



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Prof. Robert Simpfendörfer
Departamento de Acuicultura,
Universidad de Los Lagos

Profesor Co-Patrocinante
Dr. Alejandro Reyes
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

**Estudio metabólico en el bivalvo *Perumytilus purpuratus*:
Participación de la carboxiquinasa fosfoenolpirúvica en la
utilización de la ruta anaeróbica del succinato-propionato**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

Karin Berta Oelckers Gil

Valdivia Chile 2004

*.....Dedico este trabajo de tesis a mi familia y muy
especialmente a la memoria de mi querida amiga
María Victoria Vial Claro.....*

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer término y en forma muy especial a mi primera Profesora Patrocinante, Directora de Tesis y amiga, Sra. María Victoria Vial Claro (Q.E.P.D.) por haberme acogido y haberme dado la posibilidad de trabajar con ella en su Laboratorio. Por todas sus enseñanzas, consejos que me entregó y por su dedicación que me brindó siempre y en cada momento que lo necesité y muy especialmente por la infinita paciencia y amistad que tuvo conmigo en todo momento. De igual modo quiero agradecer de forma muy especial a quien es hoy día mi Profesor Patrocinante, Sr. Robert Simpfendöfer, ya que sin él no hubiese podido estar donde hoy me encuentro. Por todo el tiempo, dedicación, amistad y conocimientos que me ha entregado, por darme su apoyo siempre y en cada momento que lo he necesitado y muy especialmente por la infinita paciencia que ha tenido conmigo durante todo este largo camino.

Quiero agradecer, también en forma muy especial al Dr. Alejandro Reyes P. por aceptar ser mi Co-patrocinante en la Universidad Austral de Chile, por su trato deferente y por el apoyo que me ha entregado para poder continuar con mi proceso de titulación.

Así, también quiero agradecer al Dr. Juan Carlos Slebe por aceptar ser miembro de mi comisión evaluadora.

A la Dra. María Cecilia Rojas quiero agradecerle todos los conocimientos y apoyo que me ha entregado para la realización de esta tesis y por estar siempre dispuesta a darme su ayuda cuando la he necesitado y por todas las palabras de estímulo que me ha brindado.

A Marcos Verdala y a Cecilia Pino por su colaboración en determinadas experiencias.

A Paul Guttler, por su ayuda prestada en la confección de esta tesis.

A mi familia, especialmente a mi marido y a mis hijos por estar a mi lado en los buenos y en los malos momentos siempre brindándome su apoyo y cariño e instándome a que continúe con este trabajo.

A todos aquellos que de alguna u otra manera me han ayudado y acompañado durante todos estos años, gracias.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Acuicultura de la Universidad de Los Lagos, y contó con el financiamiento de los proyectos FONDECYT 0032-89, 0666-92 y de la Dirección de Investigación de la Universidad de Los Lagos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN		1
	ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN		3
3. MATERIALES Y MÉTODOS		17
3.1. Reactivos.		17
3.2. Animales.		17
3.3. Determinación de consumo de oxígeno en inmersión y en emersión en <i>Perumytilus purpuratus</i> .		17
3.4. Preparación de sobrenadantes proteicos de tejido muscular.		18
3.4.1. Determinación de la actividad PEPCK.		19
3.4.2. Determinación de la actividad PK.		19
3.4.3. Determinación de la concentración de proteínas.		20
3.5. Determinación de la concentración de succinato.		20
3.6. Purificación de la PEPCK de músculo aductor de <i>Perumytilus purpuratus</i> .		21
3.7. Caracterización cinética de la enzima PEPCK purificada de músculo de <i>Perumytilus purpuratus</i> .		22
3.7.1. Determinación del tamaño molecular de la PEPCK.		22
3.7.2. Determinación de las constantes de Michaelis para los sustratos de la enzima.		22
3.7.3. Efecto de metales bivalentes.		23
3.7.4. Efecto del pH.		23
3.7.5. Efecto de potenciales moduladores de la enzima.		23
3.8. Estudios de inactivación y titulación de PEPCK con DTNB.		24
3.8.1. Estudios de inactivación de PEPCK con DTNB en presencia y en ausencia de sustratos.		24
3.8.2. Titulación con DTNB de la PEPCK purificada.		25

4. RESULTADOS	26
4.1. Determinación del consumo de oxígeno de <i>P. purpuratus</i> en inmersión y en emersión.	26
4.2. Actividad PEPCK y PK en sobrenadantes de músculo aductor de <i>P. purpuratus</i> en condiciones de emersión (hipoxia) y de burbujeo de nitrógeno (anoxia).	26
4.3. Determinación de succinato en músculo aductor de <i>P. purpuratus</i> .	29
4.4. Purificación de la PEPCK de músculo aductor de <i>P. purpuratus</i> .	29
4.5. Caracterización cinética y estructural de la PEPCK de <i>P. purpuratus</i> .	34
4.5.1. Determinación del tamaño molecular.	34
4.5.2. Determinación de las constantes de Michaelis para los sustratos en la reacción de carboxilación.	34
4.5.3. Efecto de metales bivalentes.	38
4.5.4. Efecto del pH.	38
4.5.5. Efecto de potenciales moduladores de la enzima.	38
4.6. Inactivación y titulación de la PEPCK muscular de <i>P. purpuratus</i> con DTNB.	45
5. DISCUSIÓN	57
6. BIBLIOGRAFÍA	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1a. Ilustración esquemática del punto de bifurcación metabólica del fosfo <i>enol</i> piruvato en moluscos bivalvos.	7
Figura 1b. Esquema metabólico que representa las transiciones graduales del metabolismo durante el ciclo de mareas.	8
Figura 1c. Acumulación de metabolitos anaeróbicos durante 24 h de emersión.	9
Figura 2. Ilustración esquemática de la reacción catalizada por la PEPCK.	11
Figura 3. Variación de las actividades PK y PEPCK en función del tiempo de anoxia parcial o total .	28
Figura 4. Determinación de la concentración de succinato.	30
Figura 5. Cromatografía de intercambio iónico en fosfocelulosa de la PEPCK de músculo aductor de <i>P. purpuratus</i> .	33
Figura 6. Cromatografía de afinidad en GTP-agrosa-hexano de la PEPCK de músculo aductor de <i>P. purpuratus</i> .	35
Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, de la PEPCK de músculo aductor de <i>P. purpuratus</i> .	36
Figura 8. Gráfico de log. PM de proteínas marcadores <i>vs.</i> movilidad relativa en una cromatografía de filtración molecular en Sephacryl S-300 para determinar el peso molecular de la PEPCK de <i>P. purpuratus</i> .	37
Figura 9. Efecto de la concentración de IDP sobre la actividad de la PEPCK.	39

Figura 10. Efecto de la concentración de PEP sobre la actividad de la PEPCK.	40
Figura 11. Efecto de la concentración de HCO_3^- sobre la actividad de la PEPCK.	41
Figura 12. Efecto de la concentración de metales bivalentes en la actividad de PEPCK.	43
Figura 13. Determinación de la actividad PEPCK a diferentes valores de pH.	44
Figura 14. Efecto de la concentración de ITP y ATP sobre la actividad de PEPCK.	46
Figura 15. Gráfico de los dobles recíprocos de la velocidad inicial vs. la concentración de PEP para la PEPCK, en ausencia y en presencia de ITP.	47
Figura 16. Cinética de inactivación de la PEPCK de <i>P. purpuratus</i> con diferentes concentraciones de DTNB.	48
Figura 17. Cinética de inactivación de la PEPCK de <i>P. purpuratus</i> con DTNB en ausencia y en presencia de sustratos.	50
Figura 18. Cinética de inactivación de la enzima PEPCK preincubada con diferentes concentraciones de PEP.	51
Figura 19a Titulación de la PEPCK de <i>P. purpuratus</i> con DTNB.	52
Figura 19b Titulación de la PEPCK de <i>P. purpuratus</i> con DTNB en presencia de SDS.	53
Figura 20. Modificación e inactivación de la PEPCK purificada de <i>P. purpuratus</i> con concentración equimolar de DTNB.	54
Figura 21. Cinética de inactivación de la PEPCK con DTNB a 0 °C.	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Consumo de oxígeno de <i>Perumytilus purpuratus</i> en inmersión y en emersión.	27
Tabla 2: Purificación de la PEPCK de músculo aductor de <i>Perumytilus purpuratus</i> .	32
Tabla 3: Valores de Km aparente para los sustratos de la PEPCK de <i>Perumytilus purpuratus</i>	42

ABREVIATURAS

A	: Absorbancia
ADP	: Adenosinadifosfato
ADH	: Alcohol deshidrogenasa
ATP	: Adenosinatrifosfato
BSA	: Albúmina sérica bovina
cAMP	: 3':5' - Adenosina monofosfato cíclico
cGMP	: 3':5' - Guanosina monofosfato cíclico
DTNB	: Acido 5'5'-ditio (bis)-2 (nitrobenzoico)
DTT	: Ditiotreitól
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
GDP	: Guanosinadifosfato
GTP	: Guanosinatrifosfato
HEPES	: Acido (N-[hidroxietil] piperazina-N – [2-etanosulfónico])
IDP	: Inosinadifosfato
INT	: p- iodonitrotetrazolio
ITP	: Inosinatrifosfato
K _m	: Constante de Michaelis
LDH	: Lactato deshidrogenasa
MDH	: Malato deshidrogenasa
MNB	: Mono nitrobenzoato
NADH	: Nicotinamida adenina dinucleótido, reducido
OAA	: Ácido Oxalacético
PEP	: Fosfoenolpiruvato
PEPCK	: Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PK	: Piruvato quinasa
PKA/PKG	: Proteína kinasa dependiente de cAMP / cGMP.
PK-CaM	: Proteína kinasa dependiente de Ca ²⁺ / Calmodulina
PM	: Peso molecular

PMSF	: fluoruro de fenilmetil sulfonilo
SDH	: Succinato deshidrogenasa
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
TES	: Acido (N-tris [hidroximetil] metil-2-aminoetano sulfónico)
Tris	: [Tris - (hidroximetil) - aminometano]

1. RESUMEN

Perumytilus purpuratus es un bivalvo marino habitual de nuestras costas. Presenta tolerancia a carencia de oxígeno, por lo cual se estudiaron en este trabajo sus capacidades fisiológicas y metabólicas de adaptación al hábitat intermareal, así como los mecanismos bioquímicos de respuesta a situaciones experimentales de carencia de oxígeno. Se observó que este organismo presenta elevada respiración aérea, respecto de su respiración en inmersión. De igual modo se comprobó que durante la emersión del bivalvo, la actividad de la enzima piruvato quinasa (PK) disminuyó en el tiempo, y se produjo un aumento de la actividad de la enzima carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK). Se observó acumulación de succinato en músculo aductor del bivalvo al ser expuesto a hipoxia. La enzima PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* fue purificada a homogeneidad electroforética. El procedimiento de purificación constó de tres etapas: a) precipitación con sulfato de amonio, b) cromatografía en fosfocelulosa y c) cromatografía de afinidad en GTP-agarosa. La actividad específica de la enzima purificada fue de 13 U/mg (a 25 °C); la enzima se purificó 252 veces, con un 28 % de rendimiento. La enzima nativa presentó una masa molecular de 89 kDa y en condiciones desnaturalantes fue de 74 kDa, por lo tanto la enzima correspondería a un monómero. La reacción enzimática se midió en el sentido de la carboxilación del fosfoenolpiruvato (PEP). Los valores de K_m aparente para los sustratos a pH 7, en presencia de 2,25 mM de $MnCl_2$, fueron de 0,55 mM (PEP), 2,4mM (HCO_3^-) y 0,045 mM (IDP). El pH óptimo de la reacción fue de 6,6 y la enzima requiere para su actividad de la presencia de un metal bivalente, en el siguiente orden de efectividad: $Co^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+}$. En la enzima purificada se realizaron estudios de cisteínas funcionales utilizando el ácido dítio (bis)-nitrobenzoico (DTNB). La enzima fue inactivada en presencia de DTNB y la titulación de la enzima nativa sugirió la presencia de 3 cisteínas reactivas por monómero de enzima. En presencia del sustrato IDP/ Mn^{2+} se observó protección de la inactivación por DTNB, lo cual, en conjunto con experimentos de cinética de inactivación por DTNB bajo condiciones de pseudo-primer orden, permite suponer que la pérdida de la actividad se debe a la modificación de una cisteína que estaría en (o cerca de) la región de unión del nucleótido. Los resultados sugieren elevadas capacidades de respuesta metabólica de *P. purpuratus* a situaciones ambientales de estrés hipóxico y que, además, la enzima PEPCK catalizaría a una etapa relevante en la discriminación del destino del fosfoenolpiruvato hacia vías metabólicas anaeróbicas como la del succinato-propionato en este invertebrado marino.

ABSTRACT

The marine bivalve *Perumytilus purpuratus* is a common inhabiting species of the Chilean coastline. It is an anoxic-tolerant intertidal organism, and their physiological and metabolic adaptatory capacities, as well as the biochemical mechanisms of response to environmental conditions of lack of oxygen, were investigated in this study.

It was observed that this organism shows a high aerial respiration, compared with immersed oxygen uptake. The muscular pyruvate kinase activity showed a marked decrease during emersion, and the phosphoenolpyruvate carboxykinase enzyme showed a clear increase on this tissue under experimental hypoxia. Accumulation of succinate was observed on adductor muscle of the bivalve after hypoxic / anoxic conditions.

The adductor muscle PEPCK of the mussel *P. purpuratus* was purified to electrophoretic homogeneity. The purification procedure included three steps: a) ammonium sulfate precipitation, b) chromatography on phosphocellulose, c) affinity chromatography on GTP-agarose. The specific activity of the purified enzyme was 13 U/mg (25 °C); the enzyme was purified 252-fold, with a yield of 28 %. The native molecular weight of the purified enzyme was 89 kDa, and of 74 kDa, by electrophoresis under denaturing conditions; the enzyme should therefore correspond to a monomer. The enzymatic activity was measured in the direction of carboxylation of PEP. The Michaelis constant (app Km) values for the substrates (pH 7), in the presence of 2,25 mM $MnCl_2$, were 0,55 mM (PEP), 2,4 mM (HCO_3^-), and 0,045 mM (IDP). The pH value for maximal PEPCK activity was 6,6, and the enzyme required a bivalent cation for activity, in the following order of effectiveness: $Co^{2+} > Mn^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+}$. Functional cysteines were studied on the purified enzyme, utilizing the reagent dithio (bis)-nitrobenzoic acid (DTNB). The enzyme was inactivated in the presence of DTNB, and the titration of the native enzyme suggested the presence of 3 reactive cysteines / monomer of PEPCK. Protection from inactivation by DTNB was observed in the presence of the substrate IDP/ Mn^{2+} , indicating that the loss of enzymatic activity was due to the modification of one cysteine which would be located in (or near) the nucleotide binding region.

The results presented here suggest high capacities of metabolic adaptation of *P. purpuratus* to environmental situations of hypoxic stress, and that the PEPCK enzyme should correspond to a relevant step on the metabolic fate of PEP into anaerobic metabolism, like the succinate-propionate metabolic pathway on this marine invertebrate.

2. INTRODUCCIÓN

La zona intermareal es el habitat de una gran variedad de organismos marinos, entre ellos, numerosas especies de invertebrados (Newell, 1979). Los invertebrados intermareales habitan una zona caracterizada por marcadas fluctuaciones en las condiciones bióticas y abióticas, impuestas por el ciclo de las mareas; estos organismos se ven expuestos a temperaturas extremas durante la emersión, riesgo de desecación, fluctuaciones marcadas de salinidad y también situaciones carenciales de oxígeno (Newell, 1979).

Los animales intermareales han desarrollado adaptaciones morfológicas, fisiológicas y metabólicas que les permiten adaptarse a las condiciones extremas que presenta la intermarea y poder sobrevivir así por períodos prolongados en estas condiciones. Invertebrados marinos representantes de diferentes phylum tienen distintas estrategias fisiológicas y metabólicas que les permiten adaptarse a las fluctuantes condiciones de la zona habitada (Zurburg y Kluytmans, 1980; Widdows y Shick, 1985; Zandee *et al.*, 1986; Vial *et al.*, 1999). Se ha observado que algunos mitílidos pueden captar oxígeno aéreo en emersión, ya que poseen una eficiente capacidad de respiración aérea bajo ciertas condiciones ambientales como baja temperatura, alta humedad relativa y por periodos cortos de exposición al aire (durante algunas horas) (Bayne *et al.*, 1976; Widdows *et al.*, 1979).

Por otro lado, se han postulado rutas metabólicas anaeróbicas que suplen, al menos en parte, los requerimientos metabólicos de estos invertebrados en situaciones de baja disponibilidad de oxígeno (Zandee *et al.*, 1986). Se ha observado en invertebrados marinos como bivalvos y gastrópodos (entre los más estudiados), que bajo condiciones de hipoxia, la degradación de glucosa (y/o glicógeno) conlleva a la formación de alanina, succinato y propionato entre otros (Simpson y Awapara, 1966; Hammen, 1969). Este metabolismo anaeróbico contemplaría la utilización de una vía alternativa en la cual el fosfoenolpiruvato (PEP), proveniente de la degradación glicolítica, sería transformado en oxalacetato (OAA) vía una carboxiquinasa fosfoenolpirúvica (PEPCK) citoplasmática (Hochachka y Mustafa, 1972; Zandee *et al.*, 1986). El OAA sería reducido a malato, el cual ingresaría a la matriz mitocondrial y luego, utilizando en

sentido reverso algunas reacciones del ciclo de Krebs, el OAA sería transformado de esta manera en los productos anaeróbicos succinato, y posteriormente, propionato. Esta ruta metabólica tendría ventajas respecto a la fermentación láctica tanto en lo que se refiere a la obtención de un mayor rendimiento de ATP, como producir un menor grado de acidez en el tejido. Otra ventaja sería tener una mayor rapidez en la degradación de metabolitos acumulados como succinato, al retornar el organismo a una situación de aerobiosis luego de reinmersión, producto de la alta marea, al mismo tiempo de mantener el balance redox glicolítico (Zammit y Newsholme, 1978).

La enzima PEPCK iniciaría de esta forma la ruta anaeróbica, en el punto de bifurcación del PEP por lo cual sería factible que posea algún mecanismo no descrito de regulación de su actividad catalítica, como también características cinéticas y estructurales que difieran de la PEPCK de otros organismos, que han sido ampliamente estudiadas, como la enzima de tejidos gluconeogénicos de vertebrados (Nordlie y Lardy, 1963; Flores y Alleyne, 1971; Hanson y Garber, 1972; Noce y Utter, 1975; Söling y Kleinecke, 1976; Jomain-Baum y Schramm, 1978; Lee *et al.*, 1981; Hebda y Nowak, 1982,b; Wiese *et al.*, 1991; Croniger *et al.*, 2002), o la enzima presente en levaduras (Cannata y Stoppani, 1963; Tortora *et al.*, 1985; Jabalquinto y Cardemil, 1992).

Al exponer invertebrados marinos a una situación de hipoxia se ha observado que la actividad PEPCK puede exceder a la actividad de piruvato quinasa (PK), enzima que se inhibe en el transcurso de la hipoxia y esta inhibición se incrementa marcadamente a medida que aumenta el período de anoxia (Munday *et al.*, 1980; Siau y Ip, 1987). La PK en tejidos de estos organismos es una enzima alostérica tipo “L”, similar a la de hígado (L) de vertebrados (Carvajal *et al.*, 1990; de Zwaan, 1972; de Zwaan y Holwerda, 1972; Holwerda y de Zwaan, 1973) que es modulada positivamente por fructosa-1,6-bisfosfato, e inhibida por L-alanina y por un aumento en la concentración de protones. Durante la hipoxia se ha observado una disminución del pH intracelular en diferentes tejidos de invertebrados marinos (Ellington, 1983; Walsh *et al.*, 1984), que combinada con un aumento en la concentración de alanina causaría la inhibición de la PK. Al estar inhibida la PK, el PEP disponible ingresaría a la ruta anaeróbica del succinato siendo transformado a OAA por la PEPCK citosólica (Zammit y Newsholme, 1978; Larade y Storey,

2002). Por lo tanto, se ha postulado la existencia de un punto de bifurcación entre la ruta aeróbica y anaeróbica en invertebrados marinos facultativos, el cual se encontraría a nivel del PEP.

Estudios realizados en especies intermareales de bivalvos del hemisferio norte, han demostrado que un gran número de invertebrados marinos son anaerobos facultativos, es decir, son capaces de adaptarse metabólicamente, tanto en inmersión como en emersión, a períodos prolongados de carencia parcial o total de oxígeno, ya sea por razones ambientales y/o funcionales (Zammit y Newsholme, 1976, 1978; Schiedek y Zebe, 1987).

Se ha propuesto que para lograr este propósito adaptativo frente a regímenes de disminución en la disponibilidad de oxígeno, estos organismos recurren a una ruta anaeróbica en la cual el PEP sería inicialmente convertido en OAA por la enzima PEPCCK (Zandee *et al.*, 1986; Larade y Storey, 2002). Se ha establecido que glicógeno es la principal fuente de energía en anaerobiosis (Zandee *et al.*, 1986; Gnaiger, 1983). Este polímero de glucosa está presente en grandes cantidades, especialmente en tejidos de bivalvos (de Zwaan y Wijsman, 1976). Se ha observado en algunos bivalvos, que el glicógeno es catabolizado a piruvato vía la glicólisis y luego, en vez de ser reducido a lactato, el piruvato experimenta una reacción de transaminación para formar alanina, que utiliza el grupo amino que ha sido transferido desde el aspartato. El producto de la deaminación del aspartato, es el oxalacetato el que sería posteriormente reducido a malato, lo cual sucedería en el inicio del período de carencia de oxígeno (Zandee *et al.*, 1986; Larade y Storey, 2002). De esta forma, la fase inicial del metabolismo anaeróbico estaría principalmente caracterizada por un consumo de aspartato y por un aumento en la concentración de alanina y de ciertas opinas (Siegmund *et al.*, 1985; Gäde y Grieshaber, 1986). Una vez que la enzima PK se inhibe por la acumulación de alanina, al continuar la hipoxia, el PEP no es convertido en piruvato, sino que en oxalacetato por la enzima PEPCCK, con la respectiva producción de ITP/GTP; el oxalacetato origina a continuación la acumulación de succinato y propionato (Hochachka y Mustafa, 1972; Kluytmans *et al.*, 1977). La aparición de estos productos es de esta manera secuencial al progresar el período de hipoxia (Hochachka y Somero, 1984; Livingstone, 1983). Se han propuesto diferentes esquemas de organización metabólica en invertebrados que dan cuenta del orden de aparición de estos productos (Larade y Storey, 2002). Bajo una condición

inicial de anoxia, se ha postulado que la ruta operante sería la que se presenta en la figura 1, a. Este esquema metabólico permite la utilización del piruvato formado en aerobiosis, para explicar la aparición inicial de alanina y, paralelamente, una leve acumulación temprana de succinato (Zandee *et al.*, 1986); en este momento ocurriría una inhibición gradual de la PK, lo cual ha sido demostrado en diferentes invertebrados marinos (de Vooy y Holwerda, 1986). En tejidos musculares de invertebrados marinos, la actividad PEPCK es similar a la actividad PK; algunos autores han utilizado la razón de las actividades específicas de la PK y PEPCK como índice de la capacidad de utilización de la ruta del succinato, ya que ambas enzimas competirían por el sustrato PEP (Fig. 1 a, b) (Ebberink y de Zwaan, 1980; Bowen, 1984; de Vooy, 1987; Simpfendörfer *et al.*, 1995).

Se ha observado en diferentes especies (principalmente bivalvos y gastrópodos marinos) que durante la transición aerobiosis-anaerobiosis, la enzima PK se inhibe, tanto bajo condiciones de $V_{m\acute{a}x}$, como a bajas concentraciones de PEP (Holwerda *et al.*, 1989; Vial *et al.*, 1992). La PK en tejidos de estos organismos es una enzima alostérica tipo L, compuesta de 4 subunidades, con una masa molecular de alrededor de 250 kDa (de Zwaan, 1972; de Zwaan y Holwerda, 1972; Holwerda y de Zwaan, 1973) modulada por fructosa-1,6-bisfosfato (FBP), L-alanina (entre otros aminoácidos), ATP y H^+ . Paralelamente a la inhibición paulatina en la actividad de la enzima PK, se produciría una activación de la PEPCK. Como se ha descrito en moluscos marinos, durante la anaerobiosis se produce una disminución del pH tanto en el espacio extracelular como intracelular (Ellington, 1983; Walsh *et al.*, 1984). Esta moderada disminución del pH durante anoxia probablemente contribuya a crear un contexto metabólico que favorecería la inhibición de la PK, cuyo pH óptimo es aproximadamente 7,5, y una activación de la PEPCK cuyo pH óptimo es aproximadamente 6,5. Un estado avanzado en el metabolismo luego de anaerobiosis prolongada se esquematiza en la figura 1 b. Se visualiza en el esquema en forma progresiva un marcado flujo metabólico a través de esta ruta anaeróbica, luego de un elevado grado de inhibición de la PK. La regulación catalítica de esta enzima en moluscos anaerobos facultativos (como *Mytilus edulis*, *Bivalvia*, o *Busycotypus canaliculatum*, Gastrópoda) incluyen la modificación covalente por la fosforilación-desfosforilación de la enzima (Plaxton y Storey, 1984; Hakim *et al.*, 1985; Holwerda *et al.*, 1989; Simpfendörfer *et al.*, 1997 a, b).

