

## DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

## METABOLISMO DEL ACIDO MEVALONICO EN VEGETALES

EDUARDO GARCIA PEREGRIN

## RESUMEN

En experiencias llevadas a cabo con plántulas de *Pinus pinaster* se ha demostrado la síntesis "in vivo" de linalool y 4-terpineol a partir de ácido mevalónico (MVA-2-<sup>14</sup>C).

Por otra parte se ha estudiado "in vitro" la incorporación de MVA-2-<sup>14</sup>C a fosfomevalónico (MVAP) y pirofosfomevalónico (MVAPP) por extractos libres de células de *P. pinaster* y *Chlorella fusca*, así como por extractos libres de células y extractos de polvos acetónicos de diferentes órganos de *Agave americana*.

Se han establecido algunas de las propiedades físicas, químicas y cinéticas de la mevalonato cinasa de *P. pinaster* y de *A. americana*: influencia de efectores de grupos —SH, requerimientos nucleotídicos, pH óptimo de actuación, efecto de algunos iones metálicos divalentes, valores de Km, etc.

La cantidad de MVAP formado en las reacciones depende de la concentración de proteínas en el medio y del tiempo de incubación. Durante cortos periodos de incubación, el MVAP formado aumenta con la concentración proteica, mientras que en incubaciones prolongadas 1-6 h hay una disminución del MVAP cuando se sobrepasa una determinada concentración de proteínas, observándose en este caso un aumento paralelo del MVA, lo cual sugiere que el MVAP formado es hidrolizado por una fosfatasa presente en los extractos. Esta actividad hidrolítica es eliminada por calentamiento, así como durante el proceso de purificación enzimática.

La mevalonato cinasa se ha purificado parcialmente por precipitación con sulfato amónico, cromatografía en columna de Sephadex G-100 y fraccionamiento a través de DEAE-Sephadex A-50 y DEAE-celulosa. Por cromatografía en columna de Sephadex G-100 se separan perfectamente dos fracciones con actividad mevalonato cinasa, tanto a partir de extractos de *P. pinaster* como de *A. americana*. Ello parece demostrar la existencia en las especies vegetales en estudio de dos isoenzimas cuya actividad es manifiesta al mismo valor de pH (7.9). Por último, mediante técnicas de aislamiento en medio a

las actividades mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa intracoloroplastidicas.

### ABSTRACT

The synthesis "in vivo" of linalool and 4-terpineol from mevalonic acid (MVA-2-<sup>14</sup>C) by *Pinus pinaster* seedlings has been demonstrated.

Cell-free extracts from *P. pinaster* seedling and *Chlorella fusca* as well as cell-free extracts and acetone powder *americana* phosphorylate MVA to phosphomevalonic acid (MVPA) and pyrophosphomevalonic acid (MVAPP).

Some properties of mevalonate kinase from *P. pinaster* and *A. americana* have been studied: influence of some effectors of —SH groups, nucleotide requirements, optimum pH, effect of some divalent cations, Km. values, etc.

The amount of MVAP formed depends on protein concentration and incubation time. During short incubations, the MVAP formed increases as prot

there is a decrease in the MVAP formed when a certain amount of protein is exceeded. A concomitant increase of the remaining MVA is also observed, suggesting that MVAP formed is hydrolyzed by a phosphatase present in the extracts. This interfering activity is eliminated when mevalonate kinase is partially purified.

The mevalonate kinase from *P. pinaster* and *A. americana* has been partially purified by ammonium sulphate precipitation, Sephadex G-100 filtration and DEAE-Sephadex A-50 and DEAE-cellulose fractionation. Two fractions with mevalonate kinase activity from *P. pinaster* seedlings and *A. americana* leaves have been isolated by Sephadex G-100. This found seems to suggest the presence of two isoenzymes, both being active at the same pH value (7.9). By using an aqueous method, the occurrence of intrachloroplastidic mevalonate kinase and phosphomevalonate kinase is reported.

### RESUMÉ

On a montré la formation "in vivo" de linalool et 4-terpineol à partir de l'acide mévalonique (MVA-2-<sup>14</sup>C) par les plantes de *Pinus pinaster*.

On a étudié "in vitro" l'incorporation de MVA-2-<sup>14</sup>C à mevalonyl-phosphate (MVAP) et mevalonyl-pyrophosphate (MVAPP) par l'extract libre de cellules de *Pinus pinaster*, *Agave americana* et *Chlorella fusca*, établissant quelques-unes des propriétés physiques, chimiques et cinétiques de la mévalonate-kinase de *P. pinaster* et *A. americana*: influence des groupes —SH, nucléotides, pH, ions métalliques, Km, etc.

La quantité de MVAP formé dépende de la concentration de protéines et de la durée de l'incubation. Les résultats suggèrent la possibilité que le MVAP est hydrolysé par une phosphatase présente dans les extracts. Cette

activité hydrolytique est éliminée par échauffement de même que pendant la purification enzymatique.

La mevalonate-kinase a été purifiée par précipitation avec sulfate d'ammonium et fractionnement sur Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50 et DEAE-cellulose. Par filtration sur colonne de Sephadex G-100 on a démontré la séparation de deux fractions avec l'activité mévalonate-kinase chez *P. pinaster* et chez *A. americana*. Ces fractions sont actives a pH 7.9. A l'issue d'une série de séparations employant solvants aqueux on a montré les activités mevalonate-kinase et phosphomevalonate kinase intracholoplastiques.

## INTRODUCCION

El ácido mevalónico ocupa un puesto central en el metabolismo de los compuestos isoprenoides. Todos ellos se sintetizan siguiendo un cauce común a partir del MVA y merced a la actuación de las enzimas mevalonato cinasa (E.C. 2.7.1.36), fosfomevalonato cinasa (E.C. 2.7.4.2) y pirofosfomevalonato descarboxilasa (E.C. 4.1.1.33).

La primera hipótesis sobre la biosíntesis de los isoprenoides se debe a Ruzicka (1), quien en 1953 supuso ya un papel fundamental para la unidad básica de 5 átomos de carbono. Por otra parte, Bloch y Rittenberg (2) fueron los primeros en demostrar que el esqueleto carbonado de un compuesto isoprenoide, el colesterol, deriva del acetato. Estos dos hechos condujeron al descubrimiento por Folker y col. (3, 4), del ácido mevalónico como compuesto clave de este proceso. Las experiencias realizadas con hígado de rata demostraron que el 43 por ciento del MVA-2-<sup>14</sup>C racémico podría convertirse en colesterol, mientras que la radiactividad del MVA-1-<sup>14</sup>C se perdía en forma de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> (5, 6). Finalmente la unidad básica pentacarbonada fue identificada como el isopentenil pirofosfato (Ip-PP), formado a través de los derivados fosforilados de MVA: fosfomevalónico y pirofosfomevalónico.

