

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Prof. Dr. FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

INCORPORACION DE ACIDO MEVALONICO (MVA-1-¹⁴C y MVA-2-¹⁴C)
POR PLANTAS DE *PINUS PINASTER* (*)

por

E. GARCIA-PEREGRIN (**)

Ars. Pharm. XI, 15 (1970)

La secuencia de reacciones que conduce a la biosíntesis del isopreno activo constituye una de las vías metabólicas de mayor pluralidad de destinos conocida actualmente en Bioquímica. En efecto, las reacciones que conducen desde el acetato al isopreno integran un cauce único a partir del cual, por ulterior polimerización, se originan los más diversos compuestos dotados, lógicamente, de las más dispares funciones fisiológicas. Es innecesario destacar, por tanto, la importancia de la diversificación que tiene lugar a partir del tronco común que conduce al isopentenilpirofosfato. Los poliprenos y las formas de ciclación resultantes forman uno de los grupos más amplios de la Bioquímica estructural, no sólo atendiendo al número de unidades idénticas que se polimerizan sino también a la distinta calidad de las mismas. Leves cambios en la estructura del isopreno activo producen monómeros análogos pero distintos cuya unión y grado de polimerización viene a incrementar la ya considerable complejidad de los derivados del isopreno. Por otra parte, sutiles variaciones ulteriores en la estructura de los poliprenos acíclicos y, especialmente, cíclicos, conduce a la formación de otros derivados que, conservando su nueva unidad estructural, difieren en su configuración y función metabólica.

Como corresponde a un proceso de tal importancia, las enzimas que participan en las reacciones de biosíntesis han sido estudiadas con detalle en diversos orígenes tanto de los reinos animal (2, 16) y vegetal (25, 17) como microbiano (5). También, con menor detalle, dada la extraordinaria complejidad del problema, son múltiples los autores que han considerado las reacciones de polimerización estereoespecífica (22, 42, 7) y de ciclación (23, 24). Buena parte de las enzimas que participan en el proceso han sido aisladas y purificadas.

(*) Este trabajo forma parte del Grant FG-Sp-145 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

(**) Becario de la Comisaría de Protección Escolar (1966-1968) para la realización de su Tesis Doctoral, parte de cuya memoria se presenta en este trabajo.

Atraídos lógicamente por la relevante función de los derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno, la mayor parte de los estudios se han polarizado en las reacciones que conducen a sus derivados y a las reacciones de intertransformación subsiguientes. En consecuencia, son muy numerosos los trabajos que versan sobre el proceso en conjunto o fraccionado en orígenes animales (19, 12, 8, 14), especialmente en hígado (40, 20). Las investigaciones realizadas acerca del proceso en vegetales, y concretamente, sobre la biosíntesis de terpenos son escasas (38, 13). Sin embargo, la secuencia ha quedado esclarecida en múltiples vegetales. La biosíntesis de carotenoides (4, 18, 11) y de los poliprenos en general (6, 9, 34) sigue en plantas y en microorganismos los mismos pasos iniciales que en los animales, sea cual sea su localización evolutiva y su capacidad funcional. También algunos autores se han ocupado de la biosíntesis de terpenos en algunas especies de pino (37, 29, 32).

Para profundizar y, en muchos casos, establecer los requerimientos de efectores que controlan el proceso era imprescindible normalizar los procedimientos de medida y poner a punto las condiciones idóneas para el desarrollo de la reacción. Los obstáculos que se oponían a la realización de este trabajo experimental eran considerables, ya que existían dificultades para la obtención de las preparaciones enzimáticas activas y, especialmente, para la visualización de los distintos intermediarios que integran la compleja secuencia metabólica que conduce al isopreno activo y, ulteriormente, a las oleorresinas. Como ha sucedido tan frecuentemente en la experimentación bioquímica de los últimos años, la posibilidad de emplear sustratos radiactivos permitió emprender con la suficiente garantía el estudio de los efectores del proceso.

MÉTODOS

1.—PREPARACION DE LOS EXTRACTOS

Para las reacciones enzimáticas se han utilizado extractos de plantas de *Pinus pinaster* de 20-35 días, 80-100 días, y 1 año.

a) *Extractos de plantas de 1 año.* Se han obtenido por trituración de las plantas con tampón tris-ClH, pH 7.9, en un mortero colocado en baño de hielo. La disgregación mecánica ("Turmix") no ha dado resultados satisfactorios, por tratarse de un material muy fino y muy duro.

A medida que va siendo obtenido, el extracto se vierte en un vaso receptor de Potter, mantenido en hielo, hasta la trituración de todo el material. Procediendo de esta manera, hemos obtenido extractos en los que la proporción planta/tampón es de 1/3. La disgregación se completa en el aparato Potter-Elvehjem durante breves espacios de tiempo intercalados con otros de descanso en el baño de hielo, con el fin de evitar un aumento de temperatura.

Una vez obtenido un extracto homogéneo, se filtra por paño y se recoge en un tubo de centrífuga, previamente enfriado, para su centrifugación. De acuerdo con P. VALENZUELA (7), ésta se hizo inicialmente a $30.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, rebajamos esta velocidad a $2.000 \times g$. En ambos casos la cantidad de sedimento obtenido es igual y muy escaso. Calentando a 80°C durante

2-3 min., el precipitado obtenido es mínimo; asimismo, cuando se precipita con ácido perclórico al 30 por ciento o se calienta el extracto a la temperatura indicada y posteriormente se le añade ácido perclórico, se obtienen los mismos resultados, los cuales indican que la riqueza proteica de los extractos de las plantas de 1 año es muy pequeña. Para conseguir extractos más concentrados se han empleado para una segunda trituración los extractos procedentes de una disgregación anterior, es decir, se han realizado extracciones múltiples y consecutivas. La cantidad total de tampón empleado es igual al peso de planta triturada, con lo que la proporción planta/tampón pasa a ser de 1/1. De este modo, el sobrenadante de la centrifugación a $2.000 \times g$ presenta mayor turbidez y riqueza proteica, aunque escasa todavía.

A lo largo de todas las operaciones descritas se comprobó el pH, observándose que cuando el tampón era 0.25 M y la proporción planta/tampón de 1/3, el pH del extracto resultante era aproximadamente de 7.0, mientras que, en el caso de las extracciones consecutivas, el pH final bajaba a 4-5. Se prepararon extractos de hojas y de tallos por separado, comprobándose que la acidez es mucho mayor en los primeros. Para evitar esta disminución del pH, se ha empleado tampón 0.5 M y se han separado los tallos, los eufilos y losseudófilos, estudiando las modificaciones del pH en cada una de estas fracciones. En los tallos la variación es prácticamente nula y en losseudófilos la disminución es ligera, mientras que en los eufilos el pH baja a valores algo inferiores a 7.0. Preparando extractos a partir de la planta completa —en la que la proporción, en peso, de hojas a tallo es aproximadamente de 2/1— se obtiene un pH final de 7.5.

