

Tesis de Posgrado

Regulación del metabolismo del glucógeno

Chelala, César A.

1971

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:

Chelala, César A.. (1971). Regulación del metabolismo del glucógeno. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1375_Chelala.pdf

Cita tipo Chicago:

Chelala, César A.. "Regulación del metabolismo del glucógeno". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1971.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1375_Chelala.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"Regulación del metabolismo del glucógeno"

Autor: César A. Chelala
Director: Dr. Héctor N. Torres

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Química
Orientación Química Biológica

1375

- 1971 -

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campomar"

1375

A mis padres

A Silvia Inés

SUMARIO

Agradecimientos	página I
Abreviaturas	página II
INTRODUCCION	página 1
PARTE EXPERIMENTAL	
A) MATERIALES Y METODOS	
I) Fosforilasa <u>b</u> quinasa	página 14
II) Fosforilasa <u>a</u> fosfatasa	página 16
B) RESULTADOS	
I) Fosforilasa <u>b</u> quinasa	página 22
II) Fosforilasa <u>a</u> fosfatasa	página 50
DISCUSION	página 98
CONCLUSIONES	página 106
BIBLIOGRAFIA	página 107

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al Dr. Héctor N. Torres, sin cuya constante guía y apoyo no hubiera podido realizar este trabajo. Con él se discutieron y a él pertenecen los aportes más valiosos de esta tesis.

Al Dr. José Manuel Olavarría y Porrúa y a las autoridades de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán, quienes posibilitaron mi ingreso al Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad Nacional de Tucumán por el apoyo material brindado.

Finalmente, deseo agradecer a los Doctores Carlos E. Cardini, Luis F. Leloir y a mis compañeros y amigos del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, por su afectuoso estímulo.

II

ABREVIATURAS

ADP: adenosina 5' difosfato

AMP: adenosina 5' monofosfato

3'5' AMP: 3'5' adenosina monofosfato cíclico

ATP: adenosina 5' trifosfato

EDTA: etilendiaminatetraacetato (Versene)

$(G)_{n-1} \text{ ó } (G)_n \text{ ó } (G)_{n+1}$: glucógeno

GS: glucógeno sintetasa

G6P: glucosa-6-fosfato

G1P: glucosa-1-fosfato

PPi: pirofosfato inorgánico

Pi: fosfato inorgánico

UTP: uridina 5' trifosfato

CTP: citidina 5' trifosfato

GTP: guanosina 5' trifosfato

INTRODUCCION

Desde que fue descubierto hace más de 100 años, el glucógeno ha sido objeto de múltiples estudios tendientes a aclarar los mecanismos involucrados en su síntesis y degradación.

El glucógeno es la principal forma de reserva de hidratos de carbono en los animales, donde fue encontrado en casi todos los tipos de células. Se acumula preferentemente en el hígado y en los músculos donde cumple funciones muy importantes: en el hígado representa una forma de depósito de glucosa disponible para mantener la glucemia dentro de límites normales y en el músculo constituye una forma de depósito de energía disponible para el trabajo muscular.

Estructura del glucógeno.

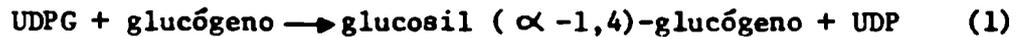
El glucógeno extraído de los tejidos por métodos suaves está constituido por moléculas altamente ramificadas y cuyos pesos moleculares oscilan entre 10 y 1000 millones (1).

El glucógeno es un polímero de la D-glucosa en cuya estructura están involucradas dos tipos de uniones glucosídicas: α -1,4 y α -1,6. Las cadenas formadas por uniones α -1,4 tienen de 10 a 14 unidades de longitud por término medio y están conectadas entre sí por las uniones α -1,6 que constituyen las ramificaciones. Toda esta estructura da como resultado una molécula ligeramente asimétrica y muy compacta.

Enzimas del metabolismo del glucógeno en el músculo.

Las enzimas directamente relacionadas con el metabolismo del glucógeno en el músculo son:

- 1) UDP glucosa: α -1,4-glucan α -4-glucosiltransferasa (EC 2.4.1.11) (glucógeno sintetasa; transferasa) que cataliza la reacción:



Esta enzima sólo puede formar uniones α -1,4 o sea que sólo puede alargar las ramas externas del glucógeno. Para que se forme un polisacárido ramificado es necesaria la acción de otra enzima denominada ramificante.

- 2) Amilo-(1,4 \rightarrow 1,6)-transglucosilasa (EC 2.4.1.18) (enzima ramificante).

Su acción consiste en la transferencia de un trozo de cadena a otra formando una unión α -1,6. Para que se produzca esta transferencia es necesario que la cadena receptora tenga alrededor de 7 residuos (2).

- 3) α -1,4 glucan: ortofosfato glucosiltransferasa (EC 2.4.1.1.) (fosforilasa) que cataliza la reacción:



- 4) Amilo-1,6 glucosidasa (EC 3.2.1.9) (enzima desramificante) que elimina por hidrólisis residuos glucosilos unidos en α 1,6 (3). La fosforilasa va eliminando las unidades de glucosa de a una por vez y se detiene al llegar a 3 ó 4 residuos glucosídicos previos a una ramificación. Actúa entonces una oligo-1,4-1,4-glucan-transferasa que transfiere 3 residuos glucosídicos α -1,4 de una rama a otra, dejando expuesta la glucosa unida por α -1,6. Esta última se elimina por la amilo-1,6 glucosidasa quedando la fosforilasa en condiciones de actuar nuevamente.

5) También se han encontrado en hígado y músculo tres tipos diferentes de hidrolasas con capacidad de hidrolizar el glucógeno o los oligosacáridos de él derivados (4) (5) (6) (7): una es una α amilasa, otra es una γ amilasa y la tercera es una α glucosidasa.

A estas enzimas, relacionadas directamente con la síntesis y degradación del glucógeno debemos añadir la UDPG pirofosforilasa, la fosfoglucomutasa y la hexoquinasa para tener el cuadro enzimático completo del metabolismo del glucógeno en el músculo.

Se ha demostrado que los factores tanto hormonales como de otro tipo que afectan el metabolismo del glucógeno muscular, lo hacen modificando la actividad de la glucógeno sintetasa, de la fosforilasa o de ambas a la vez.

Glucógeno sintetasa.

Desde el momento en que se descubrió la fosforilasa por Cori y luego que se consiguió sintetizar glucógeno "in vitro" con fosforilasa y glucosa-1-fosfato, se supuso que esta enzima era la que actuaba "in vivo" en condiciones fisiológicas sintetizando el glucógeno.

No obstante había algunos hechos que hacían dudar del papel de la fosforilasa en la síntesis del glucógeno, entre ellos la acción de la adrenalina, substancia que provoca glucogenolisis por una parte y aumenta la actividad de la fosforilasa por otra. Este efecto indicaría que la actividad de la fosforilasa está relacionada con la degradación del glucógeno y no con su síntesis.

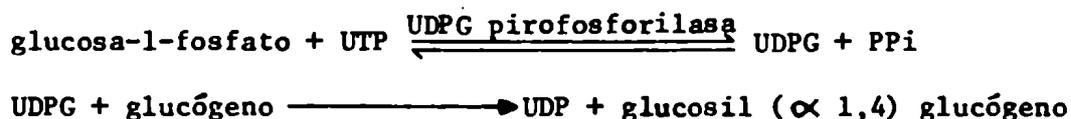
Por otra parte, Robbins, Traut y Lipmann (8), trabajando con homogeneizados de músculo comprobaron que cuando aumentaba la actividad de

la fosforilasa disminuía la incorporación de glucosa radioactiva al glucógeno.

La sospecha sobre el papel de la fosforilasa recibió confirmación con el descubrimiento de Leloir y Cardini de una enzima de hígado que sintetiza glucógeno a partir de UDP-glucosa por incorporación de glucosa a las cadenas externas del glucógeno aceptor (9).

Poco tiempo después se encontró en músculo una enzima similar junto con la enzima formadora de UDP-glucosa (10).

Las dos reacciones que conducen a la formación de glucógeno a partir de glucosa-1-fosfato son las siguientes:



En condiciones fisiológicas se considera que ambas reacciones son prácticamente irreversibles.

Leloir y colaboradores observaron en 1959 que la glucógeno sintetasa de músculo era fuertemente activada por extractos calentados de músculo y determinaron que el factor responsable era la glucosa-6-fosfato (1).

Posteriormente, y teniendo en cuenta los cambios provocados por algunas hormonas en el grado de dependencia de la glucosa-6-fosfato, Villar-Palasi y Larner postularon la existencia de dos formas de la enzima; una cuya actividad era dependiente de glucosa-6-fosfato y otra forma activa aún en ausencia de este metabolito (12).

La forma dependiente de glucosa-6-fosfato fue llamada glucógeno sintetasa D, mientras que la forma independiente fue llamada glucógeno sintetasa I.

La glucógeno sintetasa de músculo demostró ser altamente específica con respecto al dador de glucosa; de todos los nucleótido azúcares probados el más efectivo fue el UDP-glucosa. También demostró ser bastante específica para el aceptor, ya que se encontró que la velocidad máxima de la reacción se lograba cuando se utilizaba glucógeno como aceptor de la reacción.

Se encontró luego que las dos formas de la enzima descriptas anteriormente son interconvertibles por diferentes mecanismos. Hay evidencias sobre la existencia de una quinasa de músculo que convierte la forma I de la enzima en forma D (13) de acuerdo a la siguiente reacción:



siendo la reacción inversa cataliza por una fosfatasa



Se demostró que el sitio fosforilado de la glucógeno sintetasa era un residuo serina (14) y que la secuencia de hexapéptidos alrededor del sitio fosforilado



era similar al hexapéptido fosforilado de la fosforilasa.

La reacción de fosforilación catalizada por la quinasa se realiza en presencia de ATP-Mg^{++} y es estimulada por el añadido de 3'5'AMP cíclico, no observándose efecto alguno del nucleótido cíclico solo (15) (16).

La quinasa de la sintetasa también es llamada transferasa I quinasa, habiéndose descartado la posibilidad que esta enzima fuera idéntica a la fosforilasa b quinasa (17). Se encontró luego un inhibidor de la reacción de la transferasa I quinasa (18) que está presente en el sobrena-

dante después de precipitar la glucógeno sintetasa y la transferasa I quinasa por acidificación de los extractos.

Se han descrito otros mecanismos de conversión de la forma I a la forma D de la sintetasa (16) (19). El agregado de Ca^{++} (10^{-4} M) a preparaciones parcialmente purificadas de glucógeno sintetasa de músculo esquelético de rata produce una rápida conversión de la forma I a la forma D de la enzima; esta reacción no requiere ATP, no es estimulada por el 3'5' AMP cíclico y es irreversible. Esta reacción requiere un factor proteico, aparentemente idéntico al factor activante del Ca^{++} (CAF) responsable de la activación de la fosforilasa b quinasa (20).

Se vió luego que también la tripsina, en ciertas condiciones, produce la conversión de la forma I a la forma D de la sintetasa.

Los tres tipos de glucógeno sintetasa D obtenidos por esos métodos se compararon (21) y se observó que sólo la glucógeno sintetasa D obtenida por la reacción de la transferasa I quinasa con ATP-Mg^{++} es capaz de transformarse nuevamente en glucógeno sintetasa I.

Con respecto al papel que juegan algunas hormonas actuando sobre la sintetasa es importante considerar la acción de la adrenalina y de la insulina sobre esta enzima.

En 1961 se encontró por primera vez en hemidiafragmas de ratas (22) que la adrenalina disminuía la actividad total de la glucógeno sintetasa a un 66% de los niveles control; paralelamente se vió que aumentaba la fosforilasa a y disminuía el contenido de glucógeno.

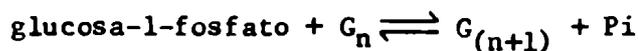
Posteriormente (23) se demostró que la adrenalina no sólo producía una disminución de la actividad total de la sintetasa sino también una

disminución de la glucógeno sintetasa I en diafragmas intactos.

Por otra parte se sabe que la insulina aumenta la penetración de glucosa en el músculo y produce acumulación de glucógeno. No se encontró acción de la insulina sobre la UDPG pirofosforilasa o sobre la fosfoglucomutasa; en cambio, se encontró en diafragmas de ratas (13) que la insulina produce un aumento de la forma I mientras que la glucógeno sintetasa total (I + D) no se modifica.

Fosforilasa.

La fosforilasa del glucógeno (EC 2.4.1.1.: α -1,4-glucan-orto fosfato glucosiltransferasa) cataliza la reacción:



donde G_n designa al glucógeno conteniendo n unidades de glucosa.

En 1943 se describieron dos formas de la enzima de músculo esquelético de conejo (24) (25) llamadas fosforilasa b y fosforilasa a.

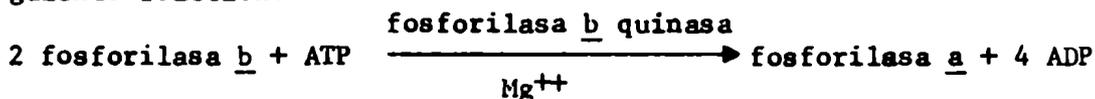
La fosforilasa b es activa sólo en presencia de 5'AMP mientras que la fosforilasa a es activa aún en ausencia de este cofactor. No obstante, es preciso señalar que el 5'AMP no carece totalmente de efecto sobre la fosforilasa a, ya que aumenta su actividad en un 25%. Ambas formas de la enzima han sido cristalizadas a partir de músculo esquelético de conejo, rata y seres humanos (26) (27) (28).

La fosforilasa b cristalina tiene la mitad (185.000) de peso molecular que la fosforilasa a cristalina (370.000) (29).

Ambas formas de la enzima pueden ser disociadas en subunidades por tratamiento con p-cloromercuribenzoato (en dos subunidades la fosforilasa b, en cuatro subunidades la fosforilasa a) (30) de un peso molecular de aproximadamente 90.000 cada subunidad (29).

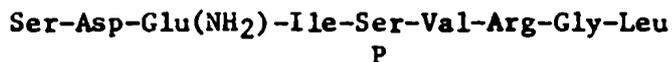
Hay que añadir a las propiedades químicas de las dos formas enzimáticas otras dos características: la presencia de grupos sulfidrilos y de la coenzima piridoxal-5-fosfato unida a la enzima.

Estas dos formas de la enzima son interconvertibles por un mecanismo de fosforilación y defosforilación. Se demostró que la conversión de la fosforilasa b de músculo en fosforilasa a (31) es catalizada por una enzima que requiere metales divalentes para actuar y que transfiere un fosfato del ATP paralelo a una dimerización de la enzima de acuerdo a la siguiente reacción:



La enzima que cataliza esta reacción se denominó fosforilasa b quinasa (32) (ATP: fosforilasa fosfotransferasa EC 2.7.1.38).

En una serie de experimentos tendientes a determinar el sitio fosforilado durante la conversión de fosforilasa b en fosforilasa a (33) se incubó fosforilasa b cristalina con ATP ³²P y fosforilasa b quinasa. La fosforilasa ³²P marcada se hidrolizó con tripsina y se aislaron los péptidos radioactivos. Se vió que el grupo fosfato se unía al grupo OH de la serina situada en la enzima en la siguiente secuencia de aminoácidos:



La fosforilasa b quinasa de músculo de conejo ha sido purificada y se determinó que su peso molecular excede 1.000.000.

Se ha demostrado que cuando este enzima es extraída de un músculo en reposo, es esencialmente inactiva (forma no activada) a pH 6.8 (34); sin embargo este enzima puede ser rápidamente activada por diferentes mecanismos a una forma con mayor actividad a ese pH (forma activada). Se utiliza el grado de activación a pH 6.8 con respecto al de pH 8.2 como índi-

ce de activación.

La fosforilasa b quinasa puede ser activada por los mismos tres mecanismos que transforman la glucógeno sintetasa I en D, es decir que, aún cuando actúan sobre reacciones opuestas son sinérgicos en cuanto a los resultados: por una parte favorecen la glucogenolisis y por la otra frenan la síntesis de glucógeno.

Un método de activación es por preincubación de la fosforilasa b quinasa no activada con Ca^{++} en presencia de un factor proteico (KAF) obtenido de músculo esquelético (35). Recientemente (36) se ha demostrado que este efecto del Ca^{++} es debido a la activación de una enzima proteolítica, lo que demuestra que este sistema de activación carece probablemente de importancia fisiológica como mecanismo regulatorio de control enzimático.

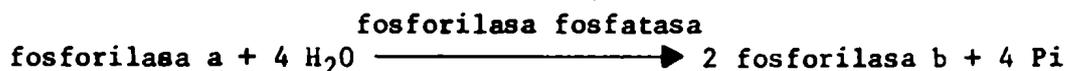
Otro método de activación es por preincubación con tripsina (35).

El tercer método de activación, que por otra parte parece ser el que regula la actividad enzimática fisiológicamente, requiere la fosforilación de la enzima por ATP en presencia de Mg^{++} (34). Incubando fosforilasa b quinasa purificada de músculo de conejo con ATP ^{32}P y Mg^{++} se produce la activación de la enzima, proceso que está acompañado por la fosforilación de la proteína (37); este tipo de activación es potenciado por el añadido de 3'5'AMP cíclico (38).

Recientemente (39) se purificó una enzima que cataliza la fosforilación de la fosforilasa b quinasa por ATP en presencia de 3'5'AMP cíclico; esta enzima se denominó fosforilasa quinasa quinasa y se demostró que la fosforilación de la fosforilasa b quinasa tiene lugar en el grupo OH de la serina al igual que en la fosforilasa del glucógeno (40).

Se describió también en músculo esquelético de conejo (40) (41) una fosfatasa que libera fosfato de la fosforilasa b quinasa fosforilada conduciendo a una inactivación de la enzima.

La transformación de fosforilasa a en fosforilasa b es catalizada por la enzima fosforilasa a fosfatasa (EC 3.1.3.17) de acuerdo a la siguiente reacción: (44):



En esta reacción el peso molecular de la fosforilasa disminuye a la mitad (42) con liberación de Pi (43).

Esta enzima fue descubierta al mismo tiempo que las fosforilasas a y b (25) y fue llamada originalmente "PR enzyme" en la creencia que actuaba eliminando algún grupo prostético de la fosforilasa a. La naturaleza química de la reacción catalizada por la "PR enzyme" permaneció oscura durante un tiempo a pesar que la enzima había sido parcialmente purificada y descritas algunas de sus propiedades. Cuando se determinó que la reacción de conversión de fosforilasa b en fosforilasa a involucraba la fosforilación de la fosforilasa por el ATP (31) (43), se encontró pronto que la reacción de conversión de la fosforilasa a en b en músculo estaba acompañada por liberación de fosfato inorgánico (43) (45).

Esa conversión catalizada por la fosforilasa fosfatasa puede seguirse ya sea por desaparición de la actividad de la fosforilasa a (medida en ausencia de 5'AMP) o por pérdida del fosfato unido a la enzima (liberación de radioactividad de la fosforilasa a marcada con ³²P).

Recientemente (46), trabajando con diafragmas de ratas aislados se encontró que la incubación de los mismos con glucosa daba como resultado una disminución de los niveles de fosforilasa a; estudiando este efec-

con más detalle (47) se encontró que tanto la glucosa como el glucógeno aumentaban la actividad de la fosforilasa fosfatasa extraída de los diafragmas.

Por otra parte, estudiando la enzima de glándula adrenal, Riley y colaboradores encontraron un nuevo punto de control del metabolismo del glucógeno a nivel de la activación de la enzima (48) (49).

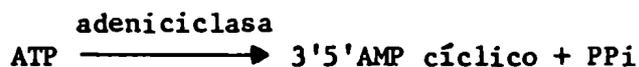
También se describió otro parámetro adicional de control por formación de intermediarios parcialmente fosforilados (50). Estos híbridos "fosfo-defosfo" presentan actividad catalítica y conducta físico-química diferentes a las fosforilasa a y b; poseen elevada actividad enzimática cuando se miden a concentraciones elevadas de glucosa-1-fosfato pero esa actividad disminuye de modo considerable por el agregado de pequeñas cantidades de glucosa-6-fosfato. Se concluyó a partir de esos datos que variaciones en las proporciones relativas de estos ésteres podían aportar un control efectivo y sensible a la utilización del glucógeno.