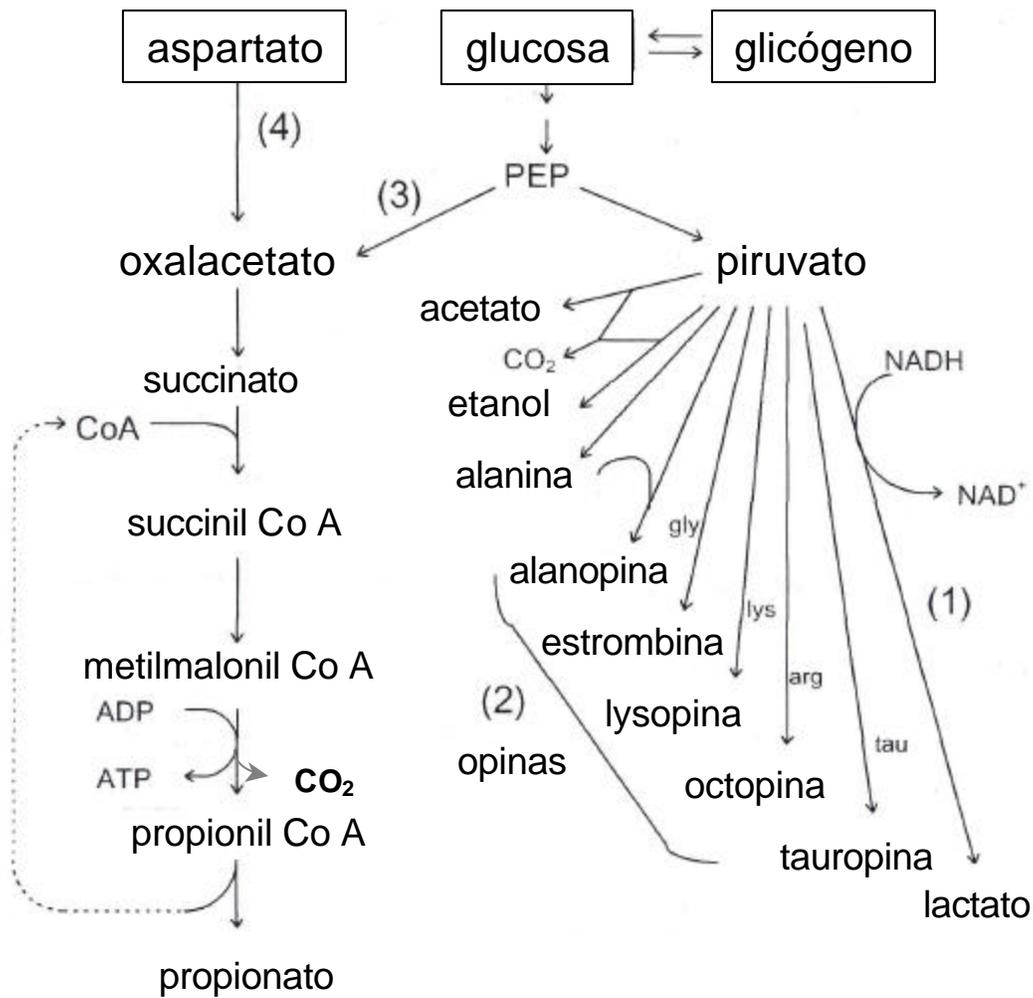


Figura 1a. Ilustración esquemática del punto de bifurcación metabólica del fosfoenolpiruvato en moluscos bivalvos. Punto de bifurcación del PEP, en torno a las enzimas PK y PEPCK (reacción 3). Se muestra en la figura (entre paréntesis) las 4 principales alternativas anaeróbicas descritas en moluscos anaerobos facultativos. 1: LDH; 2: Opinas deshidrogenasas; 3: PEPCK; 4: Transaminasa (de acuerdo a Hochachka y Somero, 1984).

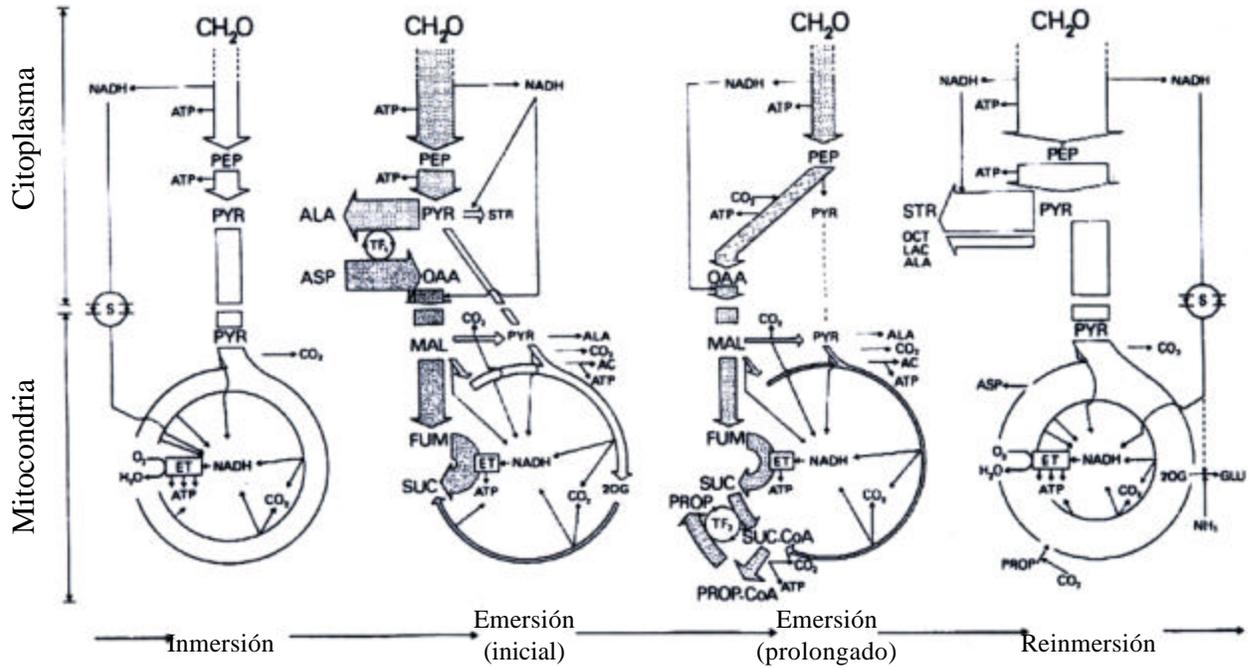


Figura 1b. Esquema metabólico que representa las transiciones graduales del metabolismo durante el ciclo de mareas. Ruta metabólica del succinato-propionato, en la transición gradual entre aerobiosis y anaerobiosis en *Mytilus edulis*, de acuerdo a Zandee *et al.*, 1986.

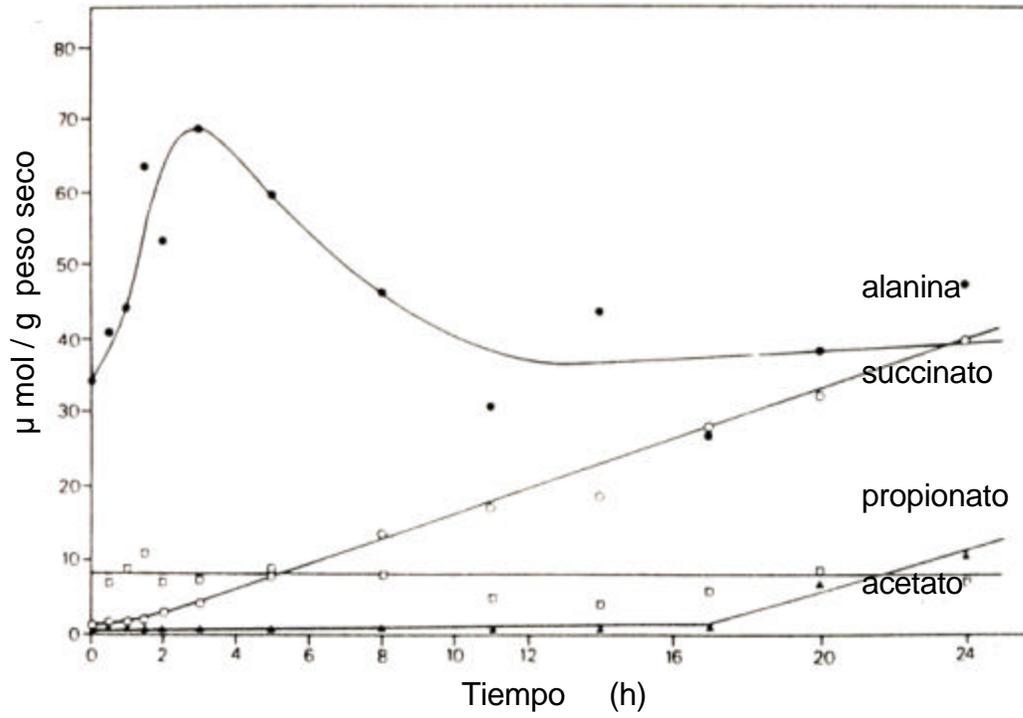
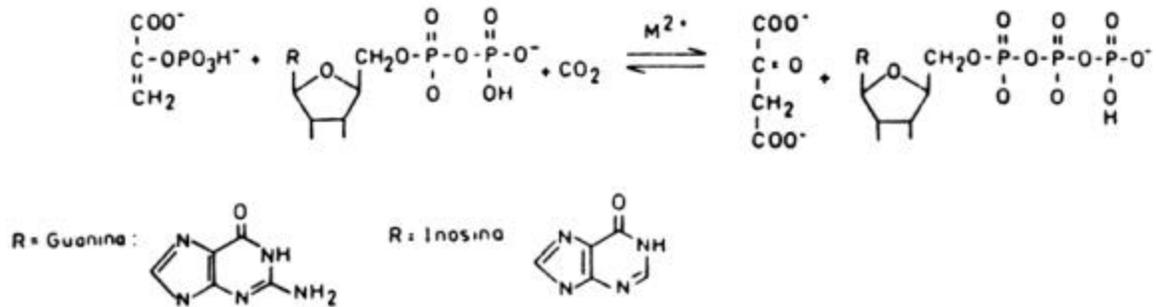


Figura 1c. Acumulación de metabolitos intermediarios durante 24 h de emersión. Curvas de producción de metabolitos anaeróbicos en *Mytilus edulis* en el transcurso de períodos crecientes de carencia de oxígeno, de acuerdo a Kluytmans *et al.*, 1977.

Las PEPCKs (GTP: oxalacetato carboxilasa (transfosforilante) E.C. 4.1.1.32/49), se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Utter y Kolenbrander, 1972; Weldon *et al.*, 1990) y requieren de un nucleótido de purina (GTP, ITP o ATP) y un ión metálico bivalente (Mn^{2+} o Mg^{2+}). Esta enzima se encuentra en sistemas muy diversos (procarionte / eucarionte; animal / vegetal) y ha sido ampliamente estudiada en hígado de ave (Hebda y Nowak, 1982,a), rata (Colombo *et al.*, 1978), riñón de oveja (Barnes y Keech, 1972), *Saccharomyces cerevisiae* (Tortora *et al.*, 1985), *E. coli* (Medina *et al.*, 1990), plantas C4 (Burnell, 1986), *Trypanosoma* spp. (Sommer *et al.*, 1984; Urbina, 1987; Urbina *et al.*, 1993), y en invertebrados marinos como *Mytilus edulis* (de Zwaan y de Bont, 1975) y *Modiolus demissus* (Harlocker *et al.*, 1991). Esta enzima se ha purificado desde tejidos de los organismos descritos, y se ha encontrado que ellas presentan marcadas diferencias en su estructura cuaternaria y en la especificidad y afinidad por el nucleótido. Las carboxiquinasas aisladas de tejidos animales, utilizan exclusivamente nucleótidos de inosina y guanina y son monómeros de alrededor de 70 kDa (Utter y Kolenbrander, 1972). Por otra parte, las PEPCKs aisladas desde microorganismos y plantas son específicas para nucleótidos de adenina y la mayoría contiene entre 2 y 6 subunidades con masas moleculares entre 42 y 64 kDa (Müller *et al.*, 1981; Burnell, 1986; Urbina, 1987; Osteras *et al.*, 1991). Las PEPCKs requieren en forma absoluta de dos moles de un ión metálico bivalente por mol de monómero (Lee *et al.*, 1981; Colombo *et al.*, 1981; Jurado *et al.*, 1996), y cada uno cumple un rol diferente en la catálisis. Uno de los cationes se une directamente al sitio activo de la enzima, originando la forma activa E- Mn^{2+} , a la cual se unen los sustratos PEP y el nucleótido (Hlavaty y Nowak, 2000). El otro ión metálico forma un complejo con la porción fosforilada del nucleótido (Lee *et al.*, 1981; Hlavaty y Nowak, 2000). En vertebrados esta enzima opera en la dirección de formación de PEP por lo cual cumple un rol gluconeogénico, es decir forma glucosa a partir de precursores C3 y C4 (Utter y Kolenbrander, 1972; Gancedo y Schwerzman, 1976; Beale *et al.*, 2002), catalizando la reacción de descarboxilación de OAA produciendo PEP (reacción reversible) (Fig. 2). Sin embargo, en invertebrados anaerobos facultativos como moluscos marinos o parásitos helmintos (Rohrer *et al.*, 1986), la PEPCK participaría como punto de ingreso glicolítico a vías anaeróbicas como la del succinato (de Zwaan y Wijsman, 1976; Brodey y Bishop, 1992), catalizando la carboxilación del PEP para formar OAA.

A)



B)

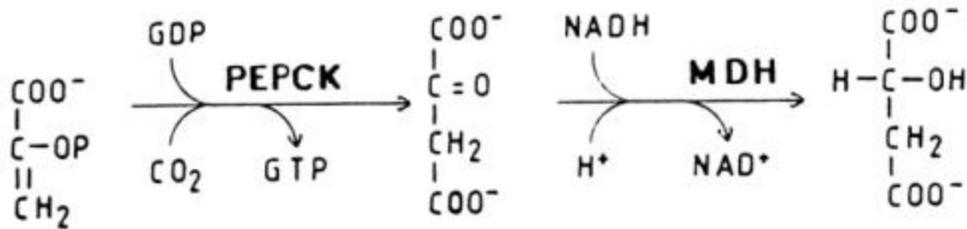


Figura 2. Ilustración esquemática de la reacción catalizada por la PEPCK. (A) Se muestra en la figura la reacción catalizada por la PEPCK. (B) Se muestra la reacción de la PEPCK acoplada a la actividad de la enzima malato deshidrogenasa (MDH). El curso de la reacción se puede seguir midiendo a 340 nm la disminución de absorbancia debida a la desaparición del NADH.

Los distintos mecanismos de regulación de los procesos gluconeogénicos y glicolíticos en tejidos de vertebrados han sido abordados ampliamente durante las últimas décadas. Estos dos procesos metabólicos son regulados bioquímica y fisiológicamente en forma concertada, de manera de conducir la síntesis o bien la degradación glicolítica celular de acuerdo a los requerimientos bioenergéticos del organismo. Uno de los puntos finamente regulado en la ruta glicolítica y gluconeogénica de hígado de vertebrados, es el circuito PEP-piruvato-OAA.

La enzima glicolítica piruvato quinasa (PK), actúa en forma complementaria con las enzimas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), para controlar el flujo del PEP hacia diferentes esquemas de degradación aeróbica, anaeróbica, o bien vías biosintéticas. La PK en tejidos gluconeogénicos de vertebrados es una enzima alostérica que presenta cooperatividad para su sustrato PEP, es alostéricamente activada por fructosa-1,6-bisfosfato e inhibida por ATP y aminoácidos como alanina. La PEPCK de vertebrados en cambio, no presenta regulación por efectores alostéricos. Se ha descrito que tanto proteínas quinasas dependientes de cAMP (PKA), como de Ca^{2+} -Calmodulina (PK-CaM) (Schworer *et al.*, 1985), catalizan la fosforilación de la PK tipo L de hígado de rata, y ambas fosforilaciones causan una inhibición de la actividad enzimática, caracterizada por un aumento en $S_{0,5}$ del PEP. La fosforilación de la PK la inactiva y hace a la enzima menos sensible a la activación por fructosa-1,6-bisfosfato y más sensible a la inhibición por alanina y ATP (Hakim *et al.*, 1985; Holwerda *et al.*, 1989; Simpfendörfer *et al.*, 1994); estos efectos de fosforilación de la PK favorecen la gluconeogénesis hepática en vertebrados, evitando que el PEP sea convertido en piruvato. Por otra parte, la PK desfosforilada favorece la glicólisis, al encontrarse activa y menos susceptible a inhibición por ATP y aminoácidos. La PK, al ser una enzima regulable por fosforilación, es la que aparece como el foco de acción para la regulación hormonal de las rutas gluconeogénica y glicolítica en vertebrados, más aún si se considera que la velocidad limitante de la gluconeogénesis es el paso de piruvato a PEP, vía OAA (Rucktäschel *et al.*, 2000; Croniger *et al.*, 2002).

Se ha observado que la PEPCK es una enzima regulable a nivel de transcripción. El glucagón, que actúa a través de la adenilato ciclasa-cAMP, estimula la síntesis de PEPCK de hígado de vertebrados. El cAMP afecta directamente la transcripción génica de PEPCK (Christ *et al.*, 1988; Rucktäschel *et al.*, 2000; Allen-Jennings *et al.*, 2002). Los glucocorticoides también estimulan la síntesis de PEPCK en estos tejidos gluconeogénicos (Scott *et al.*, 1998). Se ha descrito que el

receptor de glucocorticoides de hígado de vertebrados posee una proteína asociada con actividad proteína-quinasa lo cual sugiere que un mecanismo de fosforilación-desfosforilación puede estar involucrado en la regulación de los niveles de PEPCK por glucocorticoides (Waltner-Law *et al.*, 2000). La insulina en cambio, reduce los niveles de mRNA de PEPCK (Massillon *et al.*, 1998; Franckhauser *et al.*, 2002); el mecanismo de acción de la insulina en la transcripción genética de la PEPCK no está claro, pudiendo también estar relacionado con un mecanismo de fosforilación-desfosforilación de proteínas, dado que el receptor de insulina de estos tejidos, posee actividad tirosina-quinásica (Kido *et al.*, 2001). Estudios más acabados en el mecanismo por el cual el cAMP y la insulina modulan la expresión génica de enzimas hepáticas, aportarían evidencias sobre la participación de la expresión génica en la regulación metabólica y cómo esta regulación bioenergética estaría integrada con todos los procesos regulatorios de vías metabólicas, para lograr el control global de las rutas glicolítica y gluconeogénica bajo condiciones fisiológicas, como también los mecanismos de disfunción en situaciones fisiopatológicas.

En invertebrados tolerantes a la anoxia, la situación sería metabólicamente diferente ya que existiría un acceso alternativo para el PEP. Bajo condiciones de anaerobiosis, el PEP sería convertido en OAA por una PEPCK citosólica, siendo esta reacción el punto de ingreso a la ruta que origina succinato y propionato, productos anaeróbicos de invertebrados anaerobos facultativos. Helmintos, invertebrados anaerobos facultativos, poseen una estrategia metabólica similar a la descrita para invertebrados marinos (Rohrer *et al.*, 1986). Se ha sugerido que en estos parásitos la PEPCK funcionaría preferentemente en el sentido de formación de OAA, debido a los bajos valores de K_m para el bicarbonato, con respecto a la enzima de vertebrados (Rohrer *et al.*, 1986). De igual modo que para moluscos, la PEPCK en helmintos es un monómero de masa molecular de 75 kDa; en *Ascaris suum* el Mn^{2+} causa una disminución en la K_m aparente para el PEP, sugiriendo un rol del metal en la regulación de la actividad enzimática (Rohrer *et al.*, 1986). El ITP es un inhibidor competitivo con respecto a los sustratos IDP y PEP, sugiriendo una sobreposición de los sitios de unión de los 2 sustratos (Rohrer *et al.*, 1986). Aunque se conoce poco sobre las propiedades de esta enzima, es altamente probable que el mecanismo y las características de los sitios de unión de los sustratos difiera de la PEPCK de vertebrados.

En vertebrados se han realizado variados estudios para la identificación de los residuos de aminoácidos en los sitios de unión de sustratos, en particular se han detectado tioles en el sitio del nucleótido en muchas PEPCKs dependientes de GDP (Barns y Keech, 1972; Carlson *et al.*, 1978; Silverstein *et al.*, 1979; Rojas *et al.*, 1991; Holyoak y Nowak, 2001). Todas las PEPCKs estudiadas han sido inactivadas por modificadores de grupos sulfhidrilos, como el ácido ditio-bis-nitrobenzoico (DTNB), N-etilmaleimida o yodoacetato (Barns y Keech, 1972; Carlson *et al.*, 1978; Makinen y Nowak, 1989). Se han encontrado grupos sulfhidrilos altamente reactivos en el sitio de unión de GTP en hígado de rata, cerdo y levadura (Cardemil *et al.*, 1990; Rojas *et al.*, 1991). En la mayoría de los casos existen evidencias que la modificación inactivante ocurre en o cerca del sitio de unión de los sustratos. La carboxiquinasa de riñón de oveja presenta dos SH esenciales, uno relacionado con la carboxilación y el otro en el sitio de unión de GDP (Barns y Keech, 1972). La PEPCK citosólica de hígado de rata es muy sensible a la acción modificadora del DTNB. La titulación de la PEPCK de hígado de rata con DTNB indica la presencia de un tiol vecino que da cuenta de la actividad enzimática (Lewis *et al.*, 1993).

Los invertebrados marinos habitan ambientes con grandes fluctuaciones en factores de tipo físico como también biótico, en particular aquellos habitantes de la intermarea, lo que es muy marcado en rocas intermareales en áreas no protegidas, donde por efecto de las mareas, los organismos se ven periódicamente expuestos a ciclos de emersión/inmersión. *Perumytilus purpuratus* es un bivalvo que habita la zona media a media-superior del intermareal de Chile a lo largo de toda la costa en el Pacífico suramericano (Brattström, 1990). Se encuentra distribuido entre 1,9 y 5,2 m sobre el nivel 0 de mareas (Simpfendorfer *et al.*, 1995). En el sur de Chile, particularmente en áreas protegidas del oleaje este organismo está expuesto a periodos prolongados de emersión (hasta 10 h en la intermarea alta) debido a la baja marea.

Por estas razones los moluscos marinos constituyen modelos metabólicos que han sido ampliamente estudiados, desde hace varias décadas, debido a sus mecanismos adaptativos en aspectos fisiológicos como metabólicos (Hochachka y Somero, 1984; Brooks y Storey, 1997). Por ello aparece especialmente interesante el estudio de los mecanismos de regulación de la transición aerobiosis-anaerobiosis, a la cual debe continuamente recurrir este organismo producto

del hábitat en el que se encuentra. Se han descrito variadas respuestas metabólicas a las situaciones carenciales de oxígeno, desde la utilización de una eficiente respiración aérea en emersión, hasta diferentes fermentaciones anaeróbicas, como la producción de alanina y opinas (Gäde y Grieshaber, 1986) y/o la producción de succinato y propionato.

En esta Tesis se estudió si en *P. purpuratus* se utiliza la ruta metabólica anaeróbica del succinato, y se analizaron las condiciones experimentales en que ella operaría. Los animales fueron expuestos a tres condiciones experimentales en el laboratorio: a) Control: organismos mantenidos en acuarios en agua de mar filtrada y con burbujeo constante de aire, sin alimento; b) Anoxia: ejemplares del animal mantenidos en agua de mar filtrada, con burbujeo constante de nitrógeno; c) Emersión: ejemplares expuestos por períodos variables en emersión, y a temperatura ambiente. En todas las condiciones experimentales se midió el consumo de oxígeno, las actividades enzimáticas en sobrenadante de extracto muscular de las enzimas PK y PEPCCK, y la concentración de succinato en el tejido muscular. Posteriormente, se purificó la PEPCCK muscular de *P. purpuratus* para caracterizar la enzima estructural y funcionalmente, e inferir así su eventual participación en el metabolismo anaeróbico en este invertebrado intermareal, común habitante de nuestro litoral.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos se postulan en el presente trabajo las siguientes hipótesis:

1. El invertebrado marino *Perumytilus purpuratus* (Mollusca / Bivalvia) posee mecanismos regulatorios de adaptación metabólica que utiliza bajo condiciones ambientales de carencia de oxígeno.
2. La enzima PEPCCK muscular del bivalvo *P. purpuratus* presenta características cinéticas coherentes con su participación en la ruta metabólica anaeróbica del succinato-propionato.

