

SALVANO, M.A.
Purificación, Propie

1996

66258



T.580

66258

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICO-QUIMICAS Y
NATURALES**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR

**PURIFICACION, PROPIEDADES CINETICAS Y
FISICO-QUIMICAS DE FOSFORILCOLINA
FOSFATASA DE *Pseudomonas aeruginosa***

66258

TESIS DOCTORAL

MARIO A. SALVANO

1996

20580

66258

REF:
CLASS
T.580

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

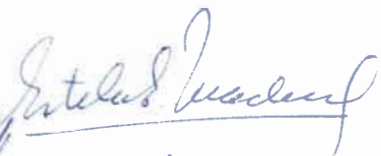
DIRECTOR DE TESIS:

Dr. CARLOS E. DOMENECH



JURADO DE TESIS:

Dra. ESTELA MACHADO



Dr. LUIS FRANZONI



Dr. HECTOR FERNANDEZ



Río Cuarto, 5 de Julio de 1996.-

A MI MADRE
A ANY,
LUCIANO, GENARO Y SANTIAGO.
A LA MEMORIA DE GLADYS.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Carlos Domenech, no sólo por su invaluable dirección científica sino también, por brindarme su confianza y la oportunidad de concretar este trabajo.

A los Dres. Estela Machado, Luis Franzoni y Héctor Fernández, por la revisión, corrección y aportes a la estructura de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio Adriana, Gaby, Tere, Mónica, Silvia, Gloria, Walter y César, y a Elizabeth y Mónica por la ayuda recibida y los gratos momentos compartidos.

A todos los integrantes del Departamento de Biología Molecular, docentes y no docentes, de quienes siempre recibí la ayuda solicitada y en muchos casos un estímulo gratificante.

Al Dr. Luis Beaugé, por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en esta apasionante y hermosa actividad, hace mucho tiempo, en la Universidad Nacional de Córdoba.

Al desaparecido Dr. Carlos Garcia Argiz, por todos los años compartidos y su aporte a mi formación.

A Tere y Walter por su inestimable y desinteresada hospitalidad.

A mi esposa Any y mis hijos Luciano, Genaro y Santiago, por tolerar y comprender mi inevitable alejamiento de ellos.

A todos quienes me conocen, sinceramente, MUCHAS GRACIAS.

INDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCION	2
Propiedades generales	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> como agente patógeno	5
Factores de virulencia	6
Fosfatasa	10
Fosfatasa ácida de <i>P. aeruginosa</i>	12
MATERIALES Y METODOS	14
Cepa bacteriana	15
Medios de cultivo	15
Condiciones de cultivo	15
Obtención de proteínas periplásmicas	16
Purificación de la enzima	17
a) Purificación parcial	17
b) Purificación a homogeneidad	17
Precipitación con sulfato de amonio	18
Cromatografía en Sephacryl S-200	18
Electroforesis en gel de poliacrilamida	18
Determinación de pesos moleculares	19
Determinación de proteínas	20
Medición de las actividades enzimáticas	20
Determinación del punto isoelectrico	22
RESULTADOS	23
Purificación de la enzima.....	24
Tratamiento con calor	24
Precipitación con sulfato de amonio	25
Filtración molecular	26
Determinación del peso molecular de la PCFasa	29
Determinación del punto isoelectrico de la PCFasa	32

Caracterización cinética de la enzima	33
Acción de cationes divalentes	33
p-NPP como sustrato	33
P-etanolamina como sustrato	36
P-colina como sustrato	40
pH óptimo en presencia y ausencia del catión Mg^{2+}	42
Efecto de agentes quelantes	43
Fosforilcolina fosfatasa frente a p-NPP y P-colina	46
Efecto de colina a pH 5	46
Efecto de colina a pH 7,4	49
Acción de detergentes sobre fosforilcolina fosfatasa	50
Inhibidores de fosforilcolina fosfatasa	53
Efecto del aluminio con p-NPP como sustrato	54
Efecto del aluminio con P-colina como sustrato	56
DISCUSION	57
Purificación y caracterización de PCFasa	58
Modelo esquemático	65
PCFasa y la infección	66
Modelo en tejido pulmonar	68
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA	72

ABREVIATURAS

AcPasa :	fosfatasa ácida
ADP :	difosfato de adenosina
AMP :	fosfato de adenosina
ATP :	trifosfato de adenosina
ChE :	colinesterasa
EDTA :	ácido etilendiaminotetraacético
EP :	extracto periplásmico
EPØ :	extracto periplásmico calentado
OF :	ortofenantrolina
PCFasa :	fosforilcolina fosfatasa
P-colina :	fosforilcolina
P-etanolamina :	fosforiletanolamina
Pi :	fosfato inorgánico
pI :	punto isoelectrico
PLC :	fosfolipasa C
p-NPP :	p-nitrofenilfosfato
PTKasa :	proteína tirosinaquinasa
PTPasa :	proteína tirosinafosfatasa

INTRODUCCION

PROPIEDADES GENERALES

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, no esporulada, aerobia estricta, perteneciente a la familia *Pseudomonaceae*. Posee una amplia capacidad de adaptación a distintos ambientes nutricionales ya que es capaz de utilizar una gran variedad de sustancias como alimento, obtener energía y crecer. Su distribución en el medio ambiente es tan amplia que puede ser aislada de agua, suelo, plantas, insectos, aguas servidas e incluso, con gran facilidad, dentro de los hospitales (Lowbury y col., 1970). Esto implica una gran versatilidad genética en el control de las enzimas responsables de la degradación de metabolitos necesarios para su crecimiento (Ornston, 1971). También significa que percibe el ambiente y responde a él modificando el nivel de expresión de sus genes, al menos ante señales producidas por cambios de temperatura, oxígeno, pH, osmolaridad y concentraciones de hierro y calcio (Botzenhart y Doring, 1993). La clave de esta propiedad reside en un único cromosoma circular superenrollado, donde muchos de los genes biosintéticos caracterizados demuestran poder intercambiar información genética por transducción, transformación y conjugación (Dean y col., 1979).

La membrana citoplasmática interna de esta bacteria contiene varios sistemas de transporte activo, de biosíntesis de moléculas y de fosforilación oxidativa. La externa, de morfología parecida, actúa como barrera contra la difusión, por ejemplo, de antibióticos y detergentes. Contiene receptores para bacteriófagos, sistemas específicos para el transporte de nutrientes (hierro, vitaminas y carbohidratos) y poros no específicos que permiten el pasaje de sustancias de bajo peso molecular. Además, junto a la membrana citoplasmática interna, le da límites al espacio periplásmico (DiRienzo y col., 1978). En esta región, los polisacáridos y otras moléculas pequeñas amortiguan las alteraciones iónicas y osmóticas del ambiente y las proteínas periplásmicas cumplen importantes funciones para procesar y transportar nutrientes esenciales, como así también en la biogénesis de la envoltura celular (Oliver, 1987).

P. aeruginosa es capaz de utilizar ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, etc., como fuente de carbono y de nitrógeno, pero prioriza, para la obtención de energía exógena, algunos ácidos orgánicos a los cuales metaboliza a través del ciclo de Krebs de los ácidos tricarboxílicos. Para

esta vía se ha descrito, de manera constitutiva, la síntesis de las enzimas involucradas, y se le ha atribuido naturaleza anfibólica, pues además de producir energía, genera intermediarios biosintéticos (Mc Gregor y col., 1992). Así por ejemplo, prefiere ácido cítrico en lugar de glucosa, al cual metaboliza mediante este ciclo (Ng y Dawes, 1967). Cuando debe crecer a expensas del carbohidrato, necesita inducir un sistema de transporte activo específico, como así también las enzimas encargadas de su degradación (Cuskey y col., 1985), y lo hace a través de la vía de Entner-Doudoroff (Lessie y Phibbs, 1984). De acuerdo a su estado fisiológico, es posible que esta bacteria catabolice la glucosa fosforilándola a glucosa-6-P o transformándola directamente en glutamato (Heath y Gaudy, 1978).

Amonio, nitratos y aminoácidos pueden ser utilizados por *P. aeruginosa* como fuente de nitrógeno. Los nitratos son reducidos a nitritos y luego a amonio, el cual es asimilado por vías que conducen a la formación de ácido glutámico (Janssen y col., 1980).

La concentración de fosfato inorgánico (Pi) en el medio de cultivo es responsable de la inducción o no, de dos actividades enzimáticas: fosfatasa alcalina y fosfolipasa C. Así, cuando el nivel de Pi es bajo se detectan estas dos actividades enzimáticas, mientras que ello no ocurre cuando el microorganismo crece en presencia de altas concentraciones (Liu, 1974; Stinson y Hayden, 1979). El fundamento para una explicación fisiológica de esta observación es coherente, puesto que la acción combinada de ambas enzimas le provee fosfato al microorganismo.

Independientemente de la concentración de fosfato presente, *P. aeruginosa* induce actividades de fosfolipasa C (PLC), fosfatasa ácida (AcPasa) y colinesterasa (ChE), cuando la fuente de carbono o carbono y nitrógeno en el medio de cultivo es colina o sus metabolitos betaína, dimetilglicina y sarcosina (Lisa, 1985; Lucchesi y col., 1989). En altas concentraciones de Pi, el agregado de ácido succínico al medio reprime la síntesis de fosfolipasa C y el agregado de éste y amonio, la actividad de AcPasa y ChE. Esto es comprensible puesto que para obtener nitrógeno debe metabolizar colina o sus metabolitos, pero es claro que la inducción de PLC responde a más de un mecanismo de regulación: uno dependiente de fósforo inorgánico, si la bacteria se halla frente a una fuente preferencial de carbono (Liu, 1974) y otro no dependiente de fósforo inorgánico, si la bacteria crece a expensas de colina, betaína, dimetilglicina o sarcosina (Lucchesi, 1992; Lisa y col., 1994).

Otro hecho interesante para destacar es la influencia de la osmolaridad del medio. Así, *P. aeruginosa*, en presencia de succinato y amonio como fuentes preferenciales de carbono y nitrógeno respectivamente, más 0.8 M de NaCl (medio hipertónico), no es capaz de crecer, pero lo hace ante el agregado de 1 mM de colina. Aunque en estas condiciones no induce ninguna de las actividades enzimáticas referidas anteriormente, sin succinato y con colina 20 mM, crece e induce actividad de PLC, AcPasa y ChE (Lisa y col., 1994). En el primer caso, colina participa solamente como osmoprotector, mientras que en el segundo también como fuente de carbono y de nitrógeno, de allí que induce las tres enzimas en cuestión.

***Pseudomonas aeruginosa* COMO AGENTE PATOGENO**

Se la define como un patógeno oportunista, pues rara vez ataca individuos con sistemas inmunológicos intactos. En cambio, es sumamente común su presencia en aquellos que han sufrido quemaduras, intervenciones quirúrgicas, que padecen cáncer, politraumatismos que requieren un tratamiento prolongado en unidades de cuidados intensivos, fibrosis quística y en general, en pacientes inmunocomprometidos (Hart y Woods, 1994).

De todos los microorganismos gram negativos, *P. aeruginosa* es, por lejos, el patógeno ocular más común, causando conjuntivitis, esclerósis, celulitis orbital y fundamentalmente, queratitis (úlceras infecciosas de la córnea), siendo la incidencia más de dos veces superior en individuos asistidos con lentes de contacto (Holland y col., 1993). La infección corneal por esta bacteria se caracteriza por una rápida destrucción del tejido ocular y la consecuente pérdida de la visión. El tiempo entre la identificación del proceso y el daño producido a la córnea puede ser tan corto como veinticuatro horas, haciendo extremadamente difícil el tratamiento para evitar las consecuencias (Baker, 1993).

Menos del 1% de las infecciones recurrentes de las vías urinarias, en pacientes ambulatorios, son causadas por *P. aeruginosa*, pero origina el 11% de las infecciones nosocomiales del tracto genitourinario, siendo, aparentemente, la presencia de catéteres y cuerpos extraños la causa mayor de esta predisposición, una prueba más del carácter oportunista de esta bacteria (Botzenhart y Doring, 1993).

Como patógeno, también muestra una gran adaptación al medio y ha sido aislada de casi todos los sitios anatómicos. Pacientes con fibrosis quística,

enfermedad hereditaria común en los caucásicos, que causa afecciones respiratorias crónicas y complicadas muy frecuentemente con el asentamiento de *P. aeruginosa*, es un fiel reflejo de esta propiedad. Esta asociación con la bacteria es la causa primaria de la alta mortalidad observada en esta patología. Si bien en un principio, la infección del pulmón se produce por la cepa salvaje de *P. aeruginosa* (no mucoide), luego de un tiempo, ésta cambia a una forma atípica (mucoide), productora de un exopolisacárido denominado alginato, lo cual la hace prácticamente insensible a la terapéutica con antibióticos (Collins, 1992; Deretic y col., 1993).

FACTORES DE VIRULENCIA

P. aeruginosa posee un amplio arsenal formado por componentes celulares y extracelulares, tales como proteasa, elastasa, exoenzima S, exotoxina A, endotoxinas (lipopolisacáridos), alginato, fosfolipasa C, leucocidinas y "pili", que han sido asociados con su virulencia, habilidad invasiva y colonización (Sato y col., 1988).

El evento inicial del proceso infeccioso es la adherencia del patógeno a la superficie de las células atacadas. Se han descrito al menos tres adhesinas diferentes, actuando coordinadamente, en esta bacteria: pili, exoenzima S y el exopolisacárido alginato. Los dos primeros, a pesar de ser bioquímica y estructuralmente diferentes, se unen a los mismos receptores celulares, pues poseen zonas de su estructura proteica con considerable homología y así, anticuerpos mono y policlonales contra epítopes de pili, mostraron actividad contra secuencias de exoenzima S. La unión de ambos a las células se lleva a cabo con constantes aparentes de afinidad altas y manifiestan su importancia en el comienzo del proceso. El alginato lo hace más tarde, cuando el número de colonias es relativamente alto y con una constante aparente de afinidad baja, pero igualmente importante en el proceso de colonización, al menos en el epitelio respiratorio, donde fue más estudiado (Irvin, 1993).

P. aeruginosa causa un gran daño en el tejido infectado a través de la producción de necrosis, formación de microabscesos, lesiones vasculares, hemorragia y degradación de constituyentes de la membrana celular a causa, entre otras, de la síntesis y excreción de proteasas, entre las cuales las dos más potentes y mejor conocidas son la elastasa y la proteasa alcalina (Nicas y Iglewski, 1986). El hecho de que han sido detectadas en el esputo de pacientes

con fibrosis quística y anticuerpos contra ellas aislados de enfermos colonizados, es un claro indicio que son sintetizadas y excretadas *in vivo* (Döring y col., 1983, Klinger y col., 1978). Las proteasas no son por sí mismas citotóxicas, pero degradan muchos componentes del tejido conectivo, incluyendo elastina, colágeno tipo III y IV y laminina (Heck y col., 1986) y forman parte esencial del mecanismo de virulencia desarrollado por esta bacteria.

La exotoxina A, descubierta y purificada hace más de tres décadas, ha sido identificada como el principal factor de virulencia producido por *P. aeruginosa* y con muy raras excepciones todas las cepas la sintetizan y excretan. Está formada por una sola cadena polipeptídica de 613 aminoácidos y un peso molecular de 66.583. Posee, al igual que la exoenzima S, actividad de ADP-ribosiltransferasa, aunque con características diferentes (Galloway, 1993). Su administración endovenosa es sumamente letal en numerosos animales incluyendo al mono, siendo una temprana necrosis de las células hepáticas, el mayor y más constante daño observado. Su toxicidad es diez mil veces la observada por los lipopolisacáridos de la misma bacteria (Pollack, 1983) y siendo ésta de naturaleza enzimática, se estima que sólo la presencia de una molécula es capaz de matar una célula, tal como se demostró para la toxina colérica, de igual mecanismo de acción (Yamaizumi y col., 1978).

Las células fagocíticas, macrófagos y neutrófilos, cumplen una función muy importante en la defensa contra la infección de patógenos extracelulares. Contra esto *P. aeruginosa* sintetiza y excreta toxinas como la leucocidina, proteína de 27 kDa con alta reactividad hacia leucocitos de diferentes especies animales (Scharmann, 1976), su localización es periplásmica y se une a los neutrófilos mediante una proteína integral de la membrana plasmática. Otra sustancia, aislada a partir del sobrenadante de cultivos de esta bacteria, es denominada inhibidor de neutrófilos y corresponde a una proteína de 65 kDa (Nonoyama y col., 1979). Ambas toxinas causan sobre estas células disminución de su motilidad, de su efecto bactericida y de su capacidad fagocítica, lo cual produce una clara alteración en el mecanismo de defensa del hospedador (Speert, 1993).

Las endotoxinas, lipopolisacáridos complejos, son parte integral de la pared celular de las bacterias gram negativas y probablemente la fracción de lípido A sea responsable de su toxicidad. Por lo general, causan fiebre en el huésped mediante la liberación de interleucina-1 y otros mediadores y conducen a una gran variedad de eventos inflamatorios. Su síntesis es dirigida por genes

cromosómicos, a diferencia de las exotoxinas, que frecuentemente son controladas por extracromosómicos, por ejemplo, plásmidos. La comparación de la toxicidad de las endotoxinas de *P. aeruginosa* con la de otros bacilos, indica que éstas son moderadas aunque no menos importantes en cuanto a su participación en los mecanismos de la patogenicidad observada en esta bacteria.

Como se mencionó anteriormente, *P. aeruginosa* sintetiza y excreta una proteína con actividad enzimática denominada PLC, ésta es capaz de catalizar la hidrólisis de los fosfolípidos fosfatidilcolina y esfingomiélna, usualmente componentes de la membrana celular de eucariontes pero no de procariontes. Los productos de reacción son, por lo general, fosforilcolina, esfingosina y diacilglicerol; este último puede por sí mismo, resultar tóxico en los animales (Besterman y col., 1986). Además, esta proteína muestra actividad hemolítica (Kurioka y Liu, 1967, Liu, 1979) y por ambas razones, se la considera como una toxina asociada a la virulencia de la bacteria. Esta PLC, purificada a homogeneidad, manifiesta un peso molecular entre 70 y 78 kDa (Watanabe y col., 1978, Berka y Vasil, 1982, Lucchesi y Domenech, 1994). Su presencia es regulada, al igual que la de fosfatasa alcalina, por el nivel de fosfato en el medio, resultando máxima la actividad de ambas cuando éste es bajo. En nuestro laboratorio se demostró que la síntesis de esta PLC no es reprimida, a diferencia de fosfatasa alcalina, por altas concentraciones de fosfato cuando la bacteria crece con colina o betaína como fuente de carbono y de nitrógeno (Lucchesi y col., 1989). Esto sugiere que la expresión de esta PLC no es regulada únicamente por el nivel de fosfato externo. Estudios genéticos condujeron al hallazgo de una segunda PLC que no posee actividad hemolítica, pues no hidroliza esfingomiélna, pero sí fosfatidilserina y fosfatidilcolina. Posee un peso molecular de 73.000 y una extensa homología con la anterior (Ostrovff y col., 1990, Pritchard y Vasil, 1986).

A la primera fosfolipasa C, que posee actividad hemolítica, se la designa PLC-H y a la segunda, sin esta actividad, PLC-N. La importancia de ambas en la virulencia de *P. aeruginosa* es aún hoy discutida, a pesar de que se le atribuyen acciones diversas tales como: agregación plaquetaria, liberación de mediadores inflamatorios y causal de muerte cuando es inyectada en ratones (Berk y col., 1987).

Colina es una base de amonio cuaternario que integra los fosfolípidos estructurales de organismos eucariontes. Por ejemplo, dipalmitoil fosfatidilcolina es el principal constituyente de la membrana surfactante del

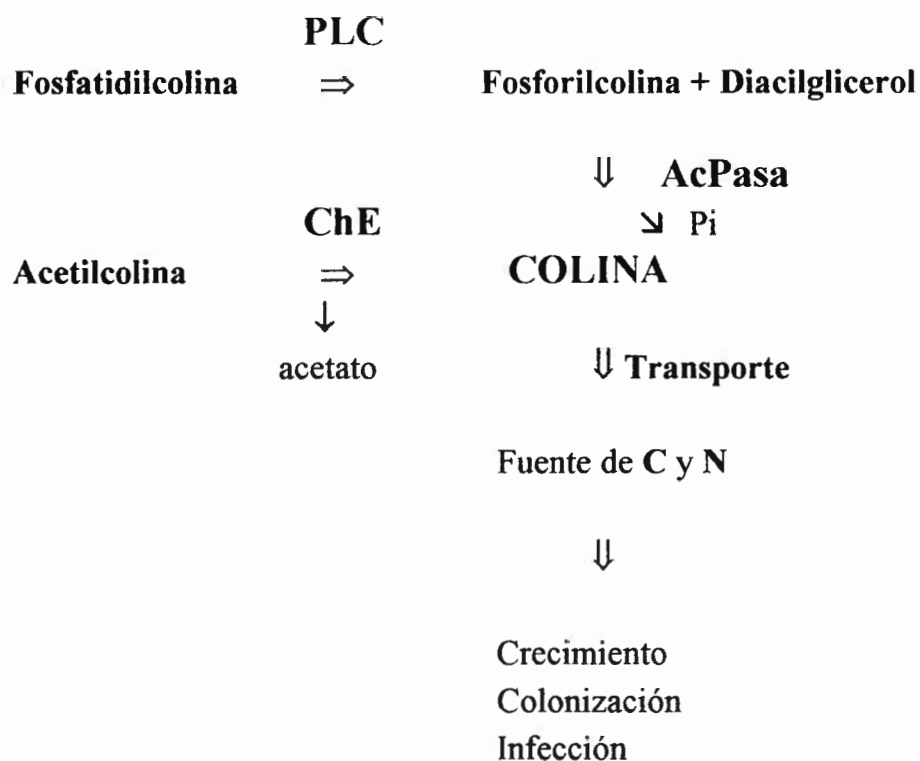
pulmón (Berka y Vasil, 1982). Como acetilcolina se la encuentra en la córnea (Pesin y Candia, 1982) y en forma libre es abundante en el tracto urinario (Kunin y col., 1992).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que, con la sola excepción de medios con alta concentración de fosfato y fuentes preferenciales de carbono y de nitrógeno coexistiendo simultáneamente, la presencia de colina en ellos es responsable de la inducción de ChE, Ac.Pasa y PLC y la acción combinada de ellas, involucrada en la patogenicidad de *P. aeruginosa* (Lisa, y col., 1994).

Además, la presencia de colina en el medio de cultivo causa la inducción de un sistema de transporte activo de colina que le otorga a la bacteria capacidad para captarla en un amplio rango de concentración, pues éste posee dos K_m , uno de alta afinidad ($3 \mu\text{M}$) y otro de baja afinidad ($400 \mu\text{M}$) (Salvano y col., 1989).

Anteriormente se propuso a dos de ellas, ChE y Ac.Pasa como enzimas con capacidad para contribuir a la infección del tejido corneal (Domenech y col., 1991).

Un resumen de lo descripto puede ser representado en el siguiente esquema:



La utilización de este mecanismo facultaría a *P. aeruginosa* el asentamiento y la consecuente infección de pulmón, córnea y vías urinarias, de hecho descritas en la literatura.

Este trabajo ha sido orientado a profundizar el conocimiento de una de las enzimas participantes en el esquema propuesto, la fosfatasa ácida (AcPasa).

FOSFATASAS

Se designa genéricamente con el término **fosfatasa**, aquellas enzimas que catalizan la hidrólisis del fosfato, presente en compuestos fosforilados mediante una unión éster o anhídrido.

Las fosfatasas se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza y se estima que difícilmente no pueda ser detectada su actividad en seres vivos. Se han obtenido preparaciones puras de fosfatasas o bien estudiado profundamente su actividad, a partir de vegetales (Fernandez y Ascencio, 1994; Perl y col., 1993; Pirck y col., 1993), batracios (Kubicz y col., 1978), peces (Kubicz y col., 1985), parásitos (Remaley y col., 1985), levaduras (Mizunaga, 1979), bacterias (Bennum y Blum, 1966; Cheng y col., 1970; Day e Ingram, 1973; Ma y Kantrowitz, 1994; Ingham y col., 1980), ratas (Leone y col., 1995), humanos (Hollander, 1971; Hamilton y col., 1990; Vihko, 1979; Dissing y col., 1979) y aún de pelos (Miyagawa y Eguchi, 1981).