A pesar de la extracción consecutiva, la riqueza proteica resultante es muy pequeña tanto en los ensayos realizados con planta total como en los llevados a cabo separando las partes que la constituyen. Las incubaciones llevadas a cabo con estos extractos no permitieron demostrar claramente la incorporación de ácido mevalónico, por lo que se consideró oportuno sustituir las plantas de 1 año por plántulas de características más adecuadas para una extracción acabada de las fracciones proteicas enzimáticas.

b) *Extractos de plantas de 20-35 días.* Por tratarse de un material mucho más blando que las plantas de 1 año, puede triturarse perfectamente en mortero. Para mantener el pH conyene adicionar una pequeña cantidad de tampón al mortero antes de comenzar la disgregación. Dado el mayor contenido en agua de las plantas jóvenes, la cantidad de tampón necesaria es menor. El contenido en proteínas —determinado por precipitación en medio ácido y por el método de Folin— es mucho mayor.

El procedimiento seguido para la obtención de los extractos es idéntico al indicado anteriormente, con una proporción óptima planta/tampón de 1/1. En cuanto a la molaridad de los tampones, se han ensayado las de 0.0125, 0.25 y 0.50. En el primer caso el pH final ha sido de 7.0, mientras que en los dos restantes se ha mantenido prácticamente constante (7.9).

c) *Extractos de plantas de 80-100 días.* Como en el caso anterior, se trata de un material biológico blando, por lo que la trituración se realiza fácil y convenientemente en un mortero mantenido en baño de hielo. De las proporciones

planta/tampón ensayadas, hemos comprobado que la más idónea es la de 1/1, al igual que en las plantas de 20-30 días, resultando un extracto muy rico en proteínas.

De acuerdo con los resultados de los ensayos anteriores, se ha seleccionado el siguiente sistema para la preparación de los extractos: En un mortero sobre hielo se tritura determinada cantidad de plántula recientemente arrancada y pesada acto seguido. Tanto el mortero como el pistilo son esmerilados para facilitar la trituración, que se realiza al principio en presencia de tampón tris-ClH 0.5 M pH 7.9 con objeto de evitar que baje el pH al quedar libres los ácidos contenidos en las estructuras vegetales. Una vez obtenida cierta cantidad de extracto, se continua triturando más plántula, siempre troceada previamente con tijeras, y se va añadiendo lentamente nueva cantidad de tampón hasta lograr un extracto lo más homogéneo posible, con la totalidad del material biológico y del tampón correspondiente. Durante toda la operación, la temperatura debe mantenerse inferior a 5°C. La proporción final de planta/tampón es de 1/1. El extracto así obtenido se filtra por paño de muselina sobre un embudo de vidrio, haciendo una "muñequilla" si fuese necesario, y se recoge el filtrado en un tubo de ensayo rodeado de hielo. El pH, que se comprobará repetidas veces, debe mantenerse constante.

2.—PREPARACION DE LOS TAMPONES

Se han ensayado los tampones siguientes:

Tampón Tris-ClH 0.0125 M pH 7.9

Tampón Tris-ClH 0.25 M pH 7.9

Tampón Tris-ClH 0.5 M pH 7.9

Para su preparación se han seguido las normas dadas por GOMORI (10), comprobando el pH final con un medidor Polymetron 45-B.

3.—RUPTURA DE LOS CLOROPLASTOS

Con objeto de estudiar la diferencia entre la incorporación del ácido mevalónico fuera y dentro de los cloroplastos, se han hecho diversas experiencias en las que se comparan los resultados hallados con el extracto obtenido según el procedimiento descrito y un extracto que contiene una suspensión de cloroplastos rotos al ultrasonido. Puesto que interesaba únicamente observar posibles diferencias, no se procedió al aislamiento de la fracción "pura" de cloroplastos para su posterior ruptura.

En principio, el extracto filtrado por paño fue sometido al ultrasonido durante dos períodos de 1 min., con un intermedio de 1 min. de descanso, manteniéndose siempre en baño de hielo-sal para evitar aumentos de temperatura. El extracto se centrifuga y se somete al resto de las operaciones ya descritas.

En experiencias ulteriores, los cloroplastos fueron separados centrifugando el extracto a $2.000 \times g$ durante 10 min. El residuo se resuspende en una nueva cantidad de tampón y se somete al ultrasonido. La proporción de tampón empleada para la suspensión ha sido variable, oscilando siempre alrededor de 10

veces el peso del sedimento. Se ensayó también la influencia de la molaridad del tampón (0.25 y 0.50) llegándose a la conclusión de que el pH se mantiene prácticamente constante con ambos, si bien se seleccionó el tampón 0.5 M por ser el utilizado en la preparación del extracto.

Para lograr una ruptura total, la acción del ultrasonido se prolonga durante cinco periodos de 1 min. con intervalos de 2 min. de descanso.

Con el fin de eliminar los restos del extracto original, se realizaron varios ensayos lavando el sedimento de la primera centrifugación con tampón 0.5 M. Los lavados se repitieron 2-3 veces, centrifugando cada una de ellas a $2.000 \times g$ durante 10 min., y sometiendo el último sedimento resuspendido a la acción del ultrasonido, tal como se indica anteriormente.

4.—SELECCION DEL METODO MAS APROPIADO PARA LA PREPARACION DEL ACIDO MEVALONICO A PARTIR DE SU LACTONA

La apertura del anillo lactónico puede lograrse por varios procedimientos, de los que se ensayaron los siguientes:

a) Tratamiento con un equivalente de KOH (30). Se comienza eliminando por calentamiento a 50°C y hasta total evaporación el disolvente de la solución bencénica en que es suministrada la lactona. De acuerdo con la actividad específica de la lactona, se calculan los micromoles existentes y los equivalentes de ácido. Según la concentración final deseada, se prepara una solución de KOH que contenga algo más de los equivalentes calculados de ácido en el volumen requerido. Para producir la apertura de la lactona basta añadir la solución de KOH al residuo de la evaporación, ya que el pH del medio resultante es suficiente para abrir el anillo lactónico.

b) Otro procedimiento para romper la lactona del ácido mevalónico consiste en realizar las operaciones descritas en el apartado anterior, pero manteniendo la solución resultante a 30°C durante 30 minutos (43).

c) El ácido mevalónico puede prepararse también a partir de la mevalonolactona tratándola con un exceso de KOH y neutralizando posteriormente con ácido hasta pH 8 (21).

d) La preparación del ácido libre al estado de sal potásica puede hacerse disolviendo la lactona en una solución de CO_2 HK 0.1 M y calentando a 37°C durante 30 minutos (40).