Con respecto al papel que juegan algunas hormonas en los procesos de glucogenolisis es importante mencionar los efectos provocados por la adrenalina y la insulina.

En 1951 (51) se demostró que, cuando los diafragmas de ratas aislados se incubaban con adrenalina había un gran aumento en la actividad de la fosforilasa a junto con una muy activa glucogenolisis. Esos experimentos se repitieron usando gastrocnemio de rata "in vivo" y sartorio de rana "in vitro" (52); en ambos casos los niveles de fosforilasa a se elevaron a expensas de la fosforilasa b después del tratamiento con adrenalina.

El mecanismo por el cual la adrenalina activaba la conversión de fosforilasa b a fosforilasa a fue dilucidado por Sutherland y colaboradores, quienes aislaron la substancia que actúa como mediadora de la

acción de la adrenalina, el 3'5'AMP cíclico. Se explicaba entonces la acción de la adrenalina, la cual acelera la reacción catalizada por la enzima adenilciclasa:



Fue en 1965 (53) que se dieron las primeras evidencias de que después de la administración de adrenalina había un aumento de la actividad de la fosforilasa b quinasa, paralelo a un aumento de los niveles de fosforilasa a y de 3'5'AMP cíclico. Determinaciones similares se realizaron después de la estimulación eléctrica, comprobándose aumento de los niveles de fosforilasa a y de la actividad de la fosforilasa b quinasa sin un aumento correlativo de los niveles de 3'5'AMP cíclico. Es decir que la fosforilasa b quinasa era estimulada en la estimulación eléctrica por un mecanismo independiente del aumento de los niveles de 3'5'AMP cíclico.

Con respecto al papel de la insulina se demostró recientemente que en músculo esta hormona inhibe parcialmente el efecto de la adrenalina sobre la fosforilasa (54).

Tenemos hasta ahora un panorama bastante completo (y complejo) de los mecanismos que se ponen en juego para degradar el glucógeno. Sólo nos resta considerar la importancia relativa de ambas formas de la fosforilasa en condiciones fisiológicas.

Durante muchos años se aceptó que la fosforilasa a era la única forma activa en condiciones fisiológicas. No obstante, cuando se midieron las concentraciones de 5'AMP en músculo se concluyó que, en condiciones normales, gran parte de la fosforilasa b tendría que ser activa.

Esos resultados, contradictorios con datos anteriores, conduje-

ron a un profundo estudio de los factores que afectan la actividad de ambas formas de fosforilasa.

Se encontró entonces (55) que el ATP era un poderoso inhibidor de la activación de la fosforilasa b por el AMP y luego que también el ADP y la glucosa-6-fosfato actuaban como inhibidores en esas condiciones (56).

Se usaron entonces concentraciones fisiológicas de los metabolitos en los ensayos y se determinó que en esas condiciones la única forma activa era la fosforilasa a mientras que la fosforilasa b era activa cuando las concentraciones de los metabolitos eran superiores a las normales (57).

La actividad glucogenolítica está entonces mediada por dos mecanismos. Uno de ellos, que no requiere energía, es la activación de la fosforilasa b por el AMP en condiciones no fisiológicas. El otro, más efectivo y cuantitativamente más importante en tejidos normales, es la conversión de la fosforilasa b en fosforilasa a.

El propósito del trabajo que presentamos es el de contribuir al esclarecimiento de los mecanismos de control de los depósitos energéticos del músculo, estudiando la regulación enzimática de los niveles de fosforilasa a. También tratamos de determinar el rol que juega el 3'5'AMP cíclico en estas reacciones, conociendo el papel clave de este metabolito en numerosos procesos biológicos.

PARTE EXPERIMENTAL

A) MATERIALES Y METODOS

Esta descripción se divide en dos partes:

- I) Métodos utilizados en la preparación y ensayo de la fosforilasa b quinasa.
- II) Métodos utilizados en la preparación y ensayo de la fosforilasa a fosfatasa.

I) FOSFORILASA b QUINASA

a) Preparación.

La fosforilasa b quinasa se preparó a partir de músculo de conejo de acuerdo al método de Krebs y colaboradores (63) con algunas modificaciones.

Los conejos se anestesiaron con pentobarbital sódico administrado por vía endovenosa. La dosis utilizada fue de 100 mg por Kg de peso. Los animales se decapitaron y desangraron. Los músculos dorsales y de las patas fueron extraídos y rápidamente enfriados en hielo. Luego de ello el tejido se homogeneizó en licuadora con 2.5 volúmenes de EDTA 4×10^{-3} M. El homogeneizado se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 20 minutos y el sobrenadante así obtenido se filtró por lana de vidrio para eliminar el material lipídico. El pH del extracto frío, que estaba usualmente dentro de un rango de pH entre 6.5 y 6.7 se ajustó a pH 5.2 con Acido Acético, a partir de lo cual la solución se enturbió ligeramente. Después de dejarla en frío durante 5-10 minutos se centrifugó nuevamente a 7.000 r.p.m. durante 20 minutos. El precipitado se retomó y homogeneizó en un homogeneizador de vidrio-teflon con una solución (20 ml/100 gr. de tejido) de EDTA 4×10^{-3} M, controlando luego que el pH se mantenga entre 7.0-7.1.

La suspensión ("precipitado ácido") se centrifugó 2 horas a 105.000 x g. El precipitado ("precipitado sin lavar") se purificó disolviéndolo en ClN_a 0.05 M (10 ml/100 gr de tejido) y centrifugándolo a 105.000 x g durante 90 minutos. El sedimento obtenido luego de tres ciclos de resuspensión y centrifugación ("precipitado lavado") se resuspendió en agua y se incubó en las condiciones descriptas abajo.

b) Ensayo.

El ensayo de la fosforilasa b quinasa (Figura 1) consta de tres etapas:

- I) activación de la fosforilasa b quinasa
- II) activación de la fosforilasa
- III) ensayo de la fosforilasa a formada

En la primera etapa se incuba la enzima no activada con buffer y mercaptoetanol en presencia de distintos agregados con diferente capacidad de activación de la enzima a 30° durante 10 minutos. Se detiene la reacción por el agregado de 2.9 ml de una solución de mercaptoetanol 0.01 M, buffer glicerofosfato pH 6.8 0.005 M y EDTA 0.0005 M.

En la segunda etapa se toma una alícuota de la reacción anterior y se la incuba nuevamente a 30°C en presencia de ATP 0.018 M + $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ 0.060 M (0.010 ml), buffer a pH 6.8 ó a pH 8.2 (0.010 ml) y fosforilasa b (0.020 ml). Se detiene la reacción por el agregado de 1.14 ml de una solución fría conteniendo buffer glicerofosfato pH 6.8 0.04 M, EDTA 0.02 M, FNa 0.05 M y mercaptoetanol 0.02 M.

En la tercera etapa se determina la fosforilasa a formada incubando una alícuota de la reacción anterior con glucógeno y glucosa-1-fosfato y determinando la liberación de fósforo inorgánico por el método de Fiske

y Subbarow (64). Se define 1 unidad de fosforilasa b quinasa como la cantidad de enzima que produce 1 nmole de fosforilasa a por minuto por ml de mezcla de ensayo.

c) Activación de la fosforilasa b quinasa.

El procedimiento usual fue incubar una solución relativamente concentrada de quinasa a 30°C con los componentes activantes. Estos eran: a) tripsina, b) ATP-Mg⁺⁺ ± 3'5'AMP cíclico, c) Ca⁺⁺, d) Mg⁺⁺. Después de un tiempo determinado se paró la reacción por dilución como se describió anteriormente. Esa dilución detenía en forma efectiva la activación, mantenía la quinasa y se diluían los componentes activantes de manera que carecían de efecto sobre la reacción de ensayo de la quinasa. La quinasa diluída se ensayaba luego para determinar el grado de activación conseguida. Si se considera que la quinasa no activada tiene poca actividad a pH 6.8 y considerable actividad a pH 8.6 mientras que la quinasa activada tiene gran actividad a ambos pH, se puede concluir que un índice conveniente del grado de activación logrado es la proporción entre el grado de actividad a pH 6.8 sobre el grado de actividad a pH 8.6. Para la quinasa no activada la relación es inferior a 0.1 y se eleva a 0.6 a 1.0 para la quinasa activada de acuerdo a las condiciones.

II) FOSFORILASA a FOSFATASA

a) Obtención de la enzima.

La fosforilasa a fosfatasa se obtuvo a partir de músculo pectoral de paloma.

El tejido se homogeneizó con 2 volúmenes de sacarosa 250 mM conteniendo buffer glicilglicina 50 mM pH 7.2 y se ajustó a pH 7.0. Alícuotas

del homogenato fueron incubadas por diferentes períodos de tiempo a 37°C sin ningún agregado. Las muestras se pasaron luego por columnas de Sephadex G-25 (1 cm x 20 cm) equilibradas con sacarosa 250 mM y buffer glicilglicina 50 mM pH 7.2; se recogió el primer 1.5 ml de eluido coloreado. Ese eluido "preparación cruda" se usó directamente como fuente de enzima en incubaciones posteriores o se precipitó por adición de 1.5 ml de una solución de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (saturado a 5°C y conteniendo EDTA 1 mM). El pellet obtenido por centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos se resuspendió en sacarosa 250 mM y buffer glicilglicina 50 mM pH 7.2 y se pasó la suspensión por columnas de Sephadex G-25 para obtener la "preparación de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ".

En algunos experimentos las columnas de Sephadex se equilibraron con ClNa 20 mM en lugar del buffer glicilglicina; en esos casos los eluidos se ajustaron a una concentración final de 0.05 M con buffer N-etil-morfolina pH 7.2 por añadido de solución 1 M.

Las determinaciones proteicas en el eluido de Sephadex se llevaron a cabo por el método de Lowry y colaboradores (65).

Las condiciones para la reactivación o inactivación de la fosfatasa variaron de acuerdo al tipo de preparación enzimática.

Cuando se usó la "preparación cruda" se incubaron 0.25 ml de enzima a 37°C con las adiciones que se indican en un volumen total de 0.3 ml. Las reacciones se detuvieron por dilución con 2.7 ml de una solución fría conteniendo mercaptoetanol 10 mM, EDTA 5 mM y buffer glicorofosfato pH 6.8 40 mM. En las muestras diluidas se ensayó la actividad de fosforilasa a fosfatasa.

Cuando se usó la "preparación $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ " como fuente de enzima se incubó 0.05 ml con las adiciones correspondientes, en un volumen total

de 0.06 ml. Las reacciones se detuvieron con 0.54 ml de la solución fría de mercaptoetanol-EDTA-buffer glicerofosfato y se ensayó la actividad enzimática.

b) Ensayo.

La actividad de la fosforilasa a fosfatasa se determinó usando como sustrato fosforilasa a de músculo de conejo marcada con ^{32}P y siguiendo la liberación de fosfato radioactivo soluble en ácido tricloroacético.

La mezcla de ensayo de la fosforilasa a fosfatasa contenía:

0.02 ml de enzima

0.01 ml de fosforilasa a ^{32}P (48 unidades Cori; 1.000-3.000 cuentas por minuto por unidad Cori).

Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C durante 5 minutos y se detuvieron por el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético al 5%. Después de centrifugar a 3.000 revoluciones por minuto en una centrífuga clínica durante 30 minutos, se transfirieron los sobrenadantes a viales conteniendo 0.04 ml de KOH 60%. Después de añadirles 5 ml de solución preparada de acuerdo a Bray (66) se midió la radioactividad en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

El fosfato radioactivo liberado durante la incubación se expresó como fosforilasa a consumida de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\begin{array}{l} \text{pmoles de fosforilasa } \underline{a} \text{ consumida} \\ \text{por unidad de tiempo} \end{array} = \frac{\text{cuentas liberadas/minuto}}{\text{cuentas iniciales/minuto}} \times \frac{P \ a}{t.k}$$

t = tiempo de incubación (5 minutos)

P a = actividad inicial de fosforilasa a en la mezcla de ensayo (48 unidades)

k = unidades Cori por pmol de fosforilasa a (0.93); este valor se estimó

suponiendo una actividad específica de la fosforilasa a de 2.515 unidades Cori/mg y un peso molecular de 370.000 (26).

c) Preparación de fosforilasa a radioactiva.

La fosforilasa a radioactiva se preparó por fosforilación enzimática. Se incubó una mezcla conteniendo:

1 ml de fosforilasa b cristalina de músculo de conejo (60.000 unidades Cori).

0.015 ml de mercaptoetanol 1 M

0.200 ml de buffer Tris-HCl pH 8.6

0.1 ml de acetato de magnesio 1 M

1,2 ml de ATP ³²P (5.10⁹ cuentas por minuto; actividad específica 1 mC/mmol)

0.2 ml de fosforilasa b quinasa (11,4 mg de proteína/ml)

durante 20 minutos a 30°C.

La reacción se detuvo por el agregado de una solución conteniendo FNa 100 mM, buffer glicerofosfato pH 6.8 80 mM, mercaptoetanol 40 mM y EDTA 20 mM. Después de añadir 0.05 ml de ATP 100 mM y 0.05 ml de buffer fosfato pH 7.0 1 M se enfrió la mezcla en hielo durante 60 minutos.

La fosforilasa a cristalina marcada se recogió por centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 10 ml de una solución conteniendo FNa 50 mM, buffer glicerofosfato pH 6.8 40 mM, EDTA 10 mM, mercaptoetanol 20 mM, 0.05 ml de ATP 100 mM y 0.05 ml de buffer fosfato pH 7.0 1 M. Se agitó la mezcla a 37°C hasta disolución de la fosforilasa y se dejó cristalizar a 0°C durante 60 minutos.

Después de 5-8 cristalizaciones el precipitado de fosforilasa a cristalina marcada se resuspendió en 5 ml de una solución conteniendo buffer glicerofosfato pH 6.5 5 mM, mercaptoetanol 10 mM, y EDTA 1 mM, más ATP

y buffer fosfato como se indicó anteriormente y se dializó contra la misma solución con excepción del ATP y del buffer fosfato que se omitieron.

Después de 6-16 horas se añadió más ATP y buffer fosfato a la bolsa de diálisis y se renovó la solución de diálisis. La adición de ATP y buffer fosfato y el cambio de la solución de diálisis se repitieron 3-5 veces. Finalmente, la enzima se dializó contra la misma solución, omitiendo el agregado de ATP y de buffer fosfato a la bolsa de diálisis.

En una preparación tipo se obtuvieron 3 ml de fosforilasa a con las siguientes características:

actividad enzimática: 14.000 unidades Cori/ml

actividad específica: 5.000 cuentas por minuto por unidad Cori

relación de fosfato radioactivo unido a fosfato radioactivo libre: 138

d) Preparación del ATP marcado.

El ATP ³²P se preparó de acuerdo a Lowenstein (67) con algunas modificaciones. 10 μ moles de ADP y 10 mC de fosfato radioactivo libre de portador se convirtieron en sal de piridina por pasaje a través de una columna de Dowex 50 (0.8 x 10 cm) (X4,20-50 mesh, forma H⁺) añadiendo piridina en exceso al percolado. La mezcla se secó en un evaporador rotatorio y se añadió luego 0.45 ml de piridina, 0.05 ml de agua y 100 mg de diciclohexilcarbodiimida en un tubo grueso de vidrio.

Después de añadir perlas de vidrio (3 mm de diámetro) se tapó el tubo con una goma cubierta por una hoja de aluminio y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas en un agitador Griffin.

La reacción se paró por el agregado de 10 ml de agua y se filtró la mezcla a través de un embudo con algodón. Se concentró el filtrado en un evaporador rotatorio y se colocó luego en una banda de 10 cm de largo en papel Whatman 3 MM. La cromatografía se llevó a cabo en un solvente de

etanol-acetato de amonio (68) a pH 7.2 durante 20 horas. El acetato de amonio se lavó con etanol absoluto y la banda radioactiva se eluyó con agua.

Habitualmente, 60% del fosfato radioactivo se recuperó como ATP³²P.

e) Preparación de la fosforilasa b cristalina.

La fosforilasa b cristalina de músculo de conejo se preparó de acuerdo a Fischer y Krebs (27).

Se anestesia un conejo por vía intravenosa con 400 mg de Pentobarbital Sódico disueltos en 5 ml de agua. Se desangra al conejo y se le extraen los músculos a temperatura ambiente, homogeneizándolos luego en una picadora de carne. Se mezclan los músculos con 1 volumen de agua y se dejan reposar 10 minutos. Se filtran y al líquido de filtrado se lo recoge en frío, repitiéndose 2 veces más esta operación.

Se juntan los líquidos de los filtrados y se llevan a pH 5.2 con Acido Acético 1 N, centrifugando luego a 7.000 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se filtra por papel y se neutraliza con Bicarbonato de Potasio sólido. Se añaden luego 0.7 volúmenes de Sulfato de Amonio Saturado y se deja sedimentar en frío durante la noche. Se descarta el sobrenadante y el precipitado se pasa a una bolsa de diálisis y se dializa contra Tris-HCl pH 7.4 durante la noche. El dializado se lleva a 20 mM mercaptoetanol y 1 mM EDTA y se ajusta a pH 8.8 con Tris 2 M. Se calienta luego 1 hora a 37°C, neutralizando con Acido Acético 1 N y eliminando el precipitado con centrifugación. Se agrega luego 1/100 del volumen de AMP 0.1 M y 1/100 de Acetato de Magnesio 1 M y se deja cristalizar en frío.

Previa a su utilización la fosforilasa b se pasa por una columna de celulosa con carbón activado a fin de eliminar el AMP utilizado para su cristalización.

PARTE EXPERIMENTAL

B) RESULTADOS

I) FOSFORILASA b QUINASA

Estudiando en detalle la activación de la fosforilasa b quinasa en distintas condiciones se encontró un nuevo mecanismo de activación de esta enzima.

En la Figura 2 se muestra una curva de tiempo de la activación de la fosforilasa b quinasa por preincubación con Mg^{++} . Las activaciones descritas anteriormente en la Introducción y la que se muestra en la figura se caracterizan por provocar un aumento de la actividad de la enzima a pH 6.8 mientras que la actividad de la enzima medida a pH 8.2 sufre poca o ninguna variación. Puede verse que la actividad con Mg^{++} sigue un curso lineal durante los 10 primeros minutos de incubación. También se observa que, contrariamente a lo que ocurre cuando se preincuba la enzima con $ATP-Mg^{++}$, el agregado de 3'5'AMP cíclico no modifica el grado de activación provocado con el Mg^{++} solo.

La activación provocada por la preincubación de la enzima con Mg^{++} planteó algunas dudas sobre la necesidad del requerimiento de ATP en ausencia del 3'5'AMP cíclico. En la Figura 3 y en la Figura 4 A se puede ver que la activación provocada por concentraciones de ATP y Mg^{++} equimoleculares es prácticamente despreciable. Sin embargo, en esas condiciones, el agregado del nucleótido cíclico fue un requerimiento importante para la conversión de la enzima. Por el contrario, cuando las concentraciones de Mg^{++} superaron a las de ATP, la velocidad de la reacción fue similar a la observada en presencia del Mg^{++} solo (Figura 3).

El 3'5'AMP cíclico no solo estimuló la activación provocada por concentraciones equimoleculares de $ATP-Mg^{++}$ sino también la lograda en condiciones en que la concentración de Mg^{++} superaba a la de ATP (Figura

FIGURA 1.- Esquema general del ensayo de la fosforilasa b quinasa.

Activación de la quinasa	Activación de la fosforilasa	Ensayo de la fosforilasa
enzima buffer (pH 7) mercaptoetanol Ca^{++} σ Mg^{++} σ ATP-Mg-3'5' AMP	dilución	
	ATP-Mg ⁺⁺ buffer (pH 6.8 u 8.6) fosforilasa <u>b</u>	dilución
$FbQ_{inact} \rightarrow FbQ_{act}$		glucógeno glucosa-1-P
	$Fb \rightarrow Fa$	
		$G_n + G \cdot 1-P \rightarrow G_{n+1} + P_i$

FIGURA 2.- Curva de tiempo de la activación de la fosforilasa b quinasa por incubación con Mg⁺⁺.