Los estudios sobre la incorporación del MVA en plantas constituyen uno de los temas más amplios en Bioquímica Vegetal. Del mismo modo que los trabajos de Popjak y col. son fundamentales en la biosíntesis de isoprenoides en tejidos animales, las del grupo de Goodwin lo son en vegetales. Así Goodwin y col. han estudiado la incorporación de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, acetato-2-<sup>14</sup>C y MVA-2-<sup>14</sup>C en el β-caroteno de plántulas de maíz etioladas (7), en la cadena lateral fitólica de la clorofila (8, 9) y en el escualeno y principales fitosteroles de las hojas de maíz y guisante (10). Recientemente, Potty y col. (11-14)

han estudiado el metabolismo del MVA en relación con la biosíntesis de monoterpenos en naranja. El mismo tema ha sido estudiado en pétalos de rosa por Francis y col. (15).

La primera de las reacciones de incorporación del MVA es catalizada por la mevalonato cinasa, enzima que fue puesta de manifiesto por primera vez en autolisados de levadura (16) y en hígado de rata (17) y de conejo (18) y posteriormente demostrada en plantas superiores (19, 20) y microorganismos (21). En el látex de *Hevea brasiliensis* Williamson y Kekwick (22) pusieron de manifiesto la formación de MVAP a partir de MVA por la mevalonato cinasa, llevando a cabo su purificación.

el MVA y los nucleótidos, así como el efecto de iones metálicos. La formación de derivados fosforilados del MVA fue puesta de manifiesto en pino por Valenzuela y col. (23), si bien la mevalonato cinasa no pudo ser extraída en este origen en los primeros trabajos de este grupo. En estudios posteriores, Valenzuela y col. (24) pudieron demostrar la presencia de mevalonato cinasa en extractos libres de células de *Pinus radiata*, mediante la identificación del MVAP formado a partir del MVA-2-<sup>14</sup>-C.

En cuanto a la regulación de la biosíntesis de isoprenoides en vegetales, se ha estudiado fundamentalmente a nivel de su compartimentación celular. El proceso tiene una parte común hasta el término C-15 (farnesil pirofosfato) que puede formarse tanto dentro como fuera de los cloroplastos y puede convertirse en geranyl-geranyl pirofosfato en ambas localizaciones. Sin embargo, también puede convertirse en escualeno, puesto que la enzima que cataliza esta reacción solo se encuentra en este compartimento. Rogers y col. (25, 26) han evidenciado la validez de la hipótesis de la compartimentación con una serie de trabajos de tipo enzimático. De acuerdo con esta hipótesis, la mevalonato cinasa debe encontrarse dentro y fuera de los cloroplastos, mientras que la membrana de estos orgánulos debe ser esencialmente impermeable en ambas direcciones al MVA. En efecto, estos autores (27) han demostrado la presencia de la mevalonato cinasa dentro y fuera de los cloroplastos, poniendo de manifiesto el requerimiento de un pH óptimo diferente para cada una de las dos isoenzimas. Esta posibilidad fue sugerida por Loomis (19), quien mencionó que el pH óptimo de la mevalonato cinasa del citoplasma de plántulas de calabaza era 5.5 en contraste con la enzima de cloroplastos cuyo pH óptimo era de 7.5. Rogers y col. (28) han demostrado la presencia

de dos isoenzimas de la mevalonato cinasa en hojas verdes y etioladas de *Phaseolus vulgaris* con un pH óptimo similar al encontrado en calabaza. Todos estos hechos evidencian la hipótesis de la compartimentación de la biosíntesis de isoprenoides en plantas (29).

En nuestro Departamento se ha estudiado durante los últimos años la incorporación y metabolismo del MVA en plántulas de *P. pinaster* y de *A. americana*. Se han elegido estas dos especies vegetales por su distinto contenido en isoprenoides. En el primer caso, los monoterpenos constituyen la mayor parte de sus aceites esenciales, por lo que la diversificación metabólica se establece a nivel del término C-10 o geranil pirofosfato. En el caso del *Agave* sus principales isoprenoides pertenecen al grupo de los triterpenos, lo que significa un mayor cauce biosintético común que se prolonga hasta el término C-30 o escualeno.

En *P. pinaster* se ha demostrado "in vivo" la síntesis de los alcoholes terpénicos linalool y 4-terpineol a partir de MVA-2-<sup>14</sup>C (30). Se han estudiado también las reacciones de fosforilación del MVA "in vitro" por extractos de *P. pinaster* y de *A. americana* poniendo de manifiesto las condiciones óptimas del proceso y los requerimientos que presenta respecto a pH, concentración de proteínas, tiempo de incubación, efectores, etc. (31-37). En ambos orígenes se ha logrado su purificación parcial (38, 39), así como la separación de dos fracciones con actividad mevalonato cinasa, ambas activas a pH 7.9 (40). Asimismo, mediante técnicas de aislamiento en medio acuoso (41) se han puesto de manifiesto las actividades mevalonato cinasa y fosfomevalonato cinasa intracloroplastídicas (42).

Por último, recientemente se ha comenzado el estudio de la fosforilación del MVA en algas unicelulares, concretamente en *Chlorella fusca*, origen en el que se conoce muy poco sobre el MVA y especialmente sobre las primeras reacciones que lo incorporan a esteroides y carotenoides, principales constituyentes de tipo isoprenoide (43). Los primeros resultados han permitido establecer las particularidades de las enzimas de fosforilación del MVA en cuanto a pH y tiempo óptimos de actuación, efectores metálicos, etc. (44).

## MATERIAL Y METODOS

Como material biológico se han utilizado plántulas de *P. pinaster* de 25-60 días, obtenidas a partir de semillas previamente estra-

tificadas a 5° durante 6 semanas (45), plantas de *A. americana* crecidas subespontáneamente y células de *C. fusca* Shihira et Kraus 211.15 de la colección de Pringsheim, Gottingen, crecidas autotroficamente con nitrato potásico como fuente de nitrógeno (43). Para los ensayos de aislamiento de cloroplastos se han utilizado también hojas de *Spinacia oleracea* de origen comercial (41).

La metodología detallada ha sido descrita anteriormente (30-43). En las experiencias "in vivo" la esencia se aisló en un aparato Neo-Clevenger modificado (45) y los alcoholes fueron identificados mediante radiocromatografía gaseosa (30).

Las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo incubando los extractos a 37° durante tiempo variable y en presencia de MVA-2-<sup>14</sup>C y otros efectores (31, 37). Los productos de las reacciones (MVAP y MVAPP) se han identificado por radiocromatografía en papel.