Todos estos procedimientos han sido ensayados, llegando a la conclusión de que el más idóneo para nuestros objetivos es el que se describe a continuación:

Se calienta a 50°C la solución bencénica, hasta evaporación total del benceno. Una vez seco, se trata con una solución de KOH que contenga— en un volumen adecuado a la concentración final deseada— hidróxido potásico en exceso respecto al número de equivalentes de ácido existentes. El pH de la disolución será aproximadamente de 10. Dicha solución se mantiene a 36°C durante 30 minutos originándose la sal potásica del ácido mevalónico, que se conserva de este modo a -20°C hasta el momento de su utilización, antes de la cual es conveniente mantenerla de nuevo a 36°C durante 30 minutos.

5.—REACCIONES ENZIMATICAS

Las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo incubando los extractos a 37°C durante tiempo variable y en presencia de diferentes sustancias coenzimáticas y cofactores metálicos (según se indicará en cada caso). Las reacciones se detienen inactivando las enzimas por calentamiento a 90°C durante 3-4 minutos. El precipitado se separa por centrifugación a temperatura ambiente a $2.000 \times g$ durante 10 minutos.

6.—SEPARACION CROMATOGRAFICA

Detenida la reacción y verificada la centrifugación como se ha descrito, se separa el sobrenadante y en él se realizan los desarrollos cromatográficos en los medios siguientes:

Líquido de desarrollo n.º 1 (33, 40): n-butanol: ácido fórmico: agua (77:10:13).

Líquido de desarrollo n.º 2 (3): t-butanol: ácido fórmico: agua (20:5:8).

Líquido de desarrollo n.º 3 (15): t-alcohol amílico: ácido acético: agua (4:1:2).

Líquido de desarrollo n.º 4 (40): ácido isoburítico: amoníaco: agua (22:1:10).

Líquido de desarrollo n.º 5: metanol: amoníaco: agua (6:1:3).

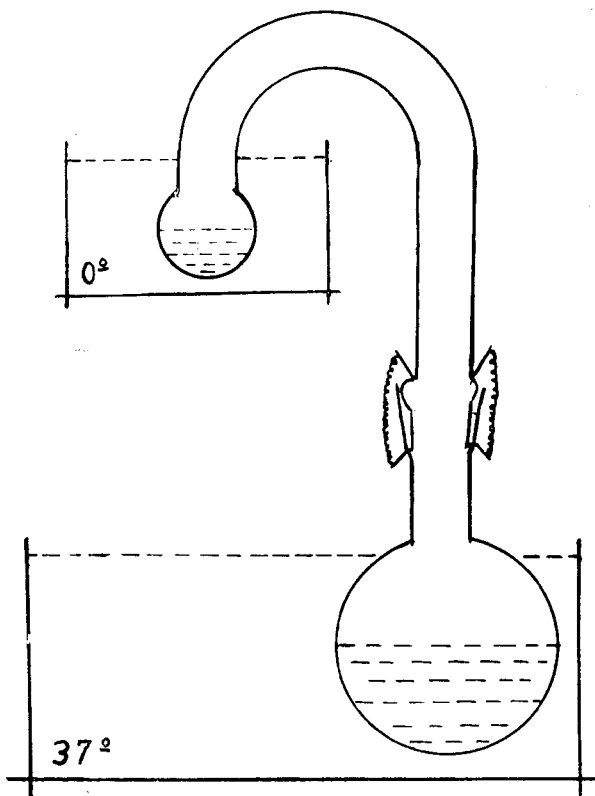
Líquido de desarrollo n.º 6 (31, 1): n-propanol: amoníaco: agua (6:3:1).

Líquido de desarrollo n.º 7 (1): isopropanol: isobutanol: amoníaco: agua (40:20:1:39).

La identificación se realiza a 260 milimicras para los nucleótidos de la adenina, por tinción con molibdato-ácido perclórico o con el reactivo de ROSENBERG (28) para los ésteres fosfóricos o por medida de la radiactividad en un sistema Actigraph III, de Nuclear Chicago.

7.—METODO PARA LA INCORPORACION A TERPENOS DEL MVA

Las experiencias conducentes a la investigación de la posible incorporación del ácido mevalónico hasta el término de terpenos se llevaron a cabo acoplando un tubo en U invertida a los tubos en que se realiza la incubación, colocando en su ensanchamiento final 1 ml de hexano (fig. 1). El sistema se cierra herméticamente y se lleva a un baño regulado a 37°C de tal forma que la reacción transcurra a esta temperatura y con agitación constante durante 5 horas. Por otra parte, el ensanchamiento que contiene el hexano se mantiene en un baño de agua-hielo a 0°C, evitándose así que durante la incubación pase hexano al tubo de la reacción tanto por agitación como por evaporación. Transcurrido el tiempo de incubación, se retira el sistema del baño y se agita repetidamente sin abrir con objeto de que el hexano pase al tubo en que ha tenido lugar la reacción y extraiga los terpenos que pudieran haber quedado retenidos. Se deja en reposo durante cierto tiempo y, una vez separadas las fases acuosas y hexánicas, se abre el sistema y se inyecta esta última capa en el cromatógrafo de gases conectado al radiocromatógrafo.



(R-6-1970)

Fig. n.º 1.—Esquema del dispositivo empleado en las experiencias sobre la incorporación a terpenos del MVA-2-¹⁴C

MATERIAL

1.—MATERIAL BIOLÓGICO

Se han utilizado plantas de *Pinus pinaster* crecidas a partir de semillas estratificadas previamente a 5°C durante 6 semanas.

2.—MATERIAL PARA CROMATOGRAFÍA

Para la cromatografía en fase gaseosa se ha utilizado un cromatógrafo Perkin-Elmer, mod. F-7 con detector de llama y columna mod. R 158-42-106 de propilenglicol (UCON LB-500 ×) al 4 por ciento de fase estacionaria sobre soporte de Chromosorb C 80/100 lavado al ácido y tratado con dimetilclorosilano.

La radiocromatografía en fase gaseosa se ha realizado en un radiocromatógrafo Perkin-Elmer mod. RGC 170. Para la detección y medida de la radiactividad en los cromatogramas de papel se ha utilizado un sistema Actigraph III mod. 1002, de Nuclear-Chicago.

PRODUCTOS

Los soportes y disolventes para cromatografía en fase gaseosa fueron suministrados por Merck-Darmstadt, calidad "Especiales para cromatografía". Los productos utilizados para la preparación de líquidos de desarrollo y tampones pertenecen a las firmas BHD y Riedel. El MVA (1 y 2-¹⁴C) fue suministrado al estado de lactona por "The Radiochemical Centre", de Amersham, a través de la Junta de Energía Nuclear. Los coenzimas utilizados pertenecen a las firmas Sigma, Nutritional Biochemicals y Boehringer.

