

ESTUDIO DE LA PIRUVATO QUINASA DEL MUSCULO ADUCTOR DE *Mytilus chilensis*: ORGANISMOS OBTENIDOS DE DIFERENTES ALTURAS INTERMAREALES.

ROBERT SIMPFENDORFER¹, MARIA V. VIAL^{1*}, DAVID NASH¹, MARIA L. GONZALEZ¹ y DANIEL LOPEZ¹

ABSTRACT: Simpfendorfer, R.; Vial, M.V.; Nash, D.; González, M.L.; & D. López. 1994. Pyruvate kinase from the adductor muscle of *Mytilus chilensis*: Specimens obtained from different intertidal levels. Revista de Biología Marina, Valparaíso. 29(1) 113-125.

The pyruvate kinase (PK) from the adductor muscle of the bivalve *Mytilus chilensis* (Hupé) was studied after purifications performed during spring. The enzyme showed a high sensitivity to the allosteric activation by fructose-1,6-diphosphate (FDP) and to the allosteric inhibition by alanine. Phenylalanine and ATP also inhibited notably the enzyme (at pH 7). The nucleotide ADP activated the PK to a higher degree, but GDP and IDP were also recognized as substrates. The PK was inhibited by an excess in the concentration of ADP, as has been previously reported for other PKs from marine invertebrates. The saturation kinetic for this substrate was hyperbolic. The optimum pH of the enzyme was 7.3, and the lower the pH, the higher was the homotropic effect of the enzyme for the substrate phosphoenolpyruvate (PEP) (pH 6.5 > 8.1). The divalent cation Mg²⁺ activated the enzyme as occurs with other PKs, but Mn²⁺ and Co²⁺ also activated the enzyme. Nevertheless, in the presence of Mn²⁺ the enzyme showed a hyperbolic kinetic regarding the substrate PEP, and the allosteric effects of FDP and alanine disappeared. After treatment of the PK with alkaline phosphatase during 24 h at room temperature, the allosteric inhibition by alanine diminished markedly. The results suggest that the adductor muscle PK from *M. chilensis* is a regulated enzyme and that it would be phosphorylated during spring-time, independent of the intertidal level inhabited by the animal.

Key words: Pyruvate kinase, Intertidal zone, Anaerobic pathways, Protein phosphorylation.

RESUMEN: Simpfendorfer, R.; Vial, M.V.; Nash, D.; González, M.L. & D. López. 1994. Estudio de la piruvato quinasa del músculo aductor de *Mytilus chilensis*: organismos obtenidos de diferentes alturas intermareales. Revista de Biología Marina, Valparaíso. 29(1): 113-125.

Se estudió la piruvato quinasa (PK) del músculo aductor del bivalvo intermareal *Mytilus chilensis* (Hupé). Se purificó la enzima durante la primavera, desde organismos trasplantados a dos alturas intermareales. La PK evidenció una alta sensibilidad a la activación alostérica por fructosa-1,6-difosfato (FDP) y a la inhibición alostérica por alanina. Fenilalanina y ATP inhibieron marcadamente la actividad PK. Frente a ADP y fosfoenolpiruvato (PEP) la enzima mostró inhibición por exceso de sustrato. La PK también fue activada por los nucleótidos GDP e IDP, aunque en menor grado que al utilizar ADP. El pH óptimo de la PK fue 7,3, y se observó que al bajar el pH, aumentó el grado de cooperatividad de la enzima para el sustrato PEP. Los metales divalentes Mg²⁺, Co²⁺ y Mn²⁺ activaron la PK, aunque en presencia de Mn²⁺ la PK mostró cinética hiperbólica para PEP. Al tratar la PK durante 24 h con fosfatasa alcalina, disminuyó marcadamente la inhibición alostérica por alanina, sugiriendo una desfosforilación de la enzima. Los resultados presentados indican que la PK de músculo aductor de *M. chilensis* es una enzima regulable, y que se encontraría fosforilada durante la primavera, en forma independiente de la altura intermareal habitada por el bivalvo.

Palabras claves: Piruvato quinasa, zona intermareal, vías anaeróbicas, fosforilación proteica.

¹ Departamento de Acuicultura, Universidad de los Lagos, Casilla 933, Osorno, Chile.

* A quien se debe dirigir la correspondencia.

