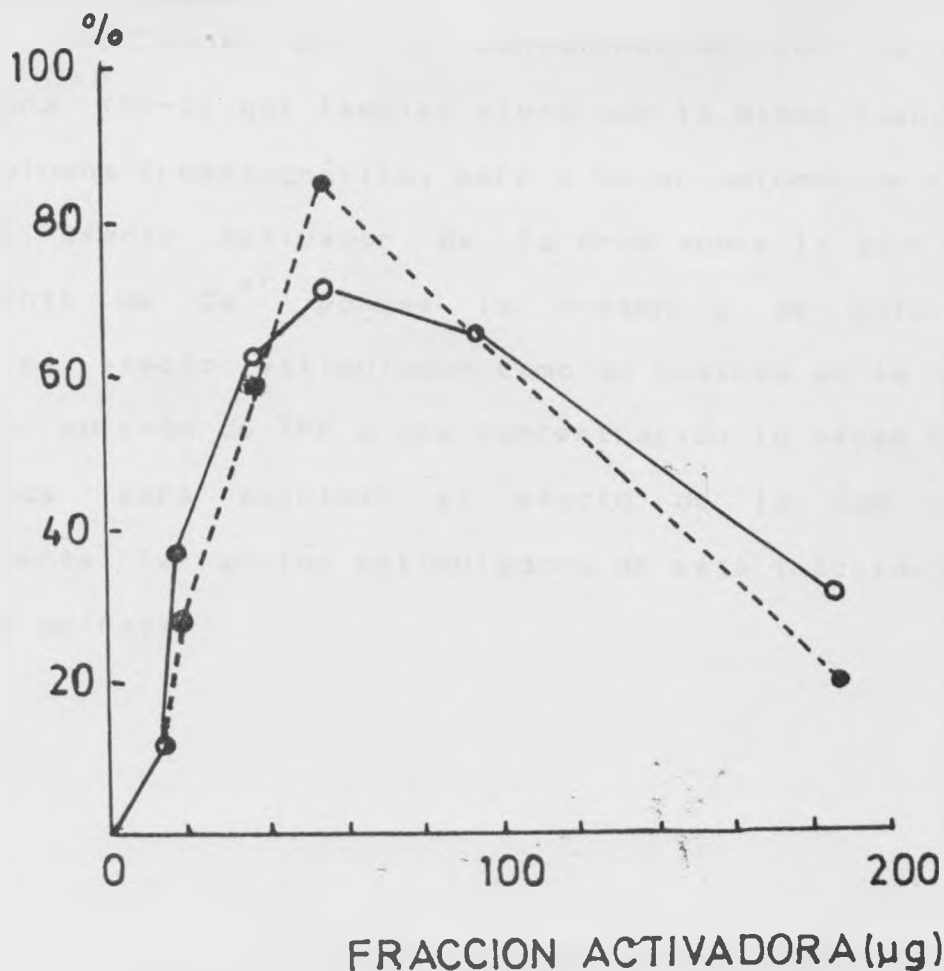


Fig. 24 : Efecto de la concentración de la fracción activadora sobre la actividad apirásica.

Se preincubó a 0° 5 μg de apirasa Desirée con cantidades crecientes de fracción activadora en presencia de NaCl 100 mM. El control para cada concentración usada se efectuó con una cantidad equivalente de BSA. El ensayo de la actividad apirásica de las respectivas alícuotas, se realizó en amortiguador succinato de sodio 100 mM pH 6,0; CaCl₂ 5 mM en presencia de ATP o ADP 2,0 mM.

•---• ATPasa o—o ADPasa.

podrían explicarse por la contaminación con la proteína inhibidora (Fr-I) que también eluyó con la misma fuerza iónica de la columna cromatográfica, pero a mayor volumen de elución.

El efecto activador de la Fr-A sobre la apirasa no es dependiente de Ca^{2+} porque la presencia de EGTA 10 mM no alteró el efecto estimulador como se observa en la tabla 17. Pero la adición de TFP a una concentración 10 veces mayor que la usada para suprimir el efecto de la CaM disminuyó parcialmente la acción estimuladora de esta fracción proteica sobre la apirasa.

DISCUSION

En el presente trabajo se han estudiado dos enzimas pirofosfohidrolásicas conocidas como apirasa, aisladas del tubérculo de dos variedades de S. tuberosum, Pimpernel y Desirée. Se ha tratado de esclarecer la posible función de los cationes bivalentes en la catálisis enzimática de los sustratos ATP y ADP, y por otra parte se ha investigado sobre la presencia de algún mecanismo regulador de las actividades hidrolíticas ATPásica y ADPásica de las isoapirasa.

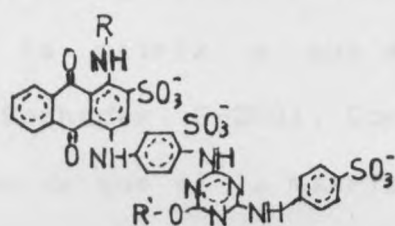
4.1. Ruta de purificación seguida para las isoapirasa.

La ruta de purificación seguida para aislar apirasa a partir de cualquiera de las dos variedades de S. tuberosum, Pimpernel y Desirée permitió obtener en forma reproducible las dos isoenzimas en estado homogéneo.

Cabe hacer notar que en ninguna de las etapas de purificación hubo disociación entre las actividades ATPásica y ADPásica. Esto se corroboró además por dos de los métodos electroforéticos empleados en que se ensayaron paralelamente las actividades ATPásica y ADPásica y hubo una estricta correspondencia con la banda de proteínas. Estos resultados confirmaron que las actividades ATPásica y ADPásica copurifican a lo largo de las distintas etapas de aislamiento, por lo que se concluye que corresponden a una sola enzima

conocida como apirasa.

Frente a la pregunta de si se puede considerar o no a la columna de azul de Cibacron-Sepharose como una cromatografía de pseudoafinidad para la apirasa, se estudió el efecto que tenía el azul de Cibacron-Sepharose solubilizado sobre una de las actividades apirásicas (ATPásica). El resultado mostró que el azul de Cibacron-Sepharose solubilizado, es un excelente inhibidor de tipo competitivo cuya K_i tiene un valor equivalente a la K_m del ATP para la isoenzima Desirée, lo que permite considerar esta cromatografía como de pseudoafinidad para la apirasa. La efectividad de esta columna cromatográfica podría explicarse por la posibilidad de que la apirasa tenga la misma especie de "pliegue dinucleotídico" que presentan diversas quinasas y deshidrogenasas (Ryan y Vestling, 1974; Easterday y Easterday, 1974; Thompson y col., 1975; Thompson y Stellwagen, 1976). La estructura antraquinónica del colorante calzaría por sus dimensiones moleculares en ese pliegue. Además, el grupo 1-amino de la antraquinona y el grupo sulfónico que está en la posición 2' del anillo de fenilendiamina, como se puede ver en la estructura del azul de Cibacron esquematizada a continuación, serían también los responsables de las interacciones altamente específicas con las enzimas (Bohme y col., 1972)



La apirasa, a diferencia de las quinasas y deshidrogenasas, no se pudo eluir de esta columna con el sustrato (ATP 10 mM), condición importante para clasificar esta cromatografía exclusivamente como una cromatografía de afinidad (Böhme y col., 1972; Easterday y Easterday, 1974; Ryan y Vestling, 1974; Thompson y col., 1975). Esta elución de la apirasa en forma inespecífica con alta fuerza iónica se puede explicar suponiendo que este "pliegue nucleotídico" no está igualmente definido para la apirasa, o que la matriz de polidextrano puede también estar participando en las interacciones inespecíficas con la enzima. Es igualmente importante de considerar el efecto de intercambiador iónico que puede tener este colorante por la presencia de los grupos sulfónicos, produciéndose así interacciones electrostáticas. Esta última suposición es factible puesto que la ruta de purificación anteriormente descrita en nuestro laboratorio terminaba con una cromatografía de intercambio iónico (Valenzuela y col., 1973). Sin embargo, la enzima proveniente de esta etapa de purificación presentó el inconveniente de ser muy inestable en el transcurso del tiempo, y por ello se trató de reemplazar esta etapa por otro tipo de cromatografía.

La suposición de que podrían haber además interacciones entre la enzima y la matriz misma de polidextrano, se basa en que la fosfofructoquinasa eluye con el sustrato o con fuerza iónica, según sea la matriz a que está unido el colorante (poliacrilamida o Sephadex G-200). Con la fosfofructoquinasa se llega al extremo de que si la matriz usada es celulosa, ni

el ATP ni la fuerza iónica permiten recuperar la enzima de la columna (Böhme y col., 1972).

A partir del momento en que se dispuso en el laboratorio de numerosas variedades clonales de S. tuberosum, se decidió que era indispensable elegir una determinada variedad para preparar apirasa homogénea. Esto se debe a que tanto el pI como el cuociente hidrolítico (ATPasa/ADPasa) de la apirasa parcialmente purificada dependían de la variedad de la cual se aislaba (Traverso-Cori y col., 1970; Carrasco, 1973).

En las variedades de S. tuberosum Pimpernel y Desirée se ha encontrado sólo una enzima con actividad apirásica; en cambio en la variedad Ultimus aparentemente hay dos isoenzimas con características cinéticas y de carga distintas (Urna, 1985). Todas estas apirasas poseen masa molecular semejante (49 kDa), pero diferente pI, por lo que se las puede considerar isoenzimas según la definición para isoenzimas vegetales (Market, 1975).

El pI de la apirasa aislada a partir del tubérculo de S. tuberosum depende de la variedad de papas de donde proviene. Por medio del electroenfoque se encontró que la apirasa Pimpernel es más alcalina, (con un pI de 8,24) que la isoenzima Desirée, que presenta un pI de 6,69. A su vez la isoenzima Ultimus A (con cuociente ATPásico/ADPásico cercano a 10) tiene un pI de 6,56 y la isoenzima Ultimus B (con cuociente ATPásico/ADPásico de 2) presenta un pI de 5,58 (Urna, 1985).

4.2. Propiedades cinéticas de las isoapirinasas Pimpernel y Desirée.

La apirasa se puede clasificar dentro del tipo de enzimas que son activadas por metales y que por lo tanto son inactivas en ausencia de ión metálico agregado. Al considerar la reacción hidrolítica de nucleótidos catalizada por esta enzima, hay que tener en consideración que de acuerdo con el pH en que se trabaje, hay presente distintas formas iónicas del nucleótido, las que a su vez están complejadas con el ión metálico agregado. En muchas de las reacciones en que participan fosfotransferasas se ha encontrado un efecto inhibitorio a ciertas concentraciones de M^{2+} y/o nucleótidos libres que están presentes junto con el complejo metal-nucleótido (Morrison, 1979). El metal bivalente puede actuar como activador o como inhibidor de la reacción; en cambio el sustrato libre es más probable que sea inhibidor por su capacidad de formar un complejo de fondo de saco con la enzima al unirse al sitio de unión del complejo metal-sustrato (Morrison, 1979).

El exceso de nucleótido y de Ca^{2+} o Mg^{2+} no presenta ningún efecto inhibitorio sobre las apirinasas Pimpernel y Desirée, en cambio, otros metales bivalentes como Mn^{2+} y Zn^{2+} inhiben parcialmente a concentraciones superiores a 2 mM (Fanta, 1982).