RESULTADOS

1.—PUESTA A PUNTO DE LOS SISTEMAS DE SEPARACION CROMATOGRÁFICA

Para la separación cromatográfica de los derivados del ácido mevalónico se han ensayado siete líquidos de desarrollo diferentes, como se ha descrito en el correspondiente apartado. Los R_f señalados en la bibliografía allí mencionada se recogen en la tabla I. Dado lo incompleto de dicha tabla y la coincidencia del

TABLA I

R_f de los derivados del MVA y del ATP en los líquidos de desarrollo empleados, de acuerdo con la bibliografía

	1	2	3	4	5	6	7
MVA	0.75	0.80-0.85	0.74	0.66	0.79		
MVA lactona				0.75			
P-MVA	0.15-0.18	0.53-0.61	0.19	0.37	0.52		
PP-MVA	0.03	0.29-0.35	0.09	0.20	0.22		
Ip-PP	0.32	0.53-0.61			0.57	0.47	0.48
G-PP						0.67	0.77
Far-PP						0.74	0.87
DAL-PP						0.35	
ATP		0.00-0.16		0.20			
ADP		0.08-0.16		0.37			
AMP		0.26-0.30					
Pi	0.15	0.50-0.58			0.30		
PP		0.28-0.36			0.16		

valor Rf de varios derivados en algunos de los líquidos de desarrollo ensayados, se ha procedido a la identificación de los mismos mediante los productos obtenidos en reacciones de incubación con MVA-1-¹⁴C y MVA-2-¹⁴C, obteniéndose los resultados resumidos en la tabla II. Al no existir patrones marcados de los deri-

TABLA II

Rf de los derivados del MVA y del ATP en los líquidos de desarrollo empleados, de acuerdo con nuestros resultados

	1	2	3	4	6
MVA	0.72-0.88	0.90-0.95	0.76-0.92	0.64-0.72	0.67-0.80
MVA lactona				0.78-0.85	
P-MVA	0.12-0.25	0.67-0.75	0.25-0.36	0.40-0.46	0.24-0.33
PP-MVA	0.02-0.10	0.42-0.50	0.16-0.23	0.31-0.36	0.08-0.16
ATP	0.00-0.02	0.00-0.12	0.04-0.07	0.35-0.40	0.14-0.15
ADP	0.20-0.25	0.13-0.19	0.04-0.07	0.41-0.50	0.16-0.22
AMP	0.35-0.39	0.25-0.30	0.16-0.17	0.53-0.63	0.22-0.32

vados fosforilados del MVA, era necesario utilizar los datos aportados por las incubaciones. Una vez demostrada la incorporación del MVA por los extractos de *Pinus pinaster*, la identificación de cada uno de los productos de la reacción ha significado una serie de comprobaciones en varios líquidos, así como cromatografías bidimensionales en las que, además, se ha demostrado el efecto que ejercen los líquidos mencionados sobre los diferentes derivados. Con el reactivo de Rosenberg aparecen teñidos en azul el ATP y el ADP. Esta reacción ha servido para corroborar la situación de los nucleótidos.

2.—PREPARACION DE LAS REACCIONES ENZIMATICAS

Las primeras experiencias se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo de trabajo núm. 1. En los cromatogramas desarrollados en los líquidos núm. 2 y 5 se determinó la radiactividad, encontrándose que sólo se detectaba claramente en el ácido mevalónico. Estos resultados, a primera vista negativos, no indicaban con seguridad que la incorporación no hubiera tenido lugar, puesto que la incorporación siempre ocurre en un porcentaje relativamente escaso y en la experiencia indicada la dilución isotópica era tan grande (aproximadamente 1/10) que el MVA-2-¹⁴C incorporado podía escapar de los límites de resolución del sistema de medida de radiactividad. Por ello, las experiencias ulteriores se realizaron utilizando únicamente MVA-2-¹⁴C como sustrato, sin diluir con MVA no marcado.

Después de realizada la detección de radiactividad, los cromatogramas se tiñeron con molibdato-ácido perclórico, al igual que otros desarrollados a partir

PROTOCOLO I

	1	2	3	4	5	6	7	8
Extracto II	2	2	2	2	2	2	2	2
ATP 0.080 mM/ml	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
MnCl ₂ 0.120 mM/ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
MgCl ₂ 0.120 mM/ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
MVA-2- ¹⁴ C 0.002 mM/ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	0.1
MVA 0.020 mM/ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—	0.1
Glutacion 0.050 mM/ml	—	0.1	—	—	—	—	—	—
FNa 0.300 mM/ml	—	—	0.1	—	—	—	—	—
Cisteina 0.060 mM/ml	—	—	—	0.1	—	—	—	—
Iodoacetamina 0.030 mM/ml	—	—	—	—	0.1	—	—	—
Tampón tris 0.5 M pH 7.9	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.5	0.3

Tubos 9, 10 y 11: Similares al 1, 5 y 8, respectivamente, pero con extracto III.

Tubos 12 y 13: Similares al 1 y 5, respectivamente, pero con extracto I.

Temperatura de incubación: 37°C

Tiempo de incubación: Tubo 6, tiempo cero

Tubos 1, 2, 3, 4, 5 y 7, tres horas

Tubo 8, cinco horas

Extracto I: Extracto filtrado pero no centrifugado. Extracto II: Extrato filtrado sometido al ultrasonido y centrifugado. Extracto III: Extracto filtrado y centrifugado.

de los extractos, que sirven de referencia. La intensidad de color obtenida refleja la cantidad de sustancia desplazada con un determinado Rf. Expresando de forma aproximada la intensidad de cada mancha mediante signos positivos, se obtuvieron los resultados que se indican en las tablas III y IV, en las que puede

TABLA III

Resultados de la tinción con molibdato-ácido perclórico de los cromatogramas desarrollados a partir del sobrenadante según el protocolo I. Líquido de desarrollo número 2. Cantidad de muestra: 50 microlitros

Rf	Color	Exto. I	Exto. II	Exto. III	1-8	9-11	12-13
0.00	Amarillo	—	—	—	+	+	+
0.12-0.22	Celeste	++	+	+	+	+	++
0.28-0.34	Azul	++	+	+	++	++	++
0.49-0.56	Amarillo	++	+	+	++	++	++
0.69-0.77	Amarillo	+	+	+	+	+	+

TABLA IV

Resultados de la tinción con molibdato-ácido perclórico de los cromatogramas desarrollados a partir del sobrenadante según el protocolo I. Líquido de desarrollo número 5. Cantidad de muestra: 50 microlitros

Rf	Color	Exto. I	Exto. II	Exto. III	1-8	9-11	12-13
0.00	Amarillo	—	—	—	+	+	+
0.53-0.60	Amarillo	++	+	+	++	++	++
0.63-0.72	Celeste	++	+	+	++	++	++
0.76-0.82	Azul	++	+	+	++	++	++

apreciarse la inexistencia de una clara diferencia en los tubos incubados con un mismo tipo de extracto. Junto con la presencia de las mismas manchas en el tubo parado a tiempo cero, estos resultados corroboraron que todas las manchas visualizadas eran el resultado de la tinción de sustancias existentes en el extracto inicial, salvo el ATP y derivados producidos por hidrólisis.