INTRODUCCION

La piruvato quinasa de algunos invertebrados marinos intermareales es una enzima regulable, similar a la forma alostérica presente en el hígado de vertebrados, activada por FDP e inhibida por el aminoácido alanina (Hochachka & Mustafa 1972; Zandee *et al.* 1986; Vial *et al.* 1992). Por ello se denomina la isoentima tipo L, mientras que la PK tipo M es la isoforma presente en el músculo esquelético de vertebrados, enzima con cinética hiperbólica que no presenta características regulatorias (Munday *et al.* 1980). La PK tipo L de moluscos marinos participaría en el punto de bifurcación metabólica del PEP, que sirve de acceso a la ruta anaeróbica del succinato (Hochachka & Mustafa 1972; Hochachka & Somero 1984). Esta enzima sería inhibida por alanina, metabolito que aumenta su concentración en períodos de anaerobiosis ambiental o funcional, en conjunto con el descenso en el pH intracelular observado luego de algunas horas de anoxia (de Vooy 1980; Holwerda *et al.* 1989). Esta inhibición de la PK es requerida para que el PEP sea convertido en oxaloacetato, vía la enzima fosfoenolpirúvico carboxiquinasa (PEPCK) (Zammit & Newsholme 1978; Zandee *et al.* 1986), ingresando a la ruta anaeróbica del succinato-propionato (Hochachka & Mustafa 1972).

Otro mecanismo de regulación metabólica de este punto de bifurcación estaría dado por la fosforilación-desfosforilación de la PK, mecanismo observado previamente en otras PKs de invertebrados marinos (Hakim *et al.* 1985; Michaelidis *et al.* 1988). Al ser fosforilada

la PK, aumenta el grado de cooperatividad para el sustrato PEP y se torna más susceptible a la inhibición alostérica por alanina y a la activación alostérica por FDP (Plaxton & Storey 1984; Holwerda *et al.* 1989). Se ha propuesto que este mecanismo de regulación de fosforilación-desfosforilación operaría en especies que habitan la zona intermareal y que serviría para acelerar los cambios metabólicos de transición aerobiosis-anaerobiosis a los que está constantemente expuesto el animal por los ciclos de marea: puede inferirse que el período para fosforilar-desfosforilar la PK sería muy restringido. En el presente trabajo se purificó la PK de músculo aductor del bivalvo *M. chilensis* (especie que habita el intermareal rocoso medio-inferior de la costa chilena) durante la primavera, en ejemplares ubicados a distintas alturas del intermareal, para conocer sus características cinéticas.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS: se utilizaron reactivos bioquímicos provenientes de Sigma, y las sales inorgánicas provenían de Merck. Las resinas cromatográficas provenían de Sigma, al igual que la enzima fosfatasa alcalina y los estándares de peso molecular. Todos los reactivos eran de elevada pureza.

ANIMALES: el bivalvo (3-4 cm de largo) fue recolectado (en primavera) de la zona intermareal de Punta Metri (Seno de Reloncaví, 41°36'S; 72°42'W). Se extrajeron ejemplares durante la marea baja desde la zona media de la distribución natural de esta especie en Punta Metri, como también de trasplantes a diferentes alturas intermareales (Simpfendörfer *et*

al. 1993)¹, siempre dentro de los límites naturales de distribución del bivalvo en el intermareal rocoso. Los ejemplares fueron transportados en emersión a la Unidad de Bioquímica Marina de la Universidad de Los Lagos (Osorno), siendo procesados de inmediato.

EXTRACCION Y PURIFICACION DE LA PK DEL MUSCULO ADUCTOR: en cada preparación se extrajo el músculo aductor de 200-300 ejemplares del bivalvo, tejido que fue inmediatamente homogeneizado en frío, en amortiguador A: Tris-HCl 50 mM, pH 7, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, PMSF 0,1 mM, con un homogeneizador vidrio-vidrio. El extracto fue centrifugado a 30.000 g por 30 min, a 4°C. El sobrenadante fue tratado con sulfato de amonio sólido para obtener una fracción proteica que precipita entre 35-65% de saturación de la sal (centrifugando cada vez a 30.000 g por 30 min). El precipitado obtenido fue resuspendido en amortiguador B: Tris-HCl 10 mM, pH 7, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, y fue dializado por 12 h contra 2 l de amortiguador B (con un cambio de solución). La fracción dializada fue aplicada a una columna de DEAE-Sephadex (2-12 cm), preequilibrada con el mismo amortiguador, a un flujo constante de 0,2 ml/min. La enzima retenida fue lavada con 200 ml de amortiguador B, y luego fue eluída con un gradiente lineal de KCl 0-2 M preparada en amortiguador B, al mismo flujo. El pico de actividad PK fue recolectado y dializado contra 2 l de amortiguador C: fosfato 10 mM, pH 7, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, durante 12 h, con un cambio de amortiguador C. La fracción dializada fue aplicada a una columna de intercamb-

