UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

03081

EL PAPEL DE LA ATP-DIFOSFOHIDROLASA (APIRASA) DE LAS MITOCONDRIAS DE LA PLACENTA HUMANA A TERMINO

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESISQUESUSTENTAELMenIBBOSCARFLORESHERRERAPARAOBTENERELGRADODEDOCTORENINVESTIGACIONBIOMEDICABASICA

289385

CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.

FEBRERO 2001



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor. Esta es la última ocasión que tengo de dedicar una tesis, la de doctorado, y vale la pena tomarse el tiempo para hacerlo bien.

Quiero hacer un reconocimiento a mi padre, por que aún después de encontrarse sin mi madre, ha tenido el tesón para mantenerse de pie y firme. Es una muestra de lo hondo que tiene sus raíces. Sigue siendo un buen ejemplo de carácter.

La Familia Flores. Es una gran familia, tanto en número como en su calidad y cariño. Sus integrantes son más que conocidos, pero por si acaso, los enumero: La hija mayor es Elvira, después está Francisco, luego Raúl y Roberto, le sigue Lucy, Enrique y en penúltimo lugar está Héctor. Yo ocuparía la posición final, pero me continúan los sobrinos (Karla, Emmanuel, Amanda, Claudia, Adrián, Emilio, Leonardo, Paco, el otro Leonardo, Gaby, Pavel, Daniel y Beto) y mi hijo Sebastián, Elvia, las cuñadas, el querido cuñado y mi familia política. Todos juntos son una gran familia de imperecederos ramilletes de flores.

También quiero recordar a mis queridos amigos, Eduardo/*pijul*, Luis/taxs, Marco/homobono, León/L, Danivid/peDOV, Diego/cachetes. No hay nada como contar con su presencia, sus consejos, sus críticas, y sin duda, su incondicional apoyo.

En una curva de la vida (A la memoría de mi madre)

Hoy quiero convidar esta alegría a dos figuras de mi historia que se cruzaron en la misma curva de la vida

una de ida la otra de vuelta

la una se llevó grandes cosas la otra llegó con un ramo de flores frescas con nuevo aroma y un gran invento

la una me entregó su pecho en el rincón de su abrazo la otra estrenó el calor de mi beso

la una me regaló un universo la otra lo tachonó con las estrellas de sus ojos

la una construyó una vida la otra reinventa el futuro arañando las paredes de mi habitación

la una fue un atardecer que se fue la otra es un despertar entre nuevas cosas /pequeñas cosas/ que me cuentan sobre sitios que aún quiero conocer

la una fue un árbol de raíces hondas la otra es apenas un retoñito que le coquetea al sol al cieto y sus nubes

la una fue el abrigo que usó la otra el día que llegó después de saludarse en una curva de la vida.

(Febrero 2001)

A Sebastián

Jinete de manos firmes que forjan su historia domando unicornios y pegasos para volar al viento y remover las hojas que borrachas han caído del árbol

Mago que crea sueños con sus manos que de pronto dijo una palabra y robó el conejo lunar para esconderlo junto al corazón y al resto de sus sueños

Hombre aún de pocas palabras y ojos negros de manos regordetas y aventuras en tierras lejanas que bailan un vals

Niño-fusil contra la tristeza niño-cuento para dormir niño pequeño que lo es todo a la vez.

(Septiembre 2000)

Reencuentro diario (A Elvia)

Amar es disfrutar de la sorpresa de las imperfecciones del reencuentro diario.

Sólo en el silencio la palabra sólo en la oscuridad la luz sólo en la muerte la vida, el vuelo del halcón brilla en el cielo vacío

> La Creación de Ea -Un mago de Terramar-, Ursula K. Leguin.

PRÓLOGO

Este trabajo doctoral está basado en el estudio de la actividad cinética de la ATP-difosfohidrolasa que se encuentra asociada a las mitocondrias de la placenta humana. Se analiza el posible papel que desempeña esta enzima en el metabolismo mitocondrial, en particular en la síntesis de progesterona.

El trabajo escrito está dividido en un cuerpo principal y tres apéndices. En aquel se incluye el resumen, la introducción, la metodología, los resultados, la discusión y las referencias; en el apéndice A incluye la copia del sobretiro del artículo de investigación publicado. El siguiente apéndice contiene el artículo de revisión publicado durante el periodo que comprende los cursos formales del doctorado, y por último, en el apéndice C se explican las bases matemáticas del regráfico de competencia.

Se sugiere que la revisión de la tesis se inicie por el artículo publicado y continuar con el cuerpo principal. Esto se debe a que la información contenida en el artículo es la base para los experimentos y resultados descritos en el cuerpo principal, y que se incluyen en el artículo en preparación.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	3
Métodos	21
Resultados	29
Discusión	44
Referencias	52
Apéndice A (artículo de investigación)	56
Apéndice B (artículo de divulgación)	67
Apéndice C (regráfico de competencia)	79

R35UM3N

La magia está en la sangre, fluye del corazón. Cada vez que la utilizas, parte de ti mismo desaparece con ella. Sólo cuando estés preparado para entregarte sin recibir nada a cambio, la magia te servirá.

> Theobald Morath Beckman, maestro. (La Forja de un Túnica Negra, vol. I, -Raistlin, el Aprendiz de Mago-, Margater Weis)

RESUMEN

n este trabajo se estudió el efecto del inhibidor 5'-p-fluorosulfonilbenzoil adenosina (5'-FSO2BZA), un análogo no hidrolizable del ATP, sobre la actividad de la ATP-difosfohidrolasa (apirasa) asociada a la membrana interna de las mitocondrias de la placenta humana. La incubación de la fracción enriquecida con la actividad de la apirasa con 1 mM de 5'-FSO₂BzA durante 90 min, disminuyó la actividad de ATPasa y ADPasa dependiente de Ca²⁺ o Mg²⁺ en un 60 y 70%, respectivamente. La adición de los nucleosidos tri- o difosfatados con el 5'-FSO₂BzA provee una protección de la actividad de la apirasa mayor al 90%, lo que indica que el inhibidor se fija en el sitio de unión para el ATP o el ADP en la ATP-difosfonidrolasa. En las mitocondrias aisladas de la placenta humana, la adición del 5'-FSO₂BzA produjo la inhibición del consumo de oxígeno inducido por el ATP y de la síntesis de progesterona. Los resultados permiten concluir que (1) la hidrólisis del ATP y el ADP se realiza por la misma enzima; (2) el 5'-FSO₂BzA se une específicamente al sitio activo de la ATP-difosfohidrolasa; (3) los cationes divalentes no son requeridos para la unión del inhibidor o el sustrato al sitio activo; (4) la actividad de la apirasa desempeña un papel importante en el metabolismo de las mitocondrias de la placenta humana a término y está directamente involucrada con la síntesis de progesterona.

INTRODUCCIÓN

El mago inteligente, se dijo Elminster, recordando las palabras de Mystra, finge no saber nada en absoluto sobre la magia. Luego, con ironía añadió el corolario: cuando adquiera auténtica sabiduría, sabrá que en realidad no fingía.

۰.

Elminster, mago. (Myth Drannor, Ed Greenwood)

INTRODUCCIÓN

Le l papel biológico del ATP no se limita únicamente al suministro de energía en los diferentes procesos metabólicos, sino que su participación celular involucra también a la transmisión de información en el sistema nervioso central y periférico. En general, el ATP, el ADP, el AMP y la adenosina están relacionados en el control de diversas vías metabólicas que frecuentemente son antagónicas, por lo que debe de existir un estricto control de su concentración a nivel intracelular.

Diversos estudios encaminados a esclarecer los mecanismos que regulan el nivel de los nucleótidos en las células y los tejidos, aportan evidencias que sugieren que las ATP-difosfohidrolasas (EC 3.6.1.5), comúnmente llamadas apirasas, pueden participar en tal modulación (1) repercutiendo en mecanismos tales como la transmisión de información en el sistema nervioso central y periférico (2); la regulación de la agregación plaquetaria (3, 4) y la presión sanguínea (5, 6); la glicosilación de las proteínas y el metabolismo de los carbohidratos (7, 8) y la regulación y protección de la integridad de las membranas biológicas (9, 10). Aunque los datos no son concluyentes, la abundancia y concentración de las apirasas, así como su alta capacidad catalítica tanto en las células procariotas como eucariotas (5, 11-14), apoyan la hipótesis de que estas enzimas desempeñan un papel importante en el metabolismo celular de los nucleótidos.

Las ecto-apirasas pertenecen al grupo de glicoproteínas membranales denominado ATPasas de tipo E, en el cual también se incluyen a las ecto-ATPasas. Ambos tipos enzimáticos tienen una alta capacidad para hidrolizar a los nucleótidos púricos y pirimídicos, tri o difosfatados. Su actividad es totalmente dependiente de cationes divalentes como el Ca²⁺ o el Mg²⁺ en el intervalo de concentración milimolar y son insensibles a los inhibidores clásicos para las ATPasas del tipo P, F o V (15).

Una diferencia enzimática importante entre las ecto-apirasas y las ecto-ATPasas, es que las primeras presentan la capacidad de hidrolizar a los nucleósidos tri (NTP) y difosfatados (NDP) con velocidades similares, mientras que las ecto-ATPasas tienen una velocidad de hidrólisis típica para los NTP que es 25 veces mayor que para los NDP. Sin embargo, ambos tipos enzimáticos son incapaces de hidrolizar a los ésteres de fosfato (15).

El pH óptimo para la actividad de las apirasas de plantas es de 6.5 (13, 16) mientras que aquellas de origen animal presentan una mayor actividad a valores de pH superiores de 7 (13, 17). Todas las apirasas son resistentes a los reactivos específicos para la modificación de los grupos -SH (12, 18 y 19) pero son sensibles a los agentes quelantes (14, 20), a los análogos del ATP (20, 21) y algunas de ellas al HgCl₂ (12, 17, 22).

La estructura de las apirasas

La as ATP-difosfohidrolasas son enzimas de membrana que hidrolizan al ATP y al ADP hasta AMP liberando fosfato inorgánico. Los estudios llevados a cabo con las apirasas purificadas de diversos organismos y tejidos muestran que se trata de una proteína glicosilada de aproximadamente 70-100 kDa en estado nativo; esta variación en la masa molecular depende del número de sitios de glicosilación así como del tipo y unidades de carbohidratos incorporados.

Recientemente se han obtenido las secuencias de los residuos de aminoácidos de diversas apirasas, entre las que se incluyen a la de cerebro humano (HB6) (23), las isoformas de los linfocitos de humano (CD39, CD39L y CD39L3) (24) y de ratón (CD39) (26), las del sistema vascular de mamíferos (27), las de aves (28), las de bovinos (29) y las NTPasas de plantas (29) (Fig. 1).

El análisis de su estructura primaria permite predecir una masa molecular de entre 30-70 kDa en ausencia del enramado de carbohidratos y un pl de 7.9; asimismo, poseen un número variable de sitios de glicosilación y entre 11 a 13 residuos de cisteína en las proteínas animales y solo 7 en plantas (Fig 1). Aunado a esto, presentan un sitio potencial de fosforilación por una proteína cinasa dependiente de AMPc/GMPc así como una tirosina susceptible de ser fosforilada (23).

El análisis de hidropatía predice la existencia de dos regiones transmembranales con estructura de α -hélice, una a cada extremo de la proteína y un dominio extramembranal que comprende al 85% de la estructura proteica y en donde reside la actividad catalítica (Fig. 2) (23, 25).

El alineamiento de diversos miembros de la familia de las ATPasas del tipo E, muestra cinco regiones de identidad en la secuencia de los residuos de aminoácidos, denominadas como "regiones conservadas de las apirasas" (ACR, del inglés, apyrase conserved regions) (24, 30) (Fig. 1).

La mutación selectiva de diversos residuos de aminoácidos en las diferentes regiones ACR modifica la actividad de las apirasas, lo que sugiere que tienen una participación muy importante en la catálisis enzimática así como en la integridad estructural de la proteína.

En este sentido, la mutación del residuo de aspártico por alanina o asparagina de la región ACR V (Fig. 1) disminuye en >90% la actividad de ATPasa de la apirasa, y elimina totalmente la hidrólisis del ADP. Asimismo se pierde la capacidad de hidrolizar cualquier otro nucleósido tri o difosfatado. La mutación de este residuo de aspártico por glutámico no afecta la capacidad catalítica de la apirasa en presencia de ATP, mientras que su actividad de ADPasa sólo disminuye sutilmente (31).

La mutación de otro residuo de aspártico, ahora en la región ACR I y de los residuos de glicina de la región ACR I y IV también provocan una disminución en la actividad de la apirasa. Estos resultados muestras que dichas regiones

contienen los residuos para la fijación o la catálisis de los grupos fosfato β y γ de los nucleótidos, lo que se asemeja a lo que se encuentra en la superfamilia de la actina/HSP70/azúcar-cinasa (31).

Por otra parte, la eliminación total de la región ACR I o ACR V disminuye substancialmente el transporte de la enzima a la superficie membranal, al parecer, debido a un mal plegamiento de la proteína. La eliminación de la región transmembranal del extremo amino y de la región ACR V provoca la localización intracelular de tales mutantes. Finalmente, la eliminación de la región ACR I o ACR IV disminuye su expresión celular, lo que indica que hay un requerimiento de esas regiones para el plegamiento apropiado de la proteína y su expresión en condiciones tales que pueda desempeñar su papel fisiológico.

El grupo de Kirley (32) ha realizado la mutación de dos residuos de triptofano de las regiones ACR III y V (Fig. 1). La sustitución del residuo de triptofano por alanina en la región ACR III produce una expresión pobre de la apirasa, además de disminuir su actividad y dejar a la enzima en el interior celular, en contraste con el comportamiento de la proteína silvestre. Asimismo, esta mutante es sensible a la digestión proteolítica por la quimotripsina, lo que sugiere que la mutación altera su estructura terciaria e impide su transportación a la membrana plasmática y la hace sensible a ser degradada.

ACR I B2-D1

B]-D1

al-Dl

a hélice de región transmembranal

HB6 (H.sapiens)	1	MFTVLTROPC	EOAGLKALYR	TPTIIALVVL	LVSIVVLVSI	TVIQIHKQEV	LPPGLKYG <u>I</u>	V LDAGSSRTTV
CD39 (H.sapiens)	1	ME	DTKESNVKTF	CSKNILAILG	FSSIIAVIAL	LAVGLTONKA	LPENVKYG <u>I</u>	V LDAGSSHTSL
CD39L (H.sapiens)	1	ME	DTKESNVKTF	CSKNILAILG	FSSIIAVIAL	LAVGLTONKA	LPENVKYG1	V LDAGSSHTSL
CD39L3 (H.sapiens)	1	MFTVLTROPC	EQAGLKALYR	TPTIIALVVL	LVSIVVLVSI	TVIQIHKQEV	LPPGLKYGI	V LDAGSSRTTV
CD39 (M.musculus)	1	ME	DTKESNVKTF	CSKNILAILG	FSSIIAVIAL	LAVGLTONKA	LPENVKYG1	V LDAGSSHTSL
Apirasa (<i>H.sapiens</i>)	1	ME	DTKESNVKTF	CSKNILAILG	FSSIIAVIAL	LAVGLTONKA	LPENVKYGI	<u>V LDAGSSHTSL</u>
Ecto-apirasa I(H.sapiens)	1	MKGTKDLTS	QQKESNVKTF	CSKNILAILG	FSSIIAVIAL	LAVGLTONKA	LPENVKYG	V LDAGSSHTSL
Ecto-apir II (H.sapiens)	1	MKGTKDLTS	QQKESNVKTF	CSKNILAILG	FSSIIAVIAL	LAVGLTONKA	LPENVKYG	V LDAGSSHTSL
Ecto-ATPasa (G.gallus)	1		м	ARRAAAVLLL	LALGCLIGIL	LLCLGSGDAR	GPPSFKYG	<u>V LDAGS</u> S <u>HTAV</u>
Ecto-apirasa (G.gallus)	1		MEYK	GKVVAGLLTA	TCVFSIIALI	LSAVDVKDVF	LPPGTKYGL	V FDAGSTHTAL
Apirasa (B.taurus)	1		MAG	KLVSLVPPLL	LAAVGLAGLL	LLCVPTODVR	EPPALKYG	<u> LDAGS</u> S <u>HTSM</u>
NTPasa (A.thaliana)	13	PKHOSLPYTV	TKAKSKSLIL	LVVVSVTITL	GLLLYVFNSN	SVISSGSLLS	RRCKLRYSV	IDAGSSCTRV

ACR II

β4-D1

β3-1)
------	---

HB6 (H.sapiens)	71	<u>YVY</u> QWPAEKE	NNTGVVSOTF KCSVKGSGI	5 SYGNNPQDVP	RAFEECMOKV KGOVPSHLHG STPIHLGATA
CD39 (H.sapiens)	63	YIYKWPAEKE	NDTGVVHOVE ECRVKGPGIS	S KEVOKVNEIG	IYLTDCMERA REVIPRSONO ETPYYLGATA
CD39L (H.sapiens)	63	<u>YIY</u> KWPAEKE	NDTGVVHQVE ECRVKGPGI	S KFVQKVNEIG	IYLTDCMERA REVIPRSONO ETPVYLGATA
CD39L3 (H.sapiens)	71	<u>YVY</u> QWPAEKE	NNTGVVSQTF KCSVKGSGI	S SYGNNPODVP	RAFEECMOKV KGOVPSHLHG STPIHLGATA
CD39 (M.musculus)	63	<u>YIY</u> KWPAEKE	NDTGVVHOVE ECRVKGPGI	5 KFVQKVNEIG	IYLTDCMERA REVIPRSONO ETPYYLGATA
Apirasa (H.sapiens)	63	<u>YIY</u> KWPAEKE	NOTGVVHOVE ECRVKGPGI	S KFVQKVNEIG	IYLTDCMERA REVIPRSONO ETPYYLGATA
Ecto-apirasa I(H.sapiens)	70	<u>YIY</u> KWPAEKE	NDTGVVHQVE ECRVKGPGI	KFVQKVNEIG	IYLTDCMERA REVIPRSONO ET PVYLGATA
Ecto-apir II (H.sapiens)	70	<u>YIY</u> KWPAEKE	NDTGVVHQVE ECRVKGPGI	S KFVQKVNEIG	IYLTDCMERA REVIPRSONO ETPYYLGATA
Ecto-ATPasa (G.gallus)	52	<u>FIY</u> KWPADKE	NDTGVVSEHS MCDVEGPGI	S SYSSKPPAAG	KSLEHCLSOA MRDVPKEKHA DTPLYLGATA
Ecto-apirasa (G.gallus)	55	<u>YVY</u> QWPADKE	NGTGIVSOVE SCTVNGSGI	S SYADDPAGAG	ASLKPCLDKA MAVIPVEQOW OTPTYLGATA
Apirasa (<i>B.taurus</i>)	54	<u>FVY</u> KWPADKE	NDTGIVGQHS SCDVRGGGI	S SYANDPSRAG	QSLVECLEOA LRDVPKDRYA STPLYLGATA
NTPasa (A.thaliana)	71	<u>hvf</u> gywfesg	KPVFDFG <u>EKH Y</u> ANLKLTPG	L SSYADNPEGA	SV <u>SVTKLVEF AKORIPKRMF RR</u> SDILMATA

Figura 1. Alineamiento de la secuencia de los residuos de aminoácidos de diversas apirasas de mamíferos, de aves y de plantas. Se muestran las asparaginas (N) de los sitios potenciales para la glicosilación (*); la treonina (T) en el sitio de fosforilación dependiente de AMPc/GMPc (Ψ) y la tirosina (Y) que puede ser fosforilada (1). También se muestran las 13 cisteínas (C) conservadas así como las regiones ACR I, II, III, IV y V. Se muestran los residuos de ácido aspártico (D) y de glicina (G) de las regiones ACR I y IV, involucrados en la fijación del fosfato β y γ del sustrato, respectivamente. Asimismo, se muestran los residuos de triptofano de las regiones ACR III y V involucrados en el mantenimiento de la actividad de la apirasa. Por último, se muestran las estructuras láminas β plegadas (___) y las α hélices (___) así como las regiones transmembranales (___).

.