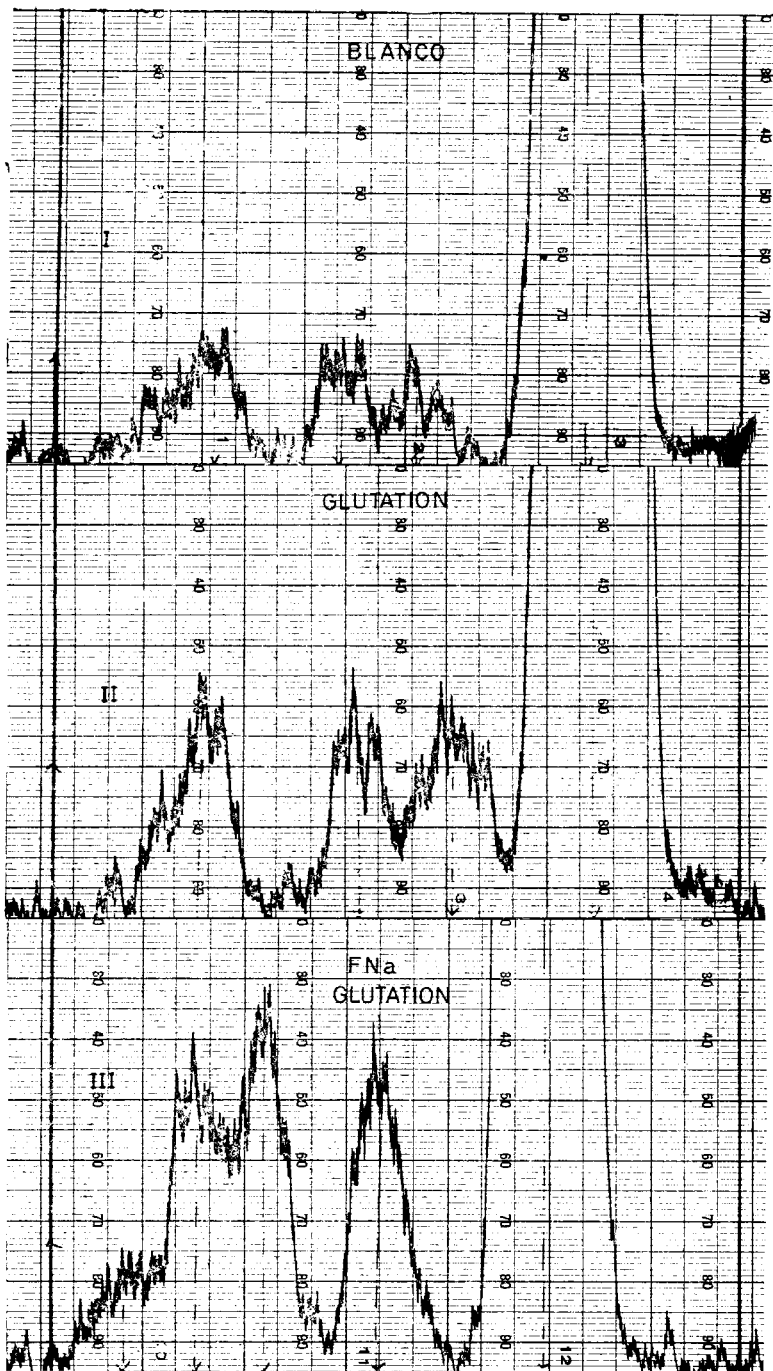
De acuerdo con estos resultados y teniendo en cuenta el efecto de la dilución isotópica, las reacciones de incubación se prepararon sobre la siguiente base: ATP ($8 \times 10^{-3}M$), Mn Cl₂ ($4 \times 10^{-3}M$), Mg Cl₂ ($4 \times 10^{-3}M$) y MVA-2-¹⁴C ($7 \times 10^{-5}M$). Eventualmente la reacción puede contener otros efectores como FNa, glutation, etc.

De este modo se ha logrado demostrar la incorporación del MVA así como la influencia de sustancias como el FNa, efectores de grupos-SH, iones metálicos, etc. Un ejemplo de la formación de los derivados fosforilados de MVA, se presenta en la fig. 2, en la que se pone de manifiesto, asimismo, el efecto activador del FNa y del glutation.

3.—INCORPORACION DEL MVA POR UNA SUSPENSION DE CLOROPLASTOS ROTOS AL ULTRASONIDO

Con el objeto de estudiar la impermeabilidad de la membrana de los cloroplastos hacia el MVA, se han realizado incubaciones durante tres horas con extractos totales de plantas de *Pinus pinaster* y extractos conteniendo una suspensión de cloroplastos rotos al US en presencia de ATP ($8 \times 10^{-3}M$), Mg Cl₂ ($4 \times 10^{-3}M$), Mn Cl₂ ($4 \times 10^{-3}M$) y MVA-2-¹⁴C ($8 \times 10^{-5}M$; 4.82 mC/ml), además de otros efectores que se expresan en la tabla V junto a los resultados obtenidos.

Estos resultados son muy interesantes, puesto que se establece una clara diferenciación entre la "capacidad metabólica" de los dos tipos de extractos. Los tratados al US conducen a la formación de un componente no identificado, mientras que los extractos directos detienen el proceso en Ip-PP.



(R-7-1970)

Fig. n.º 2.—Incorporación del MVA por extractos de *P. pinaster*. Efecto del FNa y del glutation. I. Incubación realizada en ausencia de FNa y glutation. II. Incubación realizada en presencia de glutation. III. Incubación realizada en presencia de FNa y glutation. Cromatografías desarrolladas en el medio n.º 6, n-propanol: amoníaco: agua (6:3:1)

TABLA V

Incorporación del MVA por extracto y cloroplastos rotos al US de plántulas de Pinus pinaster. Actividades en c.p.m. de los derivados del MVA-2-¹⁴C.
 Condiciones de medida: Col. = 12; C. T. = 10; Esc. = 500; Vel. = 30 (*)

Ld n.º 1	Rf	Extracto total			Cloroplastos rotos		
		FNa	FNa+G-SH	G-SH	FNa	FNa+G-SH	G-SH
PP-MVA	0.04-0.07	175	500	450	90	150	120
Ip-PP	0.41-0.48	60	125	90	—	—	—
No identificado	0.53-0.57	—	—	—	100	50	45

(*) Abreviaturas: Col. = Anchura del colimador, en mm. C. T. = Constante de tiempo, en seg. Esc. = Amplitud de la escala registradora, en c.p.m. Vel. = Velocidad de paso del cromatograma y del registrador, en cm/h.

4.—EXPERIENCIAS SOBRE LA INCORPORACION A TERPENOS DEL MVA

Se han llevado a cabo según el método descrito incubando extracto y plántula troceada en presencia de ATP (12×10^{-3} M), Mg Cl₂ (6×10^{-3} M), Mn Cl₂ (6×10^{-3} M), glutation (2.5×10^{-3} M y MVA-2-¹⁴C (5.25×10^{-5} M; 4.28 mC/ml.). El tiempo de incubación ha sido de 5 horas.