El "precipitado ácido" se dializó contra agua durante 4 horas. Se tomaron alícuotas de esta preparación de 0.020 ml y se incubaron como se describió anteriormente; cuando se añadió, la concentración de 3'5'AMP cíclico fue de 2×10^{-6} M. Las actividades están expresadas como unidades de quinasa en la mezcla de incubación de la activación.

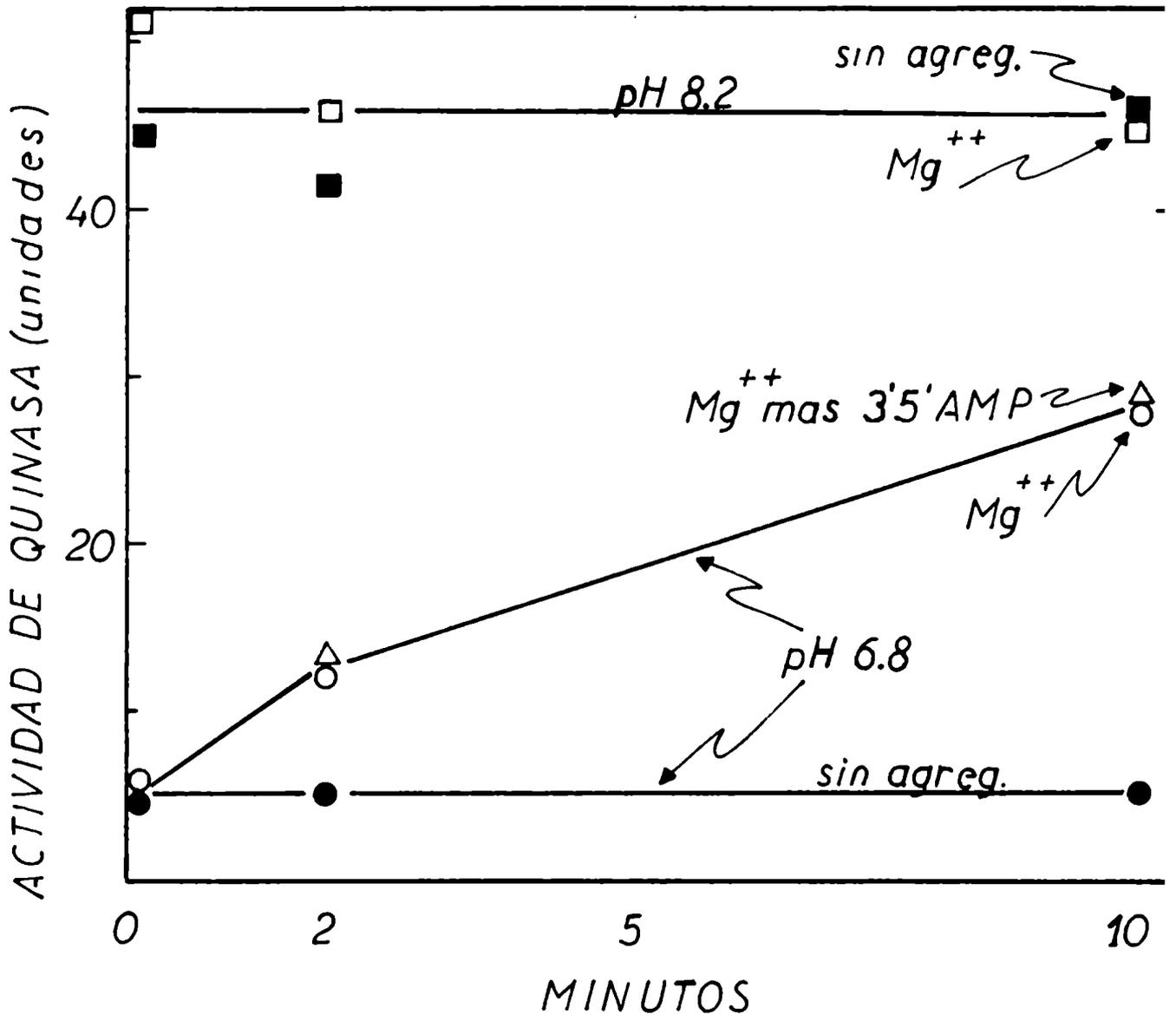


FIGURA 3.- Curva de tiempo de la activación de la fosforilasa b quinasa por diferentes agregados.

Las concentraciones de las sustancias que se agregaron fueron: ATP=Mg⁺⁺, ATP 5 mM y Cl₂Mg 5 mM; ATP=Mg⁺⁺ más 3'5'AMP cíclico, igual que la anterior pero conteniendo 3'5'AMP cíclico 2×10^{-6} M; ATP < Mg⁺⁺, ATP 2.5 mM más Cl₂Mg 5 mM; ATP < Mg⁺⁺ más 3'5'AMP cíclico, igual que la anterior pero conteniendo 3'5'AMP cíclico 2×10^{-6} M; Mg⁺⁺, Cl₂Mg 5 mM; Ca⁺⁺, Cl₂Ca 5 mM. Las actividades de quinasa se determinaron a pH 6.8. Las condiciones restantes fueron como las de la Figura 2.

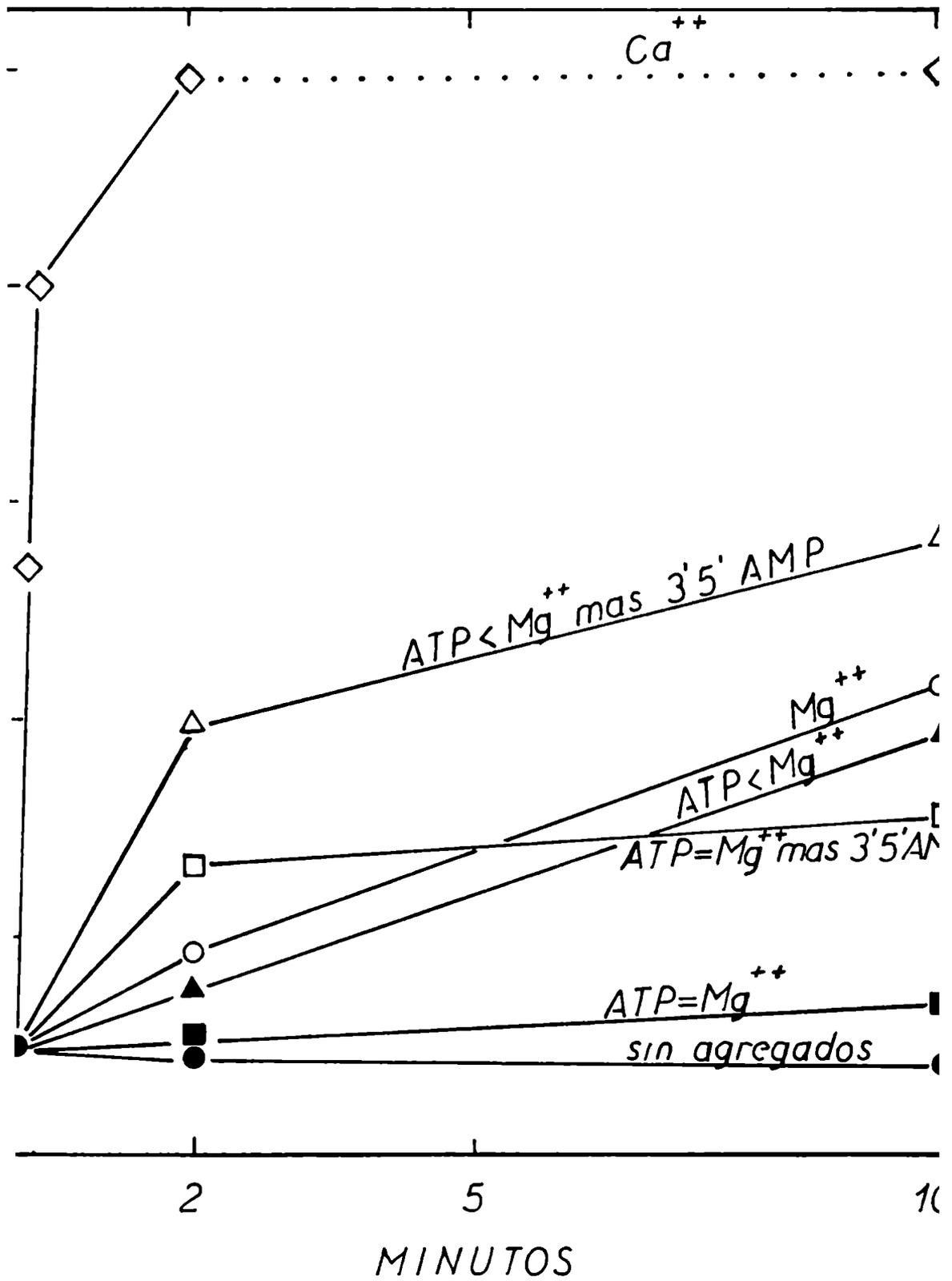
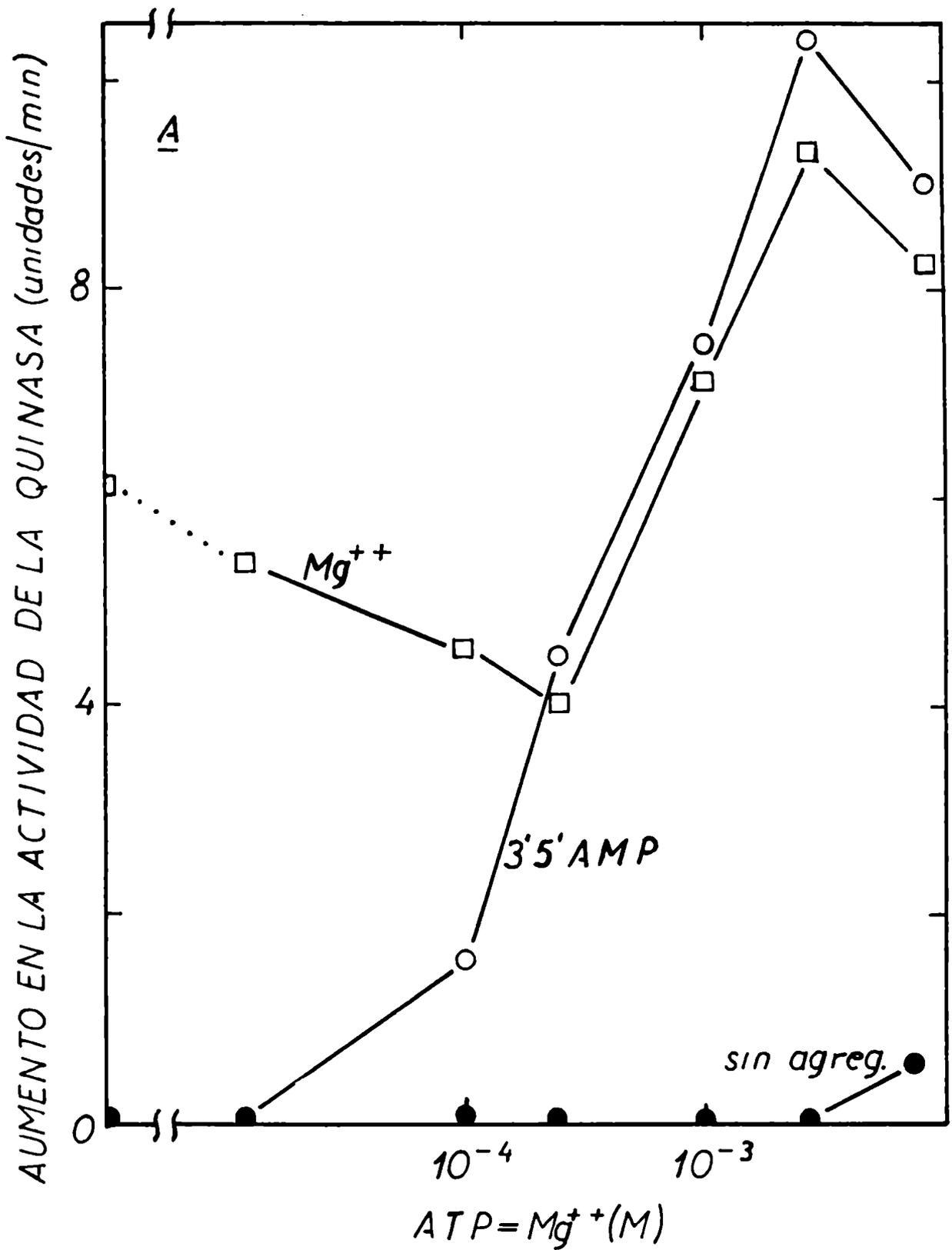
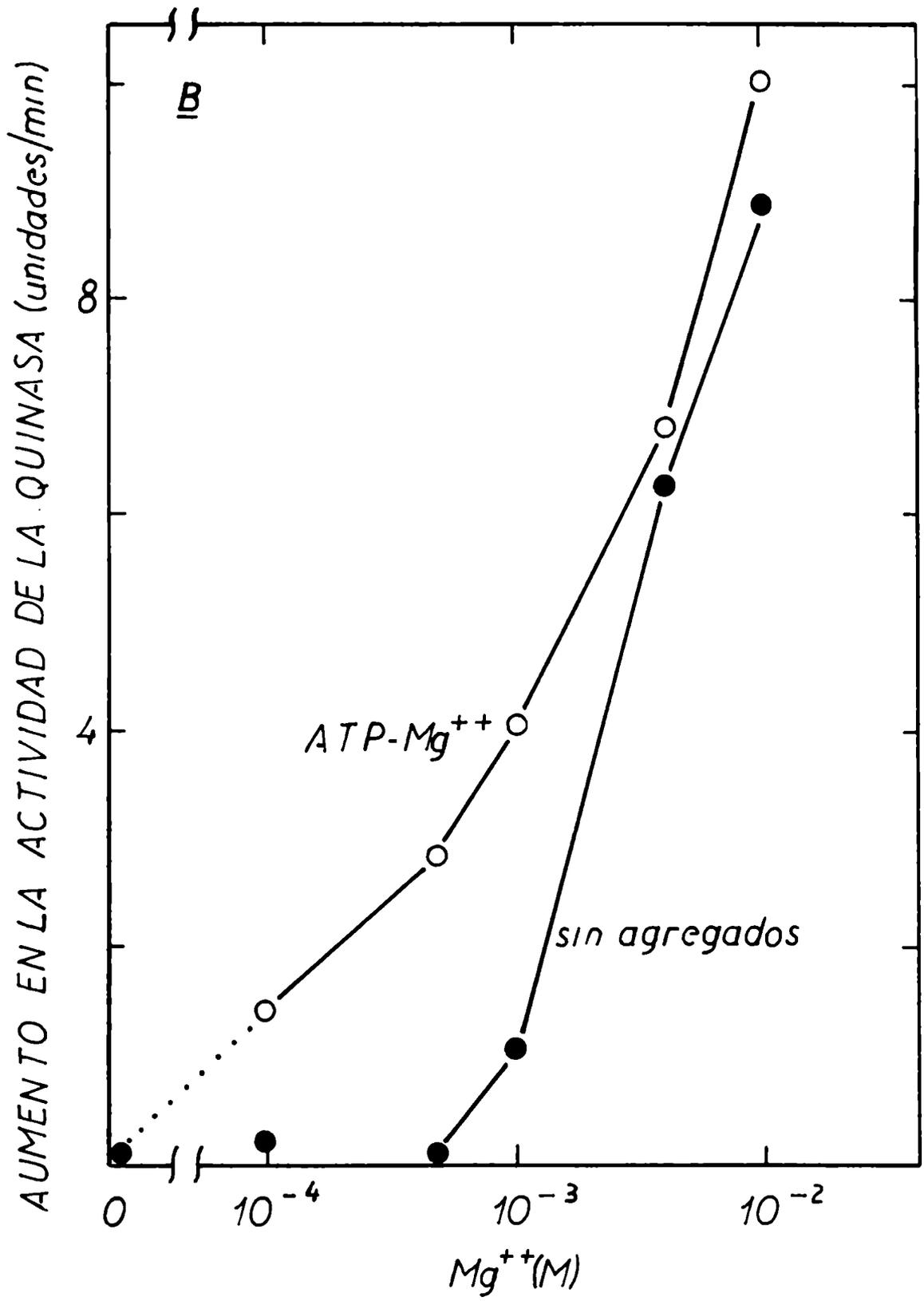


FIGURA 4.- Activación de la fosforilasa b quinasa en diferentes condiciones.

a) Activación de la enzima variando $[ATP]$ y $[Mg^{++}]$ en concentraciones equimoleculares, en presencia y ausencia de 3'5'AMP cíclico o Cl_2Mg 5 mM.

b) Activación de la fosforilasa b quinasa variando la concentración de Mg^{++} , en ausencia y en presencia de ATP y Cl_2Mg a concentraciones equimoleculares (5 mM). El tiempo de incubación fue de 2 minutos. La actividad inicial de fosforilasa b quinasa (pH 6.8) en la mezcla de activación fueron 16.5 unidades. Las activaciones se expresaron como aumentos en la actividad de quinasa (pH 6.8) por minuto, en la mezcla de activación. Las condiciones restantes son las de la Figura 2.





). Además, la curva de tiempo obtenida en esas condiciones, parece a suma de la obtenida en presencia de Mg^{++} más la correspondiente a incubación con 3'5'AMP cíclico más concentraciones de ATP- Mg^{++} equimolares.

Se determinó el efecto de la variación de la concentración Mg^{++} sobre la actividad de la quinasa en ausencia y en presencia de concentraciones equimoleculares de ATP- Mg^{++} (Figura 4 B). El efecto estoratorio del ATP- Mg^{++} sobre el Mg^{++} sólo se hizo evidente a bajas concentraciones del catión.

En la Figura 5 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de Ca^{++} y de Mg^{++} sobre la actividad de la quinasa. Pueden observarse activaciones manifiestas por preincubación con Ca^{++} a concentraciones superiores a 10^{-4} M mientras que la activación por Mg^{++} se coincide con concentraciones superiores a 10^{-3} M.

Cuando se purificó el "precipitado ácido" por centrifugaciones sucesivas a 105.000 x g se observó que la capacidad de la fosforilasa quinasa de las distintas fracciones obtenidas, de ser activadas por Mg^{++} ó ATP- Mg^{++} más 3'5'AMP cíclico, variaba significativamente (Tabla sí por ejemplo, la fracción sobrenadante de 105.000 x g respondía preferentemente al Ca^{++} , mientras que el precipitado de 105.000 x g lo hacía preferentemente con el Mg^{++} .

Por otro lado, todas las fracciones obtenidas fueron activables en grado similar por ATP- Mg^{++} más 3'5'AMP cíclico.

Es importante destacar que luego de un lavado el precipitado de 105.000 x g perdía casi toda la capacidad de responder al Mg^{++} . Estos datos indicaban de hecho que se requería cierto factor para activar a fosforilasa b quinasa en presencia de Mg^{++} . Tal requerimiento se

FIGURA 5.- Activación de la fosforilasa b quinasa en función de la concentración de Ca^{++} o Mg^{++} .

Las condiciones son similares a las de la Figura 3.