						AUK III		
		α2-D1				β5-D1	α3-D1	
HB6 (H.sapiens)	141	GMRLLRLQNE	TAANEVLESI	QSYFKSQPFD	FRGAQI ISGQ	EEG <u>VYGWITA</u>	NYLMGNFLEK	NLWHMWVHPH
CD39 (H.sapiens)	133	GMRLLRMESE	ELADRVLDVV	ERSLSNYPFD	FQGARI ITGQ	EEGAYGWITI	NYLLGKFSCK	TRWFSIVPYE
CD39L (H.sapiens)	133	GMR LRMESE	ELADRVLDVV	ERSLSNYPFD	FQGARI ITGQ	EEGAYGWITI	NYLLGKFSCK	TRWFSIVPYE
CD39L3 (H.sapiens)	141	GMRLLRLONE	TAANEVLESI	QSYFKSQPFD	FRGAOI ISGQ	EEGVYGWITA	NYLMGNFLEK	NLWHMWVHPH
CD39 (M.musculus)	133	GMRLLRMESE	ELADRVLDVV	ERSLSNYPFD	FQGARIITGQ	EEGAYGWITI	NYLLGKFSCK	TRWFSIVPYE
Apirasa (H.sapiens)	133	GMRLLRMESE	ELADRVLDVV	ERSLSNYPFD	FQGARIITCO	EEGAYGWITI	NYLLGKFSCK	TRWFSIVPYE
Ecto-apirasa I(H.sapiens)	140	GMRILRMESE	ELADRVLDVV	ERSLSNYPFD	FQGAR I I TGQ	EEGAYGWITI	NYLLGKFSCK	TRWFSIVPYE
Ecto-apir II (H.sapiens)	140	GMRLLRMESE	ELADRVLDVV	ERSLSNYPFD	FQGAR I ITGQ	EEGAYGWITI	NYLLGKFSCK	TRWFSIVPYE
Ecto-ATPasa (G.gallus)	122	GMRLLTIADP	PSOTCLSAVM	A TLKSYPFD	FGGAKILSGE	EEGVFGWITA	NYLLENFIKR	GWLGEWIØSK
Ecto-apirasa (<i>G.gallus</i>)	125	GMRLLREONS	TKAEQVFAEV	SKAIREFPVD	FRGAOILTGN	EEGSFGWITV	NYLLETLIKF	SFAGKWEHPO
Apirasa (B.taurus)	124	GMRLLNLTSP	EATAKVLEAV	TOTLTRYPFD	FRGARILSGO	DEGVFGWVTA	NYLLENFIKY	GWVGRWIRPR
NTPasa (A.thaliana)	141	GMRLLEVPVQ	EQILEVTRRV	L RSSGFMFR	DEWANVISGS_	DEGIYSWITA	NYALGSLGTD	PLET
			CRIV					
		↓ β1.	D7 82.D	.	63-172			
			pz-D	*	p5-D2			
HR6 (H saniens)	213	GVET . T. GAL	DIGGASTOTS	FVAGEKMOLN	TSDIMOVSLY	GYVYTLYTHS	FOCYGRNEAE	KKFLAMLLON
CD39 (H sanjens)	203	TNNOETEGAL	DIGGASTOVE	FVPONOTIES	PDNALOFRLY	GKDYNVYTHS	FLCYGKDOAL	WOKLAKDIOV
CD39L (H sanjens)	203	TNNOETEGAL	DLCCASTOVE	EVPONOTIES	PONALOFRLY	GKDYNVYTHS	FLCYGKDOAL	WOKLAKDIOV
CD39L3 (# canienc)	211	CVET . T. CML	DICCASTOLE	EVAGERMDLN	TEDIMOVELY	GYUYTLYTHS	FOCYCENEAE	KKELAMLLON
CD39 (M musculus)	202	TANIOFTECAL	DICOLOTO	EVDONOTTES	DDNNLOEDLY	CKDVMVTHC	PLOYONDONI.	WOKLAKDIOU
Direct (H conjong)	203	THINDETECAL	DI CONSTOUR		PDNALOPPLY	CKDYNVTHS	FLOIGKDQAD	WOKLAKDIOV
Apirasa (H.sapiens)	203	THNUELCOAL	DI GOLOTOVI		PDNALOFRUI	GKDYNVIIIG	FICTORDONI	WORLNEDIOV
Ecto-apirasa i(H.sapiens)	210	TIMULICAL.	DIGGASTOVI	FUPONOTIES	PDNALOFRUI	GKDINVIIAS	FLCIGNDQAL	WOKLANDIOV
Ecco-apir II (H.sapiens)	210	INNOLT GAL	DIGGASTOVI	FVPONUTIES	PUNALOFREI	GADINVIIIIS	FLCIGNDQAL	WORLANDIQA
Ecto-ATPasa (G.gailus)	191	KK TLGAM	DFGGASTQIF	FETSDA · 1ED	PKNEVMLKLY	GOPYKVYTHS	FLCYGRDQVL	KRLLSKVLQA
Ecto-apirasa (G.gallus)	195	NTEV LGAL	<u></u>	FOPGV TIED	KNT <u>SVLF</u> RLY	GINYSLYTHS	YLCYGQIQAS	KRLMAALHOD
Apirasa (B.taurus)	194	KG TLGAM	DLGGASTQIT	FETTS · PSED	PON <u>ÉVHL</u> RLY	GQHYRVYTHS	FLCYGRDQVL	QRLLASALQI
NTPasa (A.thaliana)	204	TIV	ELCGASAOVE	FVSSEHVPPE	YSR <u>TIAY</u> GNI	SYTI · · YSHS	FLDYGKDAAL	KKLLEKLONS
				*				*
HB6 (H.sapiens)	279	SPTKNHLTNP	CYPRDYSISF	TMGHVFDSLC	TVDQRPESYN	PNDVITFEGT	GDPSLCKEKV	ASIFDFKACH
CD39 (H.sapiens)	273	ASNEILRDP	CFHPGYKKVV	NVSDLYKTPC	TKRFEMTLPF	QQFEIQGIGN	YQQCHQSILE	LFNTSYCPYS
CD39L (H.sapiens)	273	 ASNEILRDP 	CFHPGYKKVV	NVSDLYKTPC	TKRFEMTLPF	QQFEIQGIGN	YOOCHOSILE	LFNTSYCPYS
CD39L3 (H.sapiens)	279	SPTKNHLTNP	CYPRDYSISF	TMGHVFDSLC	TVDQRPESYN	PNDVITFEGT	GDPSLCKEKV	ASIFDFKACH
CD39 (M.musculus)	273	ASNEILRDP	CFHPGYKKVV	NVSDLYKTPC	TKRFEMTLPF	QQFEIQGIGN	YOOCHOSILE	LFNTSYCPYS
Apirasa (H.sapiens)	273	ASNEILRDP	CFHPGYKKVV	NVSDLYKTPC	TKRFEMTLPF	QQFEIQGIGN	YQQCHQSILE	LENTSYCPYS
Ecto-apirasa I(H.sapiens)	280	· ASNEILRDP	CFHPGYKKVV	NVSDLYKTPC	TKRFEMTLPF	OOFEIOGIGN	YOOCHOSILE	LFNTSYCPYS
Ecto-apir II (H.sapiens)	260	SITOSRPAPF	TSAPPAPTSC	CFLFOIO				
Ecto-ATPasa (G.gallus)	257	ENYOETVANP	CWPTGYRKSI	SLSSIYDSPC	TEKERPGLPL.	NTTVVSGTGN	GNLCAVHVNK	LFDFTSCSFS
Ecto-apirasa (G.gallus)	262	GSYVONISHP	CYPKGYRRII	TIAELYDSPC	VPTPSMLSPA	OILTVIGTON	PAACPTAILK	LFNLTCGANR
Apirasa (B.taurus)	260	HRFHPCWPKG	YSTOLLREVY	OSPCTMGORP	OTENSSATVS	LSGTSNAALC	RDLVSGLFNT	SSCPFSOCSF
NTPasa (A.thaliana)	266	ANSTVDGVVE	DPCTPPKGYT	YDTNSKNYSS	GFLADESKIK	GSLOAAGNES	KCRSATFALL	KEGKE · NCLY
Figure 4 eastinussife	200							
rigura 1. continuación.								

HB6 (H.sapiens)	349	DOETCSFDGV	YQPKIKGPFV	AFAGFYYTAS	ALNLSGSFSL	DTFNSSTWNF	CSQNWSQLPL	L <u>LPKFDEVYA</u>
CD39 (H.sapiens)	342	• QCAFNGIFL	PPLQ · GDFG	AFSAFYFVMK	FLNLTSEKVS	QEKVTEMMKK	FCAOPWEEIK	T <u>SYAGVKEKY</u>
CD39L (H.sapiens)	342	·QCAFNGIFL	PPLO GDFG	AFSAFYFVMK	FLNLTSEKVS	QEKVTEMMKK	FCAQPWEEIK	T <u>SYAGVKEKY</u>
CD39L3 (H.sapiens)	349	DQETCSFDGV	YQPKIKGPFV	AFAGFYYTAS	ALNLSGSFSL	DTFNSSTWNF	CSQNWSQLPL	LLPKFDEVYA
CD39 (M.musculus)	342	· QCAFNGIFL	PPLQ GDFG	AFSAFYFVMK	FLNLTSEKVS	QEKVTEMMKK	FCAQPWEEIK	TSYAGVKEKY
Apirasa (H.sapiens)	342	· QCAFNGIFL	PPLQ · · GDFG	AFSAFYFVMK	FLNLTSEKVS	QEKVTEMMKK	FCAQPWEEIK	T <u>SYAGVKEKY</u>
Ecto-apirasa I(H.sapiens)	349	· CAFNGIFL	PPLQ · · GDFG	AFSAFYFVMK	FLNLTSEKVS	QEKVTEMMKK	FCAQPWEEIK	T <u>SYAGVKEKY</u>
Ecto-ATPasa (<i>G.gallus</i>)	327	HCSFDGVFQP	EVS···GNFI	AFSAFFYTVD	FIRTVMERPV	HSPSDLKDAA	ETICATSWNE	LYOKAPRLEK
Ecto-apirasa (G.gallus)	332	TCGFDGVYQP	PVR · · · · GQFF	AFAGFYYTFS	FLNLTGOQSL	SHVNATVWDF	CNKNWSELVE	TFPONKEHLH
Apirasa (B.taurus)	330	NGFFQPPVAG	NFI···AFSA	FYYTVDFLKT	VMGLPVGTLK	OLEDATETTC	NOTWAELQAR	VPGQQTRLPD
NTPasa (A.thaliana)	335	EHCSIGSTFT	PDLQ · GSFL	ATASFYYTAK	FFELEEKGWL	SELIPAGKRY	CGEEWSKLIL	E <u>YPTTD</u> EEYL

٠

ACR V

			β4-D2	α2-D2	*β5-D2 α3-D2
HB6 (H.sapiens)	419	· · RSYCESAN	YTYHLEVNGY	KETEETWPOT HEEKEVONSS	TAWSLOYMLS LTNOTPAESP LIPLPIEDPV
CD39 (H.sapiens)	409	LS · EYCFSGT	YI <u>LSLLLO</u> GY	HFTADSWEHI HFTGKIQGSD	AGWTLGYMLN LTNMIPAEOP LSTPLSHSTY
CD39L (H.sapiens)	409	<u>LS · E</u> YCFSGT	YI <u>LSLLLQ</u> GY	HFTADSWEHI HFIGKIQGSD	AGWTLGYMLN LTNMIPAEOP LSTPLSHSTY
CD39L3 (H.sapiens)	419	<u>···RS</u> YCFSAN	YI <u>YHLFVN</u> GY	KFTEETWPOI HFEKEVGNSS	IAWSLGYMLS LTNOIPAESP LIRLPIEPPV
CD39 (M.musculus)	409	<u>LS · E</u> YCFSGT	YI <u>LSLLLQ</u> GY	HFTADSWEHI HFIGKIOGSD	AGWTLGYMLN LTNMIPAEQP LSTPLSHSTY
Apirasa (<i>H.sapiens</i>)	409	<u>LS · E</u> YCFSGT	YI <u>LSLLLQ</u> GY	HFTADSWEHI HFIGKIOGSD	AGWTLGYMLN LTNMIPAEOP LSTPLSHSTY
Ecto-apirasa I(H.sapiens	415	<u>LS · E</u> YCFSGT	YI <u>LSLLLO</u> GY	HFTADSWEHI HFIGKIQGSD	AGWTLGYMLN LTNMIPAEOP LSTPLSHSTY
Ecto-ATPasa (G.gallus)	394	<u>RLPD</u> YCATST	FV <u>YLLITK</u> GY	NFNNRSFPSI AFOKKAGETS	IGWALGYMLN LTNMIPAQEP ASHRSMLYNY
Ecto-apirasa (G.gallus)	399	····TYCVVG	YI <u>LTLLVD</u> GY	KFDEHTW <u>SNI HFS</u> QKAGNAD	IGWTLGFMLN LTNMIPTEAL EHVKGHEPSW
Apirasa (<i>B.taurus</i>)	397	···· YTCVAM	FIHOLLSRGY	SFDERSFRGV VFEKKAADTA	VGWTLGYMLN LTNLIPADLP GLRKGTHFSS
NTPasa (A.thaliana)	403	<u>RGYC</u> FSAAYT	IS <u>MLHDSL</u> GI	ALDDESITYA SKAGEKHIPL	DGWALGAFIL DVVTENSDYN GKSRKYLGF

α hélice de la región transmembranal

HB6 (H.sapiens)	487	FVGTLAFFTA	ARLLCLAFLA	YLCSATRRKR	HSEHAFDHAV	DSD
CD39 (H.sapiens)	478		VFLMVLFSLV	LFTVAIIGLL	IFHKPSYFWK	DMV
CD39L (H.sapiens)	478	• • • • • • • • • • • • • • •	VFLMVLFSLV	LFTVAI IGLL	IFHKPSYFWK	DMV
CD39L3 (H.sapiens)	487	FVGTLAFFTV	AALLCLAFLA	YLCSATRRKR	HSEHAFDHAV	DSD
CD39 (M.musculus)	478		VFLMVLFSLV	LFTVAIIGLL	1 FHKPSYFWK	DMV
Apirasa (H. <i>sa</i> piens)	478		VFLMVLFSLV	LFTVAIIGLL	IFHKPSYFWK	DMV
Ecto-apirasa I(H.sapiens)	484	WVILILLSTY	VFLMVLFSLV	LFTVAIIGLL	IFHKPSYFWK	DMV
Ecto-ATPasa (G.gallus)	464	AGFVITTLTA	LLTAVYLLRR	SKSSTI		
Ecto-apirasa (G.gallus)	465	WVAISFIVLA	IVAGLVAILL	QCFWKSK		
Apirasa (B.taurus)	463	ALLLLFTVLI	LAALVLLLRQ	VRSAKSPGAL		

Figura 1. continuación.

En contraste, la mutación del triptofano de la región V (Fig. 1) produce la estimulación de la actividad de nucleótido trifosfatasa (NTPasa) pero disminuye la de NDPasa. La localización celular de esta mutante es similar a la proteína silvestre. Aunado a esto, si se realiza simultáneamente la mutación del residuo de triptofano de la región ACR V y el aspártico de la región ACR IV, se obtiene una enzima que hidroliza preferentemente a los nucleósidos trifosfatados. Esta doble mutante presenta una relación de las velocidades de hidrólisis de ATP/ADP de 11:1 y de 148:1 para la relación GTP/GDP, además, adquiere resistencia a la acción de la azida de sodio (32).

Por otra parte, la eliminación de la región ACR V y de la región transmembranal del extremo carboxilo, inhibe de manera importante la actividad de la apirasa. Esta mutante ya no es reconocida por el anticuerpo monoclonal BU61, lo que sugiere como epítope a la región del carboxilo terminal (31).

Por último, las regiones transmembranales están involucradas en la formación de dímeros, trímeros o tetrámeros (33) lo que produce una enzima con mayor capacidad catalítica. La eliminación de cualquiera de éstas disminuye la actividad de la apirasa y aumenta su resistencia a la desnaturalización por los detergentes. Lo anterior sugiere que los contactos entre estos dominios en los monómeros son necesarios para alcanzar la máxima actividad enzimática (30).

Así pues, las regiones ACR I, III, IV y V y las regiones transmembranales son necesarias para el mantenimiento de la actividad enzimática, la integridad estructural y la expresión de la proteína en las membranas celulares (34).



Figura 2. Modelos de la estructura secundaria de la ATP-difosfohidrolasa. En A se muestra la topología βββαβαβα de los dominios de la ATPdifosfohidrolasa basada en el análisis de la secuencia de los residuos de aminoácidos de la subunidad monomérica de la enzima (predicción consenso de la estructura secundaria de la Figura 1). Se muestran las regiones ACR I, II, III y IV así como la presencia de los dominios estructurales. Asimismo se muestran los sitios potenciales para la glicosilación (*, \bigcup), así como los residuos de cisteinas conservadas (c, \bigcirc). El sitio de fosforilación dependiente de AMPc/GMPc se muestra como (\uparrow) en el ACR IV y la tirosina fosforilable como (\uparrow) en el ACR II, así como la región epítope en el extremo carboxilo. En B se observa el posible arreglo en dos dimensiones de los dominios βββαβαβα de la apirasa así como la localización de las regiones que fijan al fosfato β y γ del sustrato (\Box). Aunque el número y la posición de los puentes disulfuro se desconoce, su presencia se basa en la resistencia de la apirasa a la proteólisis así como su inhibición por ditiotreltol.

Aunado al papel que desempeñan las regiones transmembranales en la oligomerización de las apirasas, la glicolisación también participa en dicho proceso (31). Al parecer, ta estructura cuaternaria de esta enzima depende de la presencia de las cadenas de glicanos. En este sentido, el tratamiento de la apirasa con la N-glicosidasa F causa una disminución en el peso molecular de la proteína asociada a la pérdida de la actividad con respecto al tiempo.

El uso de la tunicamicina en las células previene completamente la glicosilación y produce una apirasa incapaz de hidrolizar al ATP o al ADP. Sin embargo, la expresión y localización de esta apirasa no glicosilada es similar a la enzima silvestre (31).

Lo anterior sugiere que la glicosilación es necesaria para la homooligomerización y la actividad de hidrólisis sobre los nucleótidos, pero no para su expresión, plegamiento, transporte y correcta distribución a nivel celular.

Por otra parte, los residuos de cisteína contribuyen a la estabilidad estructural del monómero de la apirasa por medio de la formación de puentes disulfuro. La formación de estos puentes está basada en que 1) las cisteínas se encuentran expuestas a un medio oxidante, 2) los reactivos para su modificación química selectiva no inhiben la actividad de la ecto-apirasa de las aves y 3) el ditiotreitol produce la inhibición de la enzima (33). Los puentes disulfuro intramoleculares podrían participar en el incremento en la estabilidad de la proteína y probablemente contribuyan a la resistencia frente a la acción de las proteasas característica de estas proteínas (23).

En cuanto a la estructura secundaria, se predice una topología βββαβαβα (Figs. 1 y 2) (31). Esta es una característica común de todos los miembros de la superfamilia de la actina/HSP70/azúcar-cinasa, además de presentar dos dominios con un arreglo similar cuya asociación tridimensional forma una gran hendidura, con el sitio para la fijación del ATP o el ADP en el fondo de ésta (36). Se ha propuesto que para llevar a cabo la hidrólisis del sustrato, existe un cambio conformacional de estos dominios, lo que induce la apertura o el cierre de esta hendidura, permitiendo así la catálisis enzimática.

El mecanismo catalíco de las apirasas

n general, se ha observado que los productos de la hidrólisis del ATP o el ADP, catalizada por las apirasas, son el AMP y el fosfato inorgánico. Al parecer, el AMP puede acumularse en los primeros estadios de la reacción, aún cuando el ATP se encuentre en alta concentración en el medio (37).

En este sentido, el empleo de técnicas de HPLC asociadas al uso de sustratos marcados radiactivamente, ha permitido determinar que la relación entre el ortofosfato liberado y el AMP (Pi/AMP), al hidrolizarse el ATP, es igual a 2, mientras que al tener al ADP como sustrato esta relación es de 1 (37). La capacidad que tiene la apirasa para hidrolizar al pirofosfato de tiamina (15) y en

menor grado al pirofosfato (42), sugiere que la velocidad con que se libera al ortofosfato está relacionada al número de enlaces pirofosfato disponibles en cada ciclo catalítico, además de necesitar de la base nitrogenada y el azúcar para anclar al sustrato al sitio activo.

Para explicar el ciclo catalítico de las apirasas empleando al ATP como sustrato inicial, se han sugerido dos posibles mecanismos. En el primero, se considera un mecanismo con un solo paso en la catálisis (Ec. 1), mientras que para el segundo modelo se involucra una reacción con dos pasos catalíticos, donde se involucra al ADP como un intermediario (Ec 2):

$$ATP + 2H_2O \longrightarrow AMP + 2Pi$$
 (Ec. 1)

$$\begin{array}{rcl} \text{ATP} + \text{H}_2\text{O} & \longleftrightarrow & \text{ADP} + \text{Pi} & \longleftrightarrow & \text{AMP} + \text{Pi} & (\text{Ec. 2}) \\ & \uparrow & \\ & \text{H}_2\text{O} & \end{array}$$

Para dilucidar el tipo de mecanismo que sigue la apirasa, Tognoli y Marre (37) emplearon ADP y ATP marcados con fosfato radiactivo en la posición β o y. Ellos demostraron que en presencia de ATP marcado, la adición de ADP no radiactivo produce una disminución de casi el 50% en la liberación del fosfato radiactivo de la posición β o y. Esto sugiere que el ADP compite con el ATP para fijarse en el sitio activo de la enzima. Asimismo, Tognoli y Mare (37) han propuesto el siguiente mecanismo para la hidrólisis del ATP por la apirasa microsomal del tallo del chícharo:

$$H_{2}O \qquad H_{2}O \qquad H_{2}O \qquad H_{2}O \qquad ATP + E \longleftrightarrow ATP \cdot E \longleftrightarrow ADP \cdot E \cdot Pi \longleftrightarrow ADP \cdot E \leftrightarrow AMP \cdot E \cdot Pi \longleftrightarrow E + AMP \\ Pi \qquad Pi \qquad Pi$$

Este esquema es correcto solo si la hidrólisis del ATP se lleva a cabo por una sola enzima y no por dos distintas (una ATPasa y una ADPasa, por ejemplo). En este sentido, la adición de ADP sobre la concentración óptima de ATP, no produce un aumento en la liberación de fosfato del ATP (37, 40); más aún, la presencia del nucleósido difosfatado puede disminuir la catálisis del ATP. Lo anterior indica que el sustrato es hidrolizado por la misma enzima, ya que la presencia de enzimas distintas podría provocar un aumento en la producción de fosfato inorgánico.

Asimismo, existen otras observaciones experimentales que sugieren que la hidrólisis del ATP o el ADP se lleva a cabo por la misma enzima: i) la inactivación térmica de la apirasa o por el uso de radiación gama, muestra una cinética de inhibición similar, ya sea en presencia de ATP o de ADP (17, 39, 40); ii) durante el proceso de purificación se mantiene la relación entre la velocidad de hidrólisis del ATP y el ADP (40-42); iii) el pH óptimo para la catálisis de ambos sustratos es similar (42) y iv) el uso de inhibidores, activadores y la modificación química de

los residuos de aminoácidos del sitio activo de la apirasa alteran de forma similar la actividad enzimática en presencia de ATP o ADP (13, 14, 17, 18, 38).

Recientemente se ha descrito la presencia de una ATP-difosfohidrolasa en las mitocondrias de la placenta humana (42). Esta apirasa está fuertemente unida a la mitocondria con el sitio activo dirigido hacia el espacio intermembranal. Existen evidencias de que su actividad está íntimamente involucrada en el metabolismo energético y el esteroidogénico (43). En este sentido, datos experimentales indican que esta enzima es capaz de estimular el consumo de oxígeno en las mitocondrias íntegras de la placenta, cuando hidroliza al ATP (63). Sin embargo, es importante señalar que este fenómeno no induce el desacoplamiento de la respiración mitocondrial, lo que sugiere que la apirasa desempeña un papel importante en el metabolismo energético de la placenta.

Aunado a lo anterior, se ha descrito la inhibición parcial de esta enzima por vanadato de sodio (42) y su efecto sobre la incorporación del colesterol a las mitocondrias de la placenta humana (61); asimismo, se ha descrito en este sistema mitocondrial que la síntesis de progesterona es dependiente de un componente proteico sensible a la degradación por tripsina (44).

Por último, la caracterización cinética de esta enzima (42), mostró que el comportamiento catalítico se ajusta al modelo de cooperatividad negativa, con un número de Hill de 0.5, una [S]_{0.5} de entre 2-10 mM y una Vmax de 380 nmolas de Pi / mg/ min para los nucleósidos tri- y difosfatados, donde la relación de hidrólisis NTP/NDP es 1. La actividad de esta ATP-difosfohidrolasa es totalmente

dependiente de cationes divalentes (Ca²⁺, Mg²⁺ o Mn²⁺), siendo el calcio el catión que produce una estimulación de casi 6 veces la catálisis del complejo lantanopirofosfato (La-PPi).

El uso de los inhibidores es una herramienta útil en la caracterización de las funciones enzimáticas. Sin embargo, la falta de un inhibidor específico para las ATP-difosfohidrolasas limita el estudio de su papel en el metabolismo mitocondrial. La 5'-p-fluorosulfonilbenzoil adenosina (5'-BSO2BzA), un análogo no hidrolizable del ADP o ATP que reacciona específicamente alquilando algunos de los residuos de los aminoácidos presentes en el sitio para la fijación del ATP de una gran variedad de enzimas (45), ha sido empleado para la modificación covalente del sitio activo e inhibir a las ATP-difosfohidrolasas de diferentes tejidos de los mamíferos y peces (22, 46, 47). Se ha sugerido que la región fluoro sulfonil del inhibidor se ubica en una posición análoga a la del fosfato gamma del ATP, lo que le permite actuar como un agente electrofílico y reaccionar covalentemente con diferentes residuos de aminoácidos. Así, este reactivo es un inhibidor adecuado para la modificación específica de los sitios de fijación de los nucleótidos púricos en las proteínas. Por todo esto, el 5'-BSO2BzA puede ser empleado como una herramienta en la caracterización del papel que desempeña la apirasa de las mitocondrias de la placenta humana.

En este trabajo se analiza la cinética de inactivación de la ATPdifosfohidrolasa de la mitocondria de la placenta humana por el 5'-FSO₂BzA. Asimismo, se analiza la repercusión de la inhibición de la actividad de dicha

enzima sobre dos procesos metabólicos importantes en las mitocondrias aisladas de la placenta humana: (1) la estimulación del consumo de oxígeno en presencia de ATP y (2) la síntesis de la progesterona.

M3TODO5

La hoja de la espada ha de templarse con el fuego o de lo contrario se quebrará.

Par-Salian, herrero.