El extracto se ha preparado en una proporción planta/tampón de 2/1, comprobándose la constancia del pH en 7.9. Realizada la incubación, se destila en corriente de vapor durante 30 min. con fuerte refrigeración, se separa el hexano con los terpenos arrastrados y se someten los dos tubos a una destilación de 2 horas en microdestiladores especiales. Pasado este tiempo, se les añade 1 ml de hexano y se continúa la destilación otros 30 min., durante los cuales se arrastran con el hexano los terpenos que pudieran haber quedado retenidos. Recogido este hexano, se analizan los terpenos existentes, tanto marcados como no marcados.

Los resultados obtenidos por cromatografía y radiocromatografía gaseosa indican claramente que durante la obtención del extracto se han perdido la mayoría de los terpenos como puede apreciarse comparando las figuras 3 y 4. En ninguno de los casos analizados aparecen terpenos marcados. Ello sugiere que no haya tenido lugar la formación de terpenos a partir del MVA-2-¹⁴C o que haya tenido lugar efectivamente pero no sean detectables en las pequeñas cantidades de muestra inyectadas. Por ello, se prepararon para el desarrollo cromatográfico sobre papel muestras de 100 microlitros, obteniéndose los resultados de la tabla VI.

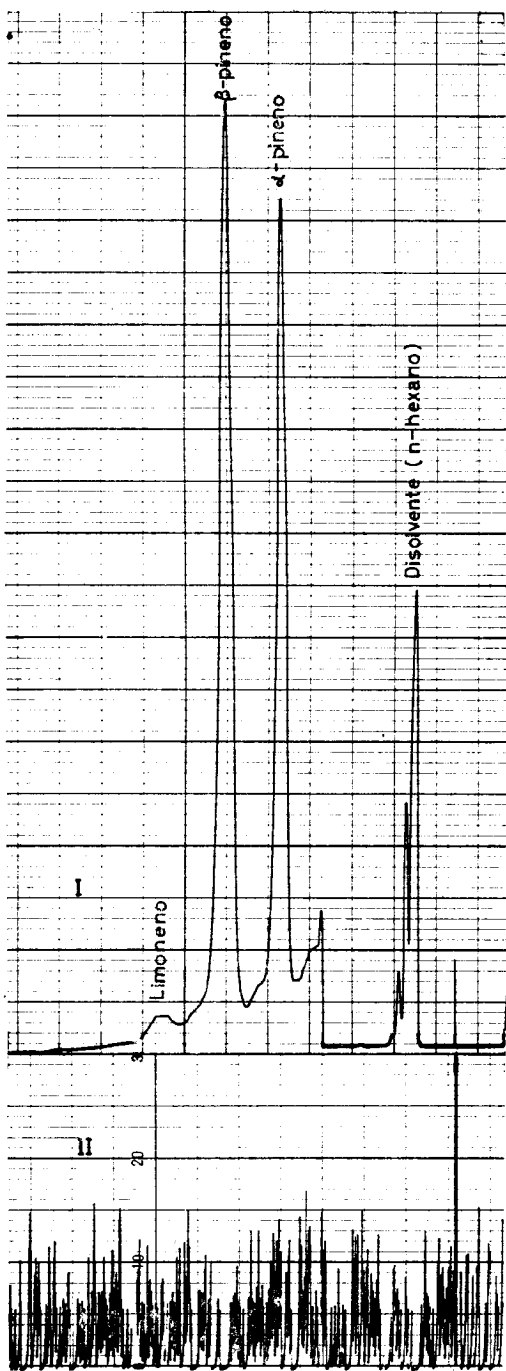


Fig. n.º 3

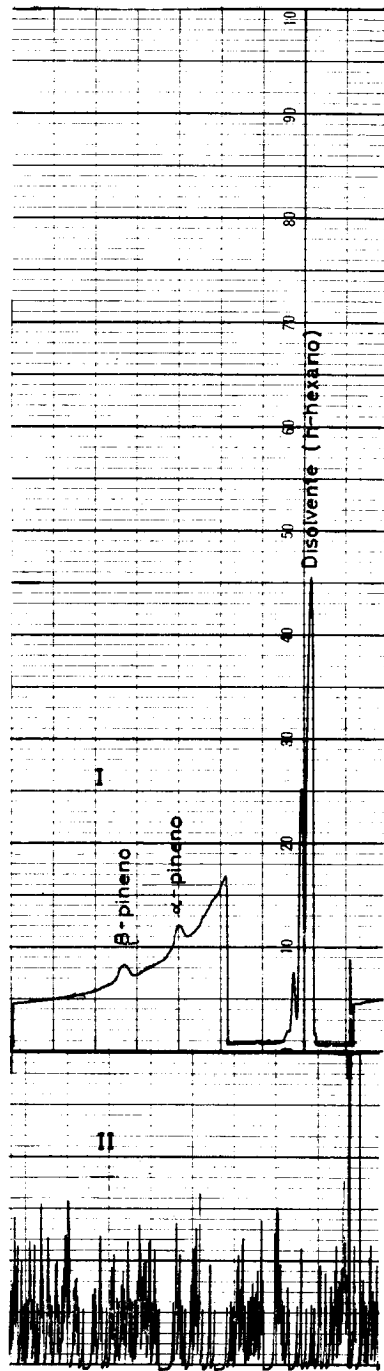


Fig. n.º 4

Fig. n.º 3.—Cromatograma (I) y radiocromatograma (II) de la fracción hexánica obtenida después de la incubación durante 5 h. y destilación en corriente de vapor durante 30 min. de plántulas troceadas de *P. pinaster* con MVA-2-¹⁴C en presencia de ATP, Mn, Mg, FNa y glutatión. Cantidad de muestra analizada: 5 microlitros.

Fig. n.º 4.—Cromatograma (I) y radiocromatograma (II) de la fracción hexánica obtenida después de la incubación durante 5 h. y destilación en corriente de vapor durante 30 min. de extractos de plántulas de *P. pinaster* con MVA-2-¹⁴C en presencia de ATP, Mn, Mg, FNa y glutatión. Cantidad de muestra analizada: 5 microlitros.

TABLA VI

Experiencia de incorporación de MVA a terpenos por plántulas de Pinus pinaster.

Actividades en c.p.m. de los derivados del MVA-2-¹⁴C.

Condiciones de medida: Col. = 12; C. T. = 10; Esc. = 100; Vel. = 15. Cantidad de muestra: 100 microlitros. Condiciones de la experiencia: I: Planta troceada y extraída 30 min. con hexano. II: Planta troceada, destilada 2 h. y extraída 30 min. con hexano. III: Extracto incubado y extraído 30 min. con hexano.