Estas enzimas se dividen en dos grandes grupos según el pH óptimo en el cual muestran su máxima actividad. Las fosfatasas alcalinas lo hacen en valores de pH próximos a 8 o superiores, mientras que las fosfatasas ácidas en pH cercanos a 5. Una inusual fosfatasa ácida, con pH óptimo de 2.5, ha sido descrita en *E. coli*, la cual podría constituir un tercer tipo (Touati y Danchin, 1987).

En general se ha observado que las fosfatasas alcalinas obtenidas de *E. coli* (Chang y col., 1986), *Saccharomyces cerevisiae* (Kaneko y col., 1987), animales (Terao y Mintz, 1987), y humanos (Kam y col., 1985) tienen una considerable similitud en su composición de aminoácidos. Por el contrario, los genes de fosfatasas ácidas obtenidos de distintos organismos (*PHO3*, *PHO5* y *POH11* de *S. cerevisiae* [Bergman y col., 1986], *POH1* de *Schizosaccharomyces pombe* [Elliott y col., 1986] y la secuencia parcial conocida de la fosfatasa ácida con pH óptimo de 2.5 de *E. coli*, mencionada anteriormente, no muestran secuencia de aminoácidos altamente conservadas (Pond y col., 1989). Con la misma amplitud

se puede decir que las fosfatasa s ácidas provenientes de distintas fuentes, difieren en su respuesta a compuestos como formaldehido, tartrato, molibdato y distintos cationes divalentes , pero muestran inhibición por fluoruros, tanto en eucariotas como procariotas (Hollander, 1971). Las alcalinas son, por lo general, dependientes de magnesio e inhibidas por zinc y ambas, rara vez, muestran alta especificidad de sustrato aunque sí, influencia del medio para su expresión (Pradel y Boquet, 1988). La frecuente inespecificidad observada en las fosfatasa s dificulta, en ocasiones, la comprensión cabal de su participación en un fenómeno fisiológico.

Un tipo distinto de fosfatasa s son las denominadas proteínfosfatasa s, que utilizan como sustratos fosfoproteínas (fosforiladas en uno o más de uno de sus aminoácidos constituyentes). Su actividad fue descrita en los años cuarenta, pero es en la actualidad cuando se está comprendiendo su vital importancia fisiológica, puesto que participan, en estrecha relación con las proteínquinasas, en la regulación de las señales celulares. Por ejemplo, la fosforilación del aminoácido tirosina de ciertas proteínas es una importante manera por la cual la célula controla su comportamiento (Gould y Nurse, 1989) y tanto la quinasa que fosforila la tirosina (PTKasa) como la fosfatasa que defosforila el aminoácido (PTPasa) son necesarias para mantener el balance homeostático requerido por las señales celulares mediadas a través de la proteína fosforilada (Matthews y col., 1992).

Las PTPasas han sido identificadas en virus (Guan y col., 1991), bacterias (Guan y Dixon, 1990), artrópodos (Streuli y col., 1989), nemátodos (Matthews y col., 1991) y mamíferos (Gu y col., 1991) y el estudio de sus estructuras primarias revela que poseen algunos dominios altamente conservados y otros muy divergentes.

La estimulación de la transcripción de ciertos genes, debido a la acción combinada de AMP cíclico (cAMP) y una proteínquinasa A (PKA) y que culmina con la fosforilación de un factor proteico denominado P-CREB, ha mostrado que generalmente se caracteriza por un rápido incremento en la velocidad de transcripción de los respectivos genes, seguido de un retorno lento a los niveles de transcripción normal, aún cuando la actividad de la PKA es sumamente elevada. Se especula que un mecanismo regulatorio de este proceso se debe a la acción de una proteínfosfatasa nuclear que defosforila el P-CREB (Wadzinski y col., 1993). Esto es apoyado por el hecho que la fosforilación de CREB por PKA, en células o extractos nucleares, es muy aumentada por la

presencia de ácido okadaico, un fuerte inhibidor de proteínfosfatasas (Hagiwara y col, 1992).

Muy recientemente, se ha descrito una fosfatasa alcalina de tejido humano, la cual mediante estudios con inhibidores específicos como orthovanadato, ácido okadaico y bifosfonatos, reveló tener actividad de proteínfosfatasa (Shinozaki y col., 1995). Esto es de gran importancia puesto que alberga la posibilidad de que aquéllas fosfatasas (ácidas y alcalinas) que no demuestran una especificidad de sustrato estrecha y por lo cual se hace difícil ubicar su importancia fisiológica, la tengan en realidad, por actuar como proteínfosfatasas participando en la regulación de señales celulares.

FOSFATASA ACIDA (AcPasa) de *P. aeruginosa*

Esta fosfatasa ácida de *P. aeruginosa*, cuya actividad es inducida por colina y sus metabolitos relacionados, cuando son utilizados como fuente de carbono, nitrógeno o de carbono y nitrógeno, demuestra ser una fosfatasa diferente a las halladas en otras bacterias gram negativas. Las mismas sustancias no fueron efectivas como fuente de carbono ni inductoras de dicha actividad en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Enterobacter liquefaciens* y *Proteus mirabilis* (Lisa y col., 1984), lo cual indicó que no sólo es suficiente la presencia del inductor en el medio, sino que éste debe ser metabolizado para actuar como tal. Por otra parte, la presencia de colina, betaína o acetilcolina en el medio de reacción, causaron inhibición de la AcPase pero no de las actividades fosfatasas en las bacterias mencionadas. Del mismo modo, fosforilcolina (P-colina) 5 mM demostró ser un fuerte inhibidor de AcPase sin afectar a las fosfatasas de los otros gérmenes (Lisa y col., 1984).

La actividad de AcPase, medida con p-NPP, no fue modificada por cationes monovalentes, pero sí, al igual que otras fosfatasas ácidas, fue activada por la presencia de cationes divalentes como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} e inhibida por fluoruro, ATP y Pi, (Lisa, 1985).

El estudio de la acción de compuestos de amonio cuaternario con distinto grado de N-metilación, aminoalcoholes y aminoácidos con diferentes sustituyentes sobre el átomo de nitrógeno y alcoholes análogos a esta serie pero sin el grupo $-NH_2$, condujo a proponer que AcPase posee un sitio aniónico y un subsitio con afinidad para metilos, similar al propuesto para ChE, (Garrido y col., 1988).

La actividad de la enzima se localiza en el espacio periplásmico de la bacteria y su medición con distintos sustratos mostró que la mayor eficiencia catalítica (V_{\max}/K_m) se obtuvo con P-colina, quien ejerció inhibición por sustrato, lo cual justifica que haya sido considerado anteriormente un fuerte inhibidor. Por este motivo se propuso que la fosfatasa ácida de *P. aeruginosa* debía ser una fosforilcolina fosfatasa (Garrido y col.,1990), con un importante rol fisiológico resumido en el esquema presentado anteriormente.

MATERIALES

Y

METODOS

CEPA BACTERIANA

Pseudomonas aeruginosa Fildes III, 1924, National Culture Type Collection, Reino Unido.

MEDIOS DE CULTIVO

a) Medio nutritivo sólido: la cepa bacteriana fue conservada mediante repiques mensuales en un medio que tuvo la siguiente composición: Triptona 1,0 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 % y agar 1,5 % (Sambrook y col., 1989).

b) Medio nutritivo líquido: la composición de este medio fue similar a la descrita en a) pero omitiendo el agregado de agar. Se lo utilizó con el fin de obtener un buen rendimiento en masa celular bacteriana para realizar inóculos (Sambrook y col., 1989).

c) Medio mineral mínimo: este medio líquido tuvo la siguiente composición: KH_2PO_4 22,0 mM, Na_2HPO_4 17,0 mM, NaCl 8,5 mM, MgSO_4 0,8 mM.

Para evitar precipitaciones salinas, la solución de MgSO_4 fue esterilizada por separado y mezclada con el resto del medio de cultivo, previamente llevado a pH 7,4 en el momento de su utilización, según lo descrito en (Lisa, 1985). A este medio basal se le agregó, en el momento de usar, colina 20 mM como fuente de carbono y de nitrógeno. Cuando se utilizó como fuente de carbono solamente, el medio se suplementó con NH_4Cl 18,7 mM.

CONDICIONES DE CULTIVO

La cepa bacteriana fue cultivada en frascos Erlenmeyer con el medio de cultivo señalado, manteniéndose una relación 1/10 entre el medio de cultivo y la capacidad del frasco. El cultivo se inició con el agregado de un inóculo al 1 % v/v, que se hizo crecer previamente a 37 °C con agitación y estandarizado de la siguiente manera: una ansada de bacterias crecidas en medio nutritivo sólido, se incubó en 5 ml de medio nutritivo líquido hasta alcanzar una $D.O_{660}$ de 0,7. Simultáneamente, se adicionaron las fuentes de carbono y de nitrógeno

previamente esterilizadas. Los cultivos se mantuvieron en un baño de agua termostático a 37 °C con agitación rotatoria (150 rpm) y su crecimiento fue determinado por medición de la absorbancia a 660 nm, a fin de eliminar la debida a pigmentos pociánicos (Cheng y col., 1970).

Las células fueron cosechadas al final de la fase logarítmica (D.O.= 0,700-0,900) por centrifugación en frío a 10.000 g durante 5 minutos y lavadas dos veces con solución fisiológica (NaCl 155 mM). Si la obtención de la fuente enzimática no fue realizada inmediatamente, el precipitado celular fue conservado hasta su utilización a -20 °C.

OBTENCION DE PROTEINAS PERIPLASMICAS

Como la AcPase es una enzima de ubicación periplásmica, se procedió a extraer las proteínas de este compartimento por dos métodos diferentes:

a) Tratamiento con cloroformo (Ferro-Luzzi Ames, y col., 1984) con algunas modificaciones introducidas en el laboratorio. El precipitado celular fue tratado con cloroformo en la proporción de 4,68 ml por cada gramo de células (peso húmedo), agitado enérgica y periódicamente a temperatura ambiente durante 15 minutos, luego se agregaron 10 volúmenes de solución amortiguadora [tris(Hidroximetil)aminometano] (Tris)-HCl 0,01 M, pH 8 y se centrifugó a 20.000 g durante 20 minutos, manteniendo la temperatura en 4 °C. El sobrenadante, conteniendo las proteínas periplásmicas, fue extraído y el remanente de cloroformo eliminado por burbujeo de N₂ o bien por agitación en vaso de precipitación a temperatura ambiente.

b) Tratamiento con EDTA-lisozima (Lisa y col., 1983), el precipitado celular se resuspendió en solución amortiguadora Tris-HCl 0,2 M, pH 8, manteniendo una relación aproximada de 15 mg de bacterias (peso húmedo) por ml de solución. Esta suspensión se llevó al doble de volumen por el agregado de sacarosa 1 M, EDTA 0,001 M en Tris-HCl 0,2 M, pH 8 y luego de agitar a temperatura ambiente durante 5 minutos, se le agregó lisozima hasta una concentración final aproximada de 100 µg/ml. La suspensión se diluyó con 4 volúmenes de agua destilada fría y se mantuvo en agitación durante 75 minutos, luego se centrifugó a 20.000 g durante 20 minutos y el sobrenadante conteniendo las proteínas periplásmicas, fue extraído.

Por ambos métodos se recuperó el 78 % de la actividad enzimática total presente en célula entera.

PURIFICACION DE LA ENZIMA

a) Purificación parcial : este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a Garrido y col., (1988). El extracto periplásmico obtenido, fue dializado contra agua destilada toda la noche y centrifugado a 20.000 g durante 20 minutos. Al sobrenadante se le agregó solución amortiguadora de fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,4 hasta lograr una concentración final de 0,1 M. A esta solución se le adicionó, lentamente y agitando, otra de $MnCl_2$ 0,1 M hasta alcanzar una concentración 0,01 M, se agitó durante 15 minutos más y centrifugó a 20.000 g por 20 minutos. Al sobrenadante, de aspecto claro y conteniendo la mayoría de la actividad de AcPasa, se le agregó $(NH_4)_2SO_4$ sólido hasta obtener el 30 % de saturación. Después de 30 minutos de agitación se centrifugó como antes y el sobrenadante se llevó con la misma sal al 90 % de saturación. El precipitado obtenido por centrifugación se resuspendió en una pequeña cantidad de solución amortiguadora Tris-ClH 0,05 M, pH 7,4 y posteriormente, fracciones de 1 ml fueron sembradas en una columna de filtración molecular (1,0 cm x 45,0 cm) conteniendo Sephacryl S-200, equilibrada y eluída con el mismo buffer. Las fracciones conteniendo la actividad de AcPasa fueron mezcladas y llevadas con sulfato de amonio sólido al 90 % de saturación y centrifugadas 20 minutos a 20.000 g. El precipitado, disuelto en un pequeño volumen de la misma solución y guardado a 4 °C, conservó la actividad de la enzima al menos durante 3 meses. Alícuotas de esta suspensión fueron centrifugadas y disueltas en agua destilada, pasadas a través de una columna (0,5 cm x 5,0 cm) de Sephadex G-25, equilibrada y eluída con agua destilada. La actividad específica de esta preparación, libre de ChE, fue alrededor de dos veces mayor que la observada en el extracto periplásmico crudo (aproximadamente 1400 U/mg de proteínas).

b) Purificación a homogeneidad

Tratamiento con calor: la enzima contenida en extracto periplásmico (EP) fue sometida a la acción del calor en presencia de Tris-HCl 0,01 M, pH 8 (solución A) y en presencia de la misma solución amortiguadora con el agregado de: colina 0,5 mM, Mg^{2+} 2 mM (como $MgCl_2$) y fosfato 10 mM (como HNa_2PO_4) (solución B), durante distintos tiempos a 56 °C. La centrifugación de la muestra a 25.300 g durante 20 minutos, permitió descartar proteínas no

enzimáticas con el consecuente aumento de la actividad específica. Al sobrenadante se lo denominó extracto periplásmico calentado (EPØ).

Precipitación con sulfato de amonio: un volumen de EPØ, de aproximadamente 30 ml, se llevó a 40 % de saturación con sulfato de amonio sólido en baño de hielo y se corrigió el cambio de pH con el agregado de hidróxido de amonio 15 N, se dejó reposar durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó durante 20 minutos a 23.500 g. El precipitado resultante se resuspendió en un volumen constante de solución A y se le determinó la actividad enzimática y proteínas totales. El sobrenadante fue llevado a 50 % de saturación con el agregado necesario de sulfato de amonio sólido según Englard y Seifter (1990) y se procedió de manera similar a la descripta anteriormente. Este proceso se repitió hasta alcanzar el 60, 70, 80, 90 y 100 % de saturación. Los precipitados con mayor actividad específica fueron seleccionados, mezclados y sembrados en una columna de filtración molecular con Sephacryl S-200.

Cromatografía en Sephacryl S-200: la muestra, obtenida en el fraccionamiento con sulfato de amonio, fue sembrada en volúmenes de hasta 10 ml en una columna de filtración molecular con Sephacryl S-200 de 2,6 x 32,5 cm y equilibrada con solución A. La elución se llevó a cabo con la misma solución, a temperatura ambiente y con un flujo constante de 18 ml/hora, recogiendo fracciones de 3 ml a las cuales se les determinó la concentración de proteínas y la actividad enzimática. Los tubos con actividad de AcPase fueron reunidos en un único volumen de aproximadamente 30 ml (8-12 fracciones) y dializado contra sacarosa sólida, a 4 °C, hasta concentrarlo entre 5 y 10 veces. A esta muestra se le determinó la actividad enzimática y proteínas y se la denominó **1er. sephacryl**. Este 1er. Sephacryl fue sembrado nuevamente en la misma columna y eluido en las mismas condiciones anteriores. Los tubos con actividad enzimática fueron reunidos, dializados contra sacarosa sólida y a la solución obtenida, a la cual se le determinó actividad de AcPasa y proteínas, se le llamó **2do. sephacryl**.

Electroforesis en geles de poliacrilamida: las proteínas contenidas en las fracciones EP, **1er. sephacryl** y **2do. sephacryl**, fueron analizadas mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (Garfin, 1990). El gel

de poro fino tuvo una concentración de acrilamida de 10 % (P/V) y el de poro grueso de 2,5 % (P/V). Se utilizó como solución amortiguadora, en las cubas de electrodo, una mezcla compuesta por: 3,025 g de Tris, 14,4 g de glicina y 1,0 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) en un volumen final de 1000 ml, la cual tuvo un pH de 8,3. Las muestras fueron previamente disueltas en una solución que tuvo en un volumen final de 100 ml: 1,51 g de Tris, 20 ml de glicerol disuelto en 35 ml de agua bidestilada y luego de ajustar el pH a 6,75 con HCl concentrado, se le agregó 4 g de SDS, 10 ml de 2-mercaptoetanol y 0,002 g de azul de bromofenol. La mezcla se calentó en baño de agua a 100°C durante 3 minutos y se sembró cuidando de depositar en cada calle alrededor de 30 microgramos de proteína (Laemmli, 1970).

Después de la migración electroforética, los geles se tiñeron con "Coomassie Brilliant Blue" R-250 0,2 % (P/V) en metanol 40 %, ácido acético 10 % y se decoloraron con la misma solución pero sin el colorante, (Garfin, 1990).

DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES

El peso molecular (P.M.) de la enzima, en condiciones nativas, fue determinada mediante el uso de la columna de filtración molecular con Sephacryl S-200 descrita anteriormente. El volumen muerto de la columna (V_0) se midió utilizando Blue Dextran (P.M. $\cong 2 \times 10^6$) y como marcadores de peso molecular se usaron: β amilasa de papa dulce (P.M. = 2×10^5), alcohol dehidrogenasa de hongo (P.M. = $1,5 \times 10^5$), albúmina de suero bovino (P.M. = $6,6 \times 10^4$), anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (P.M. = $2,9 \times 10^4$) y citocromo C de corazón de caballo (P.M. = $1,24 \times 10^4$) [Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA]. Los volúmenes de elución (V_e) de cada proteína marcadora fueron determinados y se construyó una curva de calibración graficando el logaritmo de los P.M. conocidos en función de la relación V_e/V_0 .

El P.M. de la enzima en condiciones desnaturalizantes se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, llevadas a cabo de la misma manera a las descritas anteriormente y utilizando como proteínas testigos gliceraldehido 3-P- dehidrogenasa de músculo de conejo (P.M. = $3,6 \times 10^4$), anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (P.M. = $2,9 \times 10^4$), tripsinógeno de páncreas de bovino (P.M. = $2,4 \times 10^4$) e inhibidor de tripsina de soja (P.M. = $2,01 \times 10^4$) [Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA]. Una mezcla de estas

proteínas, conteniendo entre 15 y 30 μg de cada una de ellas, se sembró, corrió y reveló en las condiciones preestablecidas y los R_f correspondientes fueron calculados, incluyendo el de la AcPasa. Con estos datos se construyó una curva de calibración graficando logaritmo del P.M. en función de los respectivos R_f (Laemmli, 1970).

DETERMINACION DE PROTEINAS

Salvo en el caso de las fracciones de columnas cromatográficas, donde la concentración de proteínas fue estimada por las mediciones de absorbancia (D.O.) a 280 nm con un detector LKB Bromma, 2138 Uvicord S. e impresas con un registrador LKB Bromma 2210 recorder 1-channel, en todos los otros casos la cuantificación se llevó a cabo por el método de Bradford, utilizando como testigo una solución de seroalbúmina bovina de 1 mg/ml (Bradford, 1976).

MEDICION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

El ensayo standard de la actividad de AcPasa se llevó a cabo a 37 °C en una mezcla de reacción de volumen 0,5 ml y que contuvo: solución amortiguadora de acetato de sodio 0,2 M y pH 5, MgCl_2 0,002 M y las concentraciones correspondientes de p-nitrofenilfosfato de sodio (pNPP). Luego de agregar la enzima, los tubos conteniendo la mezcla fueron incubados durante 15-30 minutos y la reacción fue detenida por el agregado de 0,5 ml de NaOH 2 N. El p-nitrofenol formado fue cuantificado mediante la lectura de la absorbancia a 410 nm.

Cuando se utilizó como sustrato fosforilcolina o fosforiletanolamina, en las concentraciones descriptas en cada caso, se trabajó en las mismas condiciones anteriores y 0,5 ml de la mezcla fueron incubadas a 37 °C durante 60-120 minutos. La reacción se detuvo mediante el agregado de 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 40 %. El fosfato (Pi) liberado se determinó por el método de Fiske y Subbarow (Fiske y Subbarow, 1925). Para ello, se agregó 0,25 ml de mezcla sulfomolibdica y 0,25 ml de mezcla reductora (pictol 1 %, sulfito de sodio 3 %). Luego de agitar, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 660 nm. La mezcla sulfomolibdica contuvo: 25 g de molibdato de amonio disuelto en 200 ml de ácido sulfúrico 10 N y luego diluído con agua bidestilada a un volumen final de 1000 ml.

Cuando la actividad enzimática se midió a pH 7,4 la solución amortiguadora de acético- acetato de sodio 0,2 M fue reemplazada por N-(2-hidroxieltipiperacine-N'-[2-ácido etanosulfónico]) (HEPES) 0,1 M.

Cuando se estudió la influencia del pH del medio sobre la actividad enzimática, el rango de pH 5 a 8 se consiguió mediante la mezcla adecuada de acético-acetato de sodio 0,2 M y HEPES 0,1 M, con el objeto de descartar acciones específicas de cualquiera de estas dos sustancias sobre la enzima.

Se definió como unidad de AcPasa la cantidad de enzima que cataliza la formación de un nanomol (nmol) de p-nitrofenol o fósforo inorgánico, por minuto y a 37 °C.

Los resultados cinéticos fueron analizados utilizando las ecuaciones apropiadas descritas en (Segel, 1975; Dixon, 1979). Para un sistema birreactante al azar (ver esquema en resultados) y bajo condiciones de rápido equilibrio, la ecuación de velocidad (v) de la reacción es:

$$v = k_p [E A S]$$

donde k_p es la constante de velocidad y E (enzima), A (catión activador) y S (sustrato). Por lo tanto

$$v/[E]_t = k_p [E A S] / [E] + [EA] + [ES] + [EAS]$$

Designando ($k_p [E]_t$) como V_{max} y sustituyendo, se obtiene la ecuación:

$$v/V_{max} = [A] [S] / \alpha K_A K_m + \alpha K_A [S] + \alpha K_m [A] + [A] [S]$$

(Segel, 1975, pag. 274) a partir de la cual se obtuvieron las ecuaciones utilizadas en resultados, para determinar las constantes cinéticas de la enzima.

Para un sistema birreactante ordenado (ver esquema en resultados) y teniendo en cuenta que ahora $[E]_t = [E] + [EA] + [EAS]$ resulta:

$$v/[E]_t = k_p [EAS] / [E] + [EA] + [EAS]$$

y expresando EA y EAS en términos de [E], se obtiene la ecuación:

$$v/V_{max} = [A] [S] / K_A K_m + K_m [A] + [A] [S]$$

(Segel, 1975, pag. 321) a partir de la cual se obtuvieron las diferentes ecuaciones utilizadas.

Cuando se trabajó con iones metálicos en presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), las concentraciones libres del metal en solución se calcularon mediante el uso de un programa iterativo de computadora, cedido gentilmente por el Dr. J. Kleineke, Bioquímica Clínica, Centro de Medicina Interna, Universidad de Göttingen, Alemania. Las constantes de estabilidad respectivas fueron tomadas de (Bartfai, 1979). Básicamente, las ecuaciones utilizadas por el programa, permiten conocer la cantidad total del

catión que se debe agregar, para obtener la concentración libre deseada del mismo, en presencia de una concentración fija de EDTA y a un valor de pH determinado. Las constantes efectivas de estabilidad, para pH 5, fueron: 2,28 ; $2,33 \times 10^{12}$ y $1,69 \times 10^9$, para Mg^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} respectivamente.

DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO

La determinación del punto isoeléctrico (pI) fue realizada mediante la técnica de isoelectroenfocado (modelo 111 Mini IEF de Bio-Red), utilizando geles de poliacrilamida (5-6 %) no desnaturalizantes y una mezcla de proteínas marcadoras de pI (Bio-Rad, N° de catálogo 161-0310) para un rango de 4,45-9,6. El gradiente de pH, entre 3 y 10 unidades, se obtuvo mediante una mezcla de anfolitos de la misma marca. Un volumen de 2 μ l de la muestra, conteniendo aproximadamente 0,5 μ g de proteína, fue depositada y se le aplicó un voltaje de 100 V durante 15 minutos, 200 V en los siguientes 15 minutos y finalmente 450 V durante 60 minutos. El gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 y lavado con la misma solución pero sin colorante.