El alma de un mago se forja en el crisol de la magia.

Antimodes, de los Túnicas Blancas. (La Forja de un Túnica Negra, vol. II, -Raistlin, Crisol de la Magia-, Margaret Weis)

MÉTODOS

La obtención de la muestra de la apirasa

La purificación de las mitocondrias del sinciciotrofoblasto de la placenta humana a término se realizó por una modificación del método reportado por Flores-Herrera y cols. (42) y que se describe en Martínez y cols. (43). Las partículas submitocondriales se obtuvieron de aproximadamente 60 placentas empleando el método reportado por Martínez y cols. (50), y almacenadas a -70°C hasta el momento de usarlas.

La obtención de una fracción enriquecida con la actividad de la apirasa se realizó por el método descrito por Flores-Herrera y cols. (42).

La determinación de la concentración de proteína

La cuantificación de la concentración de la proteína se realizó según una modificación del método descrito por Lowry y cols. (51), el cual consiste en tratar a la muestra con 0.017% del detergente desoxicolato y su precipitación con el ácido tricloroacético al 6% (52). Se recuperó la fracción proteica por medio de centrifugación y se determinó su concentración utilizando como estándar a la albúmina sérica de bovino cristalizada (BSA).

La detección de carbohidratos asociados a la apírasa

a detección de carbohidratos asociados a la ATP-difosfohidrolasa se realizó

por medio de un ensayo comercial de la marca BIO-RAD (Los Angeles, CA, EUA). Para este ensayo se llevó a cabo la electroforesis de la preparación de la apirasa en un gel de poliacrilamida (10%) en presencia del detergente SDS, según lo descrito por Laemli y cols. (53). Posteriormente se realizó la electro-transferencia de las proteínas en el gel a una membrana de nitrocelulosa Bio-Rad, a 100 V durante 12 h a temperatura ambiente. Después de la transferencia se continuó con la metodología descrita en el instructivo del ensayo comercial. Este método se basa en la oxidación específica de los carbohidratos y su marcaje con biotina, el uso del conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina y por último el desarrollo del color por medio del azul de tetrasolio (NBT) y el 5 bromo-4 cloro-3 indoliil fosfato, incluidos en el ensayo comercial.

La electroforésis en condiciones nativas

La electroforésis en condiciones nativas se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida en gradiente del 3 al 10%, utilizando los siguientes amortiguadores: 150 mM de ácido 3-(*N*-morfolino) sulfónico propano (MOPS); 125 mM de histidina a un pH de 6.5; 10% de glicerol; 2.5 mM de Zwittergent 3-14; 0.05% de sulfato de amonio y 0.04% de TEMED (v/v). La fracción proteica (2 mg) obtenida a partir de la filtración molecular en la resina Sephacryl S400 HR (42) se solubilizó con la α -lisofosfatidilcolina y el Zwittergent 3-14 con una relación 1:1:1. Este tratamiento no modifica la actividad de la apirasa. La electroforésis se llevó a cabo en un amortiguador que contenía 150 mM de MOPS; 125 mM de histidina a un pH de 6.5 y 3 mM de Zwittergent 3-14; la corriente fue de 100 V durante 6 h a 4°C.

La actividad catalítica de la apirasa en el gel se identificó de la siguiente manera: el gel se lavó en una solución que contenía 30 mM de Tris-HCI (pH 8) y 5 mM de MgCl₂ durante 15 min a temperatura ambiente. Después se incubó a 37°C durante 30 min en la solución de reacción que contenía 30 mM de Tris-HCI (pH 8),

5 mM de MgCl₂ y 5 mM de ATP o de ADP. Posteriormente el gel se lavó varias veces con la mezcla de reacción en ausencia del sustrato y se incubó a 45°C durante 5 min en la solución reveladora que contenía 3.3% de heptamolibdato de amonio, 3.75 N de H₂SO₄ y 0.015% de ácido ascórbico. Al revelarse la presencia del fosfato liberado por la hidrólisis del ATP o del ADP, el gel se lavó con agua bidestilada y fotografiado con una cámara Polaroid (modelo DS-34, UK). Asimismo, la localización de las proteínas se realizó por medio de la tinción con plata de una muestra del gel nativo.

La extracción electroforética de la enzima

La región del gel nativo que mostraba la mayor actividad catalítica de la apirasa fue removida de un gel sin teñir o incubado en la presencia de los sustratos, y empleada en la extracción electroforética de la enzima. Asimismo, otras regiones del gel fueron también removidas con el fin de ser utilizadas como controles. El sistema de electroelución que mejores resultados aportó fue el descrito por Hashizume y cols. (54), el cual consiste de dos soluciones, el amortiguador inferior (ánodo) que contenía 189 mM de imidazol (pH 7.4), 62 mM de HCl y 10% de glicerol; y el amortiguador superior (cátodo) que estaba constituido por 2.5 mM de imidazol y 10 mM de glicina (pH 8). La extracción electroforética se llevó a cabo a 300 V durante 5 h a 4°C. Al finalizar, las muestras se colectaron en el extremo del ánodo.

El ensayo enzimático

a actividad de la apirasa se determinó por medio de la liberación del fosfato

inorgánico de los nucleósidos tri- y difosfatados. La mezcla de reacción contenía 30 mM de Tris-HCI (pH 8.0), 1 mM de Mg²⁺ o Ca²⁺ libre y 50 µg de proteína en un volumen final de 500 µl a 30°C. La reacción se inicio con la adición de una mezcla equimolar del complejo nucleótido-catión y se detuvo con la adición de 6% de ácido tricloroacético. Después de la centrifugación a 4500 *g* durante 10 minutos a 4°C, se usó una muestra del sobrenadante para determinar la concentración del fosfato liberado empleando el método descrito por Lanzetta y cols. (55) usando al H₃PO₄ como estándar.

La determinación de los parámetros cinéticos

Los datos obtenidos para la hidrólisis de los sustratos se analizaron en un modelo de regresión no lineal por medio del programa de computación Enzfitter (Elsevier-Biosoft, version 1.05; CGA). Los datos son el promedio de cinco experimentos independientes.

El regráfico de competencia

I regráfico de competencia se realizó según Chevillard y cols. (56), el cual es un método para determinar si dos reacciones enzimáticas distintas se llevan a cabo en la misma enzima.

Para una preparación enzimática, no necesariamente pura, que cataliza dos reacciones diferentes se definió a uno de los sustratos como A (en este caso, et ATP) y se escogió una concentración (a_0) que produce una velocidad de catálisis (v_0) que pueda ser cuantificada fácilmente en ausencia del sustrato B (en

este caso, el ADP). Asimismo se escogió una concentración del sustrato B (b_0) a la cual la velocidad de hidrólisis sea v_0 en ausencia del sustrato A.

Posteriormente se preparó una serie de mezclas de reacción que contenian al sustrato A (ATP) y al B (ADP) a las siguientes concentraciones: $a = (1-p)a_0$ y $b = pb_0$ respectivamente, donde p es la relación entre los dos sustratos y su valor es de 0 a 1. Se determinó la vetocidad de hidrólisis para cada mezcla de los sustratos y se graficó contra el valor de p. Si las dos reacciones se llevan a cabo en el mismo sitio catalítico, el regráfico muestra una línea horizontal, lo que indica una independencia de la velocidad de catálisis (v_0) con respecto al valor de p. Por el contrario, si las catálisis se realiza en dos enzimas independientes, el regráfico muestra una curva con un máximo; si cada uno de los sustratos son más eficientes en interferir la catálisis del otro sustrato, la curva muestra un mínimo.

Por otra parte, cuando las dos reacciones no se comportan según el modelo de Michaelis-Menten y presentan una cinética de cooperatividad con los coeficientes de Hill constantes (h_A y h_B, respectivamente), la definición de las concentraciones de los sustratos A y B en la mezcla de reacción se expresa como $a = a_0(1-p)^{1/hA}$ y $b = b_0p^{1/hB}$ para obtener un regráfico de v_0 contra p con las mismas propiedades ya descritas (ver apéndice B).

Los valores empleados en este diseño experimental para la concentración del sustrato A (ATP) y el B (ADP) que producen la misma v_0 fue de 2 mM y el número de Hill fue de 0.5 para ambos nucleótidos (42).

La inhibición de la actividad de la apirasa por la 5'-p-fluorosulfonil benzoil adenosina

a fracción enriquecida con la actividad de la apirasa (100 μ g/ml) se incubó a 30°C durante 90 min. en una solución que contenía 30 mM de Tris-HCI (pH 8), 5 mM de Mg²⁺ o Ca²⁺ y diferentes concentraciones de la 5'-*p*-fluorosulfonil benzoil

adenosina (5'-FSO₂BzA). A los diferentes tiempos se tomó una muestra y se agregó a la mezcla de reacción descrita en el apartado de "el ensayo enzimático" (esquema 1). Esta mezcla contenía una concentración equimolar del complejo ATP-catión o ADP-catión y la reacción de hidrólisis se llevó a cabo durante 5 min, al término de los cuales se agregó ácido tricloroacético (concentración final de 6%) y la cantidad de fosfato liberado se cuantificó por el método de Lanzetta (1979). Asimismo, se incubó a la fracción proteica en la presencia de 1% (v/v) de dimetil sulfóxido, el solvente en el cual se disolvió al inhibidor, para cuantificar su efecto sobre la actividad enzimática de la apirasa.





Las curvas de las gráficas semilogarítmicas de v/v_0 versus el tiempo fueron lineales y a partir de éstas se calculó la Ki para la 5'-FSO₂BzA. Los datos son el promedio de al menos cuatro experimentos independientes.

Los experimentos de protección de la apirasa contra la inhibición del 5'-FSO₂BzA se realizaron en la presencia de diversos compuestos en una mezcla de incubación que contenía 30 mM de Tris-HCI (pH 8), 1 mM del inhibidor a una temperatura de 30°C. La actividad residual de la apirasa se ensayó después de 1 h de incubación utilizando al ATP o al ADP como sustrato, y se calculó el porcentaje de la actividad residual comparando la catálisis enzimática en los diferentes tratamientos con la actividad en ausencia del inhibidor.
El efecto de la 5'-FSO₂BzA en el metabolismo de las mitocondrias de la placenta humana

L l efecto de la 5'-FSO₂BzA sobre el consumo de oxígeno en las mitocondrias íntegras de la placenta humana, se determinó polarográficamente con un electrodo tipo Clark en un medio que contenía 250 mM de sacarosa, 10 mM del ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) pH 7.4, 1 mM del ácido etilen glicol-bis(β-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), 1 mM del ácido etilen diaminotetraacético (EDTA), 8 mM de α-cetoglutarato, 5 mM de H₃PO₄ pH 7.4, 5 mM de MgCl₂ y 0.2% de BSA. La temperatura fue de 20°C y la concentración de proteína de 1 mg/ml. El consumo de oxígeno se estimuló con la adición de 300 nmolas de ADP o de ATP y la concentración del 5'-FSO₂BzA fue de 1 mM. Las mitocondrias utilizadas fueron preincubadas en presencia del inhibidor durante 15 min a temperatura ambiente con agitación suave.

El efecto de la 5'-FSO2BzA en la síntesis de progesterona en las mitocondrias se determinó en un medio que contenía 120 mM de KCI, 10 mM del ácido 3-[N-morfolino]propanosulfónico (MOPS) pH 7.4, 0.5 mM de EGTA, 8 mM de α -cetoglutarato o de isocitrato, 5 mM de H₃PO₄, pH 7.4, 5 mM de MgCl₂, 2mM de ATP o ADP y 0.2% de BSA. La concentración del 5'-FSO₂BzA fue de 1 y 2 mM, la temperatura fue de 20°C, el tiempo de incubación de 3 min y la concentración de proteína de 0.2 mg/ml. Después del tiempo de incubación, la progesterona fue extraída con dietil éter y su concentración se determinó por quimioluminiscencia empleando el ensayo comercial de IMMULITE (Diagnostic Porducts Corporation, Los Angeles, CA, EUA).

R35ULT4D05

Aquellos que aspiran a poco no consiguen nada. En esto no hay ninguna duda. Es mejor, pienso, intentar coger las estrellas, que no hacerlo porque sabes que no puedes alcanzarlas. Al menos quien trepa disfrutará de una magnífica vista, y quizás incluso se haga de una manzana colgada de la rama en recompensa por sus esfuerzos.

> Montolio, Vigilante del Bosque. (El Elfo Oscuro, vol. III, -El Refugio-, R. A. Salvatore)

RESULTADOS

El regráfico de competencia

L ste método cinético determina si dos reacciones distintas, en este caso la hidrólisis del ATP (actividad de ATPasa) y la del ADP (actividad de ADPasa), ocurren en la misma enzima o en enzimas independientes (56). Como se observa en la Figura 3, el regráfico de competencia muestra que la velocidad de aparición del fosfato inorgánico es independiente del valor de *p*, lo que indica que la hidrólisis del ATP y del ADP se llevan a cabo en el mismo sitio activo o por una sola enzima, en este caso, la apirasa de las mitocondrias de la placenta humana.

Esta resultado concuerda con la información obtenida de la caracterización cinética de la enzima (42), donde se determinó que la actividad de hidrólisis del ATP o el ADP muestra la misma dependencia a los cambios de pH, sensibilidad al vanadato de sodio y depende de la presencia de cationes divalentes (Ca²⁺, Mg²⁺ o Mn²⁺).

Asimismo, en la Figura 4 se muestra la presencia de carbohidratos asociados a una proteína de aproximadamente 40 kDa, la cual ha sido relacionada con el monómero de la ATP-difosfohidrolasa de las mitocondrias de la placenta humana (42).

Estos resultados muestran que la ATP-difosfohidrolasa de las mitocondrias de la placenta humana presenta características cinéticas y estructurales similares a lo reportado para otras apirasas: es capaz de hidrolizar a los NTP y los NDP con una velocidad similar, contiene carbohidratos asociados a su estructura protéica y es totalmente dependiente de cationes divalentes para la hidrólisis de sus sustratos (37, 57, 58).

La electroforésis en condiciones nativas y la extracción electroforética de la apirasa

La electroforésis en condiciones nativas de la fracción enriquecida con la actividad de la apirasa muestra dos bandas de actividad de hidrólisis en presencia de ATP o de ADP (Figs. 5A y B). La tinción con plata (Fig. 5C) mostró que estas bandas de actividad contienen alrededor del 0.1% de la proteína total empleada en el experimento, mientras que el resto se localiza en la parte superior del gel, región en la cual la actividad de la apirasa es nula. La tinción con el azul brillante de Coomasie R215 aporta resultados similares (datos no mostrados).



Figura 3. Regráfico de competencia. La concentración del sustrato A (ATP) a una p = 0 fue de 2 mM, mientras que para el sustrato B (ADP) a una p = 1 fue de 2 mM. La determinación de la actividad de la apirasa se realizó según se describió en la sección de Métodos. Los datos son el resultado de al menos 4 experimentos independientes ± DE.

La banda con la mayor actividad de la apirasa (señalada por la flecha en la Fig. 5 A y B) fue cortada del gel y se realizó la extracción electroforética de la enzima. El comportamiento cinético de la ATP-difosfohidrolasa extraída del gel en condiciones nativas se ajusta al modelo de cooperatividad negativa (Fig. 6), con un número de Hill de 0.3, una K \approx 3.28 \pm 0.12 mM, una [S]_{0.5} = 52.4 mM y una V_{max} = 2260 \pm 150 nmol de Pi/mg/min para la hidrólisis del Ca-ADP, lo que muestra un incremento de la actívidad específica de aproximadamente 6 veces con respecto a la preparación enriquecida. Asimismo, esta preparación es capaz de hidrolizar a los complejos catión-ATP, catión-ADP y catión-PPi con las mismas características cinéticas; además de ser inhibida por el orto-vanadato de sodio. Sin embargo, la cantidad de proteína que es posible recuperar por este método es muy baja, lo que impide realizar más estudios de la apirasa a partir de esta preparación.



Figura 4. Detección de los carbohidratos asociados a la ATP-difosfohidrolasa. La electroforésis en condiciones desnaturalizantes de la apirasa y su electrotransferencia a la membrana de nitrocelulosa se realizó según lo descrito en la sección de Métodos. La detección de los carbohidratos asociados a la fracción proteica se llevó a cabo según un ensayo comercial de BIO-RAD, descrito en la sección de Métodos. Est = β -galactosidasa (116 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa); A = Partículas submitocondriales; B = Fracción enriquecida con la actividad de la apirasa, la línea del extremo derecho indica una proteína de aprox. 40 kDa; C = mitocondrias de la placenta humana.

La inhibición de la apirasa por el 5'-FSO2BzA

 S_{e} analizó la cinética de inhibición de la apirasa por el 5'-FSO₂BzA, empleando como sustrato al complejo catión-ATP o catión-ADP, en presencia de Ca²⁺ o Mg²⁺.

En la Figura 7 se muestra el curso temporal de la actividad residual de la apirasa en presencia de diferentes concentraciones de 5'-FSO₂BzA. La inhibición de la actividad de la apirasa al hidrolizar al complejo catión-ADP es del 70% después de 90 min de incubación en presencia de 2 mM de 5'-FSO₂BzA (Fig. 7B).



Figura 5. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. Para realizar la electroforesis en condiciones nativas se usó una muestra de la proteína y un gel en gradiente de poliacrilamida (3-10%). La hidrólisis del ADP (A) o el ATP (B) en el gel se ensayó según lo descrito en la sección de Métodos. La cabeza de flecha indica la banda de mayor actividad de la ATP-difosfohidrolasa que fue electroeluída. La presencia de la proteína total en el gel se detectó por medio de la tinción con plata (C).



Figura 6. Dependencia de la actividad de la ATP-difosfohidrolasa respecto de la concentración del sustrato. La ATP-difosfohidrolasa utilizada para este experimento fue obtenida de la electroelución proteica del gel en condiciones nativas (Fig. 5). El comportamiento cinético de la actividad se ajustó al modelo de Hill con cooperatividad negativa. El recuadro muestra el ajuste de los datos al regráfico de Lineweaver-Burk.

Para el caso donde el sustrato es el complejo catión-ATP, las mismas condiciones experimentales produjeron una inhibición máxima del 60% (Fig. 7A); sin embargo, no se observó una mayor inhibición de la actividad de la apirasa cuando el tiempo de incubación aumentó hasta 120 min o al incrementar la concentración del inhibidor. Aunado a esto, la actividad de la apirasa en las condiciones control (en ausencia del inhibidor) o en presencia del DMSO (compuesto usado para disolver al inhibidor), no se modifica con el tiempo o la temperatura de incubación (Fig. 7, recuadro). Más aún, el DMSO parece mantener más estable a la apirasa con respecto al control, probablemente debido a la interacción directa entre el compuesto y la enzima o al rearreglo de las moléculas

de agua de la mezcla de incubación. Sin embargo, la diferencia en la actividad no representa más del 20%, por lo que este fenómeno no se exploró en detalle.



Figura 7. Curso temporal de la inhibición de la ATP-difosfohidrolasa por el 5'-FSO₂Bza. La concentración de la proteína fue de 50 μ g / 100 μ l y se incubó a 30°C en ausencia {control (O) y DMSO (**X**) en el recuadro} o en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor {(**O**) 0.1, (**II**) 0.25 y (**V**) 0.75 mM en presencia de ATP; (**O**) 0.1, (**II**) 0.5 y (**V**) 2 mM en presencia de ADP}. En los tiempos indicados se tomó una muestra y se determinó la actividad usando al sustrato catión-ATP (A) o catión-ADP (B). La actividad residual se calculó a partir de la relación de la velocidad de la actividad enzimática a los diferentes tiempos (v) con la velocidad de la actividad enzimática control (v₀). La cinética de inactivación se ajustó a un decaimiento exponencial. Los regráficos muestran el curso temporal en presencia de 2 mM de 5'-FSO₂BZA hasta 90 min de incubación. Los datos son el resultado de 4 experimentos independientes ± DE.

Por otra parte, la disminución de la actividad de la apirasa en presencia de ATP o ADP, se ajusta a una cinética de pseudo-primer orden en los primeros 5 minutos de la reacción. El regráfico del logaritmo natural (Ln) de la actividad residual de la enzima en función del tiempo de incubación (Fig. 8), permite calcular las constantes de pseudo-primer orden (K_{obs}) a partir de la pendiente de las curvas obtenidas a cada concentración del inhibidor, por medio de la siguiente ecuación:

$$-Ln (v/v_0) = K_{obs} \cdot t$$

donde v_0 es la velocidad en ausencia del inhibidor, v es la velocidad en presencia de diferentes concentraciones del 5'-FSO₂BzA y t es el tiempo.

Para determinar la Ki se utilizaron las K_{obs} ontenidas a las diferentes concentraciones del 5'-FSO₂BzA. El regráfico de las constantes de pseudo-primer orden en función de la concentración del 5'-FSO₂BzA muestra una cinética de saturación (Fig. 9). El regráfico de los inversos de estos datos (Fig. 9 recuadro), basados en la siguiente ecuación:

$$1/K_{obs} = 1/K_2 + K_2 \cdot [I]$$

determinan un valor para la K_i de $0.75 \pm 1.7 \times 10^{-1}$ mM, el cual representa la concentración del inhibidor a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima de inactivación de la enzima. Asimismo, el hecho de que la línea tenga un valor positivo en el eje de la abscisas, muestra la formación inicial de un complejo reversible entre la enzima y el inhibidor (59). El desarrollo gradual de la inhibición irreversible de la enzima se define por una K₂ = $0.157 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$, lo cual ilustra la velocidad máxima de inhibición a concentraciones saturantes del compuesto. El hecho de que ambas actividades de hidrólisis tengan un comportamiento similar en presencia del inhibidor, apoyan la idea de que tal actividad reside en una

misma enzima, en este caso, la ATP-difosfohidrolasa de las mitocondrias de la placenta humana.



Figura 8. Determinación de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden a partir de la disminución de la actividad de la ATP-difosfohidrolasa en presencia del 5'-FSO₂BzA, tanto con ATP (A) como con ADP (B). La enzima fue incubada en diferentes concentraciones de 5'-FSO₂BzA {(\bigcirc) 0.1, (\triangledown) 0.25, (\square) 0.5, (\blacksquare) 0.75 y (\triangle) 2 mM para la hidrólisis del ATP; (\bigcirc) 0.1, (\triangledown) 0.25, (\square) 0.5, (\blacksquare) 1 y (\triangle) 2 mM para la hidrólisis del ADP}. La actividad residual se calculó como se describe en la Figura 7. Las constantes de velocidad se determinaron a partir de las pendientes del regráfico del logaritmo natural de la velocidad residual contra el tiempo.

El efecto de los sustratos y otras moléculas en la inactivación de la aplrasa por el 5'-FSO₂BzA

Se determinó la reversibilidad de la inhibición por el 5'-FSO₂BzA, por medio de la habilidad que tienen diversos ligandos de prevenir la inactivación de la apirasa.

Como se muestra en la tabla I, los nucleósidos de adenina tri- y difosfatados fueron capaces de prevenir en un 90% la inactivación de la apirasa por el 5'-FSO₂BzA, lo que sugiere que el sitio de unión para el inhibidor es el mismo que para la fijación del ATP o ADP en la ATP-difosfohidrolasa.



Figura 9. Regráfico de las constantes de velocidad de pseudo-primer orden para la inactivación de la actividad de la ATP-difosfohidrolasa como una función de la concentración del 5'-FSO₂BzA, en presencia de ATP (\blacktriangle) o de ADP (O). Las K_{obs} fueron determinadas como se describió en la Figura 8. El recuadro muestra el ajuste de los datos al modelo de Lineweaver-Burk, a partir dei cual se calcularon la Ki y la K₂.

