

Tesis de Posgrado

Estudio de los centros activos de las enzimas fosfoglicerato mutasa y fosfatasa alcalina

Zwaig, Noé

1963

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zwaig, Noé. (1963). Estudio de los centros activos de las enzimas fosfoglicerato mutasa y fosfatasa alcalina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1181_Zwaig.pdf

Cita tipo Chicago:

Zwaig, Noé. "Estudio de los centros activos de las enzimas fosfoglicerato mutasa y fosfatasa alcalina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1181_Zwaig.pdf

UNDA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de los Centros Activos de las Enzimas
Fosfoglicerato Mutasa y Fosfatasa Alcalina

Robé Zwaig

Luis 1184

Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Biológicas

1963

ÍNDICE

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Microbiología bajo la dirección del Dr. César Milstein quien preparo el tema y dirigió todos los pasos del mismo. Deseo por ello expresarle aquí mi más sincero agradecimiento así como también por las provechosas discusiones mantenidas a lo largo de todo el trabajo.

Mi agradecimiento también al Dr. Raúl E. Trucco, Profesor de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haberme permitido consultar esta tesis en su laboratorio y brindarme su decidido apoyo.

Al Dr. Ignacio Pirotsky, ex Director del Instituto Nacional de Microbiología por su constante estímulo concedido a mi trabajo.

A la Lic. Martha Fogelman de Strassny por haberme facilitado fosfoglucomutasa de su preparación y por las determinaciones de actividad de la misma enzima.

Al Dr. Moisés Burachik por las mediciones en la balanza microanalítica.

Al Lic. J. Pablo Bennini por la realización de algunas fotos de radiografías.

Al Dr. Santiago Grisolia por haberme facilitado 2,3-PGA.

A la Sta. Eivira Buono por la confección de las figuras.

Este trabajo contó con la ayuda de un subsidio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

El propósito inicial del presente trabajo consistió en el estudio comparado de secuencias de aminoácidos alrededor del centro activo de diversas enzimas, utilizando para ello técnicas isotópicas del tipo que habían utilizado anteriormente Milstein y Sanger (1961) para el estudio de la secuencia alrededor de la serina activa en la fosfoglicerato mutasa.

Dicho estudio se centró sobre dos enzimas: la fosfoglicerato mutasa de músculo de conejo y la fosfatasa alcalina de *Serratia marcescens*. Se eligieron esas enzimas porque, de acuerdo a lo observado por Pizer (1960) para el caso de la fosfoglicerato mutasa y Engström (1961 a) para la fosfatasa alcalina, ambas enzimas formarían, con el P_i, intermediarios estables. Sin embargo, los intentos que se hicieron en el presente trabajo para aislar una fosfoenzima estable para la fosfoglicerato mutasa de las características informadas por Pizer, no tuvieron éxito. Ello llevó a un estudio más profundo del mecanismo de acción de esa enzima y, al mismo tiempo, se buscó establecer las condiciones para un posterior estudio de la secuencia.

Este trabajo ha sido dividido en dos partes. La Parte I comprende un estudio de la fosfoglicerato mutasa en relación a su mecanismo de actividad catalítica. La Parte II se refiere al estudio comparado de las secuencias de aminoácidos en las fosfatasas alcalinas de *Serratia marcescens* y *Escherichia coli*.

INDICE

Pág.

RESUMEN	1
-------------------	---

PART I

CAPITULO I

1. INTRODUCCION	3
2. PURIFICACION Y CARACTERISTICAS MOLECULARES	5
Purificación	5
Peso molecular	5
Especies moleculares	6
3. ACTIVIDAD CATALITICA	7
Métodos de determinación de actividad	7
pH óptimo de acción	9
Equilibrio de la reacción	10
Efecto de metales	11
Inhibición por el sustrato	12
Otros inhibidores	12
Activación por arseniato	13
Especificidad	14
Acción de fosfatasa	15
4. MECANISMO DE ACCION CATALITICA	16

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

Marcesión de la FGM	22
Determinación de actividad de la FGM	22
Determinación de actividad de la FGM	22
Difusión de proteínas marcadas con ³² P	23

Electroforesis sobre papel	24
Separación de ésteres fosfóricos por electroforesis sobre papel	25
Identificación de ésteres radiactivos	27
Lectura de bandas radiactivas	27
Lectura de radiactividad en líquidos	27
Determinación de fósforo total	28
Hidrólisis ácida parcial	28
Determinación del coeficiente de extinción de la FGAM	28
Armado de columnas de celulosa	30
Precipitación con sulfato de amonio sólido	30
Origen de la FGAM cristalizada	30
Fosforo radiactivo	30
Levadura	31
Reactivos	31
Abreviaturas	31

CAPITULO III

PURIFICACION DE FGAM

Purificación por tratamiento con sulfato de amonio .	32
Purificación por columna	33

CAPITULO IV

PREPARACION Y PURIFICACION DE ³²P - 2,3-FGA DE ALTA ACTIVIDAD ESPECIFICA

A partir de levadura	37
A partir de FDP.	37
A partir de eritrocitos de conejo	38
Reconocimiento del 2,3- ³² FPA	40

CAPITULO V

EXPERIMENTOS

PARA AISLAR UN INTERMEDIARIO FOSFO-ENZIMA EN LA FGAM

Insuación de la FGAM con 2,3- ³² PFA purificado . . .	42
Insuación de la FGAM con hemolizado de eritrocitos	43
Experimentos de intercambio	45
Contaminación de FGM en la FGAM cristalizada	47
Cromatografía de 2,3-PGA y Glc-1,6-P ₂	48

CAPITULO VI

FORMACION DE UN COMPLEJO ESTABLE EN LA REACCION DE LA FGAM.

Insuación de FGAM con 2,3- ³² PFA y tratamiento de la misma a varios valores de pH	50
Formación de un complejo en la insuación de la FGAM con 2,3-PGA	52
Relación molar del complejo	54
Experimentos efectuados para tratar de estabilizar el complejo	57

CAPITULO VII

ACTIVIDAD FOSFATASICA DE LA FOSFOGLICERATO MUTASA

Actividad de fosfatasa por descomposición del complejo	60
Determinación de la vida media del complejo	62

CAPITULO VIII

DISCUSION	65
----------------------------	-----------

PARTE II

CAPITULO I

INTRODUCCION 74

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS 77

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION 84

BIBLIOGRAFIA 88

RESUMEN

En el presente trabajo se estudian algunos métodos de purificación de la fosfoglicerato mirasa.

Se desarrollan métodos para preparar 2,3-PGA radiactivo de alta radiactividad específica y libre de monofosfoglicerato y Glc-1,6-P₂. Para este fin se estudian sistemas de solventes en electroforesis de alto voltaje.

Se reinvestigan las conclusiones de Piner (1960) acerca de la formación de una fosfo-enzima con la fosfoglicerato mirasa y se demuestra que mínimas contaminaciones de fosfoglicocmirasa del orden de 1/200 están presentes en las preparaciones cristalinas de fosfoglicerato mirasa. En las condiciones de trabajo de Piner las preparaciones de 2,3-PGA no están libres de Glc-1,6-P₂. La fosfoproteína que se marcaría en estas condiciones es fosfoglicocmirasa y no fosfoglicerato mirasa como dicho autor sugiere.

La fosfoglicerato mirasa puede aislarse, sin embargo, como una fosfo-proteína. Este complejo se forma entre la enzima y el cofactor y resulta inestable, en particular, en medio ácido.

Se sugiere que el cofactor conserva su estructura original en el complejo pero que se descompone con mucha facilidad para dar ácido monofosfoglicérido y Pi cuando es sometido a electroforesis a varios valores de pH. La proporción en que aparecen dichos productos depende del pH.

Se establece la relación molar del complejo que resulta igual a la unidad.

En solución a pH neutro el complejo resulta inestable y su vida media fué calculada en un valor del orden de las 4 horas. El producto de la descomposición del complejo es Pi y constituye parte de la actividad fosfatásica de la enzima.

Se busca estabilizar el complejo por desnaturalización de la enzima. Los resultados obtenidos permitirían establecer las condiciones en que dicha estabilización tendría lugar.

Todos estos resultados se discuten en función de los posibles mecanismos de actividad de la fosfoglicerato mutasa.

Se estudian comparativamente las secuencias de aminoácidos alrededor de las serinas activas de las fosfatasas alcalinas de *Serratia marcescens* y *Escherichia coli*. Se demuestra la existencia de, al menos, un pentapéptido común a ambas enzimas. También se observan diferencias en la composición de aminoácidos en una zona cercana al pentapéptido referido.

PARTE I

**ESTUDIO DEL CENSO ACTIVO DE LA
ENZIMA FOSFOLICERATO METASA**

CAPITULO I

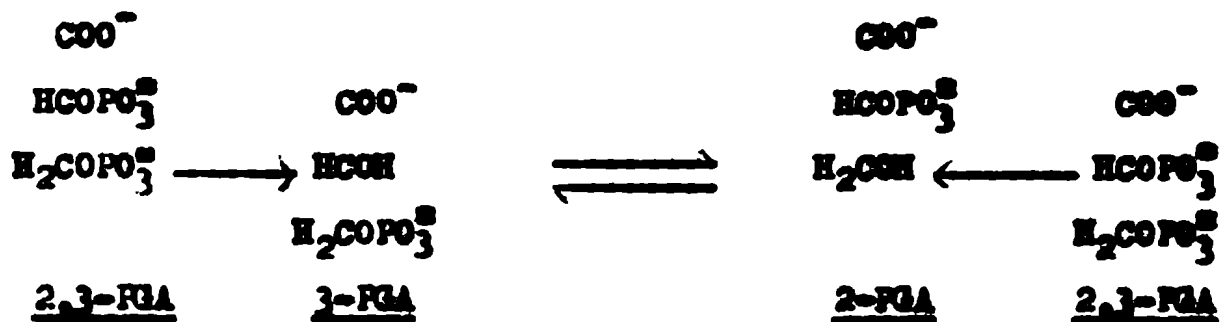
1) INTRODUCCION

La enzima fosfoglicerato mutasa pertenece al sistema glicolítico y cataliza la siguiente reacción:



Fue descrita originalmente por Meyerhof y Kissling en el año 1935, quienes demostraron que sólo los D(-) isómeros del 3-PGA y del 2-PGA actúan como sustratos.

En un principio se creyó que esta enzima, al igual que otras fosfomutasas, catalizaba una reacción intramolecular, es decir, retiraba la transferencia de fosfato de la posición 3 a la posición 2 y vice versa en forma directa, es decir, en la misma molécula, sin intermediario alguno. Sin embargo, más tarde fue demostrada para la fosfoglucomutasa (Leloir et al., 1948) la participación de un cofactor (Glc-1,6-P₂) en el mecanismo de la reacción - Glc-1-P \rightleftharpoons Glc-6-P. Del mismo modo, Sutherland et al (1949) encontraron un cofactor para la fosfoglicerato mutasa, el 2,3-PGA que había sido descubierto en 1925 por Greenwald en eritrocitos de varias especies de mamíferos. Estos autores sugirieron el siguiente esquema para la reacción de esta mutasa:



De esta manera, una molécula de 2,3-PGA vuelve a formarse a partir de cada molécula de sustrato, dejando formado el producto de la reacción al transferir el fosfato.

Se conocen 6 fosforutasas: fosfoglucomutasa, fosfoglicocromutasa, fosforibomutasa, fosfodesoxiribomutasa, fosfoacetilglucosaminamutasa y la difosfoglicocromutasa. Todas ellas tendrían de común el requerimiento de un cofactor para desarrollar su actividad catalítica. Esta tendría lugar según un mecanismo similar al descrito para la PGAM. Dicho cofactor es un difosfato salvo en el caso de la DIFGAM en que es un monofosfato: el 3-PGA. Sin embargo, el requerimiento de cofactor por parte de las mutasas no es general. Así, en el caso de la PGAM aislada a partir de germen de trigo o de arroz desarrollan su máxima actividad catalítica en ausencia de 2,3-PGA (Ito y Grisolia, 1959) Fernández y Grisolia, 1960). Del mismo modo se ha observado actividad de PGAM sin adición de cofactor en extractos de músculo esquelético, de corazón y de pulmón en ratas (Grisolia y Joyce, 1959). Los valores de estas actividades eran de alrededor de 100 veces menor que en presencia de 2,3-PGA. Esto podría interpretarse suponiendo la presencia de moléculas de PGAM que no requieran cofactor (del tipo de las de germen de trigo) como una variedad aberrante de las dependientes. También podría explicarse esta actividad a la luz de los resultados obtenidos en el presente trabajo (Cap. VIII).

En una nota breve, Toune (1960) comunicó la obtención de actividad catalítica en mutasa de levadura sin el agregado de cofactor, después de un período de inmersión de 25 minutos.

La PGAM se halla ampliamente distribuida en la naturaleza.

De los tejidos animales se la ha extraído de músculo, cerebro, páncreas e hígado, tanto de aves como de mamíferos (Grisolia y Joyce, 1959). También se la ha encontrado en vegetales y en microorganismos (bacterias y levadura).

2) PURIFICACION Y CARACTERISTICAS MOLECULARES

a) Purificación:

F₆₂ fue encontrada primeramente en levadura por sus descubridores. Sutherland et al (1949) la purificaron parcialmente de músculo esquelético de conejo. La enzima de este origen fue luego purificada por Cowgill y Pizer (1956) por desnaturalización diferencial por calentamiento a partir de un extracto acuoso y luego por precipitación con sulfato de amonio y alcohol. Finalmente obtuvieron, por electroforesis en almidón, una proteína 90 veces purificada.

La enzima fue recién cristalizada en el año 1956 por Rodwell et al a partir de levadura por desnaturalización diferencial por calor y fraccionamiento con sulfato de amonio, precipitación con acetona y nuevamente sulfato de amonio donde cristalizaba. Más tarde, Pizer y Ballou (1957), empleando las condiciones dadas por Rodwell et al (1956) para la levadura, cristalizaron la enzima de músculo de conejo a partir de una preparación purificada según Cowgill y Pizer (1956). Ultimamente, Cook y Elshar (1960) obtuvieron una enzima cristalizada partiendo de un extracto acuoso de músculo esquelético de conejo después de tres precipitaciones con sulfato de amonio a distintos pHs.

b) Peso Molecular:

El peso molecular de la F₆₂ purificada por Rodwell et al (1957) a partir de músculo de conejo y de actividad

específica comparable a la de levadura cristalizada, fue estudiada por Edelhoch et al (1957) quienes obtuvieron un valor de 64,000 en base a datos de sedimentación y difusión. En la ultracentrífuga la enzima se mostraba homogénea, pero por electroforesis el pico principal solo pesaba un 85 % del total. Por otro lado, Pizer (1960) obtuvo un peso molecular de 57,000 por el método de Archibald (método de aproximación al equilibrio) de la enzima cristalizada de conejo (Pizer y Ballou, 1957).

La mutasa de levadura cristalizada por Redwell et al (1956) fue estudiada por Edelhoch et al (1957) quienes, con datos de sedimentación y difusión, calcularon un peso molecular de 112,000.

Finalmente, los pesos moleculares de las enzimas de germen de trigo y de arroz fueron establecidas por Ito y Grisolia (1959) y por Fernández y Grisolia (1960) en un valor de aproximadamente 30,000. Los cálculos se basaron en la velocidad de sedimentación y por el valor de la actividad catalítica que supusieron a lo sumo igual a las de levadura y misculo.

Es interesante destacar las relaciones simples que se observan en cuanto al valor del peso molecular de las enzimas de diverso origen:

levadura	112.000
misculo	57.000
germen de trigo y arroz	30.000

Sin embargo, Edelhoch et al (1957) descartan la posibilidad de asociación molecular para el caso de la levadura basándose en datos de sedimentación y difusión.

c) Fracciones moleculares:

Edelhoch et al (1957) encontraron, por electroforesis libre, 5 componentes de la PGAM de levadura

cuyas movilidades variaban según una relación aritmética. Más tarde, Chiba y Sugimoto (1959 b) y Chiba et al (1960 e) resolvieron el problema al constatar que las distintas fracciones (ellos encontraron 6 fracciones) provenían de una de ellas por modificación durante la autólisis de la levadura. Estos autores observaron que de las 6 fracciones sólo poseen actividad cinco de ellas pero que esta actividad es inversamente proporcional a su movilidad en electroforesis. Ellos suponen que el aumento de carga se debería a una hidrólisis de enlaces amídicos más que a un contenido diferente de fosfato esterificado como fuera sugerido por Hielboch et al (1957).

3) ACTIVIDAD CATALITICA

a) Métodos de determinación de actividad:

Estos métodos han sido descritos por Sutherland et al (1949) y son de dos tipos :

a) polarimétrico: se basa en el cambio en la rotación óptica cuando el 3-PGA es convertido a 2-PGA e vice versa. En solución neutra de nolibdato, el $[\alpha]_D$ del D-3-PGA es de -74.5° y el del D-2-PGA es de -68° .

b) espectrofotométricos:

1- Se basa en la medida a $340\text{ m}\mu$ de la oxidación del DPNH cuando el 3-PGA pasa a ácido láctico (Fig. 1). Para ello se utiliza una reacción acoplada al 2-PGA, que es el producto de la reacción de la PGAM sobre el 3-PGA, para su conversión a ácido láctico. Este método resulta de utilidad cuando se trata de medir PGAM en extractos crudos. En este caso, la PGAM es limitante de la reacción.

2- Tiene su fundamento en la formación o desaparición de fosfoenol pirúvico en presencia de enzima de enzimas :

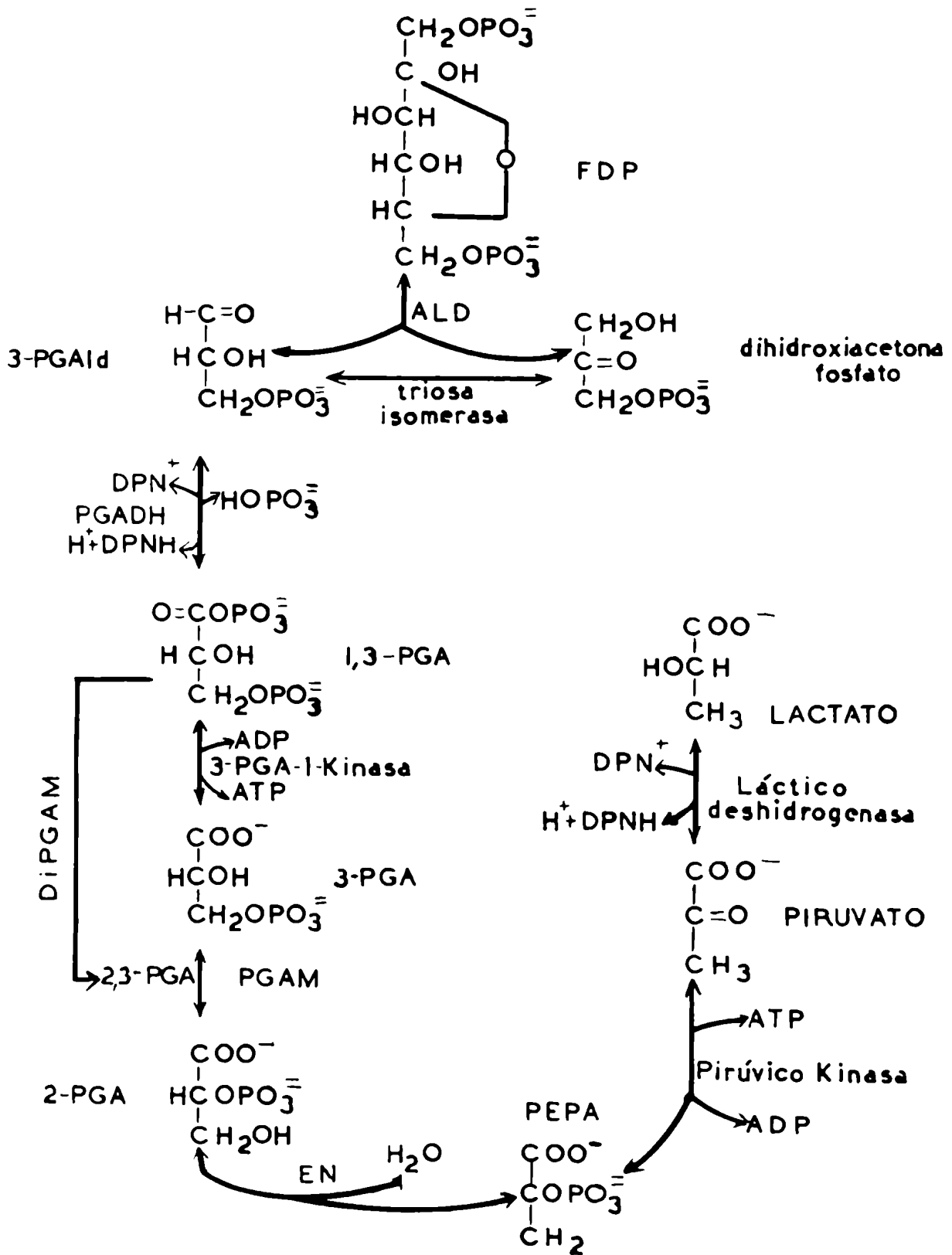


Fig. 1

Esquema parcial del sistema glicolítico.