Los pIs fueron calculados gráficamente mediante la construcción de una curva con la distancia recorrida (mm) en función de los respectivos valores de pI. Las proteínas marcadoras fueron: ficocianina (3 bandas), pIs = 4,45; 4,65 y 4,75; β -lactoglobulina B, pI = 5,1; anhidrasa carbónica bovina, pI = 6,0; anhidrasa carbónica humana, pI = 6,5; mioglobina equina (2 bandas), pIs = 6,8 y 7,0; hemoglobina A humana, pI = 7,1; hemoglobina C humana, pI = 7,5; lectina (3 bandas), pIs = 7,8; 8,0 y 8,2 y citocromo C con pI = 9,6 .-

RESULTADOS

PURIFICACION DE LA ENZIMA

TRATAMIENTO CON CALOR

Fosfatasa ácida (AcPasa) de *P. aeruginosa* es una enzima de localización periplásmica (Garrido y col., 1990), por tal motivo, el objetivo primario fue extraer las proteínas de este compartimento bacteriano y para ello se utilizaron dos métodos diferentes: uno mediante el tratamiento con cloroformo y el otro con EDTA-lisozima. En ambos se recuperó el 78 % de la actividad enzimática presente en células enteras, tal como se describió en Materiales y Métodos.

Con el fin de conocer el grado de resistencia de esta enzima al tratamiento con calor, se calentó el extracto periplásmico (EP) a distintos tiempos y se midió la actividad enzimática remanente.

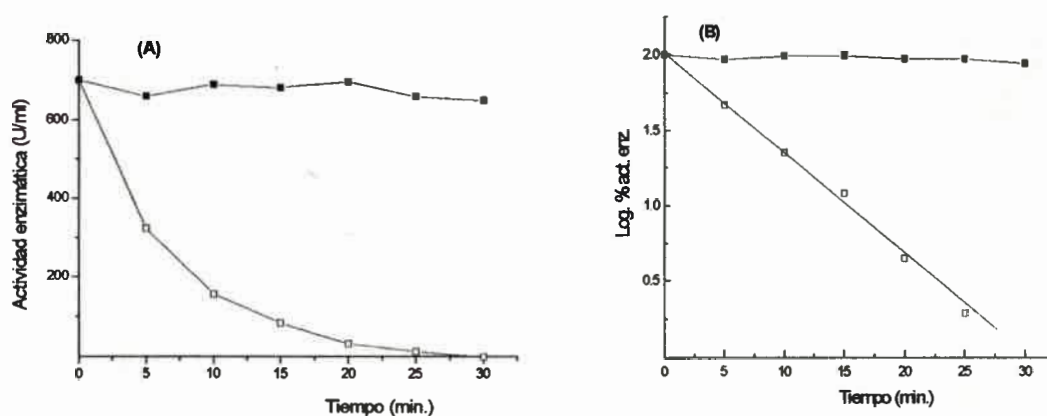


Figura 1: Dos muestras de EP fueron incubadas en baño de agua a 56 °C: (□) en presencia de Tris-HCl 0,01 M, pH 8 (solución A) y (■) en la misma solución pero con el agregado de colina 0,5 mM, MgCl₂ 2 mM y HNa₂PO₄ 10 mM (solución B). A los tiempos indicados en las figuras, se midió la actividad de AcPase a pH 5 y con pNPP 10 mM como sustrato. (A) gráfico directo de las actividades enzimáticas medidas en función del tiempo. (B) gráfico del logaritmo de los porcentajes de las actividades en función del tiempo, del cual se calculó $k = 0,154 \text{ min}^{-1}$.

La Figura 1 muestra que la AcPase es termoestable sólo cuando la solución amortiguadora en la que se halla contiene colina, Mg²⁺ y fosfato inorgánico (Pi). Esta protección a la desnaturalización por calor, se puede interpretar como que los ligandos (colina, Mg²⁺ y Pi) interaccionan con la estructura proteica produciendo un efecto estabilizador, similar al ejercido por los sustratos cuando se hallan frente a sus respectivas enzimas (Dixon y Weeb,

1979). En ausencia de los mismos, se inactiva rápidamente siguiendo una cinética de primer orden con una $k = 0,154 \text{ min}^{-1}$, calculada a partir de la ecuación:

$$\log \% \text{ act. enz.} = - 2,3 k t$$

donde t expresa el tiempo de calentamiento de la enzima y se considera 100 % de actividad enzimática a $t = 0$.

El comportamiento de la enzima frente al tratamiento con calor, permitió utilizar este procedimiento como un primer paso de purificación, ya que aquellas proteínas que en esas condiciones de temperatura se desnaturalizaron, pudieron ser separadas por centrifugación con el consiguiente aumento de la actividad específica del EP.

Tabla 1: Tratamiento de EP de *P. aeruginosa* con calor.

Tiempo de \emptyset (minutos)	Proteínas Totales (mg)	Actividad Específica	Purificación (N° de veces)	Recuper. (%)
0	19,60	702	1,00	100
10	12,84	1078	1,54	101
20	10,41	1323	1,88	100
30	10,20	1289	1,84	97
60	9,00	891	1,27	58

Un volumen de 20 ml de EP en solución B, fue calentado a 56 °C en baño de agua. A los tiempos indicados una muestra de 5 ml fue extraída y centrifugada 20 minutos a 25300 g y a 4 °C. En el sobrenadante se determinó actividad enzimática frente a p-NPP 10 mM y proteínas. Los valores obtenidos a tiempo cero se midieron en 5 ml de EP sin calentar y no incluidos en el volumen de 20 ml.

La Tabla 1 revela que el calentamiento del EP, durante 20 minutos, permitió eliminar el 46,9 % de proteínas sin actividad de AcPase, purificando la enzima 1,88 veces y con una recuperación del 100 %. Al EP así obtenido se lo denominó extracto periplásmico calentado (EP \emptyset) y ésta fue la muestra utilizada en el próximo paso de purificación.

PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

Experimentos anteriores mostraron que la enzima no precipitaba en una solución al 40 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pero, llevado el porcentaje a cifras cercanas al 90 %, lo hacía prácticamente en su totalidad. Sin embargo,

no permitía un buen grado de purificación y recuperación de la enzima. Estos antecedentes sugirieron realizar un fraccionamiento salino en forma gradual, para evitar el efecto de coprecipitación, probablemente responsable de los resultados obtenidos.

Tabla 2: Precipitación gradual con sulfato de amonio del EPØ de *P. aeruginosa*.

Muestra	Prot. Totales (mg)	Act. Total (U)	Act. Específica (U/mg)	Recuperación (%)
EP Ø	10,400	13.600,00	1.307,7	100,00
⊗ al 40 %	0,864	51,15	59,2	0,38
⊗ al 50 %	1,260	94,98	75,4	0,70
⊗ al 60 %	2,316	336,00	145,0	2,47
⊗ al 70 %	0,729	1.285,80	1.764,0	9,45
⊗ al 80 %	0,861	6.312,00	7.343,0	46,41
⊗ al 90 %	1,323	2.980,00	2.253,0	21,29
⊗ al 100 %	1,455	409,20	281,4	3,01
total	8,808	11.469,13		84,34

Un volumen de 20 ml de EPØ se llevó a 40 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido, en baño de hielo, corrigiendo la variación de pH con el agregado de NH_4OH 15 N, se dejó reposar 15 minutos y se centrifugó 20 minutos a 25.300 g en frío. El precipitado (⊗) se resuspendió con 1,5 ml de Tris-clorhídrico 10 mM, pH 8 (solución A) y se determinó actividad enzimática y concentración de proteínas. Al sobrenadante se lo llevó al 50 % de saturación mediante el nuevo agregado de la cantidad necesaria de sal sólida. Se repitió el mismo procedimiento hasta llegar al 100 % de saturación.

La Tabla 2 muestra que el tratamiento en forma gradual con sulfato de amonio fue efectivo, ya que permitió obtener una aceptable purificación de la enzima sin pérdida considerable de su actividad. Además, la mezcla de los precipitados al 70, 80 y 90 % conservó el 78 % de la actividad enzimática y sólo el 28 % de las proteínas, originando una actividad específica de 3.648 U/mg lo cual significó una purificación de 2,8 veces. Por esta razón, la reunión de los referidos precipitados se utilizó como fuente de enzima en el siguiente proceso de purificación.

FILTRACION MOLECULAR

Con el fin de lograr la obtención de la AcPase en forma pura, la muestra fue sometida a una cromatografía de exclusión molecular, para lo cual se sembraron volúmenes inferiores a 10 ml en una columna de Sephacryl S-200

equilibrada con solución A y tratada como se indicó en Materiales y Métodos. Los tubos con actividad de AcPase, en general entre 8 y 12, fueron reunidos y sometidos a diálisis contra sacarosa sólida, a 4 °C hasta concentrar entre 5 y 10 veces. La determinación de la actividad enzimática y concentración de proteínas reveló una recuperación del 78,6 % y una purificación de 13 veces con respecto a la muestra cargada en la columna. Esta muestra se denominó 1er. sephacryl y la Figura 2 muestra el respectivo cromatograma.

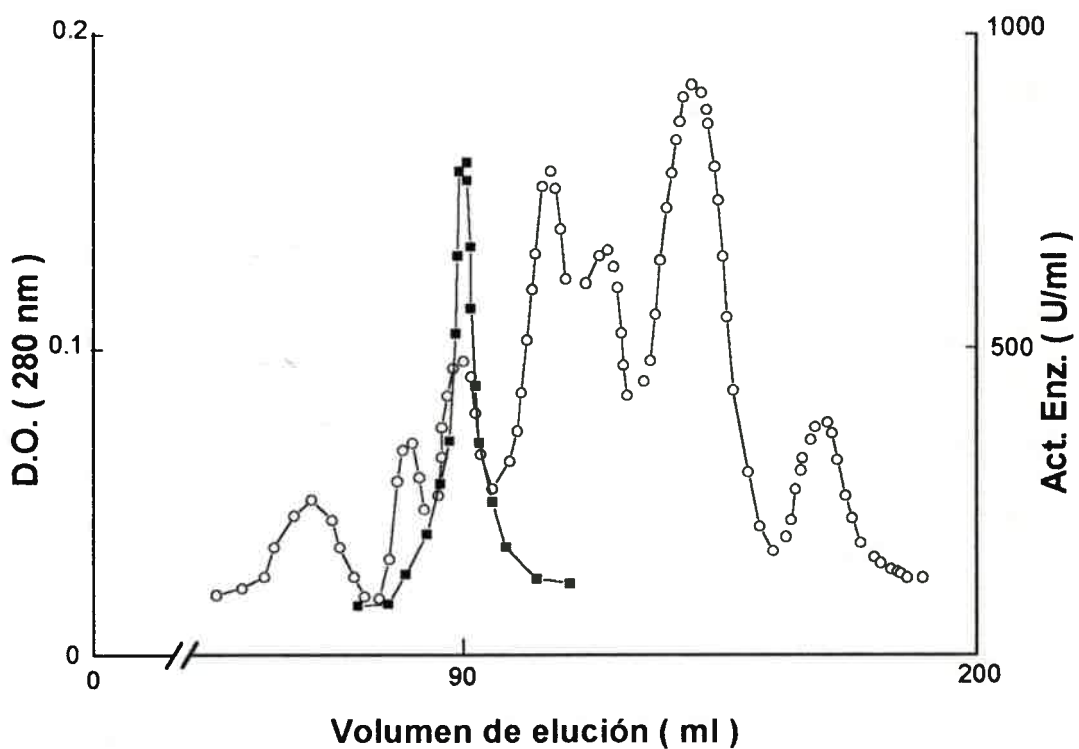


Figura 2: Primera cromatografía de exclusión molecular en columna de Sephacryl S-200. Las fracciones recogidas, con 3 ml c/u, fueron analizadas para actividad de AcPase con p-NPP 10 mM como sustrato (■) y la absorbancia (D.O.) a 280 nm revela concentración de proteínas (○).

Debido al alto grado de recuperación logrado en la muestra denominada 1er. sephacryl, probablemente a causa del reiterado uso de la columna lo cual se tradujo en la saturación de la retención inespecífica, el eluido fue sembrado nuevamente en la misma columna de Sephacryl S-200 y tratada de la misma

forma. La muestra obtenida luego de dializar los tubos con alta actividad enzimática contra sacarosa sólida, se denominó 2do. sephacryl. El análisis de la misma mostró una recuperación del 81,4 % de la actividad enzimática sembrada y sólo un 17,3 % de las proteínas con lo cual se logró incrementar casi cinco veces más el grado de purificación.

El sometimiento de esta muestra a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), reveló una única banda proteica cuando éstos fueron teñidos con "Coomassie Brilliant Blue" R-250, o con nitrato de plata (Figura 3). La misma figura muestra el contenido proteico de EP, 1er. sephacryl, 2do. sephacryl y de esta misma muestra pero previamente evaporada bajo corriente de nitrógeno, donde fue concentrada más de diez veces, a fin de corroborar la inexistencia de otra banda no revelada por baja concentración proteica.

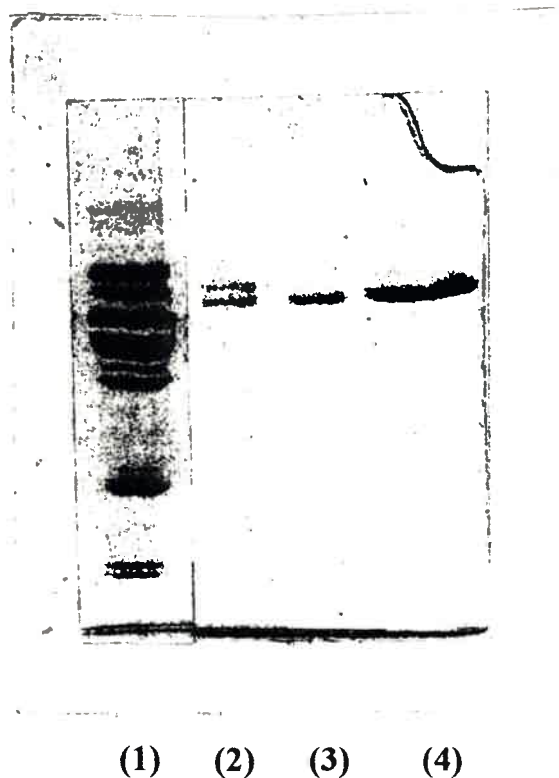


Figura 3: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, desarrollado y teñido como se indica en Materiales y Métodos. (1) EP, (2) 1er. sephacryl, (3) 2do. sephacryl y (4) 2do. sephacryl concentrado bajo corriente de nitrógeno.

La imagen del gel demostró la existencia de una única banda proteica, corroborando que se logró la purificación de la AcPasa a homogeneidad.

Los resultados obtenidos en el proceso total de purificación son resumidos en la Tabla 3. Su análisis revela que la enzima fue purificada 87 veces con respecto al EP original y con una recuperación aproximada del 50 %.

De ello surgió, además, que la cantidad total de AcPasa representa aproximadamente el 1.12 % del total de proteínas extraídas del espacio periplásmico de *P. aeruginosa*, crecidas en presencia de colina como fuente de carbono y de nitrógeno.

Tabla 3: Resumen del proceso de purificación de la AcPase de *P. aeruginosa*.

	volúmen (ml)	prot. tot. (mg)	enz. tot. (U)	Act.Esp. (U/mg)	purificac. Nº veces	recuper. (%)
EP	31,0	30,380	21.328	702	1,00	100,00
EP Ø	31,0	16,120	21.080	1.308	1,86	98,84
⊕ con (NH) ₄ SO ₄	7,0	4,515	16.399	3.632	5,17	76,89
1er. sephacryl	5,0	0,990	12.900	13.030	18,56	60,48
2do. sephacryl	1,8	0,171	10.500	61.404	87,47	49,23

Un volúmen inicial de 31 ml de EP fue tratado con calor, precipitado con sulfato de amonio en forma gradual y sometido a filtración molecular como se indicó en Materiales y Métodos. El proceso culminó con la obtención de 1,8 ml de una solución conteniendo 0,171 mg de la proteína enzimática pura.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA PCFasa

La determinación del peso molecular de la AcPasa de *P. aeruginosa*, se realizó mediante la utilización de la misma columna de exclusión molecular con la cual se logró la purificación a homogeneidad de la enzima. Para ello, ésta fue calibrada con proteínas marcadoras de peso molecular como se describe en Materiales y Métodos y el volumen muerto (V_0) de la columna se calculó utilizando Blue Dextran (P.M. = 2×10^6). Los volúmenes de elución (V_e) de cada una de ellas, incluyendo el de la AcPasa, fueron medidos en las mismas condiciones y a través de la relación lineal existente entre el cociente V_e/V_0 y el logaritmo del peso molecular, se determinó el P.M. de la enzima.

La Figura 4 muestra el cromatograma de elución obtenido con la columna de Sephacryl S-200 para cada una de las proteínas marcadoras de peso

molecular y el de la propia AcPase. Los volúmenes de elución respectivos fueron evaluados merced al seguimiento del perfil proteico medido por la absorbancia (D.O.) a 280 nm y por la actividad enzimática para la enzima. La relación de estos parámetros con sus correspondientes masas moleculares reveló un peso molecular para AcPase de 70.000 Da.

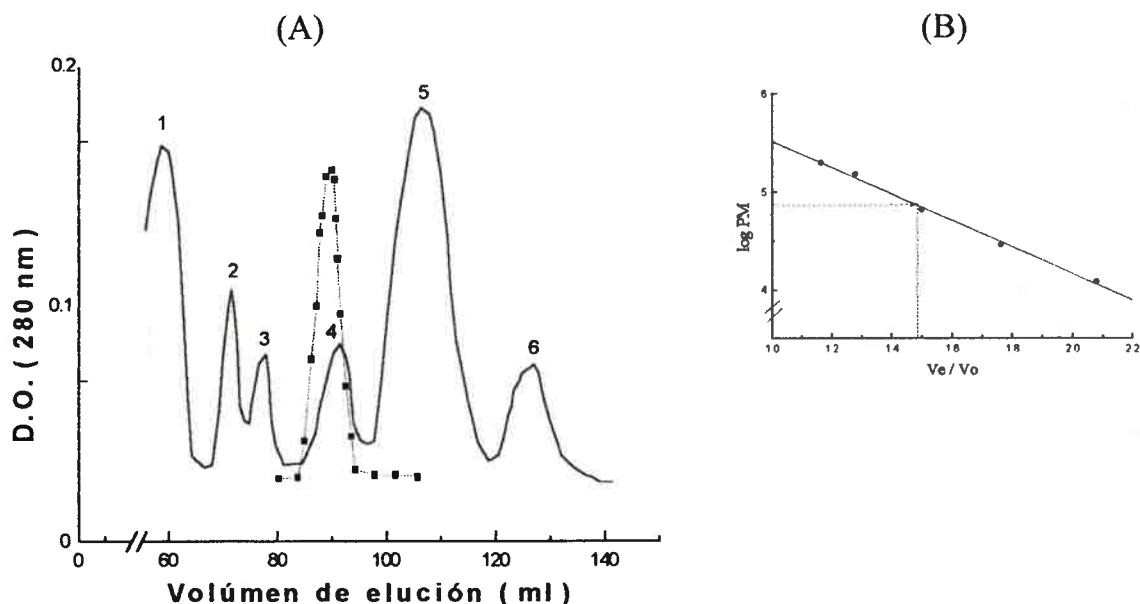


Figura 4: (A) Elución de las proteínas marcadoras de P.M. (—) y AcPase (■--■) en la columna de Sephacryl S-200. (1) blue dextran: P.M.= 2×10^6 y $V_e= 61,0$ ml; (2) β amilasa: P.M.= 2×10^5 y $V_e = 71,0$ ml; (3) alcohol deshidrogenasa: P.M. = $1,5 \times 10^5$ y $V_e = 78,0$ ml; (4) albúmina bovina: P.M. = $6,6 \times 10^4$ y $V_e = 91,5$ ml; (5) anhidrasa carbónica: P.M. = $2,9 \times 10^4$ y $V_e = 107,5$ ml; (6) citocromo C: P.M. = $1,24 \times 10^4$ y $V_e = 127,0$ ml; AcPase: $V_e = 90,0$ ml. (B) Cálculo del P.M. nativo de AcPasa según los datos de (A). Valor hallado: 70.000.-

A fin de conocer el grado de polimerización de la enzima (o si se trataba de una proteína monomérica), se determinó su peso molecular mediante la utilización de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), sobre los cuales se sembró una mezcla de proteínas marcadoras de peso molecular y el extracto conteniendo la AcPase en forma pura. La Figura 5 muestra una de las separaciones electroforéticas realizadas (Fig. 5-A) y el gráfico del logaritmo del P.M. en función de los Rf calculados (Fig. 5-B).

La aplicación del antilogaritmo al valor de la ordenada correspondiente a la proteína en cuestión, reveló un valor aproximado para el peso molecular de

la misma de 35.000 Da. De los datos aportados por las Figuras 4 y 5, se concluye que AcPasa se trata de una proteína dimérica de peso molecular 70.000, formada por monómeros de igual masa.

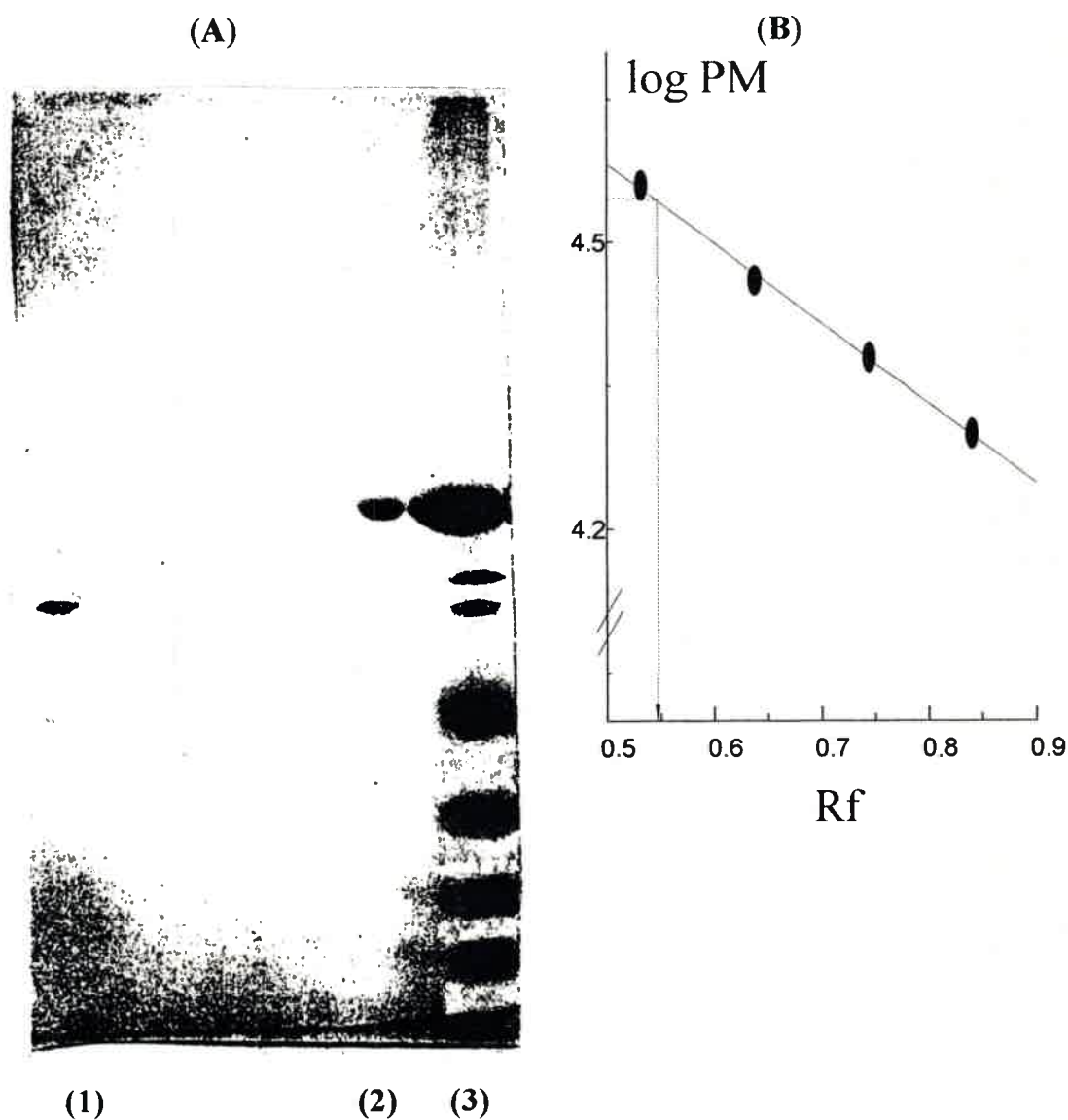


Figura 5: (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). (1) AcPase pura; (2) Albúmina Bovina; (3) Proteínas marcadoras de P.M. en orden descendente: albúmina bovina (P.M.= 66.000), albúmina de huevo (P.M.= 45.000), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (P.M.= 36.000), anhidrasa carbónica (P.M.= 29.000), tripsinógeno (P.M.= 24.000), inhibidor de tripsinógeno (P.M.= 20.100) y lactoalbúmina (P.M.= 14.200). (B) Gráfico del logaritmo del P.M. en función de los respectivos Rf (en orden creciente) para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, anhidrasa carbónica, tripsinógeno e inhibidor de tripsinógeno. Peso Molecular estimado de la proteína: 35.000.-

DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO DE LA PCFasa

Dos muestras de AcPasa obtenidas de diferentes extractos periplásmicos y purificadas a homogeneidad, fueron ensayadas para la determinación del punto isoeléctrico (pI) mediante la técnica del isoelectroenfocado, como se describe en Materiales y Métodos. En ambos casos se hallaron tres bandas proteicas con distinto pI. El primer ensayo reveló valores de 8,1; 7,5 y 4,3 respectivamente, mientras que en la segunda oportunidad se detectaron tres bandas con valores de 6,9; 5,0 y 4,75 para cada una.