Por otra parte, los cationes divalentes son incapaces de prevenir la inhibición de la enzima, lo que sugiere que su participación parece no ser necesaria para el reconocimiento del sustrato por el sitio activo sino únicamente para la hidrólisis del ATP o ADP. Lo anterior puede ser extrapolado para el caso del análogo estructural del sustrato, el 5'-FSO₂BzA, ya que la presencia del EDTA

y el EGTA, al remover cualquier contaminación por calcio o magnesio del medio de incubación, no modifica el porcentaje de inhibición de la apirasa.

Los nucleósidos de guanina tri- o difosfatados (10 mM) en presencia de magnesio, también fueron capaces de prevenir la inhibición de la enzima, lo que refuerza la hipótesis de un mismo sitio para la unión del sustrato y del 5'-FSO₂BzA.

Moléculas adicionadas a la mezcla de	Actividad residual (v/v ₀)					
incubación						
-	Mg-ATPasa	Mg-ADPasa				
Soio el 5'-FSO₂BzA (1mM)	0.22 ± 0.02	0.33 ± 0.02				
Nucleótidos						
ATP (10 mM)	0.96 ± 0.22	0.98 ± 0.02				
ADP (10 mM)	0.92 ± 0.16	1.16 ± 0.03				
ATP (10 mM) + Mg ²⁺ (11 mM)	$\textbf{0.89} \pm \textbf{0.12}$	0.81 ± 0.06				
ADP (10 mM) + Mg ²⁺ (11 mM)	0.87 ± 0.10	1.01 ± 0.03				
ATP (10 mM) + Ca ²⁺ (11 mM)	0.95 ± 0.23	0.82 ± 0.07				
ADP (10 mM) + Ca ²⁺ (11 mM)	0.88 ± 0.15	0.91 ± 0.01				
GTP (10 mM) + Mg²⁺ (11 mM)	0.94*	0.90*				
GDP (10 mM) + Mg ²⁺ (11 mM)	0.97*	0.89*				
Cationes divalentes						
Ca ²⁺ (11 mM)	0.34 ± 0.05	0.41 ± 0.02				
Mg²+ (11 mM)	0.34 ± 0.09	0.48 ± 0.02				
Agentes quelantes						
EDTA (2 mM) + EGTA (2 mM)	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.01				

 Tabla I. Efecto protector de diferentes sustratos y otras moléculas sobre la inactivación de la actividad de la apirasa por el 5'-FSO2BzA

La actividad de la apirasa fue inhibida con 1 mM de 5'-FSO₂Bza a 30°C durante 1 h en un medio que contenía 30 mM de Tris-HCI (pH 8.0). Donde se señala, las moléculas protectoras se añadieron junto con el inhibidor. Al tiempo definido se retiró una muestra y se ensayó la actividad residual de la enzima, la cual se calculó comparando la actividad en presencia de los competidores y la actividad en condiciones control. Los valores son el resultado de 4 experimentos independientes, excepto (*) que es un experimento representativo.

El efecto del 5'-FSO₂BzA sobre el metabolismo energético y el esteroidogénico de las mitocondrias de la placenta humana

Los datos de nuestro laboratorio muestran que la adición de ATP a la fracción mitocondrial de la placenta humana modifica el consumo de oxígeno (60), la síntesis de progesterona (44) y la incorporación de colesterol (61). Aunado a esto, la inhibición de la apirasa por el 5'-FSO₂BzA abre la posibilidad de explorar la posible relación que existe entre la actividad de esta enzima y el metabolismo mitocondrial.

En la Figura 10 se muestra el consumo de oxígeno de las mitocondrias íntegras, tanto en presencia como en ausencia del 5'-FSO₂BzA. Como se puede observar, la adición de ADP (300 nmolas) o ATP (300 nmolas) induce el consumo de oxígeno (Fig. 10 A y B). Es importante señalar que la hidrólisis del ATP por la apirasa no induce un efecto desacoplante, ya que existe una transición entre el estado 3 (alta velocidad de consumo de oxígeno) y el estado 4 (baja velocidad de consumo de oxígeno, o en reposo); más aún, esta misma transición es inducida por la adición del ADP. En este sentido, la relación del consumo de oxígeno entre ambos estados, denominado control respiratorio, tiene un valor similar, ya sea en presencia de ATP o de ADP (Fig. 10A y B), el cual es superior a lo reportado por otros autores para este mismo sistema mitocondrial (62). Lo anteríor sugiere que la membrana interna mitocondrial se encuentra íntegra.

En las mitocondrias aisladas de la placenta humana, la presencia del 5'-FSO₂BzA elimina el consumo de oxígeno inducido por la adición de ATP al medio de respiración (Fig. 10C y D). Sin embargo, en las mismas condiciones, la adición de ADP induce la estimulación del consumo de oxígeno de manera similar que en las condiciones control. Esto indica que proteínas tales como el acarreador de los adenín nucleótidos, el de fosfato, el de los ácidos tricarboxílicos y los cuatro componentes de la cadena de transporte de los electrones y el bombeo de los protones, así como la ATP-sintasa, no son afectados por el inhibidor.



Figura 10. Efecto del 5'-FSO₂BzA en el consumo de oxígeno estimulado por el ATP o el ADP en las mitocondrias íntegras de la placenta humana. Las mitocondrias fueron incubadas en el medio de respiración descrito en la sección de Métodos. La concentración del inhibidor fue de 1 mM en todos los trazos, excepto en A y B donde no se adicionó. Donde se indica, el consumo de oxígeno se estimuló con 300 nmolas de ADP o de ATP. En los trazos C y D la última adición de ATP fue de 2000 nmolas y 4000 nmolas, respectivamente. Los números muestran el valor del control respiratorio (CR = consumo de oxígeno en el estado 3 / consumo de oxígeno en el estado 4).

Estos resultados muestran que el 5'-FSO₂BzA, en las condiciones empleadas en este experimento, inhibe de forma exclusiva a la apirasa de las mitocondrias de la placenta, lo que permite emplearlo para explorar la participación de la apirasa en este sistema mitocondrial.

En la Figura 11 se muestra el efecto del 5'-FSO₂BzA sobre la síntesis de progesterona en las mitocondrias íntegras de la placenta humana, utilizando αcetoglutarato o isocitrato como sustrato oxidable. Como se puede observar, la adición de ATP estimula en 100% la síntesis de la hormona, mientras que la adición de ADP no tiene ningún efecto (Fig 11A). Aunado a esto, la presencia del 5'-FSO₂BzA elimina totalmente la estimulación del ATP. Este resultado sugiere que la inactivación exclusiva de la actividad de la apirasa elimina la estimulación de la síntesis de la progesterona inducida por el ATP. Martínez y cols. (63) han demostrado que la apirasa de las mitocondrias de la placenta humana es capaz de hidrolizar un amplio espectro de nucleótidos de purina y pirimidina. En la Figura 11B se muestra el efecto que produce la adición de diferentes tipos de nucleótidos sobre la síntesis de progesterona en las mitocondrias de la placenta. Al emplear al isocitrato como fuente de energía, el ATP y el ADP estimularon la síntesis de progesterona en 6 y 5 veces respectivamente, en relación a las condiciones control (Fig 11B). Los demás nucleótidos indujeron menos del 50% del efecto del ATP. Por otro lado, la hidrólisis de los nucleótidos fue proporcional a la síntesis de progesterona, lo que sugiere que la actividad de la ATP-difosfohidrolasa puede estar involucrada en este fenómeno. En este sentido, la inactivación de la apirasa por el 5'-FSO2BZA disminuye en más del 80% la síntesis de progesterona y en más del 90% la hidrólisis de los nucleótidos (Fig 11B). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la actividad de la ATP-difosfohidrolasa está estrechamente relacionada con el metabolismo hormonal en las mitocondrias de la placenta humana.



Figure 11. Efecto del 5'-FSO₂BzA sobre la síntesis de progesterona de las mitocondrias de la placenta humana. La mitocondrias fueron incubadas en el medio para la síntesis de progesterona descrito en la sección de métodos empleando al α -cetoglutarato como fuente de energía (A). La concentración de los nucleótidos fue de 2 mM y del 5'-FSO₂BzA fue de 1 o 2 mM, en presencia de 2 mM de ATP. Los resultados son la media ± d.s. de 2 experimentos individuales. En B se muestra el efecto del ATP, ADP, GTP, CTP, UTP y TTP sobre la síntesis de progesterona y la actividad de la ATP-difosfohidrolasa en las mitocondrias íntegras de la placenta humana, empleando al isocitrato como fuente de energía. La concentración de cada nucleótido fue de 2 mM y la del 5'-FSO₂BzA fue de 1 mM. Los resultados son la media ± d.s. de 3 experimentos por separado.

DI5CU5IÓN

Clérigos. Así es como se consideraban los miembros de la antigua hermandad de hechiceros. La palabra *hechicero* significa ni más ni menos *hombre sabio*, y en verdad tiene que ser un hombre sabio aquel capaz de interpretar la realidad del universo como un todo, abarcando lo físico y lo espiritual, pues los dos van estrechamente unidos. Muchos clérigos no comprenden el aspecto físico, y la mayoría de los científicos actuales no tienen sentido de lo espiritual. Pero un hechicero... Un hechicero conoce los dos, y siempre tiene presente ambos. Existen consecuencias espirituales en cada acto físico, y el ser físico no tiene más opción que seguir el curso marcado por el espíritu.

> Brind'Amour, Gran Hechicero de Eriador. (La Sombra Carmesí, vol. I, -La Espada de Bedwyr-, R. A. Salvatore)

DISCUSIÓN

a familia de las ATP-difosfohidrolasas incluye enzimas cuya localización subcelular es tan variada como su especificidad por los nucleotidos (64-66). Sin embargo, la repercusión del papel de este tipo de enzimas en el metabolismo celular de los nucleótidos aún es desconocida. En las mitocondrias de la placenta humana a término se ha descrito una nueva ATP-difosfohidrolasa, la cual es capaz de hidrolizar un amplio espectro de nucleótidos y cuyo comportamiento cinético se ajusta a un modelo de cooperatividad negativa (42). Esta enzima comparte algunas características con otras apirasas de los mamíferos. Por ejemplo, es una proteína asociada a la bicapa lipídica: su actividad es dependiente de diferentes cationes divalentes, donde el Ca²⁺ es el que induce la mayor activación (42); es insensible a la oligomicina, ouabaina o al Ap5A y es una proteína glicosilada (Fig. 4). Sin embargo, muestra algunas diferencias importantes con otras apirasas, las cuales la hacen una enzima muy peculiar dentro de esta familia de enzimas: su localización subcelular es mitocondrial a diferencia de lo reportado para otras apirasas, las cuales se asocian a la membrana plasmática o son citoplásmicas; es capaz de hidrolizar con poca afinidad y baja velocidad al complejo catión-PPi; es insensible a la azida de sodio y al fluoruro de sodio (42); su comportamiento cinético se ajusta al modelo de cooperatividad negativa (42), lo que sugiere la presencia de por lo menos dos sitios activos o diferentes subunidades.

Se ha sugerido que la actividad de esta apirasa podría estar involucrada en el metabolismo esteroidogénico de la placenta (44). En el presente trabajo se ha evaluado la inactivación de la apirasa de las mitocondrias de la placenta humana a término por el 5'-*p*-fluorosulfonilbenzoil adenosina, así como su repercusión en la síntesis de progesterona.

Las evidencias que demuestran que la hidrólisis de los nucleósidos tri- y difosfatados reside en la apirasa mitocondrial, son las siguientes: a) la actividad de hidrólisis del ATP o ADP incrementa en la misma proporción durante las diferentes etapas del proceso de purificación y no se modifica la preferencia por los sustratos (42); b) el comportamiento cinético de la hidrólisis de por lo menos cinco sustratos diferentes, se ajusta al modelo de cooperatividad negativa y presenta un pH óptimo de 8.0 (42); c) la actividad de hidrólisis dependiente de los cationes divalentes (Ca²⁺, Mg²⁺ y Mn²⁺) muestra el mismo patrón de estimulación en el intervalo micromolar y de inhibición en el intervalo milimolar, sin importar el tipo de sustrato empleado (42); d) la inhibición de la actividad de hidrólisis con el vanadato de sodio tiene el mismo patrón en presencia de diferentes sustratos (42); e) los reactivos clásicos para la inhibición de la apirasa (42); f) los datos cinéticos del regráfico de competencia demuestran que la actividad de hidrólisis del catión-ATP y otros nucleótidos reside en la misma enzima (Fig. 3); g) la inactivación de la apirasa por el 5'-FSO₂BzA muestra el mismo comportamiento cinético en presencia de catión-ATP (Fig. 9).

El uso de diferentes inhibidores reversibles para inactivar a las ATPdifosfohidrolasas ha tenido poco éxito (67). Por otra parte, la modificación irreversible de estas enzimas con el 5'-FSO₂BzA, un análogo no hidrolizable del ATP, ha sido utilizado con éxito en la inhibición de las ATP-difosfohidrolasa de *Schistosoma mansoni* (68), de los linfocitos T (69), de la aorta de bovino (22) y del órgano eléctrico del pez *Torpedo* (47).

Empleando una preparación de la ATP-difosfohidrolasa parcialmente purificada de las mitocondrias de la placenta, se ha observado que el 5'-FSO₂BzA es un inhibidor específico para la ATP-difosfohidrolasa, ya que a partir del análisis de la inhibición se observa que el regráfico de la velocidad de inactivación como una función de la concentración del inhibidor muestra una cinética de saturación, además de que se demuestra la formación de un complejo reversible antes de la inhibición de la enzima (Fig. 9, recuadro); asimismo, la presencia de diferentes nucleotidos en bajas concentraciones disminuye la velocidad de inactivación de la

apirasa, mientras que en altas concentraciones son capaces de eliminar totalmente el efecto del 5'-FSO₂BzA.

En este sentido, a partir del análisis de la inhibición de la actividad de la apirasa por el 5'-FSO₂BzA, así como de los experimentos de protección, se pueden sugerir algunas de las características del sitio activo y del mecanismo de hidrólisis de estas enzimas. Por una parte, el hecho de que los nucleósidos tri- y difosfatados, en ausencia de cationes divalentes, sean capaces de evitar la inactivación de la apirasa por el 5'-FSO2BzA, sugiere que los cationes divalentes. que son necesarios para la hidrólisis de los sustratos (42), no son esenciales para el reconocimiento y unión del sustrato al sitio activo de la apirasa. Aunado a esto. la presencia de EDTA y EGTA o de cationes divalentes (Ca²⁺ o Mo²⁺) no modifica la inactivación de la apirasa por el 5'-FSO2BZA aún después de 120 min de incubación. Sin embargo, aunque los cationes no son necesarios para la inactivación de la apirasa, Hixon y Krebs (70) han sugerido que los cationes y el 5'-FSO₂BzA pueden formar un compleio e inhibir de una forma más eficiente a la enzima. La formación de este tipo de complejo puede extrapolarse a los sustratos naturales de la enzima, donde se ha demostrado que los iones metálicos pueden asociarse con el anillo de purina o bien con los grupos fosfato de los nucleótidos. Aunado a esto, los cationes también podrían asociarse a la enzima y modificar la unión del sustrato o del inhibidor al sitio activo. En este sentido, datos de nuestro laboratorio han demostrado que la apirasa de las mitocondrias de la placenta humana a término, es estimulada por calcio o magnesio en el intervalo de concentración micromolar, lo que sugiere que los cationes divalentes regulan a la actividad de la apirasa por medio de un sitio específico distinto al sitio activo (42).

Con respecto al ciclo catalítico, los experimentos en las mitocondrias íntegras, donde se muestra la estimulación del consumo de oxígeno por el ATP, aportan evidencias que permiten proponer el siguiente mecanismo catalítico para la apirasa:



Este esquema solo es correcto si la hidrólisis del ATP o el ADP se realiza en una sola enzima y no por dos distintas. En el esquema se muestra como primer paso la fijación del ATP a la enzima y la hidrólisis del enlace de alta energía del fosfato y. El siguiente paso es la liberación del fosfato inorgánico, del ADP y la recuperación de la enzima libre. En este paso, si el ADP se hidrolizara hasta AMP, no se observaría la estimulación del consumo de oxígeno en las mitocondrias íntegras.

En nuestras condiciones experimentales la hidrólisis del ATP está por debajo del 5-10% de la concentración inicial, lo que indica que la actividad catalítica de la apirasa se encuentra en velocidades iniciales. Por otra parte, cuando se adiciona el ADP, éste se fija a la apirasa y se lleva a cabo la hidrólisis del enlace β . El siguiente paso es la liberación del Pi, del AMP y la recuperación de la enzima libre. Los cationes divalentes pueden unirse al nucleótido y formar el sustrato catión-nucleótido, o bien fijarse a la apirasa en un sitio regulador. Este esquema es apoyado por los experimentos de competencia (Fig. 3) y es válido para la hidrólisis de cualquier nucleótido empleado en este trabajo.

Debido a que el 5'-FSO₂BzA es un inhibidor específico de la apirasa en la fracción enriquecida obtenida a partir de las mitocondrias de la placenta humana, y que datos de nuestro laboratorio sugieren que la actividad de esta apirasa

48

podría estar asociada con el transporte de colesterol y su transformación a progesterona, se evaluó el efecto que tiene el 5'-FSO₂BzA en dos parámetros funcionales de las mitocondrias íntegras, el consumo de oxígeno y la síntesis de progesterona.

Los estudios en las mitocondrias integras en presencia del 5'-FSO₂BzA muestran que la actividad de la apirasa fue inhibida en un 90% utilizando diferentes nucleótidos como sustrato, y que el consumo de oxígeno estimulado por el ATP fue totalmente eliminado. Estos resultados confirman la existencia en las mitocondrias de la placenta de un sitio externo para la fijación del ATP distinto al translocador de los adenín nucleótidos o cualquier otra proteína típica mitocondrial, va que se conserva la estimulación del consumo de oxígeno estimulado por el ADP en presencia del inhibidor. Por otra parte, la síntesis de progesterona fue estimulada más de 5 veces por los nucleósidos de adenina tri y difosfatados, mientras que el resto de los nucleótidos produjeron menos del 50% del efecto inducido por el ATP. Asimismo, se observa una relación entre la estimulación de la síntesis de progesterona y la actividad hidrolítica de la apirasa. En este sentido, la inactivación de la apirasa por el 5'-FSO2BzA se reflejó en la síntesis de progesterona, donde se observa que la disminución en la hidrólisis de los diferentes nucleótidos es simultánea a la disminución de la concentración de la hormona hasta los niveles obtenidos en las condiciones control. Martínez y cols. (63) y Flores-Herrera y cols. (42) han reportado que en las partículas submitocondriales y en una fracción parcialmente enriquecida con la apirasa, la hidrólisis del ATP, ADP, GTP, GDP, CTP, UTP y TTP tienen la misma magnitud.

En contraste con esta información, los resultados mostrados en las mitocondrias intactas de la placenta humana, sugieren que tanto el ATP y el ADP son los mejores sustratos para estimular la síntesis de progesterona (*vide supra*), y que el metabolismo esteroidogénico en la placenta podría ser selectivo por los nucleótidos de adenina. Aunado a esto, la diferencia en la hidrólisis de los diferentes nucleotidos sugiere que la actividad de la apirasa, en las mitocondrias íntegras del sincisiotrofoblasto, es finamente regulada, ya que la hidrólisis de los

nucleótidos de adenina es 50% superior al resto de los nucleótidos ensayados. En este sentido, la hidrólisis de los nucleotidos por la ATP-difosfohidrolasa y la síntesis de progesterona parecen estar estrechamente relacionados.

A este respecto, Martínez y Strauss (71), han descrito que en las células de los tejidos esteroidogénicos como las glándulas suprarrenales, los ovarios y los testículos, el colesterol es transformado en las diferentes hormonas esteroidogénicas. En particular, es en las mitocondrias donde el colesterol es transformado en pregnenolona y posteriormente en progesterona. Se ha demostrado que estos tejidos requieren de proteínas especiales para realizar el transporte del colesterol dentro de la mitocondria y así sintetizar a las hormonas. Recientemente se ha descrito en las glándulas suprarrenales la proteína StAR (proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda) cuya participación está relacionada con el transporte del colesterol a las mitocondrias (72, 73). Sin embargo, se ha demostrado que en la placenta humana no se expresa la StAR, lo que sugiere que las células del trofoblasto emplean un mecanismo diferente para transportar al colesterol hacia la mitocondria (74).

Por otra parte, se ha sugerido que la translocación de los lípidos en las membranas es dependiente de energía. En este sentido, la adición de GTP incrementó la síntesis de pregnenolona en las mitocondrias del tejido adrenérgico (75). Los autores sugieren que el efecto del GTP está mediado por una GTPasa asociada con la mitocondria. Recientemente, Navarrete y cols. (61) han determinado el efecto del vanadato sobre la hidrólisis del ATP y la incorporación del colesterol en la fracción mitocondrial de la placenta humana. Los autores han demostrado que el transporte del colesterol en la placenta humana requiere de energía en forma de ATP.

Aunado a esto, Espinosa-García y cols. (44) han mostrado que el transporte del colesterol en las mitocondrias de la placenta humana es mediada por un sistema proteico. Nuestros resultados sugieren que la actividad hidrolítica de esta nueva ATP-difosfohidrolasa está relacionada con la síntesis de progesterona, posiblemente formando parte del complejo proteico encargado del

50

transporte del colesterol en las mitocondrias (61). En este trabajo hemos demostrado que el 5'-FSO₂BzA es un inhibidor específico de la actividad de la apirasa y en el futuro puede ser empleado como una herramienta para clarificar el papel fisiológico de esta ATP-difosfohidrolasa en el metabolismo esteroidogénico de las mitocondrias de la placenta humana a término.

R3F3R3NCI45

Aún la luz más brillante, necesita de la oscuridad para existir.

Ged, Archimago de Terramar. (Las Tumbas de Atuan, Ursula K. LeGuin)

REFERENCIAS

- Burnstock G (1991) Overviwe: purinergic receptors. In Role of Adenosine and Adenine Nucleotides in the Biological Systems (Ed.) Imai S & Nakasawva M, pp. 3-16. New York: Raven Press.
- 2. Edwards FA & Gibb AJ. (1993). FEBS Lett. 325:86-89.
- 3. Marcus AJ & Safier LB. (1993). FASEB J. 7:516-522.
- Beukers MW, Pirovano IM, Van Weert A, Kerkhof CJM, Ijserman AP & Soudin W. (1993) *Biochem. Pharmacol.* 46:1959-1966.
- 5. Law JH, Ribeiro JMC & Wells MA. (1992). Ann. Rev. Biochem. 61:87-111.
- 6. Ziganshin AU, Hoyle HV, Ziganshina LE & Burnstock G. (1994) Br. J. Pharmacol. 113:669-674.
- Fanta N, Anich M, Mancilla M, Kettlun AM, Valenzuela MA y Traverso-Cori A. (1988) Arch. Biol. Med. Exp. 21:129-133.
- Sabbatini GP, Smith PJ & Von Holt CA. (1993) Biochim. Biophys. Acta. 1153:132-134.
- Girolomoni G, Santanionio ML, Pastore S, Bergstresser PR, Giannetti A & Cruz PD. (1993) J. Invest. Dermatol. 100:282-287.
- Saribas AS, Lusting KD, Zhang X & Weisman GA. (1993) Analyt. Biochem. 209:45-42.
- 11. Amano T, Wakagi T y Oshima T. (1993) J. Biochem. 114:329-333.
- 12. Hamlyn JM y Senior AE. (1983) Biochem. J. 214:59-68.
- Valenzuela MA, López J, Depix M, Mancilla M, Kettlun AM, Catalan L, Chiong M, Garrido J Y Traverso-Cori A. (1989) Comp. Biochem. Physiol. 93D:911-919.
- 14. Yagi K, Shinbo M, Hasuzime M, Shimba LS, Kurimura S y Miura Y. (1991) Biochem. Res. Comm. 180:1200-1206.
- 15. Komoszynski M & Wojtczak A. (1996) Biochim. Biophys. Acta. 1310:233-241.
- 16. Vara F y Serrana R. (1981) Biochem. J. 197:637-643.
- Picher M, Côté YP, Beliveau R, Potier M y Beaudoin AR. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:4699-4703.
- 18. Frassetto SS, Dias RD y Sarkis JJ. (1993) Mol. Cell Biochem. 129:47-55.
- 19. Sato J, Matsukawa R y Takiguchi H. (1994) Int. J. Biochem. 26:905-911.
- 20. Moodie FDL, Baum H, Butterworth PJ and Peters TJ. (1991) *Eur. J. Biochem.* 18;202(3):1209-1215.
- 21. Knowles AF, Isler RE y Reece JF. (1983) Biochim. Biophys. Acta. 731:88-96.
- 22. Côté YP, Ovellet S & Beaudoin AR. (1992) Biochim. Biophys. Acta. 1160:246-250.
- 23. Kirley TL. (1997) J. Biol. Chem. 272(2):1076-1081.
- 24. Smith TM y Kirley TL. (1998) Biochim. Biophys. Acta. 1386(1):65-78.
- 25. Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH y Robson SC. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:33116-33122.