La purificación enzimática se ha llevado a cabo por precipitación con sulfato amónico y sulfato de protamina, cromatografía en columna de Sephadex G-100 y fraccionamiento a través de DEAE-Sephadex A-50 y DEAE-celulosa. Como criterio de pureza se ha empleado la electroforesis en gel de poliacrilamida (37).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1.—Experiencias "in vivo"

La esencia obtenida a partir de plántulas de *P. pinaster* que se habían incubado troceadas con MVA-2-<sup>14</sup>C durante 24 h presentaban una clara radiactividad en el sistema de detección directa RGC-170. Cuando una muestra de la misma esencia fue sometida a radiocromatografía gaseosa se puso de manifiesto la existencia de dos alcoholes terpénicos cuyo tiempo de retención coincidía con los del linalool y 4-terpineol, alcoholes cuya significación biológica no está bien establecida (30). En efecto, en el mecanismo biosintético general que conduce a los monoterpenos, constituyentes de los aceites esenciales del género *Pinus*, se ha demostrado (46, 47) que el neril pirofosfato ocupa un puesto clave, a partir del cual se van a originar los distintos terpenos cíclicos. Zavarin (48) ha propuesto una serie de intermediarios en este proceso biosintético según una hipótesis que no ha podido ser demostrada enzimáticamente hasta el momento. Sin embargo, las variaciones estacionales observadas por nosotros en la composición terpénica de *Pinus halepensis* y *Pinus sylvestris*

(49) parecen confirmarla. A la misma demostración se parece haber llegado en otras especies vegetales (50-52).

## 2.—Ex

*Fosforilación del MVA por diferentes preparaciones enzimáticas.* Los primeros estudios llevados a cabo con *P. pinaster* pusieron de manifiesto las condiciones óptimas para la obtención de extractos con actividad enzimática a partir de plántulas crecidas durante 25-100 días. Tanto los extractos libres de células como los obtenidos por redisolución de polvos acetónicos de plántulas de pino muestran su capacidad para fosforilar el MVA según una serie de reacciones en que aparecen como productos MVAP, MVAPP e Ip-PP.

Los extractos libres de células de hoja de *A. americana* fosforilan el MVA a MVAP y MVAPP sin que en la radiocromatografía se detecte ningún otro metabolito posterior. Resultados similares se obtienen a partir de extractos preparados por redisolución de polvos acetónicos. Las preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de la corteza de hoja de *Agave* presentan el máximo de actividad. El parénquima es prácticamente inactivo.

Por último, tanto las suspensiones celulares como los extractos libres de células de *C. fusca* presentan actividad fosforilante del MVA.

*Influencia de algunos efectores de grupos —SH.* La suplementación de glutatión o de cisteína  $10^{-2}M$  a extractos libres de células de plántulas de *P. pinaster* produce un claro incremento en la cantidad de derivados fosforilados del MVA. Resultados semejantes se obtienen en extractos de *A. americana*. No obstante, la suplementación de estos u otros protectores de grupos —SH como el  $\beta$ -mercaptoetanol al tampón utilizado para la preparación de los extractos aumenta considerablemente la formación de MVAP y MVAPP, probablemente gracias a la acción protectora de dichos efectores sobre los grupos —SH de las enzimas implicadas en las reacciones en estudio.

Por otra parte, se ha investigado el efecto de diversos agentes que bloquean los grupos —SH, suplementándolos a los extractos libres de células de *P. pinaster* (Tabla I). Tanto la iodoacetamida como el p-hidroximercuribenzoato y la etilmaleimida a concentración  $10^{-2}M$  inhiben prácticamente la fosforilación del MVA. A una concentración  $10^{-3}M$  el efecto varía según el agente bloqueante,

TABLA I.—Efecto de algunos inhibidores de grupos —SH sobre la formación de MVAP y MVAPP por extractos de *P. pinaster*

	Efectores adicionados												
	G-SH $1.6 \times 10^{-3}$				G-SH $1.6 \times 10^{-3}$				G-SH $1.6 \times 10^{-3}$				
	I.A.		I.A.		p-HMB		p-HMB		E.M.		E.M.		
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	
MVAP (dpm)	280	—	—	650	—	200	—	500	—	300	—	450	50
MVAPP (dpm)	400	100	50	650	100	250	—	1150	—	400	—	500	150

Abreviaturas: I.A. = iodoacetamida; G-SH = glutation; p-HMB = parahidroximercuribenzoato; E.M. = etilmaleimida.



siendo más activos la iodoacetamida y el p-hidroximercuribenzoato. La adición conjunta de glutathion  $1.66 \times 10^{-3}M$  revierte la inhibición producida por los bloqueantes a  $10^{-3}M$  pero no tiene ningún efecto frente a estos agentes suplementados a concentración  $10^{-2}M$ .

Estos resultados coinciden con los reseñados en la bibliografía, ya que, con la excepción de los extractos de levadura (16) y de los *Hevea* (22) que no precisan la suplementación de agente reductor alguno para la síntesis de isoprenoides a partir de MVA tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, todos los trabajos que se han ocupado de este tema empleando los más diversos orígenes enzimáticos coinciden con el efecto favorecedor de los agentes reductores y, en la mayoría de los casos, se señala su presencia como imprescindible.

*Efecto del pH.* La formación de MVAP por extractos de polvos acetónicos de plántulas de *P. pinaster* ha sido estudiada en un margen de pH 4-8 usando distintos tampones. A pH inferior a 7.0 no ha sido posible en ningún caso la fosforilación del MVA. Sin embargo, a pH superior aparece y se incrementa rápidamente la actividad mevalonato cinasa, lográndose un máximo a pH 7.9 en tampón Tris-HCl. Resultados semejantes se han obtenido con la enzima de *A. americana*. En extractos libres de células de *C. fusca* la formación de MVAP y de MVAPP parece ocurrir mejor a valores superiores de pH (8.2-8.4).

La mevalonato cinasa de hígado de cerdo (53) y de conejo (20), de larvas de *Sarcophaga bullata* (54) y de latex de *Hevea* (22) tiene similares valores de pH óptimo, mientras que la de levadura (16) y de naranja (11) tiene valores más ácidos. Asimismo, Valenzuela y col. (24) encontraron la máxima actividad fosforilante del MVA por extractos de *Pinus radiata* a pH 6.0 en tampón Tris-succinato. En *Phaseolus*, Rogers y col. (27, 28) encontraron dos isoenzimas de la mevalonato cinasa, una localizada en los cloroplastos y otra fuera de ellos, con pH óptimo de 7.5 y 5.5, respectivamente, y con anterioridad, Loomis y Battaille (19) habían encontrado actividad mevalonato cinasa a pH óptimo 5.5 en cotiledones etiolados de plántulas de calabaza.

*Requerimientos nucleotídicos de la mevalonato cinasa.* La enzima de *P. pinaster* solo puede utilizar ATP como sustrato, siendo inactivos el GTP, UTP e ITP a concentraciones  $1-5 \times 10^{-3}M$ . La suplementación de ADP en estos últimos casos no logra

la formación de MVAP, lo cual pone de manifiesto la ausencia de actividad nucleósido difosfato cinasa.

En extractos de polvos acetónicos de *A. americana* se ha investigado el efecto de los mismos nucleótidos. Los resultados de la tabla II muestran que el ATP es el donador de fosfato más efectivo, si bien las preparaciones enzimáticas pueden usar los otros nucleótidos a concentración  $5 \times 10^{-3}$  con una eficacia del 20 por ciento de la obtenida con ATP  $10^{-3}$ M.