bio iónico de fosfocelulosa (2·10 cm), preequilibrada en amortiguador C. La cromatografía fue realizada a un flujo de 0,15 ml/min. La enzima retenida fue lavada con 150 ml de amortiguador C y luego fue aplicada una gradiente lineal de fosfato 10-250 mM, preparada como el amortiguador C. Las fracciones obtenidas con mayor actividad PK fueron dializadas exhaustivamente contra amortiguador D: Tris-HCl 10 mM, pH 7, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, glicerol 5 %, KCl 0,1 M, MgCl₂ 0,5 mM. La fracción enzimática dializada fue aplicada a una columna de afinidad de Cibacron Blue (1·6 cm), preequilibrada con amortiguador D. La PK retenida fue lavada como en las cromatografías anteriores, y luego fue aplicada una gradiente lineal de KCl 0,1-2 M preparada en solución D, para eluir la enzima. La preparación obtenida de la cromatografía de afinidad fue dializada contra solución D, fracción utilizada para caracterizar la PK purificada.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PK Y CONCENTRACION DE PROTEINAS: la actividad PK fue medida de acuerdo a Bücher & Pfeleiderer (1955), usando la enzima acoplada LDH (Vial *et al.* 1992). El medio de reacción constaba de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7, KCl 65 mM, MgCl₂ 5 mM, ADP 0,4 mM, NADH 0,2 mg/ml, LDH 5,5 U (exceso), PEP 0,5 mM. Se monitoreó la cinética de desaparición del NADH a 340 nm durante 1-3 min. La reacción fue iniciada con la adición del PEP. Se utilizó cada vez 10-50 µl de la solución enzimática. Al realizar las curvas de saturación se usaron las concentraciones de ADP y PEP indicadas en

1) 13^{ra}. Jornadas de Ciencias del Mar, Viña del Mar, 1993, pp 131.

la figura respectiva. Una unidad de actividad PK correspondió a la cantidad de enzima que oxidó 1 μmol de NADH por min, a 25°C, en un volumen final de 1 ml. La concentración de proteínas fue determinada por absorbancia a 280 nm para leer las columnas cromatográficas, y por el método de Bradford (1976) para calcular la purificación de la PK, usando albúmina sérica de bovino (BSA) como proteína de referencia.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA PK DE MUSCULO ADUCTOR DE *M. chilensis*: el peso molecular de las subunidades de la PK purificada fue determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, de acuerdo a Laemmli (1970). β -galactosidasa (116 kDa), BSA (66 kDa), albúmina de huevo (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa) fueron los estándares de peso molecular. El peso molecular de la enzima nativa fue determinado por filtración en gel Sephacryl S-300. La columna (1.65 cm) fue previamente equilibrada con 0,4 l de amortiguador E: Tris-HCl 10 mM (pH 7), EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 0,1 M. Los estándares de peso molecular (β -amilasa, 200 kDa; alcohol deshidrogenasa, 150 kDa; BSA, 66 kDa; anhidrasa carbónica, 29 kDa) fueron disueltos en amortiguador E, y la PK fue dializada contra amortiguador E antes de la cromatografía de filtración. El flujo de la columna (constante) fue de 0,1 ml/min. La PK fue detectada midiendo actividad enzimática y los estándares fueron revelados midiendo proteínas por Bradford (1976).

TRATAMIENTO DE LA PK PURIFICADA CON FOSFATASA ALCALINA: el procedimiento de desfosforilación aplicado fue el descrito previamente por Plaxton &

Storey (1984). La enzima fue dializada en frío contra amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, sacarosa 0,75 M, DTT 1 mM, EDTA 1 mM. La PK dializada fue incubada en esta misma solución (menos EDTA), más KCl 25 mM y MgCl_2 10 mM, con 20 unidades de fosfatasa alcalina (de *E. coli*) durante 24 h, a temperatura ambiente (Michaelidis *et al.*, 1988). Los controles realizados (tratados en las mismas condiciones que la fracción experimental, pero en ausencia de fosfatasa alcalina) indicaron que la enzima pierde poca actividad (10-20 %) luego de ser mantenida por este período a temperatura ambiente.

RESULTADOS

PURIFICACION DE LA PK DE MUSCULO ADUCTOR DEL BIVALVO.