IV: Extracto incubado, destilado 2 h. y extraído 30 min. con hexano

Derivados	Ld.	Rf	c.p.m.	Condiciones
P-MVA	1	0.17	30	I
No identificados	1	0.98	40	
	2	1.00	35	
	4	0.55	35	
	4	1.00	50	
No identificados	6	0.99	35	II
	1	0.99	45	
	2	1.00	40	
	4	1.00	40	
	6	1.00	30	
P-MVA	1	0.20	30	III
No identificados	1	1.00	25	
	2	1.00	40	
No identificados	6	1.00	30	IV
	1	1.00	30	
	4	0.99	30	

Como se ve en ella existe un compuesto que se desplaza con el frente en todos los líquidos de desarrollo empleados y al cual corresponde la mayor parte de la actividad observada. Por otra parte, es de destacar que, tanto en la planta troceada como en el extracto, el hexano extrae en los primeros 30 min. indicios de P-MVA, detectable en el L. d. núm. 1.

DISCUSION

La inexistencia de patrones marcados y de las sustancias puras correspondientes a los diversos intermediarios origina considerables dificultades para establecer con precisión los Rf de los distintos compuestos separados después de las incubaciones enzimáticas. De acuerdo con los objetivos experimentales de este trabajo, se ha atendido a la extensa información bibliográfica al respecto, confirmada en algunas experiencias tales como las realizadas empleando MVA-1-¹⁴C.

La selección de los disolventes más apropiados para la separación de los precursores, productos de las reacciones de biogénesis y nucleótidos presentes en

la mezcla de incubación ha constituido uno de los aspectos más laboriosos de los ensayos preliminares de puesta a punto de la metodología adecuada. A los efectos de la identificación de los distintos derivados fosforilados radiactivos, es interesante destacar la acción hidrolítica de los propios disolventes empleados en el desarrollo cromatográfico. La localización, de acuerdo con los valores de R_f convencionales, es extremadamente difícil ya que los compuestos originales pueden sufrir transformaciones muy notables según el líquido de desarrollo. Esto ha obligado a emplear múltiples sistemas y mezclas de disolventes con el fin de poder confirmar la situación de algunos derivados y establecer con cierta aproximación la de otros.

La normalización de las condiciones óptimas para la obtención de extractos radiactivos a partir de plantas y plántulas de pino ha permitido la realización de ensayos sistemáticos sobre la influencia de los efectores de la misma. El período de desarrollo de la planta en que se alcanzan mayores actividades se sitúa entre los 20 y 100 días.

Las experiencias realizadas con cloroplastos rotos al ultrasonido señalan como línea muy interesante de investigación futura la diferenciación del proceso y de los productos terminales en preparaciones que contengan cloroplastos intactos y otras con cloroplastos aislados y rotos al ultrasonido, con el fin de poder establecer en este material la misma especialización subcelular y compartimentación que se ha establecido por algunos autores en otros orígenes. Goodwin y col. (35, 36) pusieron de manifiesto que la biogénesis de los terpenoides en cloroplastos se regula, conjuntamente, por las distintas ubicaciones enzimáticas y por la propia permeabilidad de la membrana del cloroplasto. Al referirse a la localización de la mevalonato cinasa (26, 27) en las semillas en germinación, estos autores destacaron la extraordinaria importancia que puede tener la situación intracelular en la regulación de la biosíntesis de los polímeros terpenoides. Los sistemas de activación del mevalonato se hallan presentes tanto dentro como fuera de los cloroplastos, si bien los pasos de ramificación poseen una ubicación perfectamente determinada intra o extracloroplastídica. Tal como se ha mencionado, se ha comprobado la presencia en células vegetales de isoenzimas de la mevalonato cinasa (25). Dentro del cloroplasto existen tanto la mevalonato como la fosfomevalonato cinasas, a pesar de que su membrana es esencialmente impermeable al mevalonato. Todo ello marca una perfecta diferenciación que encuadra la regulación de la biosíntesis de terpenos dentro de un sistema suplementario de control por acceso a las ubicaciones celulares donde tiene lugar el proceso específico de polimerización. De acuerdo con esta distinta compartimentación, los resultados obtenidos por nosotros empleando preparaciones con cloroplastos intactos reflejan únicamente el proceso catalizado por los sistemas enzimáticos extracloroplastídicos. Ello sugería la realización de experiencias a partir de acetato o de anhídrido carbónico, el primer tipo de los cuales ha dado resultados positivos, habiéndose logrado demostrar que el acetato se incorpora por los extractos de plántulas de pino en presencia de glutatión y NADPH entre otros efectores.

Es muy probable que radiquen en el sustrato los infructuosos intentos de demostrar la incorporación de precursores radiactivos en terpenos, cuando se ha empleado mevalonato y extractos o preparaciones troceadas de plantas y plán-

ulas de 28 y 100 días. En las experiencias realizadas se han identificado los intermediarios marcados y en los cromatogramas han aparecido sustancias radiactivas que se desplazan con el frente pero no corresponden a los pinenos separados por cromatografía en fase gaseosa. Trabajando con plántulas de *P. silvestris*, *P. contorta*, *P. radiata* y *P. jeffreyi*, Wieckowski y Goodwin (41) han puesto de manifiesto que la incorporación relativa de anhídrico carbónico en β -caroteno y fitol es mucho mayor que la incorporación que se obtiene empleando ácido mevalónico. La principal característica de las plántulas de pino a este respecto es que son capaces de sintetizar clorofila y carotenoides en la oscuridad. Puesto que lo mismo sucede con los terpenos, las experiencias futuras programadas con el ánimo de obtener información sobre el tránsito de los precursores a las oleorresinas, se realizarán con precursores más sencillos y de demostrada permeabilidad y acceso a los cloroplastos. En efecto, conocida la compartimentación de los sistemas biosintéticos y la impermeabilidad de la membrana del cloroplasto al ácido mevalónico, todo parece indicar que la diferenciación metabólica debe establecerse en *P. pinaster* empleando sustratos marcados más sencillos. Sin embargo empleando acículas de *P. radiata*, VALENZUELA y col. (39) lograron poner de manifiesto la incorporación de precursores radiactivos (mevalonato-2-¹⁴C) con los componentes de la oleorresina. Con los extractos libres de células procedentes de plántulas fueron incapaces de reproducir la incorporación de radiactividad obtenida con el empleo directo de las acículas. La ausencia de incorporación de mevalonato marcado en los terpenos puede ser debida a la destrucción de un nivel mínimo de la organización requerida o bien a la ausencia de un método eficaz para la extracción de los sistemas enzimáticos de la cadena biosintética. Con las plántulas troceadas se ha obtenido evidencia de una fácil incorporación de la radiactividad del ácido mevalónico a sus derivados fosforilados. Sin embargo, se corrobora que la principal línea de investigación futura sugerida por los resultados alcanzados a este respecto, consiste en la obtención de extractos de cloroplastos que permitan realizar el proceso de incorporación a terpenos en unas condiciones de clara y definida estimación.