Para corroborar experimentalmente las hipótesis de este trabajo, fueron planteados los siguientes objetivos:

1. Determinar en *Perumytilus purpuratus* el consumo de oxígeno en inmersión y en emersión.
2. Estudiar la aparición de productos del metabolismo anaeróbico (succinato) después de distintos tiempos de exposición a condiciones de emersión y de anoxia (burbujeo constante de nitrógeno).
3. Estudiar la actividad PK y PEPCK en extracto proteico de músculo aductor del bivalvo después de distintos tiempos de emersión y anoxia, y definir de esta manera las condiciones óptimas de expresión de la PEPCK.
4. Purificar la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* considerando los procedimientos utilizados en la purificación de PEPCK de otros organismos.
5. Caracterizar algunas propiedades estructurales y cinéticas de la PEPCK purificada, y vincularlas con la participación de esta enzima en el metabolismo anaeróbico en el bivalvo estudiado.
6. Realizar estudios de cisteínas funcionales en la PEPCK purificada; para ello se utilizará el reactivo modificador DTNB, en presencia y en ausencia de sustratos de la enzima.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co.: PEP, IDP, ADP, GDP, NADH, ITP, GTP, malato deshidrogenasa, alanina, aspartato, succinato, DTT, TES, HEPES, PMSF, DTNB, INT, Tris-HCl, Sephacryl S-300, fosfocelulosa, GTP-Agarosa, estándares de peso molecular. Los siguientes reactivos se obtuvieron de Merck, (grado proanálisis): EDTA, NaH₂PO₄, KH₂PO₄, KCl, glicerol, sacarosa, KHCO₃, HClO₄, MnCl₂, MgCl₂, CoCl₂, ZnCl₂.

3.2. ANIMALES

Ejemplares adultos de *Perumytilus purpuratus* fueron recolectados de la zona media del intermareal de Punta Metri (41°35'S; 71°42'W), localidad ubicada en el Seno de Reloncaví, CEACIMA; Centro experimental de Acuicultura y Ciencias del Mar, Universidad de Los Lagos. Los especímenes de 3 - 3,5 cm de largo, fueron trasladados al Laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Los Lagos y fueron mantenidos allí en acuarios a temperatura ambiente (15 ± 1 °C) con agua de mar filtrada y burbujeo constante de aire y sin alimento, por períodos variables (1 día a 2 semanas). Las condiciones experimentales a las que fueron sometidos los organismos para la realización de los diferentes experimentos fueron las siguientes:

- Control: inmersión con burbujeo constante de aire;
- Hipoxia: emersión por tiempos crecientes a temperatura ambiente;
- Anoxia total: inmersión continua en agua de mar con burbujeo constante de nitrógeno.

3.3. DETERMINACIÓN DE CONSUMO DE OXÍGENO EN INMERSIÓN Y EN EMERSIÓN EN *P. purpuratus*.

El consumo de oxígeno en emersión se midió usando un respirómetro de Davies (1966). Este instrumento consiste de dos cámaras (de igual volumen) que están interconectadas. En una de

ellas se introduce al organismo, y la otra posee un tornillo micrométrico. En ambas cámaras se introdujo un pequeño recipiente con 1 ml de solución de hidróxido de potasio concentrado (1 M), con el objeto de captar el dióxido de carbono que elimina el organismo. Además, se agregaron 3 gotas de agua de mar filtrada a temperatura ambiente (15 °C) en cada cámara, para mantener una humedad relativa alta. Con el tornillo micrométrico (conectado a la cámara contraria a la cual se introduce el organismo) se compensan las presiones relativas de ambas cámaras, al captar el organismo oxígeno aéreo. La escala del tornillo micrométrico corresponde a un determinado volumen de oxígeno aéreo consumido por el organismo. Las mediciones fueron realizadas con organismos en forma individual, por períodos de tiempo de 15 a 30 min. Cada determinación se estandarizó por hora y gramo de peso seco de partes blandas ($\text{ml O}_2 \times \text{gps}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). El peso seco de cada organismo fue obtenido interpolando su talla (largo) en curvas de peso seco versus talla que fueron realizadas previamente en el laboratorio de Cultivos Marinos. El organismo extraído del acuario fue inmediatamente introducido en la cámara de medición de oxígeno. Se monitoreó en cada oportunidad respiración aérea durante 15 min, a temperatura ambiente (15 °C).

El consumo de oxígeno en inmersión se determinó por medio de un oxigenómetro WTW OXI-530, instrumento conectado a un electrodo que detecta concentración de oxígeno disuelto (mg/l), con una cámara hermética con agua de mar saturada de oxígeno (155 ml de volumen total). Se utilizó agua de mar prefiltrada (filtro Whatman, 50 μm de poro) y luego filtrada en un filtro de nitrocelulosa Whatman (0,45 μm). Se determinó el consumo de oxígeno de cada organismo por un período de 20 min. El consumo de oxígeno se estandarizó por hora y gramo de peso seco de partes blandas.

3.4. PREPARACIÓN DE SOBRENADANTES PROTEICOS DE TEJIDO MUSCULAR.

Para realizar determinaciones enzimáticas en sobrenadantes proteicos de tejido para las enzimas PEPCK y PK, se extrajo el músculo aductor de los mitílidos. Este tejido fue extraído con un bisturí y colocado de inmediato en un vaso en hielo. Para cada análisis se ocuparon los músculos de 5 organismos; se pesó el tejido obtenido (peso húmedo) y luego se homogeneizó en homogeneizador vidrio-vidrio con 5 ml del siguiente buffer de extracción: 50

mM Hepes pH 7,0; 5 mM EDTA; 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 % (v/v) glicerol. El homogeneizado fue centrifugado a 17.000 rpm (35.000 g) por 30 min, a 4 °C en una centrífuga Kubota KR 2000 T (rotor RA-2). En el sobrenadante obtenido, se determinó la actividad PEPCK según el método de Noce y Utter (1975), y la actividad PK de acuerdo al método de Bücher y Pfeleiderer (1955).

3.4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PEPCK.

La actividad de la PEPCK se midió en el sentido de la carboxilación del PEP, acoplando la reacción de esta enzima a la reacción catalizada por la malato deshidrogenasa, determinando espectrofotométricamente la desaparición de NADH (Noce y Utter, 1975). El medio de reacción contenía: 100 mM Hepes pH 7,0; 2,5 mM PEP; 0,2 mM IDP; 2,25 mM $MnCl_2$; 50 mM $KHCO_3$; 0,2 mM NADH; 8 U malato deshidrogenasa y 20-50 μ l de muestra que contenía la enzima, en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició agregando el PEP a la mezcla de reacción preincubada a 25 °C. Se realizaron blancos sin PEP y sin HCO_3^- . Para determinar la velocidad de formación de oxalacetato a partir de PEP, se midió la disminución de la absorbancia a 340 nm, producto de la desaparición del NADH (Fig. 2). Se definió una unidad de actividad PEPCK como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol de NADH por minuto, a 25 °C, en 1 ml de solución.

3.4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PK.

La actividad de la PK fue medida según el método de Bücher y Pfeleiderer (1955) a 25 °C, en el cual se acopla a la reacción de la PK, la reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y se monitoreó el consumo de NADH a 340 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. El medio de reacción contenía: 50 mM Tris-HCl pH 7,0; 1 mM PEP; 1 mM ADP; 50 mM KCl; 5 mM $MgSO_4$; 0,2 mg/ml NADH; 5,5 U LDH y 50 μ l de la preparación enzimática. La reacción se inició agregando el sustrato PEP. La unidad enzimática PK se definió de igual modo que para la PEPCK.

3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

La concentración de proteínas fue determinada según el método descrito por Bradford (1976), usando como estándar seroalbúmina de bovino, o bien midiendo la absorbancia de la muestra diluída a 260 nm y a 280 nm , utilizando la relación:

$$\text{Proteína (mg/ml)} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

3.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SUCCINATO.

Para cada situación experimental se extrajo el músculo aductor de 5 organismos. Este tejido fue homogeneizado 1/3 (p/v) en ácido perclórico 6 % con un homogeneizador manual vidrio-vidrio. El homogeneizado obtenido fue centrifugado a 10.000 rpm (20.000 g) por 10 min a 4 °C en una centrífuga Kubota. El sobrenadante fue ajustado a pH 7,5 con KOH. De este modo se obtuvo un sobrenadante no proteico en el que se determinó la concentración de succinato. Se determinó succinato utilizando la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) obtenida de hígado de bovino fresco, modificándose el método de Kmetec (1966). La fracción mitocondrial con SDH fue obtenida al homogeneizar el hígado de bovino con la siguiente solución amortiguadora: 0,1 M KCl; 0,015 M NaH₂PO₄ pH 7,5; 5 mM EDTA; 0,15 M sacarosa (todo a 4 °C). Luego, el precipitado obtenido se lavó 3 veces con 6 ml de la misma solución a 7.200 rpm (aprox. 4.000 g) por 10 min, para luego resuspender el precipitado que contenía la SDH en la misma solución de extracción de SDH.

La succinato deshidrogenasa cataliza la siguiente reacción:



Como aceptor de electrones se utilizó la sal de tetrazolio INT, de acuerdo a la siguiente reacción:



En este método de punto final se monitoreó la aparición color violeta a 540 nm (INT reducido) incubando la muestra por 30 min en presencia y en ausencia de malonato. El malonato es un inhibidor competitivo de la SDH, por lo tanto la diferencia de actividad obtenida al incubar la

muestra en ausencia y presencia de malonato, da cuenta de la concentración de succinato en la muestra.

3.6. PURIFICACIÓN DE LA PEPCK DE MÚSCULO ADUCTOR DE *P. purpuratus*.

La PEPCK se purificó de músculo aductor de *P. purpuratus*, organismos adultos. Todos los procedimientos se llevaron a cabo entre 2 - 4 °C en hielo o en cámara fría. Previo a sacar el músculo aductor, los especímenes (aproximadamente 800 cada vez de 2,5 - 3,5 cm de largo fueron sometidos a 12 h de emersión a temperatura ambiente en el laboratorio (15 °C); luego se les sacó con el bisturí el músculo aductor, el cual fue puesto inmediatamente en un vaso precipitado en hielo. Una vez recolectado todo el material (aproximadamente 30 g en cada oportunidad), este se guardó a -80 °C (la actividad PEPCK del tejido se mantuvo sin variaciones por al menos dos meses a -80 °C). Después de descongelar el tejido, éste se secó y se procesó en homogeneizador mecánico vidrio-teflón con 4 volúmenes del siguiente buffer de extracción: 50 mM Hepes pH 7,0; 1 mM DTT; 5 mM EDTA; 0,1 mM PMSF y 0,25 M sacarosa. Este homogeneizado se centrifugó por 45 min a 30.000 g a 2 °C, obteniéndose un sobrenadante al cual se le hizo un primer corte con sulfato de amonio sólido al 35 % de saturación. Después de agitar por 40 min, la suspensión se centrifugó a 30.000 g por 30 min a 2 °C. Al sobrenadante que se obtuvo, se le hizo un segundo corte con sulfato de amonio al 65 % de saturación. El pellet se resuspendió en 10 ml de solución A: 10 mM KH₂PO₄ pH 7,0; 1 mM DTT; 5 mM EDTA; luego se dializó por 1 h contra 1 l de amortiguador A y luego toda la noche contra otro litro del mismo amortiguador. Después de dializada la muestra, ésta se aplicó a una columna de intercambio iónico de fosfocelulosa (2,7 × 4,5 cm) la cual fue previamente equilibrada con solución A. Una vez adsorbida la muestra, se lavó con 6 volúmenes de columna de solución A, con un flujo de 0,5 ml/min, hasta que la absorbancia a 280 nm disminuyó a un nivel basal. La PEPCK fue eluída con una gradiente lineal de KH₂PO₄ pH 7,0 desde 10 a 250 mM, conteniendo 1 mM DTT y 5 mM EDTA, a un flujo de 0,5 ml/min. Se mezclaron las fracciones que contenían la enzima y se dializó la mezcla por 1 h contra 1 l de solución B: 10 mM Tes pH 7,3; 0,1 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 8,7 % glicerol y 0,2 mM MnCl₂, y luego toda la noche contra otro litro del mismo amortiguador B. A la fracción dializada se le agregó MnCl₂ hasta una concentración final de

1,15 mM. Se ajustó la absorbancia a 280 nm a un valor de 0,3, agregando solución C: 10 mM Tris pH 7,3; 0,1 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 8,7 % glicerol y 1,15 mM $MnCl_2$. La muestra diluída se aplicó a una columna de afinidad de agarosa-hexano-GTP (1×10 cm) previamente equilibrada con la solución C. Una vez que la muestra se adsorbió, se lavó con 4 volúmenes de columna del amortiguador C, a un flujo de 0,33 ml/min, hasta obtener una absorbancia a 280 nm igual a la absorción del blanco. La muestra se eluyó aplicando un gradiente lineal entre 0-1,5 M KCl, preparado en solución C. El volumen total del gradiente fue equivalente a 9 volúmenes de columna.

3.7. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA PEPCK PURIFICADA DE *P. purpuratus*.

3.7.1. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR DE LA PEPCK.

Para determinar el grado de purificación (homogeneidad electroforética) y el tamaño molecular de la enzima eluída de la columna de afinidad de GTP-Agarosa, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS (Laemmli, 1970). Se usaron como estándares de peso molecular las siguientes proteínas: β -galactosidasa, 116 kDa; seroalbúmina de bovino (BSA), 66 kDa; albúmina de huevo, 45 kDa y anhidrasa carbónica, 29 kDa. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie G-250 de acuerdo a Weber y Osborn (1969). Para determinar el peso molecular en condiciones no desnaturantes, se usó una columna de filtración en gel Sephacryl S-300 (columna de 50 cm de alto por 1 cm de diámetro). La muestra eluída desde GTP-Agarosa se concentró con sacarosa y luego se dializó contra 1 l de amortiguador 10 mM Hepes pH 7,0; 0,5 mM DTT; 1 mM EDTA; 0,1 M KCl, por 4 h. Los estándares de peso molecular que se usaron para cromatografía de filtración fueron los siguientes: β -amilasa, 200 kDa; alcohol deshidrogenasa (ADH), 150 kDa; seroalbúmina bovina (BSA), 66 kDa; anhidrasa carbónica, 45 kDa.

3.7.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS PARA LOS SUSTRATOS DE LA ENZIMA.

Se utilizaron las fracciones con mayor actividad PEPCK eluídas de la columna de GTP-

agarosa. Para cada curva de saturación se determinó actividad PEPCK utilizando concentraciones crecientes del sustrato variable (sin alterar el volumen final de reacción), manteniendo fija la concentración de los demás sustratos y del cofactor metálico. En todos los casos se utilizó 50 μ l de PEPCK purificada, y se monitoreó la desaparición de NADH durante 2 - 4 min, manteniéndose condiciones de estado estacionario a partir de 30 segundos de reacción. La reacción fue iniciada en todos los casos agregando la enzima.

3.7.3. EFECTO DE METALES BIVALENTES.

Se analizó el efecto de los siguientes metales bivalentes en la actividad catalítica PEPCK: CoCl_2 , MnCl_2 , ZnCl_2 , MgCl_2 , los cuales fueron utilizados en concentraciones variables, como se indica en la figura respectiva. La actividad PEPCK fue determinada como se detalla en el punto 3.4.1., con concentraciones saturantes de los sustratos de la enzima.

3.7.4. EFECTO DEL pH.

Se midió la actividad PEPCK en función de diferentes valores de pH de la solución acoplada de reacción. Para ello se utilizaron dos amortiguadores (acetato y Hepes), en rangos de pH óptimos para cada uno. Las concentraciones de sustratos de la enzima, y las condiciones catalíticas fueron las descritas en el punto 3.4.1.

3.7.5. EFECTO DE POTENCIALES MODULADORES DE LA ENZIMA.

Se estudió el posible efecto de metabolitos musculares en la actividad de la PEPCK purificada, los cuales han sido descritos como eventuales reguladores *in vitro* de la actividad PEPCK en otros organismos invertebrados marinos. Entre estos, se determinó la actividad PEPCK en presencia de los siguientes compuestos: succinato 2 mM, alanina 5 mM, aspartato 2 mM, ADP 0,2 mM. Se midió la actividad PEPCK con concentraciones saturantes de los sustratos de la enzima, en ausencia y presencia de los metabolitos indicados. Igualmente, se determinó el

efecto de los nucleótidos ITP y ATP, en concentraciones crecientes, en la actividad PEPCK, como se describe en la figura respectiva.

3.8. ESTUDIOS DE INACTIVACIÓN Y TITULACIÓN DE LA PEPCK CON DTNB.

Para realizar los experimentos de titulación de sulfhidrilos con DTNB se concentró la enzima eluída de la columna de GTP-agarosa, efectuando diálisis contra sacarosa sólida y luego se dializó la enzima concentrada contra el amortiguador: 10 mM Tes pH 7,3; 8,7 % glicerol; 0,5 M KCl. El ácido 5':5'-ditio(bis)-2-nitrobenzoico (DTNB), fue disuelto en solución 10 mM Tes pH 7,3. La solución de DTNB fue titulada previamente con DTT, para corroborar su concentración real.

3.8.1. ESTUDIOS DE INACTIVACIÓN DE LA PEPCK CON DTNB EN PRESENCIA Y EN AUSENCIA DE SUSTRATOS.

Para realizar los experimentos de inactivación de PEPCK con DTNB se preincubó a 30 °C una solución que contenía cantidades variables de enzima en el amortiguador D con cantidades variables del reactivo inactivador en un volumen final de 0,1 - 0,2 ml. Esta preincubación se realizó en ausencia o presencia de diferentes ligandos como: IDP; Mn^{2+} ; IDP- Mn^{2+} ; ITP; GDP; PEP; ATP; HCO_3^- (a las concentraciones indicadas en cada figura correspondiente). Se tomaron luego alícuotas de 5-10 μ l y se midió la actividad residual de la PEPCK. El modificador (DTNB) se diluía así entre 100 a 200 veces en el medio de ensayo de actividad remanente, no observándose efecto de DTNB en la actividad de la PEPCK ni en la enzima auxiliar, malato deshidrogenasa. La relación estequiométrica E/DTNB se indica en la figura respectiva.

Se estudió el efecto protector del sustrato PEP en la actividad enzimática al incubar la PEPCK purificada con DTNB. Para ello fue preincubada la enzima en presencia de las siguientes concentraciones de PEP: 1 mM; 2,5 mM; 3,5 mM; 5 mM; 7 mM. Luego se realizó incubaciones en presencia de DTNB por tiempos crecientes, para determinar finalmente actividad PEPCK

residual, como se describe anteriormente, utilizando mezcla de reacción acoplada de la PEPCK como se describe en el punto 3.4.1.

3.8.2. TITULACIÓN CON DTNB DE LA PEPCK PURIFICADA.

La titulación de la PEPCK se realizó a 30 °C en el amortiguador D. Se incubó 1 ml de enzima (concentración indicada en la figura respectiva) con una concentración de DTNB de 50 veces exceso estequiométrico y se monitoreó el aumento de absorbancia a 412 nm producido por la liberación del anión mono nitro benzoato (MNB). Este mismo experimento se realizó en presencia de 2 % SDS y en presencia del ligando Mn^{2+} -IDP. El seguimiento de la reacción se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160. De igual modo se realizó una titulación estequiométrica 1:1 de la enzima purificada con DTNB. Este experimento se realizó en presencia y ausencia de Mn^{2+} -IDP.

Para determinar el orden de la reacción se preincubó a 0 °C la enzima (de manera de disminuir la velocidad de inactivación), con concentraciones crecientes de DTNB correspondiente a 10-50 veces de exceso estequiométrico con respecto a la concentración de la enzima. Para medir la actividad PEPCK remanente se tomaron alícuotas de 10 μ l por intervalos crecientes de tiempo.

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO EN *P. purpuratus* EN INMERSIÓN Y EN EMERSIÓN.

Se determinó el consumo de oxígeno en inmersión y en emersión de *P. purpuratus* a 15 °C, obteniéndose un consumo de oxígeno aéreo de 0,184 ml O₂ x g⁻¹ x h⁻¹, lo cual representa un 48 % del consumo de oxígeno en inmersión a la misma temperatura (Tabla 1). Por tanto la situación de emersión para *P. purpuratus* constituiría una situación de hipoxia o carencia parcial de oxígeno (anoxia parcial), ya que posee una elevada capacidad de respirar oxígeno aéreo. Esta capacidad de respiración aérea es alta si se compara con otros mitílidos, en los cuales la capacidad de respiración aérea es de sólo 5 a 15 % (como es el caso de *M. chilensis*) (Simpfendörfer *et al.*, 1995) y de un 4 a 17 % en el caso de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Widdows *et al.*, 1979).

4.2. ACTIVIDAD PEPCK Y PK EN SOBRENADANTES DE MÚSCULO ADUCTOR DE *P. purpuratus* EN CONDICIONES DE EMERSIÓN (HIPOXIA) Y DE BURBUJEO DE NITRÓGENO (ANOXIA).

En la figura 3 se representa la actividad enzimática de las enzimas PK y PEPCK, determinadas en extractos proteicos de músculo aductor de *P. purpuratus*, en ejemplares mantenidos por tiempos variables en emersión y en inmersión en acuarios con burbujeo constante de nitrógeno. Las actividades de ambas enzimas fueron medidas bajo condiciones de $V_{máx}$, con concentraciones saturantes de los sustratos de cada enzima y a pH óptimo. El control se determinó en situación de normoxia (inmersión con burbujeo constante de aire y sin alimento) y se obtuvo para ambas enzimas valores de concentración en el tejido de 3,36 U/g peso húmedo músculo, para la PK y de 1,06 U/g peso húmedo músculo, para la PEPCK, valores a los cuales se les asignó 100 % de actividad inicial (tiempo 0 de hipoxia en la Fig. 3). Se visualiza en la figura una disminución de la actividad PK tanto en emersión (hipoxia) como con burbujeo de nitrógeno (anoxia), con respecto al control en inmersión (aerobiosis), observándose en anoxia una inhibición más marcada en el tiempo.

TABLA 1

Consumo de oxígeno de *Perumytilus purpuratus* en inmersión y emersión.

Consumo de oxígeno (ml O ₂ /gps/h)		Respiración E* Respiración I x 100 (%)
Inmersión (I)	Emersión (E*)	
0,383 ± 0,086 (10)	0,184 ± 0,026 (11)	48

Promedio ± DE. Para cada experiencia se indica entre paréntesis el número de determinaciones. Las mediciones de respiración fueron realizadas a 15 °C.

* Valor de respiración aérea a tiempo cero de emersión (inmediatamente después de sacar los ejemplares del agua).

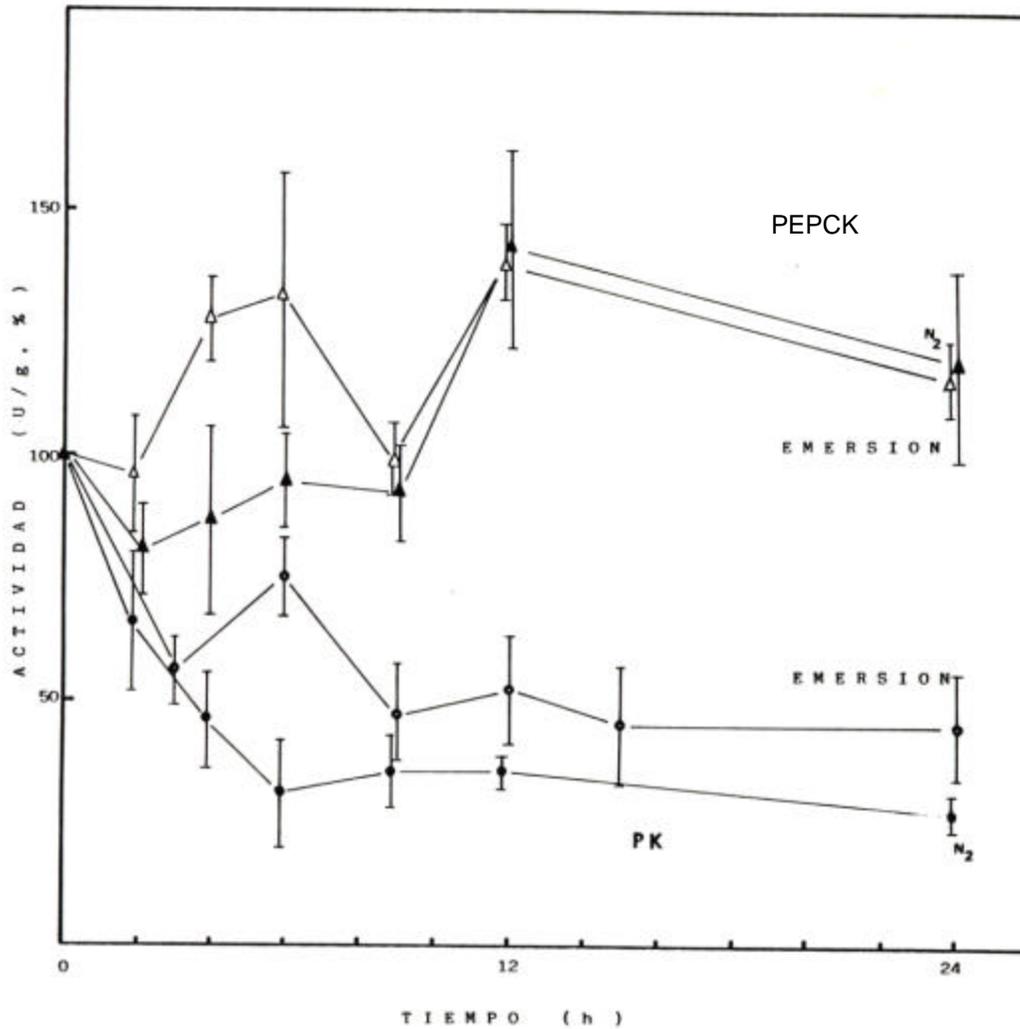


Figura 3. Variación de las actividades PK y PEPCK en función del tiempo de anoxia parcial o total. Actividad PK y PEPCK en extracto crudo de músculo aductor de *P. purpuratus*, expuestos a anoxia parcial (emersión) y anoxia total (inmersión con burbujeo constante de nitrógeno) por tiempos crecientes a temperatura ambiente y con un 85 % de humedad relativa. Para cada tiempo experimental se presenta el promedio (\pm una desviación estándar) de 5 experiencias. En cada experiencia se usaron 5 organismos. La concentración inicial en el tejido de las enzimas (tiempo 0) fue de 3,36 U/g peso húmedo tejido (PK) y de 1,06 U/g peso húmedo muscular (PEPCK).