TABLA II.—Requerimientos nucleotídicos de la mevalonato cinasa de *A. americana*

Nucleótido	Concentración (mM)	MVAP formado) (dpm $\times 10^{-3}$ /mg proteína)
ATP	1	24.0
	5	24.0
UTP	1	0.0
	5	5.5
ITP	1	2.0
	5	6.0
GTP	1	4.5
	5	4.5

D. Suárez y E. García-Peregrín. *Phytochemistry* (1976). (en prensa).

En este aspecto, la mevalonato cinasa de *P. pinaster* y *A. americana* se comporta de manera semejante a la de otros orígenes, si bien la de pino presenta una especificidad más acusada hacia el ATP.

*Efecto de la diálisis y de iones metálicos divalentes sobre la mevalonato cinasa.* Tanto los extractos libres de células de plántulas de *P. pinaster* y de *C. fusca* como los obtenidos por redisolución de polvos acetónicos de *A. americana* son capaces de fosforilar el MVA sin adición de iones metálicos divalentes al medio de incubación. Cuando los extractos son dializados, la actividad específica de la mevalonato cinasa disminuye fuertemente (Tabla III). La suplementación de  $Mg^{2+} 10^{-2}$ M a los extractos de *A. americana* incrementa fuertemente la fosforilación del MVA, mientras que el  $Mn^{2+}$  a la misma concentración presenta un claro efecto inhibitor. En cuanto a los extractos de *P. pinaster* el  $Mg^{2+}$  no parece presentar una clara influencia, ya que disminuye ligeramente la fosforilación

por los extractos no dializados pero los incremento en los dializados. El ion  $Mn^{2+}$  ejerce una fuerte inhibición, semejante a la reseñada para los extractos de *A. americana*.

TABLA III.—Efecto de la diálisis y de algunos iones metálicos divalentes sobre la mevalonato cinasa de *P. pinaster* y *A. americana* (Concentración iónica =  $10^{-2}M$ )

	MVAP formado (dpm $\times 10^{-3}/mg$ proteína)					
	<i>P. pinaster</i>			<i>A. americana</i>		
	—	$Mg^{2+}$	$Mn^{2+}$	—	$Mg^{2+}$	$Mn^{2+}$
Extractos no dializados	48.0	43.2	22.8	17.4	27.6	11.4
Extractos dializados	9.6	12.0	4.8	7.2	23.1	1.4

D. Suárez, E. García-Peregrín y F. Mayor. *Phytochemistry*, 13, 1059-1063, (1974).

D. Suárez y E. García-Peregrin. *Phytochemistry* (1976) (en prensa).

Trabajando con mevalonato cinasa parcialmente purificada a partir de extractos de *A. americana* se ha puesto de manifiesto un máximo de actividad con suplementación de  $Mn^{2+}$   $2 \times 10^{-3}M$  o  $Mg^{2+}$   $6-8 \times 10^{-3}M$ . Concentraciones superiores de  $Mn^{2+}$  presentan un efecto claramente inhibitor, mientras que concentraciones superiores de  $Mg^{2+}$  producen solo una ligera disminución de la actividad mevalonato cinasa (Fig. 1). Un efecto muy semejante presentan los mismos cationes sobre la enzima purificada de hígado de cerdo (55).

La cantidad de MVAP formado por extractos libres de células de *C. fusca* aumenta cuando se suplementan iones  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  si bien esta cantidad disminuye a medida que se incrementa la concentración de ion adicionado ( $0.8-8 \times 10^{-3}M$ ).

Todos estos resultados, obtenidos con extractos libres de células, ponen de manifiesto la actuación de los iones  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  dependiente de su concentración. En general, a pequeñas concentraciones el  $Mn^{2+}$  suele ser más activo que el  $Mg^{2+}$  aunque a concentraciones superiores presenta casi siempre un claro efecto inhibitor, mucho más claro que el ejercido por el  $Mg^{2+}$  (22, 24).

*Influencia del tiempo de incubación y de la concentración proteica sobre la formación de MVAP.* Uno de los aspectos más interesantes puesto de manifiesto en las reacciones en estudio es el de

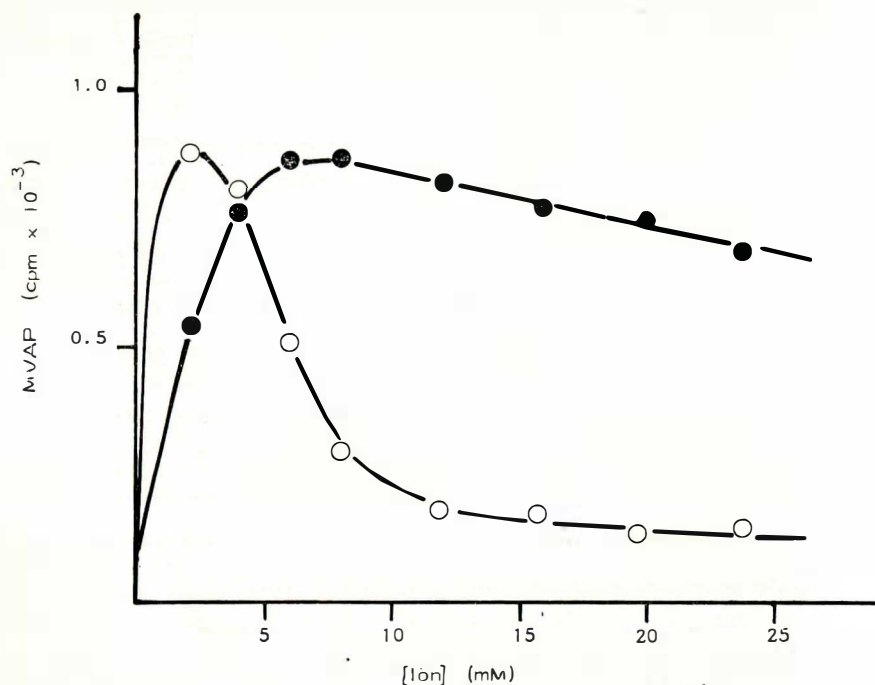


Fig. 1.—Efecto de los iones  $Mg^{2+}$  (●) y  $Mn^{2+}$  (○) sobre la actividad mevalonato cinasa parcialmente purificada de *A. americana*.