CARACTERIZACION CINETICA DE LA ENZIMA

ACCION DE CATIONES DIVALENTES

Estudios previos realizados con extractos crudos (Lisa, 1985) o parcialmente purificados (Domenech y col., 1992) mostraron, entre otras propiedades, que la AcPasa de *P. aeruginosa* es activada por iones divalentes tales como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} y Co^{2+} y que cataliza la hidrólisis de los sustratos p-NPP (artificial), fosforiletanolamina (P-etanolamina) y fosforilcolina (P-colina). Este último fue propuesto como el sustrato fisiológico por Garrido y col., (1990).

Al tener la enzima purificada a homogeneidad, nuestro objetivo inmediato fue determinar las constantes cinéticas verdaderas y proponer el mecanismo de acción para los sustratos mencionados. Ello nos condujo a realizar los experimentos en presencia de EDTA a fin de conocer exactamente la concentración del catión activador en su estado libre en solución.

p-NPP COMO SUSTRATO

La determinación de la velocidad de reacción en función de concentraciones crecientes de sustrato y ante la presencia de diferentes cantidades de los iones Zn^{2+} , Cu^{2+} o Mg^{2+} , indicó que éstos eran activadores.

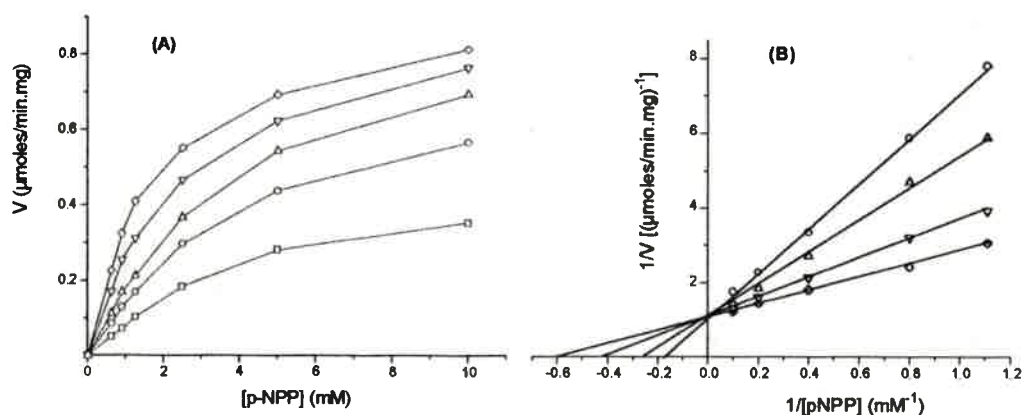


Figura 6: (A) Curva de saturación de AcPase de *P. aeruginosa* por p-NPP en presencia de diferentes concentraciones de Zn^{2+} libre (mM): $\square = 0,005$; $\circ = 0,010$; $\Delta = 0,015$; $\nabla = 0,030$ y $\diamond = 0,060$. La actividad de la enzima fue medida por incubación durante 30 minutos a 37°C , pH 5 y EDTA 1 mM. (B) Gráfico de doble recíproca (Lineweaver-Burk) correspondiente a los mismos datos.

La Figura 6 muestra las curvas de saturación por p-NPP y la activación producida por la presencia de Zn^{2+} . El gráfico de las inversas o dobles recíprocas permitió determinar los K_m aparentes y calcular la V_{max} verdadera ($1 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$) a partir de la ecuación

$$1/v = (K_m/V_{max})(1 + K_A/[A]) 1/[S] + 1/V_{max}$$

donde $[A]=[Zn^{2+}]$ y $[S]=[p\text{-NPP}]$

La Figura 7 muestra las curvas de saturación de la enzima por Zn^{2+} en presencia de distintas cantidades de p-NPP. Con el uso de la ecuación

$$1/v = (K_A/V_{max})(K_m/[S]) 1/[A] + (1 + K_m/[S]) 1/V_{max}$$

el gráfico de las dobles recíprocas permitió calcular los valores de K_A y V_{max} verdaderos ($0,05 \text{ mM}$ y $1 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ respectivamente) cuando $[S]$ tiende a infinito.

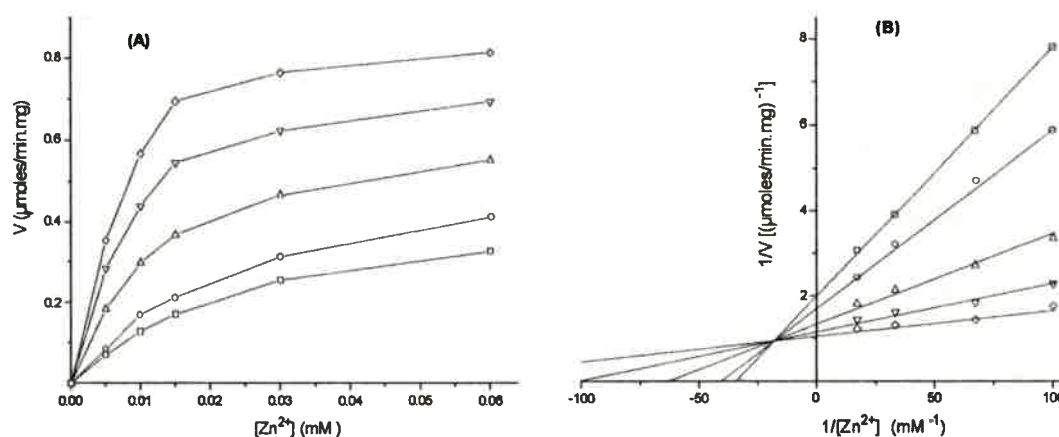


Figura 7: Curva de saturación de la enzima con Zn^{2+} en presencia de diferentes cantidades de p-NPP (mM): $\square= 0,9$; $\circ= 1,25$; $\Delta= 2,5$; $\nabla= 5,0$ y $\diamond= 10,0$. (A) gráfico directo. (B) dobles recíprocas con los mismos datos.

Con los datos obtenidos de la Figura 6-B (pendientes de $1/[S]$ y K_m aparentes) y utilizando las ecuaciones

$$\text{pendiente } 1/[S] = (K_m \cdot K_A / V_{\max}) (1/[A]) + K_m/V_{\max} \quad \text{y}$$

$$K_{m\text{ap}} = K_m \cdot K_A (1/[A]) + K_m$$

se construyó la curva que muestra la Figura 8-A, la cual permitió calcular el K_m verdadero (1,0 mM) y nuevamente, los V_{\max} y K_A verdaderos que fueron 1 $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ y 0,05 mM, respectivamente. Con la inversa de los K_A aparentes, calculados de la Figura 7-B y mediante la aplicación de la ecuación

$$1/K_{A\text{ap}} = (1/K_A K_m) [S] + 1/K_A$$

se recalculó el K_m y K_A verdaderos: 1,0 y 0,05 mM respectivamente, (Figura 8-B).

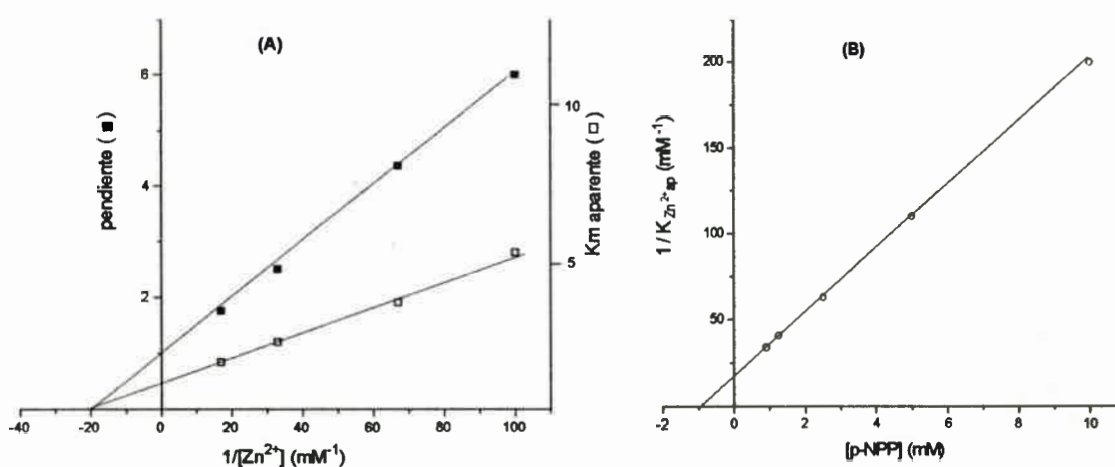
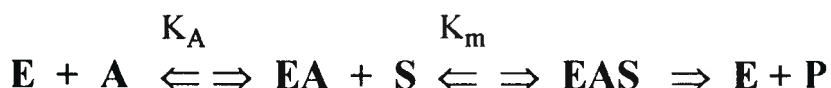


Figura 8: (A) Gráfico realizado con los datos obtenidos de la Figura 6 B que permite obtener los valores de K_m , V_{\max} y K_A verdaderos. (B) con datos obtenidos de la Figura 7 B y permite recalculer K_m y K_A verdaderos.

El cálculo de las constantes cinéticas descriptas para el sustrato y el catión activador, se basó en la utilización de gráficos primarios y secundarios derivados de la ecuación:

$$v / V_{\max} = [A] [S] / (K_A K_m + K_m [A] + [A] [S])$$

que corresponden a un sistema birreactante ordenado, donde, obligadamente, el activador (A) se une primero a la enzima (E), para formar el complejo (EA) y luego éste recibe al sustrato (S), constituyendo el complejo (EAS), quien finalmente libera el producto (P), suponiendo cinéticas de equilibrio rápido o estado estacionario (Segel, 1975).



En las mismas condiciones, se estudió el efecto de los cationes Mg^{2+} y Cu^{2+} , los cuales mostraron un comportamiento similar al hallado para el Zn^{2+} . Las concentraciones utilizadas del sustrato p-NPP fueron las mismas en los tres casos, mientras que para los activadores se usó 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 y 1,6 mM de Mg^{2+} y 0,005; 0,01; 0,02; 0,03 y 0,06 mM de Cu^{2+} . La Tabla 4 muestra las constantes cinéticas halladas para cada caso.

Tabla 4: Constantes cinéticas de AcPasa de *P. aeruginosa* obtenidas con el sustrato p-NPP y diferentes cationes activadores.

	Mg^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}
K_m (mM)	1,4	1,0	3,0
K_A (mM)	1,25	0,05	0,03
V_{max} (μ moles/min.mg)	0,86	1,0	1,39
V_{max} / K_m	0,61	1,0	0,46

V_{max} , K_m y K_A fueron obtenidas de gráficos primarios y secundarios de curvas de saturación con el sustrato p-NPP y en presencia de concentraciones variables de los iones metálicos. La actividad de la enzima fue medida en solución amortiguadora de acetato de sodio 0,2 M, pH 5 y EDTA 1 mM.

P-ETANOLAMINA COMO SUSTRATO

Las Figuras 9, 10 y 11 muestran los resultados obtenidos cuando se reemplazó el sustrato p-NPP por P-etanolamina. En este caso se muestra la acción del catión Cu^{2+} pero, al igual que en el caso anterior, también Zn^{2+} y Mg^{2+} se comportaron del mismo modo.

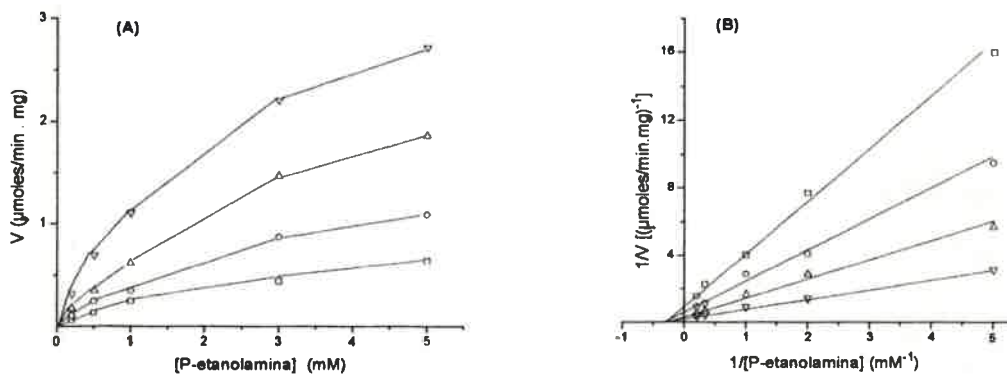


Figura 9: (A) Curva de saturación de AcPasa de *P. aeruginosa* por P-etanolamina en presencia de diferentes concentraciones de Cu^{2+} libre (mM): $\square = 0,005$, $\circ = 0,01$, $\Delta = 0,02$ y $\nabla = 0,04$. La actividad de la enzima fue medida por incubación durante 90 minutos a 37°C , pH 5 y EDTA 1 mM. (B) Gráfico de doble recíproca correspondiente a los mismos datos.

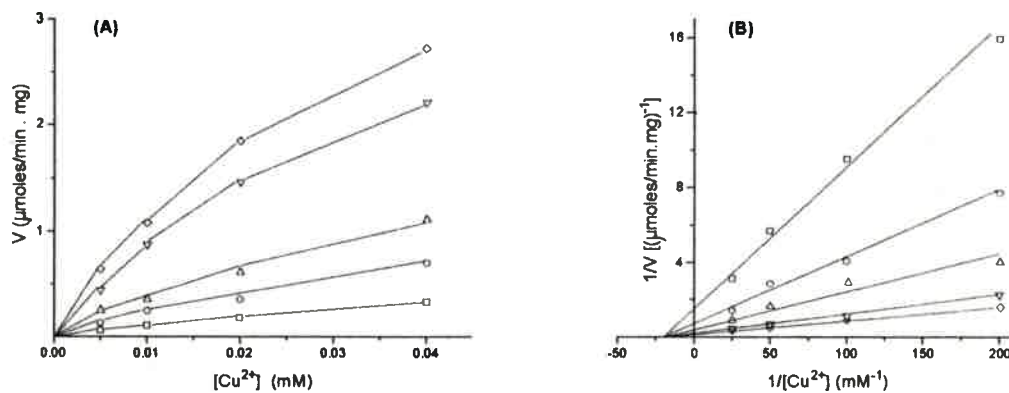


Figura 10: (A) Curva de saturación de AcPasa de *P. aeruginosa* por Cu^{2+} en presencia de diferentes concentraciones de P-etanolamina (mM): $\square = 0,2$; $\circ = 0,5$; $\Delta = 1,0$; $\nabla = 3,0$ y $\diamond = 5,0$. La actividad de la enzima fue medida en las mismas condiciones que las descritas en la Figura 9. (B) Gráfico de doble recíproca correspondiente a los mismos datos.

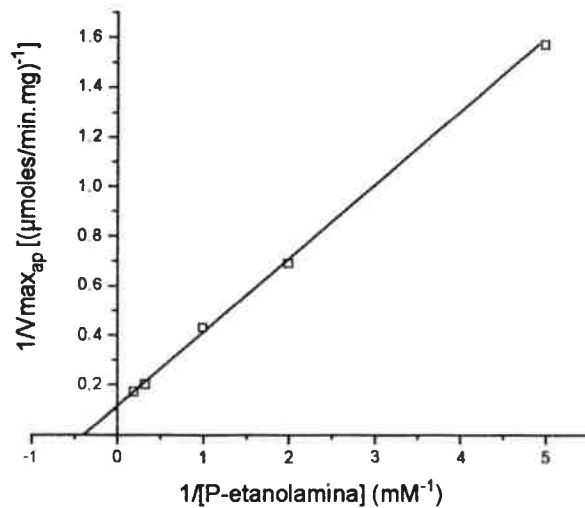
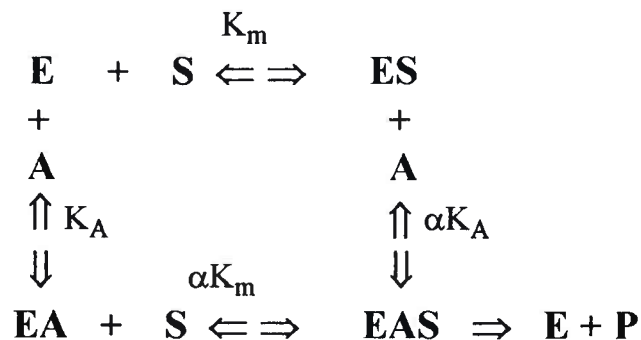


Figura 11: Gráfico realizado con los datos obtenidos de la Figura 10 B ($1/V_{max_{ap}}$) que permite obtener los valores de K_m y V_{max} verdaderos.

La aplicación de las ecuaciones correspondientes a un sistema birreactante al azar, fueron las apropiadas para interpretar el comportamiento de AcPasa de *P. aeruginosa*, cuando utilizó P-etanolamina como sustrato. Este mecanismo supone, a diferencia del anterior, que la enzima se puede unir en primera instancia, tanto al activador como al sustrato sin importar el orden y cualquiera de los dos caminos lleva a la formación del complejo (EAS). Debido a que tanto el sustrato como el activador pueden provenir de dos complejos distintos (ES)-(EAS) y (EA)-(EAS) respectivamente, se introdujo el factor α que afecta las constantes involucradas en la disociación del complejo (EAS). El siguiente esquema representa el mecanismo descrito (Segel, 1975).



El tipo de gráficos obtenidos en las figuras mostradas, determinaron para α un valor igual a 1. Por lo tanto, los resultados mostrados en la Figura 9-B, por aplicación de la ecuación

$$1/v = (\alpha K_m / V_{\max})(1 + K_A/[A]) 1/[S] + 1/V_{\max} (1 + \alpha K_A / [A])$$

(donde $[A] = [Cu^{2+}]$ y $[S] = [P\text{-etanolamina}]$), permitieron calcular el K_m verdadero para P-etanolamina que fue de 2,86 mM.

De la misma manera, la Figura 10-B mediante la ecuación

$$1/v = (\alpha K_A / V_{\max})(1 + K_m/[S]) 1/[A] + 1/V_{\max} (1 + \alpha K_m / [S])$$

arrojó para K_A verdadero un valor de 0,05 mM y para $1/V_{\max}$ aparente : 1,57; 0,69; 0,43; 0,2 y 0,17 para concentraciones crecientes del sustrato. Con estos valores y mediante la aplicación de la ecuación

$$1/V_{\max \text{ ap}} = \alpha K_m / V_{\max} 1/[S] + 1/V_{\max}$$

la Figura 11 permitió calcular la V_{\max} verdadera (8,3 $\mu\text{moles/min.mg}$) y recalcular el K_m verdadero (2,86 mM).

Tabla 5: Constantes cinéticas de AcPasa de *P. aeruginosa* obtenidas con el sustrato P-etanolamina y diferentes cationes activadores.

	Mg ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺
K_m (mM)	2,10	4,00	2,86
K_A (mM)	1,00	0,02	0,05
V_{\max} ($\mu\text{moles/min.mg}$)	5,00	7,65	8,33
V_{\max} / K_m	2,38	1,91	2,91

V_{\max} , K_m y K_A fueron obtenidas de gráficos primarios y secundarios de curvas de saturación con el sustrato P-etanolamina y en presencia de concentraciones variables de los iones activadores .

La Tabla 5 resume los parámetros cinéticos obtenidos con cada uno de los cationes activadores, cuando la enzima catalizó la hidrólisis de P-etanolamina.

Las concentraciones de P-etanolamina fueron las mismas para los tres cationes activadores estudiados, las de Cu^{2+} y Zn^{2+} fueron similares mientras que el Mg^{2+} se utilizó en concentraciones de: 0,1; 0,4; 0,8 y 1,6 mM.

P-COLINA COMO SUSTRATO

Los resultados representados en la Figura 12 indican que el catión Mg^{2+} , en concentración 0,1 mM, produjo la máxima activación de la enzima y el mismo efecto se obtuvo aún con valores mil veces menores (0,1 μM), datos no mostrados. El uso de concentraciones libres inferiores del catión, en presencia de EDTA 1 mM, fueron impracticables debido a los errores de dilución introducidos. Los cationes Cu^{2+} y Zn^{2+} produjeron un efecto similar al observado con Mg^{2+} .

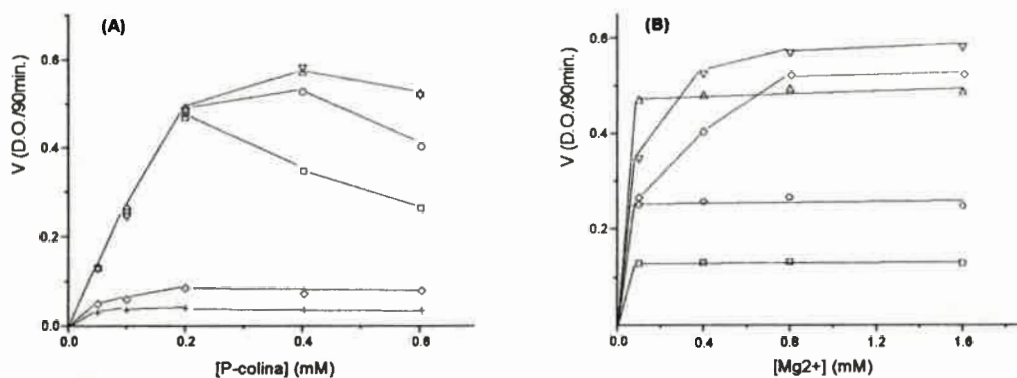


Figura 12: (A) Curva de saturación de AcPasa de *P. aeruginosa* por P-colina en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} libre (mM): $\square = 0,1$; $\circ = 0,4$; $\Delta = 0,8$ y $\nabla = 1,6$. La actividad de la enzima fue medida por incubación durante 90 minutos a 37 °C, pH 5 y EDTA 1 mM. (\diamond) actividad sin Mg^{2+} ni EDTA. (+) actividad sin Mg^{2+} y con EDTA 1 mM. (B) Curva de saturación de la enzima con Mg^{2+} en presencia de distintas concentraciones de P-colina (mM): $\square = 0,05$, $\circ = 0,1$; $\Delta = 0,2$; $\nabla = 0,4$ y $\diamond = 0,6$.

Si bien las constantes cinéticas verdaderas no pudieron ser calculadas, en la Figura 13 se muestran los datos de una condición particular, que permitieron determinar los valores de V_{\max} y K_m aparentes: 5 $\mu\text{moles}/\text{min.mg}$ y 0,67 mM respectivamente.