- 26. Banco de las Secuencias proteicas. ATP-difosfohidrolasa de las celulas limfoides de raton. No. acceso: P49961, PID g1705710.
- 27. Matsumoto M, Sakurai Y, Kokubo T, Yagi H, Makita K, Matsui T, Titani K, Fujiyama Y y Narita N. (1999) FEBS Lett. 453(3): 335-340.
- Nagy AK, Knowles AF y Nagami GT. (1998) J. Biol. Chem. 273(26):16043-16049.
- Gao L, Dong L y Whitlock JPJr. (1998) J. Biol. Chem. 273(25):15358-15365.
 29Banco de las Secuencias proteicas. Proteína similar a las nucleosido fosfatasa. No. acceso: AAD39311, PID g5080801.
- 30. Wang T-F, Ou Y, Guidotti G. (1998) J. Biol. Chem. 273(38):24814-24821.
- 31. Smith TM y Kirley TL. (1999) Biochemistry. 38:321-328.
- 32. Smith TM, Carl SAL y Kirley TL. (1999) Biochemistry. 38:5849-5857.
- 33. Stout JG y Kirley TL. (1996) Biochemistry. 35:8289-8298.
- 34. Schulte y cols 1999 Biochem. 38:2248 BUSCAR
- 35. Smith TM y Kirley TL. (1999) Biochemistry. 38:1509-1516.
- 36. Bork P, Sander C y Valencia A. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:7290-7294.
- 37. Tognoli L & Marre E. (1981) Biochim. Biophys. Acta. 642:1-14.
- 38. Sarkis JJF & Salto C. (1991) Brain. Res. Bull. 26:871-876.
- 39. Côté YP, Picher M, St-Jean P, Beliveau R, Potier M y Beaudoin AR. (1990) Biochim. Biophys. Acta. 1078:187-191.
- 40. Sarkis JJ, Guimaraes JA Y Ribeiro JMC. (1986) Biochem. J. 233:885-891.
- 41. Anich M, Fanta N, Kettlun AM, Valenzuela MA y Traverso-Cori A. (1990) Phytochemistry. 29:1411-1415.
- 42. Flores-Herrera O, Uribe A, Pardo JP, Rendón JL & Martínez F. (1999) Placenta. 20: 475-484.
- 43. Martínez F, Espinosa-García MT & Navarrete J. (1997) Placenta. 18: A.38.
- 44. Espinosa-García MT, Straus JF III & Martínez F. (2000) Placenta. 21:654-660.
- 45. Allison WS, Bullough DA & Andrews WW. (1986) *Methods Enzymol.* 126:741-761.
- 46. Sévigny J, Côté YP & Beaudoin AR. (1995) Biochem. J. 312:351-356.
- 47. Martí E, Aranda IG & Solsona L. (1996) Biochim. Biophys. Acta. 1282:17-24.
- 48. Flores-Herrera O, Pardo JP, Espinosa-García MT & Martínez F. (1995) Biochem. Mol. Biol. Int. 35:793-801.
- 49. Martínez F, Kiriakidou M & Stauss JF III. (1997) Endocrinology. 138:2172-2183.
- Martínez F, Moncada R, Bárcenas FJ & Espinosa-García MT. (1992) Placenta. 13:463-473.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Rarr AL & Randall RJ. (1951) J. Biol. Mol. 193:265-275.
- 52. Bensadoun A & Weinstein D. (1976) Analyt. Biochem. 70:241-250.
- 53. Laemli UK. (1970) Nature. 227:680-685.
- Hashizume S, Rashid MA, Shoji M y Kuroda K. (1984) *Electrophoresis*. 5:30-34.

- 55. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS & Candia OA. (1979) Analyt. Biochem. 100:95-97.
- 56. Chevillard C, Cárdenas ML & Cornish-Bowden A. (1993) Biochem. J. 289:599-604.
- 57. LeBel D, Poirier GG, Phenaut S, St-Jean P, Laliberte JF & Beaundoin AR. (1980) J. Biol. Chem. 225:1227-1233.
- 58. Lin SH. (1990) Ann. NY. Acad. Sci. USA. 603:394-400.
- 59. Kitz R y Wilson IB. (1962) J. Biol. Chem. 237(10):3245-3249.
- 60. Martínez F, Espinosa-García MT, Flores-Herrera O & Pardo JP. (1993) *Placenta*. 14:321-331.
- Navarrete J, Flores-Herrera O, Uribe A & Martínez F. (1999) Placenta. 20:285-291.
- 62. Olivera AA & Meigs RA. (1975) Biochim. Biophys. Acta. 376:426-435.
- Martínez F, Meaney A, Espinosa-García MT, Pardo JP, Uribe A & Flores-Herrera O. (1996) *Placenta*. 17:345-350.
- Vasconcelos EG, Ferreira ST, de Carvaiho TMU, De Souza, Kettlun W, Mancilla M, Valenzuela MA & Verjovski-Almeida S. (1996) *J. Biol. Mol.* 271:22139-22145.
- 65. Handa M & Guidotti G. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 218:916-923.
- 66. Verjovski-Almeida S, vasconcelos EG, Ferreira ST, Kettlun AM, Mancilla M & Valenzuela MA (1997) ATP diphosphohydrolase from Schistosoma mansoni belongs to a new family of apyrases, in Ecto-ATPases (Plesner L, Kirley TL & Knowles AF, eds) pp 153-159, Plenum Press, New York.
- 67. Plesner L. (1995) Int. Rev. Cytol. 158:141-214.
- 68. Torres CR, Vasconcelos EG, Ferreira ST & Verjovski-Almeida S. (1998) *Eur. J. Biochem.* 251:516-521.
- 69. Filippini A, Taffs RE, Agui T & Sitkousky MV. (1990) J. Biol. Chem. 265:334-340.
- 70. Hixon CS & Krebs EG. (1979) J. Biol. Chem, 254:7509-7514.
- Martínez F & Strauss JF III (1997) Regulation of mitochondrial cholesterol metabolism. In: Subcellular Biochemistry Vol 28. Cholesterol: Its functions and metabolism in biology and medicine. Edd R. Bittman. Plenum Press. NY. USA. pp 205-234.
- 72. Lin D, Sugawara T, Straus JF III, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A & Miller WL. (1995) Science. 267:1828-1831.
- 73. Stocco DM & Clark BJ. (1996) Bioch. Pharm. 51:197-205.
- 74. Strauss JF III, Martínez F & Kiriakidou M. (1996) Biol. Rep. 54:303-311.
- Xu X, Xu T, Robertson DG & Lamberth JD. (1989) J. Biol. Mol. 264:17674-17680.

APÉNDIC3 <u>A</u> (*ARTÍCULO D3 INV35TI64CIÓN*)

A Novel ATP-diphosphohydrolase from Human Term Placental Vitochondria

Flores-Herrera, A. Uribe, J. P. Pardo, J. L. Rendó n and F. Martí nez^a

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, Doyoacán, 04510, México, D. F., México

Paper accepted 2 February 1999

This report describes an ATP-diphosphohydrolase activity associated with the inner membrane of human term placental mitochondria. An enriched fraction containing 30 per cent of the total protein and 80 per cent of the total ATP-diphosphohydrolase activity was obtained from submitochondrial particles. ATP-diphosphohydrolase activity was characterized in this fraction. The enzyme had a pH optimum of 8 and catalysed the hydrolysis of triphospho- and diphosphonucleosides other than ATP or ADP. Pyrophosphate was also hydrolysed, but AMP or other monoester phosphates were not. The activity of ATP-diphosphohydrolase was dependent on Mg^{2+} , Ca^{2+} or Mn^{2+} and the enzyme substrate was the cation-nucleotide complex. An excess of free cation produced inhibition.

ATP-diphosphohydrolase activity was stimulated at micromolar concentrations of calcium or magnesium in the presence of La-PPi. Negative cooperativity kinetics was observed with all substrates tested. The V_{max} ranged from 150 to 300 nmol of Pi released/mg/min. The [S]_{0.5} for nucleotides was 1-10 mM and 182 mM for PPi. The enzyme was inhibited by orthovanadate, but not by L-phenylalanine, oligomycin, sodium azide, P¹, P⁵-di(adenosine-5')pentaphosphate or sodium fluoride.

The experimental evidence showing absence of inhibition by sodium azide and sodium fluoride, hydrolysis of pyrophosphate but not of monoester phosphates, and negative cooperativity suggested that this enzyme was a novel ATP-diphosphohydrolase. Placenta (1999), 20, 475-484 © 1999 W. B. Saunders Company Ltd

INTRODUCTION

ATP-diphosphohydrolases (EC 3.6.1.5) are ATP-hydrolysing enzymes with unknown metabolic function. Their abundance and high enzymatic activity suggest that they might play an important role in cell metabolism (Komoszy ski and Wojtczak, 1996). Although ATP-diphosphohydrolases and ATPases belong to the same group of enzymes, there are several differences between them. While ATPases hydrolyse ATP, ATP-diphosphohydrolases can hydrolyse different di- and triphosphonucleosides; for example, hydrolysis of ATP releases AMP and orthophosphate. The hydrolysis of nucleoside monophosphates by ATP-diphosphohydrolase has not been observed. This suggests that each enzyme has a different metabolic function.

Although the hydrolysis of nucleotides by ATPdiphosphohydrolases has been implicated in several functions, such as neurotransmission (Burnstock, 1991; Sarkis and Salto, 1991), blood platelet aggregation (Law, Ribeiro and Wells, 1992; Marcus and Safier, 1993; Beukers et al., 1993), pressure

*To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Apartado Postal 70-159, Coyoacún, 04510, México D. F., México. Fax: 52 (5) 616 2419; E-mail: fedem@servidor.unam.mx

0143-40047997050475+10 \$12.0070

regulation (Edwards and Gibb, 1993; Ziganshin et al., 1994), protein glycosylation and sugar level control (Sabbatini, Smith and Von Holt, 1993), and the regulation of membrane integrity and transport of large molecules (Girolomoni et al., 1993; Saribas et al., 1993), evidence concerning its physiological role is not conclusive. Recently, we described the presence of an enzyme associated with the inner mitochondrial membrane in the human term placenta, named 5'-nucleotidase (Martínez et al., 1992, 1993), which hydrolyses triphospho- and diphosphonucleosides and pyrophosphate (PPi). However, as the enzyme does not hydrolyse nucleoside monophosphate or other monophosphate compounds (Martínez et al., 1996), in the present report it was redesignated as an ATPdiphosphohydrolase.

The hydrolysis of ATP by this enzyme induces oxygen consumption in human placental mitochondria (Martínez et al., 1993) with a respiration control ratio 2-5 times higher than those values reported by other authors (Olivera and Meigs, 1975). In the presence of magnesium, the hydrolysis of ATP by ATP-diphosphohydrolase does not uncouple mitochondrial respiration. Furthermore, this activity seems to regulate mitochondrial metabolism (Martínez et al., 1996), and could be involved in the metabolism of nucleotides in the trophoblast cell. In this work, we have characterized the ATPdiphosphohydrolase activity, starting from an enriched fraction obtained from human placental submitochondrial particles fractionated on a Sephaeryl S400 HR. Its kinetic behaviour, ion modulation and the effect of several inhibitors were investigated. The results showed a pH optimum of 8.0 for the hydrolysis of ATP or ADP by ATP-diphosphohydrolase. Purine nucleotides and PPi were hydrolysed, but AMP and monoester phosphate compounds were not. Bivalent cations were found to be necessary for the ATP-diphosphohydrolase activity.

In the presence of an La-PPi complex as substrate, calcium and magnesium stimulated ATP-diphosphohydrolase activity at micromolar concentrations, which suggests an enzymatic modulation by these cations. Activity was inhibited by orthovanadate, but not by L-phenylalanine, oligomycin, sodium azide (NaN₃), P¹, P⁵-di(adenosine-5')pentaphosphate (Ap5) or sodium fluoride (NaF).

MATERIALS AND METHODS

Isolation of mitochondria and submitochondrial particles

To isolate syncytiotrophoblast mitochondria, the term human placentae were processed within 30 min of delivery, as reported earlier (Flores et al., 1995) and modified by Martínez, Kiriakidou and Strauss (1997). Each batch of submitochondrial particles (SMP) was obtained from about 60 placentae by the method reported previously by Martínez et al. (1992) and stored at -70° C until use. At least five different batches were used in this study.

Submitochondrial particle (SMP) fractionation

SMP (20 mg/ml) were suspended in a solution containing 4 mM ATP and 3 mM EDTA (pH 7.4), then the pH was adjusted to 9.2 with NH₂OH under continuous stirring. The suspension was sonicated in 5-ml aliquots in an ice bath, using an MSE Soniprep (UK) model 150 at maximal output for two periods of 10 min with a 3-min interval. The sonicated material was centrifuged at 100 000 g for 90 min at 4°C, and the supernatant was loaded on a Sephacryl S400 HR column (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden: 2.5 × 40 cm) previously equilibrated with 30 mM Tris-HCl (pH 8) and 5 per cent glycerol. At room temperature, the column was eluted with the same buffer at a flow rate of 16 ml/h. Following exclusion volume, 21 samples of approximately 6-7 ml were collected. The shoulder of the first peak contained the ATPdiphosphohydrolase activity (fractions 3-7), which was pooled and concentrated in an Amicon (Beverly, MA, USA) cell, using a YM 100 Diaflo (USA) membrane and stored at = 70°C until use. This fraction contained 30 per cent of the total protein and was designated as the Sephacryl S400 HR fraction.

At least five different preparations of this enriched Sephaeryl S400 HR fraction were used in this study.

Native gel electrophoresis

A native polyaerylamide gradient gel (3-10 per cent)was prepared in the following buffer: 150 mm 3-(N-morpholino)propane sulphonic acid (MOPS); 125 mm histidine, pH 6.5; 10 per cent glycerol; 2.5 mM Zwittergent 3-14; 0.05 per cent ammonium sulphate, and 0.04 per cent TEMED (v/v). The protein from the Sephacryl S400 HR fraction (2 mg) was solubilized with α -lisophosphatydilcholine and Zwittergent 3-14 in a 1:1:1 ratio. This condition did not modify activity for the hydrolysis of nucleotides. Gels were run in a buffer containing 150 mm MOPS; 125 mM histidine, pH 6.5, and 3 mm Zwittergent 3-14 at 100 V for 6 h at 4°C.

The hydrolytic activity of the enzymes in the gel was shown as follows. A solution containing 30 mM Tris-HCl (pH 8), and 5 mM MgCl₂ was used to wash the gel for 15 min at room temperature. The gel was then incubated at 37°C for 30 min in 30 mM Tris-HCl (pH 8), 5 mM MgCl₂ and 5 mM ADP or ATP. Next, the gel was again washed with the previous washing solution and incubated at 45°C for 5 min in 3.3 per cent ammonium heptamolibdate, 3.75 N H₂SO₄, and 0.015 per cent ascorbic acid to reveal the phosphate released from nucleotides. Finally, gels were washed with double-distilled water and a photograph was taken using a direct screen instant Polaroid camera (model DS-34, UK). One sample gel or one guide stripe was stained with silver.

Electrophoretic extraction

The portion of the native gel corresponding to the band with the highest enzyme activity was sliced out from unstained sample gel and used for electrophoretic extraction. Several other slices were cut from the native gel as control. As described in Hashizume et al. (1984), the buffer system providing the most efficient extraction contained a lower buffer system (anode) of 189 mM imidazole, 62 mM HCl, and 10 per cent glycerol (pH 7.4) and an upper buffer (cathode) containing 2.5 mM imidazol and 10 mM glycine (pH 8). The electroextraction was performed at 300 V for 5 h at 4°C. The samples were placed on the cathode side and after the run, protein was collected on the anode side.

Determination of protein

Samples were treated with 0.017 per cent deoxycholate and precipitated with 6 per cent trichloroacetic acid (Bensadoun and Weinstein, 1976). After centrifugation, the protein content was determined as described by Lowry et al. (1951). Crystalline bovine serum albumin (BSA) was used as standard.

Enzyme assays

The ATP-diphosphohydrolase activity, defined as the nucleoside tri- and diphosphate hydrolytic activity, was determined ł

. Flores-Herrera et al.: A Novel ATP-diphosphohydrolase from Human Term Placental Mitochondria

Table 1. Preparation of the ATP-diphosphohydrolase fraction

Step	Total protein	Volume	Specific	Total	Yield	Purification
	(mg)	(mł)	activity"	activity ^h	(per cent)	(fold)
SMP Sephacryl S400 HR	97 36 5	5	117	11 363	100	1 2.2

The submitochondrial particles were processed as described in Materials and Methods, Similar results were obtained in the presence of Mg-ADP as substrate, "nmol of Pi release/mg/min in the presence of Mg-ATP; "mnol of Pi release/total mg/min in the presence of Mg-ATP.

y measuring the release of inorganic phosphate (Pi). The eaction was started by the addition of the substrate nucleotide-cation complex) plus 1 mM of free cation (Mg2+, a²⁺ or Mn²⁺), and stopped by the addition of 6 per cent richloroacetic acid. After centrifugation at 4500 g for 10 min t 4°C, an aliquot of supernatant was used for Pi determination s described by Sumner (1954) for high concentrations, or by anzetta (1979) for low concentrations of Pi. The activity at lifferent pH values was assayed with 30 ms of the following uffers: 2-(N-morpholino)-ethene sulphonic acid (MES) rom 5.5 to 7, Tris-HCl from 7 to 8.5, and 3-f(1,1-directly)--hydroxyethyl)amino]-2-hydroxy-propanesulphonic acid AMPSO) from 8.5 to 10. In each experiment, 50 µg of protein n a final volume of 0.5 ml was used; experiments were carried out at 30°C. Subsequently, experiments for the hydrolysis of AMP, ADP, ATP, GDP, GTP or PPi were performed n the presence of 30 mM Tris-HCl (pH 8). ATPliphosphohydrolase activity was also assayed in the presence of increasing concentrations of the following specific inhibiors: 1.-phenylalanine at pH 10, or sodium orthovanadate, bligomycin, NaF, Ap5 and NaN3 at pH 8.

The effect of millimolar concentrations of free Mg^{2+} or Ca^{2+} on the ATP-diphosphohydrolase activity was studied in 80 mAt Tris-HCl (pH 8), using 15 mM or 6 mM cationnucleotide complex as substrate. To study the effect of low concentrations of free Mg^{2+} or Ca^{2+} on the ATPliphosphohydrolase activity, the La-PPi complex was used as aubstrate. Experiments were performed at least four times in luplicate.

Determination of the kinetic parameters

Data for the hydrolysis of different substrates were analysed by obust, weighted, non-linear regression analysis using the Enzfitter software (Elsevier-Biosoft, version 1.05; CGA). The lata represent the average of eight independent experiments.

Chemicals

Analytical grade reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and E. Merek (Darmstadt, Germany).

RESULTS

Partial purification of the ATP-diphosphohydrolase

Typical results from the partial purification of ATPdiphosphohydrolase using the Sephacryl S400 HR column are given in Table 1. The activity was eluted as a single peak containing 80 per cent of the total ATP-diphosphohydrolase activity and 30 per cent of the total protein. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 0.1 per cent SDS (Laemmli, 1970) revealed the presence of at least seven protein bands (Figure 1). This preparation, designated the Sephacryl S400 HR fraction, was used for kinetic characterization.

Effect of pH and inhibitors

Using ATP and ADP as substrates, the highest hydrolysis rate was obtained at pH 8.0; whereas for AMP, the rate increased steadily from pH 8 to 10 (data not shown). As these results suggested the presence of an alkaline phosphatase, the effect of L-phenylalanine, a specific inhibitor of alkaline phosphatase activity, was tested (Fishman and Ghosh, 1967). The hydrolysis of AMP at pH 10 was inhibited approximately 95 per cent by 30 mM L-phenylalanine [Figure 2(A)]. Although AMP was not hydrolysed at pH 8, the hydrolysis of ATP or ADP at this pH was not modified by L-phenylalanine. These results indicate that the ATP-diphosphohydrolase-enriched Sephacryl S400 HR fraction contained an alkaline phosphatase, but that activity was negligible at pH 8. As more than 95 per cent of the Pi released at pH 8 was due to ATP-diphosphohydrolase activity, subsequent experiments were performed at pH8.

NaN₃ and NaF were used as inhibitors as these substances have been described previously as specific inhibitors of ATPdiphosphohydrolase activity (Meyerhof, 1945; LeBel et al., 1980; Knowles, Isler and Recee, 1983). The following inhibitors were also tested: oligomycin for the mitochondrial $F_3F_{0^-}$ ATPase (Tzagdoff, McLennan and Byington, 1968); Ap5 for myokinase (Lienhard, 1973), and orthovanadate for the P-type ATPases (Perlin et al., 1986). Oligomycin, Ap5, NaN₃ or NaF did not modify the Pi release from ATP, ADP or PPi. Orthovanadate inhibited the release of phosphate from ATP or ADP (Figure 2(B)) with an IC₅₀ of 0.4 mst. The hydrolysis of



gure 1. Polyacrylamide-gel electrophoresis of ATP-diphosphohydrolase, extrophoresis was done on a SDS-10 per cent polyacrylamide slab gel, which s then stained with silver. The figure shows mitochondria (II), PSM (C), the phacryl S400 11R (raction (D) and the ATP-diphosphohydrolase fraction). The molecular weight markers (A) were bovine albumin (66 kDa), albumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), bonie anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor 1 kDa) and u-betalbumin (14.2 kDa).

Pi was also inhibited by orthovanadate. These data suggest st that the F_1F_0 -ATPase and myokinase were not present in is preparation, as oligomycin or Ap5 did not inhibit the drolysis of the substrates used, and second, that the hydrolys of the different substrates was catalysed by the same zyme. Also, neither NaN₃ nor NaF inhibited ATPphosphohydrolase, the results suggest that mitochondrial TP-diphosphohydrolase from the human placenta shows fierent properties from enzymes isolated from other ological sources (vide infra).

haracterization of the TP-diphosphohydrolase activity

he hydrolysis of different Mg-nucleotide complexes was adied in the presence of 1 mM free Mg²⁺ in order to aintain a high concentration of the complex. The time course phosphate release was linear up to 5 min for ATP or ADP, id for up to 15 min for PPi. Less than 10 per cent of the aeleotide or PPi was hydrolysed.