El aumento de PEPA se sigue en el espectrofotómetro a 240 m μ .

b) pH óptimo de acción:

Robelli et al (1957) observaron que la máxima actividad de la PGAM de levadura tanto en la reacción $3\text{-PGA} \rightarrow 2\text{-PGA}$ como en la inversa tenía lugar a pH 5,9. En cambio, cuando medían la misma mutasa en la reacción $3\text{-PGA} \rightarrow \text{PEPA}$ con exceso de enolasa, la actividad máxima tenía lugar a pH 7,0. Ellos pensaron que este desplazamiento en la actividad de la mutasa sería debido a la influencia de la enolasa ya que su máxima actividad se da a pH 7,3 y a pH 5,9 sólo posee un 35 % de la misma.

Sin embargo, Cook et al (1960) encontraron un óptimo de actividad de la PGAM, preparada a partir de músculo, a pH 7,0 tanto para la reacción $3\text{-PGA} \rightarrow 2\text{-PGA}$ como para $3\text{-PGA} \rightarrow \text{PEPA}$. Según los datos de ambos grupos de investigación, se estaría en presencia de dos mecanismos diferentes para ambas enzimas: la PGAM de levadura y la de músculo. Así, en esta última, a pH 7,0 estaría favorecido el desplazamiento del fosfato en el C₃ del 2,3-PGA (ver más adelante: Mecanismo de Acción). De esa manera, se obtendría una máxima actividad catalítica en la isomerización del 3-PGA. Por otro lado, a pH 5,9 estaría favorecido el desplazamiento del fosfato en el C₂ del cofactor. Entonces se obtendría máxima actividad en la reacción $2\text{-PGA} \rightarrow 3\text{-PGA}$. En el caso de la PGAM de levadura el mayor desplazamiento de ambos fosfatos del 2,3-PGA se daría al mismo pH. Para las mutasas que no requieren de la presencia del 2,3-PGA para desarrollar su actividad catalítica como son los casos de las de germen de trigo y de arroz, el máximo de actividad tiene

lugar al mismo pH (8,9) tanto para la reacción 3-PGA \rightarrow 2-PGA como para la inversa (Ito y Grisolia, 1959; Fernández y Grisolia, 1960).

e) Equilibrio de la reacción:

El equilibrio de la reacción 3-PGA \rightleftharpoons 2-PGA es dependiente de la temperatura. Los valores que se encontraron para el equilibrio 3-PGA / 2-PGA catalizado por la PGM y medidos por polarimetría, resultó ser de 6 a 24° C para la mitasa de músculo (Geyrhofer y Gesper, 1949); de 5 a 37° C también para la enzima de músculo (Cowgill y Piner, 1956) y de 6,3 medido a 30° C para la PGM de levadura. Este último valor apenas acusaba cambios para variaciones de pH entre 4,60 y 6,65 (Rodwell et al, 1957).

Chiba y Sugimoto (1959 a) obtuvieron para la enzima de levadura un Keq de 5,2 medido a 25° C. Usaron 3-PGA como sustrato y midieron polarográficamente. Sus valores son también independientes del pH entre 5,0 y 7,2.

Es interesante notar que el Keq no varía con esas variaciones de pH a pesar de que las constantes de disociación secundaria de los fosfatos son de 7,0 para el 2-PGA y de 6,2 para el 3-PGA (Wold y Ballou, 1957; Johnson, 1960).

Cuando el 2-PGA es calentado a 100°C en presencia de HCl 1 N durante 30 minutos se obtiene, por migración del fosfato un equilibrio del 3-PGA / 2-PGA igual a 4,1 (Ballou y Fischer, 1954).

Rodwell et al (1957) observaron que el número de recambio del 3-PGA en la reacción 3-PGA \rightarrow 2-PGA en función del producto enzima x tiempo, resultaba una reacción lineal sólo hasta la conversión del 2 % del sustrato. En cambio, usando 2-PGA como sustrato,

la función era lineal hasta la transformación del 45 % del valor inicial.

d) Efecto de metales:

A diferencia de otras enzimas que transfieren fosfato no se ha podido probar ningún requerimiento de metales en la actividad catalítica de la PGAM (Covgill y Piser, 1956; Rodwell et al, 1957). Sin embargo, algunos agentes quelantes como oxalato, citrato, etc. a altas concentraciones inhiben la acción enzimática (Chiba y Sugimoto, 1959 a) pero la enzima recupera completamente la actividad por diálisis. De estos resultados los autores nombrados sugieren la posibilidad de que se esté en presencia de una enzima que mantenga un metal unido firmemente a la molécula.

Rodwell et al (1957) observaron inhibición en la actividad de la PGAM por Zn^{++} pero, según ellos, esta inhibición no sería competitiva con el sustrato sino que más bien formaría un complejo $Zn-2PGA$ que actuaría como el verdadero inhibidor dado que con un aumento de sustrato hay un aumento de la inhibición de la actividad de la enzima. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Malastrón en otra enzima: la enolasa. Malastrón (1953) observó que el Zn^{++} a altas concentraciones inhibía la actividad de la enolasa que interpretó como debido a la formación de un complejo inactivo con el 2-PGA. El $Zn-2PGA$ sería un inhibidor específico desde que el Ca^{++} que forma un complejo con el 2-PGA (Wald y Ballou, 1957) similar al del Zn, causa mucha menor inhibición que éste. La posibilidad de que dicho aumento en la inhibición sea debido a la acción competitiva del 2-PGA está descartada en aquel experimento.

También poseen acción inhibitoria el Mg^{++} y el Mn^{++} en forma similar a la del Zn y los siguientes cationes: Ca^{++} , Sr^{++} , Ag^+ , Hg^{++} y Cu^{++} (Covgill y Piser, 1956; Chiba y Sugimoto, 1959 a). El hecho de que el Hg^{++} y el Ag^+ posean fuerte poder inhibitorio (10^{-4} M inhibe el 100 % y el 85 % respectivamente), indicaría la presencia de grupos sulfhidrílicos en el centro catalítico de la enzima. Chiba et al (1960 b) encontraron que la inhibición por Mn en la reacción de la PGAM de levadura, es competitiva para la coenzima.

e) Inhibición por el sustrato:

Redwell et al (1957) observaron el efecto inhibitor del D-2-PGA y del DL-2-PGA sobre la actividad catalítica de la fosfoglicérase mutasa de levadura y de músculo de conejo. Por otro lado, Chiba et al (1960 a) hallaron en PGAM de levadura que el D-2-PGA es un inhibidor competitivo de la coenzima. El sustrato ocuparía el lugar de unión de la enzima con la coenzima, interfiriendo su combinación. El 2-PGA formaría así un complejo inactivo con la PGAM. Como es de esperar, en las mutasas que no requieren del cofactor para su actividad como son los casos de las de germen de trigo y de arroz (Ito y Grisolia, 1959; Fernández y Grisolia, 1960), el 2-PGA no posee poder inhibitor.

f) Otras inhibidoras:

Covgill y Piser (1956) encontraron que el fluoruro inhibe la actividad de la mutasa de músculo pero que dicha inhibición es independiente del agregado de Mg^{++} , contrario a lo que sucede en fosfogluco mutasa en que se formaría un complejo magnesio-fluoruro-fosfato-enzima de carácter inactivo (Hajjar, 1948). Chiba y Sugimoto (1959 a) observaron que en la

inhibición de la FGAM de levadura por fluoruro, cuando se agrega EDTA o citrato en concentraciones más altas que la del fluoruro, la inhibición resulta disminuida. Pero esta protección sólo se opera cuando el agente quelante es agregado antes que la enzima se ponga en contacto con el fluoruro y el sustrato. Parece ser que en presencia del sustrato se formaría un complejo irreversible. Esta acción protectora por parte de los agentes quelantes podría ser debida a la presencia de un metal unido a la enzima, pero no explicaría por qué son necesarias concentraciones mayores de EDTA que de fluoruro para obtener protección. La formación de un complejo EDTA-fluoruro-sustrato que no tendría carácter inhibitor sobre la FGAM ha sido postulada por Piser (1962).

El pirofosfato actúa como inhibidor competitivo de la enzima al igual que el Ba (Chiba et al, 1960 b).

Los reactivos de grupos sulfhidrílicos iodoacetato y p-mercuribenzato, inhiben la actividad enzimática a condición de que se incubados con la enzima antes de agregar el sustrato (Covgill y Piser, 1956). De esta manera, el sustrato protegería a la enzima de la acción de aquellos reactivos.

g) Activación por arseniato:

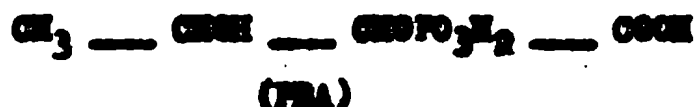
En cuanto a la acción del arseniato, Towns (1960) observó que cuando se agrega en concentraciones de 3×10^{-3} a $1,3 \times 10^{-2}$ M produce una activación de la FGAM de levadura y de músculo y acorta el período de 25 minutos que requiere la enzima para comenzar a actuar en ausencia de 2,3-PGA. Este efecto activador no se observa en FGAM de germen de trigo. Por otro lado, concentraciones de arseniato de $3,3 \times 10^{-2}$ M inhiben a la enzima.

h) Especificidad:

Govgill y Piser (1956) estudiaron el efecto inhibitor de compuestos relacionados estructuralmente con el sustrato en la reacción catalizada por la PGAM de músculo. Encontraron que para que la inhibición se produzca es necesaria la presencia de un grupo carboxílico terminal y un grupo fosfato esterificado o hidroxilo libre en el carbono 2. Entonces los requerimientos estructurales mínimos para producir inhibición son :



Es decir, se requiere que los carbonos 1 y 2 posean la estructura del 2-PGA o del 3-PGA. A la misma conclusión llegaron Chiba y Sugimoto (1959 a). Estos autores sugirieron que la inhibición por PEPA que posee la estructura exigida, puede ser competitiva. Piser y Ballou (1957) observaron que el ácido fosforil - β - cistiro dihidroxibutírico (PBA) funciona como sustrato para la PGAM:



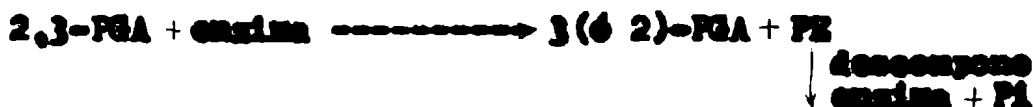
El PBA acepta un fosfato del 2,3-PGA produciendo simultáneamente una mezcla de 2-PGA y 3-PGA. De esta manera el PBA pasa a DPBA que puede reemplazar al 2,3-PGA como activador en la reacción catalizada por la PGAM, aunque con sólo 1/10 de su actividad. Posteriormente, estos autores (Piser y Ballou, 1959) continuaron estudiando la especificidad de la PGAM de músculo para lo cual probaron una serie de compuestos relacionados estructuralmente con los sustratos naturales. Esos compuestos análogos funcionan como aceptores

de fosfato provenientes del 2,3-PGA si reúnen los siguientes requerimientos:

- a) El carbono 1 debe poseer una carga negativa (carboxilo, sulfonilo).
- b) Los carbonos 2 y 3 deben poseer hidroxilos que pueden tomar una configuración citro, debiendo estar esterificado con fosfato uno de ellos. Los requerimientos para actuar como donador de fosfato son los mismos pero ambos hidroxilos deben estar esterificados con fosfato (en 2 y 3). El único que actuaba era el DPBA.

1) Acción de fosfatasa:

Redwell et al (1977) observaron que cuando se incubaba PGAM de levadura con 2,3-PGA, se obtiene P1 y 3 (ó 2)-PGA. Pensaron que este resultado podía explicarse de dos modos diferentes: a) por la presencia de una contaminación de 2,3-PGA fosfatasa o b) por un mecanismo de descomposición espontánea con formación de un intermediario fosfo-enzima (PE):



Para obtener una respuesta a esta disyuntiva midieron la relación de las actividades de mutasa y de fosfatasa a través de la purificación de PGAM. Observaron así que la actividad de mutasa incrementaba en un valor de 25 veces respecto a la fosfatasa desde el extracto crudo hasta la segunda cristalización. Ello hizo pensar que ambas actividades eran desarrolladas por enzimas diferentes. Sin embargo, Joyce y Grisolia (1978) observaron que en la purificación de 2,3-PGA fosfatasa de levadura la relación de actividades de la mutasa respecto de la fosfatasa se mantenía muy constante.

En consecuencia, al no poder separar ambas actividades es posible pensar que sean producidas por la misma proteína. En la misma dirección apuntan los resultados de Chiba citados por Pizer (1962) como comunicación personal. Dicho autor encuentra que, cuando se separan los diferentes componentes de la FGAM de levadura por electroforesis (ver más arriba) la actividad de 2,3-PGA fosfatasa es la misma en todos los componentes así como también en la enzima sin fraccionar. Estos componentes poseen diferente actividad específica para mutasa pero el mismo Km para el 2,3-PGA. Esto son - acordaría con la suposición de que ambas actividades, la de mutasa y la de fosfatasa se encuentran en la misma molécula.

Por otro lado, Rapoport y Luebering (1951) informaron haber obtenido una preparación de 2,3-PGA fosfatasa que no poseía actividad de mutasa. En el mismo trabajo, Rapoport y Luebering observaron algunas propiedades de la 2,3-PGA fosfatasa que difieren de otras fosfatasas como son la inhibición por 3-PGA pero no por Pi.

Con los datos de que se dispone hasta el momento es imposible sacar alguna conclusión definitiva sobre este problema. Sin embargo, es posible que ambos: fosfatasa específica para 2,3-PGA y ligera actividad de fosfatasa por parte de la FGAM representen una probable alternativa teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis.

4) MECANISMO DE LA ACCIÓN CATALÍTICA

La actividad de la FGAM, como se dijo más arriba, presupone la presencia del 2,3-PGA para las enzimas de origen animal e microbiano. Esto fue demostrado por Sutherland et al (1949) quienes observaron que, cuando se incubaba 3-³²P-GA con 2,3-PGA en presencia de

PGAM, se obtiene un equilibrio del 3^2P entre el sustrato y el cofactor. Esto indica que la isomerización del 3-PGA se lleva a cabo intermolecularmente. Un fosfato del 2,3-PGA pasaría directamente al 3-PGA (ó al 2-PGA) para formar otra molécula de cofactor más una del otro monofosfato (ecuación 1), o a través de la formación de un complejo intermediario del tipo enzima-fosfato (ecuación 2).



Estos dos mecanismos son denominados (Koshland, 1959) "mecanismo de simple desplazamiento" el primero y "mecanismo de doble desplazamiento" el segundo. Según este autor, en las enzimas de transferencia habría zonas que poseerían especificidad para los sustratos así como también para el grupo transferido (fosfato en el caso aquí tratado).

Los estudios realizados para demostrar la presencia de una fosfo-enzima en la PGAM del tipo observado en la PGAM (Anderson y Jolles, 1957) son poco convincentes. Así, Pizer (1960) describió la formación de una fosfo-enzima para la PGAM de músculo que resultaba estable al tratamiento con sulfato de amonio y el aislamiento de SerP como producto de una hidrólisis ácida parcial. Sin embargo, Grisolia et al (1961) pusieron en duda los resultados de Pizer. Ellos describen también la formación de una fosfo-enzima pero encuentran que es inestable al tratamiento con sulfato de amonio. En una comunicación posterior Pizer (1962) pone en tela de juicio sus anteriores resultados, no descartando la posibilidad de una contaminación de PGM en su preparación de PGAM que sería la responsable de los resultados obtenidos.

Hay varios mecanismos propuestos para explicar la actividad catalítica de la PGAM. Grisolia y Joyce (1959) elaboraron uno que se basa en la suposición de que el centro activo estaría formado por tres puntos de enlace que formarían entre sí un triángulo equilátero (Fig.2)

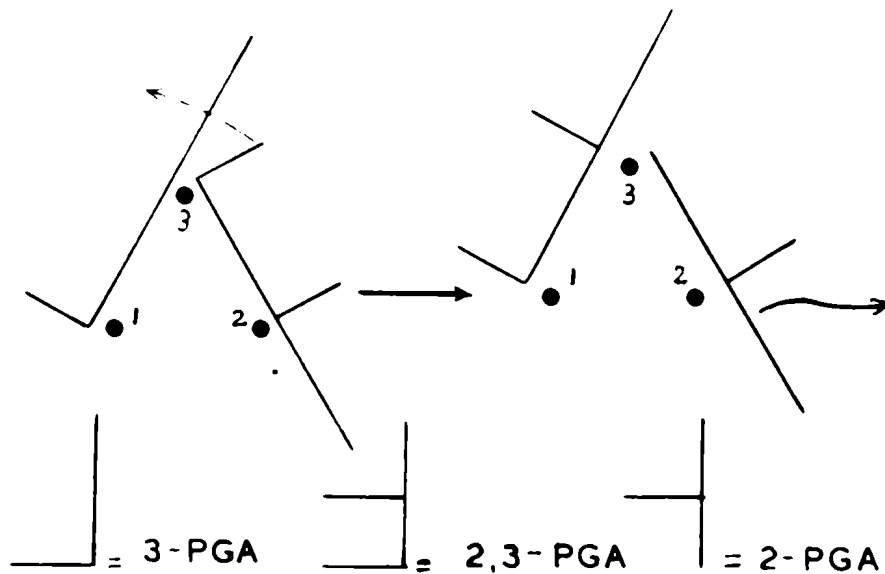


Fig. 2

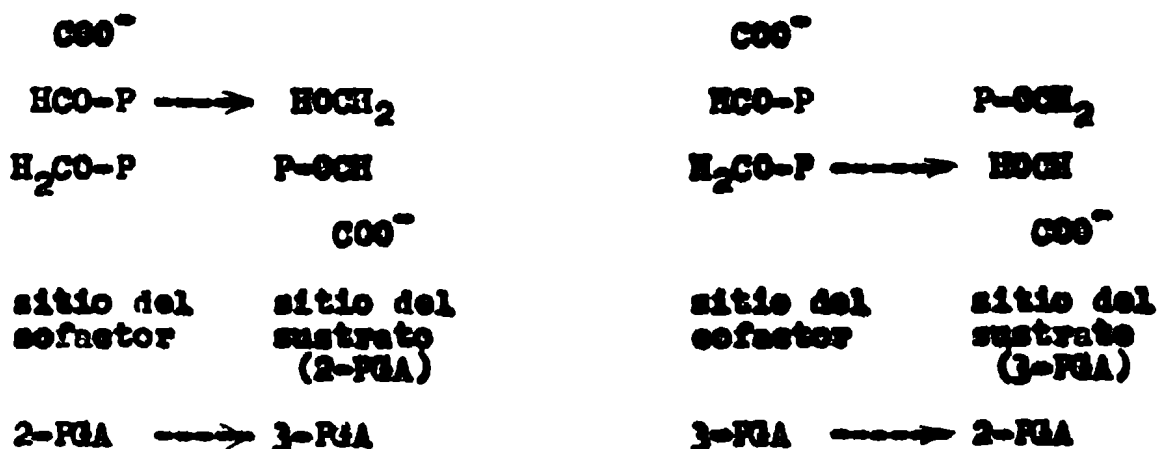
Modelo de mecanismo de acción de la PGAM propuesto por Joyce y Grisolia (1959). El 2,3-PGA cede un fosfato al 3-PGA, determinando la formación de otra molécula de cofactor. El 2-PGA formado se disocia (derecha).

El 2,3-PGA tendría una posición tal que sus fosfatos ocuparían los puntos 2 y 3 de la figura. El punto 1 estaría ocupado por el fosfato del 3-PGA. Como puede apreciarse en la figura, después

de la interacción, el nuevo 2,3-PGA formado ocuparía la posición 1,3 y el fosfato del 2-PGA formado ocuparía el lugar 2. El 2-PGA se disociaría y una nueva molécula de 3-PGA ocuparía en posición. La reacción inversa daría lugar a la isomerización del 2-PGA. Por otro lado, la enzima de germen de trigo o de arroz que no requieren cofactor, poseerían, según los mismos autores, un sistema de tres puntos de unión pero, por problemas de orden espacial, el 2,3-PGA no se adaptaría. En este caso sólo los monofosfatos se unirían con probable migración de fosfato de molécula a molécula.