Estos resultados fueron muy similares al determinar las actividades enzimáticas como actividad específica en los extractos musculares (resultados no presentados). Se concluye de esta experiencia que *P. purpuratus* presenta bajo condiciones de anoxia e hipoxia una disminución gradual de la actividad específica de la PK en extractos de músculo aductor. La PEPCK en cambio, mostró poca variación en su $V_{máx}$ durante las primeras horas de carencia de oxígeno, pero después de 12 h de hipoxia o anoxia, se aprecia un aumento significativo de la actividad específica que alcanza hasta un 150 % con respecto a la actividad PEPCK bajo condiciones de aerobiosis (control 100 % de actividad).

4.3. DETERMINACIÓN DE SUCCINATO EN MÚSCULO ADUCTOR DE *P. purpuratus*.

Se estudió la acumulación de succinato en el músculo aductor del bivalvo, producto intermediario del metabolismo anaeróbico, luego de las siguientes condiciones experimentales:

- emersión en el tiempo (constituiría condición de hipoxia);
- inmersión con burbujeo constante de nitrógeno en el tiempo (anoxia total);
- inmersión con burbujeo constante de aire (control aerobiosis).

Puede apreciarse en la figura 4 una marcada acumulación de succinato en músculo aductor luego de anoxia durante las primeras 15 h para descender luego la concentración de este intermediario; en cambio, la aparición de succinato en el tejido bajo condiciones de hipoxia se visualiza sólo después de 6 h. de emersión. En inmersión (aerobiosis) no se detectó succinato por la metodología utilizada. Esta experiencia permitió comprobar que el invertebrado intermareal *P. purpuratus* utilizaría la ruta metabólica anaeróbica del succinato, la que sería de mayor magnitud luego de anoxia total que en regímenes de hipoxia.

4.4. PURIFICACIÓN DE LA PEPCK DE MÚSCULO ADUCTOR DE *P. purpuratus*.

La purificación de la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* se llevó a cabo en tres etapas:

- a) Precipitación con sulfato de amonio.
- b) Cromatografía de intercambio iónico en fosfocelulosa.

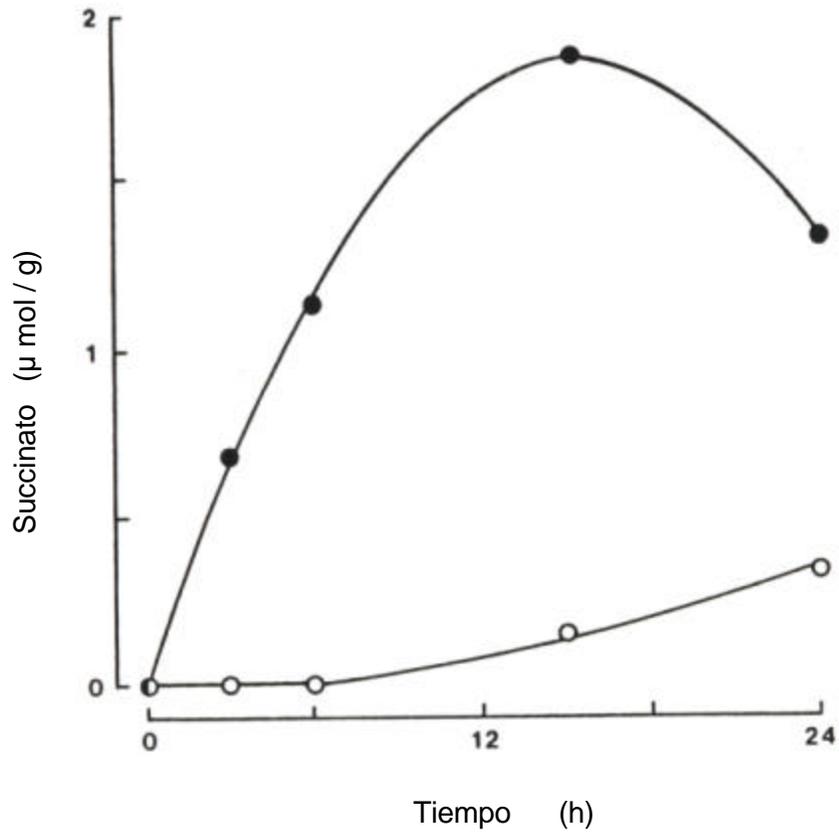


Figura 4. Determinación de la concentración de succinato. Variación en la concentración de succinato ($\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo) en músculo aductor de *P. purpuratus* expuestos a emersión (○) y a inmersión con burbujeo de nitrógeno (●) por tiempos crecientes.

c) Cromatografía de afinidad en GTP-agarosa.

Además de las cromatografías finalmente utilizadas (etapas b y c), cabe destacar que en el proceso de estandarización de la purificación de la PEPCK se efectuó alternativamente a la cromatografía en fosfocelulosa, una cromatografía en DEAE-Sephadex. En este último procedimiento se eluyó con una gradiente de 0-0,5 M NaCl, en amortiguador 10 mM Tris-HCl pH 7,0; 0,1 mM DTT ; 0,5 mM EDTA. Empero, en esta columna cromatográfica la PEPCK perdió completamente su actividad. Se probó también, como etapa alternativa al intercambio iónico, una columna de adsorción en hidroxilapatita, eluída con una gradiente entre 10 y 500 mM de amortiguador fosfato pH 7,0; 0,1 mM DTT y 1 mM EDTA). En este caso, la cromatografía se realizó después de una cromatografía de filtración en Sephadex G-150 (en amortiguador 10 mM fosfato pH 7,0; 0,1 mM DTT; 0,5 mM EDTA); sin embargo estas dos etapas no fueron muy efectivas en purificar la PEPCK, y fueron reemplazadas por una diálisis luego de precipitar con sulfato de amonio y por la columna de intercambio iónico en fosfocelulosa, etapas que arrojaron mejor rendimiento, mayor purificación y en menor tiempo.

El extracto inicial que contenía la enzima obtenida luego de centrifugar el homogeneizado muscular, se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 35-65 % de saturación, obteniéndose un 94 % de recuperación de las unidades iniciales, con 2,3 veces de purificación de la actividad específica de PEPCK (Tabla 2). El precipitado en sulfato de amonio fue redissuelto y dializado y fue aplicado a continuación a la columna de fosfocelulosa.

El perfil de elución de la columna de fosfocelulosa se visualiza en la figura 5. Se puede apreciar que el lavado de la fracción retenida por esta columna elimina gran cantidad de proteínas y que la elución de la PEPCK se produce hacia el final de la gradiente aplicada, en un solo pico de actividad, siendo eluída aproximadamente con 180 mM de fosfato. En la figura 5 se observa el pico de PEPCK obtenido, se reunieron las fracciones con más actividad, conjunto que presentó una actividad específica de 0,95 U/mg (Tabla 2). La enzima fue estable en esta etapa, al ser mantenida a 5 °C por 48 h. Esta mezcla se aplicó a una columna de afinidad de agarosa-hexano-GTP. El perfil de elución de la enzima en esta columna se puede observar en la figura 6. La columna de afinidad fue eluída con una gradiente de KCl entre 0 y 1,5M. En la figura se aprecia que la PEPCK eluye con alrededor de 1 M KCl, en un solo pico, presentando un comportamiento

TABLA 2Purificación de la PEPCK de músculo aductor de *Perumytilus purpuratus*.

Procedimiento	Volumen (ml)	Proteínas Totales (mg)	Unidades Totales (U)	Actividad Específica (U/mg)	P (veces)	R (%)
Sobrenadante (Ei)	135	770	43	0,056	1	100
pp (NH ₄) ₂ SO ₄ 35-65%	14,6	310	40,4	0,131	2,3	94
Fosfocelulosa	24,8	30	28,3	0,95	17	66
GTP-Agarosa	25	0,93	12	13	252	28

R = rendimiento

P = purificación

U = unidades (definidas en Materiales y Métodos).

pp = precipitado

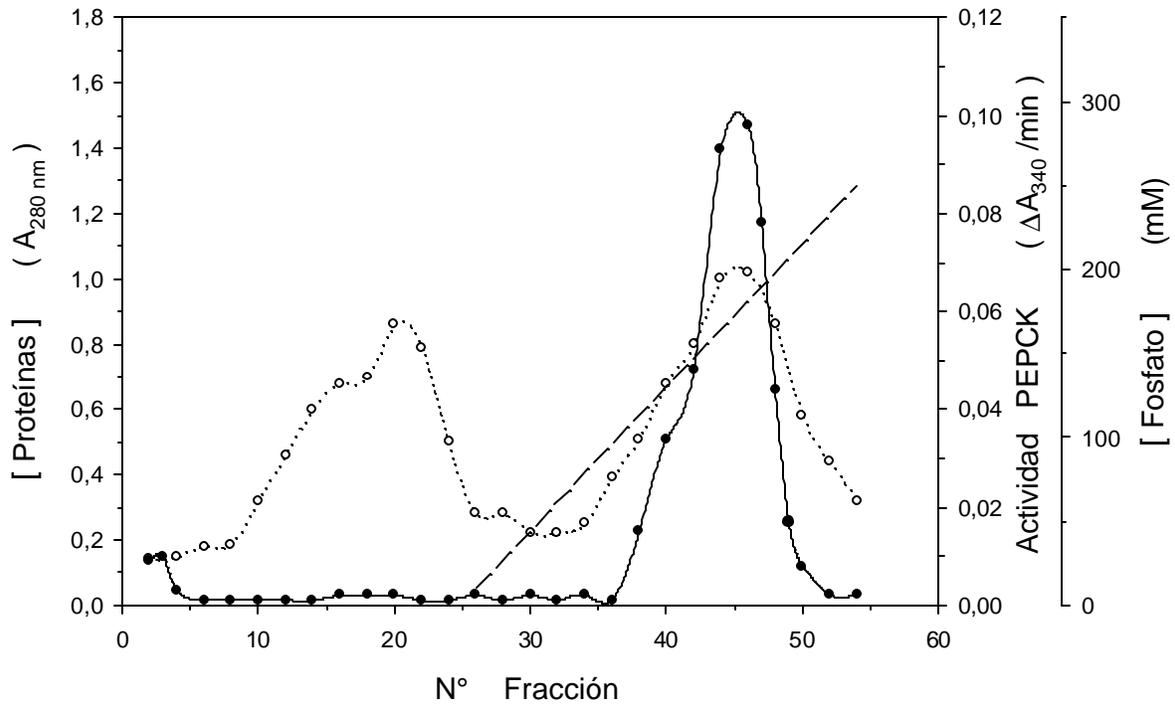


Figura 5. Cromatografía de intercambio iónico en fosfocelulosa de la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus*. La columna fue lavada con amortiguador fosfato 10 mM pH 7,0; 1 mM DTT; 5 mM EDTA. La elución de la muestra fue realizada con un gradiente de 10 a 250 mM amortiguador fosfato pH 7,0; 1 mM DTT; 5 mM EDTA. Se determinaron absorbancia a 280 nm (o) y actividad enzimática como $\Delta A_{340}/\text{min}$ (?).

de elución similar al observado para PEPCKs de otros organismos (Rojas *et al.*, 1991). La enzima eluída de la columna GTP-agarosa, fue mantenida a 4 °C, sin observarse pérdida de actividad durante al menos 7 días.

En la Tabla 2, se resume la purificación de la enzima. Se puede apreciar que la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* fue purificada 252 veces, con un 28 % de rendimiento. La PEPCK eluída de GTP-agarosa, presentó una actividad máxima específica de 13 μ moles de OAA formados por minuto y por mg de proteína a 25 °C. En la preparación descrita se utilizaron 30 g de tejido muscular y se obtuvieron 0,93 mg totales de PEPCK homogénea, en 2-3 días.

4.5. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y ESTRUCTURAL DE LA PEPCK DE *P. purpuratus*.

4.5.1. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MOLECULAR.

El grado de homogeneidad de la preparación, se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes y reductoras. En el gel se observa (Fig. 7), una sola banda con tinción de Coomassie, con una migración correspondiente a una proteína de masa molecular de alrededor de 74.000 Da. Para determinar el tamaño molecular de la enzima nativa se realizó una cromatografía de filtración en gel, Sephacryl S-300, obteniéndose una enzima con un tamaño nativo de alrededor de 89.000 Da (Fig. 8), con lo cual se concluye que la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* correspondería a un monómero.

4.5.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE MICHAELIS PARA LOS SUSTRATOS DE LA PEPCK EN LA REACCIÓN DE CARBOXILACIÓN.

Las constantes cinéticas para los sustratos IDP, GDP, PEP y HCO_3^- fueron obtenidas a partir de los datos de las curvas de saturación para cada sustrato de la PEPCK en sentido de la reacción de carboxilación del PEP. Los parámetros cinéticos fueron calculados de los gráficos de dobles recíprocos de la velocidad en función de la concentración variable del respectivo sustrato. Los

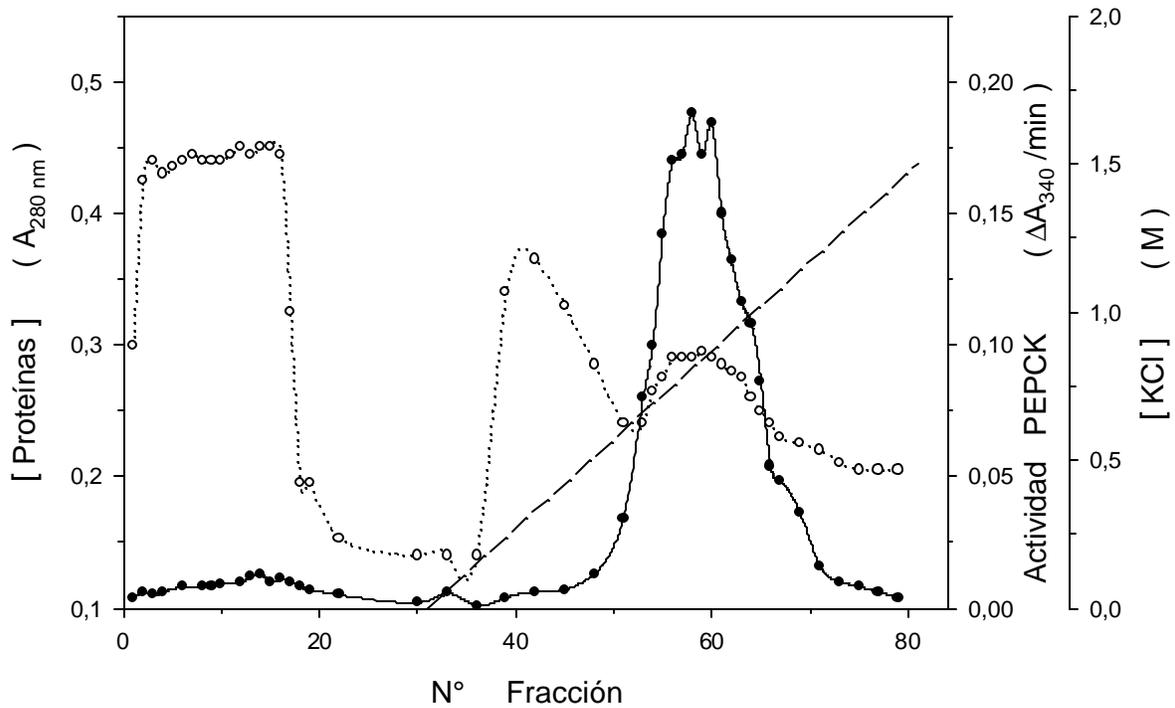


Figura 6. Cromatografía de afinidad en GTP-agarosa-hexano de la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus*. El volumen de adsorción de la muestra correspondió a 370 ml. El lavado de la muestra adsorbida fue con amortiguador C: Tes 10 mM pH 7,3; 0,1 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 1,15 mM $MnCl_2$; 8,7 % glicerol. La elución de la muestra fue realizada con un gradiente de 90 ml de 0 - 1,5 M KCl en amortiguador. (o) absorbancia a 280 nm ; (?) actividad enzimática expresada como ? A/min.

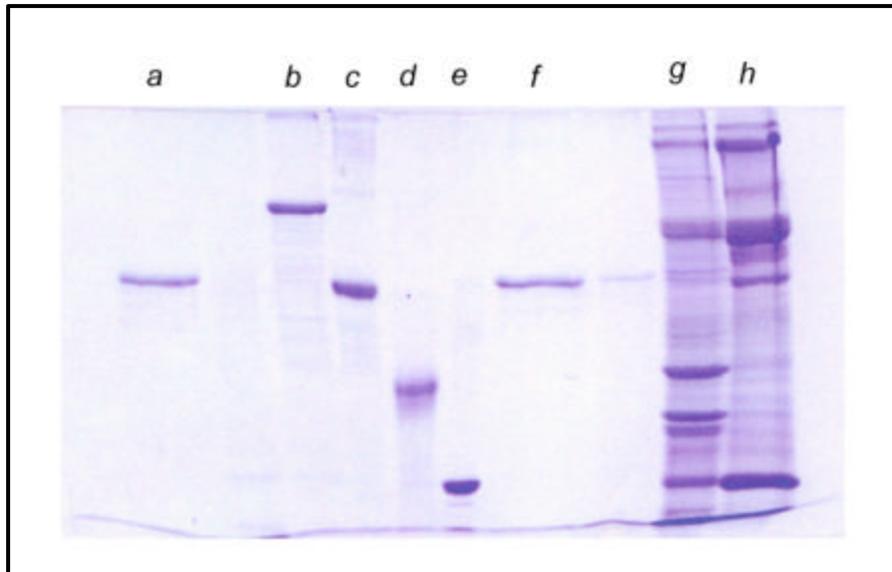


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, de la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus*. Se muestra la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* eluída de la columna de afinidad GTP-agarosa en un gel de poliacrilamida al 10 %, en presencia de SDS. Se aplicó en el gel aproximadamente 3 - 5 μg de proteína en cada carril (a - f), y 10 μg para los carriles g y h. Carriles: a) PEPCK eluída de GTP-agarosa; b) β -galactosidasa, 116 kDa; c) BSA, 66 kDa; d) albúmina de huevo, 45 kDa; e) anhidrasa carbónica, 29 kDa; f) PEPCK eluída de GTP-agarosa; g) Sobrenadante muscular inicial; h) Fracción eluída desde fosfocelulosa.

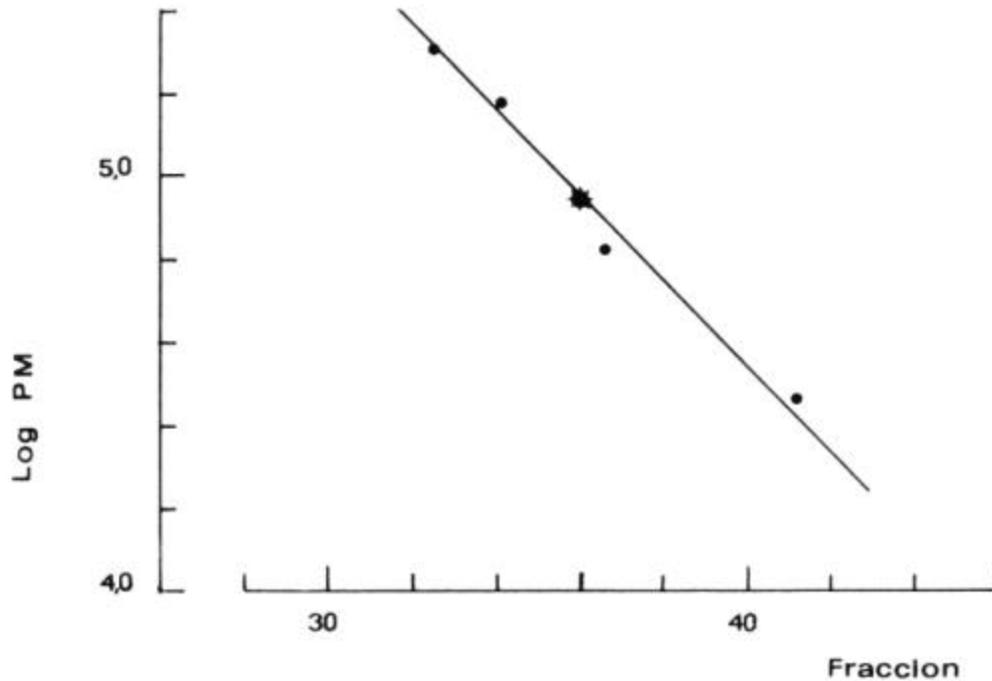


Figura 8. Gráfico de log PM de proteínas marcadoras vs movilidad relativa en una cromatografía de filtración molecular en Sephacryl S-300 para determinar el peso molecular de la PEPCK de *P. purpuratus*. Se determinó el tamaño molecular nativo de la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* por filtración en gel Sephacryl S-300, equilibrada en amortiguador Hepes 10 mM. pH 7,0; 0,5 mM DTT; 1 mM EDTA; 0,1 M KCl. La PEPCK fue obtenida de la cromatografía de afinidad en GTP-agarosa-hexano. Los marcadores de tamaño molecular fueron: a) amilasa, 200 kDa; b) ADH, 150 kDa; c) BSA, 66 kDa; d) anhidrasa carbónica, 45 kDa. Se midió actividad PEPCK (ζ) en las fracciones eluidas de la columna de Sephacryl S-300 y los estándares fueron visualizados midiendo proteína por determinación de absorbancia a 280 nm.

estudios cinéticos en velocidad inicial (Figs. 9, 10 y 11), muestran que la enzima presenta un comportamiento de tipo hiperbólico con respecto a los diferentes sustratos, de acuerdo a la cinética de Michaelis-Menten. La constante de Michaelis para cada sustrato, se determinó a pH 7,0 y en presencia de 2,25 mM MnCl_2 (con concentraciones saturantes de cada sustrato fijo) y se resumen en la Tabla 3. Se aprecia que la K_m aparente para IDP (0,045 mM) es mayor que la K_m aparente para GDP ($< 0,01$ mM), mientras que el ADP no fue reconocido como sustrato por la PEPCK muscular de *P. purpuratus*. Los valores de K_m aparente para PEP y HCO_3^- fueron 0,55 mM y 2,4 mM, respectivamente.

4.5.3. EFECTO DE METALES BIVALENTES.

La PEPCK requiere de la presencia de un metal bivalente para su actividad catalítica. Al medir la actividad de la PEPCK purificada luego de cromatografía en GTP-agarosa en presencia de diferentes metales bivalentes (Fig. 12), se observa que el Co^{2+} es el metal con el que se obtuvo mayor velocidad máxima, bajo las condiciones de reacción aplicadas, seguido por Mn^{2+} , Zn^{2+} y Mg^{2+} .

4.5.4 EFECTO DEL pH.

La figura 13 muestra la actividad PEPCK medida a diferentes valores de pH con 2 amortiguadores, observándose un pH óptimo a 6,6. La actividad fue medida a cada pH con concentraciones saturantes de los sustratos y Mn^{2+} ($V_{m\acute{a}x}$), (Fig. 13). Los datos muestran que el rango de actividad máxima (pH óptimo) es pequeño, ya que la enzima PEPCK no tiene actividad a $\text{pH} < 6,0$ ni a $\text{pH} > 8,0$, siendo la PEPCK de *P. purpuratus* activa entre pH 6,0 y 8,0.