La PK fue purificada aproximadamente 300 veces, luego de las cuatro etapas de purificación aplicadas (precipitación con sulfato de amonio, cromatografías de intercambio iónico en DEAE y fosfocelulosa, y cromatografía de afinidad en Cibacron Blue) (Tabla 1). La etapa más efectiva fue la cromatografía de afinidad. La recuperación fue de un 23% en la purificación presentada en la Tabla 1. La PK fue purificada a homogeneidad electroforética. El peso molecular de cada subunidad fue de 71,2 kDa, determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, en condiciones reductoras (Fig. 1). Este resultado implica que la PK de músculo aductor de *M. chilensis* sería un tetrámero de peso molecular similar a otras PK tipo L (Munday *et al.* 1980; Plaxton & Storey 1984; Simpfendörfer *et al.* 1994, b). El peso molecular de la enzima nativa fue corroborado por cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-300, procedimiento por el que se obtuvo

Tabla 1. Purificación de la piruvato quinasa del músculo aductor del bivalvo. Se midió actividad PK en presencia de FDP 0,1 mM para calcular la tabla de purificación.

Fracción	Vol. (ml)	Act.PK (U)	Prot. (mg)	Act. esp. (U/mg)	Purif.	Rend. (%)
Extracto inicial	88	106	220	0.48	1	100
Sulfato amonio	21	106	42	2.5	5.2	100
DEAE	43	125	20.6	6.1	12.7	118
Fosfofelulosa	29	41	2.76	14.9	31	39
Cibacron Blue	45	24	0.159	151	315	23

un peso molecular de alrededor de 300 kDa. El comportamiento de la enzima observado durante las etapas de purificación fue el mismo para ejemplares provenientes de las distintas alturas intermareales (límites superior e inferior de la distribución intermareal del bivalvo en Punta Metri).

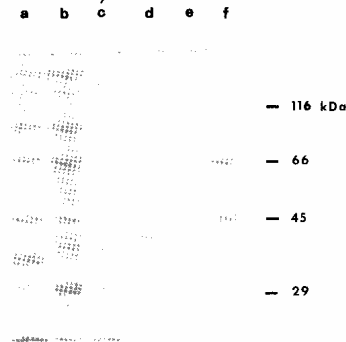


Fig. 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (en condiciones reductoras) de las fracciones de la PK en el transcurso de la purificación. Se utilizó acrilamida al 10% a, extracto crudo de músculo aductor; b, fracción sulfato de amonio; c, fracción DEAE; d, fracción fosfofelulosa; e, fracción obtenida de Cibacron Blue. f, estándares de peso molecular, indicados en Materiales y Métodos.

CARACTERIZACION CINETICA DE LA PK

Se realizaron curvas de saturación para PEP en presencia de FDP y alanina (Fig. 2). Se observó que la enzima presenta efecto cooperativo para el sustrato PEP, y que a concentración 1 mM de PEP la PK presenta inhibición por exceso de sustrato. La FDP activó marcadamente la PK, efecto observado previamente para PKs regulables que se encuentran fosforiladas (Plaxton & Storey 1984; Carvajal *et al.* 1990; Michaelidis *et al.* 1988). Alanina mostró inhibición alostérica característica para el aminoácido (Hochachka & Mustafa 1972; Zandee *et al.* 1986; Carvajal *et al.* 1990). El efecto inhibitorio fue pronunciado, similar al observado en PKs fosforiladas (Plaxton & Storey 1985; Michaelidis *et al.* 1988). Para el sustrato ADP la enzima mostró cinética hiperbólica (Fig. 3), como se observa en el gráfico de dobles recíprocos (inserto de la Fig. 3). La Km para ADP fue 0,36 mM. Se aprecia también en la figura una marcada sensibilidad al exceso del sustrato, el que a concentración de ADP mayor que 0,5 mM inhibe la actividad PK. GDP e IDP no fueron buenos sustratos de la PK (Fig. 4), puesto que la Vmáx obtenida en presencia de estos nucleótidos fue sólo un 25 % respecto a la actividad obtenida con ADP bajo las mismas condiciones. Para GDP e IDP, la cinética fue igualmente hiperbólica.

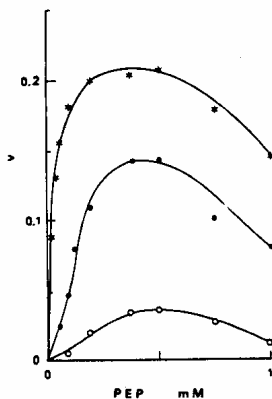


Fig. 2. Curvas de saturación para PEP en ausencia (●) y presencia de los efectores alostéricos FDP 0.1 mM (*) y alanina 1 mM (o). Se indica la velocidad como la variación en la absorbancia a 340 nm/min. El pH fue 7 (amortiguador Tris-HCl 50 mM), y la concentración de ADP fue 0.4 mM en todos los casos.