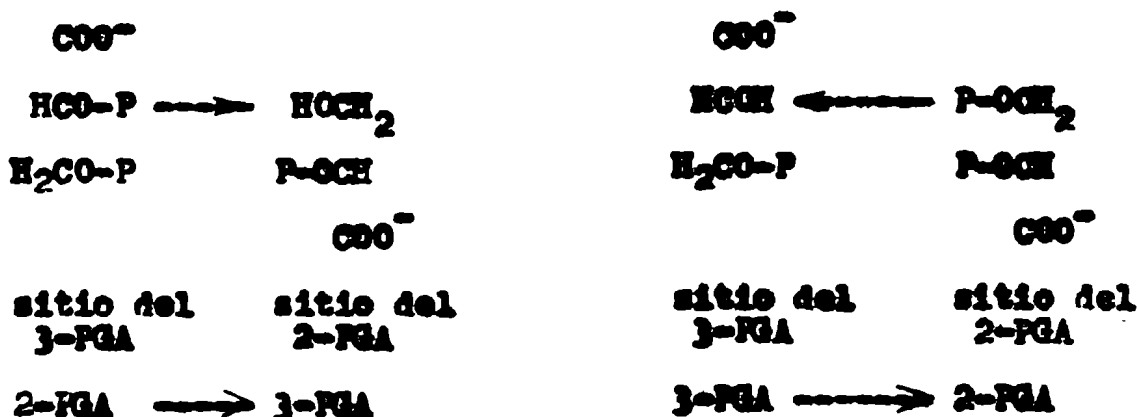
Pizer (1962), sin dar razones experimentales que invaliden sus propios resultados (Pizer, 1960), sugirió mecanismos de simple desplazamiento en los que, tanto el sustrato como el cofactor debían estar simultáneamente en el centro activo de la enzima, produciendo la transferencia sin la participación de una fosfoenzima intermediaria.

Mecanismo I: El cofactor se uniría específicamente a un solo sitio de la enzima y uno cualquiera de los monofosfatos se uniría al otro sitio. Un fosfato del 2,3-PGA pasaría al otro sitio y formaría una nueva molécula de cofactor al unirse al monofosfato. La molécula de 2,3-PGA así formada se disociaría inmediatamente. Además, el monofosfato podría unirse indistintamente a ambos sitios y causar inhibición. El fosfato transferido según este mecanismo estaría determinado por el hidroxilo aceptor.



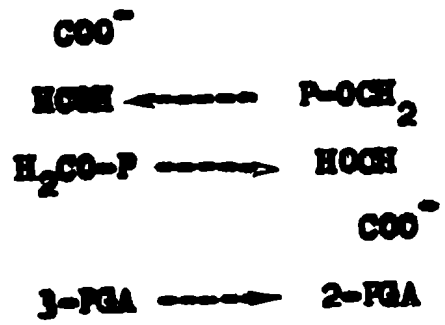
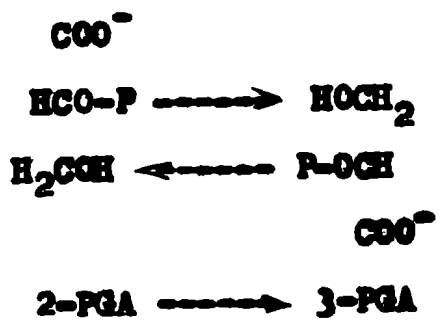
MECANISMO I

Mecanismo II: El cofactor se uniría a cualquiera de los dos sitios pero no al mismo tiempo. Los monofosfatos se unirían, cada uno a un sitio, pero si ambos monofosfatos ocupan sus sitios simultáneamente producen inhibición. Por este mecanismo se transferiría sólo uno de los fosfatos del cofactor, dependiendo del sitio que ocupe.



MECANISMO III

Mecanismo III: Este modelo tiene en cuenta el caso de las enzimas que no requieren 2,3-PGA para desarrollar su actividad. Es similar al de Grisolia y Joyce (1959): dos moléculas del mismo monofosfato transferirían simultáneamente sus fosfatos dando lugar a dos moléculas del isómero.



MECANISMO III

C A P I T U L O I IMATERIALES Y METODOS

Marasación de la PFM. La enzima fué purificada a partir de músculo de conejo por la Lic. Martha Fegelman de Strasney según el método de Najjar (1948). Se dializaron 5 mg de la enzima contra agua destilada primero y luego contra una mezcla de histidina 0,04 M pH 7,5 y SO_4Mg 2,5 mM. La marasación fué hecha según Milstein y Sanger (1961). La mutasa se incubó con 1 ml de almidón 2,5 %, 0,020 ml de fosfato de sodio 0,05 M pH 7,0 0,1 ml de Tris 0,1 M pH 7,0 1 mC de ^{32}P y 0,3 ml de extracto de papa como fuente de fosforilasa. La mezcla fué mantenida durante la noche a temperatura ambiente y luego dializada exhaustivamente contra agua destilada.

Determinación de actividad de la PFM. La actividad catalítica de la mutasa fué determinada por el método de Sutherland et al. (1949) en un espectrofotómetro Beckman DU. Se consideró como una unidad a la cantidad de enzima que produce un cambio de densidad óptica de 0,010 en un minuto a 240 mμ en las siguientes condiciones de ensayo : 0,3 ml de Cl_2Mg 5×10^{-2} M; 1 ml de histidina 0,1 M pH 7,0; 0,3 ml de 3-PGA 2×10^{-2} M; 1,36 ml de agua; 0,020 ml de emulasa cristalizada 1 mg/ml; 0,020 ml de fracción que contenía PFM. Para agregar la muestra a medir se construyó un mezclador que consistía en una varilla de vidrio con una pequeña placa de acrílico en uno de sus extremos, y de la medida de la sección de una cubeta del espectrofotómetro. Los lados de la placa tenían forma de media luna para facilitar, de ese modo, la mezcla.

Determinación de actividad de la PFM: La actividad de la fosfoglucomutasa fué obtenida según el método de Najjar (1948).

Díálisis de proteínas marcadas con ^{32}P : Las proteínas marcadas radiactivamente fueron sometidas a díálisis intensa contra agua destilada a 4°C para quitar los restos de ^{32}P unidos inespecíficamente. Para ello se utilizó un vaso de precipitación al que se le unió un sifón (Fig. 3).

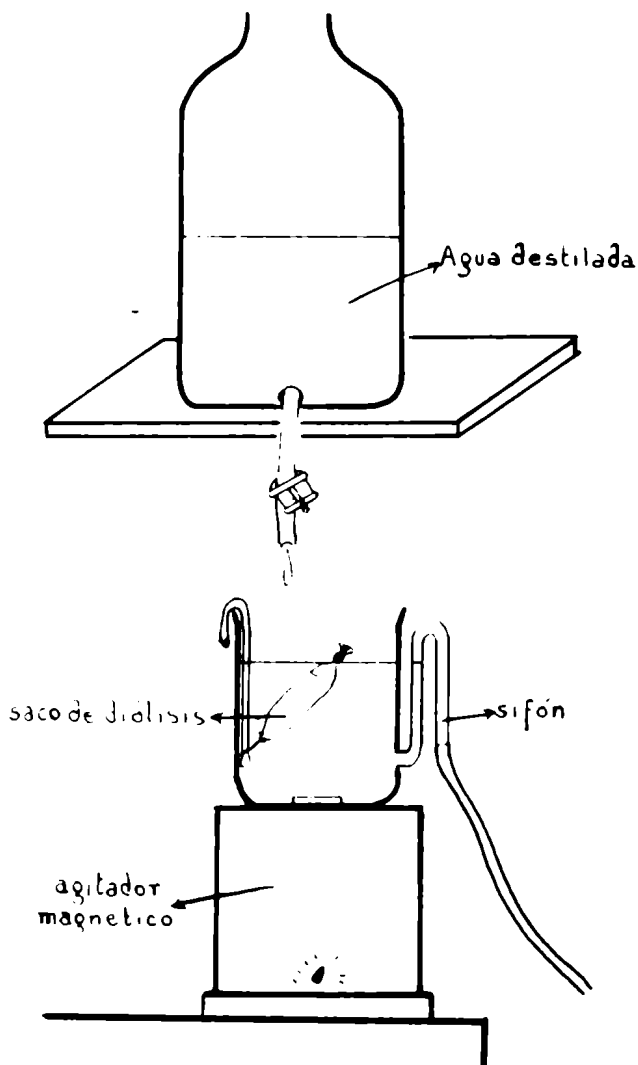


Fig. 3

Aparato para díálisis continua. Este tiene especial aplicación cuando se desea obtener una díálisis exhaustiva durante la noche ya que trabaja en forma automática. La burbuja encerrada en el saco de díálisis produce, con el movimiento del nivel del vaso por el sifoneo, una intensa mezcla de su contenido.

El saco de díálisis quedaba fijo en uno de sus extremos a la altura de la mitad del recipiente. De esa manera, el líquido dentro del saco de díálisis se mezclaba al ser sometido a un movimiento ascendente y descendente con el llenado y el vaciado del vaso.

El líquido del recipiente era mezclado con un agitador magnético. Este sistema resultaba de suma utilidad cuando se dejaba funcionando durante la noche. En efecto, por ese método, con 9 l de agua, se obtenía por la mañana una diálisis exhaustiva.

Electroforesis sobre papel: a) Papel utilizado: El papel que se utilizó a lo largo del trabajo fue el Whatman 3 MM salvo cuando se indica lo contrario. Se usó sin previo tratamiento. En los casos en que se usó papel Whatman N° 1, éste fue lavado previamente con solución saturada de ácido oxálico. Las hojas eran dejadas en esa solución durante la noche y luego lavadas con abundante agua destilada hasta que no daban reacción con Cl_2Ca .

b) Sembrado de las muestras sobre papel y mojado del mismo: El material a correr se sembraba a 10 cm del borde inferior de la hoja en un ancho de 2 cm. A fin de poder seguir visualmente la corrida, se sembraba sobre el origen y a un costado de la hoja, una mancha de colores. Además los colores servían de puntos de referencia para ubicar los distintos compuestos separados sobre el papel (Milstein y Sanger, 1961). El papel se colocaba sobre una plancha de vidrio y la zona correspondiente al origen se levantaba, colocando a tal efecto dos varillas de vidrio por debajo del papel y en forma equidistante del origen. El papel era mojado con el buffer por medio de una pipeta, cuidando que el líquido llegara simultáneamente al origen desde ambos lados. De esa manera se conseguía concentrar el material sembrado.

c) Aparato de electroforesis: Las cubas eran de acrílico lo mismo que el caballete cruzado de hilos

de nylon sobre los que iba montada la hoja de papel. Se usó varsool como refrigerante. El potencial aplicado era de 32 V/cm cuando se usó Whatman 3 MI y 25 V/cm sobre papel Whatman N° 1.

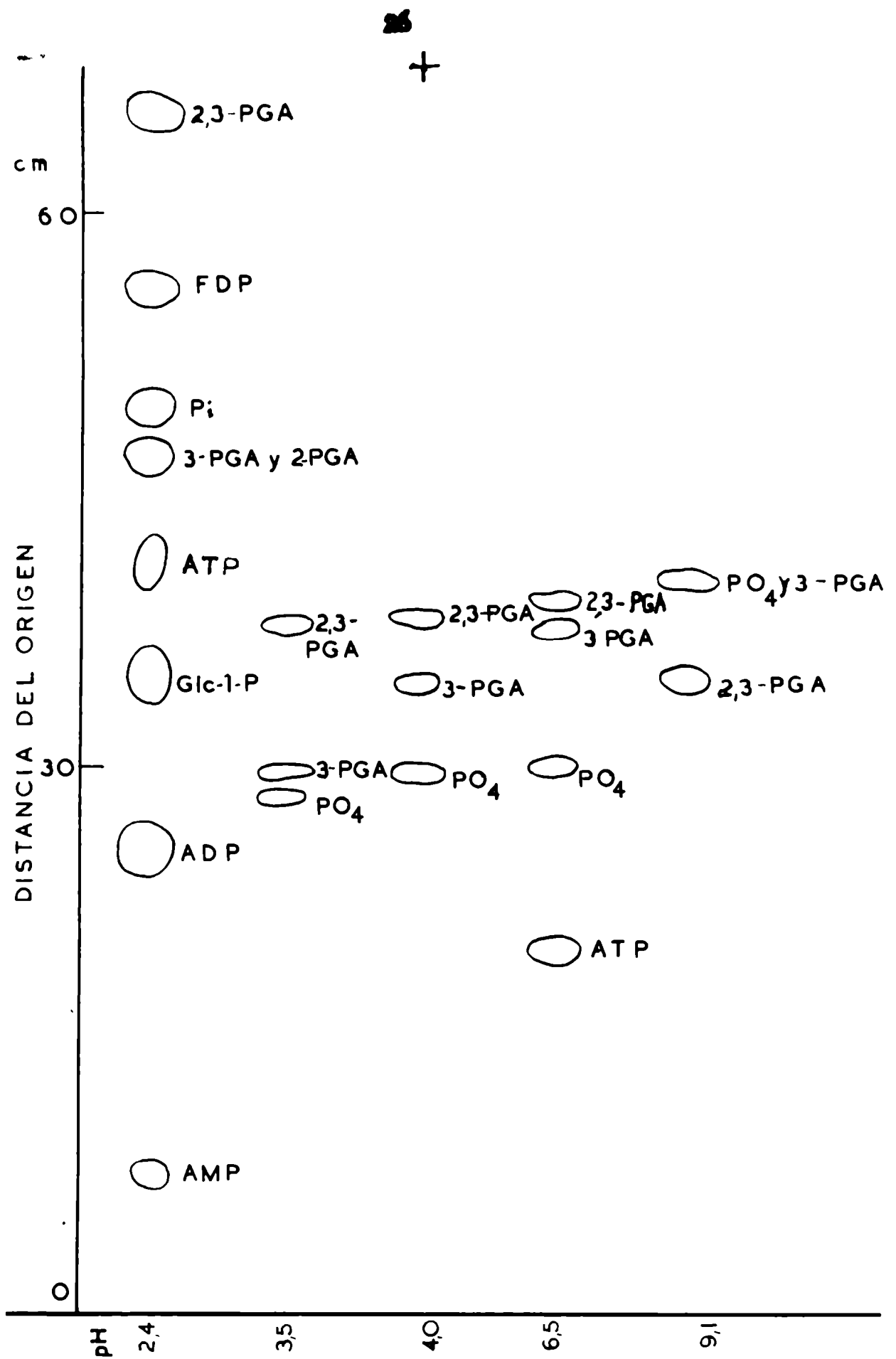
d) Radioautografía de la corrida: Al término de la corrida el papel era secado con aire caliente. Se colocaba en una carpeta con dos placas radiográficas (una de cada lado de la hoja y se guardaba en un cajón oscuro, el tiempo necesario de acuerdo a la radiactividad de las manchas.) Las carpetas tenían la tapa inferior de plomo para evitar la contaminación sobre otras placas que podían ponerse simultáneamente en el cajón. Antes de poner el papel junto a las placas, se marcaba el mismo con algunos puntos de referencia con tinta a la que se había agregado fósforo radiactivo. De esa manera se podía, luego de revelada la placa, encontrarse la misma y delimitar las manchas sobre el papel.

Separación de ésteres fosfóricos por electroforesis sobre papel:

Se utilizaron los siguientes sistemas:

- a) Piridina-acético-agua (1:10:109) - pH 3,5 (Haughton et al., 1960).
- b) " " " (10:0,4:90) - pH 6,5 (" " ").
- c) " " " - pH 4,0 Llevando a pH con piridina el sistema a).
- d) Carbonato de amonio-agua (10:90) - pH 9,1
- e) Acido fórmico-piridina-agua (3:0,5:96,5) - pH 2,4

La Fig. 4 representa la posición de los ésteres fosfóricos probados en los distintos sistemas mencionados. A pH 2,4 se usó papel Whatman N° 1. Se hicieron dos hojas para darle mayor longitud (1 m).



Ubicación de ésteres fosfóricos sometidos a electroforesis sobre papel a distintos pHs.

Identificación de ésteres radiactivos: Los ésteres radiactivos separados por electroforesis sobre papel eran identificados de la siguiente manera :

Las bandas problema sobre el papel eran recortadas, divididas en dos y cocidas sobre otras tantas hojas de papel Whatman 3 MM. Se sembraba sobre los recortes (uniformemente en toda su superficie) una solución testigo del posible éster. El material era entonces corrido en la forma habitual en electroforesis a μ s 3,5 y 6,5, secado y radiografiado. Los papeles eran después tratados con una solución ácida de molibdato de amonio y luego calentados a aproximadamente 85° C para hidrolizar los ésteres (Hanes y Isherwood, 1949). En estas condiciones el ortofosfórico libre forma un complejo fosfo-molibdato que es reducido por acción de la luz ultravioleta a la que eran sometidos los papeles, dando un color azul intenso correspondiente a azul de molibdeno (Banduraki y Anselrod, 1951). Las dos manchas (la de las placas radiográficas y la revelada con el reactivo de molibdato) se consideraban idénticas si se superponían exactamente a los dos μ s.

Lectura de bandas radiactivas: Las bandas radiactivas sobre el papel eran recortadas y leídas en un escalímetro "Nuclear Chicago" Modelo 181 B. En general se contaban 1.000 cuentas salvo en los casos en que las bandas tenían más de 5.000 cuentas. En esos casos se contaban 10.000 cuentas.

Lectura de radiactividad en líquidos: Para conocer la radiactividad de una solución se llevaba una alícuota sobre una plancheta, se secaba por medio de una lámpara de rayos infrarrojos y se contaba en el escalímetro.

Determinación de fósforo total: Se utilizó el método de Fiske - SubbaRow (1925) modificado por Bartlett (1959) para medir cantidades menores de fósforo. Las muestras que contenían menos de 10 µg de fósforo se colocaban en un tubo de ensayo y se agregaba 0,020 ml de solución de nitrato de Mg 0,2 M. Se llevaba a sequedad en una estufa y luego se calentaba al rojo vivo en un mechero durante 1 minuto. Se hacía la reacción de Fiske-SubbaRow y luego se calentaba a baño maría hirviendo durante 7 minutos. Las lecturas se hacían en un espectrofotómetro Beckman DU a 830 mµ. En esas condiciones 1 µg de P daba una lectura de ,165.

Hidrólisis ácida parcial: La hidrólisis ácida parcial de la proteína marcada fue hecha en pequeños tubos. Al material dializado conteniendo de 1 a 2 mg de proteína y con una radiactividad entre 5×10^4 y 10^5 cpm de ^{32}P , se lo secaba en un desecador que contenía SO_2 y H₂K. Se le agregaban 0,2 ml de HCl 5,7 N y se calentaba en baño maría a ebullición durante 30 minutos. Se evitaba la evaporación por medio de un globito de vidrio puesto a modo de tapa. El material, una vez hidrolizado, se secaba en un desecador. Luego se agregaba agua y se volvía a secar para eliminar los restos de HCl. Esta operación se repetía dos veces. La proteína hidrolizada, una vez seca, estaba lista para ser sometida a electroforesis sobre papel para separar los distintos péptidos.

Determinación del coeficiente de extinción de la PGM: Se dializaron exhaustivamente contra agua destilada 4 mg de enzima contenidos en 1 ml de solución y luego se los centrifugó en una centrifuga Servall refrigerada a 14,000 rpm. Se tomaron 2 alícuotas de 0,200 ml sobre sondas cápsulas de vidrio previamente taradas y se

las secó primero, hasta sequedad aparente, con lámpara de rayos infrarrojos y luego al vacío a 100° C. Las pesadas fueron efectuadas en una balanza microanalítica Mettler. Se utilizó como blanco dos alícuotas de igual volumen que fueron tomadas del líquido dializado y sometidas a igual tratamiento. Otra alícuota de 0,4 ml fué diluida en 3 ml y leída su densidad óptica en un espectrofotómetro Beckman DK2-A con registrador automático para distintas longitudes de onda y utilizando una celda de 1 cm de paso de luz. (Fig. 5)

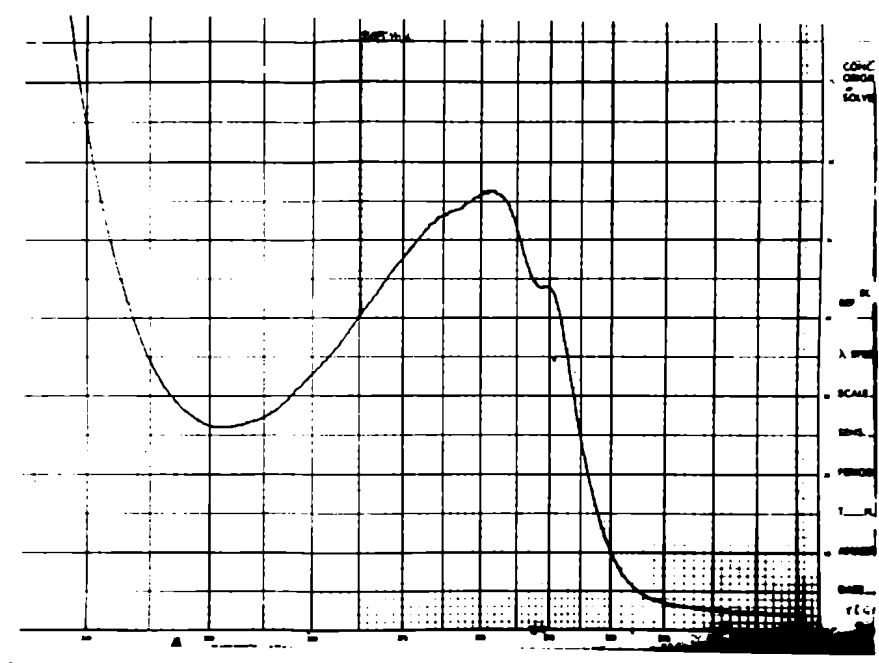


Fig. 5
Espectro de absorción de la FGAN.