D. Suárez y E. García-Peregrin. *Phytochemistry* (1976) (en prensa)

la influencia que la concentración de proteínas de los extractos presenta sobre la velocidad de formación del MVAP. Nuestras primeras experiencias con extractos muy concentrados de plántulas de *P. pinaster* demostraron que la formación de MVAP no era lineal respecto al tiempo en que se prolongaba la incubación, apareciendo una fuerte tendencia a la disminución del MVAP y del MVAPP (Tabla IV). Este fenómeno era tanto mayor cuanto mayor era la

TABLA IV.—Influencia del tiempo de incubación sobre la formación de derivados fosforilados del MVA por extractos de *P. pinaster*

	0	15 min	30 min	1 h	3 h	5 h	10 h
MVAP (dpm)	40	2400	3700	2850	2000	1550	1000
MVAPP (dpm)	—	450	400	150	—	—	—

cantidad de proteínas presentes en el medio de incubación, lo cual nos interfiere en la formación de los derivados fosforilados del MVA, especialmente cuando se alcanzan determinadas concentraciones. Los resultados hallados en incubaciones realizadas durante un mismo tiempo con cantidades crecientes de un mismo extracto enzimático pusieron de manifiesto una clara disminución de la cantidad de MVAP formado cuando se excedía de un determinado valor de proteínas. Simultáneamente a la disminución del MVAP aparecía un incremento del MVA, sin que ningún otro derivado del mismo pudiera ser demostrado. Esto parecía indicar que el MVAP era de nuevo convertido en MVA por un agente hidrolítico cuya actuación está estrechamente relacionada con la de la mevalonato cinasa.

Las experiencias realizadas con hoja, flor y escapo de *A. americana* demostraron que las actividades específicas dicientes extractos eran diferentes según su concentración proteica. En efecto, aunque la cantidad total de MVAP formado a lo largo de diferentes tiempos de incubación era muy parecida, teniendo en cuenta su distinta concentración proteica se obtenían actividades específicas muy superiores en las preparaciones más diluidas (escapo) mientras que las más ricas en proteínas (hoja) proporcionaban datos muy inferiores a los esperados (Fig. 2). Ello nos llevó a estudiar la formación de MVAP por los extractos de hoja, flor y escapo a un mismo tiempo de incubación, adicionando cantidades crecientes de los correspondientes extractos. Los resultados así obtenidos fueron muy similares en todos los casos, presentándose una disminución del MVAP cuando se sobrepasa un determinado nivel de proteínas en cualquiera de los preparaciones ensayadas.

Este efecto está en íntima relación con el tiempo durante el que se prolonga la incubación de los extractos, como hemos puesto de manifiesto en reacciones llevadas a cabo con preparaciones de hoja, flor y escapo de *Agave*. En todos los casos, sólo cuando se sobrepasa un determinado tiempo de incubación y una determinada cantidad de proteínas se presenta el efecto que estamos estudiando (Fig. 3).

En experiencias llevadas a cabo con suplementación de extracto de alta concentración proteica hervido y centrifugado a incubaciones con una pequeña cantidad de proteínas, no se ha encontrado disminución del MVAP formado, incluso cuando el tiempo de incubación se prolonga durante seis horas. Tampoco se ha obtenido disminu-

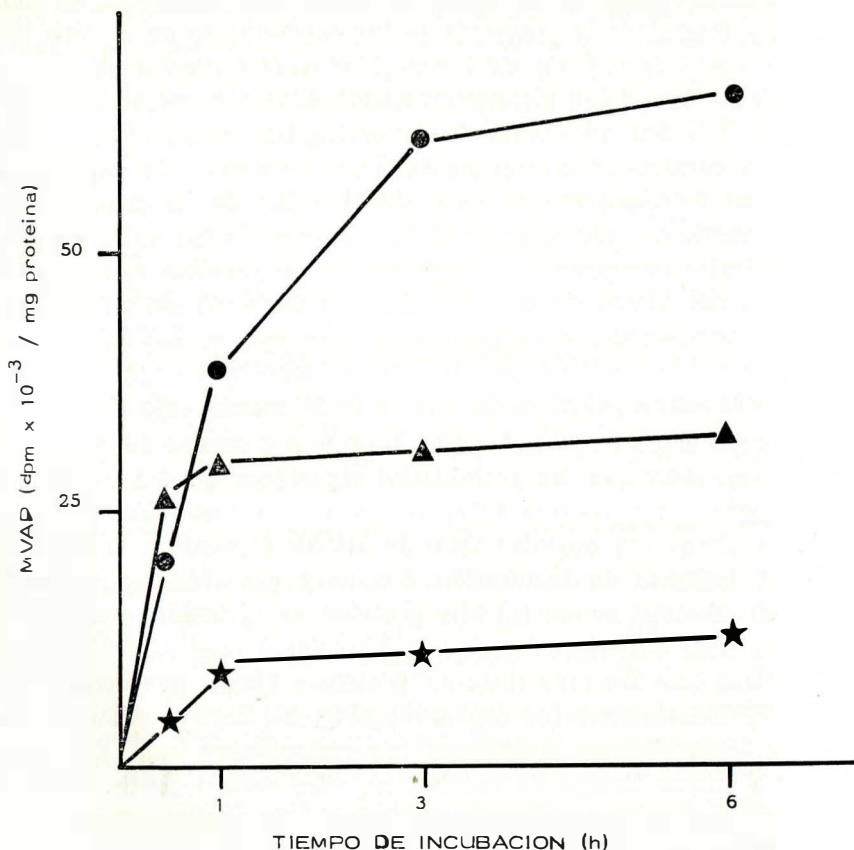


Fig. 2.—Formación de MVAP por extractos de polvos acetónicos de hojas (\*), flores (▲) y escapo (●) de *A. americana* a diferentes tiempos de incubación.

D. Suárez y E. García-Peregrín. *Phytochemistry* (1976) (en prensa).

ción del MVAP cuando se trabaja con la mevalonato cinasa parcialmente purificada.

La formación de derivados fosforilados del MVA por extractos libres de células de *C. fusca* es también dependiente del tiempo de incubación: la cantidad de MVAPP tiende a disminuir a partir de los 45 min de incubación, mientras que el MVAP permanece prácticamente constante.

Todos estos resultados parecen confirmar la presencia en los extractos de una fosfatasa inespecífica semejante a la descrita por otros

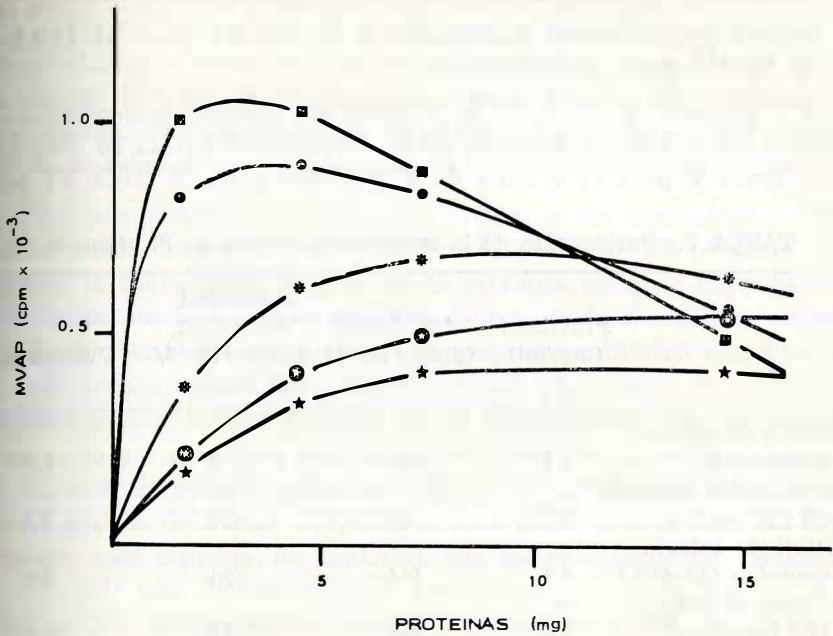


Fig. 3.—Influencia de la concentración proteica sobre la formación de MVAP por extractos de polvos acetónicos de hoja de *A. americana*. Tiempos de incubación: (\*) 15 min; (●) 30 min; (\*) 1 h; (●) 3 h; (■) 6 h.