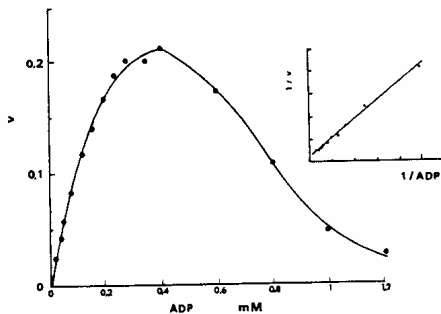


Fig. 3. Curva de saturación para ADP de la PK del bivalvo. En el inserto se indica el gráfico de dobles recíprocos. La concentración de PEP fue 0.5 mM (pH 7).

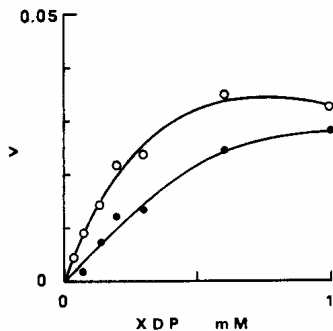


Fig. 4. Curvas de saturación para los nucleótidos GDP (o) e IDP (●), a las concentraciones indicadas en la figura. (PEP 0,5 mM; pH 7). Se utilizó la misma cantidad de PK que en la figura 3.

Se estudiaron los efectos de inhibidores de otras PKs de invertebrados marinos, como ATP y fenilalanina, además de alanina (de Vooy 1980; Morán *et al.* 1983). Se observa en la figura 5 que la PK de *M. chilensis* es afectada notoria-

mente por los tres moduladores, resultado que nuevamente es similar a lo observado para PKs fosforiladas de moluscos intermareales, especialmente dada la marcada inhibición por ATP (de Vooy 1980).

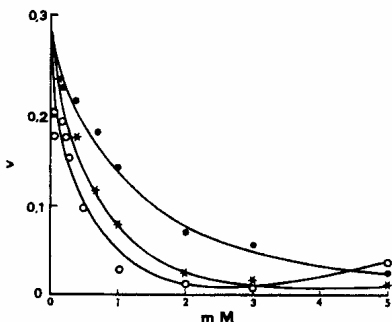


Fig. 5. Determinación de la actividad de la PK en presencia de concentraciones crecientes de alanina (o), ATP (*) y fenilalanina (●) (PEP 0,5 mM; ADP 0,4 mM; pH 7). El control de actividad 100 % fue determinado en ausencia de los efectores.

El pH al cual se obtuvo la mayor actividad PK fue 7,3, disminuyendo la actividad a pH inferiores a 6,5 y superiores a 8 (Fig. 6). Como se aprecia en la figura, se utilizaron diferentes amortiguadores orgánicos e inorgánicos para determinar estos valores. Al repetir las curvas de saturación para PEP en presencia de FDP y alanina a diferentes pH, se ob-

tuvo que al descender el pH, aumentaron los efectos cooperativos de la PK para el sustrato PEP (Fig. 7). A pH 8,1 en cambio, la enzima prácticamente no fue afectada por sus efectores alostéricos y la cinética para PEP fue hiperbólica. La Tabla 2 resume los índices cinéticos obtenidos para la PK purificada en meses de primavera (Figs. 2 y 7).

Tabla 2. Parámetros de la PK de músculo aductor de *M. chilensis*, en presencia de efectores alostéricos. Se indica el $S_{0,5}$ (μM) y el coeficiente de Hill (n_H).

	pH 6,5		pH 7		pH 8,1	
	$S_{0,5}$	n_H	$S_{0,5}$	n_H	$S_{0,5}$	n_H
Control	460	2,03	156	1,72	200	1,39
Alanina 1 mM	1370	1,41	255	1,84	1000	0,98
FDP 0,1 mM	42	1,17	32	1,36	61	0,95

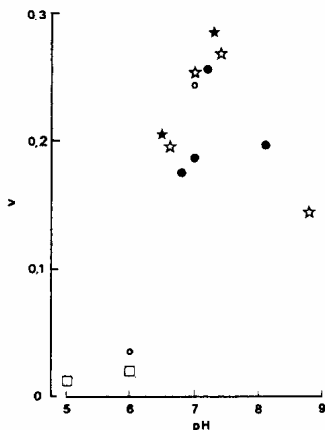


Fig. 6. Determinación de la actividad PK en función del pH. Se utilizó diferentes amortiguadores, todos a concentración 50 mM: acetato (□), fosfato (○), TES (★), HEPES (☆) y Tris-HCl (●). (PEP 0,5 mM; ADP 0,4 mM).