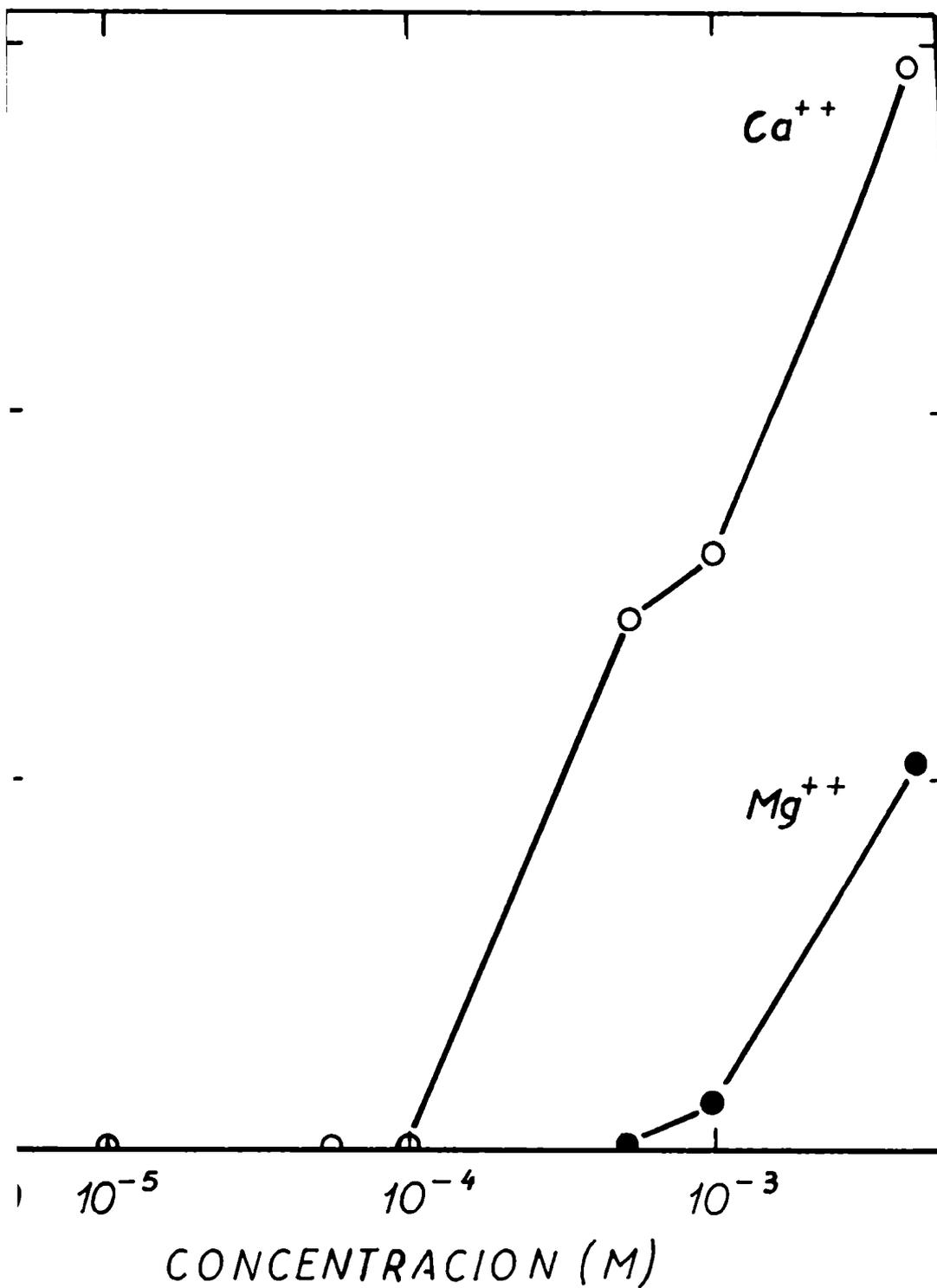


TABLA I

Actividad de fosforilasa b quinasa y activación por varios agentes de distintas fracciones de fosforilasa b quinasa de músculo de conejo.

FRACCION	ACTIVIDAD			ACTIVACION (porcentaje/min) (*)		
	U/mg/ prot.	$\frac{6.8}{8.2}$	U/ml	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	ATP.Mg 3'5'AMP
Precipitado Acido	17.2	0.17	234	8.7	100	7.8
Sobrenadante de 105.000 x g	21.1	0.12	93	3.5	221	9.4
Precipitado de 105.000 x g	12.9	0.20	377	7.4	59	5.2
Sobrenadante de 105.000 x g centrifugado a 155.000 x g (precipitado)	65.3	0.11	182	2.1	61	15.1
Precipitado lavado de 105.000 x g	15.7	0.24	412	1.2	14	5.5

El fraccionamiento se efectuó según se indicó en el texto. Las activaciones se efectuaron según las condiciones indicadas en la Figura 4.

(*) Incremento en actividad de quinasa [(Unidades a pH 6.8) / minutos / actividad quinasa (unidades a pH 8.2)] x 100.

cia en la Figura 6. Se puede ver que solo cuando se incubaba con Mg^{++} y con dicho factor hay activación de la enzima. También se observa que dicha activación es proporcional a la cantidad de factor utilizado.

El factor responsable de la activación por Mg^{++} pudo ser separado del correspondiente a la activación por Ca^{++} según dos procedimientos:

- a) Cromatografía en TEAE-celulosa. En esas condiciones se separó una fracción que sobresalía con el pico de exclusión y que tenía la propiedad de restablecer el efecto del Mg^{++} . Esta fracción carecía casi completamente de actividad de fosforilasa b quinasa y del factor proteico requerido para la activación del Ca^{++} (Figura 7).
- b) Absorción selectiva en Gel de Fosfato de Calcio. Se separó una fracción con características similares a la anterior (Figura 8).

Varias evidencias indican que la activación de la quinasa por Mg^{++} no requiere ATP. La dialisis de la enzima o la adición de hexoquinasa más glucosa a la mezcla conteniendo Mg^{++} no modificaba el grado de activación provocado. Por otra parte, ya se vió que cuando se añade ATP a la mezcla conteniendo Mg^{++} solo se consigue estimular la conversión de la quinasa a concentraciones del nucleótido superiores a 10^{-4} M (Figura 4 A) mayores que la concentración de ATP presente en la preparación enzimática (10^{-5} M).

El tratamiento de la fosforilasa b quinasa con Mg^{++} da lugar a una modificación en sus parámetros cinéticos (Tabla II). Comparando la enzima no activada con respecto a la activada con Mg^{++} se vió que esta última sufre un aumento de la velocidad máxima a pH 6.8 cuando se la ensaya a altas concentraciones de su sustrato, la fosforilasa b. En esas condiciones no se observó ningún cambio de la K_m aparente (Figura 9).

FIGURA 6.- Requerimientos para la activación de la fosforilasa b quinasa por iones Mg^{++} .

El "precipitado lavado" (0.04 ml) se incubó 4 minutos o no se incubó en ausencia o presencia de Mg^{++} y en ausencia (barras vacías) o en presencia (barras rayadas y barras llenas) de 0.02 ml de "precipitado no lavado" diluído. Los números encima de las barras indican la relación de actividad de la quinasa medida a pH 6.8 y 8.2. Las condiciones restantes son similares a las de la Figura 3.

ACTIVIDAD DE FOSFORILASA b QUINASA
a pH 6.8 (unidades $\times 10^{-2}$)

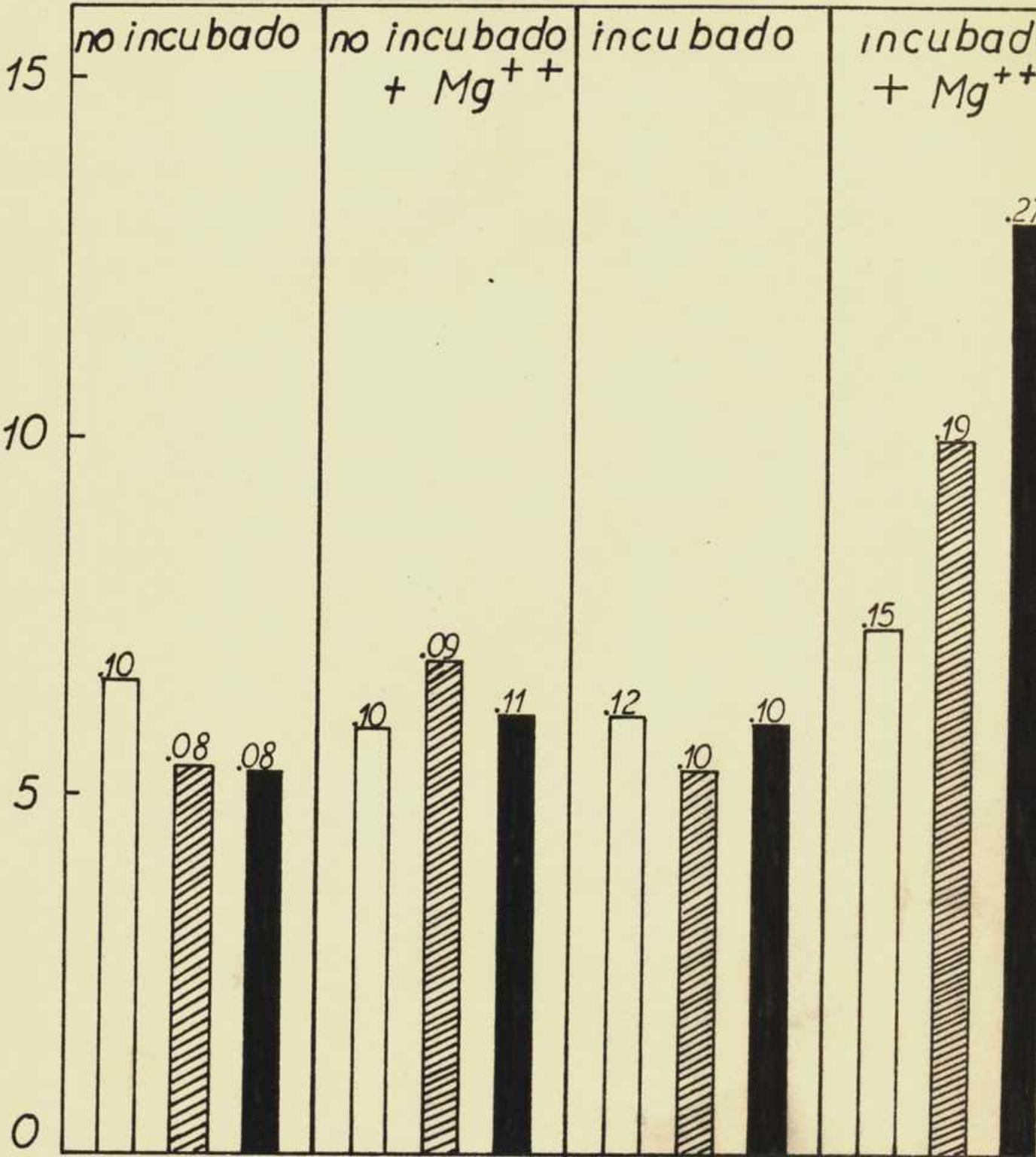


FIGURA 7.- Cromatografía en TEAE-celulosa de un "precipitado no lavado".

La columna (0.8 x 4.5 cm) equilibrada con N-etilmorfolina pH 7.0 50 mM se cargó con 2 ml del precipitado resuspendido (9 mg de proteína/ml). Luego de lavar con el mismo buffer se eluyó por etapas con las concentraciones de Cl₂Na indicadas por las flechas conteniendo dicho buffer. El volumen de cada fracción fue de 2 ml. Las activaciones se realizaron utilizando como fuente de fosforilasa b quinasa un "precipitado lavado" según las condiciones indicadas en la Figura 6.

Barras claras: activación por Mg⁺⁺.

Barras oscuras: activación por Ca⁺⁺.

Círculos oscuros: contenido en proteína.

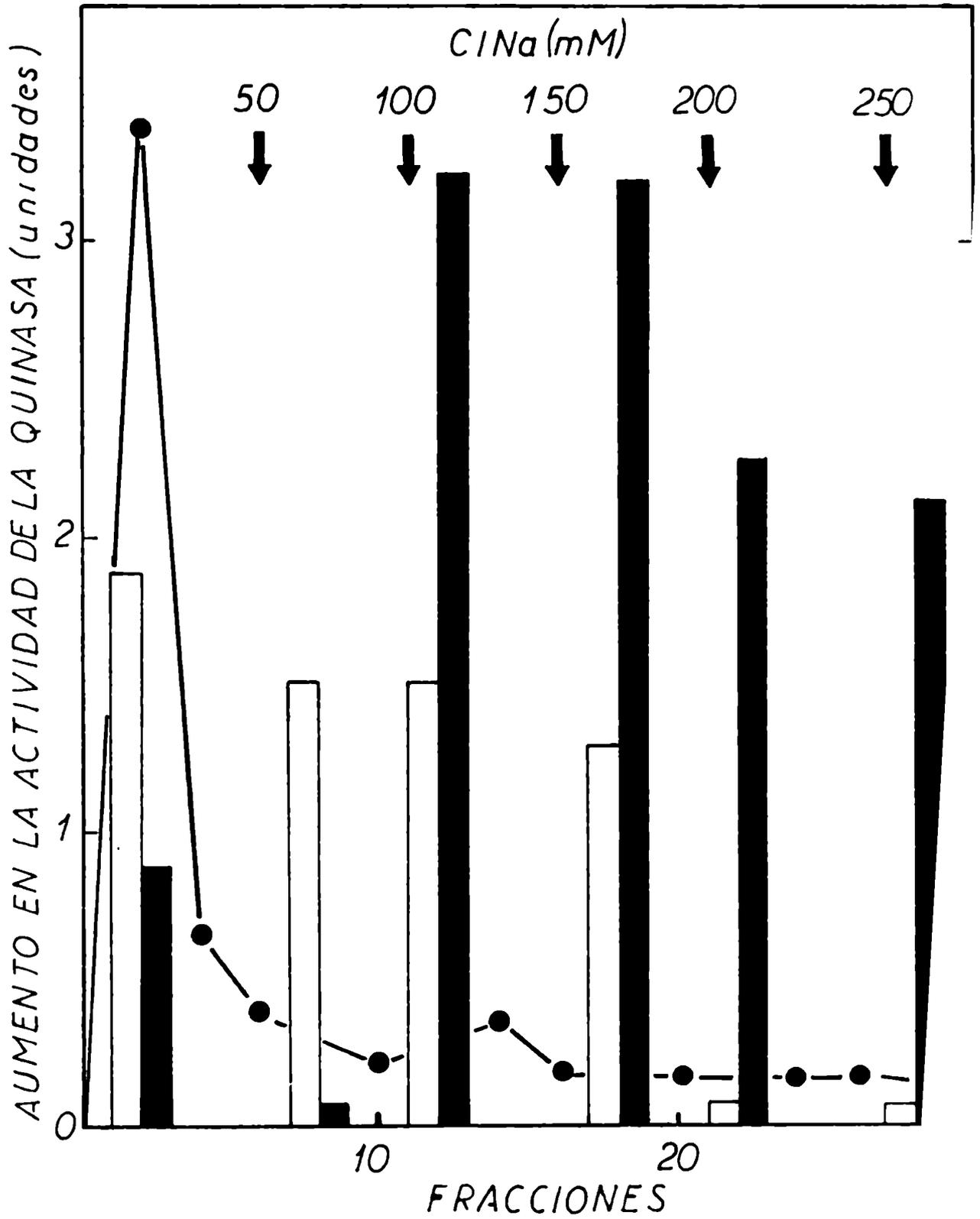


FIGURA 8.- Adsorción en Gel de Fosfato de Calcio.

Un "precipitado no lavado" (0.6 ml) se adsorbió con cantidades variables de un precipitado de gel de fosfato de calcio en presencia de buffer N-etilmorfolina pH 7.0 50 mM. La mezcla se dejó a 0° durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 x ρ durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos. Las activaciones se realizaron utilizando como fuente de fosforilasa b quinasa un "precipitado lavado" según las condiciones indicadas en la Figura 6.

Barras claras: activación por Mg^{++}

Barras oscuras: activación por Ca^{++}

Círculos oscuros: contenido total de proteína en cada fracción.

AUMENTO EN LA ACTIVIDAD DE LA QUINASA (unidades)

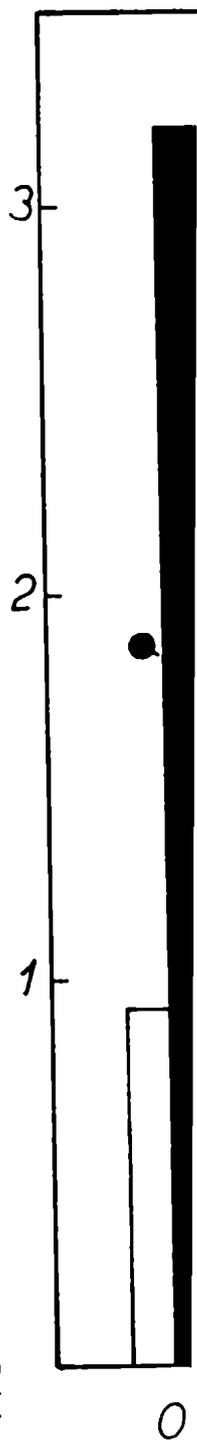


TABLA II

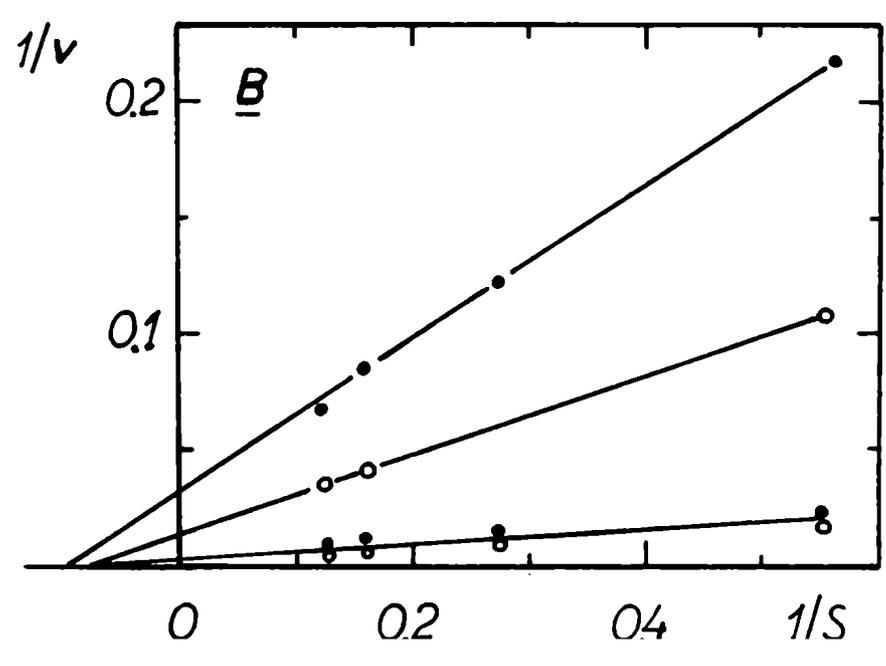
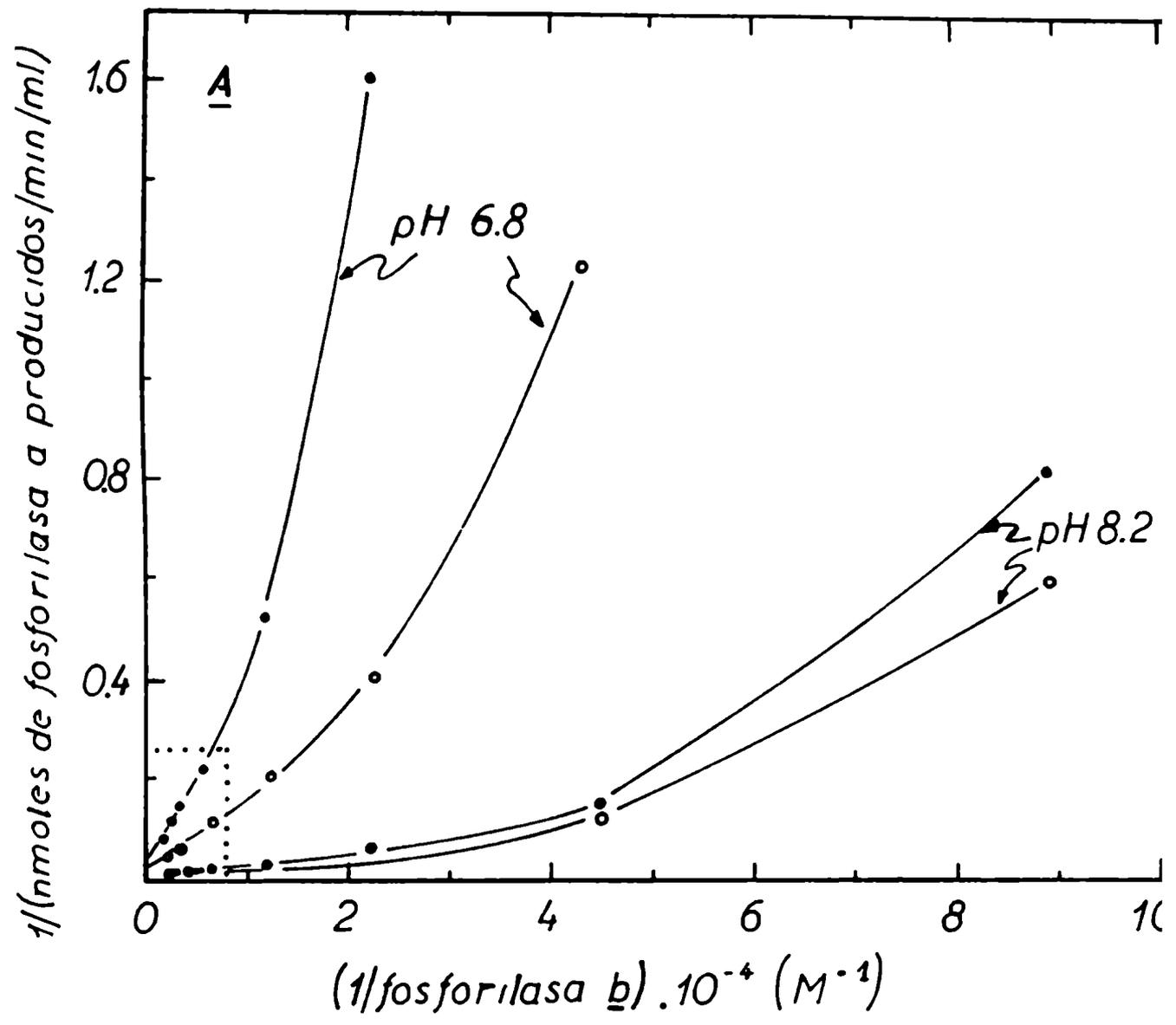
Parámetros cinéticos de la fosforilasa b quinasa activada o no por iones
Mg⁺⁺.