Para llegar a conocer la función que podría desempeñar el catión bivalente en la hidrólisis de los sustratos ATP y

ADP catalizada por las apirinas Pimpernel y Desireé, se trató de dilucidar el esquema de coordinación de la enzima con el ión metálico y con el sustrato.

Por lo general, las enzimas activadas por iones metálicos bivalentes poseen estequiometrías simples en sus complejos ternarios, donde enzima, catión y sustrato tienen una relación 1:1:1 (Mildvan, 1970). Los sustratos que participan en este tipo de complejos son generalmente ATP y ADP, derivados pirofosforilados con alta afinidad por los iones metálicos bivalentes (Phillips, 1966).

Se pueden distinguir, en general, tres esquemas de coordinación posibles para las enzimas activadas por iones metálicos que forman complejos 1:1:1 de enzima, ión metálico y sustrato (Mildvan, 1970):

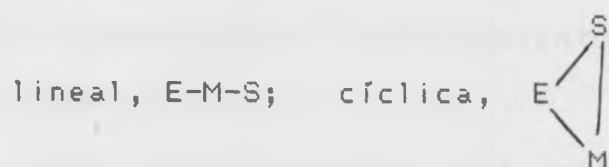
a) Complejo en que el sustrato hace de puente



b) Complejo en que la enzima hace de puente



c) Complejos en que el ión metálico hace de puente en dos formas



Estudios posteriores que incluyen la estimación de las distancias entre el ión metálico y el sustrato, y el uso de los complejos estables de ATP con Cr(III), permitieron describir dos esquemas de coordinación adicionales; d) complejo

de la segunda esfera, $E-M(L)S$, donde L , un ligando de la esfera interna (primera) del ión metálico unido a la enzima, está unido al metal y al sustrato, y e) complejo metálico dual, $E-M(L)S-M$ (Mildvan, 1979).

Los datos obtenidos con diversas enzimas que catalizan reacciones en que participa el ATP y las respectivas transferencias de grupos fosforilos, muestran que la mayoría de ellas presentan esquemas en que hay una coordinación directa del ATP con el ión metálico (Mildvan, 1979).

Las técnicas utilizadas para determinar los esquemas de coordinación de los complejos ternarios, enzima, ión metálico y sustrato, se han dividido en dos grupos: 1) técnicas preliminares que incluyen estudios cinéticos y de unión y 2) técnicas confirmatorias de espectroscopía de resonancia magnética. Este segundo grupo comprende: a) los estudios de aumento de la relajación de núcleos determinados del sustrato o análogos (1H , ^{13}C o ^{19}F) y de los protones del agua por efecto de un metal paramagnético unido a la enzima, $(Mn(H_2O)_6^{2+})$ y b) la sensibilidad del espectro de ESR del $Mn(H_2O)_6^{2+}$ a la alteración del campo de ligandos por unión con una enzima, provocando cambios en el desdoblamiento hiperfino del espectro (Mildvan, 1979).

En esta tesis se abordó la interrogante del esquema de coordinación correspondiente a la apirasa, mediante estudios cinéticos y de ESR (estos se discuten más adelante en la sección 4.3.)

Los estudios cinéticos, a pesar de que generalmente no

son concluyentes, proporcionan pruebas que permiten descartar algunos de los esquemas. Estos estudios cinéticos se enfocaron desde dos puntos de vista: a) la determinación de los parámetros cinéticos para el sustrato (ADP) y para el Ca^{2+} ; b) el efecto sobre la actividad apirásica de un análogo de metal-sustrato inerte a los intercambios de ligando, como es el Cr(III)-ATP .

4.2.1. Parámetros cinéticos para ADP y Ca^{2+}

Dixon y Webb (1979) deduciendo las ecuaciones para el caso en que el verdadero sustrato es el complejo metal-sustrato, demostraron que se deben esperar los mismos valores de K_m y V_m , tanto para el sustrato como para el metal.

$$v = \frac{k[e]}{1 + \frac{K_0}{[a][S]} + \frac{K_{AS}}{[a][S]}} \quad (\text{Ec.6})$$

$[e]$ = concentración total de enzima

$[a]$ = concentración ión metálico libre

$[S]$ = concentración de sustrato libre

K_0 = constante de disociación metal-sustrato

K_{AS} = constante de disociación enzima-

(complejo metal-sustrato)

k = constante catalítica

La presente tesis muestra correspondencia en los valores de K_m y V_m para Ca^{2+} y ADP con la apirasa Desirée a pH 6,0. La linealidad y correspondiente superposición de los gráficos de S/v en función de la concentración de sustrato total con el de M^{2+}/v en función de la concentración del ión metálico total, permiten concluir además, que no hay efecto inhibitorio por el nucleotido ni por el ión calcio libre (Morrison, 1979).

Estos resultados concuerdan plenamente con los obtenidos para la enzima Pimpernel efectuados a diferentes pH por Donoso (1976) en este laboratorio. Estos experimentos apoyarían la hipótesis de trabajo en cuanto a que la forma activa del sustrato es el complejo nucleotido-metal en relación 1:1.

Con el propósito de calcular la concentración real de Ca-ADP se midió la constante de asociación de este complejo en las mismas condiciones de pH y fuerza iónica en que se realizaron los estudios cinéticos, como aconsejan O'Sullivan y Smithies (1979). Con anterioridad en el laboratorio se había determinado la constante de asociación para Ca-ADP a pH 8,0 por el método de filtración en Sephadex G-10, encontrándose un valor de $2300\ M^{-1}$ (Donoso, 1976), valor que está de acuerdo con los informados en la literatura y determinados por otros métodos (O'Sullivan y Perrin, 1964). Por eso se utilizó también esta técnica para conocer el valor de esta constante a pH 6,0 y para corroborar los datos obtenidos, se determinó también por titulación directa mediante un electrodo selectivo para Ca^{2+} .

Se hizo necesaria la determinación de este valor en las

mismas condiciones del ensayo enzimático (MES 100 mM pH 6,0), principalmente por dos razones. La primera de ellas se basa en que en la literatura se encontraron datos de constantes de asociación entre ADP y Ca^{2+} sólo a pH cercanos o superiores a 8,0 en que existe la forma trianiónica del ADP ($\text{pK}_{a2} = 6,44$). También hay valores de constantes a pH 5 e inferiores, en que predomina la forma dianiónica ($\text{pK}_{a1} = 3,93$). Si se consideran estos valores de pK_{a1} y pK_{a2} (Taki Khan y Martell, 1962) para los dos grupos fosforilos del ADP se puede calcular que a pH 6,0, en que la apirasa Desirée presenta su máxima actividad, existe un 73% de la forma dianiónica y un 26,6% de la forma trianiónica de esta sustancia. Por lo tanto, la constante de asociación a pH 6,0 refleja una mezcla de las constantes de asociación de las especies dianiónica y trianiónica con Ca^{2+} . Con los valores de la literatura de constantes de asociación metal-nucleotido y los valores de pKa se podría haber calculado la constante de asociación de estos complejos Ca-ADP di y trianiónicos. Pero se prefirió determinar la constante a pH 6,0 debido a que los valores descritos en la revisión de Phillips (1966) presentan una enorme variabilidad, inclusive a un mismo pH, dependiendo de las condiciones experimentales de trabajo, tipo de amortiguador, fuerza iónica y también del método utilizado para su determinación.

Con el valor de la constante de asociación obtenida para Ca-ADP a pH 6,0 (alrededor de 640 M^{-1}) se calculó la K_m del complejo Ca-ADP para la enzima Desirée, obteniéndose un valor de 40 μM .

Como se señaló en la sección 3.2, no fue posible la determinación de estos parámetros para Ca^{2+} en presencia de ATP como sustrato, dado que la K_m para este nucleótido es cinco veces menor por lo cual la K_m del metal se encontraría dentro de la concentración contaminante de Ca^{2+} y/o Mg^{2+} . El intento de reducción de esta contaminación con EDTA no resultó ser consistente por la irreproducibilidad de los datos logrados.

No obstante, es posible suponer que la hidrólisis enzimática de ATP y ADP catalizada por la apirasa en presencia de Ca^{2+} procedería por el mismo mecanismo. Por lo tanto, con estos resultados se podría clasificar a la apirasa dentro de las enzimas en que el verdadero sustrato es el complejo de coordinación nucleótido-metal (1:1). Además, por los resultados obtenidos con Cr(III)-ATP que se discuten a continuación, es posible postular que el nucleótido haría de puente entre la enzima y el ión metálico.

4.2.2. Interacción del Cr(III)-ATP con la apirasa

El método cinético propuesto por Dixon y Webb (1979) no permite distinguir si el complejo sustrato-metal se combina con la enzima a través del ión metálico o del sustrato. En el caso de la apirasa, esta pregunta se resolvió utilizando el complejo inerte Cr(III)-ATP . Los nucleosidos trifosfatos de Cr(III) han resultado ser excelentes inhibidores de "fondo de saco" de varias enzimas que transfieren grupos fosforilos (Janson y Cleland, 1973; Dannenberg y Cleland, 1975) puesto

que se parecen al sustrato.

En la mayoría de las enzimas estudiadas, el Cr(III)-ATP es un inhibidor de tipo competitivo respecto al verdadero sustrato $\text{M}^{2+}\text{-ATP}$. La fuerte unión de estos complejos de Cr(III) con las quinasas, a pesar de la inercia química del Cr^{3+} sugiere que la interacción con el sitio activo de las enzimas se efectuaría principalmente a través de los oxígenos de la cadena pirofosfórica, y no por coordinación a través del ión metálico. En cambio, cuando la enzima interactúa con el sustrato a través del ión metálico, como en el caso de la pirofosfatasa inorgánica de levadura, los complejos de pirofosfato de Cr(III) , no son inhibidores (Sperow y Butler, 1976).

Este análogo del complejo metal-nucleótido es un inhibidor de tipo competitivo de las actividades ATPásica y ADPásica de las dos isoenzimas de la apirasa estudiadas. A través de los valores del parámetro K_i , se observó que el Cr(III)-ATP se une más firmemente a la isoenzima Desirée que a la isoenzima Pimpernel.

La conclusión general, que se desprende del efecto inhibitorio del Cr(III)-ATP sobre las isoapirinasas de S. tuberosum es que estas isoenzimas no interactúan con el sustrato a través de la primera esfera de coordinación del ión metálico. La unión con el complejo metal-nucleótido podría ser a través de los oxígenos de la cadena pirofosfórica o bien del anillo de purina. No obstante, es posible descartar la importancia de la interacción con el núcleo de purina por las

tres razones siguientes: 1) por datos obtenidos en el laboratorio se ha visto que los derivados de cromo de piro y tripolifosfato inorgánicos también son inhibidores de la apirasa (datos no publicados); 2) los valores de K_m para ADP y tripolifosfato inorgánico son del mismo orden (Kettlun y col., 1981) y 3) la apirasa presenta una gran inespecificidad frente a la porción orgánica del sustrato (Aron y col., 1974; Del Campo y col., 1977).

Por otro lado, no se obtuvo ninguna conclusión en cuanto a si el Cr(III)-ATP es o no sustrato de la apirasa, puesto que no se efectuaron experimentos de un ciclo catalítico, en que los productos no abandonan la enzima por quedar coordinados al Cr(III) .