4.5.5. EFECTO DE POTENCIALES MODULADORES DE LA ENZIMA.

Se estudiaron los efectos de alanina, aspartato, ADP y succinato sobre la actividad de la enzima purificada, debido a su papel como posibles reguladores de actividad PEPCK en tejidos de otros invertebrados (de Zwaan y de Bont, 1975). Se pudo apreciar que alanina 5 mM y aspartato 2 mM, bajo condiciones de ensayo de PEP no saturante (0,5 mM) y PEP saturante

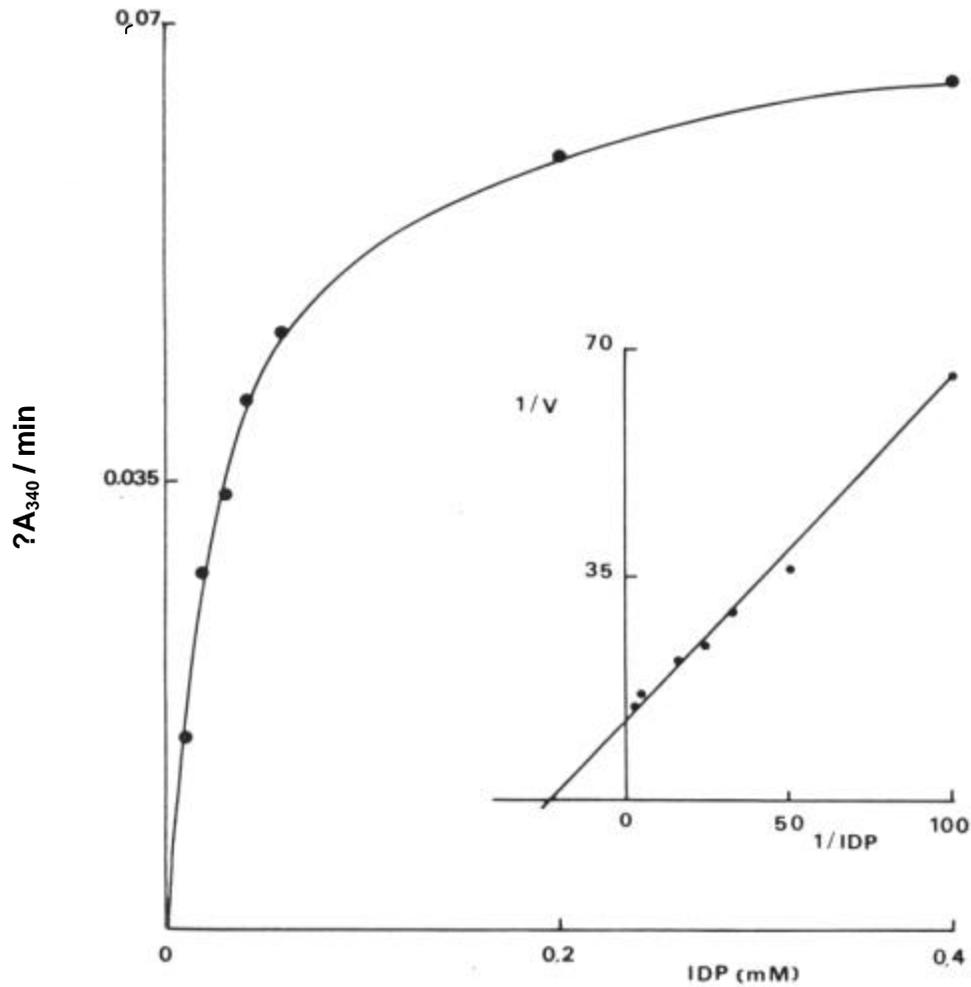


Figura 9. Efecto de la concentración de IDP sobre la actividad de la PEPCK. La actividad PEPCK fue expresada como A_{340}/min a 340 nm. PEPCK = 0,3 μM . Medio de reacción: 100 mM Hepes pH 7,0; 2,25 mM MnCl_2 ; 2,5 mM PEP; 50 mM KHCO_3^- , 8 U MDH; 0,15 mg/ml NADH y 50 μl de preparación enzimática en un volumen final de 1 ml. Los puntos graficados fueron determinados experimentalmente. La línea fue trazada en forma teórica utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. En el recuadro aparece la gráfica de los dobles recíprocos.

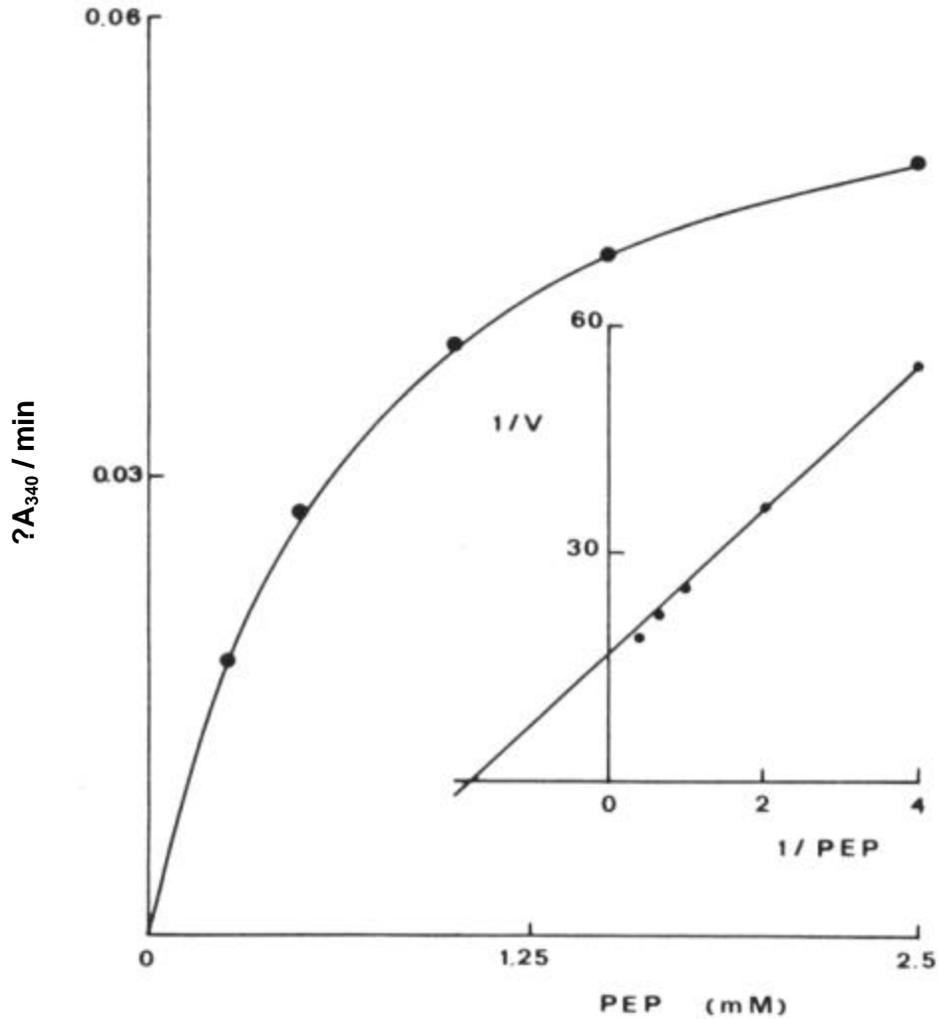


Figura 10. Efecto de la concentración de PEP sobre la actividad de la PEPCK. Velocidad expresada como A_{340}/min a 340 nm. PEPCK = $0,3 \mu\text{M}$. Medio de reacción: 100 mM Hepes pH 7,0; 0,2 mM IDP; 2,25 mM MnCl_2 ; 50 mM HCO_3^- ; 8 U MDH; 0,15 mg/ml NADH y 50 μl de preparación enzimática en un volumen final de 1 ml. Los puntos graficados fueron determinados experimentalmente. La línea fue trazada en forma teórica utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. En el recuadro aparece la gráfica de dobles recíprocos.

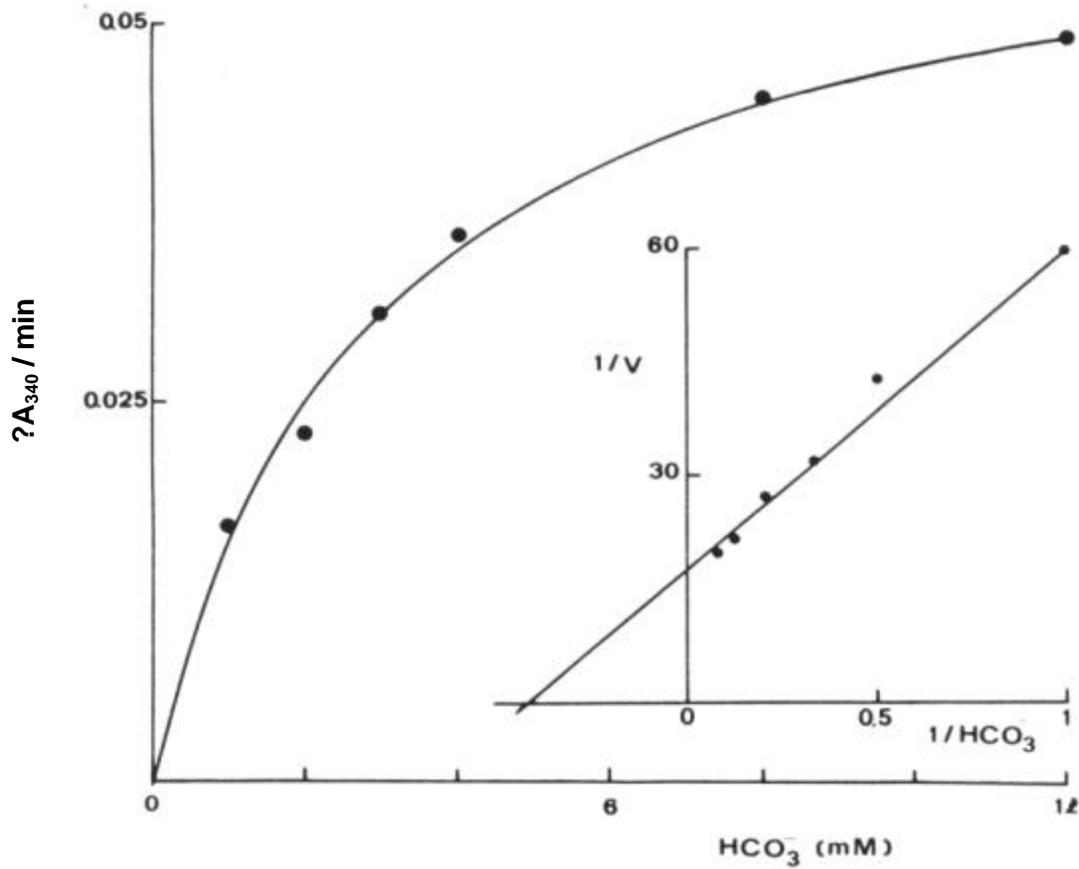


Figura 11. Efecto de la concentración de HCO_3^- sobre la actividad de la PEPCK. Velocidad expresada como A_{340}/min a 340 nm. PEPCK = $0,3 \mu\text{M}$. Medio de reacción: 100 mM HEPES pH 7,0; 2,25 mM MnCl_2 ; 2,5 mM PEP; 0,2 mM IDP; 8 U MDH; 0,15 mg/ml NADH y 50 μl de preparación enzimática en un volumen de 1 ml. Los puntos graficados fueron determinados experimentalmente. La línea fue trazada en forma teórica utilizando la ecuación de Michaelis-Menten. En el recuadro aparece la gráfica de dobles recíprocos.

TABLA 3

Valores de Km aparente para los sustratos de la PEPCK de *Perumytilus purpuratus*.

Sustrato	Km aparente (mM)
PEP	0,550
HCO ₃ ⁻	2,4
IDP	0,045
GDP	< 0,010

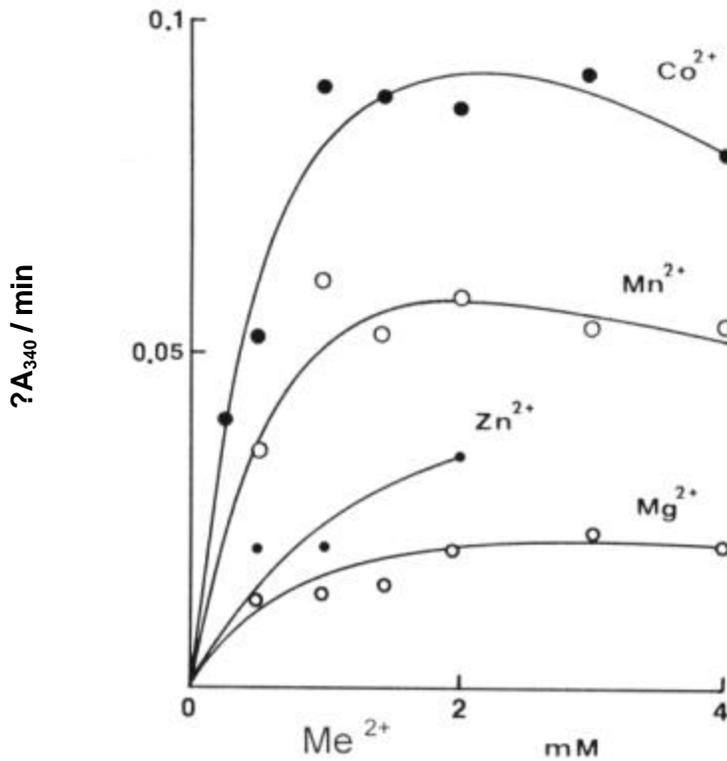


Figura 12. Efecto de la concentración de metales bivalentes en la actividad PEPCK. Se determinó la actividad PEPCK en presencia de diferentes metales bivalentes en la enzima purificada de músculo aductor de *P. purpuratus*. Velocidad expresada como A_{340}/min a 340 nm. PEPCK = 3,22 μM . Medio de reacción: 100 mM HEPES pH 7,0; 0,2 mM IDP; 2,5 mM PEP; 50 mM HCO_3^- ; 8 U MDH; 0,15 mg/ml NADH y 50 μl de preparación enzimática en un volumen final de 1 ml. Los puntos graficados fueron determinados experimentalmente. Se usaron concentraciones variables de los siguientes metales bivalentes: CoCl_2 (?); MnCl_2 (O); ZnCl_2 (●) y MgCl_2 (?).

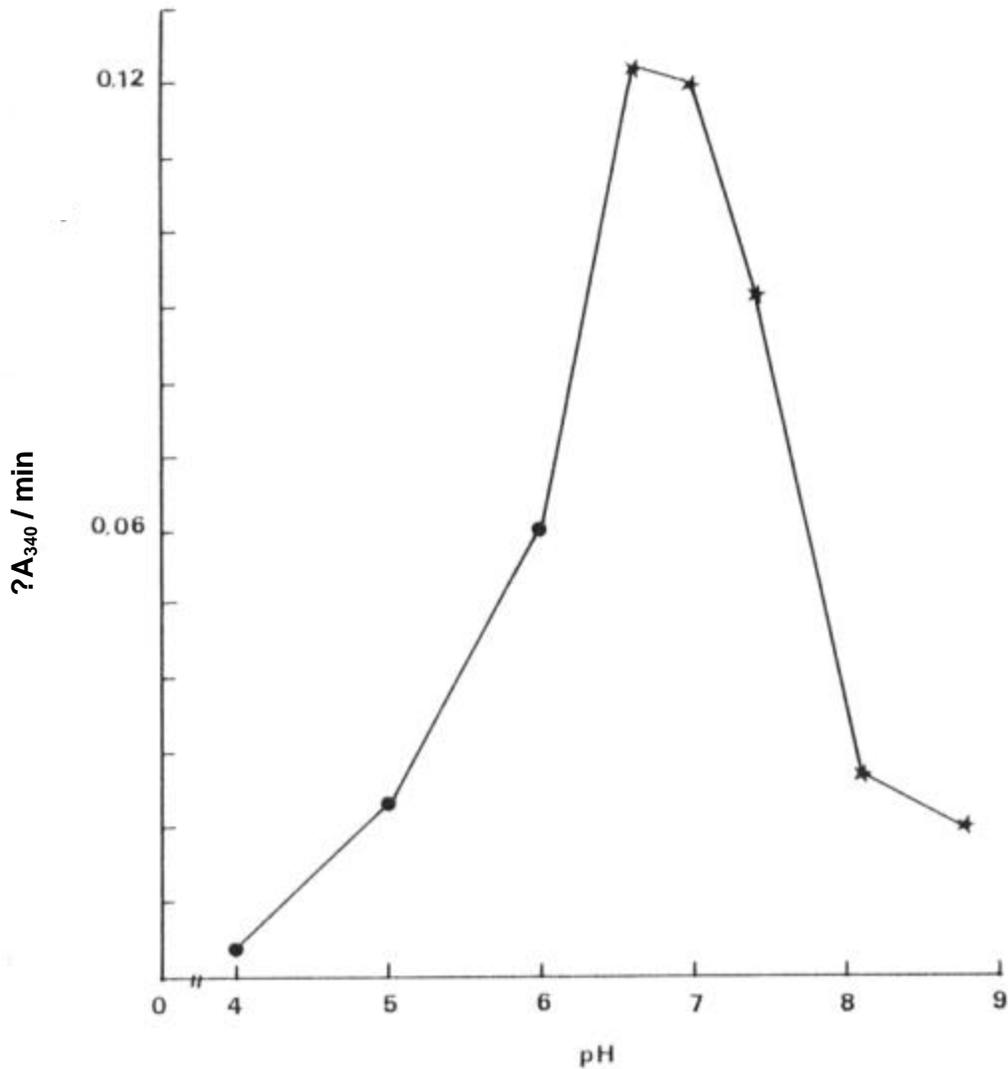


Figura 13. Determinación de la actividad PEPCK a diferentes valores de pH. Se midió actividad PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* en función del pH. La velocidad fue expresada como $?A/\text{min}$ a 340 nm. PEPCK = 3,22 μM . Se usaron los siguientes amortiguadores: 100 mM Acetato (?) y 100 mM Hepes (★). El medio de reacción contenía: 0,2 mM IDP; 2,25 mM MnCl_2 ; 2,5 mM PEP; 50 mM HCO_3^- ; 8 U MDH; 0,15 mg/ml NADH y 50 μl de preparación enzimática en un volumen final de 1 ml.

(2,5 mM), no mostraron efecto alguno en la actividad PEPCK (datos no mostrados). De igual modo, se comprobó que ADP (0,2 mM) tampoco produjo cambios en la actividad PEPCK de *P. purpuratus*.

Se analizó el efecto de concentraciones crecientes de ITP y ATP sobre la actividad de PEPCK la purificada (Fig. 14), observándose que ambos nucleótidos son inhibidores de la enzima, presentando mayor grado de inhibición el ITP. ATP inhibió la PEPCK a concentraciones mayores de 1 mM. La inhibición de la enzima por ITP presenta un valor de I_{50} para el nucleótido de 1,70 mM, mientras que la enzima presenta una disminución en la sensibilidad al ATP, teniendo un valor de I_{50} para ATP de 1,95 mM. En la figura 15 se muestra el gráfico de $1/\text{velocidad}$ vs $1/[\text{PEP}^?]$, en ausencia y en presencia de una concentración fija de ITP. Los datos de la figura dan una excelente correlación con la ecuación para una inhibición mixta, con respecto a PEP. De los datos de la figura 15 se determinó que la constante de inhibición para ITP tiene un valor de 0,8 mM, el cual es similar a la constante de inhibición de ITP con respecto a PEP (K_i de 0,75 mM), en el helminto *Ascaris suum* (Rohrer *et al.*, 1986), invertebrado anaerobo facultativo.

4.6. INACTIVACIÓN Y TITULACION DE LA PEPCK MUSCULAR DE *P. purpuratus* CON DITIOBISNITROBENZOATO.

Para determinar si la enzima PEPCK muscular de *P. purpuratus* presenta grupos sulfhidrilos funcionales, se realizaron experiencias de titulación con DTNB, reactivo dirigido a grupos SH. Para este fin, se realizaron dos tipos de experiencias: a) se monitoreó la actividad catalítica en el tiempo al tratar la enzima purificada con el reactivo de sulfhidrilos, bajo diferentes condiciones estequiométricas, y en presencia o ausencia de sustratos de la enzima; b) Por otro lado, se monitoreó espectrofotométricamente la aparición del anión mono nitrobenzoato (MNB), el que absorbe a 412 nm, luego de experiencias de titulación de la PEPCK purificada. Para ello se dializó la enzima purificada inmediatamente antes de las experiencias de reacción con DTNB, para remover el DTT, como se describe en Materiales y Métodos.

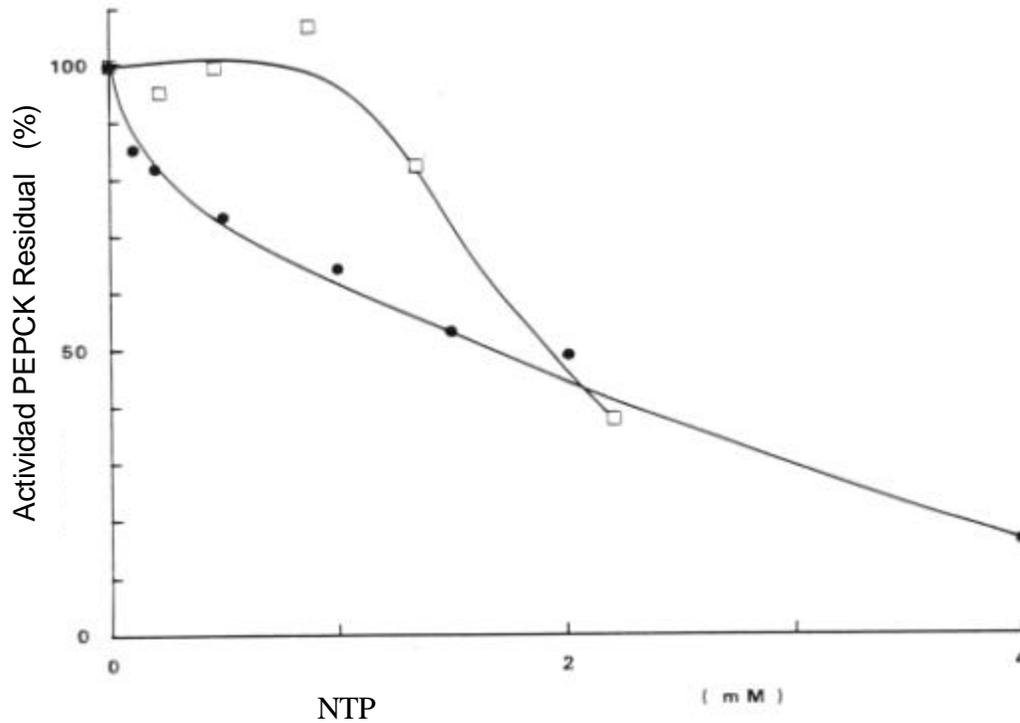


Figura 14. Efecto de la concentración de ITP y ATP en la actividad PEPCK. Se midió la actividad PEPCK en función de concentraciones crecientes de ITP (?) y ATP (?) de la PEPCK purificada. PEPCK = 3,22 μ M. La actividad de la enzima fue determinada como se describe en las leyendas de las figuras 9 y 10, con concentraciones saturantes de los sustratos PEP, IDP y HCO_3^- .

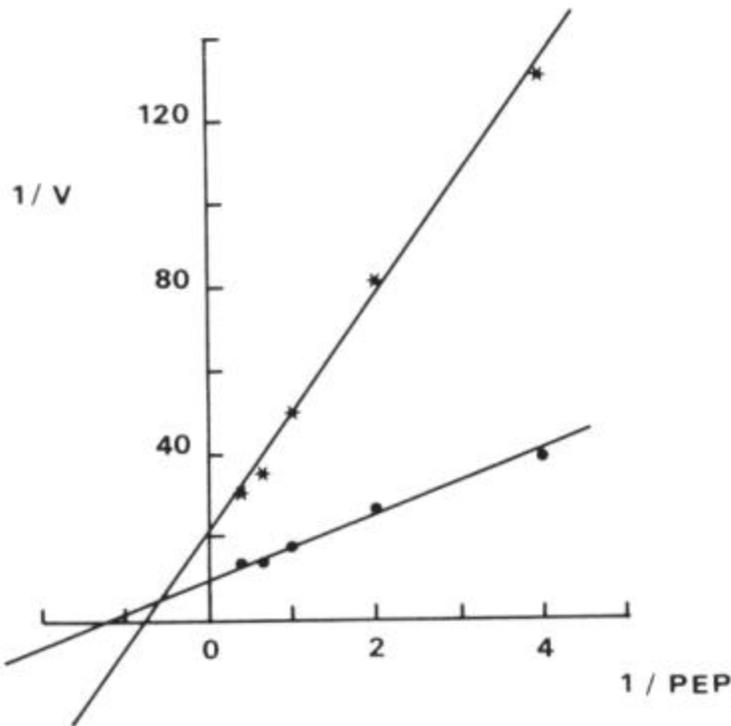


Figura 15. Gráfico de dobles recíprocos de la velocidad inicial ($\text{? A}_{340} / \text{min}$) vs la concentración de PEP para la PEPCK, en ausencia y presencia de ITP. Gráfico de Lineweaver-Burk de la inhibición de la actividad enzimática PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* causada por ITP, a concentraciones variables de PEP. Se mantuvieron constantes las concentraciones de los siguientes sustratos: 0,2 mM IDP; 2,25 mM MnCl_2 ; 50 mM HCO_3^- . PEPCK = 3,22 μM . La concentración de PEP fue variable, en ausencia (?) y en presencia de 2 mM ITP (★).