A plot of the ATP-diphosphohydrolase activity versus subrate concentration (nucleotide-cation complex) showed that e enzyme did not follow simple Michaelis-Menten kinetics 'igure 3). The activity increased very sharply at low concen-



Figure 2. Effect of L-phenylalanine and orthovanadate on mitochondrial ATP-diphosphohydrolase activity. ATP-diphosphohydrolase activity was assayed in the presence of different concentrations of (A) L-phenylalanine or (B) vanadate. The concentration of the Mg-nucleotide complex was 15 max, with 1 mm MgCl₂ in excess and 30 mm of AMPSO or Tris-HCl, respectively. The activity in the presence of Mg-ATP (O) or Mg-ADP (\bullet) was at pH 8, and with Mg-AMP (\bullet) at pH 10. Values are mean \pm s.d. of five separate experiments.

trations of Mg-ATP or Mg-ADP, but the slope levelled off as the substrate concentration increased. The lines shown in Figure 3 were drawn with the values of the parameters



gure 3. Dependence of mitochondrial ATP-diphosphohydrolase activity on substrate concentration. The dependence of the activity on substrate concentration pH 8 was fitted to the Hill equation. The insets show the double reciprocal plots of the data. Values are mean \pm s.d. of eight separate experiments.

btained by non-linear regression analysis, assuming an azyme with negative cooperativity, and described by the Hill quation:

τ

By using a Michaelis-Menten two enzymes model, the results revealed a wide dispersion of values. For example, K_{m_1} and K_{m_2} for the hydrolysis of ATP were 1.83 ± 1.40 and 0.01 ± 0.008 , repectively. The standard deviations were 75 and 80 per cent, respectively.

$$v = (V_{\max} \times [S]^n) / (K + [S]^n) \text{ with } n < 1.$$
 (1)

Table 2. Kinetic parameters of ATP-diphosphohydrolase from human placental mitochondria, in the presence of different substrates

jubstrate	Mg ²⁺				Ca ²⁺				Mn ²⁺			
	ĸ	V _{max}	n	[S] _{0.5}	K	V _{max}	N	[S] _{0.5}	К	'V _{max}	n .	[S] _{0.5}
ADP	1.6±0.10	261 ± 42	0.5 ± 0.03	2.4	1.1 ± 0.10	350 ± 15	0.4 ± 0.03	1.3	2.5 ± 0.16	169 ± 21	0.5 ± 0.03	5.6
ATP	1.1 ± 0.07	280 ± 48	0.5 ± 0.03	1.3	1.2 ± 0.10	380 ± 32	0.5 ± 0.04	1.4	3.2 ± 0.40	197 ± 18	0.7 ± 0.08	4.8
GDP	2.8 ± 0.50	240 ± 39	0.3 ± 0.08	8.1								
GTP	1.9 ± 0.30	250 ± 41	0.6 ± 0.09	3.1								
2Pi	10 ± 1.20	200 ± 35	0.5 ± 0.02	182								

The kinetic parameters were estimated in the presence of the cation-nucleotide complex plus 1 mm of free eation and adjusted to the Hill equation as described in Materials and Methods. K=mM; $P_{max}=nmol$ of Pi released/mg/min; n=Hill number; $\{S\}_{n,s}=K^{1/n}$.

The negative cooperativity was visualized better in the double reciprocal plots (Figure 3, inset), in which a non-linear, concave, downward-sloping line was obtained. A statistical comparison of the two models (two-enzyme or negative cooperativity) was analysed by an *F*-test comparing the residuals (Ellis and Duggleby, 1978). This test showed that the model employing negative cooperativity was the best fit to our results, with a statistically significant difference (P < 0.005).

The Hill numbers (n) for nucleoside tri- or diphosphate hydrolysis in the presence of Mg^{2+} , Ca^{2+} or Mn^{2+} ranged from 0.33 to 0.73. The V_{max} values were from 170 to 380 nmol of Pi released/mg/min, and the [S]_{0.5} values from 1.3 to 10 mM (Table 2). PPi hydrolysis also showed negative cooperativity with a Hill number of 0.45, a V_{max} of 200 nmol of Pi released/mg/min, and a [S]_{0.5} of 182 mM. This low affinity suggested that the cation-PPi complex was not the best substrate for ATP-diphosphohydrolase.

The presence of calcium in the reaction mixture increased V_{max} by 30 per cent compared with magnesium (Table 2). In contrast, when Mn²⁺ was used in the reaction mixture, the V_{max} was decreased by 30 per cent compared to Mg²⁺. Similar to other ATP-diphosphohydrolases, the presence of cations may play a role in modulating activity in addition to their role as part of the substrate complex. The addition of EDTA (0.5 mM) or EGTA (0.5 mM) stopped the ATP-diphosphohydrolase activity (data not shown), supporting the assumption that this enzyme requires divalent cations for its activity. In addition, the data suggest that the true substrate or ATP-diphosphohydrolase is cation-nucleotide complex or cation-PPi, which is in equilibrium with free cation and free nucleotide or PPi.

To determine the effect of free cation on ATPdiphosphohydrolase activity, the enzyme activity was assayed in the presence of a large excess of the cation. Figure 4 shows results when the concentrations of ATP (closed symbols) and ADP (open symbols) were held constant, while the MgCl₂ or CaCl₂ concentration was varied from 1 to 30 mM above the concentration of ATP or ADP. When the concentration of free cation was increased above 1 mM, ATP-diphosphohydrolase activity was inhibited and the percentage of inhibition was the same at low (Δ) or high (O) concentrations of ATP or ADP.

A double reciprocal plot of these data also showed nonlinear curves and was fitted to the Hill equation (data not shown). The large excess of free cation diminished the $V_{\rm max}$ by 50-65 per cent compared to 1 mM of free cation, while the *n* was unchanged (values between 0.43 and 0.51), suggesting that $V_{\rm max}$ was the main kinetic parameter affected by the excess of free cation.

The effect of divalent cations on ATP-diphosphohydrolase activity was further studied by determining the hydrolysis of the La-PPi complex in the presence of calcium or magnesium. As the association constant (K_a) for La-PPi is higher by an order of magnitude than that for Mg-PPi or Ca-PPi (log $K_a = 16.72$, 5.45 and 5.40, respectively), the only complex formed will be La-PPi and Ca²⁺ and Mg²⁺ will remain free in solution. As shown in Figure 5, calcium and magnesium ions increased the rate of La-PPi hydrolysis by five-fold and two-fold, respectively. These results suggested that Ca²⁺ and Mg²⁺ might have a recognition site on the enzyme and play a role in the regulation or activation of the enzyme.

Native gel electrophoresis of the enriched Sephacryl S400 HR fraction showed two bands which were capable of the hydrolysis of both ATP and ADP. These two bands contained no more than 0.1 per cent of the total protein loaded, as there was no silver-staining of the bands corresponding to ATPdiphosphohydrolase activity, despite detection of the remaining protein (Figure 6). Similar results were obtained with the Coomassie Brillant Blue R215 (data not shown).

The band with the higher ATP-diphosphohydrolase activity was cut and electrocluted from the native gel. The kinetic behaviour of this enriched ATP-diphosphohydrolase was relevant, as the electrocluted protein hydrolysed triphospho- and diphosphonucleosides and its activity was inhibited by ortovanadate. The specific activity was increased six-fold compared to the Sephacryl S400 HR fraction and while the kinetic behaviour still showed negative cooperativity with the same Hill number for the hydrolysis of PPi, ATP, ADP or GDP. However, the amount of the protein recovered was too low to permit further kinetics studies.



Figure 4. Inhibition of mitochondriat ATP-diphosphohydrolase by excess of Ca^{12} . The reaction mixture contained 30 mst Tris-HCl, p118, and the indicated amounts of free cation: (•) 15 mst Ca^{12} -ATP complex; (O) 15 mst Ca^{12} -ADP complex; (•) 6 mst Ca^{12} -ATP complex; (•) 6 mst Ca^{12} -ADP complex; (•) 7 mst Ca^{12} -ADP complex; (•) 8 mst $Ca^$

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated the presence of ATPdiphosphohydrolase activity in the mitochondrial fraction from the human term placenta, with characteristics differing



Figure 5. Stimulation of mitochondrial ATP-diphosphohydrolase activity by Mg^{2*} or Ga^{2*} . The reaction mixture contained 30 mM Tris-HCI, pH 8, 0.5 mM La-PPi as substrate and different concentrations of (O) calcium or (\bigcirc) magnesium. (A) Control activity in absence of Ga^{2*} or Mg^{2*} . The values are the mean \pm s.d. of three separate experiments.



Figure 6. Electrophoresis under non-denaturing conditions. An aliquot of protein (Sephaery S400 HR fraction) was used to perform electrophoresis on a native polyary hmicke gradient gel (3–10 per cent). The hydrolysis of ADP (A) or ATP (B) into gel was assayed as described under Material and Methods section. The arrowheads indicate the highest band of ATP-diphosphohydrolase activity that was electroeluted. The presence of total protein in the gel was detected by silver staining (C).

from the ATP-diphosphohydrolases described in other tissues. NaN₃ and NaF did not inhibit the activity of this enzyme, contrary to previous reports in other ATPdiphosphohydrolases (Brunette et al., 1995; Christoforidis et al., 1995; Komoszyski and Wojtezak, 1996). The pH optimum for the hydrolysis of both ATP and ADP was 8, which is similar to the pH optimum of 7.5 described by Brunette et al. (1995). In other cases the pH optimum depended on the substrate used (Christoforidis et al., 1995).
Ithough orthovanadate is a potent inhibitor of this mitochonrial ATP-diphosphohydrolase, it did not inhibit the activity f the enzyme in plasma membrane from human placenta Brunette et al., 1995). Two other exclusive features of this 'TP-diphosphohydrolase were its capacity to hydrolyse PPi nd the negative cooperativity observed with all substrates ested. Overall, these differences made this enzyme a novel 'TP-diphosphohydrolase.

Several attempts were made to solubilize the enzyme from 5MP, however treatment with several concentrations of świttergent 3-14, deoxycholate, Lubrol, Triton X100, Digitonin, Tween 20 or laurylmaltoside either resulted in 90 per cent inactivation and/or a lack of solubilization (data not shown), suggesting a tight association between the protein and he lipids of the inner mitochondrial membrane. In the same nanner, we have previously described an ATP hydrolysis/ cholesterol ratio of 6.95 ± 0.67 (u=12) in SMP of the placenta Martinez et al., 1996), suggesting an interaction between cholesterol and ATP-diphosphohydrolase. The Sephacryl 5400 HR fraction used in this study showed an ATPliphosphohydrolase activity/cholesterol ratio of 7.65, similar to that previously reported (Martínez et al., 1996), suggesting that the concentration of cholesterol is important for ATPdiphosphohydrolase activity. Although the interaction underlying the association between ATP-diphosphohydrolase and the inner membrane in placental mitochondria is unknown, Hanada et al. (1995) demonstrated that the interaction between cholesterol and the proteins bound/anchored to the membrane by GPI reduced the solubility of these proteins. Our data suggest that the low solubility of the ATP-diphosphohydrolase from human placental mitochondria could be due to an interaction between cholesterol and the enzyme. Despite this, we obtained a Sephacryl S400 HR fraction with 30 per cent of the total submitochondrial protein and 80 per cent of total ATP-diphosphohydrolase activity, enabling us to determine the kinetic properties of the diphosphohydrolase and the effect of several inhibitors and cations.

Although two bands hydrolyzing ATP and ADP were observed in the native gel electrophoresis, the band with the highest ATP-diphosphohydrolase activity showed the same negative cooperative behaviour as the Sephaeryl S400 HR fraction. It is probable that the two bands observed corresponded to a single enzyme with different aggregation states, although this result does not exclude the possibility that these two bands corresponded to two different enzymes. If an ADPase was present, then, in the presence of ADP, only one band should appear and not two as were observed. Nevertheless, from this experiment we concluded that the concentration of ATP-diphosphohydrolase was low, as despite loading 2 mg of the Sephaeryl S400 HR fraction onto the gel, silver staining did not show any bands in the region where the activity was detected although a wide band of protein was stained at the beginning of the gel. In a similar manner, bands were not detected by Coomassie Blue staining. This suggests that the concentration of enzyme was less than 0.1 per cent of the total mitochondrial protein.

Although an alkaline phosphatase was present in the enriched Sephacryl S400 HR fraction, its activity was negligible at pH 8 which allowed us to determine the kinetic behaviour of the ATP-diphosphohydrolase. Also, the activity of other mitochondrial enzymes associated with the hydrolysis of nucleotides, such as F₁F₀-ATPase or myokinase, were not detected in the Sephacryl S400 HR fraction, as revealed by the hydrolysis of ATP and ADP in the presence of specific inhibitors for F₄F₀-ATPase and myokinase. However, orthovanadate inhibited the hydrolysis of different nucleoside tri- and diphosphates and PPi in a concentration-dependent manner, following the same kinetic behaviour. This result suggests that the hydrolysis of all these different substrates is catalysed by the same enzyme, an ATP-diphosphohydrolase which does not share the same sensitivity to inhibitors as other previously reported ATP-diphosphohydrolases (Brunette et al., 1995; Christoforidis et al., 1995; Komoszyski and Wojtczak, 1996; Menezes et al., 1997).

An alternate explanation for this behaviour is that the enzyme activity could be due to a nucleotidase. Henke et al. (1989), and Raatikainen et al. (1992) reported a 5'-nucleotidase activity associated with mitochondria from rat liver, having a pH optimum of between 7 and 7.5 for AMP and IMP. AMP was the most effectively hydrolysed nucleotide. In contrast to the ATP-diphosphohydrolase activity of placental mitochondria, rat enzyme did not require bivalent cations but was stimulated by Mg²⁺. In addition, the enzyme followed Michaelis-Menten kinetics. The enzyme from human placental mitochondria showed a high preference for nucleoside triand diphosphates and, to a lesser extent, for PPi. AMP was not hydrolysed by this ATP-diphosphohydrolase, in contrast to the enzyme from rat liver mitochondria (Henke et al., 1989; Raatikainne et al., 1992). In addition, the placental mitochondrial ATP-diphosphohydrolase activity was dependent on the presence of bivalent cations, Ca2+ being the most effective, followed by Mg²⁺, Mn²⁺ and La³⁺. These data strongly suggest that the phosphate release observed in placental mitochondria could be due to ATP-diphosphohydrolase activity.

With respect to the activation of ATP-diphosphohydrolase activity by cations, there are two possible explanations: (1) a direct binding of the cation to the enzyme, modifying the enzyme conformation and resulting in an appropriate catalytic state; or (2) an indirect effect, as the eation participates in the formation of the actual substrate, the cation-(nucleotide or PPi) complex. The results showed that both Ca²⁺ and Mg²⁺, but primarily Ca2+, stimulated the hydrolysis of La-PPi, suggesting that Ca2+ and Mg2+ could modify the ATPdiphosphohydrolase through a regulatory site. In addition, the dependence of Pi release on cation concentrations suggested that the cation-nucleotide complex was the substrate for the ATP-diphosphohydrolase. Thus, under physiological conditions, the human placental mitochondrial ATPdiphosphohydrolase could be modulated by Ca2+ and/or Mg²⁺ at micromolar concentrations.

From these results, the hypothesis that nucleotide hydrolysis activities can be attributed to the same protein is based on the following: (1) the hydrolytic activity towards both ATP and ADP increased to the same degree throughout the isolation process; (2) the kinetic behaviour for the hydrolysis of at least five different substrates was the same; (3) the preference for the substrate hydrolysis remained unchanged at each step of purification; (4) the cation-dependent activity showed the same pattern, regardless of which nucleotide was used; (5) the inhibition patterns of hydrolysis of nucleotides by orthovanadate were the same for all substrates used; and (6) the hydrolytic activity towards ATP and ADP remained unchanged in the presence of four different specific inhibitors.

With regard to point (6) we have previously described the presence of two enzymes which hydrolysed ADP in human placental mitochondria and SMP; the activity of one was associated with ATP-diphosphohydrolase and the activity of the other with an ADPase, which was sensitive to oligomycin (Uribe et al., 1998). In this study, the addition of oligomycin did not change the rate of the hydrolysis of ADP. This strongly suggests that the ADPase is not active in the enriched fraction of ATP-diphosphohydrolase.

The kinetics observed for ATP-diphosphohydrolase activity suggest that the enzyme has two or more substrate-binding sites interacting with negative cooperativity (Segel, 1975). Analysis of the dependence of the rate of hydrolysis on the concentration of nucleotides or PPi (with 1 mM excess of the cation) gave a Hill number of approximately 0.5. This negative cooperativity model implies that the binding of each substrate to the enzyme decreases the intrinsic affinities of the vacant sites. Interestingly, the kinetic behaviour, the Hill number and the inhibition by orthovanadate were similar for all substrates used, suggesting that ATP-diphosphohydrolase is the only enzyme hydrolysing these substrates. The assumption that hydrolysis of the different substrates is catalysed by the same enzyme is reinforced by the ratio between the V_{max} for the hydrolysis of the nucleoside triphosphate and the V_{max} for the hydrolysis of the nucleoside diphosphate, which is close to 1 in the presence of either Ca²⁺, Mg²⁺ or Mn²⁺.

A statistical analysis, performed to compare the residuals between the Hill model and the two-enzyme model, supported the Hill model. This result supports the assumption that the enriched Sephacryl S400 HR fraction contains a single enzyme hydrolysing nucleotides and PPi.

Finally, the role of the mitochondrial ATPdiphosphohydrolase in the placental metabolism remains to be defined. We have evidence that the energetic state of mitochondria modifies the hydrolysis of ATP, suggesting a relationship between ATP-diphosphohydrolase activity and the mitochondrial metabolism (Martínez et al., 1996). Moreover, the addition of ATP stimulates oxygen consumption in isolated mitochondria from human placenta; respiratory control is higher than in the presence of ADP. Furthermore, sequential additions of ATP produced a notable improvement in state 4 respiration, increasing the respiratory control ratio from 4 to 11 (Martínez, Chávez and Echegoven, 1987). These results suggest that the ATP-diphosphohydrolase could be involved in the maintenance of mitochondrial membrane integrity. In addition, the participation of this enzyme in cholesterol transport in placental mitochondria has been observed (Martínez, Espinosa-Garcia and Navarette, 1997; Navarette et al., 1999), a process inhibited by orthovanadate. Although orthovanadate inhibits ATP-diphosphohydrolase by more than 90 per cent, the development of specific inhibitors will be essential for further investigation of the physiological role of this enzyme.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Alejandro Sosa-Peinado for critical reading of the manuscript. This work was partially supported by the following grants: IN200194, IN202496 and IN200897 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México; 26096M from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México; and PLI-239/96 from Programa Latinoamericano de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana.

REFERENCES

- Bensadoun A & Weinstein D (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analyt Biachem*, 70, 241–250.
- Beukers MW, Pirovano IM, Van Weert A, Kerkhof CJM, Ijserman AP & Soudin W(1993) Characterization of ecto-ATPase on human blood cells. A physiological role in platelet aggregation? *Biochem Pharmacol*, 46, 1959– 1966.
- Brunette MG, Bastani B, Leelerc M & Narbaitz R (1995) Detection of different adenosine triphosphatases in human placental brush. J Membr Biol, 145, 285-293.
- Burnstock G (1991) Overview: purinergic receptors. In Role of Adenoine and Adenine Nucleotides in the Biological Systems (Ed.) Innai S & Nakasawya M, pp. 3–16. New York: Raven Press.
- Christoforidis S, Papamarcaki T, Galaris D, Kellener R & Tsolas O (1995) Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur J Buchem*, 234, 66–74.
- Edwards FA & Gibb AJ (1993) ATP-a fast neurotransmuter. FEBS Lett, 325, 86-89.
- Ellis KJ & Duggleby RG (1978) What happens when data are fitted to the wrong equation? *Biochem J*, 171, 513–517.

- Fishman WH & Ghosh NK (1967) Isoenzymes of human alkaline phosphatase. Adv. Clin Chem, 10, 256–262.
- Flores-Herrera O, Pardo JP, Espinosa-García MT & Martínez F (1995) Calcium transport in human term placental mitochondria. *Biocham Mol Biol* Int, 35, 793–801.
- Girolomoni G, Santanionio ML, Pastore S, Bergstresser PR, Giannetti A & Cruz PD (1993) Epidemal Langerhans cell are resistant to the permeabilizing effects of extracellular ATP: in vitro evidence supporting a protective role of membrane A/Pase. J Invest Dermatol, 100, 282–287.
- Hanada K, Nishijima M, Akamatsu Y & Pagano RE (1995) loth splingolypids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-auchored protein, in mammalian membranes. *J Buil Chem*, 270, 6254–6260.
- Hashizume S, Rashid MA, Shoji M & Kuroda K (1984) Electrophoretic extraction-concentration of proteins from polyaerylamide gels under alkaline, neutral and aerdic conditions. *Electrophoretis*, 5, 30-34.
- Henke W, Lang M, Duhiel W, Holzhütter H-G & Gerber G (1989) Identification and characteristics of a novel nutochondrial 5'-nucleotidase in rat liver. *Biochem Int*, 18, 833-844.
- Knowles AF, Isler RE & Reece JF (1983) The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Bookim Biophys Lett*, 731, 88-96.

- Kornoszy ski M & Wojtczak A (1996) Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta*, 1310, 233–241.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Lunzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS & Candia OA (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analyt Biochem*, 100, 95–97.
- Law JH, Ribeiro JMC & Wells MA (1992) Biochemical insights derived from insect diversity. Ann Rev Biochem, 61, 87-111.
- LeBel D, Poirier GG, Phaneuf S, St-Jean P, Laliberte JF & Beaundoin AR (1980) Characterization and purification of calcium-sensitive ATPdiphospholydrolase from pig pancreas. J Biol Chem, 225, 1227-1233.
- Lienhard GE (1973) P', P'-Di(adenosine-5')pentaphusphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. J Biol Chem, 248, 1121-1123.
- Lowry OH, Roschrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. J Biol Chem, 193, 265-275.
- Marcus AJ & Safier LB (1993) Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in humeostasis and thrombosis. FASEB J, 7, 516–522.
- Martínez F, Chávez E & Echegoyen S (1987) Decreased exchange of adenine nucleotides in human placental mitochondria. Int J Biochem, 19, 275-279.
- Martinez F, Kiriakidou M & Strauss JF III (1997) Structural and functional changes in mitochondria associated with trophoblast differentiation: methods to isolate enriched preparations of syncytiotrophoblast mitochondria, Endocrinology, 138, 2172-2183.
- Martinez, F., Moncado, R., Bárcenas, FJ & Espinosa-García, MT (1992) Subcellular kocalization and properties of adeitosine diphosphatase in human placenta. *Placenta*, 13, 463–473.
- Martinez F, Espinosa-García MT, Flores-Herrera O & Pardo JP (1993) Respiratory control induced by ATP in human term placental mitochondria. *Placenta*, 14, 321–331.
- Martinez F, Meaney A, Espinosa-Garcia MT, Pardo JP, Uribe A & Flores-Herrera O (10%) Characterization of the F₁F₀-ATPase and the tightly-bound ATPase activities in submitochondrial particles from human term placenta. *Placenta*, 17, 345–350.
- Martínez F, Espinosa-García MT & Navarette J (1997) Cholesterol transport and pregnenolone synthesis in human placental mitochondria. *Placenta*, 18, A,38.
- Menezes OE, Oliveira BAM, Meirelles MN, Menezes MM, Dutra DR & Freitas SJJ (1997) Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarxolemmal membrane from rat heart. Mol Cell Binchem, 170, 115–123.