Se ha demostrado en diversas enzimas que utilizan ATP como sustrato, que alguno de los distintos diastereómeros de Cr(III)-ATP , bi o tridentados son sustratos (Danenberg y Cleland, 1975; Bossard y col., 1980; Dunaway-Mariano y Cleland, 1980a; Frasch y Selman, 1982). El método de síntesis del complejo de cromo descrito por DePamphilis y Cleland (1973) utilizado en esta tesis da alrededor de un 75% de la especie tridentada (α , β y γ) siendo el 25% restante el complejo β , γ -bidentado, según fue demostrado posteriormente por Danenberg y Cleland (1975).

Entre las diversas enzimas ensayadas se ha encontrado que la especie tridentada es sustrato del factor 1 de acoplamiento del cloroplasto ATPasa CF_1 (Frasch y Selman, 1982); a su vez la especie bidentada es sustrato de la

hexoquinasa (Danenberga y Cleland, 1975), de la piruvato quinasa (Dunaway-Mariano y col., 1979), y de la fosfofructoquinasa (Dunaway-Mariano y Cleland, 1980a). La ATPasa mitocondrial utiliza como sustrato tanto el complejo mono como el bidentado (Bossard y col., 1980). En cambio para otras enzimas, estos distintos complejos han resultado ser solo inhibidores y no sustratos; entre estas se pueden citar la fructoquinasa (Pecoraro y col., 1985), la creatín-quinasa y la arginín-quinasa (Dunaway-Mariano y Cleland, 1980a).

Como se mencionó anteriormente, estos complejos bi y tridentados de Cr(III)-ATP existen además en varias formas diastereoméricas (el tridentado tiene 4 formas y el bidentado dos formas, Δ y Λ). Cornelius y Cleland (1978) han separado estas distintas formas diastereoméricas mediante columnas de ciclohepta-amilosa.

En consecuencia, para demostrar o descartar que las distintas especies de Cr(III)-ATP son sustratos o inhibidores de la apirasa, deberían obtenerse en forma pura todos los posibles diastereoisómeros de las formas bi y tridentadas, como lo describe Dunaway-Mariano y Cleland (1980b). Luego habría que probar la formación del producto Cr(III)-ADP-Pi unido a la enzima, lo que se hace desnaturando la enzima por calentamiento en presencia de EDTA, o por tratamiento a pH ácido para romper la coordinación del Cr(III) con el nucleotido y el Pi. Finalmente los productos se pueden identificar mediante algún tipo de cromatografía.

Como parte del mecanismo de ruptura del ATP y ADP

catalizada enzimáticamente, hay que considerar la ubicación del ión metálico en los distintos átomos de fósforo de los nucleótidos. En general, los desplazamientos nucleofílicos sobre el átomo de fósforo se pueden agrupar en dos clases de mecanismos, el disociativo o SN_1 y el asociativo o SN_2 (Mildvan, 1979). Mildvan (1979), propone tres criterios para determinar el mecanismo de las reacciones en que participa el ATP. Dentro de estos se encuentra la ubicación del ión metálico en el complejo activo. Se apoya la existencia de un mecanismo asociativo cuando el metal activador coordina al grupo fosforilo del ATP que va a ser sustituido, puesto que esta coordinación dificulta (inhibe) el otro mecanismo. El segundo criterio es conocer las distancias inter-sustratos en la enzima; esto se ha podido realizar mediante técnicas de relajación magnética nuclear con Mn^{2+} , Co^{2+} y complejos de $Cr(III)$. Finalmente, el tercer criterio es determinar la estereoquímica de la sustitución en el átomo de fósforo. El mecanismo disociativo se espera que ocurra con racemización en el fósforo; en cambio el asociativo ocurre con inversión o retención de la configuración (número par de inversiones) o una sustitución nucleofílica con pseudo-rotación del intermediario penta-coordinado. En este mecanismo, el estado de transición consiste en un fósforo penta-coordinado con geometría bipiramidal trigonal, estando los grupos saliente y entrante en las posiciones apicales (Eckstein, 1985).

Tanto el primer como el tercer criterio se pueden

abordar a) mediante el uso de los distintos diastereómeros de los complejos de Cr(III) y de Co(III), b) siguiendo por ESR la interacción del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ con los fosfatos del ATP en que se ha sustituido el ^{16}O por ^{17}O (Reed y Leyh, 1980; Eccleston y col., 1981; Leyh y col., 1982; Webb y col., 1982); y c) utilizando los análogos de fosforotioatos del ATP (Eckstein, 1985).

La utilidad de estos análogos fosforotioatos se basa en las observaciones hechas por espectroscopía de NMR de ^{31}P que demostraron que el Mg^{2+} , metal duro, coordina con el oxígeno; en cambio, un metal suave como el Cd^{2+} , lo hace con el azufre. A su vez otros cationes como Co^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , se encuentran en una situación intermedia. También se pueden utilizar derivados quirales de (^{18}O) -fosforotioatos de quiralidad conocida para determinar el curso estereoquímico de la reacción de transferencia de un grupo tiofosforilo terminal (Jarvest y Lowe, 1979).

Se ha demostrado que el curso estereoquímico de varias reacciones catalizadas enzimáticamente no cambia si se transfiere un grupo fosforilo o un tiofosforilo (Eckstein, 1985). Por lo tanto, los fosforotioatos, como análogos de ATP, han permitido contestar varias preguntas sobre el tipo de complejo metálico, mono, bi o tridentado utilizado por la enzima, además de dilucidar el curso estereoquímico de la reacción. Hay métodos de síntesis descritos para reemplazar tanto los oxígenos que no forman puente en las posiciones α , β , γ , como a un oxígeno que forma un enlace fosfato internucleotido. Estos reemplazos le otorgan quiralidad al

átomo de fósforo correspondiente, siendo algunos de los diastereoisómeros sustratos de varias enzimas (Eckstein, 1985).

4.2.3. Efecto de diversos iones metálicos bivalentes sobre la actividad apirásica

Además del Ca^{2+} se vió que varios otros iones metálicos bivalentes podían actuar estimulando la hidrólisis enzimática de los enlaces pirofosfóricos del ATP y ADP. Entre ellos Mn^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} y Zn^{2+} , resultaron ser los iones metálicos más efectivos para la apirasa. El hecho que otros iones metálicos bivalentes, aparte del Ca^{2+} , activen a la apirasa concuerda con la proposición de que el ión metálico no hace de puente, pues en estos casos hay diferencias más notorias en cuanto a especificidad que lo encontrado en el caso de las apirinas. Generalmente se ha observado que el Ca^{2+} es un inhibidor de las enzimas en que el ión metálico hace de puente, en cambio activa a las enzimas en que el sustrato hace de puente (Mildvan, 1970). Pero se han descrito algunas hidrolasas activadas por Ca^{2+} en que este catión se une directamente a la enzima. Por ejemplo, la nucleasa de estafilococo, en que por estudios cristalográficos se ha demostrado la formación de un complejo cíclico entre la enzima, el catión y el polinucleotido (Mildvan, 1970).

Lo que más llama la atención sobre el efecto de los iones metálicos en la catálisis enzimática de la apirasa, es

que algunos de ellos hacen cambiar el cociente ATPásico/ADPásico si se comparan con el encontrado en presencia de Ca^{2+} . En la enzima Pimperl, el Mn^{2+} y el Cd^{2+} producen un gran aumento de la actividad ADPásica con respecto al Ca^{2+} en comparación con la ATPásica, dando como resultado una baja del cociente ATPásico/ADPásico. Por otra parte, estos mismos cationes bivalentes (Mn^{2+} y Cd^{2+}) en la isoenzima Desirée produjeron un aumento de la actividad ATPásica con respecto al Ca^{2+} , sin variar significativamente la ADPásica, logrando así un incremento del cociente ATPásico/ADPásico. Se hace difícil comprender por que los complejos Mn-ATP y Cd-ATP son mejores sustratos para la enzima Desirée y los correspondientes derivados difosforados Mn-ADP y Cd-ADP lo son para la apirasa Pimperl.

En consecuencia, estos resultados cinéticos no pueden atribuirse exclusivamente al sustrato (complejo metal-nucleotido) sino que también a diferencias estructurales tridimensionales adquiridas por ambas enzimas al unir los distintos sustratos. Estas diferencias podrían ser sólo de tipo conformacional o por diferencias en los sitios activos. Es posible hacer este último comentario puesto que, como se describió en la Introducción (sección 2B), los estudios comparativos efectuados con modificadores químicos de residuos de aminoácidos mostraron que hay diferencias en el sitio activo de ambas isoenzimas (Kettlun y col., 1981, 1982).

Se ha tratado de explicar estas diferencias cinéticas con los cationes ensayados, correlacionando los datos de

velocidad, con el radio iónico del catión, con la constante de asociación nucleotido-metal y con la electronegatividad. Este último parámetro está relacionado con la capacidad del catión de polarizar el grupo fosforilo terminal del ATP o ADP, aumentando así su electrofilia. Este aspecto se trató de homologar con los resultados obtenidos por Gupta y col. (1976); estos autores encontraron una correlación entre la electronegatividad del metal y la velocidad enzimática de enolización del piruvato en presencia de ATP. Estos autores emplearon como medida de electronegatividad los valores de pK_a del agua de coordinación unida al ión metálico, encontrando que la velocidad de enolización del piruvato disminuía al aumentar el pK_a .

En el caso de las isopirinasas Pimpernel y Desirée no se encontró relación alguna entre velocidad enzimática y el parámetro termodinámico pK_a del agua de coordinación de los cationes bivalentes. Tampoco se encontró correspondencia entre el radio iónico o la constante de asociación nucleotido-metal con la velocidad enzimática.

Finalmente, si se considera que la velocidad limitante de la reacción es la disociación del catión coordinado al nucleotido, se debió haber obtenido la siguiente secuencia de activación por cationes bivalentes: $Ca > Zn > Mn > Co > Mg > Ni$, secuencia que corresponde al inverso de la estabilidad del complejo (Eigen y Hammes, 1963; Mildvan, 1970). Como se aprecia en las tablas 7 y 8, los resultados obtenidos con las apirinasas Pimpernel y Desirée no corresponden a esta secuencia,

por lo que se descarta que la velocidad limitante de la reacción sea la sustitución del ligando unido al grupo fosfato por una molécula de agua durante la reacción hidrolítica catalizada por la apirasa.

La estructura tridimensional del sustrato nucleotido-metal varía de acuerdo con el catión. Datos de la literatura indican que los iones metálicos ensayados podrían coordinarse con los tres fosforilos del ATP además del N⁷ del anillo de la adenina (Mildvan, 1970; Huang y Tsai, 1982), exceptuando al Ca^{2+} . Hay datos que indican que este último liga solamente a los dos fosforilos terminales de estos nucleotidos. Otra diferencia espacial de estos complejos obtenidos por estudios cristalográficos señala que, las formas bote de estos complejos, pueden ser sesgadas o eclipsadas de acuerdo a si el radio iónico del catión es mayor de 1 Å (Mg, Co, Ni, Cu, Zn), o si es menor de 1 Å (Ca, Sr, Cd) respectivamente (Mildvan, 1970).

A través de estas descripciones sobre las características estructurales del sustrato para las apirasas, se puede sugerir que las isoapirasas actuarían preferencialmente sobre complejos nucleotido-metal unidos por dos ligandos, con una conformación bote eclipsada, características que corresponden a los complejos ATP o ADP con calcio. Las dos excepciones a esta generalización son los complejos con Mn^{2+} o bien con Cd^{2+} para los cuales no se ha encontrado aun ninguna interpretación.