La figura 16 muestra la cinética de inactivación de la enzima incubada (a 30 °C) con distintas concentraciones de DTNB, observándose que el DTNB inactiva rápidamente la PEPCK a bajas concentraciones y en forma dependiente de su concentración.

De igual modo se realizaron experiencias de inactivación con DTNB en presencia de los sustratos de la enzima. Para dicho experimento fueron probados los siguientes ligandos: ITP, MnCl_2 -IDP, IDP, GDP, PEP, MnCl_2 , ATP y HCO_3^- (las concentraciones se indican en leyenda de la figura). Al observar la figura 17, se desprende que al incubar la enzima con DTNB en presencia de Mn^{2+} -IDP y en presencia de ITP, se protege completamente la PEPCK purificada de la inactivación con concentraciones estequiométricas de DTNB; por otro lado IDP, Mn^{2+} y PEP 0,5 mM protegieron parcialmente la enzima. HCO_3^- y ATP no protegieron a la enzima de la inactivación con DTNB. Se estudió del efecto causado en la enzima por DTNB al ser preincubada con concentraciones crecientes de PEP, en ausencia de DTNB. En la figura 18, se puede observar que al preincubar la enzima con PEP, se produce una inactivación notable y ella es mayor y más rápida a medida que se aumenta la concentración de PEP.

La titulación de la PEPCK de *P. purpuratus* con 50 veces exceso de DTNB, en ausencia y en presencia de 2 % SDS, se muestra en la figura 19 (a, b). Se observa un número total de grupos SH titulados en ambos casos, de aproximadamente 3 moles de SH modificados por mol de enzima; sin embargo la velocidad de modificación de las cisteínas de la enzima es diferente, presentando una mayor velocidad de modificación en ausencia de SDS que en presencia del reactivo. Ello sugiere la existencia de grupos sulfhidrilos cuya reactividad depende del entorno en que se encuentra la proteína nativa. Al titular la enzima con 50 veces exceso de DTNB pero en presencia del ligando Mn^{2+} -IDP (Fig. 19, a), se visualiza que sólo fueron modificados alrededor de 2,3 moles de SH por mol de enzima; ello sugiere la protección de un grupo SH por mol de enzima, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en las experiencias de inactivación con protección de los sustratos Mn^{2+} -IDP (Fig.17).

La titulación de la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* usando cantidades estequiométricas de DTNB se observa en la figura 20. Se aprecia aproximadamente un 80 % de pérdida en la actividad PEPCK cuando se han titulado aproximadamente 0,3 - 0,5 moles de SH

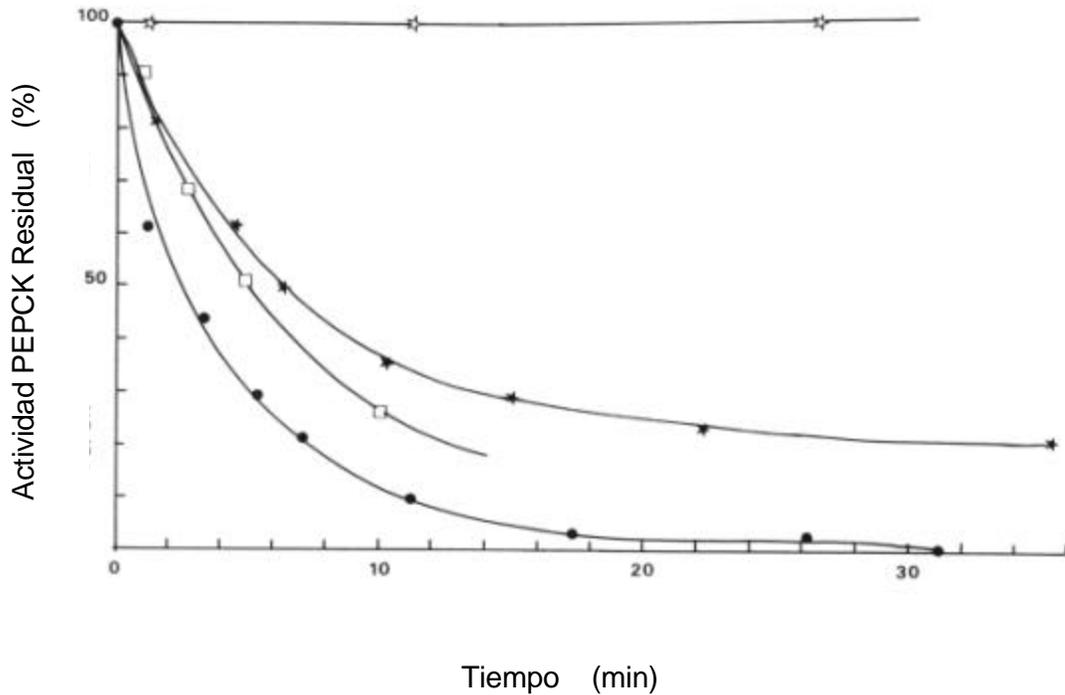


Figura 16. Cinética de inactivación de la PEPCK con diferentes concentraciones de DTNB.

Se determinó la actividad PEPCK remanente de la enzima purificada, al ser preincubada a 30 °C por tiempos variables con distintas concentraciones de DTNB. La concentración de la enzima fue de 3,4 μM en cada caso. Ausencia de DTNB (control)(☆); 1,17 μM DTNB (★); 2,6 μM DTNB (?) y 3,4 μM DTNB (?). A los tiempos indicados se tomó una alícuota desde cada condición, en la que se determinó la actividad PEPCK remanente bajo condiciones de sustratos saturantes. La actividad PEPCK se expresó en %, respecto de la actividad a tiempo 0. Actividad PEPCK a $t_0 = 1,15 \text{ U / ml}$.

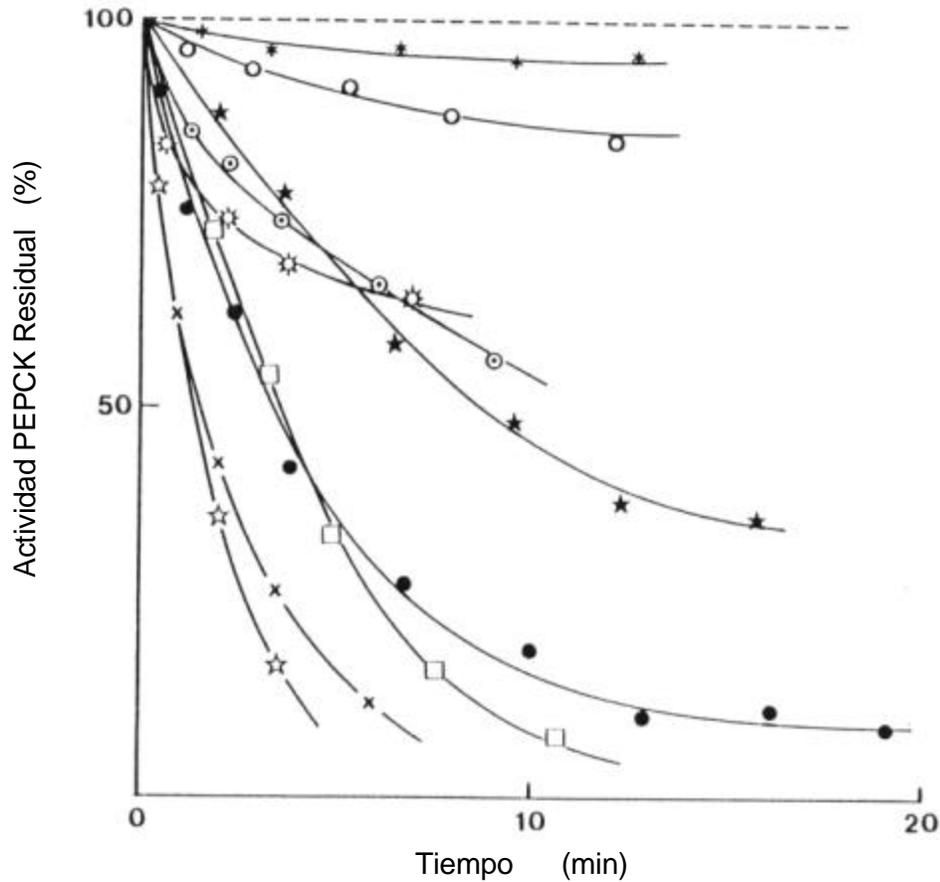


Figura 17. Cinética de inactivación de la PEPCK de *P. purpuratus* con DTNB en ausencia y en presencia de sustratos. Cinética de inactivación de la PEPCK de *P. purpuratus* con DTNB, a 30 °C en ausencia (?) y en presencia de sustratos de la enzima. Actividad PEPCK a $t_0 = 1,15$ U / ml. PEPCK = 3,5 μ M; DTNB = 2,6 μ M. Las concentraciones de los sustratos fueron: 0,5 mM ITP (★); 2,24 mM MnCl₂-0,5 mM IDP (?); 0,5 mM GDP (α); 0,5 mM IDP (⊙); 0,5 mM PEP (★); 2,3mM MnCl₂ (?); 0,5 mM ATP (×) y 5 mg/ml HCO₃⁻ (☆). Se procedió experimentalmente como se describe en la figura 16. La línea punteada corresponde a enzima incubada en el tiempo a 30 °C, en ausencia de DTNB y sustratos.

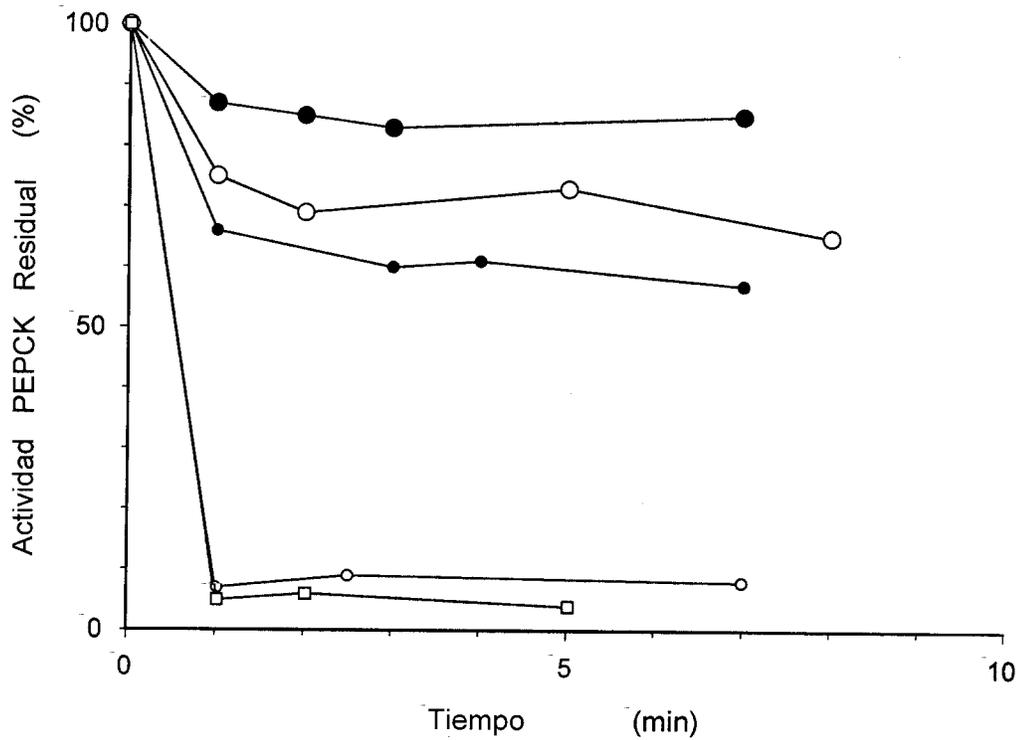


Figura 18. Cinética de inactivación de la enzima PEPCK preincubada con diferentes concentraciones de PEP. Efecto de concentraciones crecientes del sustrato PEP en la inactivación de la PEPCK por DTNB. Actividad PEPCK a $t_0 = 0,49$ U/ml. PEPCK = $2 \mu\text{M}$; DTNB = $2 \mu\text{M}$. Se determinó la cinética de inactivación por DTNB de la PEPCK de *P. purpuratus* purificada, como se describe en la figura 16, al ser preincubada con concentraciones crecientes de PEP. Temperatura de incubación con DTNB de 30°C . Se preincubó con PEP a las siguientes concentraciones: 1 mM (?); $2,5 \text{ mM}$ (?); $3,5 \text{ mM}$ (?); 5 mM (?); 7 mM (?). Se sacó alícuotas de PEPCK de cada condición por tiempos crecientes, para determinar actividad PEPCK en presencia de sustratos saturantes de la enzima.

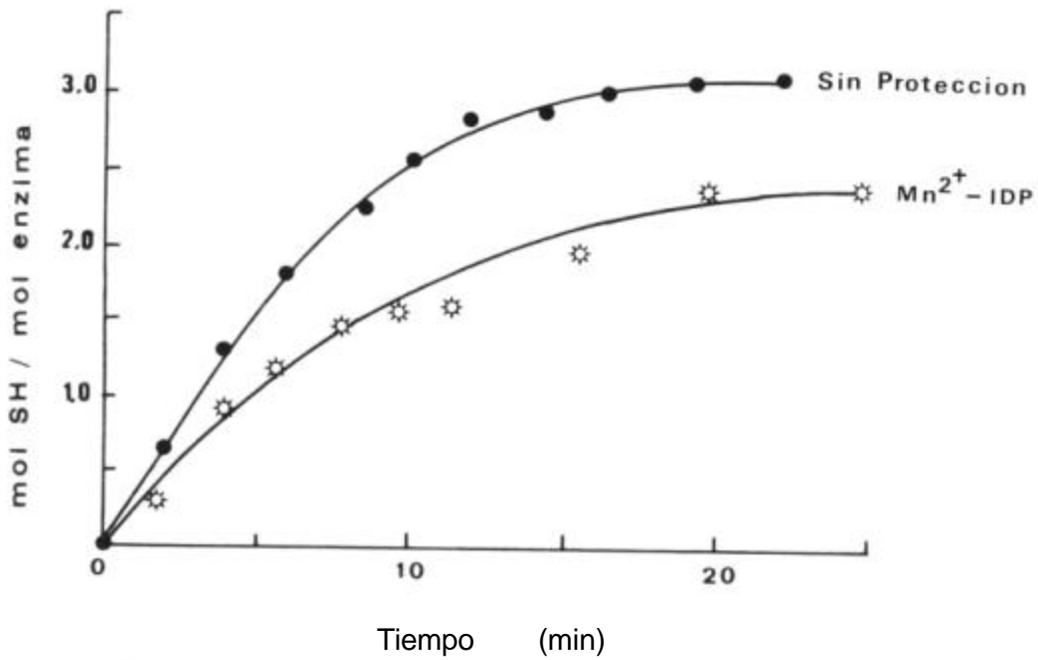


Figura 19a. Titulación de la PEPCK de *P. purpuratus* con DTNB. La titulación de la PEPCK de *P. purpuratus* se realizó con DTNB 50 veces en exceso. La enzima purificada (1,15 μ M) fue incubada a 30 °C en presencia de DTNB (61 μ M), monitoreando en el tiempo la absorbancia a 412 nm. Se muestra en el gráfico el número de moles de SH modificados por mol de monómero de PEPCK. (?) Sin protección y (⊗) en presencia de Mn²⁺ 2,27 mM + IDP 0,4 mM. Se muestra lectura de absorbancia a 412 nm, en el tiempo.

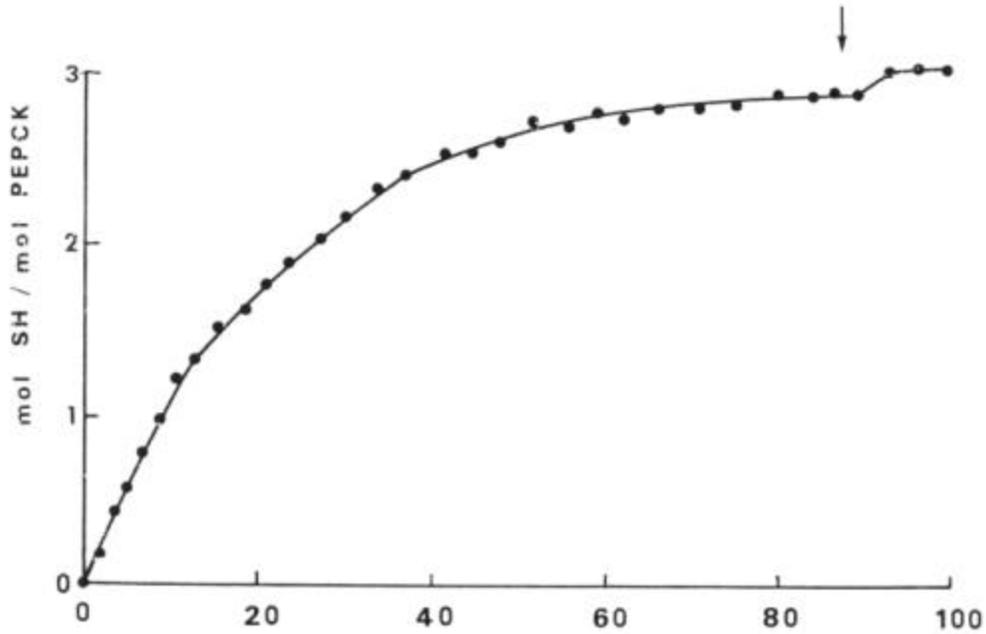


Figura 19b. Titulación de la PEPCK de *P. purpuratus* con DTNB en presencia de SDS.

Curva de titulación de la PEPCK de *P. purpuratus* con DTNB 50 veces en exceso, en presencia de 2 % SDS. La enzima (1,5 μM) se incubó a 30 °C con DTNB (80 μM) en presencia de 2 % SDS, midiendo absorbancia a 412 nm en el tiempo. La flecha indica aumento en la temperatura de reacción a 40 °C.

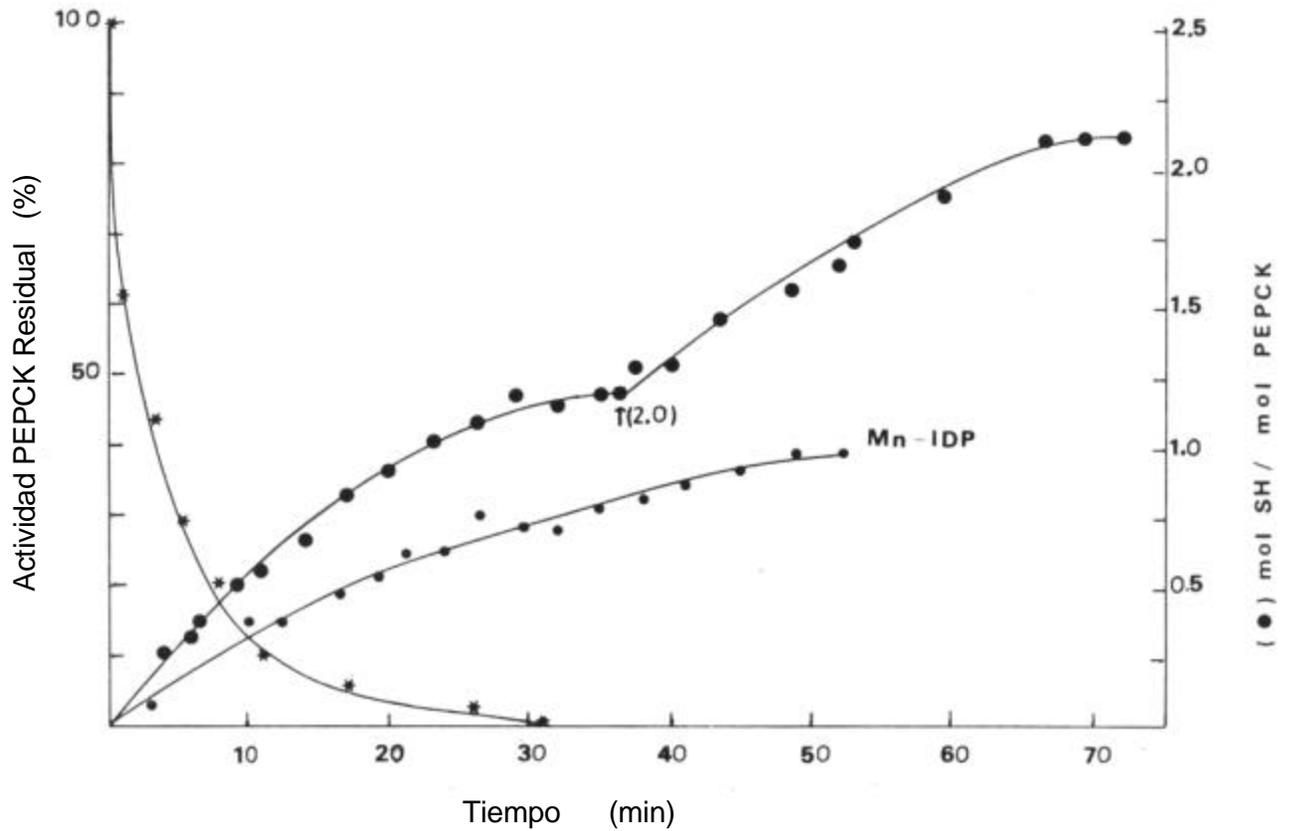


Figura 20. Modificación e inactivación de la PEPCK purificada de *P. purpuratus* con concentración equimolar de DTNB. La enzima ($3,5 \mu\text{M}$) fue mantenida a 30°C en presencia de DTNB ($3,4 \mu\text{M}$) en triplicado; luego de 35 min se agregó a la condición control (ausencia de $\text{IDP}/\text{Mn}^{2+}$, ver flecha) DTNB en una proporción final 2:1 respecto de la PEPCK. La razón molar de DTNB con la enzima se muestra entre paréntesis. Actividad PEPCK remanente, en % (★). Titulación estequiométrica en presencia (●) y en ausencia (?) de Mn^{2+} -IDP.

por mol de enzima. Al agregar a la enzima modificada, un segundo mol de DTNB se produce la liberación de aproximadamente otro mol del anión MNB por mol de enzima modificada. Las pendientes de las gráficas sugieren que el primer grupo SH se modifica a una mayor velocidad que el segundo. De igual modo, el efecto de Mn^{2+} -IDP en la inactivación de la enzima con concentraciones estequiométricas de DTNB se observa en la figura 20. Se puede apreciar que se libera 1 mol del anión MNB por mol de enzima modificada; la velocidad de liberación del anión fue menor que la velocidad de modificación del primer grupo SH en ausencia de Mn^{2+} -IDP, y es similar a la velocidad del segundo mol liberado (en ausencia de Mn^{2+} -IDP, el que protege al grupo SH más reactivo) obteniéndose un 100 % de pérdida de actividad PEPCK.

Para determinar la cinética de inactivación con DTNB, se debió realizar la experiencia a $0 - 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para reducir la velocidad de reacción y obtener condiciones de pseudo-primer orden. En la figura 21 aparece la cinética de inactivación obtenida con diferentes concentraciones de DTNB (10 a 50 veces exceso) incubando en baño de hielo/agua ($0 - 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) la PEPCK purificada. En esta figura se puede apreciar que la cinética de la reacción es de una fase y el orden de la reacción es de pseudo-primer orden (Fig. 21, inserto).