- Meyerhof O (1945) The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. J Biol Chem, 157, 105-119.
- Navarrete J, Flores-Herrera O, Uribe A & Martinez F (1999) Differences in cholesterol incorporation into mitochondria from hepatoma AS-30-D and human term placenta. *Placenta*, 20, 285–291.
- Olivera AA & Meigs RA (1975) Mitochondria from human term placenta. I. Isolation and assay conditions for oxidative phosphorylation. *Biachim Biaphys Acta*, 376, 426–435.
- Perlin DS, San Francisco MJD, Slayman CW & Rosen BP (1986) 11*/ATP stoichiometry of proton pumps from Neurospora crassa and Escherichia cali. Arch Biochem Biophys, 248, 53-61.
- Raatikninen MJP, Peuhkurinen KJ, Kiviluoma KT, Hiltunen JK & Hassinen IE (1992) 5'-nucleotidase activity and adenosine production in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1099, 238–246.
- Sabbatini GP, Smith PJ & Von Holt CA (1993) A 46 kDa NTPase common to rat liver nuclear envelope, mitochondria, plasma membrane, and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, 1153, 132–134.
- Saribas AS, Lusting KD, Zhang X & Weisman GA (1993) Extracellular ATP reversibility increases the plasma membrane permeability of transformed mouse fibroblast to large macromolecules. *Analyt Biochem*, 209, 45–52.
- Sarkis JJF & Salto C (1991) Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. Brain Res Bull, 26, 871–876.
- Segel III (1975) Euzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Euzyme Systems pp. 346–384. New York: John Wiley.
- Summer JB (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorous. Science, 100, 413-414.
- Tzagdoff A, McLennan DH & Byington KH (1968) Studies on the mitochondrial adenosine triphosphatase system. III. Isolation from the oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase complex of the factors which bind F₁ and determine oligomycin sensitivity of bound F₁. Biochemistry, 7, 1596–1602.
- Uribe A, Flores-Herrera O, Rendón JL, Espinosa-García MT & Martínez F (1999) Presence of two enzymes, different from the F11Fo-ATPase, hydrolyzing nucleotides in human term placental mitochondria. Int 7 Biochem Cell Biol, 31, 319–330.
- Ziganshin AU, Hoyle HW, Ziganshina LE & Burnstock G (1994) Effect of cycloplazonic acid on contractility and ecto-ATPase activity in guinea-pig urinary bladder and vas deferens. Br J Pharmacol, 113, 669-674.

APÉNDIC3 <u>B</u> (*ARTÍCULO D3 DIVUL64CIÓN*)

.

ISSN-0187/294X

BEB 98 BOLETÍN DE EDUCACIÓN BIOQUÍMICA

Órgano de información de la ASOCIACIÓN MEXICANA DE PROFESORES DE BIOQUÍMICA, A C

Publicación incluida por el Centro de Información Científica y Humanística de la Universidad Nacional Autónoma de México en la base de datos **PERIÓDICA** (Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias).

Vol. 17

ASPECTOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LAS 5'-NUCLEOTIDASAS

Oscar Flores-Herrera y Federico Martínez Montes. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-159, México 04510, D.F. México.

RESUMEN

La actividad de las 5'-nucleotidasas ha sido descrita en las bacterias, plantas y en diferentes tejidos de vertebrados. En esta revisión se discuten las propiedades cinéticas y la estructura general de estas enzimas. Su clasificación incluye su localización y el sustrato preferente. Así, las 5'-nucleotidasas que utilizan al AMP o IMP, de manera preferente, se denominan como c-N-I o c-N-II, respectivamente. Por otro lado, si la 5'-nucleotidasa está anclada a la membrana por medio de un puente de glucosil fosfatidil inositol, se denomina como e-N, y por lo general está orientada hacia el exterior celular como una ecto-nucleotidasa. Se sugiere que participan en diferentes procesos celulares, tales como: la recuperación posterior a la hipoxia, el aporte de metabolitos para la síntesis del ADN o del ácido úrico. Actualmente, la actividad de fosfotransferasa de algunas 5'-nucleotidasas ha adquirido gran interés farmacéutico en la activación de agentes antivirales o antioncogénicos.

PALABRAS CLAVE: 5'-nucleotidasa, ectoenzimas, AMP, IMP, ATP.

ABSTRACT

The 5'-nucleotidase activity has been described widely in bacteria, plants, and vertebrates tissues. In this review, the kinetic properties and the general structure of several 5'-nucleotidases are discussed. The classification of this enzymes has been related to its localization and the substrate-preferring. Thus, the 5'-nucleotidases that has a strong preferences for AMP or IMP are referred to as c-N-I and c-N-II respectively. On the other hand, if the 5'nucleotidases is anchored to the membrane through a glucosyl phosphatydil inositol are referred to as e-N, and usually is oriented outside cells as an ectonucleotidase. Its activity has been proposed to be involved in some cell functions, such as: the recovery of hypoxia, to bring out metabolites for DNA or uric acid synthesis. Recently, the phosphotransferase activity of some 5'-nucleotidases has been considered of a major pharmaceutical interest in the activation of antiviral and antioncogenic agents.

KEY WORDS: 5'-nucleotidase, ecto-enzyme, AMP, IMP, ATP.

INTRODUCCIÓN

Las 5'-nucleotidasas (E. C. 3.1.3.5) son enzimas que catalizan la liberación del fosfato esterificado en la posición 5' de la ribosa o desoxirribosa de los nucleósidos tri, dí o monofosfato, además, son capaces de actuar sobre compuestos como la UDPglucosa y el FAD (1). Su distribución en la escala evolutiva es amplia, ya que se ha reportado su actividad en bacterias (2 y 3), protozoarios (4), peces (5), plantas (6), aves (4) y mamíferos (7 a 11).

Las nucleotidasas pueden encontrarse en forma soluble en el citoplasma o asociadas a la membrana plasmática a través de un puente de glucosil fosfatidilinositol (7). La clasificación de estas enzimas toma en cuenta su localización subcelular y su especificidad por diferentes sustratos; en este sentido, se tiene que las formas solubles que hidrolizan preferentemente al AMP se denominan c-N-I (del inglés "citoplasmic nucleotidase type I"), mientras que aquellas que hidrolizan preferentemente al IMP se denominan c-N-II. Por otra parte, las nucleotidasas asociadas a la membrana se conocen como e-N (del inglés "ecto-nucleotidases"), independientemente del tipo de sustrato y fracción subcelular a la que estén asociadas (4).

Por otra parte, se conoce poco acerca de la función biológica que desempeñan estas enzimas; mientras que las 5'-nucleotidasas citosólicas participan en el control de los niveles de los 5'-nucleosidos monofosfato, aquellas asociadas a la mem-

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

brana plasmática contribuyen en la vía extracelular que hidroliza al ATP hasta la adenosina. La función fisiológica de estas enzimas probablemente depende del organismo y del tejido al que se asocian.

Debido a su alta inespecificidad de sustrato, su localización celular y a su amplia distribución a nivel filogenético, una de las principales cuestiones por esclarecer es si las 5'-nucleotidasas pertenecen a un tipo principal de enzima o si son diferentes formas enzimáticas con características cinéticas parcialmente compartidas. En este sentido, el análisis de la estructura primaria derivada del ADN complementario (ADNc) de bacterias y vertebrados, muestra evidencias de que al menos parte de las 5'-nucleotidasas conocidas, pueden ser agrupadas en una sola familia de proteínas relacionadas filogenéticamente.

En este trabajo se describen las características estructurales y cinéticas de las diferentes 5'nulceotidasas conocidas y su posible participación en el metabolismo celular.

ESTRUCTURA

A. Vertebrados

Actualmente se conoce la estructura primaria derivada del ADNc para las 5'-nucleotidasas asociadas a la membrana plasmática de la placenta humana (11), del hígado de rata (11) y del cerebro del pez elasmobranquio Discopyge ommata (5). En los tres casos la proteína madura es de 548 residuos de aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 61 kDa. Se ha reportado que las enzimas de placenta humana y de D. ommata tienen 4 sitios posibles de ser N-glicosilados, mientras que la enzima de rata contiene 5. El carboxilo terminal (C-terminal) contiene una sección de residuos de aminoácidos hidrofóbicos que son cortados y sustituidos por el anclaje del glucosil fosfatidilinositol (GPI), el cual se encuentra unido covalentemente al residuo de serina 523 (4). Por lo tanto, las 5'nucleotidasas pertenecen al grupo de proteínas que son anciadas a las membranas biológicas a través de un puente de GPI, tales como la fosfatasa alcalina, la acetilcolinesterasa y la aminopeptidasa, entre otras.

La composición molar del GPI para las 5'nucleotidasas de hígado de rata y de la placenta humana es: 2 etanolaminas, 3 manosas, 1 glucosamina y 1 inositol; los ácidos grasos incluyen a los ácidos esteárico, mirístico y al palmitico (2 moles en total). De las 2 etanolaminas, una de ellas posiblemente participa en la unión del GPI al grupo α carboxilo de la serina 523, la otra pudiera estar unida al residuo de manosa del glicano por medio de un enlace fosfodiéster (4 y 11).

Se ha sugerido la existencia de variaciones en el anclaje de la 5'-nucleotidasa a la membrana, debido a la baja actividad de las fosfolipasas C o D para liberar a las 5'-nucleotidasas y a su baja solubilización por diferentes detergentes; dichas variaciones pueden ser los cruces transmembranales, de manera similar a lo reportado para la acetilcolinesterasa (4). Sin embargo, como aún no se conoce con precisión la estructura tridimensional de estas enzimas, la existencia de algún cruce transmembranal es aún incierto.

La secuencia de las enzimas del higado de rata v de la placenta de los humanos muestran cerca del 90% de identidad, mientras que la 5'-nucleotidasa de D. ommata tiene un 61% de identidad con respecto a cualquiera de las nucleotidasas de mamífero (Tabla I). El perfil de hidropatía revela que la estructura de estas enzimas tiene un alto grado de conservación y no solamente en lo que respecta al dominio del amino terminal (N-terminal, correspondiente al péptido señal) o C-terminal (sitio de unión con el GPI), sino también con el resto de los dominios hidrofóbicos e hidrofilicos. Es importante mencionar que la identidad de los perfiles de hidropatia no siempre correlaciona con la identidad en la secuencia de resíduos de aminoácidos. En este sentido, hav siete dominios en la secuencia de aminoácidos, de los cuales cinco muestran un alto grado de conservación durante el proceso evolutivo: la identidad de estos dominios entre la enzima de rata y de humano es de entre el 90 y el 100%. mientras que para la comparación pez/rata oscila entre el 71 y el 100% (4).

En cuanto a la estructura secundaria, los estudios de espectroscopía infrarroja realizados con la nucleotidasa de *D. ommata*, revelan que la proteina contiene 49.2% de láminas β -plegada, 32.7% de α -hélice, 9.5% de giros β y 8.4% de estructura desordenada. Se predicen resultados similares para

	Relación de id	lentidad de difer	entes tipos de 5'-	nucleotidasas	
Fuente	Localización celular	Número de residuos de aminoácidos	% de identidad por grupo*	% de identidad con respecto a mamiferos	Cita
Placenta de humano	Membrana plasmática	548	90		11 .
Higado de rata	Membrana plasmática	548	90		11
Discopyge ommata	Membrana plasmática	577		60	5
E. coli	Citoplasma	525	60	22	3
Vibrio costicola	Memb. plas. cara externa	539	60	22	2
Vibrio para- haemolitico	Memb. plas. cara externa	539	60	22	4

TABLA I

* Los grupos son: mamíferos, peces y bacterias, respectivamente.

la ecto-nucleotidasa de la placenta humana y del higado de rata (4).

B. Bacterias

Se conoce la estructura primaria de la 5'-nucleotidasa de membrana de Vibrio costicola (2) y de Vibrio parahemolitico (4), las cuales muestran un 60% de identidad con una UDP-azúcar hidrolasa soluble de Escherichia coli (3), la cual es capaz de hidrolizar una amplia variedad de 5'-nucleótidos (Tabla I). Las 5'-nucleotidasas de bacterias, al igual que en los vertebrados, están formadas por 539 residuos de aminoácidos y se asocian a la membrana plasmática por medio de un puente de GPI.

La comparación de la estructura primaria deducida del ADNc para las 5'-nucleotidasas de vertebrados y de bacterias, revela la presencia de regiones altamente conservadas, lo que sugiere la existencia de un ancestro común. Más aún, estas secuencias se observan en una enzima de *E. coli* (cpdB) (4) que hidroliza tanto a los 3'-nucleótidos como a los 2',3'-fosfodiésteres cíclicos; esto sugiere que dichas secuencias tienen un significado funcional relevante y que posiblemente incluyen una o más regiones para la fijación del sustrato. Por otra parte, el patrón de hidropatía para la 5'-nucleotidasa de bacterias y de vertebrados muestra una gran similitud, lo que hace pensar en una homología en la estructura de estas enzimas.

PROPIEDADES CINÉTICAS Y FISIOLÓGICAS A. Vertebrados

a. Forma e-N: Las 5'-nucleotidasas del tipo e-N de mamíferos tienen un pH óptimo para su actividad de entre 7 a 8 y actúan sobre los nucleótidos 5'-monofosfato (Tabla II). Su actividad es estereoselectiva, ya que el L-enantiómero del AMP no es hidrolizado. Con base en la relación Vmax/Km, el mejor sustrato para la enzima es el AMP, cuya afinidad se encuentra en el intervalo micromolar. La baja especificidad de estas enzimas se demuestra por la actividad hidrolítica sobre el FAD, la cual se ha determinado en la 5'-nucleotidasa de membrana plasmática de la placenta humana, así como la hidrólisis de la UDP-glucosa por parte de la 5'-nucleotidasa del órgano eléctrico de D. ommata (5).

Por otra parte, el ADP, el ATP y la adenosina 5'- $[\alpha,\beta$ -metilen] difosfato actúan como inhibidores competitivos, mientras que la concanavalina A se comporta como un inhibidor de tipo no-competiti-

TABLA II Propiedades de cuatro tipos de 5'-nucleolidasas del tipo e-N Metal Inhibidor Fuente PM aparente Localización Cita nН Km Vmax celular óptimo obinsu par Zn2. 7.5 ATP. 5 Pez nativo 120 a Membrana IMP = 10 a 50 µM 31 umotas/min/mg ADP elasmo-160 kDa niasmática AMP = 1 a 50 µM branquio Subunidad 60 ConA* a 80 kDa 7 nativo 270 Membrana 74 IMP = 7 mM87.5 umolas/min/mg --Placenta de kDa plasmática humano subunbidad 73 kDa Hígado de 7 2 7 5 AMP = 85 a 100 µM Mo^{2*} 9 y Memb inter 33 nmolas/min/mg _ rata mitocondrial IMP = 480 LM 45 nmotas/min/mg 10 cara externa

* concanavalina A

vo (Fig 1). También se sabe que el fosfato inorgánico (Pi) no tiene ningún efecto sobre la actividad o afinidad de la enzima.

La actividad de estas enzimas no dependen de la presencia de cationes, aunque la adición de Mg²⁺



Figura 1. Características cinéticas generales de las 5-nucleotidasas del tipo c-N-I, c-N-II y e-N. La figura muestra las principales diferencias en cuanto a la afinidad por el AMP, el IMP o los nucleósidos trifosfato, y el efecto de los diversos moduladores como el ATP, el ADP o el Pi sobre la actividad catalitica. La forma c-N-I es activada por ADP, mientras que la forma c-N-II se activa por el ATP y se inhibe por el Pi. La forma e-N es inhibida por el ATP y no muestra estimulación por otras moléculas.

estimula su catálisis. Asimismo, se ha determinado que la 5'-nucleotidasa de la molleja de pollo contiene unido fuertemente y de manera natural al Zn²⁺ en una relación molar zinc/proteína de 2 (4). En este sentido, se ha sugerido que los residuos de las Cys 324, 329, 358 y la His 354 de la enzima de la raya eléctrica, podrían funcionar como sitios de unión para el zinc (5).

La estructura funcional de las 5'-nucleotidasas es la de un dímero $\alpha\alpha$ unido por medio de puentes disulfuro intercatenarios, los cuales son esenciales para mantener la actividad (1). Sin embargo, se desconoce el número de grupos tioles que participan en la formación del dímero (4). La modificación química específica de diversos residuos de aminoácidos sugiere que las 5'-nucleotidasas pertenecen al grupo de las histidín-fosfatasas, donde se incluye además a la glucosa-6 fosfatasa y a la fosfatasa alcalina (1).

En relación a su papel fisiológico, la forma e-N se ha relacionado principalmente con la hidrólisis extracelular del 5'-AMP hasta la adenosina. Sin embargo, aún se tiene que relacionar la actividad de esta enzima y de la fosfatasa alcalina que también se encuentra asociada a la membrana por un puente de GPI y orientada hacia el exterior celular. De tal suerte, es necesaria la determinación exacta de la distribución y actividad catalítica de ambas enzimas, para definir sus papeles en la hidrólisis de los nucleótidos extracelulares.

En este sentido, es importante mencionar que la actividad hidrolítica del ATP o ADP asociada a la

membrana plasmática de diversos tejidos, muestra un comportamiento cinético diferente a lo reportado para las ATPasas intracelulares conocidas (4). Dicha actividad tiene, entre otras características, una velocidad similar a la presentada por las 5'-nucleotidasas; lo que sugiere que estas enzimas podrían ser el paso final en la vía de hidrólisis extracelular de los trinucleótidos hasta nucleósidos.

La repercusión de la hidrólisis de los trinucleótidos, en especial del ATP hasta los nucleósidos, está aún en estudio. Debido a que tanto el ATP como la adenosina extracelulares actúan sobre los receptores purinérgicos (P_2) (4), las 5'-nucleotidasas participan en dos procesos metabólicos relacionados: la inactivación del ATP y la formación de adenosina. La inactivación del ATP representa el paso en su control como mediador intercelular, mientras que la adenosina induce una variedad de funciones que incluyen la vasodilatación y la disminución de la filtración glomerular, entre otras.

No obstante, la fuente de ATP extracelular y otros nucleótidos está aún en discusión. Existen sistemas celulares tales como las neuronas colinérgicas y adrenérgicas o las plaquetas, que compartamentalizan al ATP en vesículas de secreción. El ATP (o ADP) de estas vesículas puede ser liberado por exocitosis controlada y entonces desencadenar la cascada de producción extracelular de adenosina (4). Sin embargo, como no se ha descrito ningún mecanismo de liberación de los nucleótidos para otros sistemas celulares, la amplia distribución de las 5'-nucleotidasas del tipo e-N, es aún enigmática.

b. Forma e-N asociada a la mitocondria: Recientemente se ha reportado la existencia de una 5'-nucleotidasa asociada a la fracción mitocondrial del hígado de rata (9 y 10). Esta enzima está asociada a la membrana interna y su orientación es hacia el espacio intermembranal, hidroliza preferentemente al AMP con una Km de entre 85 y 100 μ M y una Vmax de 35 nmolas /mg /minuto, mientras que la hidrólisis de IMP muestra una Km de 480 μ M y una Vmax de 45 nmolas /mg /minuto (Tabla II). El pH óptimo para la actividad de esta enzima es de 7 a 7.5 y requiere de Mg²⁺ para su catálisis. Se ha sugerido que su principal contribución en el metabolismo hepático, es la producción de adenosina durante la recuperación posterior a la hipoxia que promueve el aporte de oxígeno al tejido.

c. Formas citosólicas: El estudio de las formas c-N-I y c-N-II indica que son altamente especificas para los nucleótidos monofosfato así como de su contraparte desoxiribonucleótidos, por lo que se sugiere que podrían intervenir en el control de los niveles de AMP o IMP intracelulares y participar en el control energético celular. Sin embargo, una diferencia importante entre estas formas solubles es su localización: mientras que la forma c-N-II tienen una amplia distribución en diferentes tejidos, la forma c-N-I sólo ha sido descrita en el tejido cardíaco de vertebrados.

La forma c-N-II tienen como sustrato preferente al IMP (Tabla III) y la cinética de hidrólisis para este sustrato es hiperbólica, mientras que para el AMP tiende a ser sigmoidal (Fig 1). La Km para el IMP y el AMP están en el intervalo de 0.1 a 0.6 mM y 1 a 15 mM, respectivamente. Sin embargo, la presencia del ATP o del ADP, en concentraciones milimolares, incrementa la Vmax y la afinidad por el AMP. El 2,3-difosfato glicerato (12 y 13) y los polifosfatos de adenosina, tales como el Ap₃A, Ap₄A y Ap₅A son estimuladores potentes de la actividad catalítica (13) (Fig 1).

El pH óptimo para la actividad de esta enzima es de 6.5 y se considera como un criterio para diferenciarla de la forma e-N. Su peso molecular, derivado de estudios de cromatografia, se encuentra entre los 200 y 265 kDa, mientras que el peso molecular para las subunidades es de 42 kDa para el crustáceo Artemia y de 52 a 70 kDa para vertebrados; de donde se sugiere que su estructura funcional es un homo-oligómero, probablemente un tetrámero.

La otra forma soluble, c-N-I, tiene como principal sustrato al AMP (Tabla II). Las características de esta enzima son similares a las descritas para la forma c-N-II, excepto que ésta sólo se estimula por el ADP y no por el ATP o los polifosfatos de adenosina (Fig 2), por lo que se ha propuesto que ambas formas contienen sitios de unión para el ATP y/o el ADP, además del sitio propio para el sustrato.

			100000	<u> </u>				
		Prop	iedades du cuatro tipos de 51-nucl	eolidasas citosólicas de vene	brados			
Fuente	PM aparente	pH Sptime	Km	Vmax	Metal requerido	Inhib Idor	Activador	Cila
c-N-I Tejido cardíaco	nativo 150 kDa subunidad 40 kDa	6.5	AMP = 2 a 8 mM			Pi	ADP	13
c-N-II Placenta de humano	nativa 90 kDa subunidad 44 a 45 kDa	6 a 6.5	GMP, 1MP, UMP = 8 a 17 mM dAMP, dGMP, dIMP = 2 a 7 mM 2'dUMP, 3'dIMP = 0.3 mM	13 a 37 µmolas/min/mg 14 a 294 µmolas/min/mg 61 a 127 µmolas/min/mg	Mg ^{2*} , Mn ^{2*} , Co ^{2*} , Cu ^{2*} , Ca ^{2*}	-	-	8
c-N-II Eritrocito de humano	Nativs 250 kDa subunidad 60 kDa	6,3 a 6.5	IMP = 0.4 mM GMP = 0.8 mM 132 μmolas/min/mg		Mg ²⁺	Pi	ATP dATP GTP 2,3 DPG*	12
			+ 2, 3 DPG* IMP = 0 04 mM GMP = 0.08 mM	468 μmolas/min/mg 557 μmolas/min/mg	-			
c-N-II Higado de polio	nativa 200 kDa subunidad 52 kDa	6.5	IMP, GMP = 1.4 a 2.3 mM UMP, CMP = 50 a 100 mM AMP = 23 mM	3 mM IMP, GMP = 18-19 μmclas/min/mg UMP, CMP =		Pi	ATP	13
			+ ATP IMP, GMP = 0.1 ± 0.14 mM UMP, CMP = 2,5 ± 4,5 mM AMP = 6.3 mM					

TABLA III

· 2,3, difosfo glicerato.