Resultados:

	Base mg	Extracción mg	Diferencia mg
muestra	702	70.2	
	702		
blanco	$\frac{35}{24}$	30	672

La D.O. de 134 mg de proteína en 3 ml de agua a 280 m μ fue de .560. El coeficiente de extinción E 280 m μ resulta entonces

$$E, 1 \text{ cm. } (280 \text{ m}\mu) = \frac{D.O.}{c} = \frac{.560}{\frac{134 \text{ mg}}{3 \text{ ml}}}$$

$$E, 1 \text{ cm. } (280 \text{ m}\mu) = 1.25$$

Armadura de columnas de celulosa: Los dos tipos de celulosa usadas, CMC y DEAE Celulosa, fueron llevadas a pH con tris 0,1 M, armadas en columnas de 10 x 1 cm y equilibradas con 500 ml de tris 0,01 M al pH correspondiente.

Presipitación con sulfato de amonio sólido: Se construyó un aparato según el modelo de Becker y Schroeder (1958) con algunas modificaciones. Consistía en un depósito de acrílico para el sulfato de amonio con una abertura en su parte inferior desde la cual se prolongaba un caño del mismo material por donde debía salir la sal. Para ello, el caño era golpeado intermitentemente por una varilla accionada por una bobina de inmersión. Para que el flujo de la sal fuera homogéneo, la sal debía estar bien seca y finamente molido.

Origen de la RNAM cristalizada: La enzima fue adquirida en "Boehringer & Soehne" como solución de sulfato de amonio 2,6 M pH aproximadamente 6 y purificada a partir de músculo de conejo. Era dializada antes de usar contra 1 lt. de agua destilada a 4°C durante 5 hs y luego se congelaba hasta su uso. La enzima se diluía en buffer Tris mM pH 7,0.

Etiquetado radiactivo: Fue adquirido en la Comisión Nacional de Energía Atómica como solución clorhidrica de ortofosfato de sodio libre de portador.

Levadura: Fue adquirida en la "Fábrica Argentina de Levadura" como levadura libre de almidón.

Reactivos: F-1, 6-DP; DPN; EN; ALD y PGAM fueron adquiridos en Boehringer & Soehne. CMC y DEAE celulosa de "Serva". Dowex 90 de Bio Rad Laboratories. Sulfato de amonio y EDTA de "Merck". Sulfato de amonio de "Analar"; 3-PGA y Glc-1-P de "Nutritional Biochemicals Corporation". 2,3-PGA facilitado por el Dr. S. Grisolia. Tris de "Sigma".

Abreviaturas: PGAM - fosfoglicerato mutasa; PGM - fosfoglicocmutasa; EN - enolasa; PGAMH - 3-fosfogliceraldehído deshidrogenasa; ALD - aldolasa; DiPGAM - difosfoglicerato mutasa; 2,3-PGA - 2,3-difosfoglicerato; 3-PGA - 3-fosfoglicerato; 2-PGA - 2-fosfoglicerato; 1,3-PGA - 1,3 difosfoglicerato; Glc-1,6-P₂ - glicosa 1,6 difosfato; F-1, 6-DP - fructosa 1,6 difosfato; PEPa - fosfoenol piruvato; Glc-1-P - glicosa 1 fosfato; Glc-6-P - glicosa 6 fosfato; DPN - difosfopiridina nucleótido; EDTA - ácido etilendiaminotetracético; Tris - (hidroximetil) aminometano; CMC - carboximetilcelulosa; DEAE celulosa - dietilaminoetil celulosa; cpm - cuentas por minuto; mC-nilaurio; mC - microcurie; Pi - ortofosfato; 3-PGald - 3 fosfogliceraldehído; SerP - serina fosfato.

C A P Í T U L O X I IPURIFICACION DE PGAM

1) Purificación por tratamiento con sulfato de amonio: Se purificó la PGAM a partir de músculo esquelético de conejo según el método de Cook y Bisher (1960). Todas las operaciones fueron realizadas a 4° C. En una preparación tipo se partió de 200 g de músculo. El conejo fue matado por golpe en la nuca y desangrado por decapitación. El músculo esquelético fue separado y pasado por una máquina de picar carne. Luego se le agregaron 400 ml de EDTA 1,3 M pH 6,1 (200 ml/100 g de músculo). Se agitó a alta velocidad en una licuadora durante 1 minuto y se centrifugó 1/2 h a 2.000 rpm en una centrífuga "International" refrigerada. Se relicó el precipitado con 200 ml más de EDTA y se centrifugó nuevamente. Se juntaron los sobrenadantes (extracto crudo). Se llevó a pH 5,8 y se agregó lentamente sulfato de amonio sólido hasta 2,6 M, compensando el efecto de la sal por incremento de volumen. El líquido fue constantemente agitado durante la operación. Se controló el pH 5,8 y se dejó 1 h. Luego se centrifugó durante 20 min, a 7.000 rpm. Se agregó al sobrenadante sulfato de amonio sólido hasta 3,2 M. Se dejó 1 h y se centrifugó durante 20 min a 7.000 rpm. El precipitado constituía la fracción F4. El siguiente paso en la purificación de la PGAM consiste en una precipitación con sulfato de amonio hasta 2,55 M a pH 5,3. Sin embargo, todos los intentos que se hicieron para incrementar la pureza de la enzima fracasaron. En la Tabla I se consiguan los resultados de un experimento tipo. Después de precipitar con sulfato de amonio sólido hasta 2,55 M a pH 5,3, se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 min. El precipi-

tado constituía la fracción "2,55 M". El sobrenadante fue llevado sucesivamente a 2,85 M y 3,30 M de sulfato de amonio al mismo pH y los respectivos precipitados constituían las fracciones "2,85 M" y "3,30 M".

TABLA I

TRATAMIENTO DE LA PGAM CON SULFATO DE AMONIO

Fracción	Volumen ml	Total unidades	Total proteínas mg	Pureza u/mg
4	60	118.000	630	187
2,55 M	6	12.000	63,6	189
2,85 M	30	45.000	360	125
3,30 M	10	18.000	126	150

Valores similares a los anotados se observaban en presencia de EDTA o del sustrato 3-PGA en concentración mM e utilizando sulfato de amonio de distinta procedencia ("Merck" e "Amalar"). No fue posible purificar la enzima más allá de los valores anotados a pesar de haber cuidado las indicaciones del autor en lo referente a temperatura, pH y otros factores.

2) Purificación por columna: Se sembraron aproximadamente 10.000 unidades de fracción F₄ contenidas en 5 ml y previamente dializadas contra Tris 0,01 M pH 7,0, en una columna de DEAE celulosa equilibrada con ese buffer. En estas condiciones la enzima no se fijaba a la columna. Tampoco se fijaba en una columna equilibrada a pH 8,2. Sin embargo, la enzima se purificaba 3,5 veces. En estas condiciones la PGAM puede ser separada de la F₄ que se fija a la columna. Esta propiedad fue usada en estudios preliminares

de marcación de PGAM con sustrato radiactivo, usando extractos crudos (Milstein, comunicación personal). Se hubiera podido aumentar aún más el pH pero, ante la posibilidad de una pérdida de actividad y la disminución de la capacidad de la DEAE a pH's elevados, se prefirió utilizar CMC.

Se realizó un experimento preliminar de la siguiente manera: a un tubo de centrífuga de 12 ml que contenía 2 ml de CMC y equilibrada con buffer de fosfato de sodio 10^{-3} M pH 8,0, se agregaron 29,2 mg de fracción F4 en 2 ml, dializados previamente contra el mismo buffer. Se dejó durante 1 h, se centrifugó y se guardó el sobrenadante (A). Se lavó con 1 ml del mismo buffer y se centrifugó (sobrenadante B). Se volvió a lavar el precipitado y se centrifugó (sobrenadante C). Se repitieron las operaciones anteriores pero esta vez usando buffer fosfato 1 M pH 8,0. Se recogieron los sobrenadantes MA, MB y MC en el orden correspondiente. En la Tabla II se exponen los resultados del experimento.

Como puede observarse en la Tabla II, el sobrenadante A no posee actividad de mitasa pero sí de enolasa como se desprende del hecho de incrementar los valores de actividad de mitasa de los sobrenadantes MA, MB y MC. Además, como se puede apreciar en la Tabla, un exceso de EN cristalizada agregada al mismo sobrenadante, determina, aproximadamente, el mismo valor de actividad. Por otra parte, el sobrenadante MC tiene actividad de mitasa pero no de enolasa. En consecuencia, es probable que estas condiciones sean útiles para la separación de ambas enzimas.

En otro experimento se utilizó una columna de CMC de 6 x 0,6 en equilibrada con buffer de Tris 5 mM pH 8,0. Se sembraron 7,5 ml de fracción F4 con un total de 2,100 unidades, previamente diali-

ados contra el mismo buffer. Se lavó con 10 ml de igual buffer y luego con 5 ml de ClNa 0,02 M, seguidos de 5 ml 0,05 M y de 5 ml de 0,075 en buffer Tris 5 mM pH 8,0. En la Tabla XII se describen los resultados obtenidos en este experimento.

Los valores indican que estas condiciones son favorables para la purificación en columnas de GFC de la enzima. Sin embargo, el método no fué mayormente usado pues en esta etapa la casa Boehringer comenzó a vender la enzima cristalizada por el método de Cook. Esa fué la enzima que se usó en el resto del trabajo.

TABLA XII

PURIFICACION DE LA PGAM EN GFC A pH 8,0

Fracción	Molaridad de fosfato	Actividad u/ml	Proteína mg/ml	Pureza u/mg
F ₄		2888	14,6	193
Sobren. MA	M	828	6,8	
" A	M	-		
" MA A		1210		178
" MA EN		1216		
" MB	M	270	1,2	
" MB A		594		495
" MC	M	-	0,33	
" MC A		288		873

TABLA XII
PURIFICACION DE PGM EN GSC A pH 8,0 CON DISTINTAS
CONCENTRACIONES DE ClNa

Fracción	Volúmen ml	Actividad u/ml	Total unidades	Proteína mg/ml	Pureza u/mg
ClNa 0,02 N	5	60	30	0,27	221
" 0,05 N	5	145	725	0,16	906
" 0,075 N	5	24	120	0,15	160

C A P I T U L O I V
PREPARACION Y PURIFICACION DE ^{32}P - 2,3-PGA DE
ALTA ACTIVIDAD ESPECIFICA

El difosfato se trató de obtener por los distintos métodos que se detallan a continuación:

A partir de levadura: Se trató de aislar el 2,3-PGA a partir de levadura de panadería según el método de Neuberg y Instig (1943). Este método se basa en la acumulación de glicerofosfatos por el agregado de un aceptor de hidrógeno (acetaldehído) para prevenir la formación de α -glicerofosfato y de un inhibidor de la enzima (flouro). No fué posible obtener fosforilación ninguno de los experimentos realizados con diversas partidas de levadura y tanto partiendo de levadura fresca como de levadura previamente secada.

A partir de FDP: La FDP, por acción de la Aldolasa y de la PGADH, en presencia de fosfato y DPN, produce 1,3-PGA (Fig. 1). Si a esa mezcla se le agrega una fuente de ^{32}P -FDP, se obtiene 2,3-PGA. En esas reacciones se basa el experimento que se llevó a cabo siguiendo a Towne et al (1957) pero que difieren de ésta por cuanto se agregó fósforo radiactivo a la mezcla y se disminuyó considerablemente la cantidad de fosfato "frío" con el fin de obtener un difosfato de alta radiactividad específica.

En la Tabla IV se consiguan los resultados del experimento utilizando, como fuente de ^{32}P -FDP, un hemolizado de eritrocitos de conejo en un caso y extracto acuoso de pectina de ave preparado a partir de un polve acetónico en el otro. Ambas preparaciones se llevaron a cabo de acuerdo a los autores citados.

En un tubo se agregaron: 15 μ moles de FDP; 15 μ moles de 50_4Mg ; 30 μ moles de PO_4HK_2 ; 0.2 mg BPN; 90 μ moles de Tris pH 8.0; 0.5 μ moles de piruvato de Na; 40 μ l de Aldolasa (1 mg/ml); 25 μ l de PGAMH (1 mg/ml) y 15 μ l de hemolizado de eritrocitos de conejo ó 15 μ l de extracto acuoso de pechuga de ave. El volumen final era de 1 ml. El ^{32}P fué agregado junto con el PO_4HK_2 . Se incubó durante 1 h a $38^\circ C$. Se paró la reacción con unas gotas de ácido acético y se sembraron muestras sobre papel y se analizaron por electroforesis a pH 6.5.

TABLA IV

FORMACION DE 2,3-PGA A PARTIR DE FDP

Fuente de BIFGAM	2,3-PGA (cpm)	Radiactividad total (cpm)	Rendimiento de 2,3-PGA (%)
Eritrocitos	185	12.130	1.5
Pechuga de ave	820	11.790	7.0

Estas preparaciones de 2,3- ^{32}P PGA eran las que poseían mayor radiactividad específica. Sin embargo, este método de preparación no fué en general usado ya que, cuando se incubaba en presencia de mayor cantidad de ^{32}P , se producía un precipitado que provocaba la detención del sistema. Se logró mejorar algo tratando la solución de ^{32}P con Dowex 90. Esto indicaría la presencia de metales pesados contaminando dicha solución.

A partir de eritrocitos de conejo: Este método se basa en los estudios de Prankerd y Altman (1954) del metabolismo del fosfato por eritrocitos de conejo y utilizados posteriormente por Grisolia et al (1961) para obtener 2,3-PGA radiactivo. Utiliza

la propiedad que poseen los eritrocitos de intercambiar fosfato con el medio externo (el plasma) "in vitro". El procedimiento seguido aquí durante la incubación de los eritrocitos con ^{32}P fue, en general, el utilizado por Grisolia pero el método de purificación del 2,3-PGA fue distinto.

Se extrajeron 5 ml de sangre de conejo por punción en el corazón. La jeringa contenía heparina. La sangre se colocó en un tubo de polietileno al que se agregó 1 μC de ^{32}P más la cantidad de ClNa 2 M necesaria para llevar la solución de ^{32}P a 0,9%. Se incubó en un baño maría a 38°C durante 5 h con un suave burbujeo de una mezcla de $\text{O}_2\text{-CO}_2$ en la relación 95:5 para mantener constante el valor del pH. Para esta última operación se utilizó un capilar de vidrio previamente tratado con silicona. Esta precaución, así como también la utilización de un tubo de polietileno, se hizo para evitar, en lo posible, la hemólisis.

Para evitar la formación de espuma se agregó a la sangre un antiespumante. Una vez terminada la incubación la sangre fue centrifugada en una centrífuga "Hisco" de mesa a 5.000 rpm durante 30 min. Los eritrocitos sedimentados fueron lavados dos veces por centrifugación con porciones de 3 ml de solución fisiológica y hemolizados con 5 ml de agua destilada. Luego se calentó en baño maría a ebullición durante 30 min. Se centrifugó y el sobrenadante se llevó a mínimo volumen en un desecador que contenía ácido sulfúrico. El 2,3- ^{32}P PGA fue purificado por electroforesis sobre papel a pH 3,5. Se utilizó papel 3 MI dada su mayor capacidad respecto de otros papeles y se sembró sobre un ancho de 20 cm. Una vez ubicada la mancha sobre el papel por radiantografía, el 2,3-PGA fue eluido con agua destilada. Los citados méto-

dos de preparación y purificación del $2,3\text{-}^{32}\text{PGA}$ fueron los generalmente utilizados a lo largo del trabajo cuando no se indica lo contrario. La purificación del cofactor por electroforesis sobre papel tiene la ventaja de correr al frente y separarse de los monofosfoglicélicos que corren juntos, bastante alejados del difosfato (Fig. 4).

Reconocimiento del $2,3\text{-}^{32}\text{PGA}$: El $2,3\text{-PGA}$ radiactivo obtenido se identificó por electroforesis a pH 3,5, 6,5 y 9,1, usando como marcador $2,3\text{-PGA}$ sintético obtenido gentilmente por el Dr. S. Grisolia. Para ello se procedió del modo señalado en el Cap. II, para la identificación de ésteres radiactivos. También se lo identificó por su capacidad para intercambiar el ^{32}P con 3-PGA en presencia de mitasa de la siguiente manera :

Se incubó a temperatura ambiente durante 2 min. una cantidad de $2,3\text{-}^{32}\text{PGA}$ del orden de los 10 μmoles con aproximadamente 0,3 μmoles de PGAM en buffer Tris 0,05 M, pH 7,0. Se analizó por electroforesis a pH 6,5 (Fig. 6 A) junto a testigos de Pi y 3-PGA . A esa incubación se le agregó 3-PGA en exceso y se corrió junto a la anterior (Fig. 6 B). Tal como cabía esperar, el supuesto $2,3\text{-}^{32}\text{PGA}$, que corría al frente en la electroforesis, intercambiaba ^{32}P con el 3-PGA (Fig. 5 B). En la misma figura, (expt. B) el $2,3\text{-}^{32}\text{PGA}$ incubado con la PGAM, produce $3\text{-}^{32}\text{PGA}$ y ^{32}Pi . Más adelante se discutirá esto con mayor extensión.

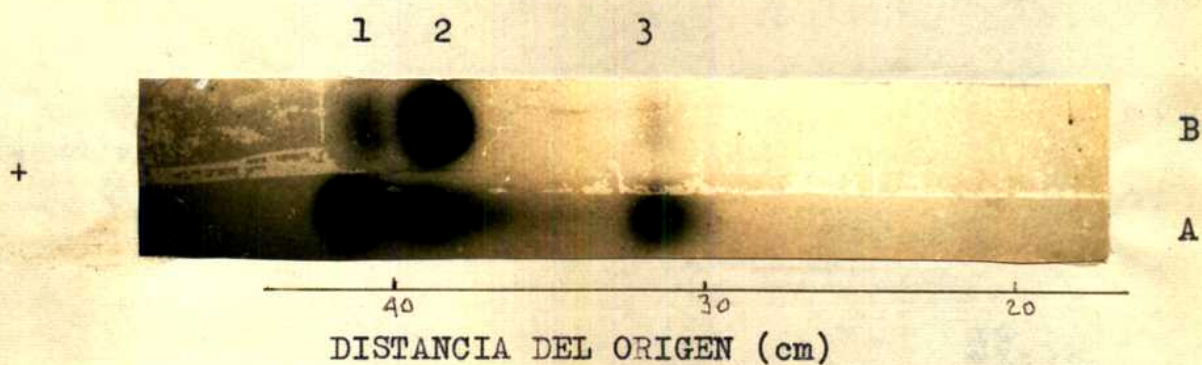


Figura 6

Radiografía de una corrida electroforética a pH 6,5 de: A, PGAM incubada con 2,3-³²P-GA; B, igual a la anterior pero con incubación posterior con un exceso de 3-PGA.

1 = 2,3-PGA; 2 = 3 (6 2)-PGA; 3 = Pi.

C A P I T U L O VEXPERIMENTOS PARA AISLAR UN INTERMEDIARIOFOSFO-ENZIMA EN LA PGM

Se realizó una serie de experimentos con el fin de obtener, como lo afirmara Pizer (1960), una fosfo-enzima intermediaria que, por hidrólisis ácida parcial o hidrólisis triptica formara SerP. La obtención de una fosfo-enzima estable representaba un requisito previo para un posterior estudio de la secuencia de aminoácidos en torno al centro activo de la enzima.

1. Incubación de la PGM con 2,3-³²PDA purificada:

a) Seguido de diálisis - En un pequeño tubo se incubaron 2 mg en 0,2 ml de enzima cristalizada con 0,2 μ moles de 2,3-³²PDA ($7,6 \times 10^5$ cpm) en 0,2 ml y 0,2 ml de Tris 0,1 M pH 7,0. El co-factor había sido purificado por electroforesis sobre papel. Se lo mantuvo en baño maría a 31° C durante 3 h. El material fue luego dializado hasta que no se detectó más radiactividad fuera del saco de diálisis. Se separó la mitad del material, se lo secó en un desecador que contenía ácido sulfúrico y luego se lo sometió a hidrólisis ácida parcial con HCl 5,7 N. La otra mitad de la incubación fue sometida a hidrólisis triptica para lo cual se agregaron 0,8 ml de agua destilada y se lo mantuvo en baño maría a ebullición durante 10 min. con el fin de denaturalizar la proteína y permitir un mejor ataque de la tripsina. Se agregó, como buffer, carbonato de amonio al 3% y se digirió con 6 mg de tripsina cristalizada, durante 20 h a 37° C. Ambos hidrolizados, el ácido y el triptico, fueron sembrados y sometidos a electrofore-

ais a pH 3,5 y 6,5. En estas condiciones de hidrólisis parcial, todos aquellos péptidos que involucran a la Ser³²P descrita por Pizer (1960), deberían poseer radiactividad y aparecer como bandas más o menos separadas en la placa radiográfica después de la radiografía. Sin embargo, sólo aparecía en la placa una banda que correspondía a la posición del Pi. En consecuencia, estos resultados estarían en contradicción con los de Pizer ya mencionados.

b) Seguido de pasaje por columna aniónica - Se incubaron durante 3 h a 25° C 0,2 μ moles de 2,3-³²FMA ($3,5 \times 10^6$ cpm/ μ mol) con 0,5 mg de PGAM cristalizada y 10 μ moles de Tris pH 7,0. El volumen se llevó a 0,2 ml. Después de la incubación se pasó el material por una columna de Dowex 1-X8 (0,6 x 1 cm) equilibrada con Tris 0,05 pH 7,0. En 1 ml pasó toda la radiactividad que no se adsorbió a la columna. Dicho efuente contenía 35.000 cpm. Inego se dializó contra agua destilada exhaustivamente y se llevó a sequedad. Este material fué sometido a una hidrólisis débil parcial, seguida de electroforesis a pH 6,5 y 3,5. El resultado fué similar al anotado en el experimento anterior. Sólo se obtuvo una banda correspondiente a la posición del Sulfato.