Al hacer un análisis comparativo en cuanto a la

dependencia de metal bivalente de la apirasa con otras ATPasas vegetales, se puede apreciar que las ATPasas al igual que la apirasa (ATPasa-ADPasa), requieren de los complejos nucleotido-metal, y es frecuente encontrar a los complejos CaATP o bien MgATP como los mejores sustratos (Kähr y Möller, 1976; Caldwell y Haug, 1980). Los estudios realizados en gramíneas mostraron además que tanto el ATP como los metales libres, Ca^{2+} y Mg^{2+} son inhibidores de la actividad enzimática. Estos efectos inhibitorios no se han encontrado en las apirasas Pimpernel y Desirée. Probablemente estas ATPasas vegetales de gramíneas presentan además del sitio de unión para el complejo nucleotido-metal, sitios de unión adicionales para metal y nucleotido libres. Estos autores han encontrado también una secuencia de efectividad producida por los metales bivalentes diferente a la encontrada para las isoapirasas de S. tuberosum, pero en ambos casos el Ca^{2+} es el catión bivalente que provoca el mayor efecto activador.

Otra diferencia importante entre las apirasas de S. tuberosum (solubles) con las ATPasas vegetales presentes en fracciones microsomales de gramíneas, es que estas últimas muestran a ciertas temperaturas una cinética no michaeliana (Caldwell y Haug, 1981). En cambio, la apirasa no muestra variaciones de este tipo en esos rangos de temperatura (Kettlun y col., 1982).

Hay datos que indican que el nivel de nutrición mineral de raíces de trigo y avena es un factor determinante en las

características cinéticas de las ATPasas que participan en el transporte de iones (Kylin y Kahr, 1973). Esto se explica porque debido a la adaptación, las funciones fisiológicas de un organismo son absolutamente dependiente del medio ambiente y en forma especial las de los vegetales (Kylin y Kähr, 1973).

Por otro lado, comparando con una de las apirasa de origen animal, como es la de páncreas de cerdo que es la única estudiada cinéticamente hasta ahora, se encuentra una diferencia notoria puesto que el ATP es hidrolizado a un 50% de la velocidad del Ca-ATP y Mg-ATP, siendo los valores respectivos de Km para ATP y M^{2+} -ATP semejantes entre si (Laliberte y col., 1982). En cambio, la apirasa de S. tuberosum prácticamente no presenta actividad ATPásica o ADPásica en ausencia de ión metálico.

Por todos los aspectos descritos, es posible apreciar diferencias cinéticas significativas entre ATPasas vegetales, apirasa animal y apirasa de S. tuberosum.

No hay datos suficientes en la literatura que permitan hacer una comparación en cuanto a la especificidad de catión bivalente con las otras apirasa (ATPasa/ADPasa) vegetales solubles y ligadas a membrana mencionadas en la Introducción.

4.3. Interacción de cationes bivalentes con la apirasa

Por el efecto inhibitorio del Cr(III)-ATP se ha deducido que el catión bivalente que compleja al nucleotido, para formar el verdadero sustrato, no interacciona con la apirasa.

Otro hecho que apoya esto mismo, mencionado en la sección 4.2.3., es que las enzimas en que el catión hace de puente suelen ser inhibidas por Ca^{2+} , catión que ha resultado ser el más efectivo para activar a esta enzima.

Sin embargo, tampoco se puede descartar, por los resultados cinéticos obtenidos, la participación de otra molécula de ión metálico bivalente unida directamente a la enzima, como es el caso de la piruvato quinasa. Se ha demostrado por estudios de relajación magnética nuclear que ninguno de los tres fosforilos del ATP están coordinados directamente al catión bivalente (Mn^{2+} , Co^{2+}) unido a la piruvato quinasa, pero sí forman complejos de segunda esfera (Mildvan y col., 1973; Mildvan, 1979).

Para contestar más claramente la interrogante referente al esquema de coordinación de la apirasa, el ión metálico y el nucleótido, se utilizó la técnica de resonancia magnética del espín electrónico (ESR) del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ considerando el hecho que la apirasa hidroliza el complejo Mn-ATP. Esta técnica confirmatoria, de acuerdo con la nomenclatura usada por Mildvan (1970), es útil para demostrar la existencia de complejos en que el sustrato hace de puente y en que participan nucleosidos di y trifosfatos. En este caso se espera encontrar una identidad entre los espectros de ESR del complejo binario, Mn-sustrato y el del respectivo complejo ternario, Mn-sustrato-enzima. En cambio, la reducción de la amplitud de las 6 líneas del espectro de la solución de $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ al agregar enzima, demuestra la formación de un

complejo binario E-Mn (Mildvan, 1970).

El diseño experimental inicial con la apirasa tuvo por objeto comparar los espectros de una solución de manganeso en presencia de esta enzima, y también de la enzima junto al pseudosustrato AMP-PCP, que es un buen inhibidor de tipo competitivo de ambas actividades hidrolíticas de la apirasa. Los resultados mostraron que la apirasa une directamente el metal en ausencia de sustrato, pues se observó una alteración notoria en el espectro de $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ junto con una disminución de la amplitud de las 6 líneas. Esta alteración del espectro se interpreta como un cambio en la simetría electrónica del Mn^{2+} hexahidratado, lo que en otras palabras significa que la primera esfera (o esfera interna) de coordinación del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ unido a la enzima se ha distorsionado por la formación del complejo binario Mn-enzima (Reed y col., 1971). Las grandes desviaciones de la simetría cubica producen transiciones fuera de la región isotrópica con la consiguiente "disminución" del espectro, puesto que las intensidades espectrales se extienden en un rango amplio y aparecen en varios miles de gauss. Hay varios ejemplos conocidos de distorciones de los complejos de Mn(II) con proteínas (Reed y Ray, 1971; Reed y Cohn, 1973; Haffner y col., 1974; Buttlaire y col., 1975; Villafranca y col., 1976). Estos resultados encontrados con la apirasa Desirée que muestran la unión directa del catión bivalente, Mn^{2+} , hicieron pensar inicialmente que la apirasa es un ejemplo de complejo metálico dual (sección 4.2., esquema e).

Se midió un valor aproximado de constante de asociación

Mn-apirasa a través del espectro de este complejo binario, encontrándose que la afinidad de esta apirasa por el Mn^{2+} es comparable con la de los sustratos ATP y ADP complejados con Ca^{2+} . La etapa siguiente fue medir el espectro del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ en presencia de AMP-PCP y apirasa; pero esta etapa se vio imposibilitada de realizar por la escasa sensibilidad del instrumento, ya que el espectro del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ con AMP-PCP mostró una gran alteración, siendo necesario para seguirlo agregar cantidades milimolares de $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ y AMP-PCP. Para estudiar el efecto de la apirasa sobre el espectro de este complejo binario (Mn-AMP-PCP), se habría requerido agregar apirasa pura también en ese mismo rango de concentración (milimolar), lo cual hizo impracticable el experimento.

Aunque no fue posible corroborar el esquema de coordinación entre la enzima, el sustrato y el catión a través de esta técnica de resonancia magnética, se encontró inesperadamente que el complejo binario apirasa-Mn presenta el fenómeno de histéresis. La apirasa une, en ausencia de nucleotido, también otros cationes bivalentes aparte del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, como son Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , y Zn^{2+} ; esto se puso en evidencia cuando se empezó a estudiar el fenómeno de histéresis en ambas isoapirasas (Pimpernel y Desirée) al preincubarlas con cualquiera de los cinco iones metálicos antes señalados. Por los estudios adicionales de ESR se vio que el grado de interacción entre el $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ y la enzima Desirée es mayor que el correspondiente al ión calcio, puesto que este último catión no fue capaz de desplazar al $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$.

del complejo binario con la enzima, en ausencia de sustrato. Además, con EDTA desaparecen del espectro de ESR las seis señales del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ libre y la señal a campo bajo que pone en evidencia la existencia del complejo Mn-enzima.

La aparición del fenómeno de histéresis en las isoenzimas complejadas con metales bivalentes, aunque no podría asegurársele un significado fisiológico, resultó ser una buena herramienta para corroborar que la apirasa liga un ión metálico en ausencia del sustrato.

Según Frieden (1970) este comportamiento puede deberse a tres causas, como se señaló en la sección 3.4.2. De estas tres posibilidades, se descartó el cambio del estado de agregación de la enzima porque no hubo modificación de la masa molecular de la apirasa. Desirée en condiciones de histéresis. La otra posibilidad es un mecanismo de desplazamiento del ligando, lo cual concuerda con la desaparición de la histéresis al ensayar la apirasa con concentraciones crecientes de sustrato (Ca-ATP y Ca-ADP). Este fenómeno deja de ser observado a concentraciones de Ca-ATP superiores a 0,1 mM (Fig. 17). Hatfield y col. (1970) también proponen modelos cinéticos que se ajustan al desplazamiento de un ligando fuertemente unido a la enzima. De los diversos modelos propuestos por Hatfield y col. (1970) solo uno de ellos se ajusta a los resultados experimentales obtenidos con la apirasa.

Como se esquematizó en la sección 3.4.5., el modelo propuesto considera sitios de unión distintos para el ligando inhibidor (catión bivalente) y el sustrato (metal-nucleotido),

siendo el sustrato el ligando que desplazaría al inhibidor unido. La ecuación desarrollada para este modelo predice la dependencia lineal entre la K_{ap} (velocidad con que se alcanza el régimen estacionario) y la concentración de sustrato, situación que se encontró para la apirasa.

Los análogos del sustrato Cr-ATP y AMP-PCP anulan la aparición del fenómeno de histéresis. Estos resultados no contradicen el modelo antes mencionado de la existencia de sitios de unión distintos para el ión metálico y nucleótido metal, puesto que se puede postular que la unión del sustrato produce un cambio conformacional en la enzima tal, que altera el sitio de unión para el ión metálico libre. Por lo tanto, de las tres causales de aparición de histéresis propuestas por Frieden (1970) y por Hatfield y col. (1970) la que se ajusta mejor en la apirasa a los datos experimentales es la del desplazamiento de un ligando fuertemente unido a la enzima.

Cabe hacer notar que de los cationes probados, el Ca^{2+} y el Zn^{2+} son los que presentaron un efecto menor en el tiempo de retardo, en cambio el $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (para ambas actividades enzimáticas) y el Co^{2+} (más significativamente para la ATPasa) produjeron un período de retardo que alcanzó al minuto. Estos valores permitirían explicar por que el Ca^{2+} no pudo desplazar al $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ en los experimentos de ESR y a la vez, el desplazamiento del Ca^{2+} , que debió haber estado unido a la enzima en esas condiciones experimentales (sección 3.4.1.), por parte del $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$. Probablemente el mayor tiempo de retardo producido por este metal paramagnético en la

liberación del producto es también un reflejo de su fuerte interacción con la enzima. El hecho que el complejo binario apirasa-Mn²⁺ no presente actividad hidrolítica, descarta que el complejo de coordinación activo sea el complejo metálico dual postulado anteriormente.

Con estos resultados se consideró la posibilidad que la existencia in vivo de apirasa unida a algún metal bivalente fuera uno de los mecanismos reguladores de esta enzima. Por esta razón se cuantificaron las concentraciones totales de los nucleótidos ATP y ADP y de algunos metales (Ca, Mg, Co, Zn) en el tubérculo de S. tuberosum var. Désirée.