El peso molecular de la forma c-N-I es de 150 kDa aproximadamente, mientras que las subunidades presentan un peso de 40 kDa, lo que sugiere que la enzima puede existir como la asociación de monómeros idénticos que forman un tetrámero.

Por otra parte, para determinar los factores que influyen en la selectividad de las 5'-nucleotidasas c-N-I y c-N-II, se ha estudiado la fijación e hidrólisis de diferentes análogos de sustrato (14), en los cuales se ha realizado alguna modificacion en la región de la base, de la ribosa o del fosfato (Fig 2).

Los resultados indican que la modificación en la región del fosfato no permite la hidrólisis del análogo (Fig 2, a y b); lo que indica que la interacción carga-carga entre la enzima y el sustrato es indispensable. Aunado a esto, la sustitución 5'-fosfodiester (Fig 2, c y d) es región-selectiva; en estas condiciones existe poca hidrólisis de dicho análogo. Las modificaciones en la región del azúcar producen análogos que se asocian a la enzima pero son poco hidrolizables (Fig 2, e), lo que sugiere que el grupo 2'-OH no es estereoselectivo para la fijación de la molécula pero es escencial para la catálisis. La sustitución de un hidrógeno por un grupo -CH (Fig 2, f) en la base nitrogenada no inhibe sustancialmente la fijación o hidrólisis del análogo, lo que sugiere que ninguna de las enzimas fija al sustrato por medio de un puente de hidrógeno del N-7.

Por otra parte, las sustituciones en el N-1 de la base, tampoco evitan la fijación y catálisis del análogo por parte de la forma c-N-I (Fig 2 g y h). Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos para la isoenzima c-N-II, para la cual la interacción con el N-1 la hace selectiva por el 5'-GTP y el 5'-AMP.

De lo anterior se puede concluir que para la fijación y la catálisis del sustrato es indispensable la integridad de la región del fosfato y de la ribosa, mientras que para el reconocimiento es indispensable el N-1 de la base nitrogenada.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de las formas e-N, c-N-I y c-N-II indican que no hay homología entre las enzimas solubles y la asociada a la membrana. Por otra parte, se ha asociado a las formas solubles a la degradación intracelular del ATP hasta adenosina y del IMP, inosina. Su actividad tiene importancia particular en situaciones de anoxia o isquemia, ya que la liberación de adenosina induce la vasodilatación y la oxigenación de los tejidos. El impacto metabólico de la activi-



Figura 2. Estructura de algunos análogos del AMP utilizados para el estudio del sitio activo de las 5'-nucleotidasas eitoplásmicas. a) Adenosina 5'-monofosforotioato (5'-AMPS); b) Adenosina 5'-monofosforomorfolibdato (5'-AMP-morfolibdato); e) Adenosina 2'-monofosfato (2'-AMP); d) Adenosina 3'-monofosfato (3'-AMP); e) 2'-desoxiadenosina 5'-monofosfato (2'desoxi-5'-AMP); f) 7-diazo-adenosina 5'-monofosfato (1-NO-5'-S'-AMP); g) Adenosina-N'-oxido 5'-monofosfato (1-NO-5'-AMP); h) 1,N⁴-eteno-adenosina 5'-monofosfato (1,N⁴-eteno-5'-AMP) (adaptado de la referencia 14).

dad de estas enzimas varía dependiendo del tejido y del organismo del que se trate. Por ejemplo, en animales urotélicos como el pollo, la desfosforilación citosólica del IMP es el inicio de la vía para la formación del ácido úrico (4), mientras que en el tejido cardíaco, la producción de adenina está relacionada con la vasodilatación y la oxigenación posterior a la recuperación del infarto o de la hipoxia (4).

En mamíferos, la actividad de estas 5'-nucleotidasas ha sido relacionada con el aporte de metabolitos para la sintesis del ADN (13), así como en la transferencia de grupos fosfato entre un nucleótido monofosfato y un nucleósido (1) y su repercusión en la activación de agentes antivirales (4) o en el desarrollo de sustancias anticancerígenas (15). Actualmente, no existe un esquema general del papel de estas dos nucleotidasas intracelulares en la producción de nucleósidos en los diferentes estados energéticos de la célula. En este sentido, se requiere una cuantificación precisa de la concentración de todos los factores que afectan la actividad de estas enzimas. Dentro de tales factores se incluyen no solo al ATP, al ADP, al AMP, al IMP o al Pi, sino también a la adenosina, la inosina, al 2,3-difosfoglicerato, a los polifosfatos de adenina y al pH, entre otros, y aunque el papel de las 5'-nucleotidasas citoplásmicas se desconoce, su deficiencia congénita está asociada a la muerte causada por enfermedades tales como la anemia hemolítica.

B. Bacterias

Las bacterias presentan tanto la forma asociada a la membrana como las solubles, codificadas por genes diferentes pero homólogos. La forma e-N se ha reportado para las bacterias marinas halófitas del género Vibrio y Photobacterium (2). Actualmente se desconoce el tipo de anclaje que tiene, pero en la enzima madura el N-terminal se encuentra bloqueado, al parecer por la unión de una cadena acilo (4). El peso molecular por subunidad es de 70 kDa, además de que muestran un reconocimiento inmunológico cruzado entre varias cepas de bacterias marinas (1).

Las 5'-nucleotidasas de membrana de Vibrio y Photobacterium pueden hidrolizar 5'-nucleótidos tri-, di- y monofosfato a un pH óptimo de 8 (Tabla IV), mientras que los 3'-nucleótidos no son hidrolizados. Estas enzimas requieren Mg^{2*} para su actividad, el cual puede ser reemplazado por Mn^{2*} y Co^{2*} , mientras que el Zn^{2*} actúa como inhibidor, es decir, de manera diferente a como lo hace en la e-N de vertebrados.

Por otra parte, *Bacillus subtilis* presenta dos 5'-nucleotidasas citoplásmicas, las cuales son activadas por Mg²⁺ e inhibidas por Zn²⁺, Cu²⁺ y Fe²⁺. Tienen un pH óptimo de 7.5 y su actividad incluye la hidrólisis de los 5'-nuleótidos monofosfato tanto de purina como de pirimidina; no obstante, son incapaces de hidrolizar a la UDP-glucosa.

En general, las 5'-nucleotidasas de bacterias son multifuncionales, y en conjunto con la enzima azú-

		Propiedade	s de <u>och</u> c	dilerentes tipos de 5	-nucleotidas	as de bacter	ias y plantas		
Fuente	PM aparente	Localización cetutar	pH óptimo	Sestrato	Km	Vmax	Metal requerido	Inhibidor	Cita
Vibrio parahaem.	subunidad 72 kDa	Membrana plasmática, cara externa	8.0	ATP ADP AMP		3.39 3.46 1.3 a <u>3</u> .3	Mg ^{2*} , Mn ^{2*} , Co ^{2*} , Cl [*] , Br <u>l' NO3</u>	Zn ^{2*} , Ni ^{3*}	4
Vibrio costicola	subunidad 70 kDa	Membrana plasmática, cara externa	8.0	ATP, UTP, GTP ADP, UDP, GDP AMP, GMP, UMP		1.2 a 2.4 0.7 a 2.7 0.5 a 2.2	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺		4
Bacillus subtilis	nativa 137 kOa subunidad 52 kDa	Periplásmica	6.0	ATP, ADP, AMP UDP-D-glucosa UDP-D-galactosa	1-30 μM		Mg ^{2*} , Mn ^{2*}		2
	subunidad 23 kDa	Citoplásmica	7.5	Nucleósidos monofosfato de purina y pirimidina	0,25 mM para el AMP		Mg ²⁺]
Colledones cacahuate	subunidad 54 kDa	Membrana del Ap. de Golgi	5.0 a 5.5	AMP	0.9 mM	0.4	-	ADP, Ki=3.4 mM ³ NaF, Ki=41 mM ⁶	6
Cotiledones cacahuate germinado	subunidad 55 kDa	Membrana plasmática	5.0 a 6.0	AMP	1.08 mM	8.5	-	ADP, Ki≂2.4 mM ^e NaF, K⊨35 mM ^e	6
Microsomas de Zea mays	nativa 49 kDa subunidad 24.5 kDa	Membrana de microsomas	6.8	AMP GMP CMP UMP IMP_	57.7 μM 57 μM 333 μM 200 μM 82 μM	200 232 92 142 198	-	AMPc, Ki=5.2 μM ^b Adenosina, Ki≤57 μM ^c	17
Gérmen de trigo	subunidad 57 kDa	sotuble	7.0	AMP	3.5 µM	0.45	Mg ²⁺		16
	subunidad 110 kDa	soluble	7.0	AMP	12.8 µM	0.23	Mg ²⁺	-	

TABLA IV

a) en µmolas/min/mg; b) Inhibición del tipo competitiva; c) Inhibición del tipo no competitiva.

car-1-fosfatasa (EC 3.1.3.23), las nucleotidasas periplásmicas proveen un sistema completo para la

hidrólisis de un UDP-azúcar extracelular hasta un nucleósido y un azúcar no fosforilado:

1) UDP-Glucosa + $H_2O \rightarrow$ uridina + Pi + α -D-glucosa-1-P 5'-nucleotidasa 2) α -D-glucosa-1-P + $H_2O \rightarrow \alpha$ -D-glucosa + Pi Glucosa-1-fosfatasa

Después, la glucosa puede ser transportada fácilmente al interior celular. Por lo que la 5'nucleotidasa de *Bacillus subtilis* probablemente participa en el sistema que provee de carbono a la célula (1).

La forma e-N de los géneros Vibrio y Photobacterium no hidroliza a los azúcaresnucleósidos difosfato, pero si cataliza la hidrólisis total de los nucleótidos trifosfatados hasta la adenosina. En este sentido, las 5'-nucleotidasas de las bacterias marinas o dulceacuícolas son consideradas como contribuyentes importantes en la regeneración del fosfato a partir de compuestos orgánicos fosfatados disueltos en el agua (1), por lo que se sugiere que las 5'-nucleotidasas de la membrana plasmática de las bacterias podrían tener una función ecológica en el reciclaje de nutrientes en los hábitats acuáticos.

C. Plantas

Después de demostrar la existencia de las 5'nucleotidasas en Solanum tuberosum, la caracterización bioquímica y molecular de estas enzimas ha adquirido gran atención. Se han descrito tanto la forma e-N como las solubles. La forma e-N ha sido estudiada en cotiledones de cacahuate (6); tiene un peso molecular para las subunidades de 54 a 55 kDa (Tabla IV). Es una glicoproteína que contiene aproximadamente un 40 % de su peso en forma de carbohidratos, su actividad tiene un pH óptimo entre 5 a 6, es específica para el AMP y no es dependiente de iones. Hasta el momento no existe información acerca del tipo de anclaje que hay para la forma e-N.

Las propiedades funcionales de las 5'-nucleotidasas de plantas superiores varían dependiendo de la especie y del tejido del cual son extraídas. Estas enzimas difieren de las reportadas para otras fuentes en que se inhiben competitivamente por nucleótidos cíclicos (16 y 17), además de que son inhibidas de una manera no-competitiva por los nucleótidos tri- y difosfato. Sin embargo, existen reportes que indican una baja hidrólisis del 3'-AMP, ADP y ATP (4).

Por otra parte, es necesario realizar más estudios para determinar si las 5'-nucleotidasas de plantas, de manera similar a lo que ocurre en animales, pueden ser clasificadas en distintos grupos.

Por último, se ha sugerido que las formas intracelulares pueden participar en las vías catabólicas del metabolismo de la citosina (4) y en la regulación de la poza de nucleótidos (17).

CONCLUSIONES

La distribución amplia de las diferentes formas de las 5'-nucleotidasas en la escala evolutiva, sugiere un papel fundamental de estas enzimas en el metabolismo de los nucleótidos. Las propiedades cinéticas y de regulación de las 5'-nucleotidasas hacen pensar que su probable papel es la formación de nucleósidos, los cuales tienen una gran repercusión en fenómenos biológicos como la recuperación posterior a la hipoxia, la estimulación de receptores purinérgicos del tipo P_2 , o bien el aporte de metabolitos para la síntesis del ADN. Asimismo, su actividad de fosfotransferasas en mamíferos ha sido asociada en la activación de agentes antivirales o anticancerígenos, cuyo potencial farmacológico actualmente ha adquirido gran importancia.

El desarrollo de un inhibidor específico para las 5'-nucleotidasas o el establecimiento de una linea

celular deficiente en la actividad de alguna de ellas, podría ayudar al esclarecimiento del papel funcional de estas enzimas en los diferentes procesos fisiológicos en los que participan.

Por otra parte, la clasificación actual de las 5'nucleotidasas no incluye a la forma asociada a la membrana interna mitocondrial del hígado de rata. Su localización y la falta del conocimiento de su estructura primaria ha impedido su clasificación dentro del amplio grupo de estas enzimas. Por lo que, la relación y la importancia funcional que existe entre las 5'-nucleotidasas se resolverá cuando se obtengan y se comparen sus estructuras primarias, lo que contribuirá no sólo al entendimiento de la especificidad de estas enzimas, sino también a dilucidar sus posibles relaciones filogenéticas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la M. en C. Aída Uribe Medina por la revisión y discusión del presente artículo. Este trabajo fue parcialmente apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México con el número de proyecto IN200194 e IN202194; y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México con el número de proyecto 26096M. Oscar Flores Herrera es becario de la DGAPA de la UNAM para estudios de doctorado.

REFERENCIAS

- Worku Y, Luzio J P y Newby A C (1984) Identification of histidyl and cysteinyl residues essential for catalysis by 5'-nucleotidase, FEBS Lett, 167(2): 235-240.
- Bengis-Garber C y Kushmer D J (1981) Purification and properties of 5'-nucleotidase from the membrane of Vibrio costicola, a moderately halophilic bacterium, J Bacteriol 146(1): 24-32.
- Burns D M y Beacham I R (1986) Identification and sequence analysis of a silent gene (ush AO) in Salmonella typhimurium, J Mol Biol 192(2): 163-175.
- Zimmerman H (1992) 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects, Bioch J 285: 345-365.
- Volknandt W, Vogel M, Peusner J, Misumi Y, Ikehara Y y Zimmerman H (1991) Svp25, a synaptic vesicle membrane glycoprotein from Torpedo electric organ that binds calcium and forms a homo-oligomeric complex, Eur J Biochem 202: 855-861.

- Mittal R, Das J y Sharma C B (1988) Purification and characterization of 5'- nucleotidase from the Golgi apparatus of peanut cotyledons, Plant Sci 55:93-101.
- Thompson L F, Ruedi J M y Low M G (1987) Purification of 5'-nucleotidase from human placenta after release from plasma membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C, Biochim Biophys Res Com 145(1): 118-125.
- Höglund L y Reichard P (1990) Cytoplasmic 5'(3')nucleotidase from human placenta, J Biol Chem 265 (12): 6589-6595.
- Dubiel W, Henke W, Miura Y, Holzhütter H-G y Gerber G (1987) Identification and characteristics of a novel mitochondrial ATPase in rat liver, Bioch Int 15(1): 45-54.
- Raatikainen M J P, Peuhkurinen K J, Kiviluoma K T, Hiltunen J K y Hassinen I E (1992) 5'-nucleotidase activity and adenosine production in rat liver mitochondria, Bioch Biophys Acta 1099: 238-246.
- Misumi Y, Ogata S, Ohkubo K, Hirose S y Ikehara Y (1990a) Primary structure oh human placental 5'nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form, Eur J Biochem 191: 563-569.

- Bontemps F, Vincent M F, van der Berg F, van Waeg G y van den Berghe G (1989) Stimulation by glycerate 2,3-biphosphate: a common property of cytosolic IMP-GMP 5'-nucleotidase in rat and human tissues, Biochim Biophys Acta 997: 131-134.
- Itoh R y Yamada K (1990) Pig lung 5'-nucleotidase: effect of diadenosine 5',5'''-P1, P4-tetraphosphate and its related compounds, Int J Biochem 22: 231-238.
- Skladanowski A C, Hoffmann C, Krass J, Jastorff B y Makarewicz W (1996) Structure-activity relationship of cytoplasmic 5'-nucleotidase substrate sites,

Biochem J 314: 1001-1007.

- De Flora A, Zocchi E, Guida L, Polvani C y Benatti U (1998) Conversion of the encapsulated 5-fluoro-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate to the antineoplastic drug 5-fluoro-2'-deoxyuridine in human erytrocytes, Proc Natl Acad Sci USA 85: 3145-3149.
- Polya G M (1974) Regulation of a plant 5'(3')ribonucleotidase phosphohydrolase by cyclic nucleotides and pyrimidine, purine and cytokinin ribosides, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 1299-1303.
- Carter S G y Tipton C L (1986) Purification and characterization of a 5'-nucleotidase from Zea mays microsomes, Phytochemistry 25(1): 33-37.

APÉNDIC3 <u>C</u> (*3L R36R4FICO D3 COMP3T3NCI4*)

.

APÉNDICE C

El regráfico de competencia

Unado una preparación enzimática cataliza dos reacciones diferentes, es importante conocer si ambas reacciones las realiza la misma enzima o bien, se trata de diferentes enzimas (Figura 1).

Para desarrollar el regráfico de competencia para una preparación enzimática que cataliza dos reacciones distintas, se define a uno de los sustratos como A (ATP en este caso), y al otro como B (ADP en este caso). Se selecciona una concentración a_0 del sustrato A, que produzca una velocidad v_0 que sea fácil de determinar. De manera similar, se selecciona una concentración b_0 para el sustrato B la cual produzca una velocidad v_0 .

Posteriormente se prepara una serie de mezclas de ambos sustratos a las siguientes concentraciones: $a = (1-p)a_0$ y $b = pb_0$, y se realiza el regráfico de la actividad enzimática con respecto a p. Si el regráfico muestra una independencia de la velocidad enzimática con respecto a p, sugiere que ambas reacciones ocurren en la misma enzima (Figura 2). Si las dos reacciones no siguen el modelo cinético de Michaelis-Menten, pero se conoce el número de Hill para ambas, ha y hb respectivamente, la definición de las concentraciones para ambos sustratos en la mezcla debe de corregirse a $a = a_0(1-p)^{1/hA}$ y $b = b_0p^{1/hB}$.

Si ambas reacciones se comportan como el modelo de Michaelis-Menten, y el sustrato A se transforma en P y el sustrato B en Q, las velocidades v_A y v_B para la catálisis de A y B respectivamente, pueden ser expresadas en términos de la concentración de *a* y *b* de la siguiente manera:

$$v_{\mathsf{A}} = (V_{\mathsf{A}}a) / (K_{\mathsf{m}}A + a) \tag{1}$$

 $v_{\rm B} = (V_{\rm B}b) / (K_{\rm mB} + b)$ (2)

80

donde V_A y V_B son las velocidades máximas, K_{mA} y K_{mB} son las constantes de Michaelis-Menten.

En el caso más simple, las reacciones de competencia siguen el comportamiento algebraico de las ecuaciones de la inhibición competitiva, con la constante de inhibición sustituida por la constante de Michaelis del sustrato que compite:

$$v_{A} = \frac{V_{A}a}{[K_{mA}(1+b/K_{mB}) + a]}$$

$$v_{B} = \frac{V_{B}b}{[K_{mB}(1+a/K_{mA}) + b]}$$
(3)

Si en el ensayo enzimático no se distingue entre las dos reacciones, la velocidad total, v_{tot}, es la suma de las dos velocidades independientes:

$$v_{tot} = v_A + v_B = \frac{V_A a}{K_{mA}(1+b/K_{mB})+a} + \frac{V_B b}{K_{mB}(1+a/K_{mA})+b}$$
$$v_{tot} = \frac{V_A a/K_{mA} + V_B b/K_{mB}}{1+a/K_{mA}+b/K_{mB}}$$
(5)

Posteriormente se toma una concentración a_0 cuya v_A se define como v_0 en ausencia del sustrato B cuando $a = a_0$; asimismo se define una concentración b_0 que produce el mismo valor de v_0 en ausencia del sustrato A cuando $b = b_0$:

$$v_0 = \frac{V_A a_0}{K_{mA} + a_0} = \frac{V_B b_0}{K_{mB} + b_0}$$
 (6)

cuando p = 0...1, los valores de a y b varian según:

$$a = (1-p)a_0$$

$$b = pb_0 \tag{7}$$

entonces la velocidad total, vta, con respecto a p es igual a:

$$v_{tot} = \frac{V_A(1-p)a_0/K_{mA} + V_B p b_0/K_{mB}}{1 + (1-p)a_0/K_{mA} + p b_0/K_{mB}}$$

si se sustituye $V_{A}a_0/K_{mA}$ por $v_0(1+a_0/K_{mA})$ y de manera similar V_Bb_0/K_{mB} :

$$v_{tot} = \frac{V_{A}(1-p)a_{0}/K_{mA} + V_{B}pb_{0}/K_{mB}}{(1-p)(1+a_{0}/K_{mA}) + p(1+b_{0}/K_{mB})}$$

$$v_{tot} = \frac{v_{0}[(1-p)(1+a_{0}/K_{mA}) + p(1+b_{0}/K_{mB})]}{(1-p)(1+a_{0}/K_{mA}) + p(1+b_{0}/K_{mB})}$$

$$v_{tot} = v_{0}$$
(8)

Si los dos sustratos son catalizados por la misma enzima, la velocidad total, $v_{t\alpha}$, es constante e independiente a la proporción de los dos sustratos en la mezcla.



Figura 1. Los tipos principales del regráfico de competencia. La velocidad total, v_{tot} , es determinada en una medio cuya mezcla de los dos sustratos es definida por las concentraciones $(1-p)a_0 y pb_0$, donde las concentraciones $a_0 y b_0$ producen aproximadamente la misma velocidad, v_0 , cuando solo uno de los sustratos está presente. Si las reacciones se catalizan por la misma enzima, v_{tot} es independiente de p; si las reacciones son realizadas por enzimas independientes, el regráfico muestra una curva con un máximo; si cada sustrato es más efectivo como inhibidor de la catálisis del otro, el regráfico muestra una curva con un mínimo.



Figura 2. Esquema de los tipos de reacciones que pueden ocurrir en la misma preparación enzimática. (A) Modelo 1, reacciones que cataliza la misma enzima; (B) Modelo 2, reacciones independientes; (C) Modelo 3, dos reacciones, pero cada sustrato puede inhibir la catálisis del otro.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Federico Martínez Montes por el apoyo y la dirección de mi trabajo experimental y de redacción de la tesis. Además de mostrarme gran confianza en todas las decisiones experimentales que hc tomado -aunque no todas tuvieron un final feliz-.

A los miembros del Comité Tutoral: Dr. Edmundo Chávez Cosío, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y Dr. Federico Martínez Montes, por los comentarios y las críticas constructivas que me hicieron durante el desarrollo de mi trabajo experimental.

A los miembros del Jurado: Dr. Armando Gómez Puyou, Dr. Edmundo Chávez Cosío, Dr. Alfonso Cárabez Trejo, Dr. Guillermo Mendoza Hernández, Dr. Luis Felipe Montaño Estrada, Dr. Juan Luis Rendón Gómez y Dr. Federico Martínez Montes, por la revisión crítica del trabajo escrito de tesis, lo que me permitió elaborar la versión final del mismo.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (D.G.A.P.A.) por el apoyo que otorga a los estudiantes del posgrado de la U.N.A.M.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por los donativos IN 200194, IN 202496 y IN200897 de la D.G.A.P.A. y 26096M del CONACyT.

Quiero extender este agradecimiento a todos los miembros de mi Familia, en especial a Vi y a Sebastián. Gracias a todos.