2. Incubación de la PGAM con hemolizado de eritrocitos:

En otro experimento se utilizó un hemolizado de eritrocitos sin posterior purificación como fuente de 2,3-³²FMA. Para ello se incubaron 0,3 ml de eritrocitos con 1 nC de ³²P en la forma ya mencionada. Se hemolizó con 2 ml de agua destilada y se introdujo en el tubo que lo contenía, un saco de diálisis con

2,5 mg de PGAM en su interior. La enzima había sido previamente desalificada por diálisis. Se dejó 48 h en heladera a 2 - 4°C y luego, conservándola en el mismo saco de diálisis, se dializó contra agua destilada exhaustivamente. Una alícuota del material fue secado, hidrolizado parcialmente con HCl 5,7 N y corrido en electroforesis sobre papel a pH 3,5, junto a un hidrolizado similar de ^{32}PGM . Los papeles fueron secados y radiografiados. Como puede apreciarse en la Fig. 7 (C y F), la distribución de las

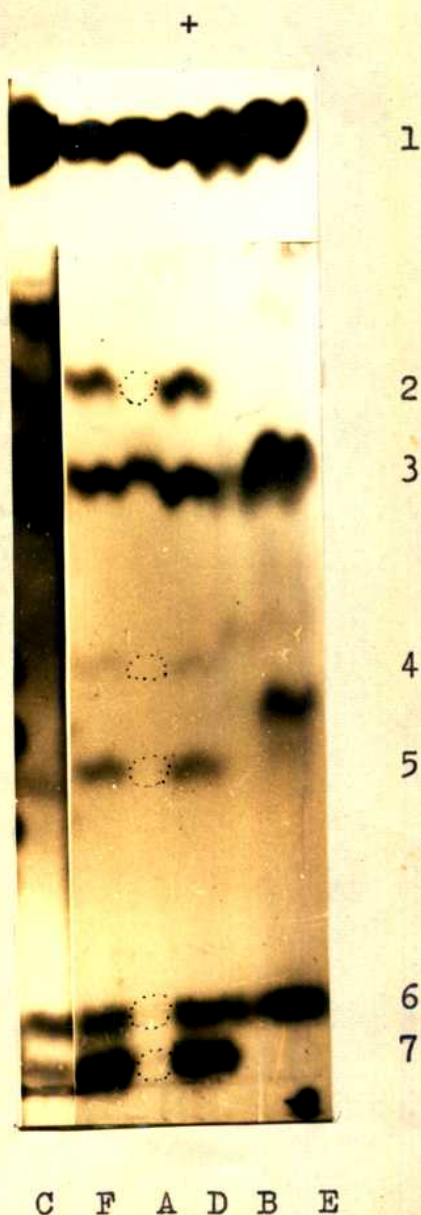


Fig. 7

Radiografía de una corrida electroforética a pH 3,5 de ^{32}PGM (incubada previamente con : 3-PGA (D), con Glc-1,6-P₂ (E) y sin incubarse (F), sometidas luego a hidrólisis ácida parcial) y de (^{32}P)-PGAM (incubada antes con: 3-PGA (A), con Glc-1,6-P₂ (B), y sin incubarse (C) y luego sometidas a hidrólisis ácida parcial). Los círculos punteados de A significan que poseían radiactividad pero no se visualiza bien en la foto.

bandas correspondientes a los péptidos formados en la hidrólisis ácida parcial de la PGAM, coinciden con aquéllos de la FGM. La similitud de los modelos de ambas enzimas, junto al hecho de no haberse podido obtener una fosfo-enzima estable a la hidrólisis ácida cuando se incubó la enzima con el cofactor purificado, sugiere la posibilidad de una contaminación de FGM en la PGAM cristalizada. Para confirmar esta suposición se estudió el intercambio de la PGAM marcada con su sustrato frío (sin radiactividad), aprovechando la especificidad de la FGM que, cuando se incuba con su sustrato en exceso, se produce un intercambio de fósforo entre la enzima y el sustrato. Si la fosfo-enzima posee ^{32}P , se obtendría una dilución de la radiactividad.

3. Experimentos de intercambio:

Se tomó una alícuota de PGAM del experimento anterior y se la dividió en tres tubos los que fueron incubados como se indica en la Tabla IV. Otro tanto se hizo con respecto a la ^{32}P FGM.

TABLE IV

Tubo	Enzima	INTERCAMBIO DE ^{32}P DE LAS METASAS MARCADAS Radiactividad (cpm)	Sustrato	Intercambio
A	PGAM	37.000	3-PGA	NO
B	"	37.000	G10-6-P	SI
C	"	37.000	---	---
D	FGM	34.000	3-PGA	NO
E	"	34.000	G10-6-P	SI
F	"	34.000	---	---

Cada tubo contenía 2 μ moles de sustrato, 8 μ moles de histidina pH 7,0, 0,4 μ moles de Cl_2Hg y agua hasta 0,2 ml. Se incubó 30 min. a temperatura ambiente, se secó e hidrolizó con HCl 5,7 N parcialmente. Se sembró sobre papel y se corrió en electroforesis a pH 3,5 (Fig. 7).

Como se puede observar en la Fig. 7, en los casos en que se incubaron las enzimas con β -PGA (tubos A y D), se obtuvieron modelos de péptidos radiactivos similares a los modelos dados por los hidrolizados de las enzimas sin incubar (C y F). Por el contrario, cuando las enzimas eran incubadas con Glc-6-P , el ^{32}P era intercambiado (tubos B y E). Las bandas que aparecen en estos últimos hidrolizados y que son comunes con los hidrolizados de las enzimas sin incubar (C y F), son Glc-3-P (Fig. 7, banda 3) y un artefacto que coincide con la banda 6 de la misma figura. En efecto, cuando los hidrolizados de las enzimas incubadas con Glc-6-P fueron sometidos a electroforesis a pH 6,5 (Fig. 8, B y E) junto con un hidrolizado de ^{32}PGM sin incubar (Fig. 8, F), se obtuvo nuevamente una banda cerca del origen (banda X) que correspondería al artefacto. Sin embargo, a este pH, uno de los componentes de la banda 6 de la corrida a pH 3,5 (Fig. 7), la banda 6a, corre bien adelante en el hidrolizado de la PGM sin previa incubación (Fig. 8, F) (Milstein y Sanger, 1961).

De los resultados arriba anotados se puede inferir que :

- a) la PGAM no forma una fosfo-enzima estable a la hidrólisis ácida y
- b) la enzima usada en esos experimentos posee una contaminación de PGM.



Fig. 8

Radiografía de una corrida electroforética a pH 6,5 de los tubos B, E y F que figuran en la Tabla IV.

4. Contaminación de PGM en la PGAM cristalizada:

Para establecer la magnitud de la contaminación de PGM en la PGAM cristalizada, observada en el experimento anterior, se midió la actividad de PGM en 2 alícuotas de 0,1 mg de PGAM por el método de Najjar (1948). Se determinaron los valores del P ácido estable producido en la reacción $\text{Glc-1-P} \xrightarrow{\text{PGM}} \text{Glc-6-P}$ para las dos muestras :

muestra 1 11 μg P ácido estable

" 2 11 μg " " "

1 unidad (u) enzimática se define como aquella que cataliza la formación de 1 μg de P ácido estable. Por lo tanto se tienen 0,011 u.

El valor de la actividad específica que se da para la enzima pura es de 26 u/ μg de proteína, Hajjar (1977). En consecuencia, 0,011 u equivalen a 0,42 μg de FEM. Entonces la contaminación de FEM en FEM resulta :

$$\frac{100 \mu\text{g}}{0,42 \mu\text{g}} = \frac{1}{240}$$

5. Cromatografía de 2,3-PGA y Glc-1,6-P₂

Los resultados de Piner (1960) podrían ser explicados como una contaminación de FEM en la purificación de la FEM. Pero esta contaminación debería estar asociada a una simultánea contaminación de Glc-1,6-P₂ en la purificación del 2,3-PGA. Para comprobar la separación de ambas cofactores se los corrió en cromatografía ascendente usando el mismo sistema de solventes de Piner (1960): 2-propanol - amoníaco - agua (70:10:20). Se utilizó papel Whatman N° 1 y se corrió durante 20 hs a temperatura ambiente. No fue posible obtener valores de R_f por cuanto el frente de solvente había sobrepasado el límite superior del papel. En la Fig. 9 se representan las posiciones alcanzadas por ambos cofactores.

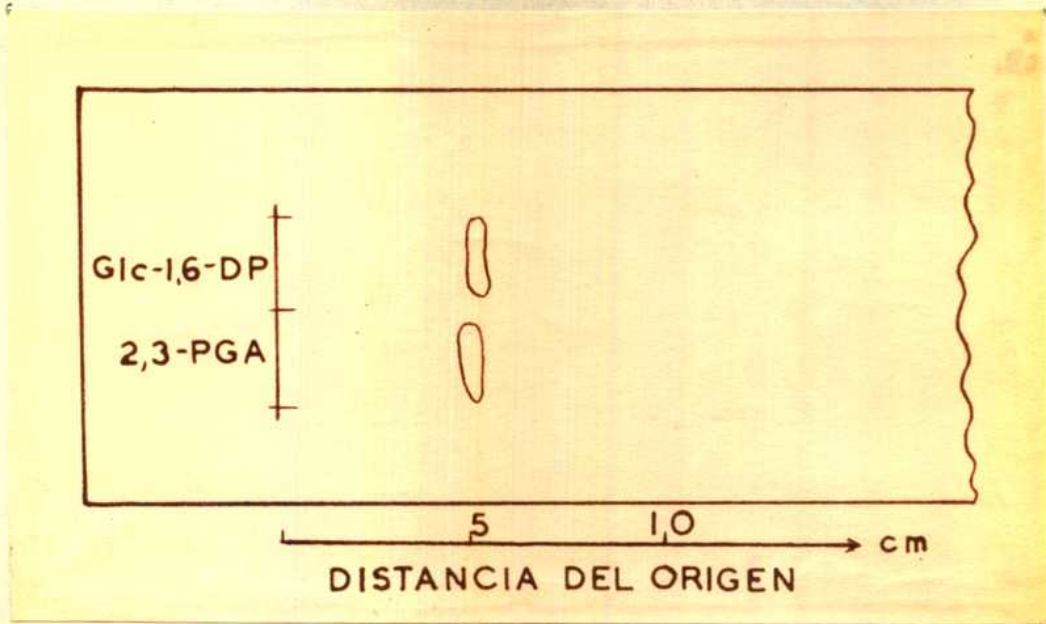


Fig. 9

Posición ocupada por los cofactores Glc-1,6-P₂ y 2,3-PGA en cromatografía ascendente en el sistema 2-propanol-amoniaco-agua.

C A P Í T U L O VI

FORMACION DE UN COMPLEJO ESTABLE EN LA REACCION DE LA FOSFOLICIDATO MITASA

1.- Incubación de PGM con 2,3-³²PFA y tratamiento de la misma en electroforesis a varias valores de pH.

a) pH 6,5 - En el experimento de intercambio que se hizo para identificar al 2,3-PFA (Cap. IV, Fig. 6), se puede observar que en el caso en que se incubó PGM con 2,3-³²PFA, la muestra sembrada sobre el papel se resuelve en 3 bandas correspondientes al 2,3-PFA, β(ó 2)-PFA y Pi (Fig. 6, A). La intensidad de las bandas que corresponden al monofosfato y al Pi resultan aproximadamente iguales si se tiene en cuenta el incremento en intensidad de la mancha del primero debido a la cola del 2,3-PFA. Cuando la incubación anterior se hacía en presencia de β-PFA se obtenía, en electroforesis, un modelo como indica la figura 6, B. Aquí se observan sólo dos bandas : la correspondiente al cofactor y la del β-PFA. La banda identificada como Pi en la misma figura desaparece. Es decir, el Pi intercambia con el fosfato del β-PFA. Sin embargo, como fuera establecido por Sutherland et al (1949), el ³²Pi que se agrega a una incubación de la mitasa con β-PFA, no se incorpora a este último. Todo esto se podría explicar si se supone que en el primer caso (Fig. 6, A) se forma una fosfo-enzima (³²PE) que al ser sometida a electroforesis se hidrolizaría para dar ³²Pi y enzima (un mecanismo del tipo de la ecuación 2, Cap. I). En el segundo caso

(Fig. 6,B), al ser incubada la fosfo-enzima con 3-PGA, la ^{32}P intercambiaría el ^{32}P y su radiactividad se diluiría frente al exceso de 3-PGA. Se estaría de esa manera frente a un mecanismo de doble desplazamiento (Cap.I), Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos posteriormente, esta interpretación no puede sostenerse.

b) pH 3,5 - Cuando las mismas incubaciones del experimento anterior eran sometidas a electroforesis a pH 3,5, se obtenía solamente 2,3- ^{32}P PGA y Pi y muy poco (aproximadamente 10%) de monofosfoglicerato (Fig.10, A). Pero en presencia de exceso de 3-PGA,

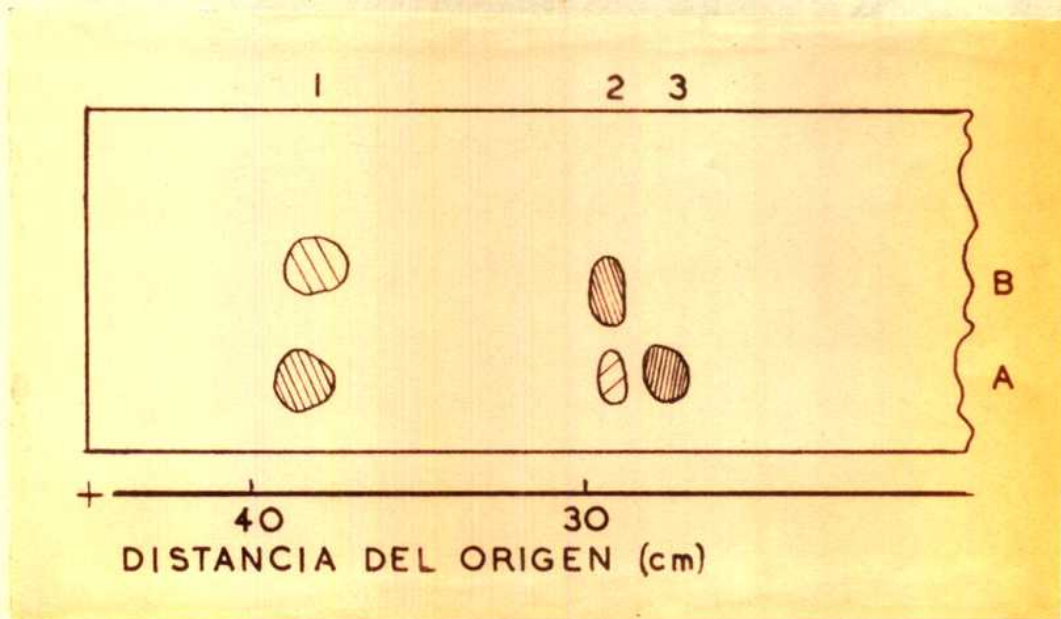


Fig. 10

Radiantografía de una corrida electroforética a pH 3,5 de: A, PGAM incubada con 2,3- ^{32}P PGA durante 2 min. a temperatura ambiente; B, igual a la anterior pero con incubación posterior con un exceso de 3-PGA.

la incubación anterior producía monofosfoglicerato, 2,3-PGA y nada de Pi (Fig. 10, B).

Los resultados descritos a esos 2 valores de pH se obtenían tanto cuando se sembraba sobre papel y luego se mojaba con el buffer, como en el caso contrario. Es decir, se trataría esencialmente de un efecto de pH del buffer.

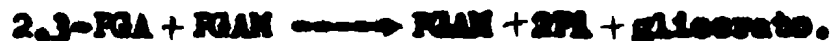
c) pH 9,1 - Una alícuota de la incubación de PGAM con 2,3 -³²P-GA del experimento anterior fué sembrada y corrida en electroforesis a pH 9,1. Se observaron, como resultado, dos manchas en el radiograma: una coincidente con la posición del 2,3-PGA y otra con la del Pi, que a este pH, corre igual que el monofosfoglicerato (Fig. 4).

2. ~~Formación de un complejo en la incubación de la PGAM con 2,3-PGA~~

Para poder explicar esos resultados es necesario suponer que el 2,3-PGA se une a la enzima y forma con ella un complejo estable cuyos fosfatos se hidrolizan en forma diferente en relación al pH: a pH 6,5 el complejo se descompondría para dar monofosfoglicerato y Pi aproximadamente en proporciones iguales según la siguiente ecuación:



a pH 3,5 el complejo se hidrolizaría dando, prácticamente, sólo Pi, según la siguiente ecuación:



El 2,3-PGA que aparece en las Figs. 7 y 8 sería el que se encuentra en exceso y no participa del complejo con la enzima. Para probar éste se hizo un experimento en el que la enzima se encontraba

en exceso respecto del 2,3-PGA. De ese modo, no debía encontrarse difosfato cuando se sometía la muestra al análisis por electroforesis.

Se incubaron 6,4 μ moles de PGAM cristalizada con 5,2 μ moles de 2,3-PGA ($2,7 \times 10^6$ cpm/ μ mol) en presencia de Tris 0,05 M pH 7,0 y un volumen final de 0,250 ml. Se sembró una alfombra sobre papel que se corrió en electroforesis a pH 6,5. En esas condiciones la radiografía reveló la presencia de sólo dos manchas: una correspondiente al Pi y otra al monofosfoglicerato.

En la Fig. 11 se esquematizan los efectos del pH sobre la descomposición del complejo.

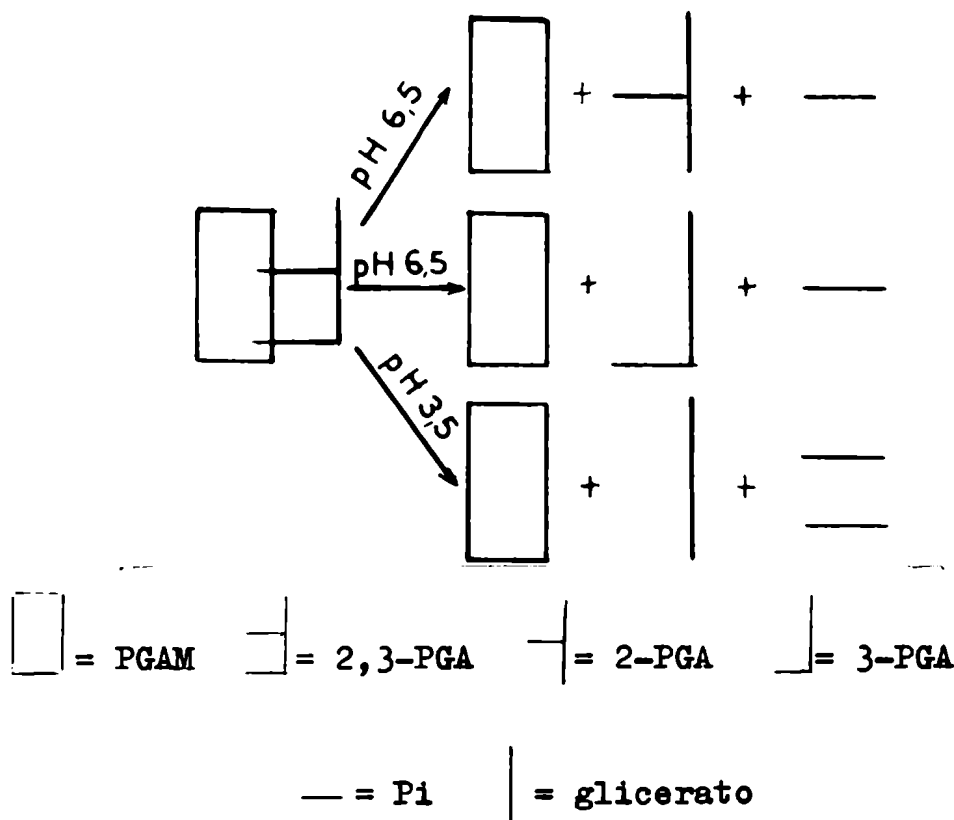


Fig. 11

Esquema representativo del efecto hidrolizante que tienen sobre el complejo distintos valores de pH.

3.- Relación molar del complejo.