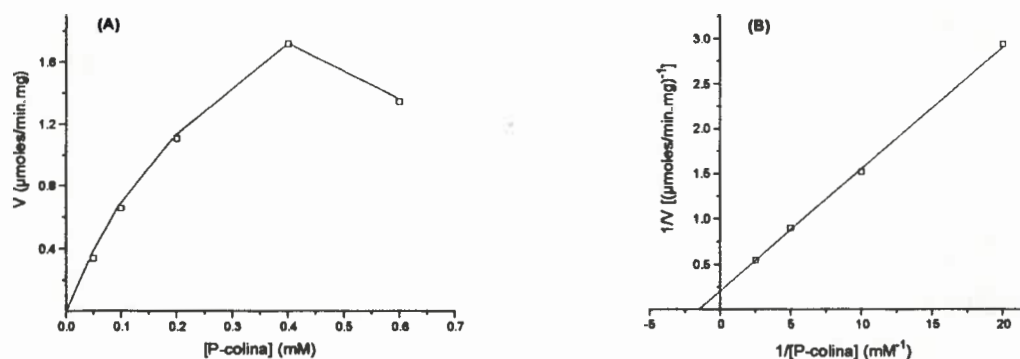


Figura 13: (A) Curva de saturación de AcPasa de *P. aeruginosa* por P-colina, en presencia de una concentración del catión activador Mg^{2+} , en forma libre, de 2 mM. La actividad de la enzima fue medida en las condiciones referidas anteriormente. (B) Gráfico de doble recíproca correspondiente a los mismos datos.

La Tabla 6 contiene las constantes cinéticas aparentes y las eficiencias catalíticas, obtenidas con los iones activadores utilizados.

Tabla 6: Constantes cinéticas aparentes de AcPasa de *P. aeruginosa*, obtenidas en presencia de P-colina frente a distintos cationes activadores.

	Mg^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}
$K_{m_{\text{ap}}}$ (mM)	0,67	1,5	1,9
$V_{\max_{\text{ap}}}$ ($\mu\text{moles}/\text{min.mg}$)	5,0	7,1	7,8
V_{\max} / K_m	7,5	4,7	4,1

Las constantes fueron obtenidas de gráficos primarios y secundarios de curvas de saturación con el sustrato P-colina y en presencia de una concentración libre del ion activador (mM): $\text{Mg}^{2+} = 2,0$; $\text{Zn}^{2+} = 0,1$ y $\text{Cu}^{2+} = 0,1$.

Los estudios cinéticos con el sustrato P-colina, demostraron que AcPasa de *P. aeruginosa* se comporta, probablemente, siguiendo un mecanismo similar al descrito para p-NPP o P-etanolamina, pero con un valor de K_A mucho más

pequeño, lo que hizo imposible técnicamente determinar las constantes verdaderas, de la manera habitual.

pH OPTIMO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DEL CATION Mg^{2+}

A fin de conocer el comportamiento de la enzima en relación al pH del medio, se midió su actividad frente a los tres sustratos utilizados anteriormente, en presencia y ausencia del catión Mg^{2+} . Dado que la capacidad quelante del EDTA varía con el pH del medio y que los resultados mostrados en la Figura 12-A revelaron que su presencia originó una disminución en la actividad de la enzima, aún superior a la causada por la ausencia del catión activador, su agregado al medio fue omitido.

La Figura 14 muestra que cuando AcPasa actúa sobre el sustrato artificial p-NPP, su pH óptimo fue 5 y necesitó siempre la presencia del ión activador. Un resultado similar se obtuvo con P-etanolamina sólo que en este caso, en presencia de Mg^{2+} , el pH óptimo se obtuvo en el rango 5-6 y en ausencia del ión a pH 6. El uso de P-colina como sustrato, mostró dos propiedades interesantes de la enzima: i) independencia del catión activador desde pH 6 hacia la zona alcalina; ii) mantenimiento de su actividad máxima en un amplio rango de pH: 5 a 8 en presencia de Mg^{2+} y 6 a 8 en su ausencia.

Estos resultados, sumados a los obtenidos en la determinación de las constantes cinéticas frente a diferentes concentraciones libres del activador, señalaron que la mayor eficiencia catalítica, independencia del catión y mejor adaptación al pH del medio, se obtuvo cuando el sustrato fue P-colina.

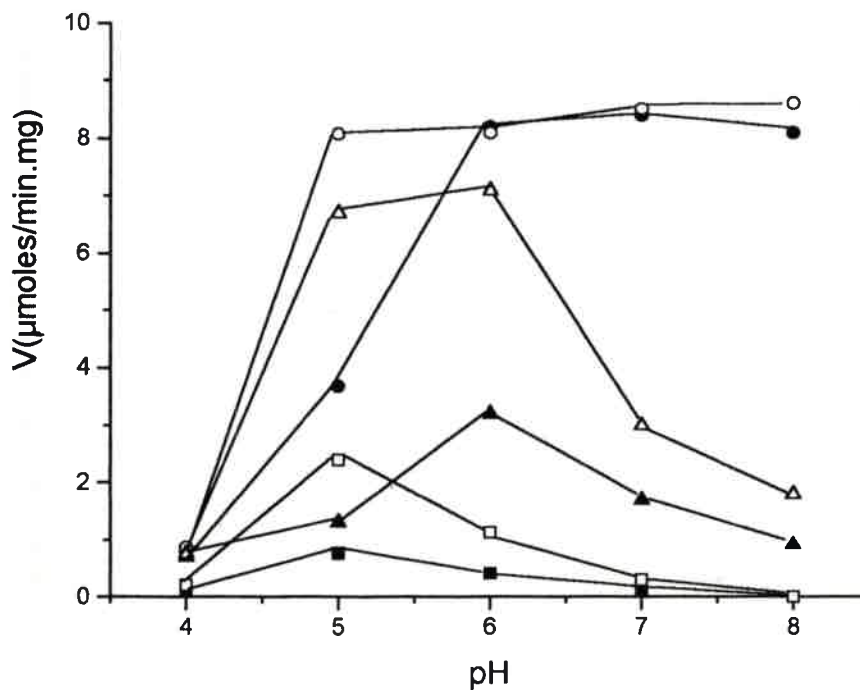


Figura 14: Actividad de fosforilcolina fosfatasa a diferentes valores de pH, medida con p-NPP 10 mM (■, □); P-etanolamina 3 mM (▲, Δ) y P-colina 0.3 mM (●, ○) como se indica en materiales y métodos, en presencia de Mg²⁺ 2 mM (□, Δ, ○) y en su ausencia (■, ▲, ●).

EFFECTO DE AGENTES QUELANTES

La Figura 15 muestra que la acción inhibitoria del EDTA y ortofenantrolina (OF), otro agente quelante con acción más específica sobre Zn²⁺, dependió del pH del medio. Para EDTA fue mínima a pH 6; OF sólo inhibió en medio ácido, siendo nulo su efecto a pH 7 y 8.

La Figura 16 muestra el efecto de la concentración de EDTA sobre la actividad de la fosforilcolina fosfatasa, a dos valores diferentes de pH, uno en el cual la enzima necesita el ión activador y otro donde su actividad es independiente del mismo.

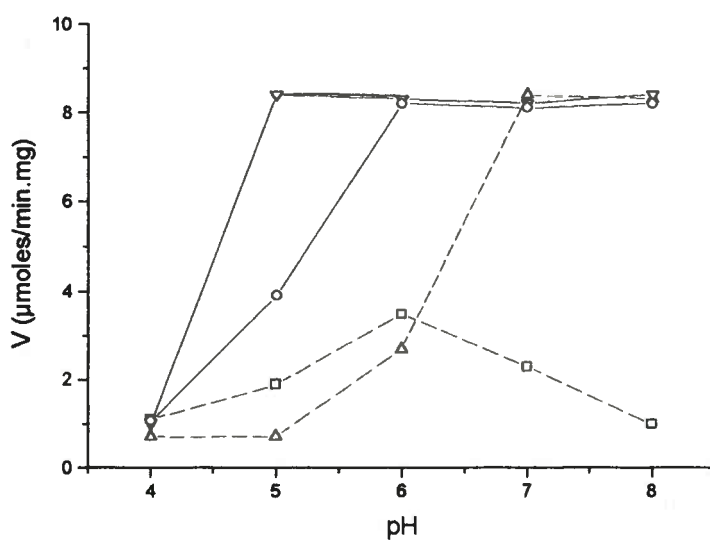


Figura 15: Efecto de EDTA 1 mM (□---□) y OF 0,1 mM (Δ---Δ) en función del pH del medio, sobre fosforilcolina fosfatasa de *P. aeruginosa* en presencia de P-colina 0,3 mM, a 37 °C, durante 90 minutos. Control sin quelantes en ausencia (○—○) y presencia (∇—∇) de Mg²⁺ 2 mM.

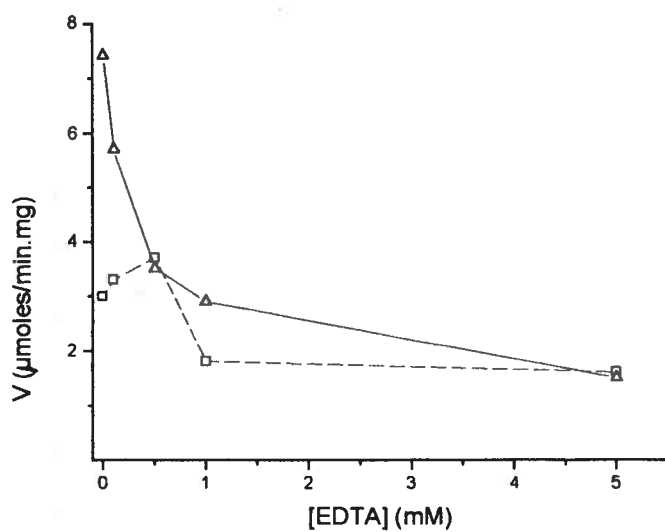


Figura 16: Efecto de la concentración de EDTA sobre la actividad de fosforilcolina fosfatasa de *P. aeruginosa*, a pH 5 (□---□) y pH 7,4 (Δ—Δ). La actividad de la enzima fue cuantificada en presencia de fosforilcolina 0,2 mM, por incubación durante 90 minutos a 37 °C.

A pH 7,4 la inhibición causada por EDTA fue dependiente de su concentración, no cambió con el tiempo de preincubación y en ningún caso llegó a ser del 100 %. En este valor de pH pero en ausencia de EDTA, el agregado de Zn^{2+} en concentraciones hasta 1 mM, no tuvieron efecto sobre la actividad de la enzima (datos no mostrados).

A pH 5, concentraciones bajas de EDTA (0,1 y 0,5 mM) produjeron una pequeña activación y desde 1 mM en adelante éste ejerció una acción inhibitoria, que nunca llegó a ser del 100%. El agregado de Zn^{2+} 0,02 mM, en ausencia de EDTA, produjo la máxima activación de la fosforilcolina fosfatasa (datos no mostrados).

Estos resultados sugirieron que los agentes quelantes no sólo secuestran el catión activador, sino que también podrían interaccionar con la enzima ejerciendo sobre ésta un efecto propio. El análisis de espectros de absorción en la región ultravioleta de soluciones de EDTA a pH 5 y 7,4, en ausencia y en presencia de la enzima, tal como muestra la Figura 17, favorecen esta especulación.

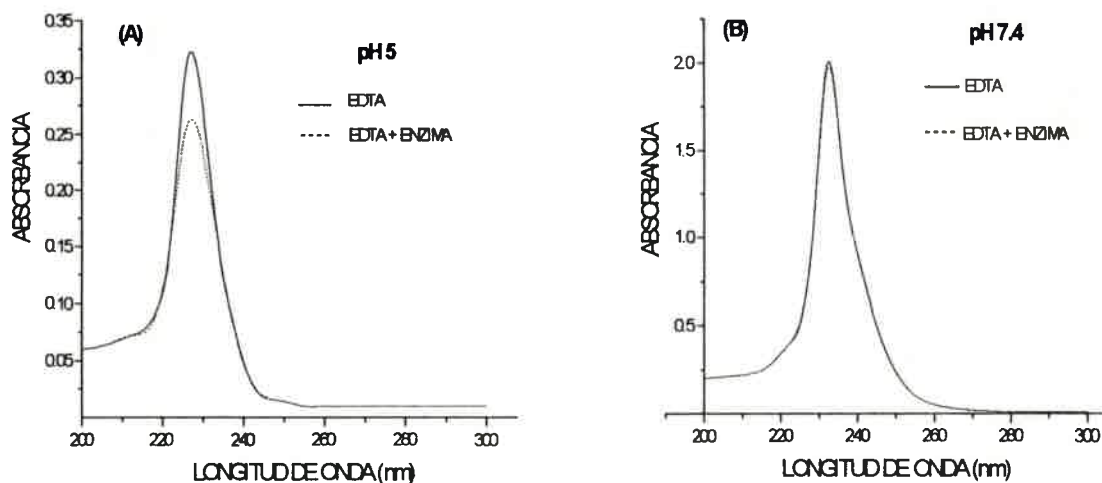


Figura 17: Espectros de absorción continuos de soluciones de EDTA 5 mM, en ausencia y presencia de 1,36 μ moles de fosforilcolina fosfatasa. (A) en solución amortiguadora de acetato de sodio 0,2 M, pH 5 y (B) en HEPES 0,1 M, pH 7,4. En todos los casos el volumen final en la celda de lectura fue 0,5 ml y la misma se llevó a cabo contra la solución amortiguadora correspondiente.

FOSFORILCOLINA FOSFATASA FRENTE A p-NPP Y P-COLINA.

EFEECTO DE COLINA A pH 5

Sin EDTA en el medio de reacción, pH 5 y en presencia de solución 2 mM de $MgCl_2$, se realizaron curvas de saturación con p-NPP, en ausencia y en presencia de P-Colina a dos concentraciones diferentes. La actividad de la enzima, cuando se omitió el agregado de Mg^{2+} , fue prácticamente nula.

La Figura 18 muestra que P-Colina se comportó cinéticamente como un inhibidor no competitivo clásico, modificando la velocidad máxima con que la enzima hidroliza el sustrato artificial pero sin afectar su constante de afinidad (K_m). La presencia de 0,3 mM de P-Colina, en el medio de reacción, inhibió completamente la actividad de la enzima medida en esas condiciones.

La Tabla 7 muestra las constantes cinéticas calculadas con los datos aportados por la Figura 18-B.

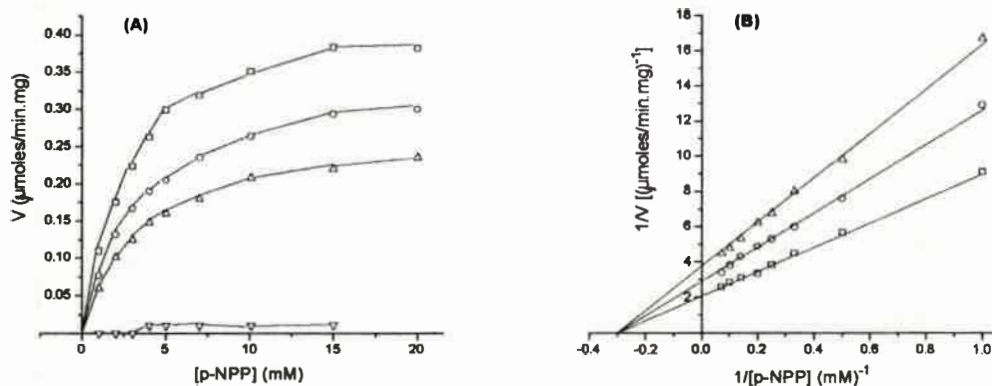


Figura 18: (A) Curva de saturación de fosforilcolina fosfatasa de *P. aeruginosa* por p-NPP en ausencia (\square) y en presencia de P-Colina a diferentes concentraciones (mM): $\circ = 0,025$; $\Delta = 0,05$; $\nabla = 0,3$. La actividad de la enzima fue medida por incubación durante 30 minutos a $37^\circ C$, pH 5 y 2 mM de Mg^{2+} . (B) Gráfico de doble recíproca, correspondiente a los mismos datos.

Tabla 7: Constantes cinéticas de fosforilcolina fosfatasa de *P. aeruginosa* con el sustrato artificial p-NPP, en presencia de P-Colina a distintas concentraciones .

	P-Colina (mM)		
	0	0,025	0,05
K_m (mM)	3,3	3,3	3,3
V_{max} (μ moles/min.mg)	0,50	0,33	0,27
V_{max}/K_m	0,15	0,10	0,08

Las V_{max} y los K_m fueron calculados del gráfico mostrado en la Figura 18-B.

La presencia de colina en el medio de incubación no afectó los parámetros cinéticos de la acción enzimática sobre p-NPP, cuando su concentración fue 0,05 mM. Cuando la concentración de colina usada fue diez veces superior (0,5 mM), la V_{max} disminuyó a 0,28 μ moles/min.mg y el K_m permaneció inalterado. La Figura 19 muestra los resultados de estos experimentos.

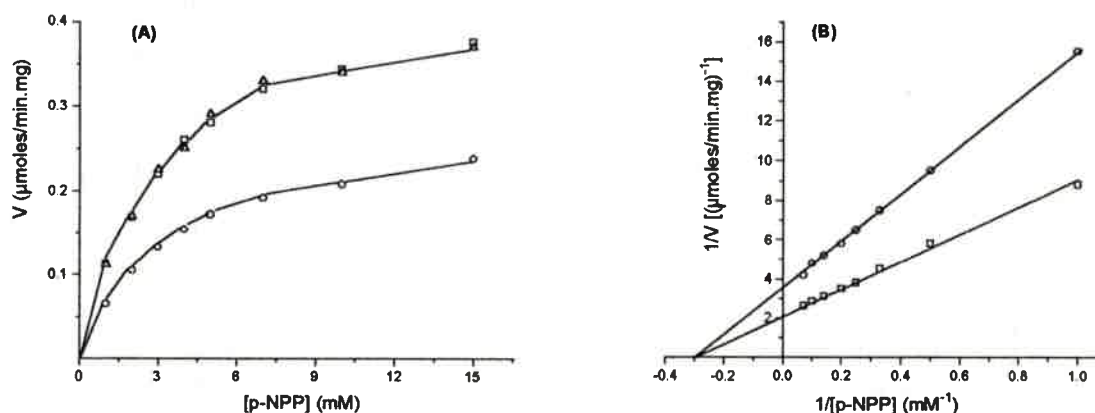


Figura 19: (A) Curva de saturación de fosforilcolina fosfatasa de *P. aeruginosa* por p-NPP en ausencia (Δ) y presencia de colina 0,05 mM (\square) y 0,5 mM (\circ) respectivamente. (B) Gráfico de doble recíproca correspondiente a los mismos datos. Los valores en ausencia de colina (Δ) no fueron incluidos por ser similares a los obtenidos con concentración 0,05 mM (\square). La actividad de la enzima fue medida en las mismas condiciones de la Figura 18.

En las mismas condiciones (pH 5) se estudió el comportamiento de la fosforilcolina fosfatasa con su sustrato fisiológico P-Colina, con y sin el agregado de Mg^{2+} 2 mM (ya que en ausencia del catión se midió una buena actividad residual, ver Figura 14) y ante la presencia de colina 0,5 mM.

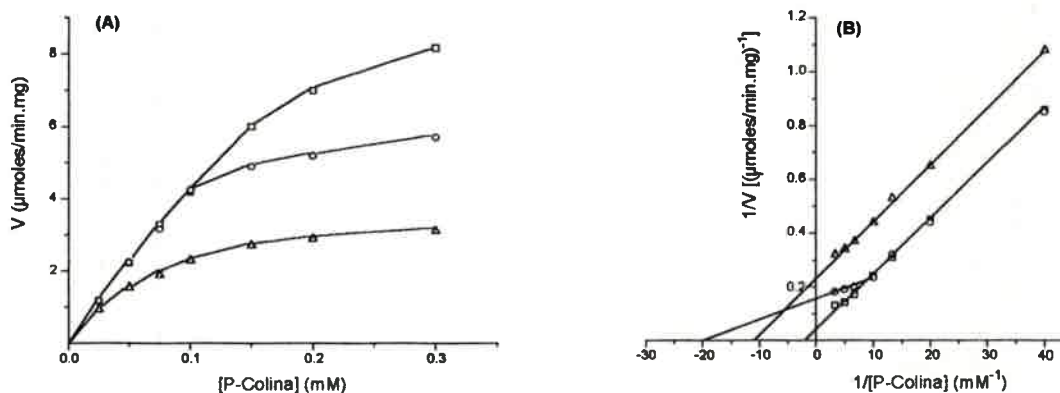


Figura 20: (A) Curva de saturación de la enzima por P-Colina en ausencia de Mg^{2+} (Δ), en presencia de Mg^{2+} 2 mM (\square) y con Mg^{2+} 2 mM y colina 0,5 mM (\circ). (B) Gráfico doble recíproco correspondiente a los mismos datos. La actividad de la enzima fue medida por incubación durante 90 minutos a 37 °C en solución amortiguadora de ácido acético-acetato de sodio pH 5.

Con los datos aportados por la Figura 20-B, la cual muestra que la presencia de colina 0,5 mM pone en evidencia un K_m de alta afinidad, se calcularon las constantes cinéticas resumidas en la Tabla 8.

Tabla 8: Constantes cinéticas de fosforilcolina fosfatasa con su sustrato fisiológico P-colina. Efecto del ión magnesio y colina a pH 5.

pH 5	- Mg^{2+}	+ Mg^{2+}	+ Mg^{2+} + Colina
K_m (mM)	0,09	0,5	0,05 ; 0,5
V_{max} ($\mu\text{moles/min.mg}$)	4,2	25	6,3 ; 25
V_{max}/K_m	46,6	50	125 ; 50

Las V_{max} y los K_m fueron calculados del gráfico de doble recíproca. La actividad de la enzima fue medida con concentraciones crecientes de P-colina, incubada 90 minutos a 37 °C y a pH 5. Las concentraciones de Mg^{2+} y colina fueron de 2 mM y 0,5 mM, respectivamente. Los signos - y + indican ausencia y presencia de las sustancias referidas.

EFECTO DE COLINA A pH 7,4

La Figura 21 revela la presencia de los dos valores de K_m para P-colina, cuando los mismos estudios cinéticos fueron realizados a pH 7,4.

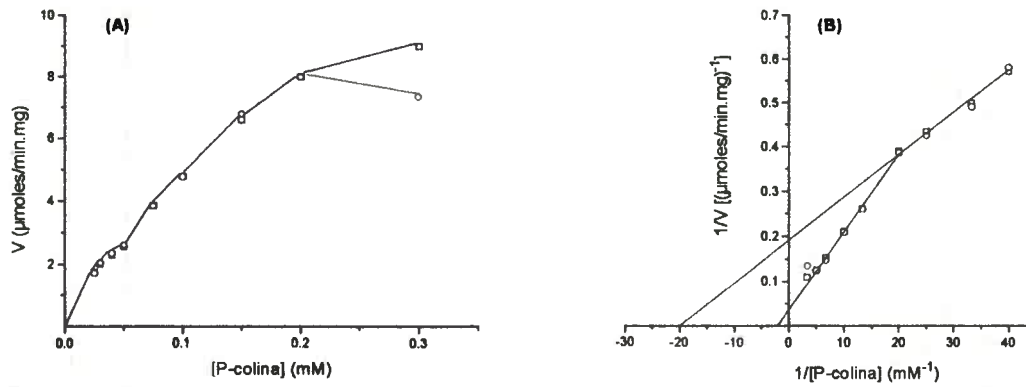


Figura 21: (A) Curva de saturación por P-colina en presencia de Mg^{2+} 2 mM (□) y en su ausencia (○). (B) Gráfico de las dobles recíprocas con los mismos datos. La actividad de la enzima fue medida por incubación a 37 °C durante 90 minutos a pH 7,4.

La Figura 22 representa los resultados obtenidos en esas mismas condiciones, cuando colina 0,5 mM estuvo presente en el medio de reacción. Resultados similares se obtuvieron en presencia o en ausencia de 2 mM de Mg^{2+} .