D. Suárez y E. García-Peregrín. *Phytochemistry* (1976) (en prensa).

autores en diversos orígenes vegetales (11, 56). Recientemente Hill y Rogers (57) han investigado la actividad fosfatasa en preparaciones de *Phaseolus vulgaris* en un margen de pH de 4-9, demostrando que al actividad de la fosfatasa ácida es varios miles de veces superior que la actividad mevalonato cinasa. En nuestro caso, sin embargo, la fosfatasa es muy activa a pH 7.9, el empleado en las reacciones.

*Características cinéticas de la mevalonato cinasa.* La fosforilación del MVA por extractos de plántulas de *P. pinaster* se ha estudiado a distintas concentraciones de MVA y de ATP. Los resultados obtenidos han permitido calcular los valores de las  $K_m$  aparentes:  $8 \times 10^{-5}M$  para el MVA y  $1.4 \times 10^{-4}$  para el ATP. Valores muy semejantes se han obtenido para la mevalonato cinasa de

*A. americana*, tanto con los extractos de polvos acetónicos como con la enzima parcialmente purificada:  $5 \times 10^{-5}$ M para el MVA y  $1.4 \times 10^{-4}$ M para el ATP.

*Purificación parcial de la mevalonato cinasa.* Los resultados obtenidos sobre la purificación de la mevalonato cinasa se resumen en la tabla V para la enzima de *P. pinaster* y en la tabla VI para

TABLA V.—Purificación de la mevalonato cinasa de *P. pinaster*

	Proteínas (mg/ml)	Actividad (dpm $\times 10^{-3}$ )	Actividad específica (dpm $\times 10^{-3}$ / mg)	Purificación
Extracto de polvos acetónicos	7.1	48	7	1.0
Sobrenadante sulfato de protamina	6.8	69	10	1.5
Precipitado sulfato amónico (30-45%)	6.2	154	25	3.6
Sephadex G-100 (1. <sup>a</sup> fracción)	1.8	229	127	18.8
Sephadex G-100 (2. <sup>a</sup> fracción)	1.6	211	132	19.5

D. Suárez, E. García-Peregrín y F. Mayor. *Phytochemistry*, 13, 1059-1063, (1974).

TABLA VI.—Purificación de la mevalonato cinasa de *A. americana*

	Proteínas (mg/ml)	Actividad (dpm $\times 10^{-3}$ )	Actividad específica (dpm $\times 10^{-3}$ / mg)	Purificación
Extracto de polvos acetónicos	13.70	216	15.8	1
Precipitado sulfato amónico (30-45%)	10.00	316	31.6	2
Sephadex G-100 (1. <sup>a</sup> fracción)	0.30	109	363.3	23
DEAE-Sephadex A-50	0.15	788	520.0	33
Sephadex G-100 (2. <sup>a</sup> fracción)	0.15	87	580.0	37

D. Suárez y E. García-Peregrín. *Phytochemistry* (1976) (en prensa).



la enzima de *A. americana*. La precipitación con sulfato de protamina, empleada con buenos resultados para la enzima de hígado de cerdo (53), sólo produce una purificación de 1.5 veces en el caso de la enzima de pino. Por ello se ha suprimido este paso previo en la marcha general seguida para la purificación de la enzima de hoja de *A. americana*.

La precipitación con sulfato amónico sí ha conducido a resultados satisfactorios. Como en la mayor parte de los orígenes estudiados, la mevalonato cinasa queda retenida en muy elevado tanto por ciento en la fracción precipitada con sulfato amónico entre el 30-45 por ciento de saturación. Una pequeña actividad es arrastrada por el precipitado obtenido entre el 0-30 por ciento de saturación, quedando sólo ligeros indicios en el sobrenadante de la precipitación al 45 por ciento de saturación. El grado de purificación respecto al extracto de polvos acetónicos logrado en la fracción 30-45% difiere en la enzima de *Pinus* y *Agave*, si bien en el primer caso suele ser siempre más elevada, en contraste con los resultados de Valenzuela y col. (24) que demostraron la posibilidad de concentración de la enzima por precipitación con sulfato amónico al 55 por ciento de saturación pero sin incremento alguno en la actividad específica de la misma.

El fraccionamiento por columna de Sephadex G-200 es muy empleado para la purificación de la mevalonato cinasa de distintos orígenes, tanto animales como vegetales. Sin embargo, los ensayos realizados con la enzima de *P. pinaster* no han dado los resultados deseados especialmente en cuanto a la separación de las proteínas de los extractos, mientras que el fraccionamiento por Sephadex G-100 sí produjo una buena separación proteica, con un ligero desplazamiento de los máximos de contenido proteico y actividad enzimática. El grado de purificación logrado por este procedimiento era superior al mencionado para la enzima de otros orígenes (22, 54).

Tanto las experiencias llevadas a cabo con preparaciones de *P. pinaster* como las de *A. americana* pusieron de manifiesto la separación de dos fracciones con actividad mevalonato cinasa (Fig. 4) con la particularidad de que el grado de purificación de la segunda fracción de *Agave* era muy superior al de la misma fracción de *Pinus*. Ambas actividades difieren también en su estabilidad, siendo sumamente inestable la segunda incluso conservada a 4° y en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol 0.01M.