QUINASA	ENSAYO		PARAMETRO CINETICO	
	pH	Vmx (umoles/min/ml)	S _{0.5} (M. 10 ⁻⁵)	n
No Activada	6.8	26.3	9.1	1.1
	8.2	300	7.4	1.1
Activada	6.8	71.4	9.7	1.1
	8.2	300	7.4	1.1

Los valores obtenidos han sido calculados a partir de los resultados indicados en la Figura 9.

FIGURA 9.- Actividad de fosforilasa b quinasa en función de la concentración de fosforilasa b en el ensayo.

El "precipitado ácido" se incubó (○) o no se incubó (●) a 30° durante 10 minutos en presencia de iones Mg^{++} según las condiciones de la Figura 3. Luego se ensayó la actividad de fosforilasa b quinasa en presencia de concentraciones variables de fosforilasa b. Los resultados obtenidos se graficaron según el método de Lineweaver y Burk.



La activación de la fosforilasa b quinasa por Mg^{++} o por $ATP-Mg^{++}$ con o sin 3'5'AMP cíclico pudo ser inhibida por un extracto calentado de músculo. Ese inhibidor (18) es muy similar al factor inhibidor de la glucógeno sintetasa. Ambos factores no pudieron ser separados por cromatografía en Sephadex G-75 o en TEAE celulosa, a pesar que la activación de la fosforilasa b quinasa era más sensible al inhibidor que la conversión de la glucógeno sintetasa. En la Tabla III se muestra la inhibición de la activación de la fosforilasa b quinasa en distintas condiciones. Puede verse que la activación por Mg^{++} es muy sensible a este factor; también se observa que, cuando la concentración de ATP iguala a la de Mg^{++} , el agregado de 3'5'AMP aumentó sensiblemente la capacidad de inhibición. La activación por Ca^{++} fue sensible a este factor inhibidor.

Finalmente, y con objeto de determinar la reversibilidad del proceso de activación provocado por el Mg^{++} se tomó una enzima activada, se la purificó por centrifugación a 105.000 x g y la enzima así obtenida se incubó con mercaptoetanol (Figura 10). Puede verse que la enzima perdió actividad cuando se la ensayó a pH 6.8 y a pH 8.2. Sin embargo, ambas actividades se recuperaron parcialmente cuando se incubó la quinasa inactivada con $ATP-Mg^{++}$ y 3'5'AMP cíclico. Esos resultados sugieren la posibilidad que la quinasa activada por Mg^{++} puede revertir a una forma inactiva a ambos pH (fosforilasa b quinasa inactiva).

TABLA III

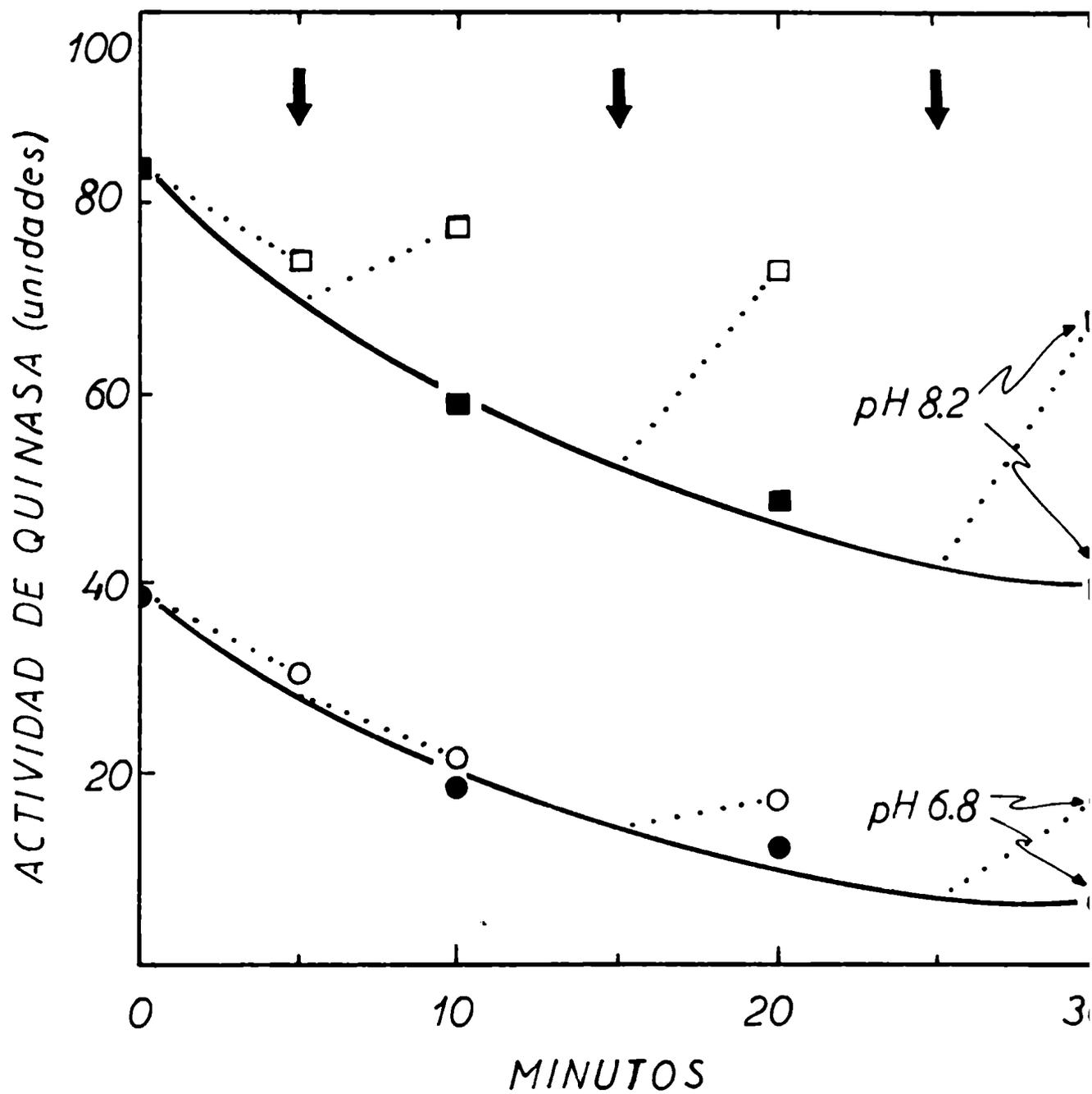
Efecto de un extracto calentado de músculo sobre las activaciones de la fosforilasa b quinasa.

ACTIVACION	ADICION DEL INHIBIDOR			INHIBICION %
	Ninguno	antes activacion	despues activacion	
Mg ⁺⁺	2.85	0.45	2.10	84
Ca ⁺⁺	54.00	24	55.80	56
ATP = Mg	0.60	0.45	1.20	25
ATP=Mg + 3'5'AMP	6.45	0.45	6.30	93
ATP < Mg ⁺⁺	3.30	1.20	3.90	64
ATP < Mg ⁺⁺ -3'5'AMP	10.65	1.80	10.50	85

Las activaciones se realizaron en condiciones similares a las indicadas en la Figura 4 en presencia o ausencia de .020 ml de "extracto calentado". El "extracto calentado" se precipitó con ácido tricloroacético y dializó según el método indicado previamente (18). Los valores indicados en las 3 columnas centrales corresponden al incremento en actividad de quinasa (unidades a pH 6.8/min).

FIGURA 10.- Reversión de la fosforilasa b quinasa activada por Mg^{++} .

El "precipitado no lavado" obtenido a partir de 20 ml de "precipitado ácido" se resuspendió en 5 ml y se dializó durante 3 horas contra agua. La preparación dializada (relación de actividad a pH 6.8 y 8.2, 0.16) se incubó a 30° durante 10 minutos con los siguientes agregados: buffer N-etilmorfolina pH 7.0, 150 μ moles; mercaptoetanol, 120 μ moles y Cl_2Mg 60 μ moles. El volumen total fue de 5 ml. La reacción se paró por el agregado de una solución fría conteniendo buffer glicerofosfato pH 6.8, 50 mM; mercaptoetanol 25 mM, ΓNa 65 mM y EDTA 12.5 mM. Esta preparación se centrifugó durante 90 minutos a 105.000 x g y el precipitado obtenido se trató por el procedimiento de resuspensión -centrifugación descripto. El precipitado final se resuspendió en 1 ml de agua y se incubaron alícuotas de 0.040 ml a 30° en presencia de mercaptoetanol 20 mM y N-etilmorfolina pH 7.0, 25 mM. El volumen total fue 0.1 ml. La reacción se paró a los tiempos indicados como se describió anteriormente. Cinco minutos antes de parar la reacción (flechas verticales) algunas incubaciones no recibieron (símbolos llenos) pero otras sí recibieron (símbolos vacíos) 0.020 ml de una solución conteniendo ATP 25 mM, Cl_2Mg 25 mM y 3'5'AMP cíclico 2×10^{-5} M.



PARTE EXPERIMENTAL

B) RESULTADOS

II) FOSFORILASA a FOSFATASA

Conversión de fosforilasa a ^{32}P marcada en fosforilasa b.

La conversión de fosforilasa a en fosforilasa b puede seguirse ya sea por la desaparición de la actividad de la fosforilasa a o por la liberación de fosfato inorgánico radioactivo.

Como puede verse en la Figura 11, hay una buena correlación entre el fosfato radioactivo liberado y la disminución de la actividad de la fosforilasa a en el ensayo standard.

La Figura 12 muestra que la liberación de radioactividad de la fosforilasa a ^{32}P marcada es proporcional al tiempo de incubación y a la concentración de la enzima.

Características de la conversión de la fosforilasa a ^{32}P marcada en fosforilasa b.

Efecto de la concentración de sustrato.

En la Figura 13 se muestran los gráficos de las inversas de las velocidades iniciales de la reacción catalizada por la fosforilasa fosfatasa de músculo contra la concentración de la fosforilasa a ^{32}P marcada.

La inactivación de la fosforilasa fosfatasa disminuye la velocidad máxima, no observándose cambio alguno en la K_m aparente para la fosforilasa a ^{32}P marcada. (curvas a y b). A pH 6.3, en presencia de teofilina 0.45 mM el valor de la constante aparente de Michaelis fue 0.25×10^{-6} M de fosforilasa a ^{32}P marcada (230 unidades Cori/ml). Cuando

FIGURA 11.- Correlación entre el cambio de actividad enzimática y la liberación de fosfato radioactivo soluble en ácido tricloroacético durante la incubación de fosforilasa fosfatasa de músculo pectoral de paloma con fosforilasa a marcada con ^{32}P .

Una "preparación cruda" se obtuvo a partir de un homogenato de músculo pectoral de paloma que no fue incubado a 37° . La enzima se diluyó en buffer glicerofosfato pH 6.8 40 mM, conteniendo EDTA 5 mM y mercaptoetanol 10 mM para obtener una concentración de 0.78 mg de proteína por ml. Las incubaciones se llevaron a cabo como se describe en la PARTE EXPERIMENTAL en presencia de teofilina 1.25 mM. Las reacciones se pararon por el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético 5% para el ensayo radioactivo o con 2.5 ml de buffer glicerofosfato pH 6.8 40 mM conteniendo NaF 50 mM, EDTA 10 mM y mercaptoetanol 20 mM en el ensayo enzimático. La radioactividad (●—●) se contó en el sobrenadante de ácido tricloroacético como se describe en la PARTE EXPERIMENTAL. Los ensayos de fosforilasa a (○—○) se llevaron a cabo en ausencia de AMP con el método de Cori y colaboradores (26).

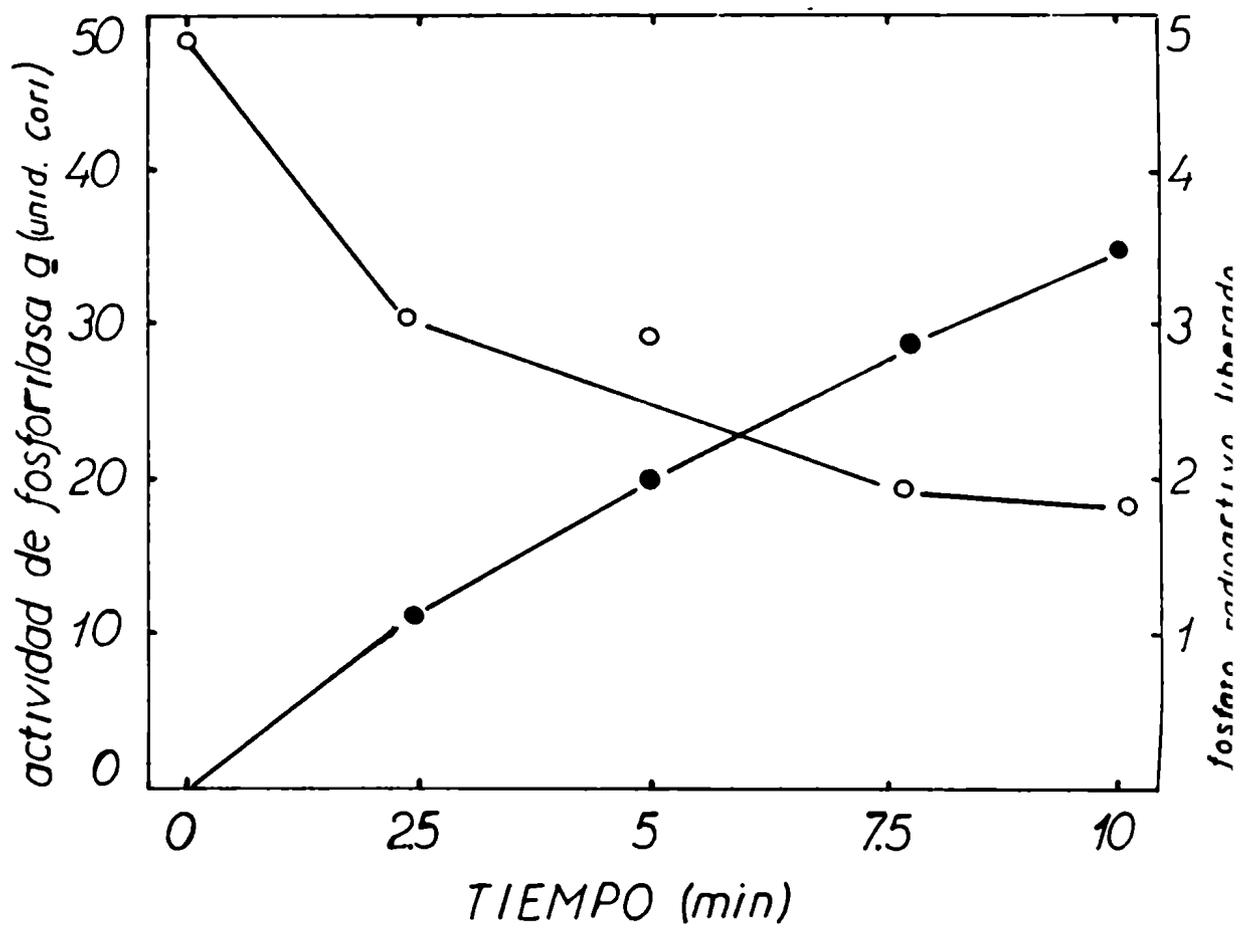
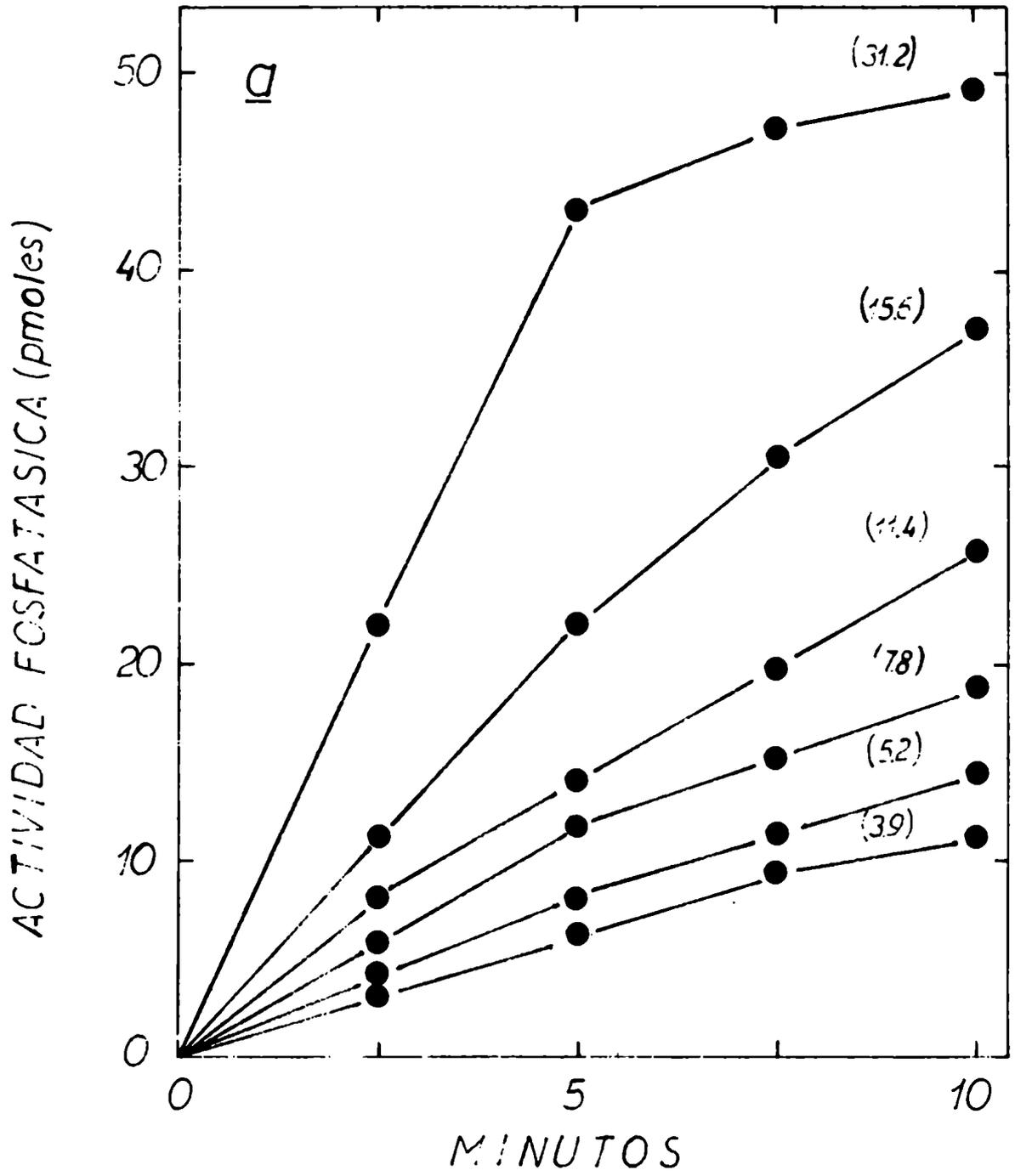


FIGURA 12.- Relación entre tiempo de incubación, concentración de enzima y actividad de fosforilasa fosfatasa de una preparación cruda de músculo pectoral de paloma.

a) Curva de tiempo de las reacciones llevadas a cabo con las mezclas de reacción conteniendo los μg de proteína indicados entre paréntesis.

b) Dependencia de la actividad fosfatásica de la concentración de enzima. Las actividades enzimáticas correspondientes a las incubaciones llevadas a cabo en 5 minutos se graficaron en función de los μg de proteínas en el ensayo de fosfatasa. Las condiciones restantes son iguales a las de la Figura 11.