La PK requiere de la unión de un metal divalente en conjunto con el nucleótido al sitio activo para realizar la catálisis (Munday *et al.* 1980). El Mg^{2+} es el catión que activa la PK de otras especies de invertebrados marinos como también la enzima de vertebrados. En el caso de la PK de *M. chilensis* Mg^{2+} también activó la enzima, aunque Mn^{2+} y Co^{2+} (a concentraciones similares) fueron igualmente reconocidos como cofactores (Fig. 8). Sin

embargo, al realizar curvas de saturación para PEP en presencia de Mn^{2+} 5 mM, la cinética resultó hiperbólica, y los efectores alostéricos de la PK, FDP y alanina, no afectaron su actividad catalítica (Fig. 9). La K_m para PEP- Mn^{2+} (en ausencia de efectores) fue 34 μM . Este resultado se ha descrito previamente para la PK de otros moluscos marinos (González *et al.* 1984; Simpfendörfer *et al.* 1994, b).

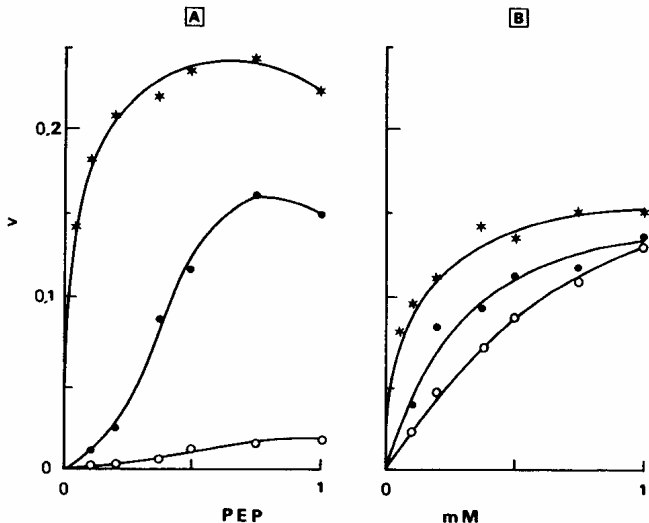


Fig. 7. Curvas de saturación para PEP en ausencia (●) y presencia de FDP 0.1 mM (*) y alanina 1 mM (○), a pH 6,5 (A) y pH 8,1 (B). La experiencia fue realizada como se describe en la figura 2.

INCUBACION DE LA PK CON FOSFATASA ALCALINA

La PK de *M. chilensis* fue tratada con fosfatasa alcalina, como se describió en Materiales y Métodos (Plaxton & Storey 1984). Luego de la incubación con esta enzima, se midió la actividad PK, en presencia y ausencia de FDP y alanina.

La Tabla 3 resume los resultados obtenidos. Se observa que luego de tratar la PK con fosfatasa alcalina, disminuye levemente la activación alostérica por FDP y disminuye notoriamente la inhibición alostérica por alanina (independientemente de la altura intermareal de la que provenían los ejemplares del mitflido).

Tabla 3. Actividad PK (variación de absorbancia a 340 nm/min; PEP 1 mM, ADP 0,85 mM) en presencia de FDP y alanina, luego de ser tratada con fosfatasa alcalina por 24 h.

	PK control	PK desfosforilada
Sin efectores	0,064	0,048
Alanina 1 mM	0,005	0,026
FDP 0,1 mM	0,106	0,072

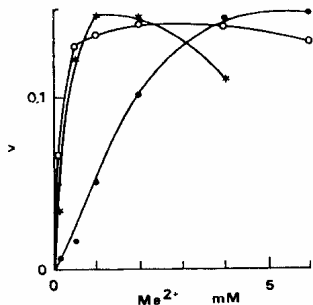


Fig. 8. Determinación de la actividad PK en presencia de concentraciones crecientes de Mg^{2+} (●), Mn^{2+} (○) y Co^{2+} (*). Las sales utilizadas eran de sulfato. Se midió la velocidad de reacción como se describe en Materiales y Métodos.