Dado el hecho de que el 2,3-PGA forma con la PGM un complejo estable, se aprovechó esta condición para titular la enzima con el cofactor. Desde un punto de vista práctico resultó mejor la titulación inversa, es decir, mantener fija la concentración del 2,3-PGA y variar la de la enzima. Como se demostró más arriba, sólo se recupera 2,3-PGA en un análisis electroforético cuando se encuentra en exceso con respecto a la enzima, es decir, cuando no interviene en la formación de complejo. Por lo tanto, si se mide ese exceso, el valor cero corresponderá al punto final de la titulación.

Las condiciones del experimento fueron registradas en la Tabla V. Las mezclas fueron incubadas durante 2 minutos sobre hielo.

TABLA V

TITULACION DE LA PGM POR EL 2,3-PGA. pH 3,5

Se incubaron 4,4 micromoles de 2,3-³²P-GA ($4,5 \times 10^4$ cpm/ml) con cantidades variables de sustrato (20 micromoles/ml) y en presencia de buffer Tris 0,05 M pH 7,0. El volumen final era de 0,270 ml. Las muestras fueron analizadas por electroforesis a pH 3,5 y las bandas medidas en la forma habitual.

Tubo Nº	2,3- ³² P-GA (ml)	PGM (ml)	Radioactividad en cada fracción de sustrato:			
			2,3- ³² P-GA	Pi	2-PGA	2,3-PGA
1	0,020	0,020	1/11	154	24	936
2	"	0,040	2/11	296	32	759
3	"	0,060	3/11	324	45	596
4	"	0,080	4/11	449	51	552
5	"	0,160	8/11	587	58	212

En la Fig. 12 se representaron los valores de la Tabla V. Según estos resultados el 2,3-PGA se unió a la enzima en la relación de un mol de cofactor por mol de enzima. A iguales resultados se llegó cuando las muestras del experimento de la Tabla V se corrieron a pH 6,5 (Tabla VI y Fig. 13).

Grisolia et al (1961), analizando el contenido en P de la sustancia que había sido incubada con 2,3-PGA y pasada por columna Dowex 1, determinaron la presencia de 2 moles de P por mol de enzima. Esta relación concuerda con la aquí observada. Sin embargo, los citados autores, con los métodos utilizados para el análisis del P, no podían establecer la vinculación de las dos moléculas de Pi como integrantes del cofactor en el complejo con la sustancia. Así, ellos sugieren la presencia de dos centros activos en la molécula de PGAM.

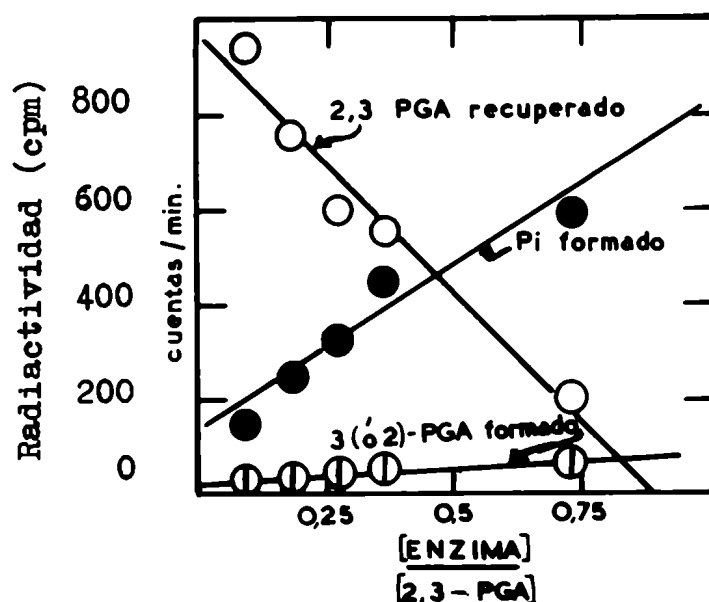


Fig. 12

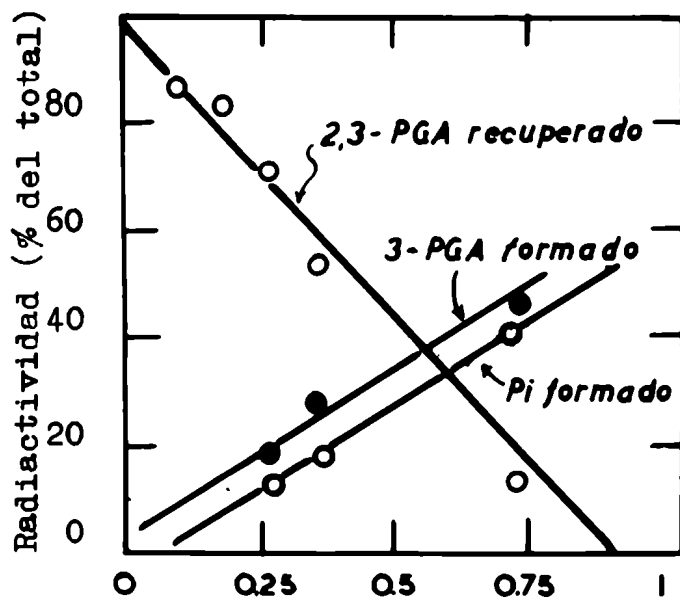
Cantidad de enzima necesaria para hidrolisar un mol de 2,3-PGA. Las muestras fueron analizadas en electroforesis a pH 3,5.

TABLA VI

TITULACION DE LA PGM POR EL 2,3-PGA pH 6,5

Las condiciones fueron las mismas que en Tabla V sólo que las muestras fueron analizadas aquí a pH 6,5

Tubo Nº	Pi	Radiactividad en μm recuperadas como:				%
		P_i	3-PGA	P_i	2,3-PGA	
1	-	-	-	-	1,088	86,5
2	-	-	-	-	896	84
3	132	11,9	186	17,7	778	70,4
4	195	17,8	303	27,8	599	54,4
5	329	39,8	382	46,2	116	14



ENZYMA
2,3-PGA

Fig. 13

Cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un mol de 2,3-PGA. Las muestras fueron analizadas en electroforesis a pH 6,5.

4.- Experimentos efectuados para tratar de estabilizar el complejo.

El reconocimiento de péptidos involucrados en el centro activo de la PAM se veía imposibilitado por la inestabilidad del complejo a la hidrólisis ácida e tróptica. Es decir, se descomponía la unión del elemento radiactivo al centro catalítico que se requería para individualizarlo. Sin embargo, se podía pensar que, variando la configuración espacial de la molécula proteica, se podría obtener una estabilización del complejo y poder así someterlo a hidrólisis parcial con el fin de aislar péptidos marcados para un posterior estudio de secuencia. De acuerdo a ello se realizó el siguiente experimento en que se trató el complejo con HCl y urea:

Se incubaron 8,4 mg de PAM con 1,4 μ moles de 2,3-PHA ($2,6 \times 10^6$ cpm/ μ mol) y 100 μ moles de Tris pH 7,0 con un volumen final de 2,1 ml. En este experimento, el 2,3-PHA radiactivo fue purificado por electroforesis sobre papel a pH 2,4. La muestra se incubó durante 2 min. a temperatura ambiente y se dividió en tres tubos (0,7 ml en c/u):

Tubo a) se agregaron 1,3 ml de una solución conteniendo 720 mg de urea;

Tubo b) se agregaron 1,3 ml de HCl 0,15 N;

Tubo c) " " " " " agua.

Las muestras fueron incubadas 15 min. a temperatura ambiente y divididas cada una en dos partes.

Una serie de tubos (a₁, b₁ y c₁) fue precipitada con 1 ml de TCA 5% y los precipitados fueron lavados tres veces con volúmenes de 0,3 ml de TCA 1%. Se reconstituyeron los precipitados en 0,5 ml de agua y se contó la radiactividad. Se obtuvieron los resultados que figuran en la Tabla VII. Los valores de la columna

de la derecha se obtuvieron dividiendo la cantidad de P en moles, conocida la radiactividad específica, por la concentración de la muestra en el precipitado.

TABLA VII

Tubo	Radiactividad total (cpm)	^{32}P (en moles de P) moles PAAH
a ₁	19,000	0,3
b ₁	7,900	0,12
c ₁	14,000	0,23

La enzima tratada (a₁ y b₁) retiene baja radiactividad que parece ser inespecífica ya que es del mismo orden que la enzima sin tratar (c₁). Ello se deduce del hecho de que el complejo, como se observó más arriba, se hidroliza en medio ácido. Es probable entonces que aquella radiactividad remanente se deba, en realidad, a un lavado insuficiente del precipitado. Ello estaría indicando que el complejo, de estabilizarse por efecto de la urea o del HCl, sería inestable en medio ácido.

La otra serie (a₂ , b₂ y c₂) fue tratada por calor en baño maría hirviente durante 15 min, y luego dializada 3 veces contra volúmenes de 500 ml de agua destilada (4 h, 12 h y 5 h). El tratamiento por calor se efectuó para evitar una renaturalización de la proteína por efecto de la diálisis. Se tomaron alícuotas, se sembraron sobre papel y se corrieron en electroforesis a pH 2,4. En la Tabla VIII figuran los resultados de este experimento.

TABLA VIII

PRODUCTOS DEL COMPLEJO POR TRATAMIENTO CON UREA E HCl

Las condiciones del experimento fueron las que figuran en el texto. Las muestras fueron analizadas por electroforesis a pH 2,4.

Muestra	Pi		2,3-FDA		3-FDA	Radioactividad en el origen	$\frac{32}{P}$ (en moles de Pi moles FDA)
	cpm	%	cpm	%			
a ₂	69	10	700	90	-	-	1,8
b ₂	472	37	795	63	-	-	1,7
c ₂	805	70	390	30	-	-	1,7

Los valores de la Tabla VIII muestran que, en el caso de la enzima tratada con urea y, en menor grado, la tratada con HCl, se obtiene más 2,3-FDA que Pi, contrariamente a lo que sucede con el c₂. Estos resultados se pueden interpretar de dos maneras:

a) que la enzima retiene al cofactor durante la diálisis y luego el complejo se descompondría según los valores anotados cuando se lo somete a electroforesis a pH 2,4 ó

b) que, al actuar la urea o el HCl previo al calentamiento o como consecuencia del mismo, el complejo se descompone para dar 2,3-FDA y Pi en una determinada relación que, luego de la diálisis, se llega a los resultados que figuran en la Tabla VIII.

C A P Í T U L O V I I

ACTIVIDAD FOSFATÁSICA DE LA FOSFOLIGERATO MITASA

1.- Actividad de fosfatasa por descomposición del complejo.

Como ya fuera mencionado en la introducción, ha sido observado por distintos autores una actividad fosfatásica sobre el 2,3-PGA en las preparaciones de PGM. Según Joyce y Grisolia (1958) los productos resultantes de su acción eran Pi y monofosfoglicerato, aproximadamente en iguales proporciones. Pero la cantidad de 2,3-PGA utilizada por esos autores en relación a la mitasa era demasiado grande como para observar algún efecto en relación a la estabilidad del complejo mencionado más arriba (Cap. VI). Los métodos de análisis utilizados en este trabajo de tesis permiten trabajar con pequeñas cantidades de cofactor y, por lo tanto, permiten un estudio de la actividad fosfatásica de la PGM en relación al comportamiento del complejo. Con ese fin se efectuó el siguiente experimento :

El 2,3-PGA y la PGM fueron incubados durante 20 h, a temperatura ambiente en diferentes relaciones molares. En la Tabla IX se describen las condiciones y resultados del experimento.

Si se analizan los datos de la Tabla IX, se puede observar que la relación Pi/monofosfoglicerato obtenida por acción de la PGM sobre el 2,3-PGA a las 20 h de incubación es distinta a la unidad, es decir, no sigue la ecuación encontrada por Joyce y Grisolia (1958) para la 2,3-PGA fosfatasa mencionada más arriba. La diferencia fundamental entre el experimento de estos autores y los aquí observados, estriba en la cantidad de 2,3-PGA incubada en relación a la enzima presente: en aquí, el cofactor se en -

TABLA IX

ACCION DE FOSFATASA DE LA PMAN CRISTALINA SOBRE EL 2,3-PGA

Se incubaron 5,4 mmoles de 2,3-³²P-GA (3.9 x 10⁶ cpm/umol) durante 20 horas con cantidades variables de PMAN y en presencia de Tris 0.05 M pH 7.0 y un volumen final de 0.270 ml. Las muestras fueron sembradas sobre papel y analizadas por autorografía a pH 6.5. Una alícuota de 1 (1') fue analizada a las 4 horas.

Tubo Nº	PMAN mmoles	[2,3- ³² P-GA] [cpm]	Radioactividad encontrada como:		diferencia a las 20 h.		
			cpm	mmoles/umol/ingesta			
1	0.25	21.6	1203	58.8	851	41.2	17.6
2	0.5	20.8	1130	67.0	633	32.1	35.8
3	1	5.4	1500	74.6	522	25.4	49.2
4	3.5	1.5	1216	77.7	318	22.3	55.4
1'	0.25	21.6	808	58.5	606	41.5	diferencia a las 4 h. 17.0

encuentra en gran exceso (más de 100 veces con respecto a la fosfatasa); en éste, el valor máximo del 2,3-FGA es de 21,6 moles por mol de enzima (tubo 1). Y, justamente es en esta incubación donde la relación Pi/monofosfoglicerato adquiere su valor más cercano a la unidad. En consecuencia se puede admitir que existe un mecanismo superpuesto al de la 2,3-FGA fosfatasa ya descrito, que produce, principalmente, Pi.

Como se puede apreciar en la misma Tabla, los valores obtenidos para Pi dependen de la cantidad de enzima presente: varían en relación directa con el aumento de la enzima, es decir, con la cantidad de complejo formado. Se pueden interpretar estos resultados si se admite que el complejo se descompone en función del tiempo produciendo fundamentalmente Pi.

Para descartar la posibilidad de estar midiendo un Pi proveniente de la descomposición del 3-FGA producido en la reacción, se tomó una muestra del tubo 1 (Tabla IX, 1') a las 4 h de incubación. La diferencia observada para los dos tiempos es menor que el 4 %, valor muy bajo para explicar por sí solo la formación de Pi a las distintas concentraciones de enzima.

2.- Determinación de la vida media del complejo.

La vida media aproximada del complejo pudo ser establecida como resultado del siguiente experimento:

Se incubó 2 μ moles de PGM con 5,4 μ moles de 2,3-¹²FGA ($3,9 \times 10^6$ cpm/ μ mol) durante 4 h. Se analizaron luego, por electroforesis a pH 6,5, dos muestras de esa incubación: la A y la B (Tabla X). La última fue incubada con 2 μ moles de 3-FGA antes de la corrida.

TABLA X

Las condiciones del experimento fueron similares a las anotadas en la Tabla IX salvo el tiempo de incubación que fué de 4 h y la concentración de la PGM de 2 μ moles. En el Expt. B se agregaron 2 μ moles de 3-PGA al final de la incubación.

Expt.	Radiactividad encontrada como:			
	Pi		monofosfoglicerato	
	cpm	%	cpm	%
A	1386	68,6	634	31,4
B	1158	64	652	36

Como se vió más arriba, existirían dos acciones de fosfatasa superpuestas : una, la producida por la 2,3-PGA fosfatasa que forma cantidades aproximadamente iguales de Pi y monofosfoglicerato, y la otra, la determinada por la descomposición del complejo que produce sólo Pi. Si se observan los valores de la Tabla X, se puede hacer el siguiente análisis:

a) El porcentaje de radiactividad debido a la acción de 2,3-PGA fosfatasa debe ser el que figura en el Expt. A para el mono - fosfoglicerato y, una cantidad aproximadamente equivalente, para el Pi. Es decir :

$$\text{Pi} = 31,4 \% \quad \text{monofosfoglicerato} = 31,4 \%$$

b) El porcentaje de radiactividad participando del complejo a las 4 h de incubación es el que se obtiene por diferencia entre los valores de ^{32}Pi de los Expts/ A y B. Ese ^{32}Pi , como se estableció más arriba, es el único que puede intercambiar con el fosfato del 3-PGA (Expt.B). Se tiene entonces:

$$68,6 - 64 = 4,6 \%$$

e) El porcentaje de radiactividad debido a la descomposición del complejo se deduce por diferencia entre el total de radiactividad y la encontrada por acción de la 2,3-PGA fosfatasa más la formando parte aún del complejo:

$$100\% - (31,4 + 31,4 + 4,6) = 32,6\%$$

El valor de la vida media del complejo se puede entonces calcular :

$$\text{vida media del complejo} = \frac{t \cdot h \cdot (32,6 + 4,6)}{32,6} \approx t + h$$

CAPITULO VIIIDISCUSION

Los resultados detallados en el Capítulo V demuestran la presencia en las preparaciones cristalinas de FGM de una contaminación de FM del orden de 1/200. Esta contaminación, sumada a la imposibilidad de obtener 2,3-FGA libre de Gls-1,6-P₂ por el sistema utilizado por Pizer (1960), tornan dudosos los resultados de este autor al sugerir para la FGM la formación de una fosfoproteína del tipo de la encontrada para la FM. Estas dudas se ven reforzadas por la circunstancia de haber sido imposible aislar una fosfoproteína de carácter estable cuando se utilizaba 2,3-FGA purificado por electroforesis sobre papel. En esas condiciones, por hidrólisis ácida parcial e tripsina no fué posible aislar SerP como Pizer describiera en el mencionado trabajo. Sin embargo, cuando la enzima era incubada con 2,3-FGA sin purificar, se obtenía SerP de un hidrolizado ácido parcial. Pero, esto no tenía lugar cuando, previo a la hidrólisis, se incubaba la preparación con el sustrato de la FM. Indudablemente la enzima marcada era la FM. Por otro lado Grisolia et al (1961) obtuvieron una FGM que poseía dos tipos de marcación: una pequeña, que no intercambiaba con el sustrato y resistente a la precipitación salina y otra específica e inestable al tratamiento salino, contrariamente a lo observado por Pizer (1960). De todo ello se deduce que es probable que la proteína marcada por este último autor fuera realmente FM.

Formación de un complejo intermediario.

Si bien, como se dijo antes, las incubaciones de FGM con

2,3-PGA purificado por electroforesis sobre papel no forman una fosfo-enzima ácido estable; los experimentos del Cap. VI permiten comprobar la formación de un intermediario estable a condiciones sucesivas de tratamiento. Así, este complejo mantiene su estabilidad cuando se lo trata con Buffer L, según se desprende del experimento de Grisolia et al (1961). Sin embargo, estos autores llegaron a conclusiones distintas a las aquí expuestas.

Es interesante destacar que Malhoch et al (1977) trataron de explicar la formación de los distintos componentes de la PGAM de levadura que se obtenían por electroforesis libre (Cap. I) como debidos a una diferente distribución del fosfato sobre la enzima. Si este fosfato estaba asociado al mecanismo de acción de la enzima, cabría esperar una mayor fosforilación de los componentes menos fosforilados si se incubaba la enzima con 2,3-PGA. Sin embargo, en esas condiciones, no observaron diferencias en la distribución de los componentes ni diferencias en sus movilidades. Sólo observaron un mismo incremento en el valor de la movilidad de todos los componentes. Concluyeron entonces que el 2,3-PGA estaría uniformemente adsorbido sobre la enzima en una relación de 2 ó 3 moléculas de coenzima por cada molécula de proteína. Es probable que se trate, en realidad, de un complejo formado entre la enzima y 2 ó 3 moléculas de cofactor del mismo tipo del encontrado en la enzima de músculo.

La posibilidad de que la PGAM de enzimas que no requieren cofactor para desarrollar su actividad catalítica como es el caso de la enzima de germen de trigo forman un complejo del tipo descrito,

resulta poco probable según se desprende del trabajo de Grisolia et al (1961). En efecto, estos autores incubaron la mitasa de germen de trigo con 2,3-PGA en proporciones equimoleculares recuperando la mayor parte como difosfato. Ellos obtuvieron esos resultados a pesar de haber utilizado Cl_2H para desproteinizar antes de hacer la titulación. Según los resultados del presente trabajo con enzima de músculo, en esas condiciones de acidez, de existir tal complejo, se hidrolizaría produciendo sólo Pi y ácido glicérico.

Por otra parte, esos mismos autores observaron que el 2,3-PGA no posee efecto sobre la estabilidad térmica de la PGM de germen de trigo contrariamente a la marcada protección observada con la mitasa de levadura.

En consecuencia, con los datos disponibles, se puede intentar una generalización en el sentido de que el complejo intermedio sería una forma común de las gliceroquinas que requieren 2,3-PGA para desarrollar su actividad catalítica, no observándose el mismo en las mitasas no dependientes del cofactor.