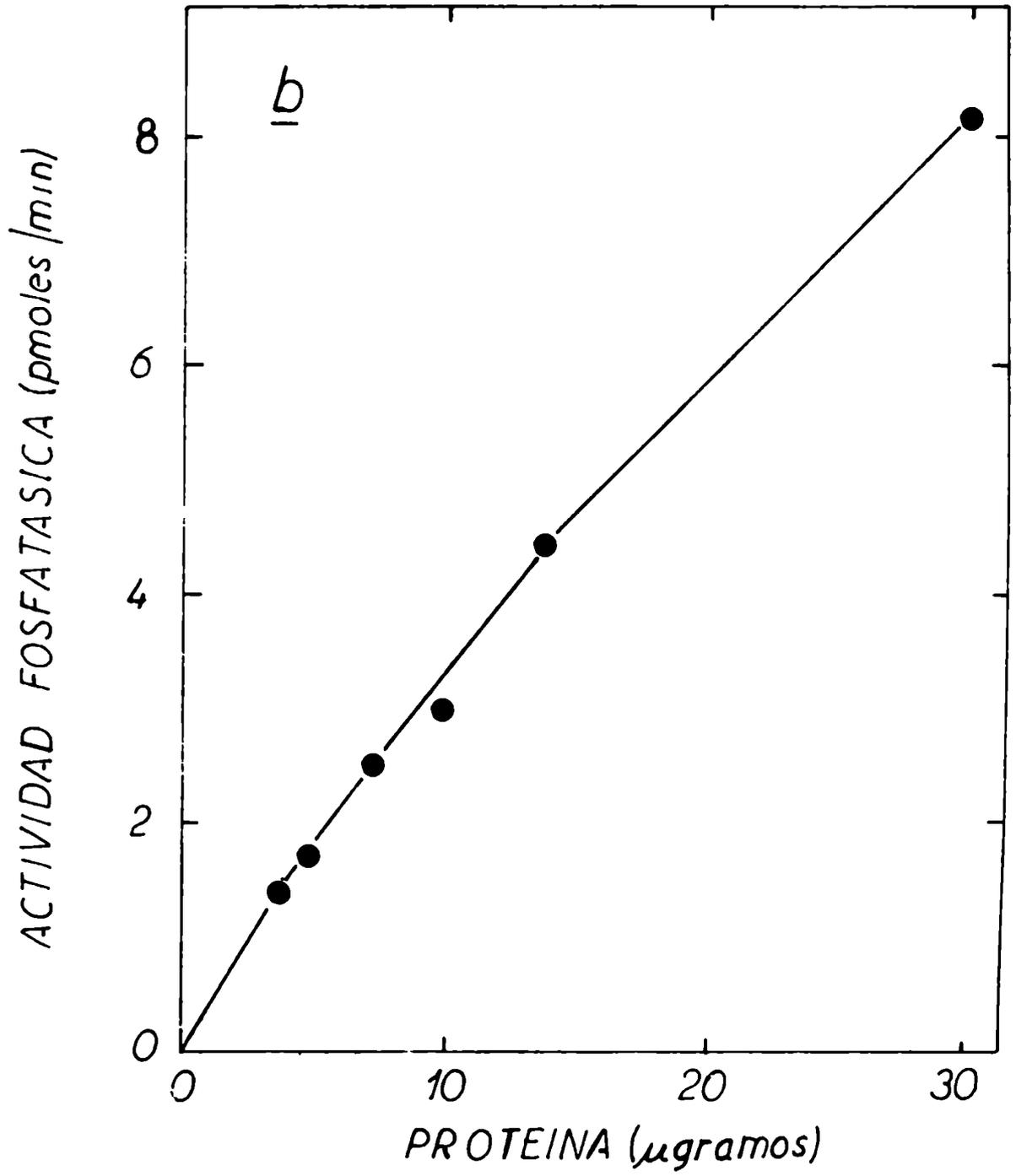
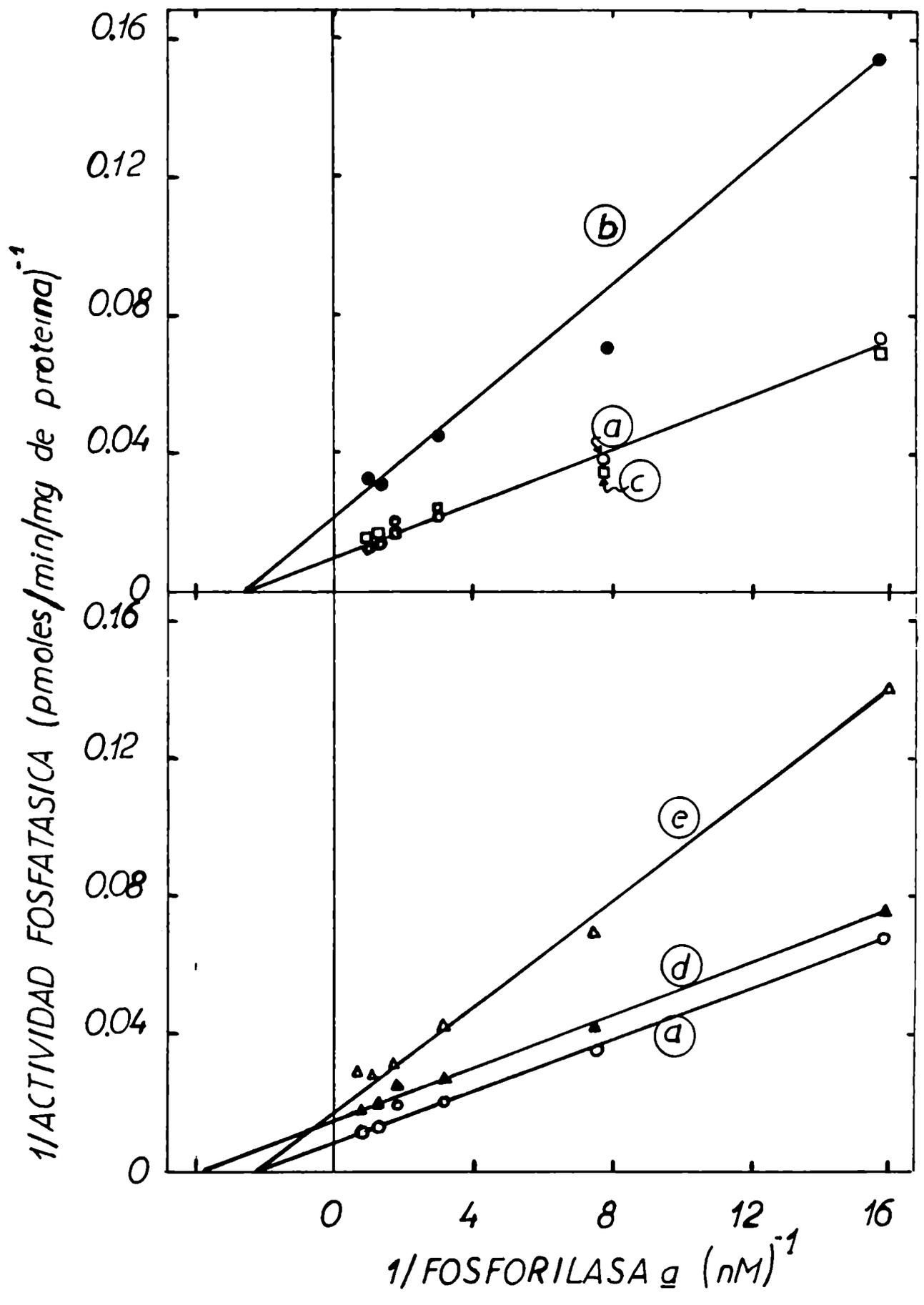


FIGURA 13.- Efecto de la concentración de fosforilasa a sobre la actividad de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

En los experimentos correspondientes a las curvas a, d y e la enzima utilizada fue la preparación cruda obtenida de un homogenato que nose incubó a 37° (enzima activa). En la curva b la enzima fue una preparación cruda obtenida de un homogenato tratado durante 40 minutos a 37° (enzima inactiva). Esa preparación enzimática (0.25 ml) fue posteriormente incubada con mercaptoetanol 10 mM, teofilina 6.7 mM, ATP-MgCl₂ 2.5 mM y creatina-fosfato-MgCl₂ 5 mM durante 5 minutos a 37° en un volumen total de 0.3 ml. La reacción se paró por el agregado de 2.7 ml de una solución conteniendo buffer glicerofosfato pH 6.8 40 mM, EDTA 5 mM y mercaptoetanol 10 mM (enzima reactivada). La curva c representa el experimento llevado a cabo con esa enzima. Antes de ser ensayadas, todas las preparaciones enzimáticas se diluyeron en la solución de glicerofosfato-EDTA-mercaptoetanol y alícuotas de esas diluciones se pasaron nuevamente por columnas de Sephadex G-25 equilibradas con NaCl 10 mM conteniendo EDTA 5 mM y mercaptoetanol 10 mM. El pH de las muestras se ajustó luego a 6.8. Las incubaciones para determinar la actividad fosfatásica se llevaron a cabo como se indica en la PARTE EXPERIMENTAL con la diferencia que el volumen total fue 0.04 ml con los siguientes agregados: curvas a, b y c, teofilina 0.45 mM; curva e, teofilina 0.45 mM más ATP 2.5 mM. La curva d no tiene ningún agregado.



se reactivó la enzima inactivada se obtuvo una preparación que se comportaba como la fosfatasa activa inicial (curva c).

Curvas de pH.

La dependencia del pH en la reacción de la fosfatasa se muestra en la Figura 14. En presencia de teofilina 0.45 mM no había mayores diferencias entre una preparación de fosfatasa activa y la enzima inactivada reactivada.

Como puede verse en la Figura las actividades máximas se encontraron entre los pH 8.0 y 8.3 (curvas a y b).

La inactivación de la fosfatasa condujo a una disminución de la actividad en todos los pH probados (curva c).

La curva d corresponde a la incubación llevada a cabo en ausencia de teofilina.

Efecto de la teofilina.

Con el objeto de inhibir la actividad fosfodiesterásica del 3'5' AMP cíclico en la reacción de la fosforilasa fosfatasa se agregó teofilina como componente standard de la mezcla de reacción de la activación e inactivación de la enzima.

Como puede verse en la Figura 15 y en la Tabla V (experimento I y II), la teofilina estimulaba la fosfatasa y el efecto de esta sustancia se ejercía en el ensayo de la enzima.

Se trató entonces de obtener algún conocimiento de la naturaleza de la activación de la fosfatasa por la teofilina; para ello se comparó la actividad de la enzima medida a diferentes concentraciones de fosforilasa a ^{32}P marcada en presencia y ausencia de teofilina.

FIGURA 14.- Actividad fosfatásica en función del pH.

Curvas a y d, enzima activa; curva c, enzima inactiva; curva b, enzima reactivada. Las mezclas de ensayo tuvieron una concentración final de glicerofosfato 50 mM y de buffer Tris 50 mM a los pH indicados. Las incubaciones se llevaron a cabo en presencia (curvas a, b y c) o ausencia (curva d) de teofilina 0.45 mM. Las condiciones restantes son las descritas en la Figura 13.

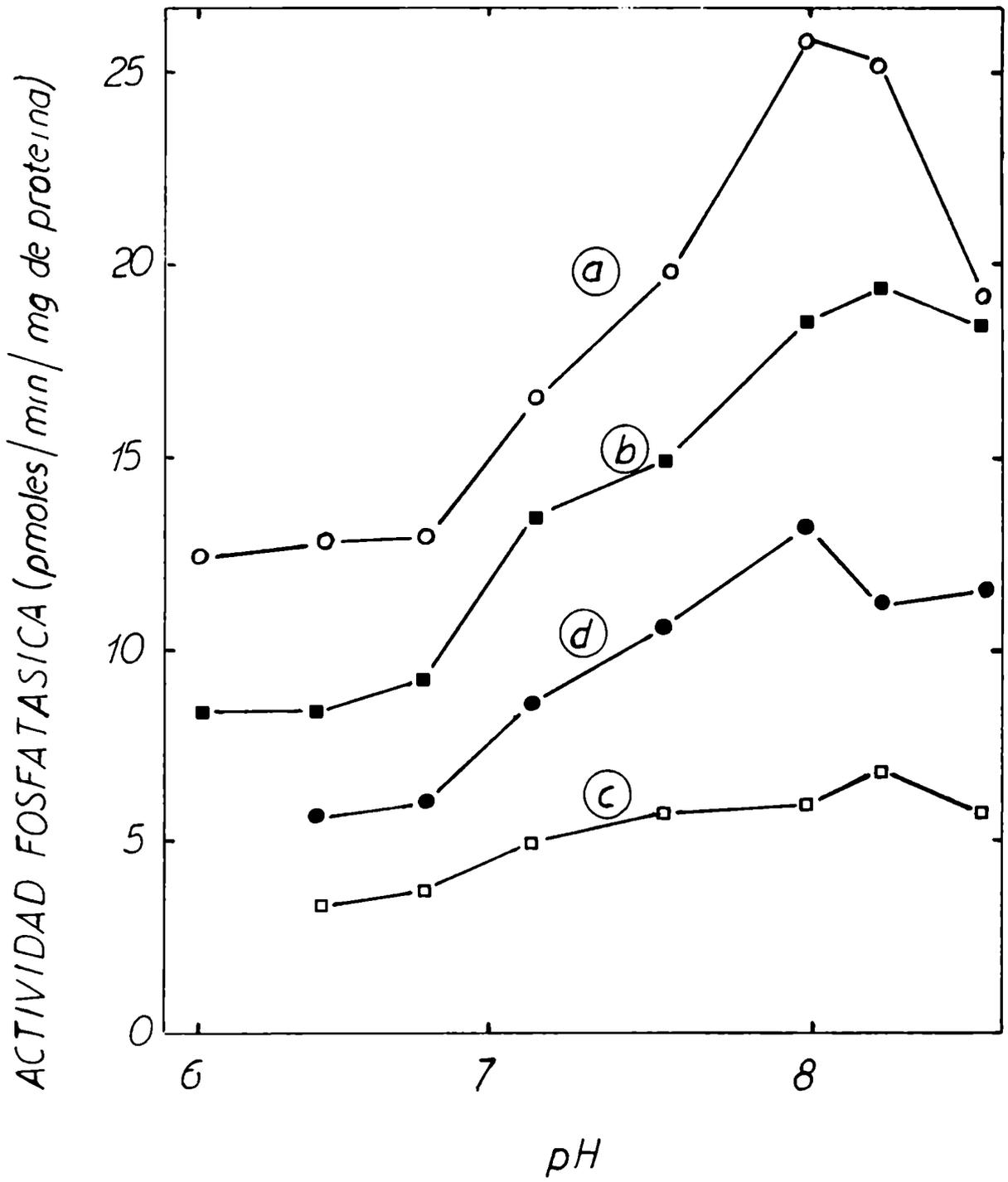


TABLA IV

Efecto de diferentes nucleótidos y metabolitos sobre la actividad de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

ADICIONES	ACTIVIDAD (p moles/min por mg de proteína)
Ninguna	53
ATP	2
ADP	0
AMP	1.3
UTP	7
CTP	9.4
GTP	2.7
Carbamil-fosfato	33
Creatina fosfato	38
Pirofosfato	2.4
Fosfato	39

Se obtuvo una "preparación $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ " a partir de un homogenato que no fue incubado a 37° . Se diluyó la enzima en buffer glicerofosfato pH 6.8 40 mM conteniendo EDTA 5 mM y mercaptoetanol 10 mM y se ensayó en presencia de teofilina 0.45 mM. Las mezclas de ensayo contenían, además, los nucleótidos y metabolitos que se indican a la concentración final de 5 mM. La actividad de fosforilasa fosfatasa se ensayó como se describe en MATERIAL Y METODOS.