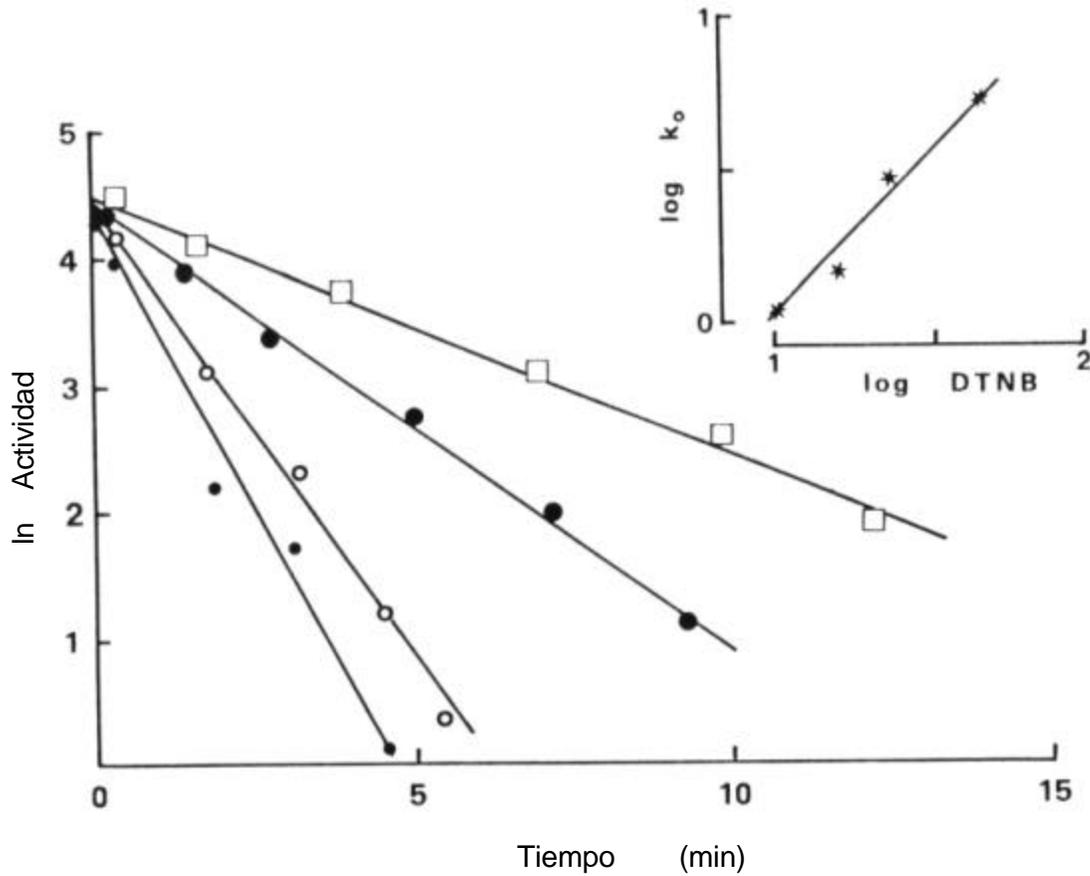


Figura 21. Cinética de inactivación de la PEPCK con DTNB a 0 °C. Se midió la cinética de inactivación de la PEPCK de *P. purpuratus* con DTNB, a 0 °C con exceso de DTNB. Enzima = 2,15 μ M (constante). 10 veces exceso DTNB (?); 20x exceso DTNB (?); 30x exceso DTNB (?) y 50x exceso DTNB (●). Se efectuó la experiencia como se describe en la Fig. 16. Se muestra logaritmo natural de la actividad PEPCK remanente, en el tiempo. Recuadro: gráfico logarítmico de las constantes de inactivación en función de la concentración del agente modificador.

5. DISCUSIÓN

Los mitílidos anaerobos facultativos que habitan la zona media del intermareal del litoral costero están sometidos regularmente a marcadas fluctuaciones en las condiciones ambientales, tales como carencia de oxígeno debido a la baja de la marea, carencia de alimentos y temperaturas extremas cuando están en emersión (Newell, 1979). Es por ello que estos organismos intermareales han desarrollado respuestas fisiológicas y metabólicas que les permiten responder a estos cambios en las condiciones ambientales. Entre las respuestas fisiológicas se ha demostrado que muchos de estos invertebrados poseen capacidades variables de respiración aérea (Widdows y Schick, 1985; Zandee *et al.*, 1986). En este trabajo se demuestra que *P. purpuratus* posee una alta capacidad de respiración aérea a 15 °C luego de períodos cortos de emersión (2 h), observándose que la captación de oxígeno aéreo alcanzó aproximadamente a un 50 % de la respiración en inmersión (Tabla 1). En estudios posteriores en nuestro laboratorio ha podido comprobarse que este animal disminuye su capacidad de respiración aérea al aumentar la temperatura de emersión o prolongarse la situación de emersión por más de 2 h, es decir, disminuye con directa relación a los riesgos de desecación a los que se expone el animal (Simpfendörfer *et al.*, 1995); ello debido a que el organismo cierra sus valvas para evitar la pérdida de agua. Dado el elevado grado de respiración aérea, se concluye en este trabajo que la emersión (a 15 °C, por 2 h) constituiría para *P. purpuratus* una situación de carencia parcial de oxígeno. Esta capacidad de respiración aérea es alta si se compara con *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* (Widdows *et al.*, 1979), especies que habitan zonas similares del intermareal. *M. chilensis*, que habita la zona inferior del intermareal, alcanza una respiración aérea que no supera el 15 % de la respiración en inmersión (Simpfendörfer *et al.*, 1995). Todas estas especies corresponden a anaerobos facultativos ya que poseen la ruta metabólica anaeróbica que forma succinato (de Zwaan y Wijsman, 1976), y propionato como productos finales.

Se analizó la actividad en el tejido muscular de *P. purpuratus* de las enzimas que se encuentran en el punto de bifurcación glicolítica entre una condición normóxica versus hipóxica, constituido por las enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la piruvato kinasa (Fig. 1, a, b). Se sometió igualmente ejemplares en el laboratorio a condiciones experimentales de carencia de

oxígeno, por tiempos crecientes, para analizar el comportamiento en el tiempo en la actividad máxima en el tejido, para ambas enzimas.

El estudio de las actividades específicas de la PK y de la PEPCK en el músculo aductor de *P. purpuratus* mostró que ambas enzimas presentaron un patrón de respuesta tanto en hipoxia como en anoxia. La actividad de la PK disminuyó en el tiempo de carencia de oxígeno hasta un 30 % de su actividad en el tejido (Fig. 3), lo cual es habitual en otros invertebrados anaerobos facultativos (Carvajal *et al.*, 1990; Holwerda *et al.*, 1989). La enzima PK de estos organismos es una enzima alostérica regulada por fructosa-1,6-bisfosfato, alanina, ATP y la concentración de H^+ (Zandee *et al.*, 1986). Estas características, han sido corroboradas también para la PK de *P. purpuratus* (Simpfendörfer *et al.*, 1995; 1997, a). Por otra parte, la actividad máxima de PEPCK en músculo aductor del bivalvo aumentó hasta un 150 % de su actividad después de 12 h de anoxia parcial o total en el laboratorio (Fig. 3). Es factible que la activación de la PEPCK en anoxia se deba a una sobreexpresión de la enzima en el tejido, al igual que en tejidos gluconeogénicos de vertebrados, donde la enzima es regulable a nivel de transcripción cuando el organismo es sometido a ayuno prolongado (Watford, 1989; Watford *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1998; Hanson, 1997).

Para determinar si la participación en la bifurcación del PEP, de las enzimas PK y PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* es activa o más bien pasiva, se efectuó un seguimiento de la actividad enzimática en el tiempo en sobrenadantes proteicos musculares, de individuos mantenidos en inmersión (aerobiosis, control), en emersión en el laboratorio (hipoxia) y en inmersión con burbujeo constante de nitrógeno (anoxia). Se observó para ambas enzimas patrones de respuesta en la actividad catalítica frente a las condiciones de carencia de oxígeno estudiadas en el laboratorio: la PK mostró inhibición sostenida en tiempos crecientes de hipoxia, como se ha descrito para otros invertebrados marinos, mientras que la enzima PEPCK muscular evidenció un claro aumento en su actividad catalítica luego de 12 h de hipoxia (actividad expresada como concentración en el tejido y como actividad específica), lo cual podría ser explicado como un aumento en la expresión de esta enzima bajo condiciones ambientales de carencia de oxígeno. La PK ha mostrado igualmente dependencia de la temperatura en su comportamiento de inhibición luego de períodos de hipoxia (Vial *et al.*, 1992). Entre las

respuestas metabólicas, se ha observado que organismos que habitan esta zona poseen una eficiente ruta anaeróbica que produce succinato y propionato como producto final (Fig. 1, c). Se determinó a continuación la utilización de la ruta metabólica del succinato en *P. purpuratus*, organismo intermareal que habita la zona media del litoral chileno, estudiando la acumulación de succinato en el tejido muscular del bivalvo, al ser expuesto a condiciones hipóxicas en el laboratorio. Por otra parte, la operación de la ruta del succinato debería tener relación directa con la capacidad fisiológica de respiración aérea. Estas dos estrategias aparecen como complementarias en invertebrados intermareales ya que responden alternativamente a situaciones carenciales de oxígeno producto de la baja marea en diferentes especies de invertebrados marinos (Simpfendörfer *et al.*, 1995).

Se estudió la aparición del producto anaeróbico succinato en organismos mantenidos en las tres condiciones experimentales descritas, para corroborar en *P. purpuratus* la utilización de esta ruta anaeróbica bajo situaciones de estrés hipóxico. En anoxia total (burbujeo de N_2) hubo formación de succinato en el músculo, durante las primeras 12 h y luego se observó una disminución a 24 h (Fig. 4); esta disminución en la acumulación de succinato podría deberse a la formación de propionato a partir de éste, producto final anaeróbico que habitualmente aparece después de prolongados períodos de anoxia en invertebrados anaerobos facultativos (de Vooy, 1987; Zurburg y Kluytmans, 1980). La aparición de succinato en ejemplares del bivalvo mantenidos en hipoxia (emersión, 15 °C), ocurrió después de 6 h, a una menor velocidad de producción que bajo carencia total de oxígeno. Probablemente este organismo, al respirar en forma aérea durante la emersión (Vial *et al.*, 1992) no requeriría en forma tan eficiente de la operación de la ruta anaeróbica durante la emersión. Por ello en terreno, en su hábitat natural, la respiración aérea sería muy importante fisiológicamente y sólo se utilizaría la vía del succinato al elevarse la temperatura aérea durante los meses estivales (Vial *et al.*, 1992). En base a los resultados anteriores se puede concluir que *P. purpuratus* recurre a la ruta metabólica anaeróbica en la cual se acumula succinato como producto anaeróbico, y que este organismo presentaría mecanismos moleculares de control de las enzimas de la bifurcación metabólica del PEP, PK y PEPCCK, que dirigirían el flujo metabólico glicolítico bajo condiciones de normoxia o hipoxia en este invertebrado.

Tanto la aparición de succinato, la disminución en la actividad de la PK muscular que fue mayor en anoxia que en hipoxia, como a su vez la actividad de la PEPCK que aumentó en forma similar luego de 12 a 24 h emersión o anoxia, sugerirían que la intensidad con que opera la vía anaeróbica estaría determinada por otras actividades enzimáticas además de la PK o PEPCK. Asimismo, la concentración de succinato en el tejido sería también determinada por otras enzimas que lo utilizan como sustrato.

La enzima PK de estos anaerobos facultativos ha sido extensamente estudiada (Munday *et al.*, 1980; Holwerda *et al.*, 1989; Simpfendörfer *et al.*, 1994; 1997, a, b), siendo similar en sus características regulatorias a la enzima tipo L de vertebrados. Además se ha evidenciado un mecanismo de fosforilación-defosforilación de la enzima que sería la causante de su inactivación durante situaciones anóxicas (Carvajal *et al.*, 1990; Storey, 1992). Esta fosforilación estaría mediada por una proteína quinasa dependiente de cGMP (Brooks y Storey, 1990). La PEPCK no sería una enzima sujeta a regulación por fosforilación-defosforilación. La PEPCK estaría ubicada en un punto de bifurcación metabólica, y operaría en sentido inverso a la enzima de vertebrados (Rohrer *et al.*, 1986). La activación de la PEPCK observada en sobrenadantes de extracto muscular durante situaciones hipóxicas, no ha sido descrita previamente en organismos anaerobos facultativos, marinos o terrestres. Este aumento en la actividad PEPCK podría deberse a la presencia de un modulador de la actividad presente en el extracto muscular, o bien a un aumento en la cantidad de enzima producto de una sobre-expresión durante la anoxia.

En este trabajo se purificó a homogeneidad electroforética la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* con el fin de caracterizar aspectos cinéticos, estructurales y funcionales de esta enzima que permitan una mayor comprensión de su participación en el metabolismo anaeróbico en un invertebrado marino habitante de la zona intermareal del litoral costero de Chile. La enzima fue obtenida de músculo de organismos previamente mantenidos en el laboratorio en aerobiosis y anoxia (emersión durante 12 h), no observándose diferencias del rendimiento en la ruta de purificación, como tampoco en las características cinéticas y estructurales en la PEPCK obtenida de organismos mantenidos previamente en ambas condiciones.

La PEPCK citoplasmática de músculo aductor de *P. purpuratus* fue purificada a homogeneidad electroforética, con un 28 % de rendimiento y 252 veces de purificación, obteniéndose una actividad específica final de 13 U/mg de proteína, desde tejido de organismos previamente mantenidos 12 h en emersión. En preparaciones purificadas prácticamente a homogeneidad electroforética en otros laboratorios la PEPCK obtenida de tejidos de animales en inmersión, ha sido purificada con un 27 % de rendimiento y una actividad específica de 9 U/mg (Harlocker *et al.*, 1991). La ruta de purificación en el presente trabajo constó de sólo 3 etapas y la PEPCK purificada desde el bivalvo mostró una alta estabilidad en el tiempo luego de su purificación, comparada con otras PEPCKs de tejidos de organismos superiores, las que son muy lábiles a la oxidación (Rojas *et al.*, 1991). La PEPCK de *P. purpuratus* mantuvo su actividad catalítica varios meses al ser guardada a -70°C y durante al menos 6 días a 4°C . La presencia de glicerol al 8 % en la preparación final enzimática resultó ser indispensable ya que en su ausencia, la enzima perdió rápidamente su actividad (datos no presentados). Sin embargo, no fue necesario desairear las soluciones utilizadas durante la purificación de la PEPCK del bivalvo, ni de la solución final almacenada, como ha sido el caso para la PEPCK de hígado de pollo y de rata.

El tamaño molecular de la enzima nativa se determinó por cromatografía de filtración en gel, obteniéndose un tamaño molecular de 85-90 kDa. Esta cromatografía se efectuó en presencia de sal para impedir interacciones inespecíficas potenciales de la enzima. Por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes y reductoras se obtuvo para la PEPCK purificada un tamaño relativo de 74 kDa. Con estos resultados, se puede concluir que la PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* se encuentra en la célula muscular como monómero. El tamaño molecular de 74 kDa obtenido para la PEPCK de *P. purpuratus* es similar al de PEPCKs de vertebrados (Ballard y Hanson, 1969; Colombo *et al.*, 1978; Noce y Utter, 1975; Hebda y Nowak, 1982, b; Rohrer *et al.*, 1986) y también a la enzima de otros moluscos bivalvos como *Modiolus demissus* (Harlocker *et al.*, 1991).

Al realizar estudios cinéticos en la PEPCK de *P. purpuratus* purificada se determinó que la K_m para IDP y GDP es similar a los valores informados para otras PEPCKs de invertebrados (Harlocker *et al.*, 1991), con una K_m para GDP menor que para IDP. El ADP no fue reconocido

como sustrato, como es el caso para todas las PEPCKs anteriormente descritas en eucariontes superiores: las enzimas de vertebrados e invertebrados que utilizan GDP e IDP (GTP/ITP) no reconocen ADP (ATP). La K_m de HCO_3^- a pH 7,0, con concentraciones de los demás sustratos de 2,5 mM de PEP y de 0,2 mM de IDP (2,25 mM MnCl_2), fue de 2,4 mM. Este valor es bajo si es comparado con la K_m de PEPCKs gluconeogénicas de vertebrados, cuyo valor es de alrededor de 20 mM (Utter y Kolembrander, 1972). Este valor de 2,4 mM es similar al valor obtenido para la K_m de HCO_3^- de PEPCKs de helmintos anaeróbicos facultativos que poseen la ruta metabólica del succinato (Rohrer *et al.*, 1986), y algo superior al valor de K_m de bicarbonato observado para la PEPCK de parásitos como *T. cruzi* (Urbina *et al.*, 1993).

Al comparar los valores de K_m de la PEPCK de *P. purpuratus* con respecto a las PEPCKs de mamíferos, se puede concluir que todos los valores son muy similares, excepto la K_m de HCO_3^- , la cual es 8-10 veces menor en el invertebrado que en vertebrados (Hebda y Nowak, 1982, b). El grado de afinidad para HCO_3^- en la PEPCK del invertebrado marino no dilucida cuál es la función metabólica de la enzima, como tampoco si opera bajo condiciones fisiológicas en el tejido en un sentido u otro, pero sí permite sugerir que la enzima sería más eficiente en la dirección de formación de OAA que en vertebrados.

La PEPCK mostró una actividad máxima a pH levemente ácido en músculo aductor de *P. purpuratus*. Este hecho es común en otros invertebrados estudiados, como también en vertebrados y levaduras (Cardemil *et al.*, 1990). La PEPCK de *P. purpuratus* en la reacción de carboxilación del PEP, presentó un máximo de actividad catalítica a pH 6,6 – 6,7, valor que es similar al pH obtenido en la enzima de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Urbina, 1987) e idéntico al pH óptimo de la PEPCK de *Modiolus demissus* (Harlocker *et al.*, 1991) y de *Mytilus edulis* (de Zwaan y de Bont, 1975). Este resultado incidiría, en conjunto con una menor actividad de PK al bajar el pH, que durante acidosis por hipoxia, la PEPCK tendría una actividad relativa muy superior a la actividad PK en el tejido (Hochachka y Mustafa, 1972; Simpfendörfer *et al.*, 1994).

Al estudiar el efecto de diferentes metales bivalentes, se observó que se requiere en forma absoluta la presencia de un metal bivalente para la actividad PEPCK, al igual que en otras

PEPCKs. La PEPCK de *P. purpuratus* presentó con Co^{2+} la mayor actividad catalítica, a concentraciones de metal de alrededor de 2 mM (con concentraciones saturantes de PEP, IDP y HCO_3^-). La actividad máxima alcanzada fue menor en presencia de Mn^{2+} y Zn^{2+} y con Mg^{2+} se obtuvo el menor grado de activación. En otros anaerobos facultativos la situación es algo diferente: el Co^{2+} activa sólo parcialmente la PEPCK de *Ascaris suum* (Rohrer *et al.*, 1986), mientras que el Zn^{2+} es un activador efectivo de la PEPCK de músculo aductor de *Mytilus edulis* (de Zwaan y de Bont, 1975). El Mg^{2+} activa sólo parcialmente la PEPCK de *P. purpuratus* lo cual difiere de lo observado en otras PEPCKs (Urbina *et al.*, 1993). En músculo aductor de *Mytilus edulis* (de Zwaan y de Bont, 1975), el Mg^{2+} solo, también activa la enzima como en el caso de *P. purpuratus* aunque ello no representa una situación general, pues la PEPCK de tejido muscular de ostra no es activada por la presencia exclusiva de este metal (Mustafa y Hochachka, 1973, a, b).

Al estudiar la inhibición por ITP de la PEPCK purificada, el nucleótido, presentó un patrón de inhibición mixto con respecto del sustrato PEP. Este resultado difiere de lo obtenido para la PEPCK de mamíferos (Utter y Kolenbrander, 1972) y de otros bivalvos que muestran una inhibición de tipo competitiva con ITP; por otra parte, la inhibición de ATP con respecto a PEP en *Modiolus demissus*, bivalvo anaerobo, es de tipo mixta (Harlocker *et al.*, 1991). No se conoce el impacto en la actividad PEPCK de la concentración de nucleótidos trifosforilados en tejidos de invertebrados, debido a que bajo condiciones fisiológicas, sus niveles de concentración no son conocidos en estos invertebrados marinos. Es por ello que no es posible inferir el efecto metabólico de la concentración de ITP, GTP o ATP en su acción sobre la PEPCK muscular de *P. purpuratus*. En estudios preliminares se ha encontrado en tejido muscular de *P. purpuratus* una concentración de ATP de aproximadamente 4 mM (Oelckers *et al.*, en preparación), la que podría ejercer un efecto inhibitorio sobre la PEPCK en este tejido. Tampoco son conocidas posibles fluctuaciones en la concentración de estos nucleótidos, que permitan proponer una regulación activa in vivo que desencadene diferentes destinos metabólicos para el PEP, bajo condiciones ambientales o ecofisiológicas.

En trabajos preliminares en PEPCK de invertebrados marinos aneróbicos facultativos (con preparaciones de PEPCK parcialmente purificadas) se había sugerido que alanina es un modulador de la actividad PEPCK, revirtiendo la inhibición de la enzima causada por ITP (de Zwaan y de Bont, 1975). Sin embargo, alanina hasta una concentración de 5 mM no afectó el grado de inhibición de la PEPCK por ITP, y tampoco afectó directamente la actividad de la enzima purificada (Vial *et al.*, 1995). Cabe señalar que el aspartato, sugerido como sustrato anaeróbico fermentativo alternativo a la glucosa (Zandee *et al.*, 1986), como tampoco el succinato (intermediario anaeróbico), mostraron algún efecto sobre la actividad PEPCK de *P. purpuratus* bajo las condiciones experimentales analizadas en este trabajo.

La PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* requiere durante su purificación y almacenaje, para mantener su actividad catalítica, y al igual que otras PEPCKs, de un reactivo reductor de grupos SH. Sin embargo, debido a la mayor estabilidad en solución de la enzima purificada (a 4 - 5 °C) y por el hecho de no requerir el desaireado de las soluciones durante la purificación, como es el caso de PEPCK de vertebrados, la enzima del bivalvo también muestra diferencias. Se ha descrito que la mayoría de las PEPCKs son sensibles a la inhibición por agentes modificadores de los grupos sulfhidrilos, lo que sugiere que este grupo funcional es importante para la actividad catalítica (Lewis *et al.*, 1989; Carlson *et al.*, 1978; Makinen y Nowak, 1989; Lewis *et al.*, 1993). En este trabajo, se estudió la presencia de grupos sulfhidrilos reactivos, para aportar al conocimiento en forma comparativa respecto de lo observado en PEPCKs de organismos filogenéticamente muy distantes, y de comprender el mayor grado de estabilidad frente a oxidación que presentó la enzima del bivalvo. El número total de cisteínas reactivas también aportaría información al análisis comparativo de la estructura (primaria y terciaria) de esta proteína.

El presente trabajo aporta evidencias de la presencia de un grupo SH muy reactivo en el sitio de unión del sustrato en la PEPCK de *P. purpuratus*; la modificación de este SH con DTNB inactivó a la enzima. Diferentes sustratos de la enzima proporcionan diversos grados de protección contra la modificación por DTNB. Los sustratos ITP e IDP-Mn²⁺ proporcionan una mejor protección contra la inactivación de la enzima por DTNB. En cambio el PEP 0,5 mM

protegió sólo parcialmente a la enzima de esta inactivación (Fig. 17). Este resultado indicaría que el grupo tiol que es rápidamente modificado con concentraciones equimolares de DTNB se encontraría en o cerca del sitio activo de la enzima, lugar donde se unen los sustratos. Respecto del efecto del PEP como sustrato protector frente al DTNB, se observó un efecto opuesto, debido a que la enzima fue más lábil a la inactivación por el agente modificador, en función de concentraciones crecientes de PEP. Este efecto del sustrato fue repetitivo y reproducible, y sugiere una labilización de la enzima frente al DTNB, en presencia de PEP.

La PEPCK citosólica de hígado de rata posee 13 cisteínas, de las cuales hay un par de cisteínas vecinas que son protegidas por sustratos frente a la acción del DTNB (Lewis *et al.*, 1993). Los experimentos de titulación de la enzima del mitílido marino con exceso de DTNB señalan la presencia de tres grupos SH reactivos por mol de enzima, tanto en presencia como en ausencia de SDS (Fig. 19, a, b). La velocidad de reacción de liberación del anión MNB fue mayor en ausencia que en presencia del detergente denaturante, lo cual sugiere que la reactividad de uno o más de los grupos SH reactivos requiere de la mantención de un microambiente específico. Al realizar los experimentos de titulación con exceso de DTNB (monitoreando la aparición del anión MNB a 412 nm) en presencia del sustrato IDP-Mn²⁺, se titularon sólo 2 grupos SH por mol de enzima, lo cual sugiere protección de un grupo SH en presencia de IDP-Mn²⁺. Aparentemente, este sería el sulfhidrilo más reactivo probablemente ubicado en el sitio de unión del nucleótido, y su modificación provoca la inactivación de la enzima. Las experiencias de titulación de la enzima con cantidades estequiométricas de DTNB aportaron mayor evidencia a esta observación. En experiencias sin protección se detectó la presencia de un grupo SH reactivo; pero al efectuar la experiencia en presencia de IDP-Mn²⁺ la velocidad de reacción del grupo SH disminuyó haciéndose similar a la velocidad de reacción del segundo SH titulado en las experiencias sin protección.