RESUMEN

Se han estudiado y normalizado las condiciones óptimas para la obtención de extractos activos a partir de plántulas y plantas de pino, conservándose toda la secuencia de reacciones que relaciona el mevalonato con el isopreno activo. El período de desarrollo en que se alcanzan mayores actividades se sitúa entre los 20 y 100 días.

Se presenta, asimismo, la puesta a punto del sistema de detección radiocromatográfica, que incluye la selección de los disolventes más apropiados para la separación de los precursores, productos de las reacciones de biogénesis (P-MVA, PP-MVA, etc.) y nucleótidos presentes en la mezcla de incubación (ATP, ADP y AMP). La utilización de mevalonato -1-¹⁴C y -2-¹⁴C ha permitido decidir la localización cromatográfica de sus derivados fosforilados.

Los extractos de cloroplastos rotos al ultrasonido conducen a la producción de un componente no identificado, mientras que las preparaciones que contienen cloroplastos intactos detienen el proceso en los compuestos normalmente identificables en las condiciones experimentales.

Se ha intentado demostrar la incorporación en terpenos de los precursores radiactivos empleados, utilizando extractos y preparaciones troceadas de planta y plántulas de 28 y 100 días. A las 5 horas de incubación no se ha observado la incorporación de radiactividad en los principales terpenos, si bien se identifican los intermediarios marcados. En los cromatogramas aparecen sustancias radiactivas que se desplazan con el frente, pero no corresponden, probablemente, a los pinenos separados por cromatografía en fase gaseosa.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, D. G. and PORTER, J. W.—Arch. Biochem. Biophys. 97, 509, (1962)
2. BENEDICT, C. R., KETT, J. and PORTER, J. W.—Arch. Biochem. Biophys. 119, 209, (1967).
3. BLOCH, K., CHAYKIN, S., PHILLIPS, A. H. and WAAR, A. de.—J. Biol. Chem. 234, 2595, (1959).
4. BRAITWAITE, G. D. and GOODWIN, T. W.—Biochem. J. 76, 5, (1960).
5. BUCHER, N. J., OVERATH, P. and LYNEN, F.—Biochim. Biophys. Acta, 40, 491, (1960).
6. BUTTERWORTH, P. H. W., BURGOS, J. and HEMMING, W.—Arch. Biochem. Biophys. 124, 398, (1966).
7. CORNFORTH, J. W., CORNFORTH, R. H., POPJAK, G. and JENGOYAN, L.—J. Biol. Chem. 241, 3970, (1966).
8. DURR, I. F.—Biochem. J. 98, 317, (1966).
9. GOAD, L. J. and GOODWIN, T. W.—Biochem. J. 99, 317, (1966).
10. GOMORI, G.—“Methods in Enzymology”. Vol. 1, pág. 144, Academic Press Inc. Publishers, New York 1955.
11. GOODWIN, T. W.—Biochem. J. 70, 612, (1958).
12. GORE, I. Y. and POPJAK, G.—Biochem. J. 84, 93, (1962).
13. GRAEBE, J. E.—Science, 157, 73, (1967).
14. HELBIG, H. R. and SAVARD, K.—Biol. Chem. 240, 1957, (1965).
15. HENNING, U., MOSLEIN, B. M. and LYNEN, F.—Arch. Biochem. Biophys. 83, 259, (1959).
16. HOLLOWAY, P. W. and POPJAK, G.—Biochem. J. 104, 57, (1967).
17. JUNGALWALA, F. B. and PORTER, J. W.—Arch. Biochem. Biophys. 119, 209, (1967).
18. KARUNAKARAN, A., KARUNAKARAN, M. E. and QUACKENBUSH, F. W.—Arch. Biochem. Biophys. 114, 326, (1966).
19. LAWSON, D. E. M., THERELFFALL, D. R., GLOVER, J. and MORTON, R. A.—Biochem. J. 79, 201, (1961).
20. LEVY, H. R. and POPJAK, G.—Biochem. J. 75, 417, (1960).
21. NANDI, D. L. and PORTER, J. W.—Arch. Biochem. Biophys. 105, 7, (1964).
22. REES, H. H., MERCER, E. I., and GOODWIN, T. W.—Biochem. J. 99, 726, (1966).
23. REES, H. H., BRITTON, G. and GOODWIN, T. W.—Biochem. J. 106, 659, (1968).
24. REES, H. H., GOAD, L. J. and GOODWIN, T. W.—Biochem. J. 107, 417, (1968).
25. ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J. and GOODWIN, T. W.—Biochem. J. 100, 14 C, (1966).

26. ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J. and GOODWIN, T. W.—*Biochem. J.* 96, 7 P., (1965).
27. ROGERS, L. J., SHAH, S. P. J. and GOODWIN, T. W.—*Biochem. J.* 99, 381, (1966).
28. ROSENBERG, H.—*J. Chromatog.* 2, 487, (1959).
29. SANDERMAN, W.—*Holsforschung Dtsch.* 16, 65, (1962).
30. SKILLETER, D. N. and KEKWICK, G. O.—*Anal. Biochem.* 20, 171, (1967).
31. SOUCED, M. and VRKOC, J.—Comunicación personal.
32. STANLEY, R. G.—“Terpene Biogenesis in Pine”. U. S. Dept. Agric. Tech. Paper, 56, Berkeley, (1961).
33. TCHEN, T. T.—*J. Biol. Chem.* 233, 1100, (1958).
34. THRELFALL, D. R., GRIFFITHS, W. T. and GOODWIN, T. W.—*Biochem. J.* 103, 831, (1967).
35. TREHARNE, K. J., MERCER, E. I. and GOODWIN, T. W.—*Biochem. J.* 99, 239, (1966).
36. TREHARNE, K. J., MERCER, E. I. and GOODWIN, T. W.—*Biochem. J.* 90, 39 P., (1964).
37. VALENZUELA, P., BEYTIA, E., CORI, O. and YUDELEVICH, A.—*Arch. Biochem. Biophys.* 113, 536, (1966).
38. VALENZUELA, P. and CORI, O.—*Tetrahedron Letters*, 32, 3089, (1967).
39. VALENZUELA, P., CORI, O. and YUDELEVICH, A.—*Phytochemistry*, 5, 1005, (1966).
40. WAARD, A. de, and POPJAK, G.—*Biochem. J.* 73, 410, (1959).
41. WIECKOWSKI, S. and GOODWIN, T. W.—*Biochem. J.* 105, 89, (1967).
42. WILLIAMS, R. J., BRITTON, G., CHARLTON, J. M. and GOODWIN, T. W.—*Biochem. J.* 104, 767, (1967).
43. WILLIAMSON, I. P. and KEKWICK, R. G. O.—*Biochem. J.* 96, 862, (1965).