TABLA V

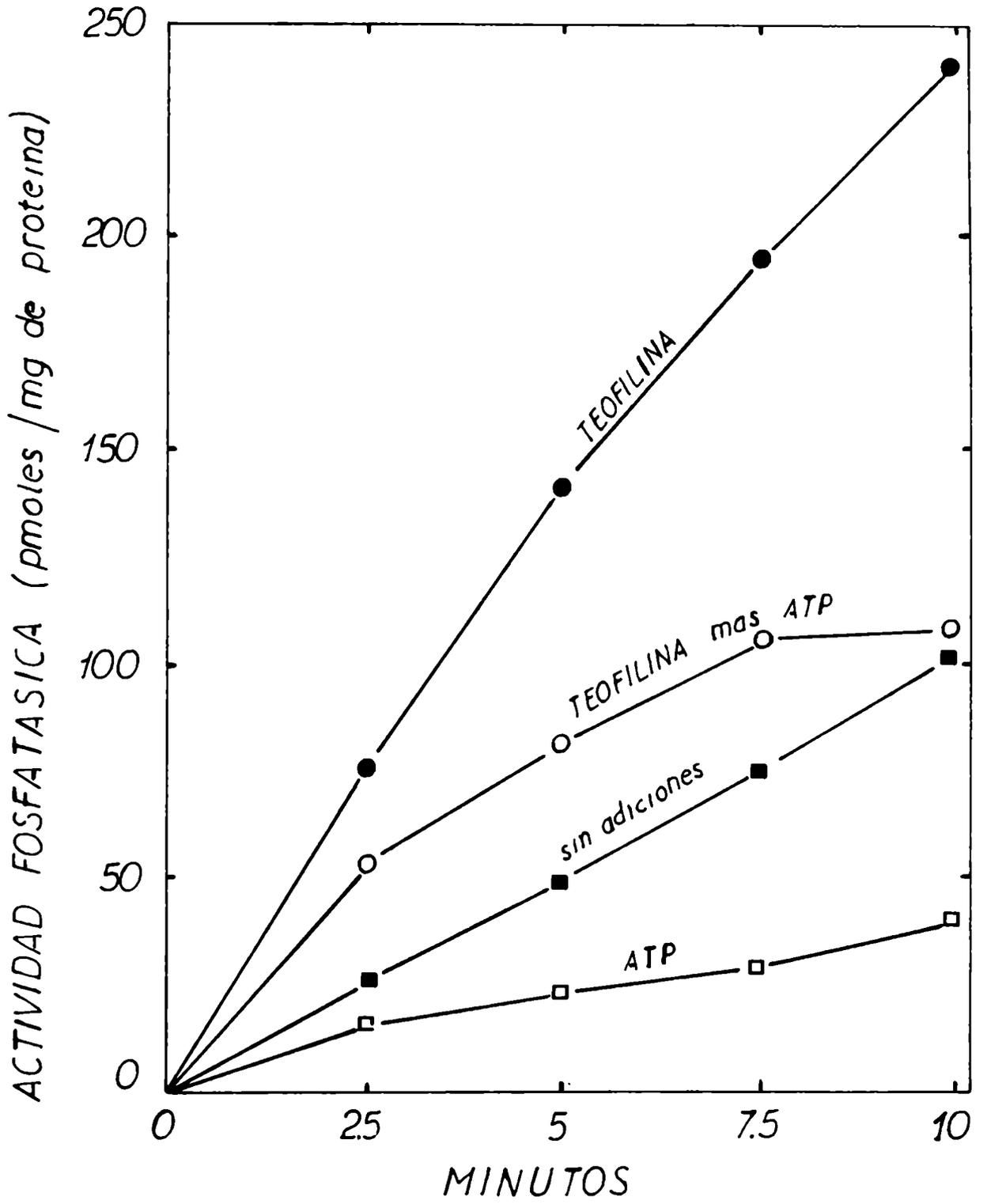
Requerimientos de diferentes sustancias en la activación de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

TIEMPO	ADICIONES	ACTIVIDAD (pmoles/min/mg proteína)		
		Exp I	Exp II	Exp III
0	ninguna	4.3	25.0	
0	mercaptoetanol, teofilina		45.0	34
5	ninguna	2.2	20.0	
5	mercaptoetanol, teofilina	12.2	48.0	
5	mercaptoetanol, teofilina, ATP-Mg ⁺⁺	60.0	72.0	
5	mercaptoetanol, teofilina, CrP-Mg ⁺⁺	43.5	89.0	
5	mercaptoetanol, teofilina, ATP-Mg ⁺⁺ CrP-Mg ⁺⁺	30.0	115.0	
5	mercaptoetanol, teofilina, Mg ⁺⁺	23.5	62.0	
5	teofilina, ATP-Mg ⁺⁺	64.0		
5	teofilina, CrP-Mg ⁺⁺	49.0		
5	teofilina, Mg ⁺⁺	30.0		
5	ATP-Mg ⁺⁺	19.3		
5	CrP-Mg ⁺⁺	26.0		
5	Mg ⁺⁺	8.0		
1	mercaptoetanol, teofilina			30.6
1	mercaptoetanol, teofilina, ATP-Mg ⁺⁺			68.0
1	mercaptoetanol, teofilina, ATP-Mg ⁺⁺ , Mg ⁺⁺			106.0
1	mercaptoetanol, teofilina, CrP-Mg ⁺⁺			44.0
1	mercaptoetanol, teofilina, ATP-Mg ⁺⁺ , CrP-Mg ⁺⁺			100.0
1	mercaptoetanol, teofilina, Mg ⁺⁺			39.2

Las concentraciones finales de los agregados fueron las siguientes: mercaptoetanol, 10 mM; teofilina, 6.7 mM; ATP-MgCl₂, 2.5 mM; CrP-MgCl₂, 5 mM; MgCl₂, 5 mM. En el experimento I la enzima fue un eluido de Sephadex (preparación cruda) obtenido de una homogenato incubado 40 minutos a 37° y en los experimentos II y III la misma preparación fue precipitada con SO₄(NH₄)₂ (preparación SO₄(NH₄)₂). En los experimentos I y II se utilizó como buffer glicilglicina-NaOH (pH 7.5, 0.05 M). En el experimento III se utilizó como buffer N-etilmorfolina pH 7.0. Los agregados se hicieron a tiempo cero y las incubaciones se llevaron a cabo durante los períodos de tiempo indicados.

FIGURA 15.- Efecto del ATP y/o teofilina en la curva de tiempo de la reacción de la fosfatasa.

La concentración final del ATP y de la teofilina fue de 3.1 y 1.25 mM respectivamente. Las otras condiciones son las descritas en la Figura 11.



La Figura 13 (curvas a y d) muestra que la teofilina aumenta tanto la velocidad máxima como la constante aparente de Michaelis de la enzima por la fosforilasa a ^{32}P marcada de tal forma que los gráficos de las inversas de los experimentos llevados a cabo sin el modificador fueron casi paralelos.

Por otra parte, la activación por teofilina fue evidente a todos los pH probados en el rango entre 6.1 y 8.6 (Figura 14, curvas a y d).

También se observó activación de la fosfatasa por la cafeína. Como puede verse en la Figura 16 ambas metilxantinas estimularon la enzima en un grado similar, observándose el efecto óptimo a una concentración de 10 mbi.

Efecto del ATP y de otros modificadores.

Se encontró que varias sustancias disminuyen la actividad de la fosforilasa fosfatasa.

A 5 mM, ATP, ADP, AMP, GTP, UTP, CTP y pirofosfato fueron efectivos. El fósforo inorgánico, la creatina fosfato y el carbanil fosfato también disminuyeron la actividad de la enzima pero sólo ligeramente (Tabla IV).

El efecto del ATP se estudió con más detalle. Como puede verse en la Figura 13 (curva e), en presencia de teofilina 0.45 mM el nucleótido disminuye la velocidad máxima de la reacción cuando la enzima se ensaya a altas concentraciones de fosforilasa a ^{32}P marcada, no observándose cambio alguno en la constante aparente de Michaelis hacia la fosforilasa a. El efecto del ATP parece ser independiente del grado de inactivación de la preparación de fosfatasa (Figura 17 A) y aumentaba con la concentración de este metabolito (Figura 17 A y B).

FIGURA 16.- Efecto de diferentes concentraciones de teofilina y cafeína sobre la actividad de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

La mezcla de reacción del ensayo de fosfatasa contenía las concentraciones de teofilina y de cafeína que se indican. Las condiciones restantes son las descritas en la Figura 14.

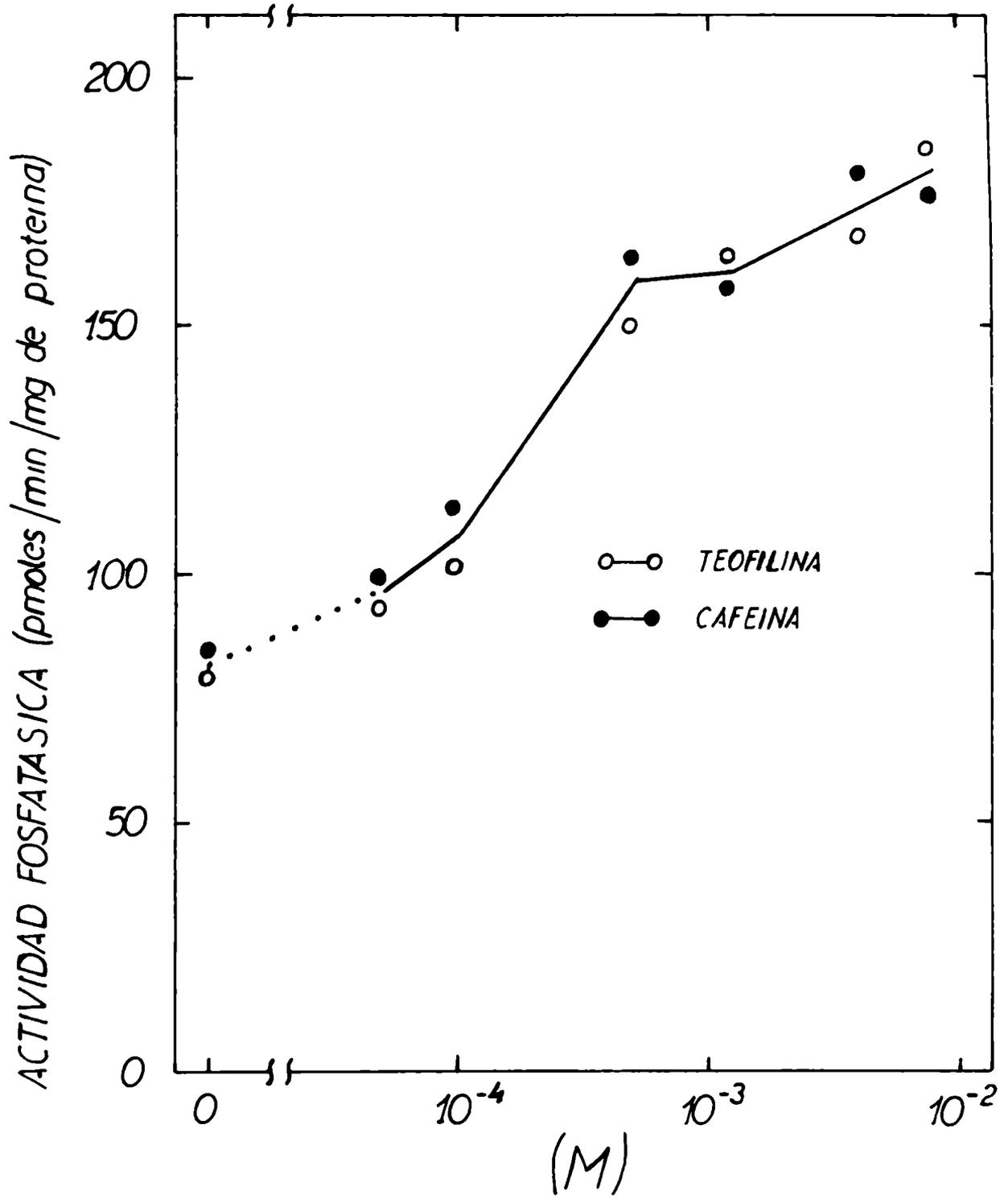
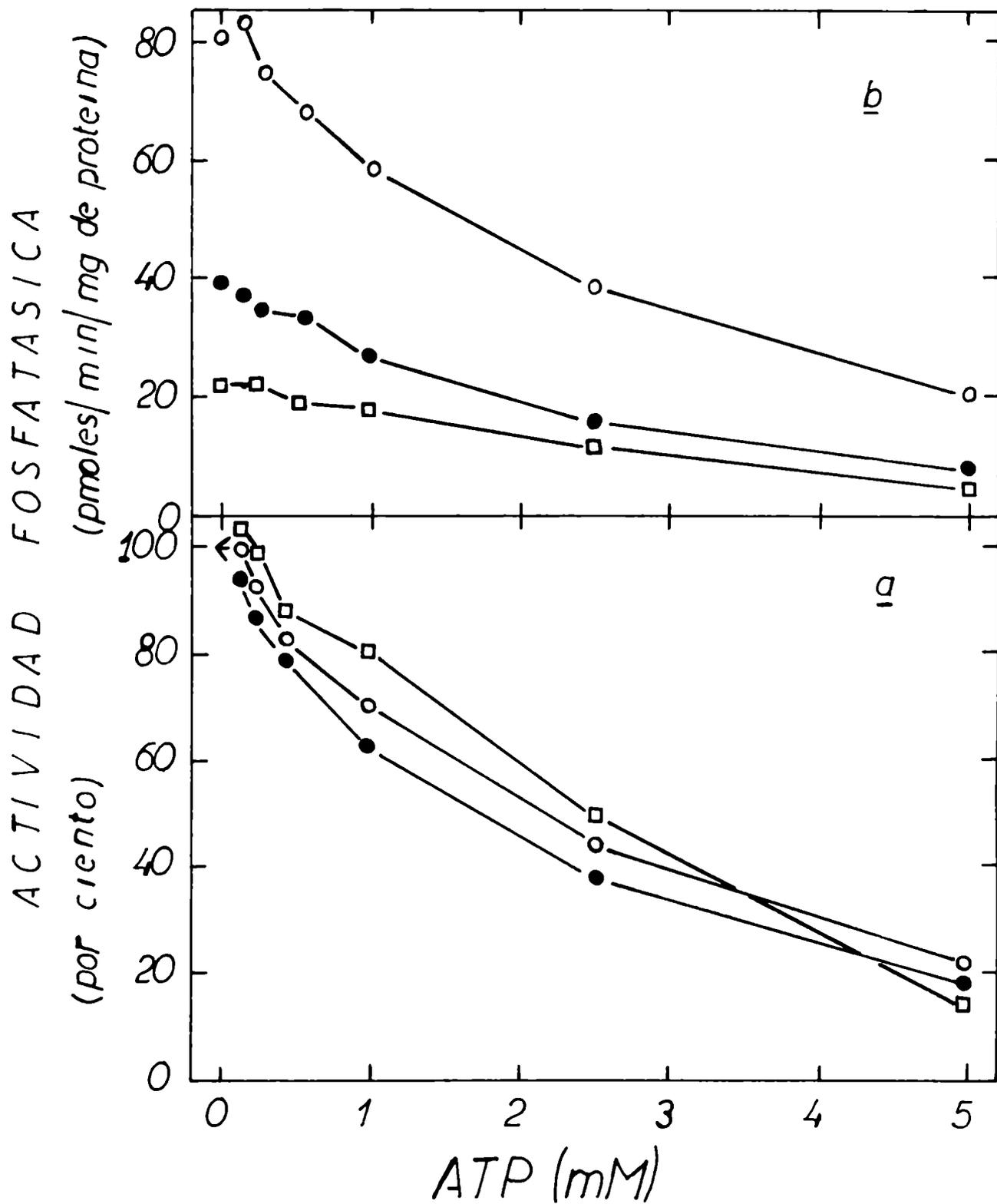


FIGURA 17.- Efecto de diferentes concentraciones de ATP sobre la actividad de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

El experimento se llevó a cabo con preparaciones crudas obtenidas de un homogenato que no se incubó a 37° (O—O) ó de homogenatos que se incubaron 20 minutos (●—●) ó 40 minutos (□—□) a 37°. Las mezclas de reacción para el ensayo de fosfatasa contenían las concentraciones de ATP que se indican más teofilina 0.45 mM. Las condiciones restantes corresponden a la Figura 13.



Algunos hechos indican la naturaleza compleja del efecto del ATP. Por ejemplo, el grado de inactivación de la fosfatasa en presencia del metabolito disminuye rápidamente con el tiempo de incubación (Figura 15). Eso sugiere que en presencia de ATP y en las condiciones del ensayo, preparaciones diluídas de fosforilasa fosfatasa pueden ser convertidas a la forma inactiva en una reacción dependiente del tiempo.

Por otra parte, los experimentos que se muestran en las Tablas IV y VIII y en las Figuras 17 y 25 evidencian en forma clara un llamativo paralelismo entre la capacidad de un compuesto determinado para estimular la inactivación de la fosfatasa y la capacidad correspondiente del mismo compuesto para disminuir la actividad de la enzima en la mezcla de ensayo. Una comparación entre ambos efectos se ve en la Figura 18.

Activación e inactivación de la enzima.

Se diseñaron una serie de experimentos con el objeto de determinar la posibilidad de reactivar preparaciones enzimáticas previamente inactivadas.

En la Figura 19 se puede ver que la incubación del homogenato de músculo pectoral de paloma a 37°C durante distintos períodos de tiempo daba como resultado una disminución de la actividad de la fosforilasa a fosfatasa dependiente del tiempo.

Al estudiar en detalle este efecto se vió que no era debido a una inactivación irreversible de la enzima, ya que la actividad de la misma en el eluído de Sephadex podía ser recuperada incubando nuevamente la enzima con ATP, creatina fosfato y Mg^{++} .

También se vió que, cuando se volvía a incubar la enzima con

FIGURA 18.- Correlación entre la capacidad de un metabolito determinado para disminuir la actividad de la fosfatasa en la mezcla de ensayo y la capacidad del mismo metabolito para estimular la conversión de la forma activa a la inactiva de la enzima.

Los resultados de los experimentos correspondientes a la Tabla IV y a la Tabla VIII se normalizaron y se utilizaron en la construcción de este gráfico. Ambos experimentos se llevaron a cabo con la misma preparación enzimática.