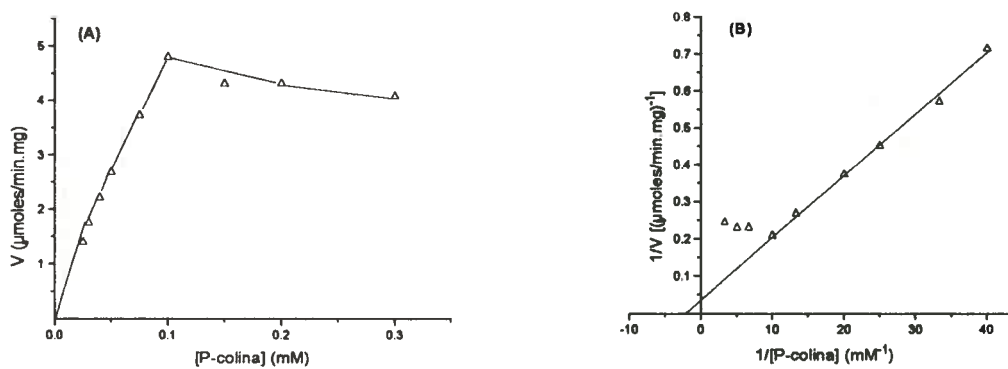


Figura 22: (A) Curva de saturación de la fosforilcolina fosfatasa de *P. aeruginosa* por P-colina en presencia de colina 0,5 mM. (B) Gráfico de doble recíproca con los mismos datos. La actividad de la enzima se midió en las mismas condiciones de la Figura 21.

Las constantes cinéticas calculadas de curvas como las mostradas en las Figuras 21 y 22 son resumidas en la Tabla 9.

Tabla 9: Constantes cinéticas de fosforilcolina fosfatasa con su sustrato fisiológico P-colina. Efecto de magnesio y colina a pH 7,4 .

pH 7.4	- Mg ²⁺	+ Mg ²⁺	+ Mg ²⁺ + Colina
K _m (mM)	0,05 ; 0,5	0,05 ; 0,5	0,5
V _{max} (μmoles/min.mg)	5,6 ; 25	5,6 ; 25	25
V _{max} /K _m	112 ; 50	112 ; 50	50

Los valores de V_{max} y K_m fueron calculados de los gráficos de las dobles recíprocas de las Figuras 21 y 22. La presencia de Mg²⁺ y colina fue de 2 mM y 0,5 mM respectivamente. Los signos - y + significan ausencia y presencia de las sustancias referidas.

ACCION DE DETERGENTES SOBRE FOSFORILCOLINA FOSFATASA

Con la intención de obtener datos que ampliaran el conocimiento de las propiedades cinéticas y fisico-químicas de esta enzima, se estudió la acción de distintos detergentes sobre su actividad, frente al sustrato artificial p-NPP y al fisiológico P-colina, a pH 5 y 7,4. A tal fin, y dado que estas sustancias muy frecuentemente modifican la estructura terciaria y/o cuaternaria de las proteínas y por ende su actividad biológica, se utilizaron tres tipos diferentes de detergentes: a) Bromuro de Tetradeciltrimetilamonio (catiónico); b) Deoxicolato de sodio (aniónico); c) Tritón X-100 (no iónico).

Una forma de distinguir la acción de un inhibidor irreversible de un inhibidor reversible no competitivo, es graficar V_{max} en función de la concentración de enzima (Segel, 1975). La acción de una inhibición reversible se manifiesta mediante la disminución de la pendiente de la recta, mientras que una inhibición irreversible, produce una recta de igual pendiente que corta el

eje horizontal en una posición equivalente a la cantidad de enzima inactivada irreversiblemente.

La Figura 23 muestra los resultados obtenidos cuando se midió la actividad de la enzima frente a p-NPP 10 mM, Mg^{2+} 2 mM y pH 5. Estos indicaron que Tritón X-100 produjo activación, el detergente catiónico inhibió reversiblemente y el deoxicolato de sodio actuó como inhibidor irreversible.

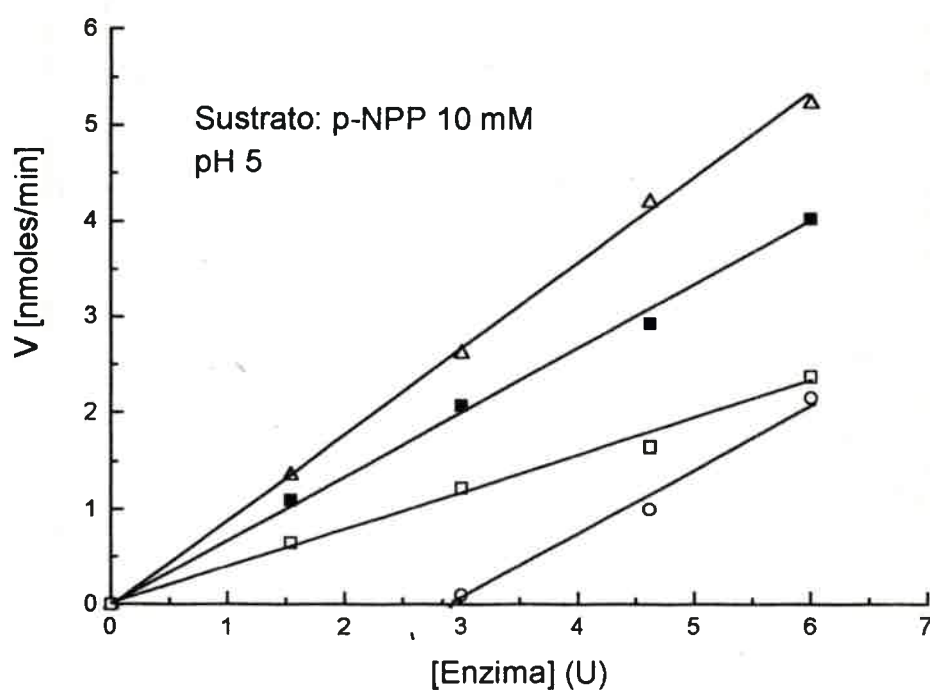


Figura 23: Actividad de fosforilcolina fosfatasa con p-NPP 10 mM, Mg^{2+} 2 mM y pH 5, en función de la concentración de enzima (unidades) y la presencia en el medio de reacción de Tritón X-100 al 0,015 % (Δ), Tetradeciltrimetilamonio al 0,01 % (\square), Deoxicolato de sodio al 0,02 % (\circ) y en ausencia de ellos (\blacksquare).

Los datos de la Figura 24 se obtuvieron en las mismas condiciones que la figura anterior, pero utilizando como sustrato P-colina 0,25 mM. En este caso

Tritón X-100 no tuvo efecto y los detergentes aniónico y catiónico actuaron como inhibidores reversible e irreversible, respectivamente.

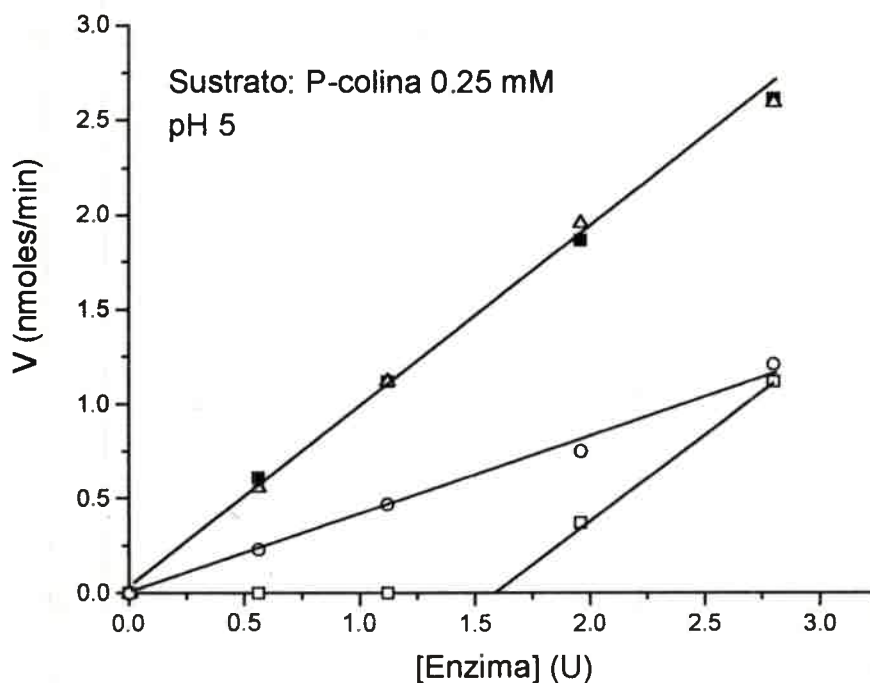


Figura 24: Actividad de fosforilcolina fosfatasa frente a P-colina 0,25 mM, Mg^{2+} 2 mM y pH 5, en función de la concentración de enzima (unidades) y la presencia en el medio de reacción de detergentes a la misma concentración que en la Figura 23. Tritón X-100 (Δ), Tetradeciltrimetilamonio (\square), Deoxicolato de sodio (\circ) y control (\blacksquare).

La misma experiencia anterior, realizada a pH 7,4 (Figura 25), mostró que el deoxicolato de sodio, que a pH 5 inhibió a la enzima reversiblemente, produjo activación. Los detergentes neutro y catiónico mantuvieron el mismo efecto que el observado a pH ácido. Tetradeciltrimetilamonio inactivó irreversiblemente la misma cantidad de enzima que a pH 5.

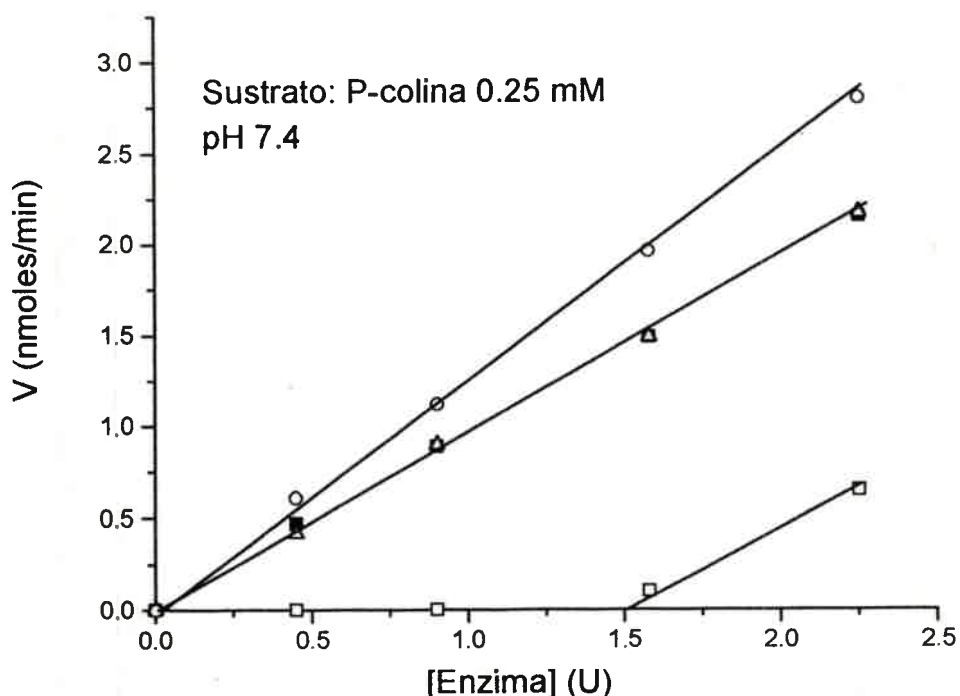


Figura 25: Actividad de fosforilcolina fosfatasa frente a P-colina 0,25 mM, Mg^{2+} 2 mM y pH 7,4 en función de la concentración de enzima (unidades) y la presencia en el medio de reacción de detergentes a la misma concentración que en la Figura 23. Tritón X-100 (Δ), Tetradeciltrimetilamonio (\square), Deoxicolato de sodio (\circ) y control (\blacksquare).

INHIBIDORES DE FOSFORILCOLINA FOSFATASA

La inhibición producida por distintas sustancias sobre la actividad de fosforilcolina fosfatasa de *Pseudomonas aeruginosa*, algunas de ellas inhibidores típicos de fosfatasa, tal como ATP, fluoruro de sodio y P_i , se muestra en la Tabla 10.

En razón del distinto comportamiento observado de la enzima, según su actividad se mida frente al sustrato artificial p-NPP o al fisiológico P-colina (tal como mostró en su respuesta al cambio de pH, necesidad del catión activador y presencia de detergentes o colina en el medio de reacción), se estudió el efecto del $AlCl_3$ sobre la actividad enzimática medida en presencia de ambos sustratos, p-NPP y P-colina.

Tabla 10: Inhibidores de fosforilcolina fosfatasa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Inhibidor	Concentración (mM)	% Actividad remanente
control	----	100
colina	0,05	100
colina	0,5	60
betaina	1,00	60
acetilcolina	1,00	44
P-colina	0,025	73
P-colina	0,05	60
P-colina	0,30	00
ATP	0,20	40
NaF	0,20	20
Pi	0,20	80
AlCl ₃	0,50	10

La actividad de la enzima fue medida en presencia de p-NPP 10 mM y Mg²⁺ 2 mM e incubada durante 30 minutos a 37 °C. Los inhibidores fueron agregados al medio de reacción a las concentraciones finales indicadas.

EFFECTO DEL ALUMINIO CON p-NPP COMO SUSTRATO

La Figura 26-A muestra la inhibición causada por concentraciones crecientes del ión Al³⁺, cuando la actividad de la fosforilcolina fosfatasa se midió a pH 5, con p-NPP como sustrato y en presencia de Mg²⁺ 2 mM.

Una respuesta de tipo sigmoideo se describe mediante la ecuación de Hill (Segel, 1975, pag. 360):

$$v/V_{\max} = [S]^n / K' + [S]^n$$

donde n expresa el número de sitios de unión del sustrato a la enzima y K' es el K_m , pero modificado por el o los factores de interacción que hacen que el comportamiento no sea michaeliano, sino precisamente, de tipo sigmoideo.

Esta ecuación puede ser transformada en

$$\log (v/V_{\max} - v) = n \log [S] - \log K'$$

Y si el efecto se traduce en una inhibición, la ecuación lineal es (Segel, 1975, pag. 471):

$$\log (v/V_{\max} - v) = - n \log [I] + \log K' \quad \text{siendo } [I] \text{ concentración del inhibidor.}$$

El cálculo de la pendiente de la recta, al graficar $\log (v/V_{\max} - v)$ en función de \log de $[Al^{3+}]$, permite hallar el valor de n .

La Figura 26-B revela para esa condición un $n = 4$, sugiriendo esa misma cifra de sitios de unión del aluminio a la proteína.

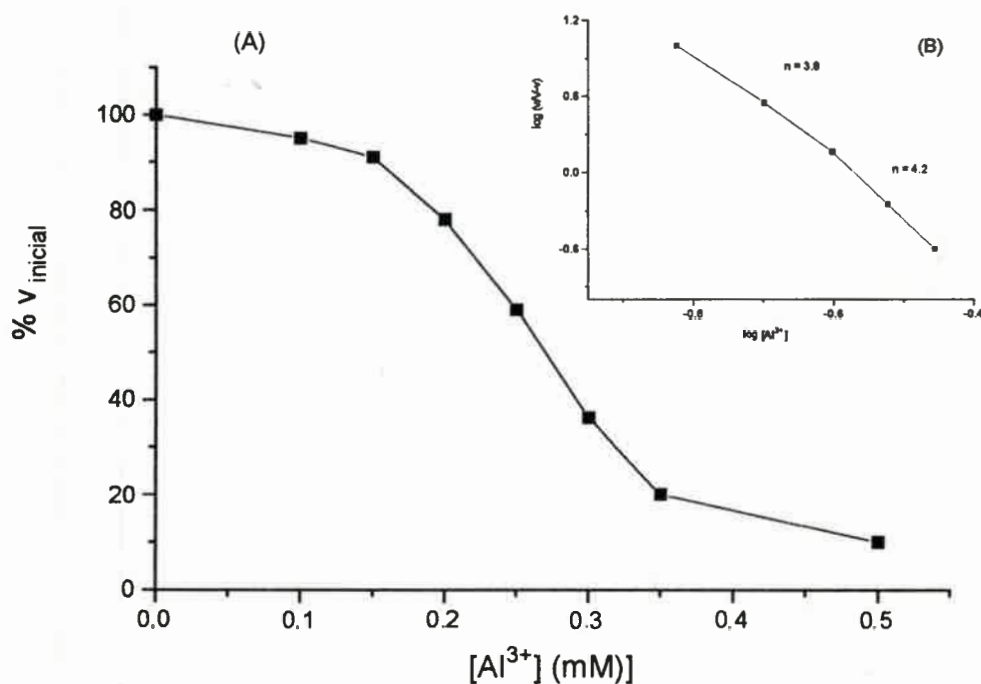


Figura 26: (A) Curva de inhibición por AlCl₃ sobre fosforilcolina fosfatasa de *Pseudomonas aeruginosa*, cuando su actividad se midió con p-NPP 10 mM, en presencia de Mg²⁺ 2 mM y pH 5. (B) Gráfico de Hill con los mismos datos, cuya pendiente permite el cálculo de n .

EFFECTO DEL ALUMINIO CON P-COLINA COMO SUSTRATO

La Figura 27 muestra el experimento equivalente al anterior, pero cuando la actividad de la enzima se midió frente al sustrato fisiológico P-colina. En este caso, la concentración necesaria del inhibidor fue diez veces menor a la empleada en la experiencia anterior y la respuesta no fue del tipo sigmoideo sino hiperbólica, obteniéndose un n próximo a 1, típico de una cinética michaeliana.

Cuando la misma experiencia se llevó a cabo a pH 7,4, en ausencia o presencia de Mg^{2+} 2 mM y con P-colina como sustrato, no hubo inhibición por Al^{3+} , utilizando concentraciones hasta 5 mM, es decir cien veces superiores.

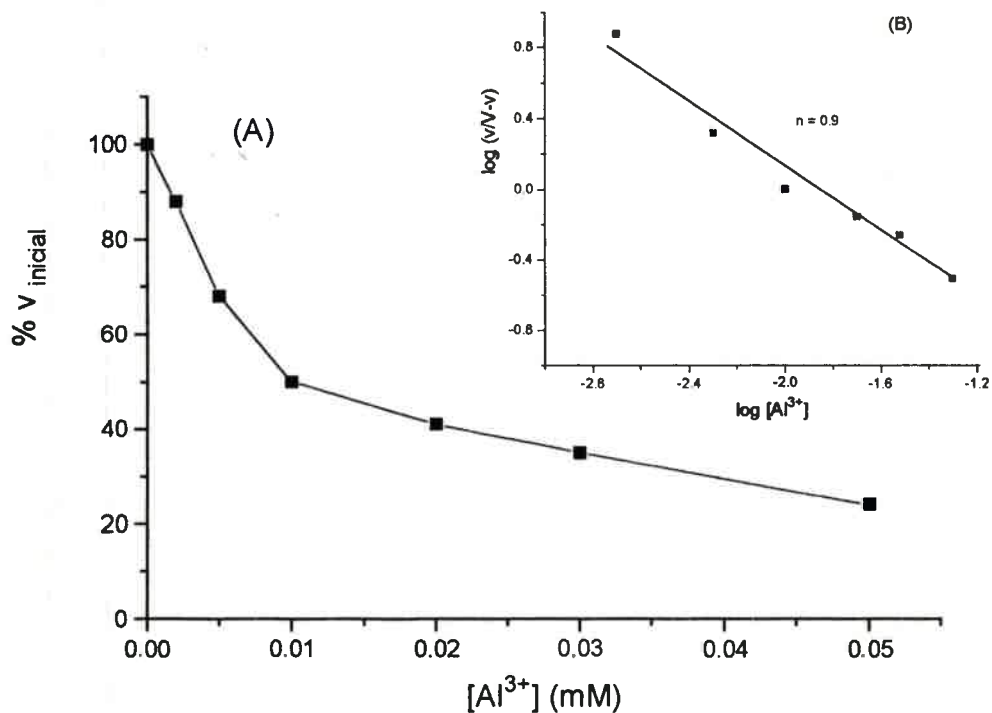


Figura 27: (A) Curva de inhibición por $AlCl_3$ sobre fosforilcolina fosfatasa de *Pseudomonas aeruginosa*, cuando su actividad se midió con P-colina 0,2 mM en presencia de Mg^{2+} 2 mM y pH 5. (B) Gráfico de Hill con los mismos datos, cuya pendiente permite el cálculo de n .



DISCUSION

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE PCFasa

Fosforilcolina fosfatasa de *Pseudomonas aeruginosa* fue purificada a homogeneidad mediante el uso de una metodología sencilla, económica y relativamente rápida, si se compara con los métodos aplicados para otras fosfatasas ácidas descritos en la bibliografía (Sakurai y Shiota, 1980, Lee y col., 1980, Dassa y col., 1982, Funaguma y col., 1982, von Tigerstrom, R., 1984). Este se basó en la resistencia al calor por parte de la enzima, su precipitación gradual con sulfato de amonio y la posterior separación mediante columnas de exclusión molecular, seguida de diálisis contra sacarosa sólida a 4 ° C. El efecto desnaturalizante de la temperatura fue eficazmente neutralizado por la presencia de Mg^{2+} y colina, lo cual sugirió que ambos tienen sitios de interacción con la proteína, hecho ratificado posteriormente mediante los estudios cinéticos. El fraccionamiento con sulfato de amonio realizado en forma gradual, permitió descartar más del 60 % de proteínas sin pérdida apreciable de la actividad enzimática, por lo que mostró mayor efectividad que los métodos clásicos de precipitación en uno o dos pasos. El tratamiento de la muestra con columnas de exclusión molecular en forma reiterada, permitió completar el proceso de purificación comprobado por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, la cual mostró una única banda proteica .

El conjunto de las técnicas aplicadas aumentó 87 veces la actividad enzimática existente en el espacio periplásmico de la bacteria y alcanzó una recuperación del 49 %, lo que permitió inferir que la enzima representa el 1,12 % de las proteínas de ese compartimento.

La determinación de su peso molecular, en condiciones no desnaturalizantes mediante una columna de Sephacryl S-200 y con electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, indicó que se trata de una proteína dimérica, con una masa aproximada de 70.000 Da aportada por dos subunidades de 35.000 Da.

Esta propiedad de la AcPasa de *P. aeruginosa* aporta un ejemplo más a los hallados en la bibliografía, que se refieren a fosfatasas ácidas de diferentes orígenes, con variados pesos moleculares y constituidas por monómeros, dímeros y hasta trímeros.

Salmonella typhimurium posee tres fosfatasas periplásmicas, una de ellas con una masa de 67.000 Da y requiere cationes divalentes para ser activa. Las otras dos funcionan como dímeros con subunidades de 27.000 y 37.000 Da,

respectivamente (Hohmann, E. y Miller, S., 1994). *Escherichia coli* crecida en un medio mínimo con Pi, produce una fosfatasa ácida específica para hidrolizar el sustrato KDO-8-fosfato, componente de los lipopolisacáridos de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Ella posee una masa aproximada de 80 kDa aportada por dos monómeros del mismo peso, es activada por Mg^{2+} e inhibida por EDTA 1 mM (Ray, P.H., y Benedict, C.D., 1980). La misma bacteria, en ausencia de Pi ó en presencia de éste pero en condiciones anaeróbicas, indujo una fosfatasa ácida con pH óptimo de 2.5, que resultó ser un monómero de P.M. 45.000 (Dassa, E., y col., 1982). *Propionibacterium acnes*, liberó al medio de cultivo una fosfatasa ácida de estructura monomérica, de P.M. 93.000 y cuya actividad fue estimulada por Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y K^{+} (Ingham, E., y col., 1980). En membranas de promastigotes de *Leishmania donovani*, se aisló una fosfatasa ácida que hidroliza p-NPP, pero no P-etanolamina ni P-colina y está formada por dos monómeros de masa 65.000 cada uno (Remaley, A.T., y col., (1985). El hongo *Ustilago esculenta*, parásito de *Zizania latifolia*, produce una fosfatasa ácida con una estructura trimérica y cada subunidad tiene un P.M. aproximado de 116.000, no posee especificidad de sustrato y su actividad no es modificada por cationes divalentes ni EDTA (Funaguma, T., y col., 1982). En hígado de bagre se aisló una fosfatasa con actividad a pH ácido que resultó ser un dímero de masa 82.500, formada por dos subunidades equivalentes (Kubicz, A., y col., 1985).