De las concentraciones relativas de estos metales analizados se desprende que el Mg²⁺ y el Ca²⁺ son los cationes que podrían estar participando in vivo, ya sea produciendo la forma activa del sustrato (complejo metal-nucleótido) o uniéndose directamente a la enzima para producir un efecto regulador sobre ella. No puede descartarse tampoco, que el Mn²⁺ sea el catión que regule directamente a la apirasa. Esto podría ocurrir, no obstante su concentración es uno o dos órdenes de magnitud menor respecto a Ca²⁺ y Mg²⁺, porque este catión se une más fuertemente a la apirasa.

Se podría especular que este modelo de regulación es factible si se supone que las concentraciones de los nucleótidos y de los cationes bivalentes encontrados en un homogeneizado de tubérculo de S. tuberosum reflejan las correspondientes al mismo compartimento en que se encuentra la apirasa. Se puede proponer en consecuencia, que los cambios de

niveles de algunos metales y de los nucleótidos ATP y ADP en el tejido del tubérculo podrían ser un mecanismo regulatorio. En este modelo se considerarían a los metales bivalentes que se unen a la apirasa (en ausencia de sustrato) como inhibidores, y a los complejos metal-nucleótido como activadores porque estos complejos desplazarían al metal unido (fenómeno de histéresis).

Sin embargo, no hay que olvidar que si la enzima se preincuba con el metal en presencia de análogos de sustrato no se observa aparición de histéresis, lo que indica que tal vez fisiológicamente este fenómeno no se lleva necesariamente a cabo en la célula. Pero también hay que tener presente que en la célula se pueden producir cambios en las concentraciones locales (distintos compartimientos) de nucleótidos y metales, por lo que es importante estudiar el fenómeno de histéresis en las condiciones más parecidas posibles a las que se producen in vivo para saber si tiene un significado fisiológico.

4.4. Interacción de la apirasa con algunas proteínas reguladoras en el tubérculo de S. tuberosum.

Se pensó que las isoapirasas fueran reguladas por calmodulina a semejanza con ATPasas vegetales (Dieter, 1984) y animales (Klee y col., 1980) a las que se las ha relacionado con el transporte de cationes. Muchos de los procesos ligados al ión calcio en tejidos vegetales se han podido relacionar con la calmodulina; si bien, no siempre se ha demostrado esta

situación en forma directa, se ha deducido a través del efecto de las drogas fenotiazínicas, antagonistas de la calmodulina (Dieter y Marmé, 1980; Cormier y col., 1982; Dieter, 1984).

Aparte de la acción estimuladora sobre ATPasas vegetales ligadas a membranas, se le reconoce a la calmodulina un efecto regulador sobre NAD-quinasa, quinato:NAD-oxido reductasa, proteína-quinasa (Dieter, 1984), aspartato-quinasa (Sane y col., 1984).

Las propiedades de la calmodulina de origen vegetal son muy semejantes a las de la calmodulina presente en animales (Anderson y col., 1980). Estas similitudes incluyen la unión dependiente de Ca^{2+} a drogas fenotiazínicas (trifluoperazina, flufenazina, clorpromazina), la masa molecular (entre 15 a 18 kDa), el punto isoelectrico (alrededor de pH 4,0), la composición de aminoácidos y su respectiva secuencia, la afinidad por Ca^{2+} y el grado de activación sobre las enzimas de origen animal y vegetal que se ha demostrado son moduladas por calmodulina (Dieter, 1984).

Este punto se enfocó aislando calmodulina del tubérculo de S. tuberosum siguiendo técnicas de aislamiento basadas en su estabilidad al calor, su precipitabilidad por sulfato de amonio y afinidad por drogas fenotiazínicas, propiedades utilizadas para la purificación de calmodulina de otros tejidos vegetales. La presencia de calmodulina en S. tuberosum ha sido sólo mencionada en una revisión de Wang y Waisman (1979) que describe su análisis electroforético a partir de un extracto en el que encuentran actividad

calmodulínica medida por su efecto activador de fosfodiesterasa de AMPc, dependiente de Ca^{2+} .

La presencia de actividad calmodulínica se detectó en S. tuberosum sólo después de concentrar el extracto por precipitación con sulfato de amonio. La fracción proteica parcialmente purificada, denominada Fr-50, presentó diversas características conocidas para calmodulina de origen animal y vegetal. Como se ha visto que los fosfolípidos pueden presentar también efecto estimulador sobre la fosfodiesterasa de AMPc, se probó la presencia de estos compuestos en la Fr-50. Anich (1984) descartó la contaminación con fosfolípidos por medio de cromatografía en capa fina y posterior revelado con el reactivo de Dittmer-Lester.

Llama la atención el efecto que tiene el EGTA sobre la acción de esta Fr-50, que no se comporta en la forma típica descrita en la literatura, puesto que la adición de concentraciones mayores de EGTA no logra reducir completamente la acción estimuladora. En cambio, la Fr-CaM (calmodulina homogénea) es afectada por este quelante suprimiendo completamente su actividad. Una explicación factible es que la Fr-50 tenga una alta contaminación con Ca^{2+} .

Como se mostró en la sección 3.7., se logró purificar a homogeneidad la calmodulina del tubérculo de S. tuberosum var. Desirée y var. Ultimus. Esta proteína presentó las características conocidas de la calmodulina proveniente de otras especies. Estas similitudes incluyen:

- a) masa molecular (17,5 kDa);
- b) pI (4,4);
- c) estabilidad al calor;
- d) capacidad de estimular a la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos en presencia de Ca^{2+} ;
- e) inhibición de su acción por trifluoperazina en una forma dependiente de Ca^{2+} .

Aunque no se hizo una curva completa de concentración de Fr-CaM para cuantificar su efecto sobre la fosfodiesterasa de AMPc, se observa que para alcanzar el 50% de la activación máxima lograda para esta enzima, hay que agregar una cantidad de proteínas considerablemente mayor comparada con la CaM de bovino (véase la tabla 16). En la literatura se menciona que la CaM de vegetales: arvejas, maní (Anderson y col., 1980), espinacas (Van Eldik y col., 1980), cebada (Schleicher y col., 1983) presenta la misma actividad biológica frente a la fosfodiesterasa de cerebro de porcino que la CaM del mismo tejido. Por lo tanto, esta actividad biológica tan baja encontrada de la CaM aislada de S. tuberosum implica que tiene que haber experimentado desnaturación durante alguna de las etapas seguidas para su purificación. No obstante su estabilidad al calor, puede ser necesario efectuar la purificación de esta proteína a 4° especialmente la etapa cromatográfica que es muy larga (varios días), y no a temperatura ambiente como se realizó.

No se hicieron mayores estudios con la CaM en relación a la cantidad de Ca^{2+} necesaria para lograr su máxima activación,

porque está descrito para la aislada de otras fuente vegetales que es del mismo orden que para la de origen animal (Anderson y col., 1980).

La calmodulina aislada del tubérculo de S. tuberosum purificada a homogeneidad, no presentó ningún efecto sobre la actividad enzimática de la apirasa al utilizarla a una concentración que activa a la fosfodiesterasa a un valor correspondiente al 65% de su actividad máxima. Estos resultados fueron confirmados al no encontrar ningún efecto con CaM de corazón de bovino a concentraciones 10 veces más altas que las necesarias para producir la máxima activación de la fosfodiesterasa (resultados no publicados). Tampoco se encontró interacción específica entre la apirasa y calmodulina unida a agarosa (resultados no publicados).

Con estos resultados se descartó la acción reguladora de la calmodulina sobre la apirasa a diferencia de las ATPasas vegetales relacionadas con el transporte de Ca^{2+} . Sin embargo, esto no descarta que la apirasa esté también implicada en el transporte de iones, ya que se ha descrito en vesículas purificadas de membranas de retículo endoplásmico de raíces de Lepidium sativum que el transporte de Ca^{2+} en esas vesículas es también independiente de calmodulina (Buckhout, 1984).

El efecto estimulador sobre la apirasa de la Fr-50 (fracción parcialmente purificada de CaM) se pudo explicar fácilmente al encontrarse una disociación de los efectos estimulantes sobre ambas enzimas (apirasa y fosfodiesterasa) al pasar esta Fr-50 por una columna cromatográfica considerada

de afinidad para la calmodulina (TFP-Sepharose). De esta columna eluyeron claramente separadas, mediante un brusco aumento de la fuerza iónica, una fracción activadora y otra fracción inhibidora de la apirasa y, finalmente al eliminar el Ca^{2+} de la columna con EGTA, se liberó la calmodulina en forma homogénea.

De las dos fracciones proteicas eluídas de la columna de TFP-Sepharose con NaCl 0,5 M, se caracterizó en forma parcial sólo la fracción activadora de la que se dispuso de mayores cantidades. En cambio, no se pudo estudiar mayormente la fracción inhibidora por la escasa cantidad que se obtuvo y por su baja estabilidad en cuanto al efecto inhibitorio sobre la apirasa. La fracción activadora presenta las propiedades típicas de una proteína: precipitabilidad con sulfato de amonio, reacción positiva frente al reactivo de Folin-Ciocalteu, la electroforesis en geles de poliacrilamida muestra bandas que se tiñen con azul de Coomassie, encontrándose el efecto activador asociado a una de las bandas de proteínas (Mancilla y col., 1986) y no es dializable. Es una proteína aun no homogénea por electroforesis en condiciones desnaturalantes y por electroenfoque. Esta fracción activadora parcialmente purificada, provoca un efecto estimulador de un 70% sobre las cuatro isoapirastas ensayadas y este efecto es independiente de Ca^{2+} . La trifluoperazina también inhibe, aunque a mayores concentraciones, la acción de la proteína activadora de la apirasa, acción que ocurre, a diferencia de la calmodulina, en ausencia de Ca^{2+} . Esto hace

suponer que esta droga fenotiazínica se une a esta proteína a un sitio de tipo hidrofóbico que tendría alguna similitud con el que se forma en la CaM al unirse el Ca^{2+} permitiendo así la unión con la trifluoperazina (Anderson y col., 1980).

Otra característica de esta fracción activadora encontrada posteriormente, es la probable participación de residuos de tirosina en la unión con la apirasa. Al explorar los posibles residuos de aminoácidos de esta fracción activadora importantes para su interacción con la apirasa, se ha encontrado que no hay participación de los grupos tiólicos porque el reactivo de Ellman no cambia las propiedades de esta fracción. En cambio, se sugiere que tiene residuos de tirosina esenciales para la interacción proteína-proteína, deducido del efecto inactivador del tratamiento con tetranitrometano previo a la unión con la apirasa (Mancilla y col., 1987).

La adición de cantidades crecientes de la fracción activadora parcialmente purificada sobre la apirasa Desirée produce inicialmente un aumento de su actividad, pero cantidades superiores a 50 μg de proteínas de esta misma fracción ya no fueron tan eficientes en su efecto estimulador (sección 3.9.2.). Estos resultados pueden explicarse por una contaminación con la fracción inhibidora, o bien porque esta fracción actúa en forma distinta a concentraciones elevadas.

No se intentó efectuar una posterior caracterización de estas fracciones proteicas hasta lograr obtenerlas en un estado de mayor pureza. Se las ha considerado proteínas reguladoras de las isoapirasas porque se encuentran presente

en el mismo tejido vegetal.