Los estudios cinéticos de la reacción de inactivación realizados a 0 °C mostraron una cinética monofásica de orden 1 con respecto a la enzima. Todos estos resultados aportan evidencias en favor de que el grupo SH más reactivo sería el residuo relevante para la actividad enzimática en el sitio activo de la PEPCK. Grupos sulfhidrilos reactivos en PEPCKs serían una característica

común de estas enzimas, ya que han sido detectados en varias PEPCKs monoméricas dependientes de GTP/ITP (Lewis *et al.*, 1989). Sin embargo, existen diferencias entre ellas. La enzima de hígado de pollo posee un SH reactivo funcional cerca pero no en el del sitio de unión de sustratos (Makinen *et al.*, 1989). La enzima de hígado de rata contiene 3 pares de ditioles reactivos (Carlson *et al.*, 1978) y la PEPCK tetramérica de levadura, dependiente de ATP, contiene tanto monotioles reactivos y ditioles vecinos cerca del sitio de unión de sustratos (Cardemil *et al.*, 1990). La PEPCK GTP dependiente monomérica de *P. purpuratus* descrita en este trabajo, poseería un monotiol en el sitio de unión del nucleótido.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- El invertebrado marino *P. purpuratus* presentó mecanismos bioquímicos regulatorios en respuesta a condiciones experimentales de carencia de oxígeno. Mostró un elevado grado de respiración aérea, y un patrón de respuesta de las enzimas PK y PEPCK en tejido muscular, que daría cuenta de mecanismos activos de adaptación metabólica a las condiciones ambientales.
- Se observó que este organismo presenta elevada respiración aérea, estrategia fisiológica que le permitiría en su hábitat regular la utilización de su metabolismo anaeróbico dependiendo de su entorno.
- Se estableció que *P. purpuratus* utiliza la ruta anaeróbica del succinato, en respuesta al grado de disponibilidad de oxígeno.
- La enzima PEPCK de músculo aductor de *P. purpuratus* fue purificada a homogeneidad electroforética. Esta enzima presentó parámetros cinéticos similares a los observados en invertebrados anaerobos facultativos, como moluscos y parásitos como helmintos y especies de *Trypanosoma*, que sustentan un flujo degradativo más que biosintético a través de esta enzima.
- La enzima se inactivó en presencia de DTNB y la titulación de la enzima nativa sugirió la presencia de 3 cisteínas reactivas por mol de enzima. Este número es inferior al determinado para PEPCK gluconeogénicas de vertebrados. Sin embargo, la PEPCK del

bivalvo presentó, al igual que PEPCK de vertebrados superiores, un grupo tiol en el sitio de unión del nucleótido, el que participaría en la catálisis de la enzima.

- Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan para la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) con el propuesto rol de puerta de acceso metabólico a vías anaeróbicas como la del succinato-propionato.

Este trabajo ha pretendido contribuir al conocimiento de las capacidades metabólicas de adaptación ambiental en un organismo, que debido a su hábitat se encuentra expuesto permanentemente a fluctuaciones en factores abióticos y bióticos. Entre las proyecciones del presente trabajo, resulta de gran interés conocer los mecanismos bioquímicos de control metabólico, que en parte constituyen un modelo de lo que sucede en organismos superiores. Sería muy interesante comprender los mecanismos moleculares que controlan la expresión génica de la PEPCK, desde un punto de vista de la bioquímica comparada, como de los mecanismos aún no descritos de control de la expresión de esta enzima en invertebrados. Igualmente resulta de interés caracterizar más en detalle la estructura de esta enzima pues, hasta donde sabemos, no se conoce la estructura tridimensional de alguna PEPCK GDP-dependiente de algún invertebrado marino. Cristalizar esta enzima sería un gran desafío futuro, debido a su muy superior estabilidad frente a la purificación, respecto de las formas de enzima de vertebrados. Esta área experimental tiene promisorios alcances, y sólo recientemente se ha caracterizado la estructura tridimensional de la PEPCK proveniente de un parásito (Trapani *et al.*, 2001), como también de una PEPCK humana (Dunten *et al.*, 2002). Finalmente, este organismo podría constituir un modelo de estudio de los mecanismos moleculares respecto de situaciones fisiopatológicas en organismos superiores, como las patologías metabólicas en las cuales esta enzima podría tener un activo rol.

6. BIBLIOGRAFÍA

Allen-Jennings, A. E., Hartman, M. G., Kociba, G. J. and Hai, T. (2002). The roles of ATF3 in liver dysfunction and the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *J. Biol. Chem.* 277: 20020-20025.

Ballard, F. J. and Hanson, R. W. (1969). Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from the cytosol fraction of rat liver and the immunochemical demonstration of differences between this enzyme and the mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 244: 5625-5630.

Barns, R. J. and Keech, D. B. (1972). Sheep kidney phosphoenolpyruvate carboxylase. Further studies on the sulfhydryl groups using dinitrofluorobenzene and N-ethylmaleimide. *Biochim. Biophys. Acta.* 289: 410-419.

Bayne, B. L. (1976). *Marine mussels: their ecology and physiology*. Cambridge University Press, London. pp. 506.

Beale, E. G., Hammer, R. E., Antoine, B. and Forest, C. (2002). Glyceroneogenesis comes of age. *FASEB J.* 16: 1695-1696.

Bowen, C. (1984). Facultative anaerobiosis in *Haliotis* (ormer/abalone): Pyruvate Kinase and Phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B: 197-200.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.

Brattström, H. (1990). Intertidal ecology of the northern most part of Chilean archipiélago. Report N° 50 of Lund University Chile expeditions 1948-49. *Sarsia* 75: 107-160.

- Brodey, M. M. and Bishop, S. H. (1992). Malic enzyme from ribbed mussel (*Modiolus demissus*) gill tissue mitochondria. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 305-312.
- Brooks, S. and Storey, K. (1990). cGMP-Stimulated protein kinase phosphorylates pyruvate kinase in an anoxia-tolerant marine mollusc. *J. Comp. Physiol.* B160: 309-316.
- Brooks, S. P. J. and Storey, K. B. (1997). Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A: 1103-1114.
- Bücher, T. and Pfeleiderer, G. (1955). Pyruvate kinase from muscle. *In: Methods in Enzymology*, Vol 1, edited by S. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, New York, pp. 435-440.
- Burnell, J. N. (1986). Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase from C4 plants. *Aust. J. Plant. Physiol.* 13: 577-587.
- Cannata, J. J. B. and Stoppani, A. O. M. (1963). Phosphopyruvate carboxylase from Baker's yeast. III. The mechanism of oxaloacetate decarboxylation. *J. Biol. Chem.* 238: 1919-1927.
- Cardemil, E., Encinas, M. V. and Jabalquinto, A. M. (1990). Reactive sulfhydryl groups in *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1040: 71-76.
- Carlson, G. M., Colombo, G. and Lardy, H. H. (1978). A vicinal dithiol containing an essential cysteine in phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine triphosphate) from cytosol of rat liver. *Biochemistry* 17: 5329-5338.
- Carvajal, N., González, R. and Kessi, E. (1990). Tissue-specific regulation of pyruvate kinase during environmental anoxia in *Concholepas concholepas* (Gastropoda: Muricidae). *J. Exp. Zool.* 255: 280-285.

Christ, B., Nath, A., Bastian, H. and Jungermann, K. (1988). Regulation of the expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes by glucagon and insulin. *Eur. J. Biochem.* 178: 373-379.

Colombo, G., Carlson, C. M. and Lardy, H. A. (1978). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine triphosphate) from rat liver cytosol. Separation of homogeneous forms of the enzyme with high and low activity by chromatography on agarose-hexane-guanosine triphosphate. *Biochemistry* 17: 5321-5328.

Colombo, G., Carlson, G. M. and Lardy, H. A. (1981). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (guanosine 5-triphosphate) from rat liver cytosol. Dual-cation requirement for the carboxylation reaction. *Biochemistry* 20: 2749-2757.

Croniger, C. M., Olswang, Y., Reshef, L., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M. and Hanson, R. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase revisited insights into metabolic role. Mini-series: Modern metabolic concepts. *Biochem. Mol. Biol. Edu.* 30: 14-20.

Davies, P. S. (1966). A constant pressure respirometer for medium-sized animals. *Oikos* 17: 108-112.

de Vooy, C. G. N. and Holwerda, D. A. (1986). Anaerobic metabolism in sublittoral living *Mytilus galloprovincialis* Lam. In the Mediterranean-III. The effect of anoxia and osmotic stress on some kinetic parameters of adductor muscle pyruvate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 217-221.

de Vooy, C. G. N. (1987). Adaptation to anaerobic metabolism in two mussel species, *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* from the tidal zone at Arcachon Bay, France. *Neth. J. Sea Res.* 21: 17-23.

de Zwaan, A. (1972). Pyruvate kinase in muscle extracts of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem Physiol.* 42B: 7-14.

de Zwaan, A. and Holwerda, D. A. (1972). The effect of phosphoenolpyruvate, fructose-1,6-diphosphate and pH on allosteric pyruvate kinase in muscle tissue of bivalve *Mytilus edulis* L. *Biochim. Biophys. Acta* 276: 430-433.

de Zwaan, A. and de Bont, A. M. T. (1975). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from the sea mussel *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.* 96: 85-94.

de Zwaan, A. and Wijsman, T. C. M. (1976). Anaerobic metabolism in Bivalvia (Mollusca). Characteristics of anaerobic metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 313-324.

Dunten, P., Belunis, C., Crowther, R., Hollfelder, K., Kammlott, U., Levin, W., Michel, H., Ramsey, G., Swain, A., Weber, D. and Wertheimer S. (2002). Crystal structure of human cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase reveals a new GTP-binding site. *J. Mol. Biol.* 316: 257-264.

Ebberink, R. H. M. and de Zwaan, A. (1980). Control of glycolysis in the posterior adductor muscle of the sea mussel *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.* 137:165-171.

Ellington, W. (1983). The extent of intracellular acidification during anoxia in the catch muscles of two bivalve molluscs. *J. Exp. Zool.* 227: 313-317.

Flores, H. and Alleyne, G. A. O. (1971). P-enolpyruvate carboxykinase of kidney: subcellular distribution and response to acid-base changes. *Biochem. J.* 123: 35-39.

Franckhauser, S., Muñoz, S., Pujol, A., Casellas, A., Riu, E., Otaegui, P., Su, B. and Bosch, F. (2002). Increased fatty-acid re-esterification by PEPCCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. *Diabetes* 51: 624-630.

Gäde, G. and Grieshaber, M. K. (1986). Pyruvate reductases catalyze the formation of lactate and opines in anaerobic invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 255-272.

Gancedo, C. and Schwerzman, K. (1976). Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 109: 221-225.

Gnaiger, E. (1983). Heat dissipation and energetic efficiency in animal anoxibiosis. *J. Exp. Biol.* 228: 471-490.

Hakim, G., Carpené, E., Cortesi, P. And Isani, G. (1985). Regulation by phosphorylation-dephosphorylation of pyruvate kinase in *Venus gallina* and *Scapharca inaequivalvis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: 109-112.

Hammen, C. S. (1969). Metabolism of the oyster, *Crassostrea virginica*. *American Zoologist* 9: 309-318.

Hanson, R.W. and Garber, A. J. (1972). P-enolpyruvate carboxykinase: its role in gluconeogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1010-1021.

Hanson, R. W. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annual Review Biochem.* 66: 581-611.

Harlocker, S. L., Kapper, M.A., Greenwalt, D. E. and Bishop, S.H. (1991). Phosphoenolpyruvate carboxykinase from ribbed mussel gill tissue: Reactivity with metal ions, kinetic and action of 3-Mercaptopicolinic acid. *J. Exp. Zool.* 257: 285-298.

Hebda, C.A. and Nowak, T. (1982, a). Phosphoenolpyruvate carboxykinase. Mn^{2+} and Mn^{2+} substrate complexes. *J. Biol. Chem.* 257: 5515-5522.

Hebda, C. A. and Nowak, T. (1982, b). The purification, characterization and activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase from chicken liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257: 5503-5514.

Hlavaty, J. J. and Nowak, T. (2000). Characterization of the second metal site on avian phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochemistry* 39: 1373-1378.

Hochachka, P. W. and Mustafa, T. (1972). Invertebrate facultative anaerobiosis. *Science* 178: 1056-1060.

Hochachka, P. W. and Somero, G. N. (1984). Limiting oxygen availability. Pp. 145-181. In: P. W. Hochachka and G. N. Somero, eds. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press. Princeton. New Jersey.

Holwerda, D. A. and de Zwaan, A. (1973). Kinetic and molecular characteristics of allosteric Pyruvate Kinase from muscle tissue of the sea mussel *Mytilus edulis* L. *Biochim. Biophys. Acta* 309: 296-306.

Holwerda, D. A., Veldhuizen-Tsoerkan, M., Vaenhof, P. R. and Evers, E. (1989). *In vivo* and *in vitro* studies of the pathway of modification of mussel pyruvate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B: 375-380.

Holyoak, T. and Nowak, T. (2001). Structural investigation of the binding of nucleotide to Phosphoenolpyruvate carboxykinase by NMR. *Biochemistry* 40: 11037-11047.

Jabalquinto, A. M. and Cardemil, E. (1992). The kinetic mechanism of yeast phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1161: 85-90.

Jomain-Baum, M. and Schramm, V. L. (1978). Kinetic mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from rat liver cytosol. Product inhibition isotope exchange at equilibrium, and partial reactions. *J. Biol. Chem.* 253: 3648-3659.

Jurado, L. A., Machin, I. and Urbina, J. A. (1996). *Trypanosoma cruzi* phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP-dependent): transition metal ion requirement for activity and sulfhydryl group reactivity. *Biochim. Biophys. Acta* 1292: 188-196.

Kido, Y., Nakae, J. and Accili, D. (2001). The insulin receptor and its cellular targets (special articles). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 972-979.

Kluytmans, J. H., de Bont, A. M. T., Janus, J. and Wijsman, T. C. M. (1977). Time dependent changes and tissue specificities in the accumulation of anaerobic fermentation products of the sea mussel *Mytilus edulis*. L. *Comp. Biochem. Physiol.* 58B: 81-87.

Kmetec, E. (1966). Spectrophotometric method for the enzymic microdetermination of succinic acid. *Anal. Biochem.* 16: 474-480.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685.

Larade, K. and Storey, K. (2002). A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates. *Cell and Molecular Responses to Stress*. Edited by K. B. Storey and J. M. Storey. Vol. 3: 1-24. Sensing, Signalling and Cell Adaptation. Elsevier Press, Amsterdam.

Lee, M. H., Hebda, C. A. and Nowak, T. (1981). The role of cations in avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase catalysis. Activation and regulation. *J. Biol. Chem.* 256: 12793-12801.

Lewis, C. T., Seyer, J. M. and Carlson, G. M. (1989). Cysteine 288: An essential hyperreactive thiol of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *J. Biol. Chem.* 264: 27-33.

Lewis, C. T., Seyer, J. M., Cassel, R. G. and Carlson, G. M. (1993). Identification of vicinal thiols of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 268: 1628-1636.

Livingstone, D. R. (1983). Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. *J. Geological Society* 140: 27-37.

Makinen, A. L. and Nowak, T. (1989). A reactive cysteine in avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 264: 12148-12157.

Massillon, D., Chen, W., Barzilai, N., Prus-Wertheimer, D., Hawkins, M., Liu, R., Taub, R. and Rossetti, L. (1998). Carbon flux via the pentose phosphate pathway regulates the hepatic expression of the glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase genes in conscious rats. *J. Biol. Chem.* 273: 228-234.

Medina, U. R., Pontarollo, R., Glaeske, D., Tabel, H. and Goldie, H. (1990). Sequence of the *pckA* gene of *Escherichia coli* K-12: relevance to genetic and allosteric regulation and homology of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxykinase with the enzymes from *Trypanosoma brucei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172: 7151-7166.

Müller, M., Müller, H. and Holzer, H. (1981). Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256: 723-727.

Munday, K., Giles, I. and Poat, P. (1980). Review of the comparative biochemistry of pyruvate kinase. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 403-411.

Mustafa, T. and Hochachka, P. W. (1973, a). Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs. II. Basic catalytic properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase in oyster adductor muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 45B: 639-655.

Mustafa, T. and Hochachka, P. W. (1973, b). Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs. 3. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its role in aerobic-anaerobic transition. *Comp. Biochem. Physiol.* 45B: 657-667.

Newell, R. C. (1979). *Biology of intertidal animals*. Marine Ecological Surveys, Faversham. Kent, pp. 757.

Noce, P. S. and Utter, M. F. (1975). Decarboxylation of oxalacetate to pyruvate by purified avian liver phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 250: 9099-9105.

Nordlie, R. C. and Lardy, H. A. (1963). Mammalian liver P-enolpyruvate carboxykinase activities. *J. Biol. Chem.* 238: 2259-2263.

Osteras, M., Finan, M. T. and Stanley, J. (1991). Site-directed mutagenesis and DNA sequence of *pckA* of *Rhizobium* NGR234, encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase: gluconeogenesis and host-dependent symbiotic phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 230: 257-269.

Plaxton, W. and Storey, K. B. (1984). Purification and properties of anaerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from red muscle tissue of the channeled whelk, *Busycotypus canaliculatum*. *Eur. J. Biochem.* 143: 267-272.

Rohrer, S. P., Saz, H.J. and Nowak, T. (1986). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from the parasitic helminth *Ascaris suum*. *J. Biol. Chem.* 261: 13049-130.

Rojas, M. C., Encinas, M. V. and Jabalquinto, A. M. (1991). Fluorescent labeling of the nucleotide site in the cytosolic rat liver phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 286: 441-447.

Rucktäschel, A. K., Granner, D. K. and Christ, B. (2000). Regulation by glucagon (cAMP) and insulin of the promoter of the human phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (cytosolic) in cultured rat hepatocytes and in human hepatoblastoma cells. *Biochem J.* 352: 211-217.

Siau, H. and Ip, Y. K. (1987). Activities of enzymes associated with phosphoenolpyruvate metabolism in the mudskippers, *Boleophthalmus boddarti* and *Periophthalmodon schlosseri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B: 119-125.

Schiedek, D. and Zebe, E. (1987). Functional and environmental anaerobiosis of the razor-clam *Ensis directus* (mollusca: Bivalvia). *Mar. Biol.* 94: 31-37.

Schworer, C. M., Raafat El-Maghrabi, M., Pilkis, S. J. and Soderling, T. R. (1985). Phosphorylation of L-type Pyruvate Kinase by a Ca^{2+} /Calmodulin dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 260: 13018-13022.

Scott, D. K., O'Doherty, R. M., Stafford, J. M., Newgard, C. B. and Granner, D. K. (1998). The repression of hormone-activated PEPCK gene expression by glucose is Insulin-independent but requires glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 273: 24145-24151.

Siegmund, B., Greishaber, M., Reitze, M. and Zebe, E. (1985). Alanopine and strombine are end products of anaerobic glycolysis in the lungworm, *Arenicola marina* L. (Annelida, Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.* 82B: 337-345.

Silverstein, R., Rawitch, A. B. and Grainger, D. A. (1979). Affinity labelling of phosphoenolpyruvate carboxykinase with 1,5-I-AEDANS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87: 911-918.

Simpfendorfer, R. W., Vial, M. V., Nash, D., González, M. L. and López, D. (1994). Pyruvate kinase from the adductor muscle of *Mytilus chilensis*: Specimens obtained from different intertidal levels. *Rev. Biol. Mar.* 29: 113-125.

Simpfendorfer, R. W., Vial, M. V., López, D. A., Verdala, M. and González, M. L. (1995). Relationship between the aerobic and anaerobic metabolic capacities and the vertical distribution of three intertidal sessile invertebrates: *Jehlius cirratus* (Darwin) (Cirripedia), *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) (Bivalvia) and *Mytilus chilensis* (Hupé) (Bivalvia). *Comp. Biochem. Physiol.* 111B: 615-623.

Simpfendörfer, R. W., Vial, M. V., Monsalve, A. and González, M. L. (1997, a). Adductor muscle pyruvate kinase from *Perumytilus purpuratus*: phosphorylated form of the enzyme during the entire tidal cycle. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 32: 117-126.

Simpfendörfer, R. W., Vial, M. V. and Monsalve, A. (1997, b). The adductor muscle pyruvate kinase from intertidal bivalve *Mytilus chilensis* (Hupé): evidence of the presence of a phosphorylated form of the enzyme during the entire tidal cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 231: 169-179.

Simpson, J. W. and Awapara, J. (1966). The pathway of glucose degradation in some invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 18: 537-548.

Söling, H. D. and Kleinicke, T. (1976). Species dependent regulation of hepatic gluconeogenesis in higher animals. In: *Gluconeogenesis: Its regulation in Mammalian Species*. (Edited by Mehlman, M. A. and Hanson, R. W.) pp 369-462. J. Wiley and Sons, New York.

Sommer, J. M., Nguyen, T. T and Wang, C. C. (1984). Phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Trypanosoma brucei* is targeted to the glycosomes by a C-terminal sequence. *FEBS Lett.* 350: 125-129.

Storey, K. (1992). The basis of enzymatic adaptation. In: *Fundamentals of Medical Cell Biology*. (Bittar, E., Ed.), pp. 137-156. JAI Press, Greenwich. C. T.

Tortora, P., Hanozet, G. M. and Guerritore, A. (1985). Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae* and its use for bicarbonate assay. *Anal. Biochem.* 144: 179-185.

Trapani, S., Linss, J., Goldenberg, S., Fischer, H., Craievich, A. and Oliva, G. (2001). Crystal structure of the dimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) from *Trypanosoma cruzi* at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 313: 1059-1072.

Urbina, J. A. (1987). The phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Trypanosoma (Schisotrypanum) cruzi* epimastigotes: molecular, kinetic and regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 258: 186-195.

Urbina, J. A., Machin, I. and Jurado, L. (1993). The limitations of paradigms: Studies on the intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Res.* 26: 81-88.

Utter, M. F. And Kolenbrander, J. M. (1972). Formation of oxaloacetate by CO₂ fixation on phosphoenolpyruvate. In: *The Enzymes*, 3 rd ED., Vol. 6 P.D. Boyer, ed. Academic Press, New York, pp. 136-155.

Vial, M. V., Simpfendorfer, R. W., López, D., González, M. L. and Oelckers, K. (1992). Metabolic responses of the intertidal mussel *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) in emersion and immersion. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 159: 191-201.

Vial, M. V., Oelckers, K., Rojas, M. C. and Simpfendorfer, R. W. (1995). Purification, partial kinetic characterization and reactive sulfhydryl group of the phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Perumytilus purpuratus* adductor muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B: 451-460.

Vial, M. V., López, D.A., Simpfendorfer, R. W. and González, M. L. (1999). Responses to environmental hypoxia of balanomorph barnacles. In: *Barnacle fouling: Ecophysiology and control technology*. Ed. R. Nagabushanam. Oxford & JBH Publishing Co., New Delhi.

Walsh, P., McDonald, D. and Booth, C. (1984). Acid-base balance in the sea mussel, *Mytilus edulis*. II. Effects of hypoxia and air exposure on intracellular acid-base status. *Mar. Biol. Lett.* 5: 359-369.

Waltner-Law, M., Daniels, M. C., Sutherland, C. and Granner, D. K. (2000). NF- κ B glucocorticoid and cAMP-mediated expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J. Biol. Chem.* 275: 31847-31856.

Watford, M. (1989). Hormonal and nutritional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA levels in chicken kidney. *J. Nutr.* 119: 319-322.

Watford, M. and Mapes, R. E. (1990). Hormonal and acid-base regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA levels in rat kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* 282: 399-403.

Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.

Weldon, S. L., Rando, A., Matathias, A. S., Hod, Y., Kalonick, P. A., Savon, S., Cook, J. and Hanson, R. W. (1990). Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase from the chicken. Comparison of the cDNA and protein sequences with cytosolic isozyme. *J. Biol. Chem.* 265: 7308-7317.

Widdows, J., Bayne, B. L., Livingstone, D. R., Newell, R. I. E. and Donkin, P. (1979). Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. *Comp. Biochem. Physiol.* 62A: 301-308.

Widdows, J. and Shick, J. M. (1985). Physiological responses of *Mytilus edulis* and *Cardium edule* to aerial exposure. *Mar. Biol.* 85: 217-232.

Wiese, T. J., Lambeth, D. O. and Ray, P. D. (1991). The intracellular distribution and activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase isozymes in various tissues of several mammals and birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 297-302.

Zammit, V. A. and Newsholme, E. A. (1976). The maximum activities of hexokinase, phosphorylase, phosphofructokinase, glycerol phosphate dehydrogenases, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetate transaminase and arginine kinase in the relation to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates. *Biochem. J.* 160: 447-462.

Zammit, V. A. and Newsholme, E. A. (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. I., Holwerda, D. A., Kluytmans, J. H. and de Zwaan, A. (1986). Metabolic adaptations to environmental anoxia in the sea mussel *Mytilus edulis* (L). *Neth. J. Zool.* 36: 322-343.

Zurburg, W. and Kluytmans, J. H (1980). Organ specific changes in energy metabolism due to anaerobiosis in the sea mussel *Mytilus edulis* (L). *Comp. Biochem. Physiol.* 67B: 317-322.