La variabilidad y multiplicidad observada en la determinación del pI de la PCFasa de *P. aeruginosa*, pueden aceptarse asumiendo que se trata de una glicoproteína, cuya variación en la cantidad y/o la naturaleza de los carbohidratos que la componen, justificaría la obtención de diferentes valores de éste. Esta interpretación es apoyada por datos bibliográficos que muestran una fosfatasa ácida de pelo de cobayo con valores del punto isoeléctrico comprendidos entre 5.08 y 7.5 y su retención por columnas de concanavalina-A-Sepharosa, lo cual presupone que se trata de una glicoproteína (Miyagawa y Eguchi, 1981). Del mismo modo, la fosfatasa ácida de hígado de bagre, purificada a homogeneidad reveló ser un dímero con subunidades de masa $35.000 \text{ Da} \pm 3.000 \text{ Da}$ y un P.M. de 82.500, presentando dos valores de pI: 5,66 y 5,37 (Kubicz y col., 1985). Este autor señala además, que la mayoría de las fosfatasas ácidas bien caracterizadas, demuestran ser glicoproteínas diméricas y que la heterogeneidad del punto isoeléctrico se debería principalmente a la variación de los carbohidratos que las integran.

En general, si bien existe heterogeneidad en las fosfatasa descritas, la presencia de dímeros en la conformación estructural y el peso molecular hallado de la fosforilcolina fosfatasa de *P. aeruginosa*, no le da características físico-químicas propias que la destaquen de las referidas hasta ahora en la bibliografía.

Por el contrario, su caracterización cinética sí demostró que posee características propias que la diferencian francamente de las fosfatasa conocidas en la bibliografía. Así, los estudios llevados a cabo con el sustrato artificial p-NPP, de amplia utilización en la caracterización de estas enzimas, la mostraron como una típica fosfatasa ácida, con pH 5 como óptimo y dependiente de cationes divalentes, tal como la liberada al medio de cultivo por *Propionibacterium acnes* (Ingham y col., 1980). En cambio, cuando su actividad se midió frente a P-colina, manifestó propiedades de fosfatasa ácida y alcalina, manteniendo su máxima actividad desde pH 5 hasta 8, independizándose del ión activador a partir de pH 6 y mostrando, a pH 7,4, la existencia de un K_m de alta afinidad, sólo detectable a pH 5 en presencia de colina, comportamiento sin antecedentes en la bibliografía consultada.

Los estudios cinéticos realizados a pH 5, demostraron que es activada por cationes divalentes (Mg^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+}) y aunque no manifestó alta especificidad por sustrato, las Tablas 4, 5 y 6 indican que la mayor eficiencia catalítica se obtuvo con el sustrato P-colina, con quien a su vez mostró la mayor sensibilidad a los activadores, en un grado tal que a concentración 1 mM de EDTA, fue imposible el cálculo de las constantes cinéticas verdaderas.

Considerando la V_{max} aparente con la cual AcPasa hidrolizó P-colina en presencia de Mg^{2+} 2 mM, o bien utilizando la ecuación: $V_{max} = K_p [E_t]$, donde $[E_t]$ representa la cantidad total de enzima presente y K_p es la constante de velocidad catalítica, también denominada número de recambio (Segel, 1975, pag. 80; Dixon, 1979, pag. 14), se obtuvo para ésta un valor de 352 min^{-1} , lo que significa que cada molécula de enzima hidrolizó en un minuto 352 moléculas de sustrato.

Este mismo resultado se obtuvo, en iguales condiciones, con el sustrato P-etanolamina, pero la eficiencia catalítica de la enzima fue menor debido a su mayor K_m .

Si en estas condiciones se relaciona la estructura química de los sustratos probados, los modelos cinéticos a los cuales cada uno se adaptó y los resultados obtenidos por Garrido y col., (1988), permiten en conjunto, reafirmar lo propuesto por aquéllos autores en cuanto a que la enzima posee un sitio

catiónico (también denominado estérico), receptor de la carga negativa del sustrato, y un sitio aniónico con subsitios para metilos (uno quizás de naturaleza puramente hidrofóbica), capaz de interactuar con el segmento positivo de la estructura del sustrato y modificable directa o indirectamente por la presencia del catión activador. Así P-colina, que posee una estructura iónica con una carga positiva aportada por el amonio cuaternario y otras negativas por el fosfato, muestra la mayor eficiencia catalítica y la menor dependencia del activador. Le sigue en eficiencia P-etanolamina, que a pH 5 conserva la carga positiva y salvo la ausencia de los grupos metilos, mantiene cierta semejanza estructural con P-colina y responde a un sistema birreactante al azar: necesita la presencia del activador para ser hidrolizado, pero puede unirse a la enzima en ausencia de éste. Por último, p-NPP, el más alejado estructuralmente de P-colina, sin carga positiva, grupos metilos ni zona hidrofóbica, presenta la menor eficiencia catalítica y responde a un sistema birreactante ordenado, más rígido, pues presupone que indefectiblemente primero debe unirse la enzima al catión activador, para luego ser reconocido y acceder a la acción catalítica.

La búsqueda del pH óptimo de la enzima, en presencia y ausencia del catión activador, abrió un nuevo rumbo en el diseño experimental dado que, como mostró la Figura 14, el mejor sustrato encontrado, P-colina, no sólo mantuvo su máxima actividad en un amplio rango de éste, sino que a partir de pH 6 se independizó de la presencia del catión activador, con lo cual amplió aún más las ventajas evidenciadas en relación a los otros sustratos.

Si bien la necesidad de iones metálicos activadores por parte de las fosfatasas conocidas no responde a una regla determinada, pues algunas son inhibidas por ellos, otras activadas y un buen número se muestra indiferente ante su presencia (Mizunaga, 1979; von Tigerstrom, 1984; Ingham y col., 1980; Dassa y col., 1982), en este caso, PCFasa de *P. aeruginosa* mostró diferentes respuestas a los iones, según el sustrato utilizado y el pH del medio.

La misma Figura 14 señaló que, por ejemplo, a pH 7 con o sin Mg^{2+} en el medio, PCFasa no muestra actividad con p-NPP y al mismo tiempo actúa con la máxima eficiencia sobre P-colina. Esta observación, sumada al resultado que mostró la Figura 18, indicando que la presencia de P-colina en el medio de reacción, cuando la enzima actúa sobre el sustrato artificial p-NPP, a pH 5, generó una cinética típica de inhibición no competitiva y el efecto dispar de la presencia de colina frente a los dos sustratos a pH 5 (Figuras 19 y 20), sugirió la existencia de sitios distintos para estos sustratos.

Esta idea fue ratificada por las experiencias llevadas a cabo en presencia de detergentes diferentes y con el inhibidor AlCl_3 . En el primer caso, la comparación de las Figuras 23 y 24 mostró que el detergente aniónico deoxicolato de sodio, en concentración 0,02 %, inhibió en forma irreversible aproximadamente el 50 % de la capacidad de la enzima para actuar sobre p-NPP, pero sólo se comportó como inhibidor no competitivo en cuanto a su capacidad de hidrolizar P-colina. El detergente catiónico tetradeciltrimetilamonio, ejerció el efecto inverso. Del mismo modo el detergente neutro Tritón X-100, activó la enzima frente a p-NPP y no tuvo efecto alguno en presencia del sustrato fisiológico. El cambio de pH en el medio de reacción, de 5 a 7,4, mostró que el detergente catiónico modificó su acción, pasando de inhibidor reversible a activador, lo cual no es incoherente si recordamos que el mismo cambio de pH liberó a la enzima de la necesidad del catión activador.

En el segundo caso, la Figura 26 mostró una inhibición sigmoidea por el ión Al^{3+} sobre la hidrólisis de p-NPP, con un coeficiente de Hill de 4. En las mismas condiciones, pero midiendo la actividad enzimática frente a P-colina, la inhibición por Al^{3+} mostró una cinética michaeliana, con un coeficiente de Hill cercano a 1 y una concentración necesaria del inhibidor, diez veces menor. El mismo cambio de pH en el medio (datos no mostrados), anuló la inhibición por Al^{3+} aún a concentraciones de éste cien veces mayores (5 mM). Por lo tanto, el efecto del AlCl_3 sobre la PCFasa de *Pseudomonas aeruginosa* indicó que cuando la enzima actuó sobre el sustrato p-NPP, el inhibidor tuvo cuatro sitios de unión a la proteína mientras que cuando lo hizo frente a P-colina tuvo sólo uno.

En resumen, la presencia de detergentes en el medio de reacción, mostró la posibilidad de afectar ambos sitios en forma separada. Por su parte, el AlCl_3 , causó un comportamiento cinético muy distinto según la enzima utilice uno u otro sitio.

Un modelo que justifique estos resultados, necesariamente deberá contemplar la existencia de un sitio distinto para cada sustrato, pues si se piensa que la modificación se lleva a cabo en un mismo sitio catalítico, pero alterándolo de manera tal que sólo modifica la afinidad por los sustratos de manera diferente, en la práctica significa aceptar la existencia de dos sitios separados.

El cambio de pH en el medio de reacción, de 5 a 7,4, también evidenció cambios interesantes en las propiedades cinéticas de la enzima, cuando ésta

actuó sobre el sustrato fisiológico P-colina. Así, a pH ácido y en presencia de Mg^{2+} 2 mM, mostró un K_m de 0,5 mM y una V_{max} de 25 μ moles/min.mg, mientras que a pH 7,4 en presencia o ausencia de Mg^{2+} , reveló la existencia de un K_m de alta afinidad (0,05 mM) a concentraciones bajas del sustrato, manteniendo el anterior para concentraciones altas del mismo. Si colina, uno de los productos de la reacción catalizada y que fue efectivo como protector de la enzima ante el efecto del calor en el proceso de purificación, está presente en el medio de reacción a pH 5, manifiesta el K_m de alta afinidad, en cambio a pH 7,4 lo anula. Esto tiene un sentido fisiológico puesto que se demostró que cuando *P. aeruginosa* crece en presencia de colina, baja el pH del medio a valores cercanos a 5 (Lisa y col., 1983), por lo tanto el efecto descrito permite a la PCFasa actuar sobre su sustrato de manera más eficiente.

La existencia de dos sistemas con capacidad de hidrolizar el sustrato P-colina, uno de baja y otro de alta afinidad, se condice con los resultados hallados en nuestro laboratorio con enzima parcialmente purificada, que muestran dos sitios de unión para P-colina en la enzima, cuando este sustrato actuó como inhibidor frente a p-NPP (Garrido y col., 1990).

El efecto de la presencia de colina en el medio fue totalmente distinto cuando la enzima actuó frente al sustrato artificial p-NPP, pues en este caso se comportó como un inhibidor no competitivo, favoreciendo lo propuesto en este trabajo sobre la existencia de sitios diferentes para ambos sustratos.

La Figura 28 muestra la propuesta de un modelo que contiene los sitios y las modificaciones causadas por los efectores de la PCFasa, descritos anteriormente.

El análisis del efecto de los agentes quelantes EDTA y OF sobre la actividad de PCFasa, mostró que este último inhibió la actividad enzimática a pH 4 y 5 pero no a pH 7 y 8, lo cual es totalmente coherente si su efecto se debe sólo al acomplejamiento del catión activador, pues la enzima requiere de la presencia de ellos a pH ácido pero no a partir de pH 6. En cambio el efecto del EDTA no puede ser explicado sólo por este razonamiento, pues al menos a pH 5 manifestó una probable interacción directa con la proteína y a pH 7,4 inhibió proporcionalmente a su concentración la actividad de PCFasa, en concordancia con la fosfatasa ácida de *E. coli* descrita por Ray y Benedict (1980), a pesar de que en esas condiciones la enzima no requiere de la presencia del ión activador. El efecto inhibitorio propio del EDTA justifica la amplia diferencia en los parámetros cinéticos obtenidos a pH 5 en su presencia, comparados con los

hallados en su ausencia e igual concentración de protones, como así también la menor velocidad de reacción medida en presencia de EDTA si se la compara con la obtenida en ausencia de Mg^{2+} .

La variación del pH del medio produce cambios conformacionales de la proteína que, por lo mostrado en este trabajo, afectan decididamente los sitios catalíticos propuestos. A este efecto, cabe señalar que el único aminoácido que modifica su estructura iónica sustancialmente desde pH 5 a 7,4, es la histidina, quien posee un $pK_2 = 6$. La presencia de este aminoácido está descrito en las fosfatasas ácidas obtenidas de hígado (Kubicz y col., 1985) como así también de *E. coli* (Dassa y col., 1982). Por otra parte, la bibliografía describe una interacción entre este aminoácido y el Zn^{2+} en la alfa toxina de *Clostridium perfringens* (Titball y Rubidge, 1990), como así también en la fosfatasa alcalina de *E. coli* y en este caso, se conoce que cada monómero de la enzima tiene dos átomos de Zn^{2+} y uno de Mg^{2+} en el sitio activo, fijados por enlaces de coordinación y al menos dos de ellos a histidinas (Coleman, J.E., 1992). Esto podría ser relacionado con la fosforilcolina fosfatasa de *P. aeruginosa* en cuanto a su dependencia del catión activador y el efecto del pH, pues el cambio de estructura predominante en el aminoácido histidina podría estar involucrado en el mecanismo responsable de las propiedades manifestadas.

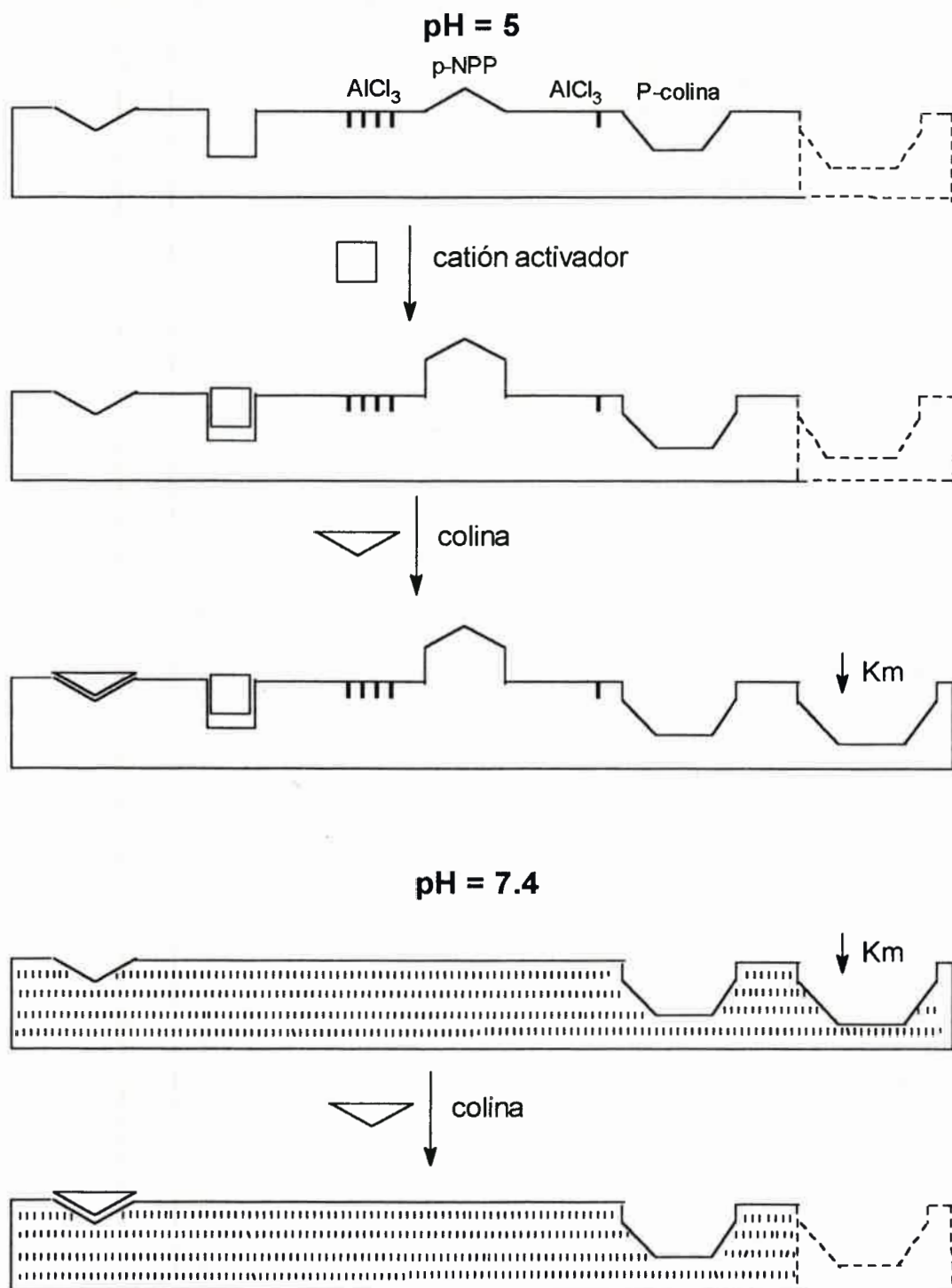


Figura 28: Modelo esquemático que representa la PCFasa con los sitios descritos cinéticamente en este trabajo. A pH 5 se muestran, de izquierda a derecha, los lugares de interacción para: colina, cationes activadores, $AlCl_3$, p-NPP y P-colina (baja y alta afinidad) y las modificaciones producidas por la presencia de colina y Mg^{2+} , Zn^{2+} ó Cu^{2+} . A pH 7,4 se observa: la falta de sitios para los cationes activadores (p-NPP y $AlCl_3$), la manifestación del sitio de alta afinidad para P-colina y su anulación ante la presencia de colina.

PCFasa Y LA INFECCION

La suma de los resultados analizados indica claramente que el cambio de pH a valores más fisiológicos, por ejemplo 7,4 , modificó la actividad de la enzima de manera que, nuevamente, P-colina fue su mejor sustrato. Así, frente a p-NPP perdió totalmente su actividad, mientras que con aquél se independizó del catión activador y puso de manifiesto un K_m de alta afinidad que le permitió desarrollar una excelente eficiencia a altas y bajas concentraciones del sustrato.

Es de destacar el hecho de que cuando PCFasa de *P. aeruginosa* ejerció su actividad hidrolítica sobre P-colina, en cualquiera de las condiciones probadas (diferentes valores de pH y presencia o ausencia del ión activador), mostró siempre una elevada y conservada eficiencia catalítica, aún a pH 5 y en ausencia de Mg^{2+} , donde fue considerada como actividad residual, sólo incrementada en las condiciones donde manifestó el K_m de alta afinidad. Esta propiedad, claramente visualizada en las Tablas 8 y 9, contrasta con las eficiencias catalíticas alcanzadas con los sustratos p-NPP y P-etanolamina, resumidas en las Tablas 4 y 5. Esto demuestra que es sólo mediante la hidrólisis de P-colina, cuando la enzima colabora a una mayor capacidad de adaptación al medio que la bacteria debe enfrentar , dado que P-colina es hidrolizado en un amplio rango de pH (5-8), en ausencia o presencia de cationes divalentes y con la mayor eficiencia catalítica, la que prácticamente mantuvo en todas las condiciones probadas.

La acción de la PCFasa sobre este sustrato le provee colina a la bacteria , la que puede utilizar como única fuente de carbono o de carbono y nitrógeno (Lisa, 1985; Lucchesi y col., 1989) y P_i , de gran importancia en medios con baja concentración, pues le permite, al menos en el rango de transición entre condiciones de alto y bajo fosfato, obtenerlo sin necesidad de que el microorganismo induzca los sistemas de captura del mismo, evitando el esfuerzo energético necesario. La inducción de la PCFasa de *P. aeruginosa* por colina es independiente de la concentración de P_i en el medio, a diferencia de la fosfatasa alcalina, involucrada en la obtención de éste, que sólo se induce en medios con bajo fosfato. Aún en estas condiciones, PCFasa responde más eficientemente que aquella, pues su actividad se detecta antes y en mayor cantidad (Lisa y col., 1994), además de ser efectiva en un amplio rango de pH.

El P_i es captado desde el espacio periplásmico, por un sistema inducido con bajas concentraciones de fosfato, que involucra una proteína unidora con

capacidad de unir un mol de Pi por mol de proteína y sistemas de baja y alta afinidad cuyos K_m aparentes son 12 y 0,5 μM respectivamente (Poole y Hancock, 1984). En mutantes de *P. aeruginosa* que han perdido la proteína unidora, sólo se detectó un sistema de transporte de baja afinidad con un K_m de aproximadamente 20 μM , (Poole y Hancock, 1984).

La colina, como se hizo referencia, es captada por un sistema de transporte activo de alta y baja afinidad (Salvano y col., 1989), del cual no se conoce si requiere proteína unidora en el espacio periplásmico, pero, si así fuese, cabe la especulación de que la misma PCFasa podría actuar como tal, puesto que se induce en las mismas condiciones, se halla en el espacio periplásmico y tiene por lo menos un sitio para colina. Además, experimentos preliminares (datos no mostrados), indican que el espacio periplásmico de *P. aeruginosa*, crecidas en condiciones en las cuales son inducidos el sistema de transporte y la actividad de PCFasa, muestra capacidad de unir colina. De confirmarse esto, la enzima no sólo generaría colina y Pi a la bacteria, sino también alimentaría su propio sistema de transporte, ahorrándole al microorganismo la síntesis de otra proteína.

La Figura 29 muestra la importancia de la PCFasa en el mecanismo propuesto de ataque y asentamiento de *P. aeruginosa* en pulmón, tejido donde produce una de las más frecuentes y graves patologías, asociada a pacientes con fibrosis quística.

Las características descriptas, junto a los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio y señalados en antecedentes, permiten reafirmar que: i) P-colina es sin duda el sustrato fisiológico de esta enzima, por lo que bien puede ser denominada **fosforilcolina fosfatasa**, como fue propuesta por Garrido y col., 1990; ii) Las características físico-químicas y cinéticas de la PCFasa de *P. aeruginosa* la facultan, en un amplio rango de condiciones, a insertarse en el esquema de colonización e infección mostrado en la introducción de este trabajo además de justificar bioquímicamente el hecho que *P. aeruginosa*, aislada de pacientes con fibrosis quística, utilice P-colina como fuente de carbono, nitrógeno y fosfato (Terry y col., 1991) y que en medios de cultivo suplementados con fosfatidilcolina como única fuente de fosfato, la conversión a cepas mucoides se lleve a cabo en mayor proporción que en otros medios (Terry y col., 1992); iii) La presencia de colina, en el medio de cultivo de la bacteria, contribuye a la patogenicidad de ésta, pues incrementa notablemente la actividad de ChE (Lisa, 1985), induce un sistema de transporte para colina (Salvano y

col., 1989) y las actividades de PCFasa y PLC (Lisa, 1985; Lucchesi y col., 1989). Además, aumenta la eficiencia de la enzima caracterizada en esta Tesis, cuando la bacteria se encuentra en un ambiente con alta concentración de protones, debido al desenmascaramiento del K_m de alta afinidad.