La presencia de estas dos proteínas reguladoras de las isoapirinas no había sido detectada antes porque en la etapa de fraccionamiento con sulfato de amonio se separan, quedando en el precipitado 0-40% de saturación que hasta ahora se había descartado. La existencia de estas dos proteínas reguladoras de la apirasa en el tubérculo de al menos dos variedades de S. tuberosum (Desirée y Ultimus), hace pensar que esta enzima debe tener una función importante en la célula. Junto con esto, hay pruebas obtenidas en este mismo laboratorio que indican que la apirasa aumenta su masa durante el desarrollo del tubérculo (Fanta, 1983). Su función en el tejido del tubérculo podría ser mantener un nivel adecuado de ADP intracelular ya que este tejido vegetal es muy deficiente en adenilato quinasa. La deficiencia en esta enzima se debe probablemente al escaso número de mitocondrias que tiene el tejido de S. tuberosum (comunicación personal de G. Laties a la Dra. A. Traverso). La apirasa proveería entonces el ADP y/o AMP necesarios para alguna vía metabólica. Este mismo tipo de función productora de ADP por la apirasa, ha sido propuesto por Ribeiro y col. (1984) los que encontraron apirasa en la glándula salival de insectos succionadores de sangre, siendo la función del ADP en este caso, impedir la agregación plaquetaria y por ende la coagulación, asegurando de esta forma la alimentación del insecto.

Otra alternativa de función fisiológica de la apirasa sería la participación en el transporte de iones, sugerido por

Vara y Serrano (1981) en vegetales y LeBel y col. (1980) en tejidos animales. Estos dos grupos independientemente han caracterizado apirasa unida a fracciones microsomales. Por la forma de extraer la apirasa de S. tuberosum se considera una proteína soluble; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que sea una proteína ligada débilmente a membranas.

Para afirmar una función celular de una enzima es importante conocer su localización intracelular. De aquí la necesidad de efectuar estudios futuros de fraccionamiento subcelular del tejido de S. tuberosum.

CONCLUSIONES

1.- Se ha logrado obtener en forma homogénea y estable dos isoenzimas de la apirasa a partir de dos variedades de tubérculo de S. tuberosum : Pimpernel y Desirée.

2.- La apirasa pertenece al grupo de enzimas que es inactiva en ausencia de algún ión metálico bivalente. Una amplia gama de cationes bivalentes activan a esta enzima, siendo el Ca^{2+} el más efectivo. Los resultados cinéticos permiten proponer que el esquema de coordinación de la apirasa con el ión metálico y el nucleótido corresponde al complejo ternario en que el sustrato hace de puente entre la enzima y el metal (E-S-M). El catión bivalente participa en la reacción formando el verdadero sustrato (metal-nucleótido). En este complejo binario, el ión metálico puede cumplir dos tipos de funciones: activar el átomo de fósforo que va a ser atacado, aumentando su electrofilia y/o formar un complejo de polifosfato de una conformación apropiada en el complejo ternario con la enzima.

El complejo metal-nucleótido no interactuaría con la apirasa a través del catión sino que principalmente a través de los oxígenos de la cadena pirofosfónica, hecho deducido del efecto inhibitorio del complejo inerte a ligandos Cr(III)-ATP .

Se demostró por espectroscopía de resonancia magnética del espín electrónico, que la apirasa en ausencia de nucleótido liga $\text{Mn(H}_2\text{O)}_6^{2+}$ formando un complejo binario en que la simetría del ión metálico está alterada.

Se descarta la formación de un complejo de coordinación activo de tipo metálico dual (E-M(L)S-M), porque el complejo binario apirasa-M²⁺ prácticamente no presenta actividad catalítica, y si la tiene es menor que la correspondiente a la apirasa libre (enzima histerética).

3.- Se postula además que la formación de este complejo binario apirasa-M²⁺, que presenta el fenómeno de histéresis, pueda tener un significado fisiológico como un mecanismo regulador de esta enzima hidrolítica. Si este mecanismo regulador tuviera significado in vivo, serían probablemente Mg²⁺ y Ca²⁺ los cationes que formarían este complejo por ser los iones metálicos presentes en mayor concentración en el homogeneizado del tejido de tubérculo de S. tuberosum. Esta forma enzimática no activa (apirasa-M²⁺) puede activarse reversiblemente al ser desplazado el metal por el verdadero sustrato (metal-nucleotido). A su vez, el catión bivalente no ejerce su acción inhibidora sobre la enzima que tiene previamente unido algún análogo de sustrato (Cr(III)-ATP; AMP-PCP). El mecanismo regulatorio propuesto considera a los cationes bivalentes que se unen a la apirasa (en ausencia de sustrato) como inhibidores, y a los complejos metal-nucleotido, como activadores por desplazar al ión metálico unido.

4.- En la búsqueda de mecanismos regulatorios de la apirasa in vivo, se purificó a homogeneidad y posteriormente se

caracterizó la calmodulina del tubérculo de S. tuberosum. Se encontró que esta proteína presenta las propiedades generales descritas para la calmodulina de origen animal y vegetal: pI, masa molecular, estimulación de la fosfodiesterasa de AMPc y efecto de drogas fenotiazínicas sobre su acción activadora; siendo estas dos últimas características dependientes de Ca^{2+} . Sin embargo, pese a tener las características recién mencionadas, esta proteína presentó una actividad biológica muy disminuída (acción estimuladora de la fosfodiesterasa) comparada con la que se describe para la calmodulina aislada de origen animal y vegetal. Este hecho es atribuible a una desnaturación irreversible producida durante las etapas de purificación utilizadas.

Esta proteína aislada de S. tuberosum con actividad calmodulínica y la calmodulina de corazón de bovino, no presentan ningún efecto sobre la apirasa a las concentraciones ensayadas.

5.- De la preparación parcialmente purificada de calmodulina, se aislaron también dos proteínas moduladoras de la actividad apirásica. Una de ellas la activa y la otra la inhibe. De estas proteínas se caracterizó parcialmente sólo la estimuladora. Por las técnicas electroforéticas utilizadas se aprecia una fracción proteica bastante impura. Esta fracción activadora no tiene acción sobre la fosfodiesterasa de AMPc; en cambio, produce una estimulación cercana al 80% de las cuatro isoenzimas de la apirasa ensayadas. La acción de esta

proteína activadora es independiente de Ca^{2+} y de otros cationes bivalentes. A semejanza con la calmodulina, su acción es también inhibida por drogas fenotiazínicas, pero no requiere la presencia de Ca^{2+} , y el efecto se observa sólo a concentraciones mucho más altas de la droga.

Se intenta continuar con el estudio de estas dos proteínas modificadoras de la actividad apirásica hasta obtenerlas en forma homogénea y estable para su posterior caracterización.

6.- La función fisiológica de la apirasa en tejidos animales y vegetales es aún desconocida. Podría tener una función importante en las células de S. tuberosum por la existencia de proteínas modificadoras de su actividad y por la variación de su masa (concentración) durante el desarrollo del tubérculo. La función que desempeña puede depender del organismo en que se encuentre, puesto que en tejidos animales, vertebrados e invertebrados, está ligada a membranas; en cambio, en tejidos vegetales sería principalmente citosólica.

En consecuencia, este es un punto muy interesante de abordar la dilucidación de la función fisiológica de la apirasa en la célula.

BIBLIOGRAFIA

- Allende, C.C., Chaimovich, H., Gatica, M. & Allende, J.E. (1970) The aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetases. II Properties of an adenosine triphosphate-threonyl transfer ribonucleic acid synthetase complex. *J. Biol. Chem.* 245, 93-101
- Ames, B.N. & Dublin, D.T. (1960) The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 235, 769-775
- Anderson, J.M., Charbonneau, H., Jones, H.D., McCann, R.O. & Cormier, M.J. (1980) Characterization of the plant nicotinamide adenine dinucleotide kinase activator protein and its identification as calmodulin. *Biochemistry* 19, 3113-3120
- Andrews, P. (1964) Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.*, 91, 222-232
- Anich, M., (1984) Apirasa y metabolitos durante la germinación y desarrollo de Solanum tuberosum. Aislamiento de calmodulina del tubérculo maduro. Tesis para optar al Título de Bioquímico y Químico-Farmacéutico. U. de Chile.
- Aron, L., Del Campo, G., Puente, J. & Traverso-Cori, A. (1974) Apirasa de Solanum tuberosum. Especificidad de sustrato de una isoenzima de la apirasa de Solanum tuberosum. *Ciencia e Investigacion* 30, 100-106
- Barua, K., Choudhuri, M.M. & Ghosh, B. (1981) Changes in adenylate energy pool and energy charge of developing and germinated rice embryos. *Plant. Sci. Lett.* 21, 357-360
- Basosi, R., Lashi, F., Tiezzi, E. & Valensin, G. (1976) Electron spin relaxation and Fourier transform nuclear magnetic resonance spectroscopy of manganese (II) complex with biomacromolecules. *J.C.S. Faraday Trans. I.* 72, 1505-1511
- Bohme, H.J., Kopperschlager, G., Schulz, J. & Hoffmann, E. (1972) Affinity chromatography of phosphofructo kinase using Cibacron blue F3G-A. *J. Chromatogr.*, 69, 209-214
- Bossard, M.J., Vik, T.A. & Schuster, S.M. (1980) Beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase catalyzed formation of a transition state analog in ATP synthesis. *J. Biol. Chem.*, 255, 5342-5346
- Buckhout, T.J. (1984) Characterization of Ca^{2+} transport in purified endoplasmic reticulum membrane vesicles from Lepidium sativum L roots. *Plant. Physiol.*, 76, 962-967
- Buttlaire, D.H., Reed, G.H. & Himes, R. (1975) Electron

paramagnetic resonance and water proton relaxation rate studies of formyltetrahydrofolate synthetase manganous ion complexes. *J. Biol. Chem.*, 250, 261-270

Caldwell, C.R. & Haug, A. (1980) Kinetic characterization of barley root plasma membrane-bound Ca^{2+} and Mg^{2+} -dependent adenosine triphosphatase. *Physiol. Plant.* 50, 183-193

Caldwell, C.R. & Haug, A. (1981) Temperature dependence of the barley root plasma membrane bound Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent ATPase. *Physiol. Plant.* 53, 117-124

Carrasco, M.A. (1971) Estudio de la actividad tirosinásica y aislamiento parcial de apirinas de diversas variedades de S. tuberosum. Tesis para optar al Título de Bioquímico. U. de Chile.

Catálogo LKB. (1980) Vertical Electrophoresis

Charbonneau, H. & Cormier, M.J. (1979) Purification of plant calmodulin by fluphenazine-Sepharose affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1039-1047

Cleland, W.W. (1963) The kinetics of enzyme catalyzed reactions with two or more substrates or products. Inhibition: nomenclature and theory. *Biochem. Biophys. Acta* 67, 173-184

Cohn, M. & Townsend, J. (1954) A study of manganous complexes by paramagnetic resonance absorption. *Nature (London)* 173, 1090-1091

Cori, O., Traverso-Cori, A., Tetas, M. & Chaimovich, H. (1965) Substrate specificity and inhibition studies on potato apyrase. *Biochem. Z.*, 342, 345-351

Cornelius, R.D. & Cleland, W.W. (1978) Substrate activity of (adenosine triphosphate)tetraamine cobalt (III) with yeast hexokinase and separation of diastereoisomers using the enzyme. *Biochemistry* 17, 3279-3286

Cormier, M.J., Jarret, H.W. & Charbonneau, H. (1982) Role of Ca^{2+} -calmodulin in metabolic regulation in plants. En *Calmodulin and intracellular Ca^{2+} receptors*. Eds. Kakiuchi, Hidaka & Means; p. 125-139. Plenum Publishing Corporation.