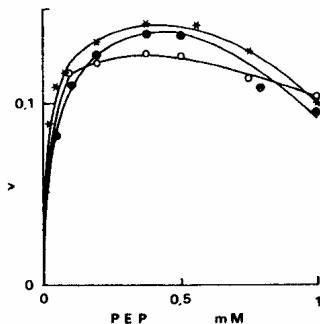


Fig. 9. Curvas de saturación para PEP en ausencia (●) y presencia de FDP 0,1 mM (*) y alanina 1 mM (○), reemplazando al magnesio por Mn^{2+} 5 mM. La experiencia fue realizada en idénticas condiciones a las de la figura 2.

DISCUSION

En el presente trabajo se describe la purificación y caracterización enzimática de la PK del músculo aductor del bivalvo *M. chilensis*, especie que habita la zona intermareal media-inferior del litoral rocoso, como también la zona submareal somera. Por ello esta especie se encuentra constantemente expuesta en su hábitat a fluctuaciones en las condiciones bióticas tales como abundancia de depredadores, y abióticas, tales como la disponibilidad de oxígeno, fluctuaciones de temperatura y salinidad, entre otras. Estas variaciones están dadas por los naturales ciclos de marea, por ello dependen de la altura del intermareal donde habita el animal. Esta especie posee un bajo grado de respiración aérea (Simpfendörfer *et al.* 1994, a), por lo que al quedar expuesta al aire al bajar la marea, debe recurrir en poco tiempo a rutas metabólicas anaeróbicas que le permiten suplir sus requerimientos energéticos (Zandee *et al.* 1986; Vial *et al.* 1992). Ello deberá ser más o menos marcado dependiendo de la altura intermareal habitada por el organismo. Así, un ejemplar en la zona alta deberá soportar prolongados períodos de emersión, los que serán de menor duración al descender en el intermareal.

Se ha determinado que esta especie forma succinato en pocas horas de emersión o de anoxia (Simpfendörfer *et al.* 1994, a), por lo que se infiere que su metabolismo es regulado rápidamente frente a situaciones de carencia de oxígeno, producto de las mareas. La PK se ha postulado como una enzima clave en la transición aerobiosis-anaerobiosis en invertebrados marinos (Zammit &

Newsholme 1978), pues se ha observado una inhibición de su actividad enzimática en períodos de carencia de oxígeno o de emersión (Holwerda *et al.* 1989; Vial *et al.* 1992). En el presente trabajo se determinó que la PK de músculo aductor del bivalvo intermareal es una enzima regulable, similar a las enzimas tipo L encontradas en otros moluscos marinos que poseen rutas anaeróbicas. La enzima fue activada por FDP e inhibida marcadamente por alanina, ATP y fenilalanina (Figs. 2, 5). Estos efectos son similares a los observados previamente en otras PKs que se ha demostrado están fosforiladas (Plaxton & Storey 1984, 1985; Michaelidis *et al.* 1988). La elevada sensibilidad al efecto del pH en la cooperatividad de la PK para el PEP (Fig. 7) también es indicativa de la fosforilación de la PK (Michaelidis *et al.* 1988). No obstante, en este caso no se detectaron diferencias en la PK de organismos obtenidos de alturas diferentes del intermareal, cuya exposición a la emersión al bajar la marea varió de 4-5 a 7-9 h en los trasplantes inferior y superior, respectivamente. La enzima se encontraría fosforilada covalentemente durante un período prolongado de tiempo (posiblemente en forma estacional), y no cambiaría el grado de fosforilación durante el ciclo de mareas, lapso para el cual se ha postulado que actuaría la fosforilación-desfosforilación como mecanismo de regulación metabólica (Plaxton & Storey 1984; Zandee *et al.* 1986). Este resultado requiere de un mayor conocimiento de las causas ecológicas que se traducen en la fosforilación de la PK de este invertebrado intermareal.

Se ha determinado en otra estación (otoño), que la PK del músculo aductor

de este mitfido presenta características cinéticas diferentes: menor efecto homotrópico frente al sustrato PEP, y menor regulación alostérica por FDP y alanina (Simpfendörfer *et al.* 1994, a). Estas características se asemejan a las obtenidas en este trabajo para la PK tratada con fosfatasa alcalina. Por otra parte, en *J. cirratus*, cirripedio que habita la zona intermareal alta, también se han detectado 2

isoformas de la PK que aparecen estacionalmente (Simpfendörfer *et al.* 1994, b).