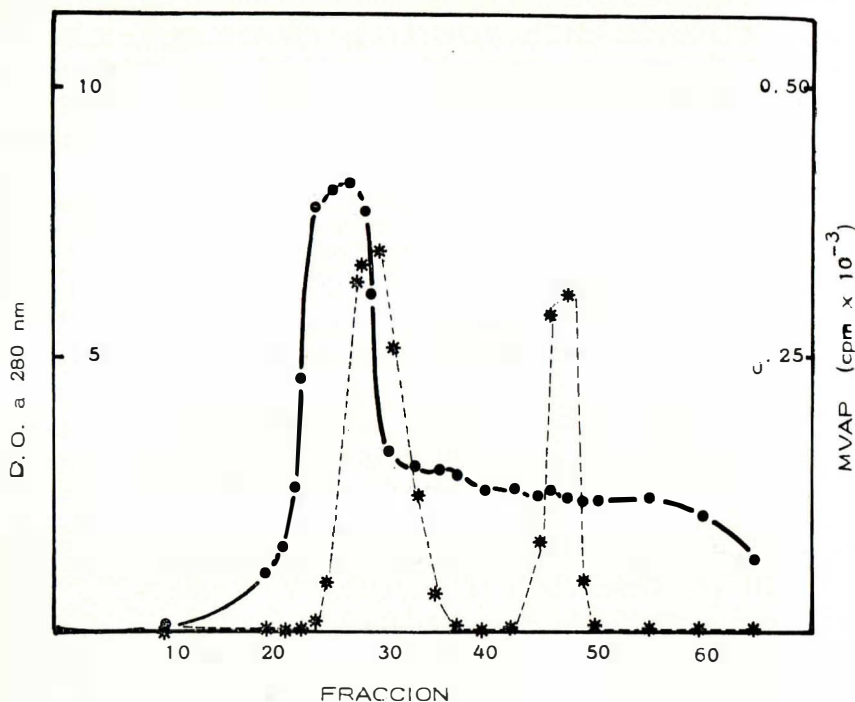


Fig. 4.—Separación de dos fracciones con actividad mevalonato cinasa por Sephadex G-100 a partir de extractos de *A. americana*. (●—●) densidad óptica a 280 nm; (\*- -\*) actividad mevalonato cinasa. E. García-Peregrin, D. Suárez y F. Mayor. *FEBS Lett.* 30, 15-17. (1973).

Como veíamos antes, Rogers y col. (28) estudiando la compartimentación de la biosíntesis de terpenoides en vegetales, demostraron la existencia de dos isoenzimas de la mevalonato cinasa en plántulas de *Phaseolus vulgaris*, una de ellas localizada en el interior de los cloroplastos y la otra fuera. El pH de la enzima intracloroplastídica fue de 7.5, mientras que la extracloroplastídica alcanzaba un máximo en su actividad a pH 5.5 siendo inactiva a pH igual o superior a 7.0. Sin embargo, en nuestro caso las dos fracciones separadas por Sephadex G-100, tanto en *Pinus* como en *Agave*, son activas a pH 7.9 al cual pH se alcanza también el máximo de formación de MVAP por los extractos obtenidos por disolución de los polvos acetónicos en ambos orígenes. Todo ello parece demostrar que se trata de dos isoenzimas que requieren similares

valores de pH para su actuación y cuya localización intracelular puede ser semejante a la encontrada en judía y calabaza. En este sentido y en un primer paso para estudiar la posible identificación de la enzima intracloroplastídica con alguna de las dos fracciones activas separadas por Sephadex G-100, hemos demostrado la presencia de la mevalonato cinasa y de la fosfomevalonato cinasa, activas sólo a pH superiores a 7.0, en cloroplastos aislados de *Spinacia oleracea*, *P. pinaster* y *A. americana* (Tabla VII).

TABLA VII. Fosforilación del MVA por diferentes preparaciones enzimáticas de hoja de *A. americana*

	Actividad específica (dpm $\times 10^{-3}$ /mg)	
	MVAP	MVAPP
Extracto crudo	7.9	0.4
Sobrenadante 1.º lavado	7.8	0.4
Sobrenadante 2.º lavado	5.7	0.3
Cloroplastos rotos hipotónicamente	42.0	6.0
Cloroplastos rotos hipotónicamente y al US.	54.0	6.4

E. García-Peregrín, A. Coloma y F. Mayor. *Plant Sci. Lett.* 1, 367-373, (1973).

El fraccionamiento por DEAE-Sephadex y DEAE-celulosa son dos procedimientos muy utilizados en la purificación enzimática. Cuando nosotros hemos aplicado la primera fracción activa separada por Sephadex G-100 a una columna de DEAE-celulosa, la elución con un gradiente de KCl nos ha permitido obtener una fracción con actividad mevalonato cinasa a una concentración de KCl aproximadamente 0.2M pero con una actividad específica inferior a la de la muestra inyectada. En cambio, la aplicación de la misma fracción activa obtenida por Sephadex G-100 a una columna de DEAE-Sephadex A-50 nos ha proporcionado una mayor purificación de la enzima de *Agave*. Resultados similares fueron obtenidos por Williamson y col. (54) con la enzima de *Hevea* que no podía haber sido purificada por DEAE-celulosa. En *A. americana* la mayor parte de la actividad fue eluida con KCl 0.2M, pero las reacciones enzimáticas realizadas con esta fracción pusieron de manifiesto también la formación de una pequeña cantidad de MVAPP, lo cual indica la existencia de la fosfomevalonato cinasa junto a la meva-

lonato cinasa parcialmente purificada. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida se han separado dos bandas en la fracción eluida con KCl 0.2M del DEAE-Sephadex A-50, lo cual corrobora la existencia de al menos otra proteína junto a la mevalonato cinasa. En el caso de la enzima de *P. pinaster*, el fraccionamiento por DEAE-Sephadex A-50 no conduce a un mayor grado de purificación, ya que la fracción eluida con actividad mevalonato cinasa presenta una actividad específica tres veces inferior a la de la muestra aplicada a la columna.

La purificación parcial y la caracterización de la mevalonato cinasa constituye un paso significativo en el conocimiento de una de las primeras enzimas del proceso de biosíntesis de los isoprenoides en los orígenes estudiados. La demostración de que la mayor parte de la enzima aparece en la fracción cloroplastídica y el aislamiento por Sephadex G-100 de dos fracciones activas con diferente estabilidad parece sugerir la presencia de dos isoenzimas, ambas activas al mismo pH. Sin embargo, Hill y Rogers (57) han intentado recientemente separar distintas especies moleculares de la mevalonato cinasa de cotiledones de *Phaseolus vulgaris* mediante electroenfoque, obteniendo varios picos por este procedimiento.

Por todo ello, parece conveniente continuar las investigaciones en este campo, para la determinación de otros parámetros moleculares y de la compartimentación de estas isoenzimas con objeto de dilucidar el papel de la mevalonato cinasa en la regulación de la biosíntesis de los compuestos isoprenoides en vegetales.

#### AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento al Prof. F. Mayor por su constante orientación y guía en la realización del presente trabajo.

Esta investigación se ha llevado a cabo con ayuda de una Beca de Formación del Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.—RUZICKA, L.: *Experientia* 9, 357-367 (1953)
- 2.—BLOCH, K. and RITTEMBERG, D.: *J. Biol. Chem.* 155, 243-249 (1944).
- 3.—FOLKERS, K., SHUNK, C. H., LINN, B. O., ROBINSON, F. M., WITTEICH, P. E., HUFF, H. W., GILFILLAN, J. L. and SKEGGS, H. R.: "Ciba Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols". Ed. G. E. W. Wolstenholme and O'Connor. Churchill Ltd., London (1959), p. 20.