Cornish-Bowden, A. (1974) A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and noncompetitive inhibitors. *Biochem. J.*, 137, 143-144

Cotton, A., Hazen, E.Jr., Day, V.W., Larsen, S., Norman, J.G., Wong, S.T.K. & Johnson, J. (1973) Biochemical importance of the binding of phosphate by arginyl groups. Model compounds containing methyl guanidinium. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 23676-23678

- Dannenbergh, K.D. & Cleland, W.W. (1975) Use of chromium-adenosine triphosphate and lyxose to elucidate the kinetic mechanism and coordination state to the nucleotide substrate for yeast hexokinase. *Biochemistry* 14, 28-39
- Del Campo, G., Puente, J., Valenzuela, M.A., Traverso-Cori, A. & Cori, O. (1977) Hydrolysis of synthetic pyrophosphoric esters by an isoenzyme of apyrase from Solanum tuberosum: *Biochem. J.*, 167, 525-529
- DePamphilis, M.L. & Cleland W.W. (1973) Preparation and properties of chromium (III)-nucleotide complex for use in the study of enzyme mechanism. *Biochemistry* 12, 3714-3723
- Dieter, P. (1984) Calmodulin and calmodulin mediated processes in plants. *Plant, Cell and Environment* 7, 371-380
- Dieter, P. & Marmé, D. (1980) Ca^{2+} transport in mitochondrial and microsomal fractions from higher plants. *Planta* 150, 1-8
- Dieter, P. & Marmé, D. (1981) A calmodulin-dependent, microsomal ATPase from corn (Zea mays L). *FEBS Lett.*, 125, 245-248
- Dieter, P. & Marmé, D. (1984) A Ca^{2+} , calmodulin-dependent NAD kinase from corn is located in the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.*, 259, 184-189
- Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem.J.*, 55, 170-171
- Dixon, M. & Webb, E.C. (1979) *En Enzymes*. 3a ed. Longmans. Academic Press. New York.
- Dunaway-Mariano, D., Benovic, J.L., Cleland, W.W., Gupta, R.K. & Mildvan, A.S. (1979) Stereospecificity of the metal-adenosine 5'-triphosphate complex in reactions of muscle pyruvate kinase. *Biochemistry* 18, 4347-4354
- Dunaway-Mariano, D. & Cleland, W.W. (1980a) Investigations of substrate specificity and reaction mechanism of several kinases using chromium (III) adenosine 5'-triphosphate and chromium (III) adenosine 5'-diphosphate. *Biochemistry* 19, 1506-1515
- Dunaway-Mariano, D. & Cleland, W.W. (1980b) Preparation and properties of chromium (III)-adenosine 5'-triphosphate, chromium (III)-adenosine 5'-diphosphate, and related chromium (III) complexes. *Biochemistry* 19, 1496-1505
- Donoso, E. (1975) Interacción del calcio en la hidrólisis de ADP por la apirasa (S. tuberosum), variedad Pimperl. Tesis para optar al Título de Bioquímico. U. de Chile.

- Easterday, R.L. & Easterday, J.M. (1974) En Immobilized biochemicals and affinity chromatography. Ed. R. Bruce Dunlap, p. 123-139. Plenum Press. New York.
- Eccleston, J.F., Webb, M.R., Ash, D.E. & Reed, H. (1981) EPR studies of the Mn(II) complex with elongation factor Tu and GDP. J. Biol. Chem., 256, 10774-10777
- Eckstein, F. (1985) Nucleoside phosphorothioates. Ann. Rev. Biochem., 54, 367-402
- Eigen, M. & Hammes, G.G. (1963) Elementary steps in enzyme reactions as studied by relaxation spectrometry. Adv. Enzymol., 25, 1-38
- Ernster, L., Zetterström, R. & Lindberg, O. (1950) Method for the determination of tracer phosphate in biological material. Acta Chem. Scand., 4, 942-947
- Fakrai, H. & Hall, J.L. (1984) Changes in calcium ATPase activity associated with the washing (ageing) of potato tuber discs. J. Plant. Physiol., 117, 69-79
- Fanta, N. (1982) Almidón, nucleótidos y apirasa durante el desarrollo del tubérculo de Solanum tuberosum. Acción in vitro de metales bivalentes sobre isoapirasas. Tesis para optar al título de Bioquímico. U. de Chile.
- Fiske, C.H. & Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem., 66, 375-400
- Frasch, W.D. & Selman, B.R. (1982) Mechanism of phosphorylation catalyzed by chloroplast coupling factor 1. Stereochemistry. Biochemistry 21, 3636-3643
- Frieden, C. (1970) Kinetic aspects of regulation of metabolic processes. The hysteretic enzyme concept. J. Biol. Chem., 215 5788-5799
- Fukumoto, M. & Venis, M.A. (1986) ATP-dependent Ca^{2+} transport in tonoplast vesicles from apple fruit. Plant Cell Physiol., 27, 491-497
- Gross, J. & Marmé, D. (1978) ATP-dependent Ca^{2+} uptake into plant membrane vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1232-1236
- Gupta, R.J., Oesterling, R.M. & Mildvan, A.S. (1976) Dual divalents cation requirement for activation of pyruvate Kinase: Essential roles of both enzyme- and nucleotide-bound metal ions. Biochemistry 15, 2881-2887
- Haffner, P.H., Goodsaid-Zalduondo, F. & Coleman, J.E. (1974)

- Electron spin resonance of manganese (II)-substituted zinc (II) metalloenzymes. *J. Biol. Chem.*, 249, 6693-6695
- Hanes, C.S. (1932) Studies on plant amylases. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by amylase of germinated barley. *Biochem. J.*, 26, 1406-1421
- Harper, F., Lamy, F. & Calvert, R. (1978) Some properties of a Ca^{2+} and (or) Mg^{2+} -requiring nucleoside di- and triphosphatase(s) associated with the membranes of rat pancreatic zymogen granules. *Can J. Biochem.*, 56, 565-576
- Hatfield, G.W. & Umbarger, H.E. (1970) Threonine deaminase from Bacillus subtilis. III Pre-steady state kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 245, 1742
- Horomy, T.P., Knight, W.B., Dunaway-Mariano, D., & Sundaralingam, M. (1983) Investigation of the structure, protonation, and reactivity of tetraamine (imidodiphosphate) cobalt (III), a substrate for potato apyrase. *Biochemistry* 22 5015-5021
- Huang, S.L. & Tsai, M.D. (1982) Does the magnesium (II) ion interact with the α -phosphate of adenosine triphosphate? An investigation by oxygen-17 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 21, 951-959
- Hulbert, R.B. (1957) *En Methods of Enzymology*. Vol 3, p. 84.
- Hummel, J.P. & Dreyer, W.J. (1962) Measurement of protein-binding phenomena by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta* 63, 532-534
- Janson, C.A. & Cleland, W.W. (1973) The specificity of chromium nucleotides as inhibitors of selected kinases. *J. Biol. Chem.*, 249, 2572-2574
- Jarret, H.W., Brown, C.J., Black, C.C. & Cormier, M.J. (1982) Evidence that calmodulin is in the chloroplast of peas and serves a regulatory role in photosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 257, 13796-13804
- Jarvest, R.L. & Lowe, G. (1979) Synthesis of methyl (R)- and (S)- (^{18}O) phosphorothioates and determination of the absolute configuration of phosphorus of the diastereoisomers of adenosine 5'-(tiotriphosphate). *J. C. S. Chem. Comm.*, 364-366
- Jaworek, D., Gruber, W. & Bergmeyer, H.U. (1974) Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. *En Methods in Enzymatic Analysis*. Ed. H.U. Bergmeyer. 2a ed., vol. 4. pp. 2127-2131. Academic Press. New York.
- Jolliot, A., Demandré, Ch. & Mazliak, P. (1976) Adenosine triphosphatases bound to plasmalemma, mitochondria and

- microsomes presents in the cytoplasmic phase from potato tubers. *Physiol. Plant.* 38 , 287-292
- Kähr, M., Möller, I.M. (1976) Temperature response and effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on ATPases from roots of oats and wheat as influenced by growth temperature and nutritional status. *Physiol. Plant* 38 , 153-158
- Kalckar, H.M. (1944) Adenosylpyrophosphatase and myokinase. *J. Biol. Chem.*, 153 , 355-367
- Kettlun, A.M., Uribe, L., Silva, S., Rivera, J., Valenzuela, M.A. & Traverso-Cori, A. (1981) Chemical modification of aromatic, acid and basic aminoacid of two isoenzymes of apyrase from Solanum tuberosum . *Arch. Biol. Med. Exp.* 14 , 171-175
- Kettlun, A.M., Uribe, L., Calvo, V., Silva, S., Rivera, J., Mancilla, M., Valenzuela, M.A. & Traverso-Cori, A. (1982) Properties of two apyrases from Solanum tuberosum . *Phytochemistry* 21 , 551-558
- Klee, C.B., Crouch, T.H. & Richman, P.G. (1980). Calmodulin. *Ann. Rev. Biochem.*, 49 , 489-515
- Knowles, A.F., Isler, R.E. & Reece, J.F. (1983) The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 731 , 88-96
- Koshland, D.E.Jr., (1959) En The Enzymes, Vol. 1., p.305. Eds. P. Boyer, H. Lardy & K. Myrback. Academic Press, New York.
- Kubovicz, B.D., Vanderhoef, L.N. & Hanson, J.B. (1982) ATP-dependent calcium transport in plasmalemma preparations from soybean hypocotyls. *Plant Physiol.* 69 , 187-191
- Kylin, A. & Kähr, M. (1973) The effect of magnesium and calcium ions on adenosine triphosphatases from wheat and oat roots at different pH. *Physiol. Plant* 28 , 452-457
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 , 680-685
- Laliberté, J.F., St-Jean, P. & Beaudoin, A.R. (1982) Kinetic effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on ATP hydrolysis by the purified ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.*, 257 , 3869-3874
- Lamprecht, W. & Trautschold, I. (1974) Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. En Methods in Enzymatic Analysis. Ed. H.U. Bergmeyer. 2a ed. Vol. 4, pag.2101. Academic Press. New York.
- Lee, Y.P. (1963) Crystalline adenylic acid deaminase from

- rabbit skeletal muscle. En Methods in Enzymology, 6 , 102-117
- Lebel, D., Poirier, G.G., Phaneuf, S., St-Jean, P., Laliberté, J.F. & Beaudoin, A.R. (1980) Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP-diphosphohydrolase from pig pancreas. J. Biol. Chem. 255 , 1227-1233
- Leyh, T.S., Sammons, R.D., Frey, P.A. & Reed, G.A. (1982) The stereochemical configuration of Mn(II)-ADP at the active site of creatine kinase, elucidated by electron paramagnetic resonance with $Rp(\alpha\text{-}^{17}O)ADP$ and $Sp(\alpha\text{-}^{17}O)ADP$. J. Biol. Chem., 257 , 15047-15053
- Liebécq, C., Lallemand, A. & Deguelde-Guillaumé, M.J. (1962) The apyrase activity of potato extract. Arch. Biochem. Biophys., 97 , 609-610
- Lineweaver, H. & Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56 , 658-665.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 , 265-275
- Mancilla, M., Kettlun, A.M., Valenzuela, M.A. & Traverso-Cori, A. (1984) Structural studies of two apyrases from Solanum tuberosum . Phytochemistry 23 , 1397-1400
- Mancilla, M., Valenzuela, M.A., Kettlun, A.M., Fanta, N. & Traverso-Cori, A. (1986) Purificación de una proteína activadora de tubérculo de S. tuberosum . Arch. Biol. Med. Exp., 19 , R225
- Mancilla, M., Valenzuela, M.A., Anich, M., Kettlun, A.M., Jara, O. & Traverso-Cori, A. (1987) Identification of an apyrase activating protein and of calmodulin in Solanum tuberosum . Phytochemistry (en prensa)
- Market, C.L. (1975) En Isoenzymes I. Molecular Structure, p. 1-9. Academic Press. New York
- Mazelis, M. (1959) Enzymatic degradation of adenosine triphosphate to adenine by cabbage leaf preparations. Plant Physiol. 34 , 153-158
- Meyerhof, O. (1945) The origin of the reaction of harden and young in cell free alcoholic fermentation. J. Biol. Chem., 157 , 105-119
- Mildvan, A.S. (1970) En The Enzymes. Vol. II. Eds. P.D. Boyer y cols. 3a ed. p.478-484. Academic Press. New York.
- Mildvan, A.S. (1979) The role of metals in enzyme-catalyzed substitutions at each of the phosphorus atoms of ATP. Adv.