Se postula en el presente trabajo que la PK de *M. chilensis* sería regulada en forma dependiente de las condiciones ambientales operantes en diferentes estaciones del año, más que en función del ciclo de mareas al cual el bivalvo está sometido constantemente en su hábitat.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT N° 0666-92, a M.V.V. Los autores agradecen la colaboración de Alejandra Monsalve en la realización de algunas experiencias y en los trasplantes de terreno.

LITERATURA CITADA

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bücher, T. & G. Pfeleiderer (1955) Pyruvate kinase from muscle. In: "Methods in Enzymology" (Colowick, S. & N.O. Kaplan, eds.). Academic Press, New York 1: 435-440.
- Carvajal, N.; González, R. & E. Kessi (1990). Tissue-specific regulation of pyruvate kinase during environmental anoxia in *Concholepas concholepas* (Gastropoda: Muricidae). *J. Exp. Zool.* 255: 280-285.
- González, R.; Carvajal, N. & A. Morán (1984) Differences between magnesium-activated and manganese-activated pyruvate kinase from the muscle of *Concholepas concholepas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B: 389-392.
- Hakim, G.; Carpené, E.; Cortesi, P. & G. Isani (1985) Regulation by phosphorylation-dephosphorylation of pyruvate kinase in *Venus gallina* and *Scapharca inaequivalvis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: 109-112.
- Hochachka, P.W. & T. Mustafa (1972) Invertebrate facultative anaerobiosis. *Science*, 178:1056-1060.
- Hochachka, P.W. & G.N. Somero (1984) Limiting oxygen availability. In: "Biochemical adaptation", pp. 145-181. Princeton University Press, New Jersey.
- Holwerda, D.A.; Veldhuizen-Tsoerkan, M.; Veenhoff, P.R. & E. Evers (1989) *In vivo* and *in vitro* studies on the pathway of modification of mussel pyruvate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 375-380.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* (London) **227**: 680-685.
- Michaelidis, B.; Gaitanaki, C. & I. Beis (1988) Modification of pyruvate kinase from the foot muscle of *Patella caerulea* (L.) during anaerobiosis. *J. Exp. Zool.* **284**: 264-271.
- Morán, A.; González, R. & O. León (1983) Studies of the effect of phenylalanine and pH on pyruvate kinase from the muscle of the sea mollusc *Concholepas concholepas*. *Comp. Biochem. Physiol.* **75B**: 603-605.
- Munday, K.; Giles, I. & P. Poat (1980) Review of the comparative biochemistry of pyruvate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* **67B**: 403-411.
- Plaxton, W. & K. Storey (1984) Phosphorylation *in vivo* of red-muscle pyruvate kinase from the channelled whelk, *Busycotypus canaliculatum*, in response to anoxic stress. *Eur. J. Biochem.* **143**: 267-272.
- Plaxton, W. & K. Storey (1985) Purification and properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from the hepatopancreas of the channelled whelk, *Busycotypus canaliculatum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**: 195-205.
- Simpfendörfer, R.W.; Vial, M.V.; López, D.A. Verdala, M. & M.L. González (1994, a) Relationship between the metabolic capacities and the vertical distribution of three intertidal sessile invertebrates: *Jeltilius cirratus* (Darwin) (Cirripedia), *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) (Bivalvia) and *Mytilus chilensis* (Hupé) (Bivalvia). Enviado a publicación.
- Simpfendörfer, R.W.; Vial, M.V.; Vesperinas, I.; González, M.L. & D.A. López (1994,b) Seasonal allosteric isoforms of pyruvate kinase from the intertidal cirriped *Jeltilius cirratus*. Enviado a publicación
- Vial, M.V.; Simpfendörfer, R.W.; López, D.A.; González, M.L. & K. Oelckers (1992) Metabolic responses of the intertidal mussel *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) in emersion and immersion. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **159**: 191-201.
- de Vooy, C.G.N. (1980) Anaerobic metabolism in sublittoral living *Mytilus galloprovincialis* Lam. in the mediterranean-II. Partial adaptation of the pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Comp. Biochem. Physiol.* **65B**: 513-518.
- Zammit, V. & E. Newsholme (1978) Properties of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in relation to the direction and regulation of phosphoenolpyruvate metabolism in muscles of the frog and marine invertebrates. *Biochem. J.* **174**: 979-987.
- Zandee, D.; Holwerda, D.A.; Kluytmans, J. & A. de Zwaan (1986) Metabolic adaptations to environmental anoxia in the intertidal bivalve mollusc *Mytilus edulis* L. *Neth. J. Zool.* **36**: 322-343.