Descomposición del complejo a distintos valores de pH

Cuando el complejo es sometido a electroforesis sobre papel a distintos pHs, se obtiene una descomposición del mismo con la formación de Pi y monofosfoglicerato en relaciones que dependen del pH elegido. Así, a pH 6,5 la relación Pi / monofosfoglicerato es de aproximadamente 1 y a pH 3,5 esa relación es de alrededor de 10. Estas diferencias podrían ser explicadas si se supone que en el complejo formado por la coenzima y el cofactor, la primera ejerce una acción hidrolizante sobre las uniones éteres

que dependería de las condiciones de pH a que tiene lugar. Así, a pHs bajos ambos fosfatos del complejo se labilizarían mientras que a pHs más altos lo harían aproximadamente un 50% solamente. En realidad, de estos resultados no se puede concluir si se trata de un promecio entre ambos fosfatos los que se hidrolizan o existe una diferencia en su labilidad. Sin embargo, los datos de la Tabla VI (Cap. VI) muestran diferencias en cpm entre los valores del monofosfoglicerato y los del Pi. Lo extraño del caso es que los valores del monofosfoglicerato superen a los del Pi. Ello no podría esperarse si la marcación fuera homogénea. Por el contrario, en ese caso de encontrarse una diferencia ésta debería ser inversa. Sin embargo, aquellos valores pueden explicarse si se supone una mayor radiactividad específica de uno de los fosfatos del 2,3-PGA, simultáneamente con una tendencia a una mayor hidrólisis del otro fosfato. Se ha observado, en efecto, que en la incubación de eritrocitos con ^{32}P , se obtiene un 2,3-PGA que posee mayor radiactividad específica en el fosfato esterificado en el carbono 2 (Franker y Altman, 1974). De esa manera, para explicar los valores más altos del monofosfoglicerato sobre los del Pi habría que suponer que tiene lugar una mayor labilidad sobre el complejo ^o el fosfato esterificado en el carbono 2. En la Fig. 14 la flecha más gruesa señala una acción más labilizante de la enzima sobre ese fosfato.

De acuerdo a las generalizaciones de Koshland y Stein (1974), la hidrólisis de los fosfatos del cofactor, a través del complejo, se efectuaría del lado del grupo que va a ser transferido. Las flechas de la Fig. 14 indican el lugar en que tendría efecto dicha hidrólisis.

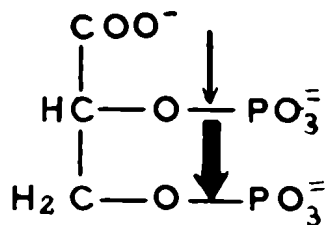


Fig. 3*

Representación de la molécula de 2,3-PGA. Las flechas indican el sitio donde se ejercería la acción hidrolizante de la PGM, juntamente con una relación de sus intensidades.

Relación molecular del complejo.

La relación molecular que se encontró entre la enzima y el cofactor resultó ser igual a la unidad. Este resultado concuerda con los de Grisolia et al (1961) quienes obtuvieron dos moles de fosfato por mol de enzima. De acuerdo a los resultados expuestos en esta tesis, en las condiciones de trabajo de dichos autores (desproteinización con ClO_4H) el complejo se hidrolizaría para formar solamente P1 que, por otro lado, es lo que aparentemente miden.

Edehloch et al (1957) rechazan la posibilidad de que la PGM de levadura sea un polímero (Cap. I), sin embargo, es muy sugestivo el hecho de que esa enzima presente, por un lado, un peso molecular aproximadamente doble del de la enzima de músculo y, por otro, si la interpretación de los resultados de Edehloch et al (1957) vistos más arriba son correctos, se requerirían probablemente 2 moles de cofactor por mol de enzima en la formación del complejo. De ser así, la PGM de levadura formaría un dímero.

Actividad fosfatásica de la enzima.

Como se desprende de los experimentos referidos en la Tabla IX (Cap. VII), la preparación de PAA cristalina posee dos actividades de fosfatasa que actúan simultáneamente sobre el 2,3-PAA y que pueden ser diferenciadas por sus productos :

a) Se trata de una actividad fosfatásica inherente a la inestabilidad del complejo. Se observa que a pH 7,0 el complejo se descompone con el tiempo dando, como producto principal, Pi. Esta actividad tendría su origen en la labilidad de los fosfatos del complejo y estaría definida por la siguiente ecuación :

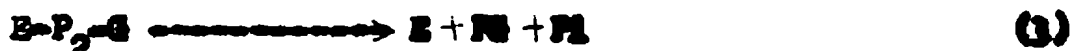


b) La otra actividad fosfatásica que se superpone a la anterior ya había sido observada por Redwall et al (1957) quienes concluyeron que se debería a una contaminación de 2,3-PAA fosfatasa. Sin embargo, como fuera mencionado en la introducción, no ha sido aclarado aún si esta segunda actividad de fosfatasa se debe a una contaminación de 2,3-PAA fosfatasa o si en realidad es desarrollada por la misma enzima. La acción de esta fosfatasa sobre el 2,3-PAA produce iguales cantidades de monofosfoglicerato y de Pi. Estaría definida por la ecuación:



Esta actividad podría ser explicada por distintos mecanismos:

1 - Que sea el resultado de la descomposición del complejo según la ecuación:



En este caso, el 2,3-PAA en exceso y que no forma complejo con la enzima, activaría la reacción hacia la descomposición del

complejo con formación simultánea de Pi y monofosfoglicerato. La relación de esas sustancias dependería de la concentración relativa del difosfato (Tabla IX). Como se ve, de ser ese el caso se trataría de una sola acción de fosfatasa. Pero esta interpretación no explicaría la actividad fosfatásica de enzimas no dependientes de 2,3-PGA. En efecto, en la mutasa purificada a partir de germen de trigo, Grisolia et al (1961) encontraron una actividad de fosfatasa sobre el 2,3-PGA del orden de la encontrada para la mutasa de levadura, a pesar de que la enzima de germen de trigo no formaría complejo con el difosfato como se discutíó más arriba.

2 - Que se trate de una contaminación de 2,3-PGA fosfatasa en las preparaciones de PGM.

3 - Que se deba a una acción específica de la PGM. Esta interpretación estaría apoyada por los datos de Chiba citados por Pizer (1962). Según ellos, los distintos componentes de PGM de levadura que se obtienen en electroforesis libre (Cap. I) poseen distinto valor de mutasa pero el mismo de fosfatasa. Teniendo en cuenta que los datos consignados no permiten discriminar entre las dos actividades fosfatásicas, es difícil decidir hasta qué punto dichos autores no han determinado como actividad fosfatásica sólo la descomposición del complejo. Es importante tener en cuenta que todas las fracciones de Chiba tenían igual Km (Cap. I) para 2,3-PGA, lo que sugiere igual velocidad de descomposición del complejo.

El sistema ensayado por dicho autor parece el apropiado para aplicar la técnica descrita en este trabajo y decidir ese proble-

na así como también la posibilidad de la presencia de una contaminación de 2,3-PGA fosfatasa.

Actividad de mitasa en ausencia de cofactor.

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, se ha observado (Grisolia y Joyce, 1979) que extractos de músculo esquelético y otros tejidos poseen cierta actividad de mitasa en ausencia del cofactor. Pero, como se vio más arriba, los métodos utilizados por esos autores para detectar 2,3-PGA no son los adecuados cuando el cofactor se encuentra unido a la mitasa formando el complejo. Es probable, por lo tanto, que aquella actividad anotada se deba precisamente a la conservación del complejo. Ello es posible puesto que dicha actividad era medida por esos autores en extractos crudos donde el complejo, probablemente, no habría sido perturbado.

Estabilización del complejo.

En los experimentos del Cap. VI se trató de estabilizar el complejo utilizando para ello urea o HCl. Como se desprende de los resultados de los mismos, por efecto de la urea y, en grado menor, del álcali, el complejo se descompondría para dar fundamentalmente 2,3-PGA, contrariamente a lo observado en la enzima nativa en que se obtiene Pi. Por lo tanto, el experimento sugeriría que el 2,3-PGA se mantiene unido a la proteína conservando su estructura intacta. Del mismo experimento se desprende la posibilidad de que el complejo se mantenga estable por efecto de la desnaturalización de la proteína por urea o HCl. Pero esta estabilidad se perdería en medio ácido (tratamiento con TCA

e electroforesis a pH 2,4). Estos resultados permiten vislumbrar la posibilidad de encontrar las condiciones (quizá hidrólisis a pH alcalino, con tripsina, por ejemplo) que hagan factible la estabilización y el análisis del complejo para un subsiguiente estudio de la secuencia de amino ácidos en torno al centro activo de la enzima.

PART II

**ESTUDIO DEL CENTRO ACTIVO DE LA ENZIMA
FOSFATASA ALCALINA**

CAPÍTULO I

ESTUDIO COMPARADO DE LAS SECUENCIAS DE AMINOACIDOS ALREDEDOR DE LA SERINA ACTIVA DE LAS FOSFATASAS ALCALINAS DE Serratia marcescens y Escherichia coli.

INTRODUCCION

Un problema de sumo interés en el estudio de la estructura de las enzimas reside en la identificación de aquellas partes de la molécula proteica que hacen a la función catalítica, es decir, al conocimiento de su centro activo.

El centro activo de una enzima se supone reducido a una pequeña zona de la molécula. Esta suposición proviene de comparar el tamaño relativamente grande de una enzima con respecto a su sustrato que, en general, es más de 100 veces menor, excepto en los casos en que el sustrato es también un polímero. Además, la posibilidad de fenómenos de resonancia entre partes distales de la molécula que cooperen en la actividad catalítica ha sido más bien desechada (Linderström-Lang y Schellman, 1959). Por otro lado, el hecho de que muchas enzimas hayan sido degradadas parcialmente conservando su actividad catalítica, habla en favor de un centro activo de dimensiones restringidas. Así, por ejemplo, Hill y Smith (1960) aislaron un fragmento activo de la papaína que poseía un promedio de 76 residuos en contraste con la molécula íntegra que posee 183. Indudablemente, estas circunstancias tornan más factibles los intentos que se hacen para revelar los mecanismos de acción enzimática.

Por otra parte, el estudio comparativo de las secuencias de aminoácidos del centro activo de una determinada enzima en espe -

cias diferentes reviste suma importancia por el hecho de que

- a) las similitudes encontradas darían una medida de la estructura mínima esencial para la función biológica, mientras que
- b) las diferencias podrían ser de utilidad desde el punto de vista filogenético (Anfinsen, 1960).

Uno de los métodos usados para un estudio de esa naturaleza consiste en aislar un intermediario de la reacción enzimática por medio del cual pueda estudiarse el centro activo. Así, Anderson y Jollés (1957) encontraron en fosfoglucomutasa un intermediario fosfo-enzima del que se obtenía SerP cuando era degradado parcialmente por hidrólisis ácida. Esta circunstancia permitió el estudio de la secuencia de aminoácidos alrededor de esa unión usando sustrato que contenía ^{32}P (Milstein y Sanger, 1961). Del mismo modo se ha observado que las fosfatasas alcalinas de mucosa intestinal y de *Escherichia coli* incorporan Pi de cuyos hidrolizados ácidos se puede aislar SerP (Bagström, 1961 a). Esta incorporación tendría lugar en el centro activo de la enzima (Bagström, 1961 b); Schwartz y Lipmann, 1961). La secuencia alrededor de la SerP en la fosfatasa de *E. coli* ha sido descrita independientemente por Milstein (1963 a) y por Schwartz y Lipmann (1963) como Asp-SerP-Ala.

En el presente trabajo se ha estudiado la secuencia de aminoácidos alrededor de la serina fosfato de la fosfatasa alcalina de *Serratia marcescens* con el intento de compararla con la de *E. coli*. Se ha elegido esta enzima porque, pese a tener propiedades similares a la de *E. coli*, difiere químicamente en varios aspectos. En efecto, Signer et al (1961) observaron que ambas enzimas poseen

las siguientes características en común: a) la síntesis es reprimida por P_i ; b) ambas son inhibidas por P_i con igual constante de inhibición; c) retienen toda su actividad después de ser calentadas a $75^{\circ}C$ durante 30 minutos; d) posibilitan a la célula el uso de P orgánico como fuente de P cuando se la priva de P_i . Al mismo tiempo estos autores observaron las siguientes diferencias entre ambas fosfatasa: a) no se observa reacción inmunológica en extractos de *S. marcescens* cuando se usa antisuero contra la fosfatasa de *E. coli*; b) el peso molecular es aproximadamente el mismo pero el punto isoelectrico de *S. marcescens* es de 6,2 mientras que el de *E. coli* es de 4,5; c) corridas bidimensionales en isoelectroforesis y cromatografía de digeridos trypiticos de las enzimas purificadas (mapa de péptidos), presentan modelos diferentes.

Los resultados expuestos más abajo indican:

a) la existencia de un pentapéptido común para ambas enzimas al nivel del centro activo y.

b) alguna diferencia en la constitución de aminoácidos cerca del pentapéptido.

C A P I T U L O I IMATERIALES Y METODOS

La actividad enzimática (Milstein, 1963 b) fue determinada agregando, a tiempo cero, 0,02 ml de enzima conteniendo entre 0,1 y 1 unidad de actividad enzimática a la celda de un espectrofotómetro Beckman DK2-A y registrando la variación de densidad óptica en función del tiempo. La celda de reacción contenía 0,3 ml de Tris 1 M pH 8,0; 0,3 ml de p-nitrofenilfosfato (2 mg/ml); 0,8 ml de Cl_2Ba 1 M y 1,6 ml de agua. La concentración de proteína fue determinada por la absorción a 280 m μ usando un coeficiente de Extinción arbitrario $E_{280\text{ m}\mu}^{1\%} = 10$

Extracción y purificación de la fosfatasa alcalina de *S. aureus*
EXTRACTO.

La fosfatasa alcalina de *S. aureus* fue extraída según el método de Garen y Levinthal (1960) con las modificaciones introducidas por Milstein (1963 b) en *E. coli*. El medio de cultivo empleado (5 l) contenía: 10 ml de $Cl_2Mg.6H_2O$ 10%; 11 ml de Cl_2Ca 1%; 2,7 ml de $Cl_3Fe.6H_2O$ 0,1%; Cl_2Zn 2×10^{-6} M; 110 ml $ClNa$ 20%; 54 ml de $ClNH_4$ 10%; 75 ml de CH 10%; 36 ml de SO_4Na_2 1% y 2 g de Bacto peptona. Además se agregaba, por goteo, durante las primeras 18 horas de crecimiento, 250 ml de solución que contenía CO_2Na M y 220 mg de β glicerofosfato. A partir de 5 l de ese medio se obtuvieron 46,5 ml de extracto con una actividad total de 750 unidades y con una actividad específica de 1,9 u/mg de proteína. El extracto se dializó contra 200 ml de agua destilada y luego contra 200 ml de Tris 0,02 M pH 7,4. La enzima fue adsorbida

en una columna de DEAE celulosa de 8 x 1 cm equilibrada con Tris 0,02 M pH 7,4 y eluida con un gradiente de 0,02 M - 0,2 M de Tris pH 7,4. Se emplearon 50 ml de Tris 0,02 M en el frasco interno diario. Se recogieron 4 ml por tubo a una velocidad de 8 gotas por minuto.

TABLA I
PURIFICACION DE LA FOSFATASA ALCALINA DE
E. COLI

Tubo	DO (280 nm)	Actividad (u/ml) (.)	Act. esp. (u/mg)
12	.125	-	-
13	.244	21,0	86
14	.430	28,8	67
15	.480	14,4	30
16	.288	6,0	21
21	.223	1,2	5,4
25	.296	1,2	4,7

(.) Una unidad de actividad fosfatásica (u) se define como la cantidad de enzima que produce un cambio de .100 de densidad óptica por minuto leído a 410 nm en un espectrofotómetro, utilizando como sustrato p-nitrofenilfosfato (NPP).

En la Tabla I y Fig. 1 se observa la forma en que la enzima eluye. Puede verse que la actividad específica es máxima en los primeros tubos en los que aparece actividad enzimática. Esto también se observa al purificar la enzima de *E. coli*. La actividad específica que se obtiene con esta purificación es suficiente para

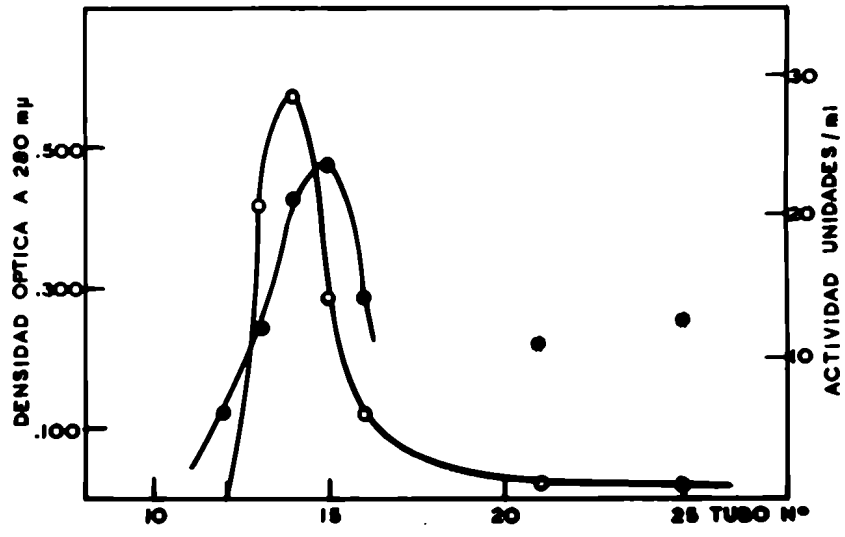


Fig. 1

Purificación de fosfatasa alcalina de *E. marmoratus* por columna de DEAE celulosa.

los propósitos del trabajo. La actividad específica, en igualdad de condiciones, de la enzima pura de *E. coli* es de 270 u/mg. En este trabajo se utilizó el contenido del tubo N° 13 (Tabla I). Para concentrar la preparación, la enzima fue fijada en una columna de DEAE celulosa de 2 x 0,6 cm, equilibrada con Tris 0,02 M pH 7,4 y eluida con Tris 0,5 M y el mismo pH. Se recogió el material en fracciones de 0,3 ml. Se tomó la segunda fracción que poseía el 73% de la actividad total y se dializó contra agua destilada.

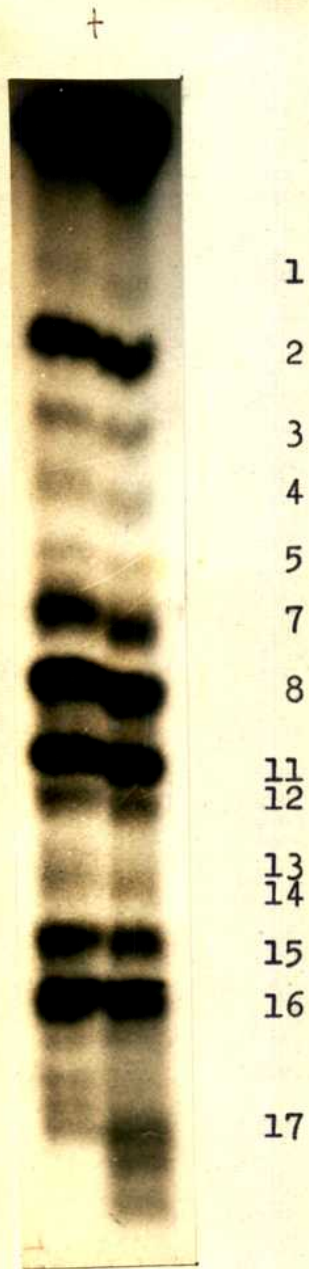
Maneja de la fosfatasa alcalina y estudio de sus unidades de hidrólisis.

La fosfatasa alcalina de *E. marmoratus* y en forma paralela una muestra de fosfatasa alcalina de *E. coli* (Milstein, 1963 b)

fué incubada (Engström, 1961 a) con 0,1 μ mol de 32 P en 1 ml de buffer acetate de Na - acético pH 5,0. Se precipitaron las proteínas con 0,15 ml de HCl 3 N, acetona hasta el 80% y 1 mg de gamma globulina humana en solución fisiológica para ayudar a la precipitación. Se centrifugó y el precipitado se lavó con 1 ml de agua destilada. Se repitió dos veces la operación anterior pero sin agregar gamma globulina. Luego se redisolvió el precipitado y se dializó contra agua destilada. Se centrifugó para separar la gamma globulina que es insoluble en agua destilada y se secó el sobrenadante. Se hidrolizó con HCl 5,7 N durante 30 minutos en baño maría hirviente y se llevó a sequedad en un desecador que contenía H_2SO_4 . Las tramas de HCl se eliminaron agregando dos gotas de agua, llevando a sequedad y repitiendo esta operación dos veces. Ambos hidrolizados (aproximadamente 20.000 cuentas/min, cada uno) se sembraron uno al lado del otro sobre papel Whatman 3MM, se les sometió a electroforesis a pH 3,5 y se los radiantografió (Fig. 2).

Los péptidos que corrían juntos en electroforesis a pH 3,5 fueron cortados, secidos sobre otra hoja de papel Whatman 3MM y nuevamente corridos en electroforesis, esta vez a pH 6,5 y radiantografiados (Fig. 3 y 4).

La técnica electroforética así como también la composición de los buffers fueron las que figuran en Parte I, Cap. II, de esta tesis.



E.c. S.m.

Fig. 2

Radiografía de una corrida electroforética a pH 3,5 de hidrolizado ácido parcial de las fosfatasas alcalinas de S. marcescens (S.m.) y E. coli (E.c.)