- 4.—SKEGGS, H. R., WRIGHT, L. E., CRESSON, E. L., MCRAE, G. D. E., HOFFMAN, C. H., WOLF, D. E. and FOLKERS, K.: *J. Bacteriol.* 72, 519-526 (1956).
- 5.—GOULD, R. G. and POPJAK, G.: *Biochem. J.* 66, 51P (1957).
- 6.—TAVORMINA, P. A. and GIBBS, M. H.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 6210 (1956).
- 7.—GOODWIN, T. W.: *Biochem. J.* 70, 612-617 (1958).
- 8.—MERCER, E. I. and GOODWIN, T. W.: *Biochem. J.* 85, 13P (1962).
- 9.—MERCER, E. I. and GOODWIN, T. W.: *Biochem. J.* 85, 46P (1963).
- 10.—GOAD, L. J. and GOODWIN, T. W.: *Biochem. J.* 99, 735-746 (1966).
- 11.—POTTY, V. H. and BRUEMMER, J. H.: *Phytochemistry*, 9, 99-105 (1970).
- 12.—POTTY, V. H. and BRUEMMER, J. H.: *Phytochemistry*, 9, 1001-1007 (1970).
- 13.—POTTY, V. H. and BRUEMMER, J. H.: *Phytochemistry*, 9, 1229-1237 (1970).
- 14.—POTTY, V. H. and BRUEMMER, J. H.: *Phytochemistry*, 9, 2319-2321 (1970).
- 15.—FRANCIS, M. J. O., BANTHORPE, D. V. and LePATOUREL, G. N. J.: *Nature*, 228, 1005-1006 (1970).
- 16.—TCHEN, T. T.: *J. Biol. Chem.* 233, 1100-1103 (1958).
- 17.—LEVY, H. R. and POPJAK, G.: *Biochem. J.* 72, 35P (1956).
- 18.—MARKELY, K. and SMALLMAN, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 327-335 (1961).
- 19.—LOOMIS, W. D. and BATAILLE, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 54-63 (1963).
- 20.—WILLIAMSON, I. P. and KERWICK, R. G. O.: *Biochem. J.* 88, 18P (1963).
- 21.—COOPER, C. Z. and BENEDICT, C. R.: *Plant Physiol.* 42, 515-519 (1967).
- 22.—WILLIAMSON, I. P. and KERWICK, R. G. O.: *Biochem. J.* 96, 862-871 (1965).
- 23.—VALENZUELA, P., BEYTIA, E., CORI, O. and YUDELEVICH, A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 113, 536-639 (1966).
- 24.—VALENZUELA, P., CORI, O. and YUELEVICH, A.: *Phytochemistry*, 5, 1005-1011 (1966).
- 25.—ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J. and GOODWIN, T. W.: *Biochem. J.* 96, 7P-8P (1966).
- 26.—ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J. and GOODWIN, T. W.: *Biochem. J.* 99, 381-388 (1966).
- 27.—ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J. and GOODWIN, T. W.: *Biochem. J.* 100, 14C-17C (1966).
- 28.—ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J. and GOODWIN, T. W.: *Photosynthetica*, 2, 184-207 (1968).
- 29.—ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J. and GOODWIN, T. W.: "Biochemistry of Chloroplasts". Ed. T. W. Goodwin, Academic Press, London, (1967), p. 283.
- 30.—MACHADO, A., GARCIA-PEREGRIN, E. and MAYOR, F.: *Plant Sci. Lett.* 2, 83-87 (1974).
- 31.—GARCIA-PEREGRIN, E.: Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 1968.
- 32.—GARCIA-PEREGRIN, E.: *Ars Pharm.*, 11, 15-33 (1970).
- 33.—GARCIA-PEREGRIN, E. and MAYOR, F.: *Rev. Esp. Fisiol.* 26, 209-216 (1970).
- 34.—GARCIA-PEREGRIN, E. and MAYOR, F.: *Rev. Esp. Fisiol.* 27, 15-22 (1971).
- 35.—ARAGON, M. C.: Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 1971.
- 36.—GARCIA-PEREGRIN, E., SUAREZ, M. D., ARAGON, M. C. and MAYOR, F.: *Phytochemistry*, 11, 2495-2498 (1972).

- 37.—SUAREZ, M. D.: Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 1973.
- 38.—SUAREZ, M. D., GARCIA-PEREGRIN, E. and MAYOR, F.: *Phytochemistry*, 13, 1059-1063 (1974).
- 39.—SUAREZ, M. D. and GARCIA-PEREGRIN, E.: *Phytochemistry* (en prensa).
- 40.—GARCIA-PEREGRIN, E., SUAREZ, M. D. and MAYOR, F.: *FEBS Lett.* 30, 15-17 (1973).
- 41.—COLOMA, A.: Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 1972.
- 42.—GARCIA-PEREGRIN, E., COLOMA, A. and MAYOR, F.: *Plant Sci. Lett.* I, 367-373 (1973).
- 43.—LINARES, A.: Tesina de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 1974.
- 44.—LINARES, A., GARCIA, J., SUAREZ, M. D. and GARCIA-PEREGRIN, E.: VI Congreso SEB, Sevilla, abst. 51, 1975.
- 45.—MONTEOLIVA, M., FUNES, A., GARCIA-PEREGRIN, E., ZAFRA, M. F. y HENARES, M.: *Ars Pharm.* 10, 285-347 (1969).
- 46.—CORI, O.: *Arch. Biochem. Biophys.* 135, 416-418 (1969).
- 47.—BANTHORPE, D. V. and Le PATOUREL, G. N. J.: *Biochem. J.* 103, 1055-1061 (1972).
- 48.—ZAVARIN, E.: *Phytochemistry*, 9, 1049-1063 (1970).
- 49.—ZAFRA, M. F. and GARCIA-PEREGRIN, E.: *J. Agr. Sci.* 86, 1-6 (1976).
- 50.—ZAVARIN, E., COBB, F. W., BERGOT, J. and BARBER, H. W.: *Phytochemistry*, 10, 3107-3114 (1971).
- 51.—ADAMS, R. P.: *Phytochemistry*, 9, 397-402 (1970).
- 52.—POWELL, R. A. and ADAMS, R. P.: *Amer. J. Bot.*, 60, 1041-1050 (1973).
- 53.—LEVY, H. R. and POPJAK, G.: *Biochem. J.* 75, 417-428 (1960).
- 54.—GOODFELLOW, R. D. and BARNES, F. J.: *Insect Biochem.* 1, 271-282 (1971).
- 55.—BEYTIA, E., DORSEY, J. K., MARR, J., CLELAND, W. W. and PORTER, J. W.: *J. Biol. Chem.* 245, 5450-5458 (1970).
- 56.—THOMAS, D. R. and STOBART, A. K.: *Phytochemistry*, 9, 1443-1451 (1970).
- 57.—HILL, H. M. and ROGERS, L. J.: *Phytochemistry*, 13, 763-777 (1974).