MODELO EN TEJIDO PULMONAR

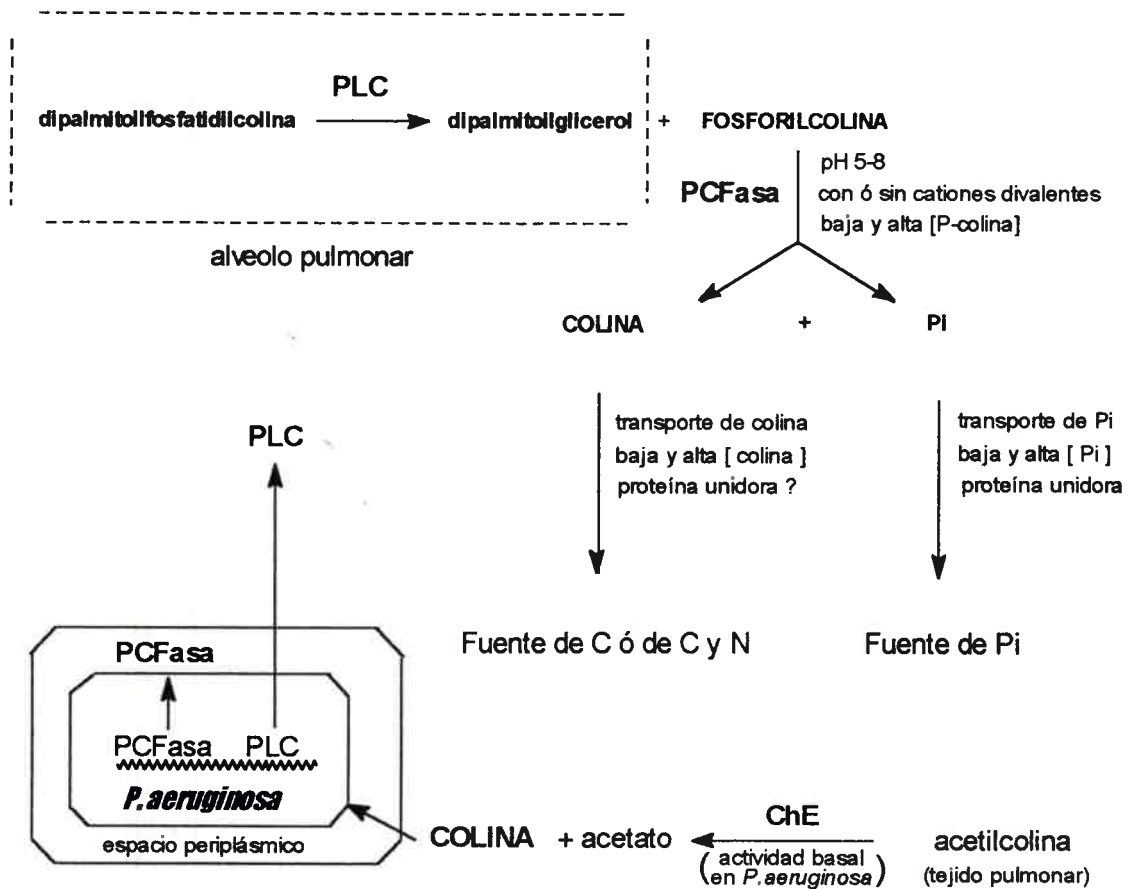


Figura 29: Mecanismo de infección por *P. aeruginosa* en tejido pulmonar que involucra la iniciación del mismo por parte de la actividad basal de ChE la cual genera colina, responsable de la inducción de PLC, FCFasa, el transporte de colina e inclusive la propia actividad de ChE. Dipalmitoilfosfatidilcolina es un fosfolípido mayoritario en la composición de la sustancia surfactante del pulmón. La presencia de acetilcolina es segura dada su acción broncoconstrictora.

CONCLUSIONES



Este trabajo demostró que la actividad de fosfatasa ácida inducida en *Pseudomonas aeruginosa*, por la presencia de colina en el medio de cultivo, reúne las siguientes características:

- Se trata de una proteína dimérica de P.M. 70.000 formada por dos monómeros de 35.000 Da cada uno. Presenta variabilidad y multiplicidad en su pl.
- En medio ácido (pH 5) cataliza la hidrólisis de los sustratos p-NPP, P-etanolamina y P-colina. Es activada por cationes divalentes (Mg^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+}) y muestra para cada sustrato modelos cinéticos diferentes.
- Con P-colina y en presencia de colina, manifiesta un segundo K_m de alta afinidad.
- Colina o P-colina (sustrato fisiológico), se comportan como inhibidores no competitivos de la enzima, cuando su actividad se mide con p-NPP como sustrato y en presencia de Mg^{2+} .
- Cloruro de aluminio es inhibidor de la actividad enzimática tanto cuando ella se mide con p-NPP (cinética de inhibición sigmoidea) como con P-colina (cinética de inhibición hiperbólica).
- A pH 7,4 su actividad con P-colina se hace independiente de la presencia de iones metálicos y bifásica, mostrando el K_m de alta afinidad. No manifiesta actividad frente a p-NPP. La presencia de colina anula el K_m de alta afinidad y el cloruro de aluminio no afecta la actividad enzimática.
- Los estudios cinéticos realizados con enzima purificada a homogeneidad, señalan que la mayor eficiencia catalítica (V_{max} / K_m) siempre se obtiene con el sustrato P-colina, al cual además hidroliza en un amplio rango de pH. Esta característica constituye la base para considerar que la actividad enzimática corresponde a una fosforilcolina fosfatasa.
- Es inhibida por los agentes quelantes EDTA y OF, el primero no sólo por su propiedad de acomplejar cationes divalentes, sino probablemente también por interacciones propias con la enzima.
- El comportamiento de la enzima en presencia de los mismos detergentes, con p-NPP ó P-colina, la inhibición no competitiva ejercida por P-colina sobre el sustrato p-NPP, la distinta cinética de inhibición mostrada por el cloruro de aluminio para ambos sustratos, más el efecto diferente obtenido ante la presencia



BIBLIOGRAFIA

- Baker, N.R.** (1993) Mucosal adherence of *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Pseudomonas aeruginosa* the opportunist: Pathogenesis and disease, p. 7-23. (Fick, B.J. Jr., ed.) CRC press. Boca Raton.
- Bartfai, T.** (1979) en Cyclic Nucleotide Research (Brooker, G., Greengard, P., and Robinson, G.A., eds.) Vol. 10, p. 219-242, Raven Press, New York.
- Bennum, A. y Blum, J.J.** (1966) Properties of the induced acid phosphatase and of the constitutive acid phosphatase of Euglena. *Biochim. Biophys. Acta* **128**: 106-123.
- Bergman, L.W., McClinton, D.C., Madden, S.L. y Preis, L.H.** (1986) Molecular analysis of the DNA sequences involved in the transcriptional regulation of the phosphate-repressible acid phosphatase gene (*POH5*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6070-6074.
- Berk, R.S., Brown, D., Couthino, I. y Meyers, D.** (1987) *In vivo* studies with two phospholipase C fractions from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **55**: 1728-1730.
- Berka, R.M. y Vasil, M.L.** (1982) Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*: purification and preliminary characterization. *J. Bacteriol.* **152**: 239-245.
- Besterman, J.M., Dougan, V. y Cuatrecasas, P.** (1986) Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 6785-6789.
- Botzenhart, K. y Doring, G.** (1993) Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*, p. 1-13. En *Pseudomonas aeruginosa* as An Opportunist Pathogen (Campa, M., Bendinelli, M. y Friedman, H., eds.) Plenum Press, New York and London.
- Bradford, M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chang, C.N., Kuang, W. y Chen, E.Y.** (1986) Nucleotide sequence of the alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli*. *Gene* **44**: 121-125.

- Cheng, K. W.J., Ingram, J.M. y Costerton, J.W. (1970) Release of alkaline phosphatase from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and of pH. *J. Bacteriol.* **104**: 748-753.
- Coleman, J.E. (1992) Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 897-946.
- Collins, F.J. (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256**: 774-779.
- Cuskey, S.M., Wolff, J.A., Phibbs, Jrs. P.V. y Olsen, R.H. (1985) Cloning of genes specifying carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **162**: 865-871.
- Dassa, E., Cahu, M., Desjoyaux-Cherel, B. y Boquet, P.L. (1982) The acid phosphatase with optimum pH of *Escherichia coli*. Physiological and biochemical study. *J. Biol. Chem.* **257**: 6669-6676.
- Day, D.F. y Ingram, J.M. (1973) Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline phosphatase. *Can. J. Microbiol.* **19**: 1221-1233.
- Dean, H.F., Royle, P. y Morgan, A.F. (1979) Detection of FP plasmids in hospital isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **138**: 249-256.
- Deretic, V., Martin, D.W., Schurr, M.J., Mudd, M.H., Hibler, N.S., Curcic, R. y Boucher, J.C. (1993). Conversion to mucoid in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bio-Technol.* **11**: 1133-1136.
- DiRienzo, J., Nakamura, K. e Inouye, M. (1978) The outer membrane proteins of Gram (-) bacteria: biosynthesis, assembly and functions. *Ann. Rev. Biochem.* **47**: 481-532.
- Dissing, J., Dahl, O. y Svensmark, O. (1979) Phosphonic and arsonic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* **569**: 159-176.
- Dixon, M. y Weeb, E. (1979) *Enzymes*. Academic Press, New York. San Francisco, p. 30.

- Heck, L.W., Morihara, K. y Abrahamson, D.R. (1986) Degradation of soluble laminin and depletion of tissue-associated basement membrane laminin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease. *Infect. Immun.* **54**: 149-153.
- Holland, S.P., Pulito, J.S., Shires, T.K. y Costerton, J.W. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* ocular infections. En: *Pseudomonas aeruginosa* the opportunist: Pathogenesis and disease, p. 159-176. Ed.: Fick, B.J. Jr.. CRC press. Boca Raton.
- Hollander, V. (1971) Acid phosphatases. En: *The enzymes*, p. 450-496, 3ra. Edición, (Boyer, P.D.,ed.) Academic Press, New York and London.
- Hohmann, E.L. y Miller, S.I. (1994) The *Salmonella* PhoP Virulence Regulon, pp: 120-125. En: *Phosphate in Microorganisms*. (Torriani-Gorini, A., Yagil, E., and Silver, S., eds..) ASM Press, Washington, D.C..
- Ingham, E., Holland, K.T. Gowland, G. y Cunliffe, W.J. (1980) Purification and partial characterization of an acid phosphatase (EC 3.1.3.2) produced by *Propionibacterium acnes*. *J. Gen. Microbiol.* **118**: 59-65.
- Irvin, R.T. (1993) Attachment and colonization of *Pseudomonas aeruginosa*: role of the surface structures, pp: 19-42. En: *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. (Campa, M, Bendinelli, M and Friedman, H., eds.). Plenum press, New York and London.
- Janssen, D.B., Op Den Camp, H.S.M., Leenen, P.J.M. y Van Der Drift, C. (1980) The enzymes of the ammonia assimilation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* **124**: 187-203.
- Kam, W., Clauser, E., Kim, Y.S., Kan, Y.W. y Rutter, J. (1985) Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 8715-8719.
- Kaneko, Y., Hayashi, N., Toh-e, A., Banno, I. y Oshima, Y. (1987) Structural characteristics of the *PHO8* gene encoding repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **58**: 137-148.
- Klinger, J.D., Straus, D.C., Hilton, C.B. y Bass, J.A. (1978) Antibodies to proteases and exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis: demonstration by radioimmunoassay. *J. Infect. Dis.* **138**: 49-58.

-Domenech, C.E., Garrido, M.N. y Lisa, A.T. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* cholinesterase and phosphorylcholine phosphatase: two enzymes contributing to corneal infection. FEMS Microbiol. Lett. **82**: 131-136.

-Domenech, C.E., Lisa, T.A., Salvano, M.A. y Garrido, M.N. (1992) *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase. Activation by cations and inhibition by aluminium ion. FEBS Lett. **299**: 96-98.

-Döring, G., Obernesser, H.J., Botzenhart, K., Flehming, B., Holly, N. y Hofmann, A. (1983) Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. **147**: 744-750.

-Elliott, S., Chang, C., Schweingruber, M.E., Schaller, J., Rickli, E.E. y Carbon, J. (1986) Isolation and characterization of the structural gene for secreted acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe*. J. Biol. Chem. **261**: 2936-2941.

-Englard, S. y Seifter, S. (1990) Purification procedures: bulk methods, p.. 285. En: Methods in enzymology, vol. 182. (Ed.: Murray P. Deutscher). Academic Press, inc..

-Fernandez, D.S. y Ascencio, J. (1994) Acid phosphatase activity in bean and cowpea plants grow under phosphorus stress. J. Plant Nutr. **17**: 229-241.

-Ferro-Luzzi Ames, G., Prody, C. y Kostu, S. (1984) Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. J. Bacteriol. **160**: 1181-1183.

-Fiske, C.H. y Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem., **66**: 361-375.

-Funaguma, T., Kawamura, Y. y Hara, A. (1982) Purification and properties of extracellular acid phosphatase from *Zizania latifolia*-parasite, *Ustilago esculenta*. Agric. Biol. Chem. **46**: 2117-2125.

-Galloway, D.R. (1993). Role of exotoxins in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections, p. 107-127. En: *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. (Eds. Campa, M., Bendinelli, M. y Friedman, H.) Plenum press, New York and London.

-Garfin, D. (1990). Methods in Enzymology. (Ed.: Deutscher, M.). Vol. 182, p. 425-441. Academic Press, INC. San Diego, California.

- Garrido, M.N., Lisa, A.T. y Domenech, C.E. (1988) *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase contains an anionic site with a trimethyl subsite. *Mol. Cell. Biochem.* **84**: 41-49.
- Garrido, M.N., Lisa, A.T., Albelo, S., Lucchesi, G.I. y Domenech, C.E. (1990) Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase as a phosphorylcholine phosphatase activity. *Mol. Cell. Biochem.* **94**: 89-95.
- Gould, K.L. y Nurse, P. (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2⁺* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature (London)* **342**: 39-45.
- Gu, M., York, J.D., Warshawsky, I. y Majerus, P.W. (1991) Identification, cloning, and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to cytoskeletal protein 4.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5867-5871.
- Guan, K. y Dixon, J.E. (1990) Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* **249**: 553-556.
- Guan, K., Broyles, S.S. y Dixon, J.E. (1991) A Tyr/Ser protein phosphatase encoded by vaccinia virus. *Nature (London)* **350**: 359-362.
- Hagiwara, H., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S. y Montminy, M. (1992) Transcription attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* **70**: 105-113.
- Hamilton, B.A., McPhee, J.L., Hawrylak, K. y Stinson, R.A. (1990) Alkaline phosphatase releasing activity in human tissues. *Clin. Chim. Acta* **186**: 249-254.
- Hart, D. y Woods, D. (1994) Urokinase enhances the growth of *Pseudomonas spp.* in vitro under nonshaking (oxygen limited) conditions. *Can. J. Microbiol.* **40**: 292-297.
- Heath, H. E. y Gaudy, E.T. (1978) Relationship between catabolism of glycerol and metabolism of hexosephosphate derivatives by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **136**: 638-646.

- Kubicz, A., Dratewka, E. y Malicka-Blaskiewicz, M. (1978) Acid phosphatase from liver of the frog *rana esculenta*, separation and partial characterization of multiple forms. *Acta Biochem. Polon.* **25**: 349-359.
- Kubicz, A., Waheed, A. y Van Elten, R.L. (1985) Isolation and characterization of a homogeneous acid phosphatase from catfish liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **81 B**: 177-183.
- Kunin, C., Hua Hua, T., Van Arsdale, L. y Villarejo, M. (1992) Growth of *Escherichia coli* in human urine: role of salt tolerance and accumulation of glycine betaine. *J. Infect. Dis.* **166**: 1311-1315.
- Kurioka, S. y Liu, P.V. (1967) Effect of hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase C activity. *J. Bacteriol.* **93**: 670-674.
- Laemmli, V. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)*. **227**: 680-687.
- Lee, Ch., Murphy, G.P. y Ming Chu, T. (1980) Purification and characterization of acid phosphatase from Dunning R3327H prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* **40**: 1245-1248.
- Leone, F.A., Ciancaglini, P., Pizauro, J.M. y Rezende, A.A. (1995) Rat osseous plate alkaline phosphatase: Mechanism of cation of manganese ions. *Biometals* **8**: 86-91.
- Lessie, T.G. y Phibbs, Jr. P.V. (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**: 359-387.
- Lisa, A.T., Garrido, M.N. y Domenech, C.E. (1983) Induction of acid phosphatase and cholinesterase activities in *Pseudomonas aeruginosa* and their in-vitro control by choline, acetylcholine and betaine. *Mol. Cell. Biochem.* **50**: 149-155.
- Lisa, A.T., Garrido, M.N. y Domenech, C.E. (1984) *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase and cholinesterase induced by choline and its metabolic derivatives may contain a similar peripheral site. *Mol. Cell. Biochem.* **63**: 113-118.

-Lisa, A.T. (1985) Colina y sus metabolitos relacionados como agentes inductores de colinesterasa, fosfatasa ácida y del transporte de colina en *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis , U.N.R.C.

-Lisa, A.T., Casale, C.H. y Domenech, C.E. (1994) Cholinesterase, Acid Phosphatase, and Phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic conditions in a high-phosphate medium. *Curr. Microbiol.* **28**: 71-76.

-Lisa, A.T., Lucchesi, G.I. y Domenech, C.E. (1994) Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to the choline metabolism through the action of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C. *Curr. Microbiol.* **29**: 193-199.

-Liu, P.V.(1974) Exotoxins of *Pseudomonas aeruginosa* factors that influence the production of exotoxin A. *J. Infect. Dis.* **130**: 594-599.

-Liu, P.V. (1979) Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Pseudomonas aeruginosa* - Clinical manifestation of infection and current therapy, p.63-68, (Ed. Doggett, R.G.), Academic press, New York.

-Lowbury, E.J., Thom, B.T., Lilly, J.R., et al., (1970) Sources of infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with tracheostomy. *J. Med. Microbiol.* **3**: 39.

-Lucchesi, G.I. (1992) Fosfolipasa C de *Pseudomonas aeruginosa*: caracterización, regulación y su participación en la infección tisular. Tesis, U.N.R.C.

-Lucchesi, G.I. y Domenech, C.E. (1994) A simple and reliable method for the purification of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C produced in a high phosphate medium containing choline. *Int. J. Biochem.* **26**: 155-162.

-Lucchesi, G.I., Lisa, A.T. y Domenech, C.E. (1989) Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* Phospholipase C activity in a high-phosphate medium. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 335-338.

-Ma, L. y Kantrowitz, E.R. (1994) Mutations at histidine 412 alter zinc binding and eliminate transferasa acitivity in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **269**: 614-619.

- Matthews, R.J., Flores, E. y Thomas, M.L.** (1991) Protein tyrosine phosphatase domains from the protochordate *Styela plicata*. *Immunogenetics* **33**: 33-41.
- Matthews, R.J., Bowne, D.B., Flores, E. y Matthew, L.T.** (1992) Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatase: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2396-2405.
- Mc Gregor, C.H., Wolff, J.A., Arora, S.K., Hylemon, P.B. y Phibbs, Jrs. P.V.** (1992) Catabolite Repression Control in *Pseudomonas aeruginosa*, p. 198-206. En *Pseudomonas Molecular Biology and Biotechnology* (Galli, E., Silver, S. y Witholt, B. eds.) American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Miyagawa, T. y Eguchi, Y.** (1981) Hair acid phosphatase: multiple forms, glycoprotein nature and characterization. *Enzyme*, **26**: 169-176.
- Mizunaga, T.** (1979) Some properties of phosphate-repressible and constitutive acid phosphatases of baker's yeast. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 1211-1218.
- Ng, F.M. y Dawes, E.A.** (1967) Regulations of enzymes of glucose metabolism by citrate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.*, **104**: 48-54.
- Nicas, T.I. y Iglewsky, B.H.** (1986) Production of elastase and other exoproducts by environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, **23**: 967-969.
- Nonoyama, S., Kojo, H., Mine, Y., Nishida, M., Goto, S. y Kuwahara, S.** (1979) Inhibitory effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the phagocytic and killing activities of rabbit polymorphonuclear leukocytes: purification and characterization of an inhibitor of polymorphonuclear leukocyte function. *Infect. Immun.* **24**: 394-398.
- Oliver, D.** (1987) Periplasm and protein secretion. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. p. 56-59. (Ed. en Jefe: Neidhardt, F.C.) American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Ornston, L.M.** (1971) Regulation of catabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacteriol. Rev.* **38**: 87-116.

- Ostroff, R.M., Vasil, A.I. y Vasil, M. (1990) Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 172: 5915-5923.
- Perl, M., Swartzberg, D. y Izhar, S. (1993) Phosphatase and ATPase activities in isonuclear lines of cytoplasmic male-sterile and male-fertile *Petunia*. Theor. Appl. Genet. 86: 49-53.
- Pesin, S. y Candia, O. (1982) Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. Invest. Ophthalmol. Visual Science. 22: 651-659.
- Pirck, M., Pay, A., Heberle-Bors, E. y Hirt, H. (1993) Isolation and characterization of a phosphoprotein phosphatase type 2A gene from alfalfa. Mol. Gen. Genet. 240: 126-131.
- Pollack, M., (1983) The role of exotoxin A in *Pseudomonas aeruginosa* disease and immunity. Rev. Infect. Dis. 5:s979-s984.
- Pond, J.L., Eddy, C.K., Mackenzie, K.F., Conway, T., Borecky, D.J. y Ingram, L.O. (1989) Cloning, sequencing, and characterization of the principal acid phosphatase, the *phoC*⁺ product, from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 171: 767-774.
- Poole, K. y Hancock, R. E. W. (1984) Phosphate transport in *Pseudomonas aeruginosa*. Involvement of a periplasmic phosphate-binding protein. Eur. J. Biochem. 144: 607-612.
- Pradel, E. y Boquet, P. (1988) Acid phosphatases of *Escherichia coli*: molecular cloning and analysis of *agp*, the structural gene for a periplasmic acid glucose phosphatase. J. Bacteriol. 170: 4916-4923.
- Pritchard, A.E. y Vasil, M.L. (1986) Nucleotide sequence and expression of a phosphate-regulated gene encoding a secreted hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 167: 291-298.
- Ray, P.H. y Benedict, C.D. (1980) Purification and characterization of a specific 3-deoxy-d-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase from *Escherichia coli* B. J. Bacteriol. 142: 60-68.

-Remaley, A.T., Das, S., Campbell, P.I., LaRocca, G.M., Pope, M. y Glew, R.H. (1985) Characterization of *Leishmania donovani* acid phosphatases. J. Biol. Chem. **260**: 880-886.

-Sakurai, Y. y Shiota, H. (1980) Some properties of multiple acid phosphatases produced on phosphate-restricted or enriched culture of *Aspergillus oryzae*. J. Gen. Appl. Microbiol. **26**: 315-329.

-Salvano, M.A., Lisa, A.T. y Domenech, C.E. (1989) Choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Cell. Biochem. **85**: 81-89.

-Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2da. edición. (Ed: Nolan, C.) Cold Spring Harbord Laboratory Press. Cold Spring Harbord.

-Sato, H., Okinaga, K. y Saito, H. (1988) Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection. Microbiol. Immunol. **32**: 131-139.

-Scharmann, W. (1976) Purification and characterization of leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. **93**: 292-302.

-Segel, I.H. (1975) Enzymes Kinetics, J. Wiley & Sons, New York/London/Sydney/Toronto.

-Shinozaki, T., Watanabe, H., Arita, S. y Chigira, M. (1995) Amino acid phosphatase activity of alkaline phosphatase-A possible role of protein phosphatase. Eur. J. Biochem. **227**: 367-371.

-Speert, D. P. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* - phagocytic cell interactions, p.163-181. En: *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. (Eds. Campa, M., Bendinelli, M. and Friedman, H.) Plenum press, New York and London.

-Stinson, M.W. y Hayden, C. (1979) Secretion of phospholipase C by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. **25**: 558-599.

-Streuli, M., Krueger, N.X., Tsai, A.Y. y Saito, H. (1989) A family of receptor-linked protein tyrosine phosphatase in humans and *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 8698-8702.

- Terao, M., y Mintz, B. (1987) Cloning and characterization of a cDNA codin for mouse placental alkaline phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 7051-7155.
- Terry, J.M., Piña, S.E. y Mattingly, S.J. (1991) Environmental conditions which influence conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Infect. Immun. **59**: 471-477.
- Terry, J.M., Piña, S.E. y Mattingly, S.J. (1992) Role of energy metabolism in conversion of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to the mucoid phenotype. Infect. Immun. **60**: 1329-1335.
- Titball, R.W. y Rubidge, T. (1990) The role of histidine residues in the alpha toxin of *Clostridium perfringens*. FEMS Microbiol. Lett. **68**: 261-266.
- Touati, E. y Danchin, A. (1987) The structure of the promoter and amino terminal region of the pH 2.5 acid phosphatase gene (*appA*) of *E. coli*: a negative control of transcription mediated by cyclic AMP. Biochimie **69**: 215-221.
- Vihko, P. (1979) Human prostatic acid phosphatase. Purification of a minor enzyme and comparisons of the enzymes. Invest. Urol. **16**: 349-352.
- von Tigerstrom, R., (1984) Production of two phosphatases by *Lysobacter enzymogenes* and purification and characterization of the extracellular enzyme. Appl. Environ. Microbiol. **47**: 693-698.
- Watanabe, M., Murata, R. y Homma, J.Y. (1978) Partial purification of heat-labile hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Japan J. exp. Med. **48**: 449-463.
- Wadzinski, B.E., Wheat, W.H., Jaspers, S., Peruski, L.F., jr., Lickteig, R.L., Johnson, G.L. y Klemm, D.J. (1993) Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. Mol. Cell. Biol. **13**: 2822-2834.
- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T. y Okada, Y. (1978) One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. Cell **15**: 245-250.

U.N.R.C.
Biblioteca Central



66258

66258