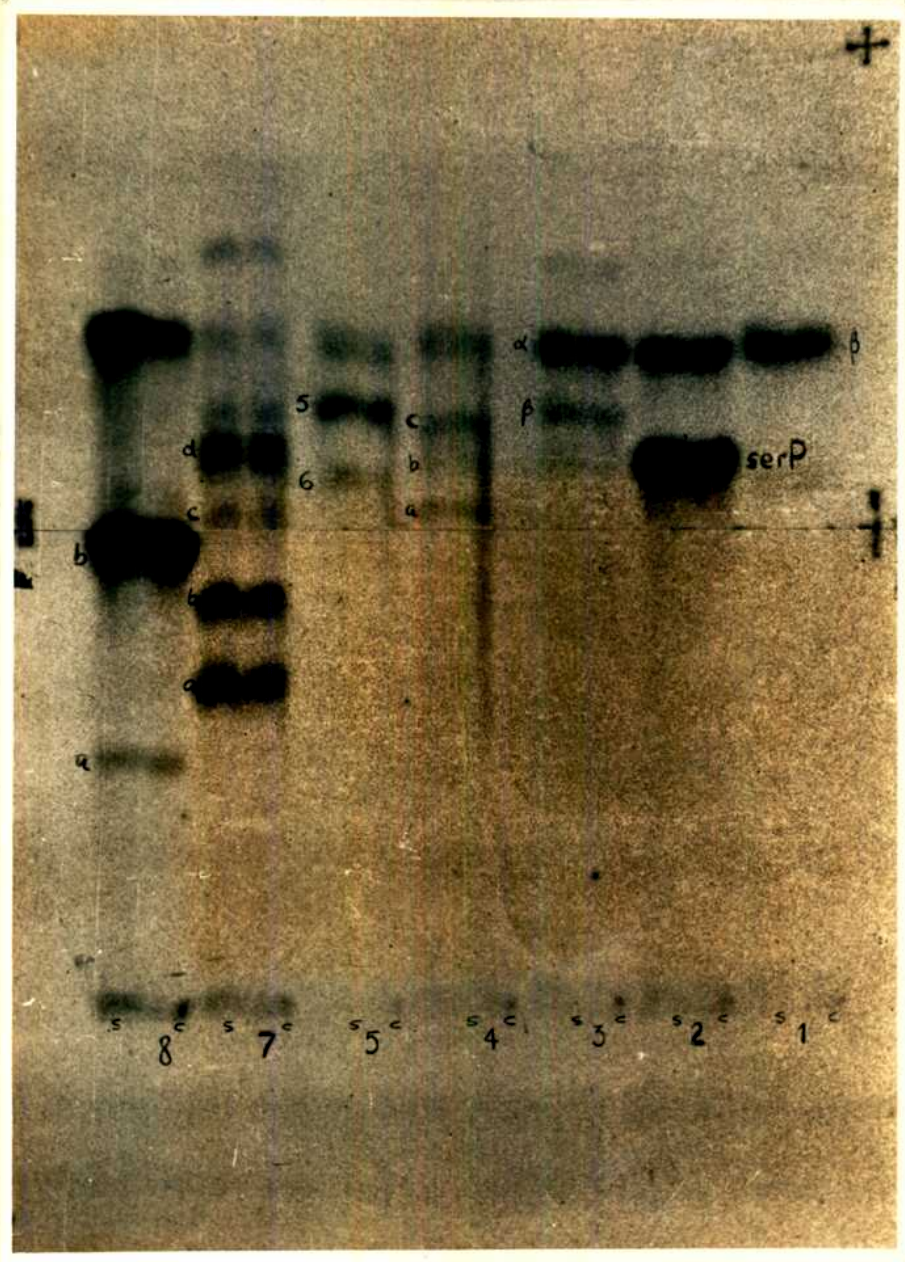


Fig. 3

Radiografía de la corrida electroforética a pH 6,5 de las bandas numeradas de la Fig. 2 (1 a 8). C = *E. coli*; S = *S. marcescens*.

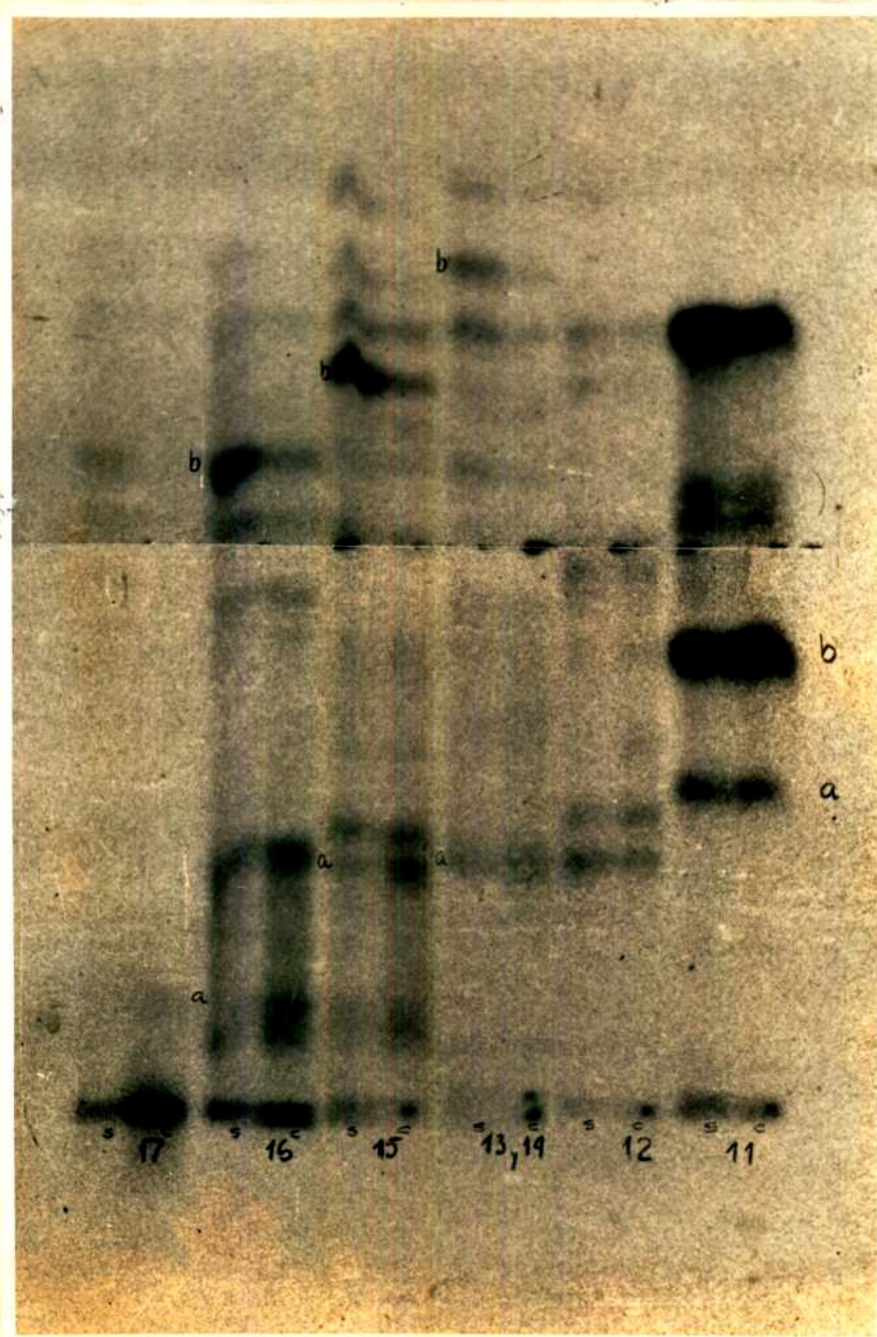


Fig. 4

Radiografía de la corrida electroforética a pH 6.5 de las bandas numeradas de la Fig. 2 (11 a 17). C = *E.coli*; S = *S.marscescens*.

C A P I T U L O I I IR E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N

Como se puede observar, las posiciones de las bandas correspondientes a ambas fosfatasa coinciden, tanto a μ 3,5 como a 6,5. (Figs. 2, 3 y 4).

De acuerdo a datos sobre la fosfatasa alcalina de *E. coli* (Milstein, 1963 a y b) las bandas de las Figs. 3 y 4 corresponderían a los péptidos que se indican a continuación:

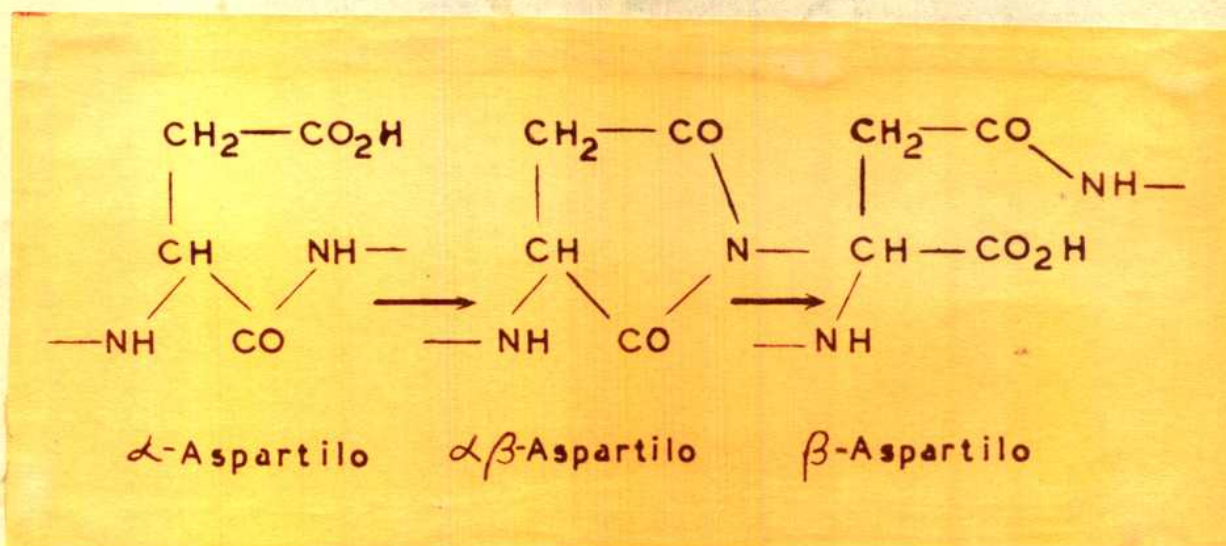
Banda (de Fig.2)	Bandas (de Figs. 3 y 4)	Péptido
1	b	Asp-SerP
2		SerP
3	b	Asp-SerP
	a	Asp-SerP-Ala
4	a	Asp-SerP
	c	(Thr o Ser)-Asp-SerP
5 y 6	5	Asp-SerP-Ala
	6	(Thr o Ser)-Asp-SerP-Ala
7	a	(Thr o Ser)-Asp-SerP
	b	Ala-SerP (.)
	d	(Thr o Ser)-Asp-SerP
8	b	SerP-Ala
11	c	(Thr o Ser)-Asp-SerP-Ala
	b	SerP-Ala-Hout (..)

(.) Este péptido se origina como artefacto durante la hidrólisis ácida, debido a la inversión del péptido 5b (Milstein, 1963 a).

(..) Hout representa a un aminoácido neutro.

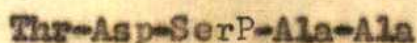
Otras bandas de las figuras sugerirían (Milstein, 1963 b) la presencia de otro aminoácido común, posiblemente en la posición del amino terminal.

Como se puede observar, hay péptidos que se repiten en distintas bandas. Ello parece ser debido a que, durante la hidrólisis ácida, los péptidos que poseen Asp pueden reordenarse según el esquema siguiente (Naughton et al, 1960):



En las condiciones de hidrólisis ácida, a partir de los péptidos se obtendrían péptidos de las formas α , β y $\alpha\beta$ (Naughton et al, 1960).

Del análisis anterior se puede concluir que, al menos, un pentapéptido resultaría común para ambas enzimas. Schwartz, Crestfield y Lipmann (1963) han estudiado, por otro métodos, la misma secuencia a la que atribuyen la estructura



En este pentapéptido el grupo amino terminal se ubica a la izquierda y el carboxílico a la derecha.

Como puede observarse en la Fig. 4, algunos péptidos como el 13a y el 14a de E. coli dan mayor rendimiento que los correspondientes del hidrolizado de S. aureus, pero en cambio en la relación es inversa. Otro tanto sucede en otros péptidos de la misma figura. Estas diferencias en los rendimientos de los hidrolizados parciales de las dos fosfatasa pueden explicarse si se tiene en cuenta el efecto que ejercen otros aminoácidos cercanos sobre las velocidades de hidrólisis ácida parcial. Ellos sugieren una cierta diferencia en aminoácidos entre las dos fosfatasa en un lugar cercano al pentapéptido.

El dipéptido Asp-SerP, por ejemplo, está presente en mucha mayor cantidad en los hidrolizados ácidos parciales de quimotripsina (Naughton et al, 1960) que en los de fosfatasa alcalina de E. coli (Milstein, 1963 b), probablemente debido a las diferencias en los aminoácidos vecinos al dipéptido citado.

Quimotripsina	8,9 %
Fosfatasa alcalina	1,5 %

Otras diferencias, probablemente de cierta importancia, deben existir entre las dos fosfatasa dadas las diferencias en el mapa de péptidos de los digeridos tripticos de las dos proteínas (Signer et al, 1961).

La similitud de secuencia entre las dos enzimas no es extraña en vista de los resultados obtenidos con otras enzimas en di -

ferentes especies. Así, por ejemplo, con la fosfoglucomutasa no pudo observarse ningún tipo de diferencia entre los péptidos radiactivos de los hidrolizados ácidos parciales de las enzimas de músculo, de hígado de rata y de levadura (Milstein, 1961). Más notable aún es la idéntica secuencia de un péptido que contiene 18 residuos alrededor de la cisteína del centro activo de las fosfogliceraldehído deshidrogenasas de levadura y de músculo de conejo (Pesham y Harris, 1963). Teniendo en cuenta esto, las pequeñas diferencias que se observan en los hidrolizados ácidos parciales de las dos fosfatasa es quizá más extraña que su similitud.

Estos resultados concuerdan con los que ya se conocen sobre ambas fosfatasa y que se comentaron en la introducción. En primer lugar, un pentapéptido común en el centro activo respondería a las exigencias de una similitud en ciertas propiedades de ambas enzimas y, en segundo lugar, diferencias en la constitución de aminoácidos en posiciones más alejadas estarían de acuerdo con las diferencias observadas por Signer et al (1961).

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, L y JOLLES, G.R.: Arch. Biochem. Biophys., 72, 121 (1957)
- ANFISEN, C.B.: The Molecular Basis of Evolution, pág. 143, Ed. J. Wiley & Sons, 1960.
- BANDURSKI, R.S. y AXELROD, B.: J. Biol. Chem., 191, 405 (1951)
- BALLOU, C.E. y FISCHER, H.O.L.: J. Am. Chem. Soc., 76, 3188 (1954)
- COWGILL, R.W. y PIZER, L.I.: J. Biol. Chem., 221, 885 (1956)
- CZOK, R. y BUCHER, Th.: Advances Prot. Chem., 15, 315 (1960)
- CZOK, R., ECKERT, L. y JÜGER, I. No publicado, Citado en la referencia anterior.
- CHIBA, H. y SUGIMOTO, E.: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 21, 207 (1959) a
- CHIBA, H. y SUGIMOTO, E.: idem, 21, 213 (1959) b.
- CHIBA, H., SUGIMOTO, E. y KITO, M.: id., 24, 418 (1960) a.
- CHIBA, H., SUGIMOTO, E. y KITO, M.: id., 24, 424 (1960) b.
- CHIBA, H., SUGIMOTO, E. y KITO, M.: id., 24, 558 (1960) c.
- EDELHOCH, H., BODWELL, V.W. y GRISOLIA, S.: J. Biol. Chem., 228, 891 (1957)
- ENGSTROM, L.: Biochem. Biophys. Acta, 52, 49 (1961) a.
- ENGSTROM, L.: id., 54, 179 (1961) b
- FERNANDEZ, M. y GRISOLIA, S.: J. Biol. Chem., 235, 2188 (1960).
- FISKE, C.H. y SUBBAROW, Y.: J. Biol. Chem., 66, 375 (1925)
- GAREN, A y LEVINTHAL, C.: Biochim. Biophys. Acta, 38, 470 (1960)
- GREENWALD, I.J.: J. Biol. Chem., 61, 339 (1925).
- GRISOLIA, S. y JOYCE, B.K.: J. Biol. Chem., 234, 1335 (1959).
- GRISOLIA, S., JOYCE, B.K. y FERNANDEZ, M.: Biochem. Biophys. Acta, 52, 81 (1961).

- HAWES, C.S. y ISHERWOOD, F.A.: *Nature*, 164, 1107 (1949)
- HILL, R.L. y E.L. SMITH,: *J. Biol.Chem.*, 235, 2332 (1960)
- ITO, N. y GRISOLIA, S.: *J.Biol.Chem.*, 234, 242 (1959).
- JOHNSON, M.J. en *The Enzymes*, 1, 407 (1960), Ed. P.D.Boyer, Ac.Press.
- JOYCE, B.K. y GRISOLIA, S.: *J.Biol.Chem.*, 233, 350 (1958).
- KOSHLAND, Jr., D.E., en *The Enzymes*, 1, 305 (1959).
- KOSHLAND, D.E. y ERWIN, M.J.: *J.Am. Chem.Soc.* 79, 2657 (1957)
- KOSHLAND, D.E., RAY, W.J. y ERWIN, M.J.: *Fed. Proc.* 17, 1147 (1958)
- KOSHLAND, D.E. y STEIN, : *J.Biol.Chem.*, 208, 132 (1954)
- LELOIR, L.F., FRUCCO, R.E., GARDINI, G.E., PALLADINI, A.G. y CAPUTTO, R.: *J.Biol.Chem.*, 19, 339 (1948).
- LINDERSTRÖM - LAND, K.V. y SCHELLMAN, J.A., en *The Enzymes*, 1, 443 (1959)
- MALMSTRÖM, B.G.: *Arch. Biochem.Biophys.*, 46, 345 (1953)
- MEYERHOF, O. y KIESSLING : *Biochem. Z.*, 276, 239 (1935)
- MEYERHOF, O. y OESPER, P.: *J.Biol.Chem.*, 179, 1371 (1949)
- MILSTEIN, C.: *Biochem. J.* 72, 26 P (1961)
- MILSTEIN, C.: *Biochem.Biophys.Acta*, 62, 171 (1963) a.
- MILSTEIN, C.: En prensa (1963) b.
- MILSTEIN, C. y SANGER, F.: *Biochem. J.*, 72, 456 (1961)
- NAJJAR, V.: *J. Biol.Chem.*, 175, 281 (1948).
- NAJJAR, V., en *Methods in Enzymology*, S.P.Colowick y N.O. Kaplan, Tomo I (1957). Ac. Press.
- NAUGHTON, M.A., SANGER, F., HARTLEY, B.S. y SHAW, D.C.: *Biochem. J.* 72, 149 (1960).
- NEUBERG, C. y LUSTIG, L.: *Arch. Biochem.* 1, 311 (1943)

PERHAM, R.N. y HARRIS, J.I., J.Mol.Biol., 7, 316 (1963).

PIZER, L.I.: J.Biol.Chem., 235, 895 (1960)

PIZER, L.I., en The Enzymes, 6, 179 (1962)

PIZER, L.I. y BALLOU, C.E.: J.Am.Chem.Soc., 79, 3612 (1957)

PIZER, L.I. y BALLOU, C.E.: J.Biol.Chem. 234, 1138 (1959)

PRANKERD, A.J. y ALTMAN, K.I., Biochem. J., 58, 622 (1954)

RACKER, E. y SCHROEDER, E.A.R.: Arch.Biochem.Biophys.
71, 326 (1958)

RAPOPORT, S. y GUEST, G.M.: J.Biol.Chem., 138, 269 (1941)

RAPOPORT, S. y LUEBERING, J.: J.Biol.Chem., 181, 507 (1950).

RAPOPORT, S. y LUEBERING, J.: J.Biol.Chem., 182, 683 (1951)

RODWELL, V.W., TOWNE, J.C. y GRISOLIA, S.: Biochem.Biophys.Acta,
20, 394 (1956)

RODWELL, V.W., TOWNE, J.C. y GRISOLIA, S.: J.Biol.Chem.,
228, 875 (1957)

SCHWARTZ, J.H., CRISTFIELD, A. y LIPMANN, E. Proc.Natl.Acad.Sci.
49, 722 (1963).

SIGNER, E.R., TORRIANI, A. y LEVINHAL, C.: Cold Spr.Harb.
Symp.Quant.Biol. 26, 31 (1961).

SUTHERLAND, E.W., POSTERNAK, T. y CORI, C.F.: J.Biol.Chem.,
181, 153 (1949)

SCHWARTZ, J.H. y LIPMANN, F.: Proc. Natl.Acad.Sci. U.S.
47, 1996 (1961)

TOWNE, J.C.: Fed.Proc. 19, 336 (1960)

TOWNE, J.C., RODWELL, V.W. y GRISOLIA, J.: J.Biol.Chem.
226, 777 (1957)

WOLD, F. y BALLOU, C.E.: J. Biol. Chem., 227, 301 (1957)

unifair

Casti