Enzymol., 49, 103-126

Mildvan, A.S., Nowak, T. & Fung, C.H. (1973) Nuclear relaxation studies of the role of the divalent cations in the mechanism of pyruvate kinase and enolase: inner sphere and second sphere complexes. Ann. N.Y. Acad. Sci., 222, 192-209

Morrison, J.F. (1979) Approaches to kinetics studies on metal-activated enzymes. Methods in Enzymology 63, Part A, 257-294

Muto, S. & Miyachi, S. (1977) Properties of a protein activator of NAD kinase from plants. Plant. Physiol. 59, 55-60

Nishikawa, A.H. (1966) Purification and characterization of cytoplasmic apyrase from plumules of Pisum sativum. Ph. D. Thesis. Oregon State University of Corvallis. Oregon. Microfilms (Ann. Arbor., Mich.) Order No. 66-3932.

Oláh, A., Béreczi, A. & Erdei, L. (1983) Benzylaminopurine-induced coupling between calmodulin and Ca-ATPase in wheat root microsomal membranes. FEBS Lett. 154, 395-399

Oparka, K.J. (1986) Phloem unloading in the potato tuber. Pathways and sites of ATPase. Protoplasma 131, 201-210

O'Sullivan, W.J. & Perrin, D.D. (1964) The stability constants of metal adenine nucleotide complexes. Biochemistry 3, 18-26

O'Sullivan, W.J. & Smithies, G.W. (1979) Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. Methods in Enzymology 63, Part A, 294-336

Pearce, F.L., Banks, B.E.C., Banthorpe, D.V., Berry, A.R., Davies, H.S. & Vernon, C. (1972) The isolation and characterization of nerve-growth factor from the venom of Vipera russelli. Eur. J. Biochem., 29, 417-425

Pecoraro, V.L., Rendina, A.R. & Cleland, W. W. (1985) Determinations of the screw sense specificity of bovine liver fructokinase. Biochemistry 24, 1619-1622

Phillips, R. (1966) Adenosine and the adenine nucleotides. Ionization, metal complex formation, and conformation in solution. Chem. Rev., 66, 501-527

Pohlman-Nepveu, J., Kahr, M., Kylin, A., Stuijver, B. & Kuiper, P.J.C. (1979) Uptake and translocation of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions in seedling of oat and wheat, and its correlation with Ca^{2+} and Mg^{2+} activated ATPases from the roots. Physiol. Plant 45, 347-350

Postmus, C. & King, E.L. (1955) The equilibria in acidic

Para
Mey
Zur

- solutions of chromium (III) ion and thiocyanate ion. J. Phys. Chem., 59 , 1208-1216
- Porath, J., Janson, J. & Laas, T. (1971) Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. I. Desulphated and reduced ions-linked agar and agarose in spherical bead form. J. Chromatogr. 60 , 167-177
- Rasi-Caldogno, F., De Michaelis, M.J. & Peugliarello, M.C. (1982) Active transport of Ca^{2+} in membrane vesicles from pea. Evidence for a $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport. Biochim. Biophys. Acta 693 , 287-295
- Reed, G.H. & Cohn, M. (1973) Electron paramagnetic resonance studies of manganese (II)-pyruvate kinase-substrate complexes. J. Biol. Chem., 248 , 6436-6442
- Reed, G.H., Leigh, J.S. & Pearson, J.E. (1971) Electron paramagnetic relaxation and EPR line shapes of manganous ion complexes in aqueous solution. Frequency and ligand dependence. J. Chem. Phys., 55 , 3311-3316
- Reed, G.H. & Leyh, T.S. (1980) Identification of the six ligands to manganese (II) in transition-state - analogue complexes of creatine kinase: oxygen-17 superfine coupling from selectively labeled ligands. Biochemistry 19 , 5472-5480
- Reed, G.H. & Ray, W.J.Jr. (1971) Electron paramagnetic resonance studies of manganese (II) coordination in the phosphoglucomutase system. Biochemistry 10 , 3190-3197
- Reisfield, P.A., Lewis, V.J. & Williams, D.E. (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature 195 , 281-283
- Ribeiro, J.M., Sarkis, J.J., Rossignol, P.A. & Spielman, A. (1984) Salivary apyrase of Aedes aegypti: characterization and secretory fate. Comp. Biochem. Physiol., 79B , 81-86
- 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
- Sane, P.V., Kochhar, S., Kumar, N. & Kochhar, V.K. (1984) Activation of plant aspartate kinase by calcium and calmodulin-like factor from plants. FEBS Lett., 175 , 238-242
- Sarkis, J.J., Guimaraes, J.A. & Ribeiro, J.M. (1986) Salivary apyrase of Rhodnius prolixii. Biochem. J., 233 , 885-891
- Schleicher, M. Lukas, T.J. & Watterson, D.M. (1983) Further characterization of calmodulin from the monocotyledon barley (Hordeum vulgare). Plant. Physiol., 73 , 666-670

- Serrano, R. (1983) Purification and reconstitution of the proton-pumping ATPase of fungal and plant plasma membrane. *Arch. Biochem. Biophys.*, 227, 1-8
- Sigel, H. & Naumann, C.F. (1976) Ternary complexes in solution. XXIV. Metal ion binding of stacked Purine-Indole adducts. The mixed-ligand complexes of adenosine 5'-triphosphate, tryptophan, and manganese (II), copper (II), or zinc (II). *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 730-739
- Sikka, K.C. & Das, N.B. (1964) Berseem (*Trifolium alexandrinum* Linn.) apyrase. *Indian, J. Exp. Biol.*, 2, 41-43
- Souci, S.W., Fachmann, W. & Kraut, H. (1979) *Die Zusammensetzung der Lebensmittel*. Ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, M.B.H. Stuttgart.
- Sperow, J.W. & Buttler, L.G. (1976) Cr(III) complexes as active site probes of yeast inorganic pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.*, 251, 2611-2612
- Sundberg, L. & Porath, J. (1974) Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography I. Attachment of group containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *J. Chromatogr.* 90, 87-98
- Stok, B.P., Tanczos, D.G., Kähr, M., Stuvier, C.E., Kylin, A. & Kuiper, P.J.C. (1981) Transport of Mg^{2+} and Ca^{2+} and Mg^{2+} -stimulated adenosine triphosphatase activity in oat roots as affected by mineral nutrition. *Physiol. Plant* 52, 115-123
- Sze, H. (1984) H^+ - translocating ATPases of the plasma membrane and tonoplast of plant cells. *Physiol. Plant* 61, 683-691
- Taki Khan, M.M. & Martell, A.E. (1962) Metal chelates of adenosine diphosphoric and adenosine monophosphoric acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 3037-3041
- Thompson, S.T., Cass, K.H. & Stellwagen, E. (1975) Blue Dextran-Sepharose: an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 669-672
- Thompson, S.T. & Stellwagen, E. (1976) Binding of Cibacron blue F3G-A to proteins containing dinucleotide fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73, 361-365
- Tognoli, L. & Marre, E. (1981) Purification and characterization of divalent cation-activated ATP-ADPase from pea stem microsome. *Biochim. Biophys. Acta* 642, 1-14
- Traverso-Cori, A. & Cori, O. (1962) Splitting of the terminal phosphate group of adenosine triphosphate by potato apyrase.

Biochim. Biophys. Acta 57 , 158-160

Traverso-Cori, A., Chaimovich, H. & Cori, O. (1965) Kinetic studies and properties of potato apyrase. Arch. Biochem. Biophys., 109 , 173-184

Traverso-Cori, A., Traverso, S. & Reyes, H. (1970) Different molecular forms of potato apyrase. Arch. Biochem. Biophys., 137 , 133-142

Travis, J., Bowen, J., Tewkebury, D., Johnson, D. & Pannell, R. (1976) Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. Biochem. J., 157 , 301-306

Urrea, R. (1985) Purificación y caracterización de isoapirinasas de S.tuberosum var. Ultimus. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile

Valenzuela, M.A., Del Campo, G., Marín, E. & Traverso-Cori, A. (1973) Effects of protein-modifying reagents on an isoenzyme of potato apyrase. Biochem. J., 133 , 755-763

Van Eldik, L.J. Grossman, A.R., Iverson, D.B. & Watterson, D.M. (1980) Isolation and characterization of calmodulin from spinach leaves and in vitro translation mixtures. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 77 , 1912-1916

Vara, F. & Serrano, R. (1981) Purification and characterization of a membrane-bound ATP diphosphohydrolase from cicer arietinum (chick-pea) roots. Biochem. J., 197 , 637-643

Villafranca, J., Ash, D.E. & Wedler, F.C. (1976) Manganese (II) and substrate interaction with unadenylated glutamine synthetase (Escherichia coli W). Electron paramagnetic resonance and nuclear magnetic resonance studies of enzyme-bound manganese (II) with substrates and a potential transition-state, methionine-sulfoximine. Biochemistry 15 , 544-553

Wang, J.H. & Waisman, D.M. (1979) Calmodulin and its role in the second-messenger system. Curr. Top. Cell. Regul., 15 , 47-107

Warburg, O. & Christian, W., (1941) Isolierung und Kristallisation des Garungferments enolase. Biochem. Z., 30 , 384-415

Watterson, D.M., Iverson, D.B. & Van Eldik, L.J. (1980) Spinach calmodulin: isolation, characterization and comparison with vertebrate calmodulins. Biochemistry 19 , 5762-5768

Webb, M.R., Ash, D.E., Leyh, T.S., Trentham, D.R. & Reed, G.H.

(1982) Electron paramagnetic resonance studies of Mn^{2+} complexes with myosin sub-fragments 1 and oxygen 17-labeled ligands. J. Biol. Chem., 257, 3068-3072

Weber, K. & Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244, 4406-4412

Winter, A., Ek, K. & Andersson, U. (1977) Analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide gels. LKB Application Note 250, December.

Zocchi, G. & Hanson, J.B. (1983) Calcium transport and ATPase activity in a microsomal fraction from corn roots. Plant, Cell Environment., 6, 203-209.





UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
QUIMICAS Y FARMACEUTICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

Señora
Aída Traverso P.

Por especial encargo del Director de la Escuela de Graduados, me permito hacer llegar a Ud. un ejemplar de la Tesis de Doctorado de la Sra. María Antonieta Valenzuela.

La saluda atentamente,

María Cristina Salas
Secretaria

Sgo. 24 de Abril de 1987.