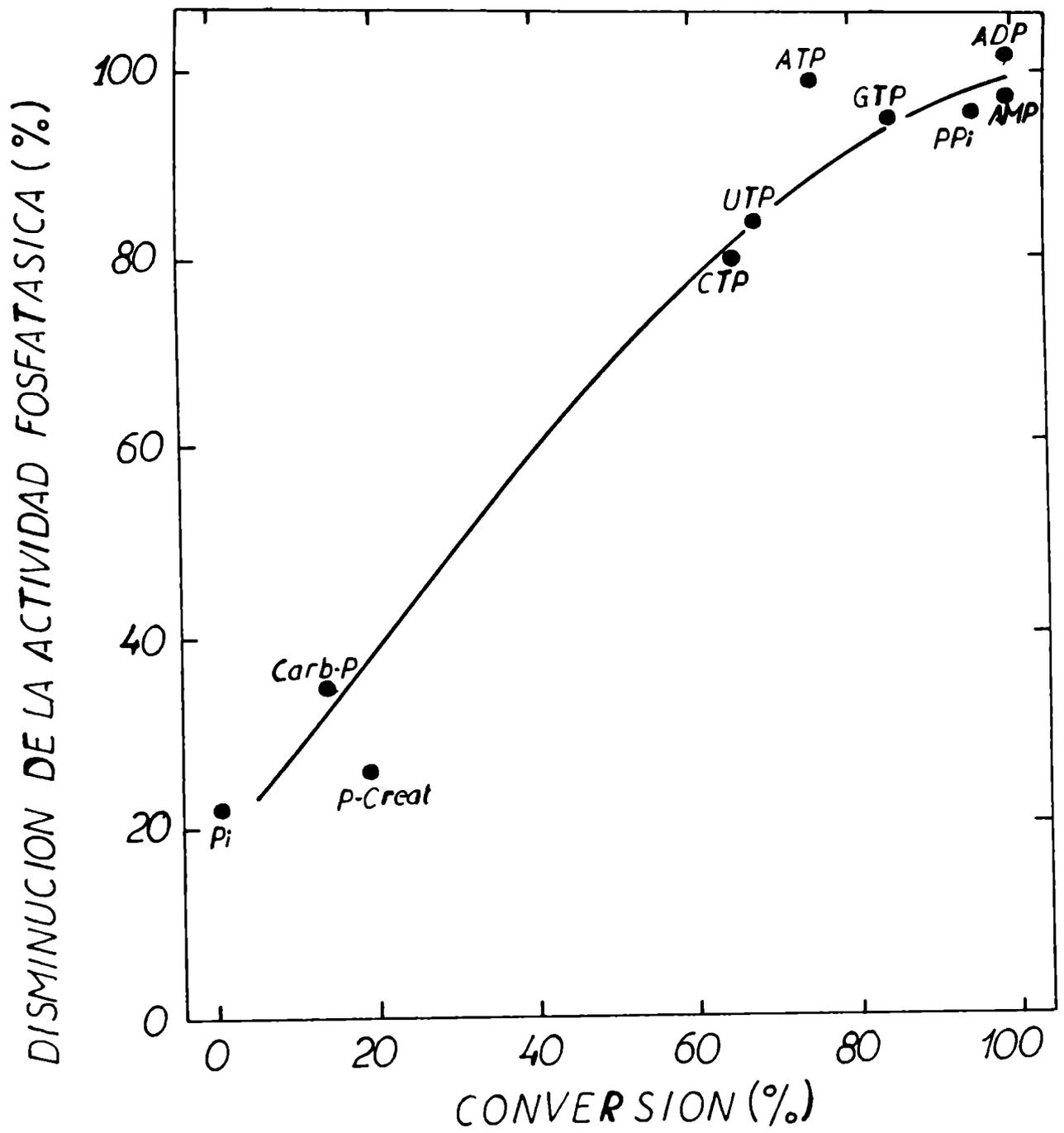
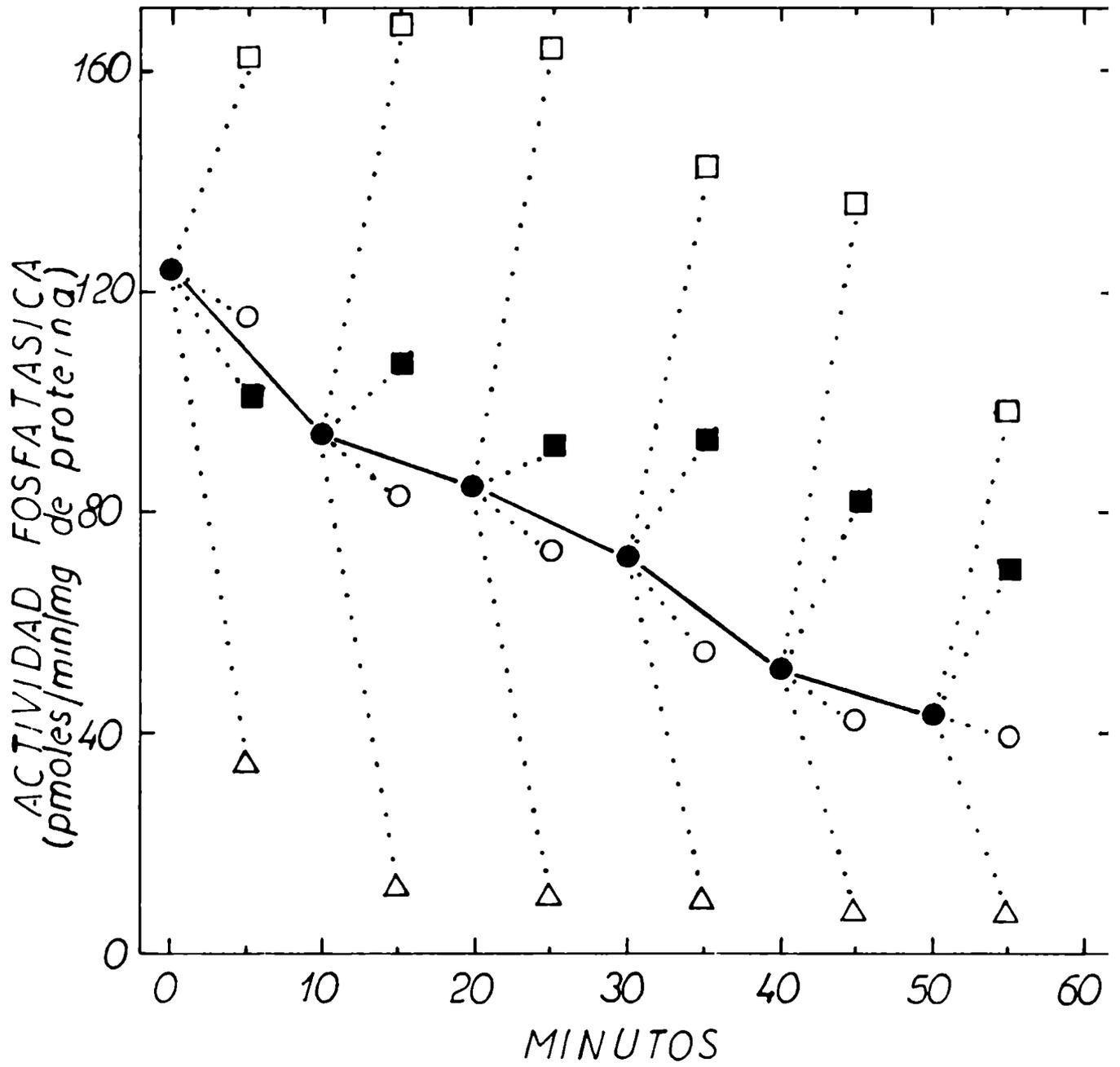


FIGURA 19.- Inactivación y reactivación de la fosforilasa a fosfatasa.

El homogenato de músculo pectoral de paloma se incubó a 37° y se pasó por una columna de Sephadex. La actividad fosfatásica en el eluído se midió después de diluirlo y de añadirle teofilina (●). Se tomaron alícuotas de ese eluído y se incubaron luego durante 5 minutos a 37° en presencia de teofilina 6.7 mM y mercaptoetanol 10 mM más las siguientes adiciones: (○) ninguna; (■) ATP-MgCl₂ 2.5 mM; (□) ATP-Mg 2.5 mM y creatinafosfato-MgCl₂ 5 mM; (△) ATP 2.5 mM. Las condiciones restantes se describen en el texto.



ATP solo, en ausencia de Mg^{++} , se producía el efecto opuesto, es decir una mayor disminución de la actividad de la enzima.

Requerimientos para la activación de la fosfatasa.

Para determinar el efecto activador de diferentes sustancias se partió de una preparación de fosforilasa a fosfatasa parcialmente inactiva obtenida después de preincubar el homogenato durante 40 minutos a 37°C.

En la Figura 20 se puede ver una curva de tiempo de la reactivación de la fosfatasa en presencia de ATP, creatina fosfato y Mg^{++} . Cuando se estudiaron los requerimientos de diferentes sustancias en la activación de la fosforilasa a fosfatasa se utilizaron preparaciones crudas y preparaciones parcialmente purificadas por precipitación con sulfato de amonio. Se añadió este último paso con el objeto de evitar posibles artificios provocados por contaminaciones de metabolitos en las preparaciones crudas.

Las activaciones de la enzima se realizaron en presencia de glicilglicina-NaOH, un buffer complejante de Mg^{++} , diferente a los usados como substratos en la reacción de activación.

Cuando se utilizó glicilglicina como buffer y en presencia de Mg^{++} , se observó que tanto el ATP como la creatina fosfato activaban la fosfatasa en un grado parecido; el Mg^{++} solo, en cambio, también activaba la enzima pero en menor grado (Tabla V, experimentos I y II).

La Figura 21 muestra los diferentes grados de activación de la enzima que se obtienen cuando se varían las concentraciones de ATP, Mg^{++} y creatina fosfato.

FIGURA 20.- Reactivación de la fosforilasa fosfatasa y efecto de 3'5'AMP cíclico.

La preparación cruda se obtuvo a partir de un homogenato incubado 40 minutos a 37°. Las mezclas de reacción contenían mercaptoetanol 10 mM, teofilina 6.7 mM (●—●); o mercaptoetanol, teofilina más ATP-MgCl₂ 2.5 mM y creatina-fosfato-MgCl₂ 5 mM (○—○). El 3'5'AMP cíclico se añadió a los tiempos indicados por las flechas a la concentración finalde 0.017 mM. Las líneas punteadas corresponden a las incubaciones que contienen el nucleótido cíclico y las líneas llenas a las que no lo contienen. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°. Las condiciones restantes se describen en el texto.

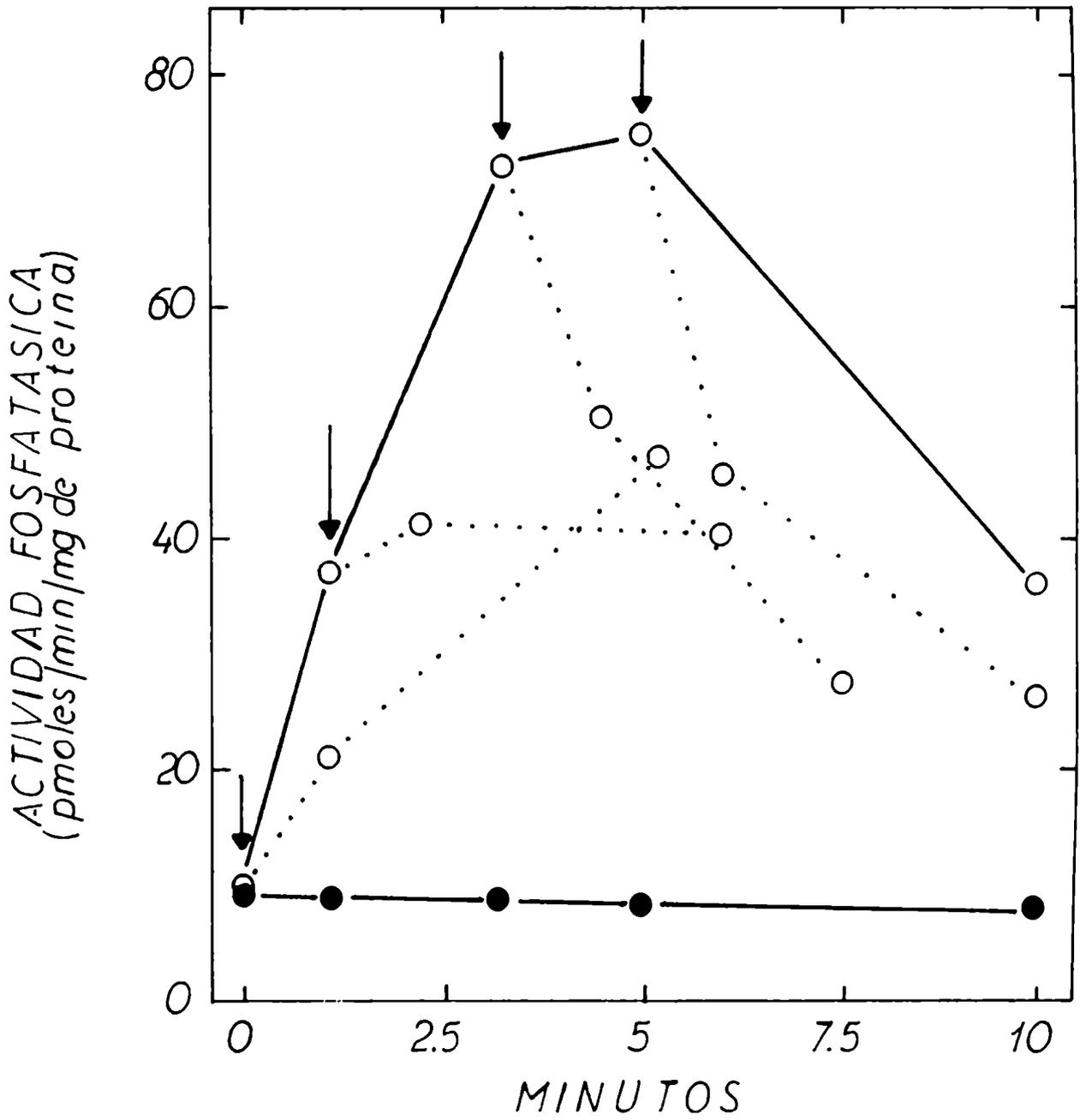
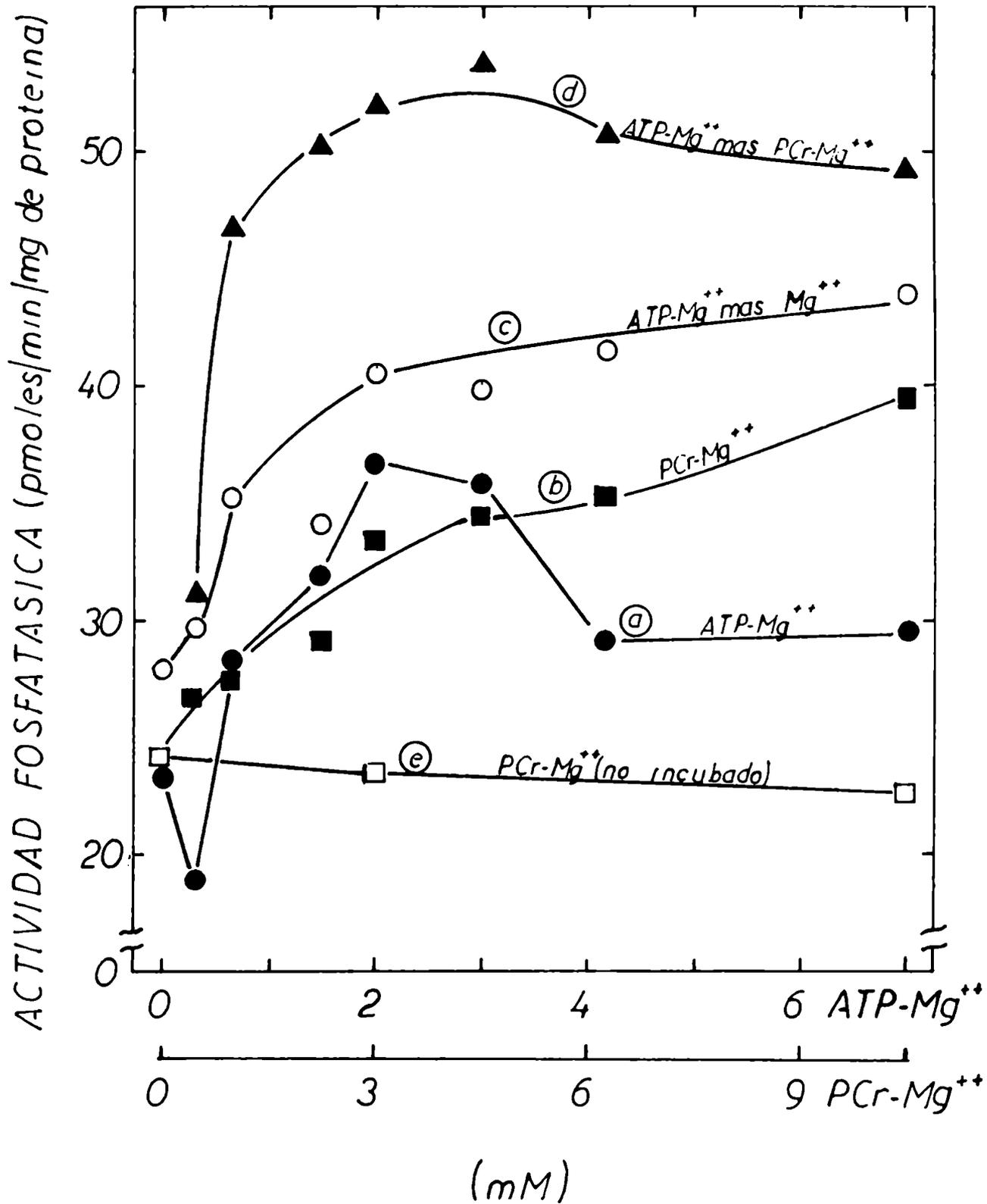


FIGURA 21.- Activación de la fosforilasa fosfatasa variando las concentraciones de ATP-Mg⁺⁺ y de creatina-fosfato-Mg⁺⁺ usando glicilglicina NaOH como buffer.

La curva c contiene además de las concentraciones de ATP-MgCl₂ indicadas en abcisa, 4.7 ml MgCl₂. Las reacciones de activación correspondientes a las curvas a, b, c y d se llevaron a cabo durante 2 minutos a 37°. Las condiciones restantes corresponden a la Figura 20.



En presencia de ATP y Mg^{++} en concentraciones equimoleculares, el efecto máximo se observó a 2.5 mM; cuando se usaron concentraciones más altas el grado de activación disminuyó (curva a).

El agregado de Mg^{++} en una concentración superior a la de ATP aumentó el grado de reactivación, no observándose efecto inhibitorio a altas concentraciones de ATP (curva c).

Cuando la activación se realizó en presencia de creatina fosfato y Mg^{++} a concentraciones equimoleculares, no se observó inhibición aún a altas concentraciones del éster fosfórico. En esas condiciones el grado de activación continuó aumentando por encima de 7 mM (curva b).

Es interesante destacar que el grado máximo de activación se obtuvo cuando se incubó la enzima con ATP, creatina fosfato y Mg^{++} ; el grado de activación aumentó rápidamente a bajas concentraciones de ATP- Mg^{++} más creatina fosfato- Mg^{++} hasta alcanzar un máximo a las concentraciones de ATP 2.5 mM y creatina fosfato 4.5 mM (curva d).

Cuando se utilizó como buffer la N-etilmorfolina-HCl, se observó que la velocidad de activación provocada por el ATP- Mg^{++} era superior a la observada cuando se utilizó como buffer la glicilglicina (Tabla V, experimento III).

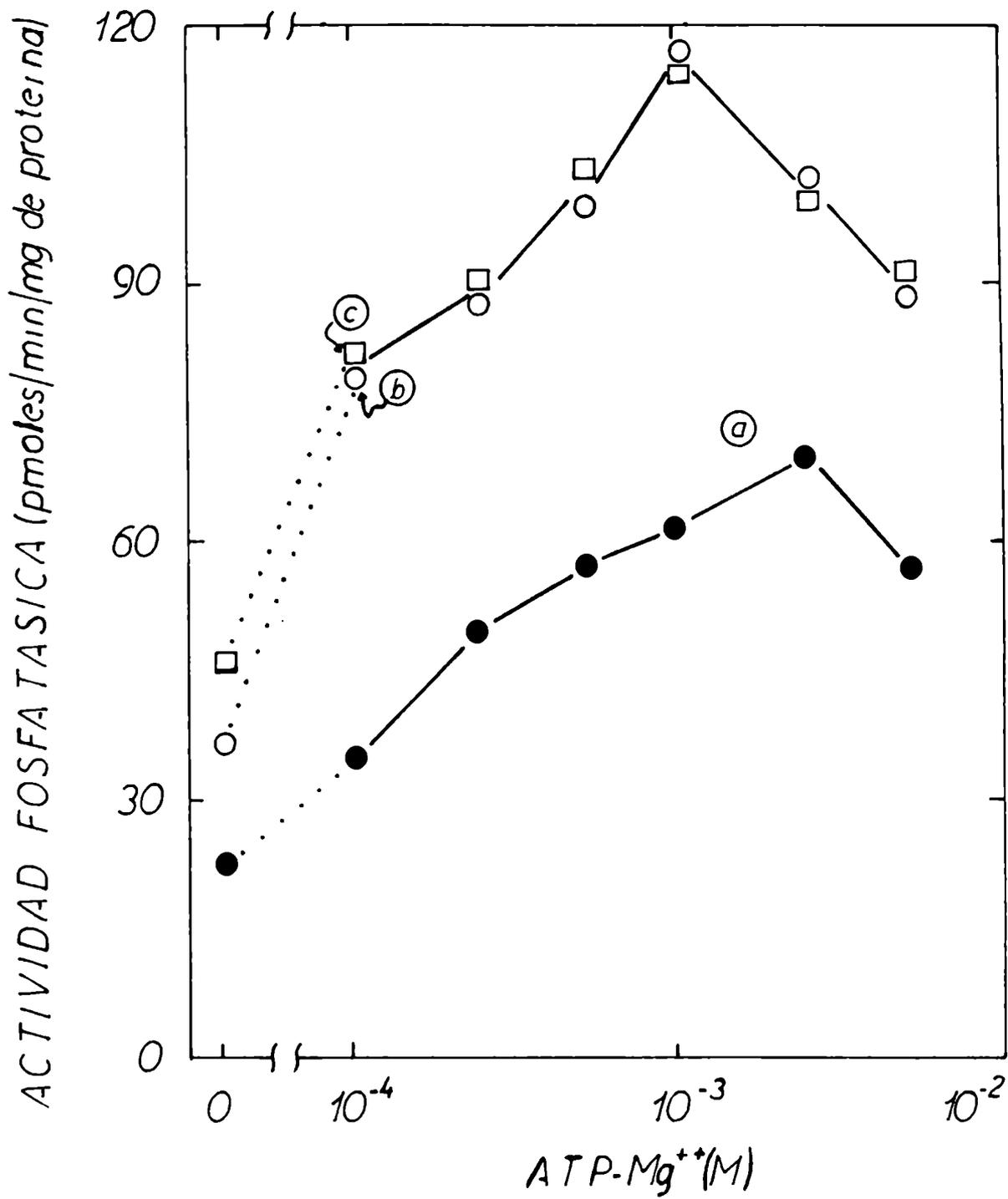
En la Figura 22 se puede ver el efecto provocado por la variación de las concentraciones de ATP- Mg^{++} cuando ambos están en concentración equimolecular (curva a).

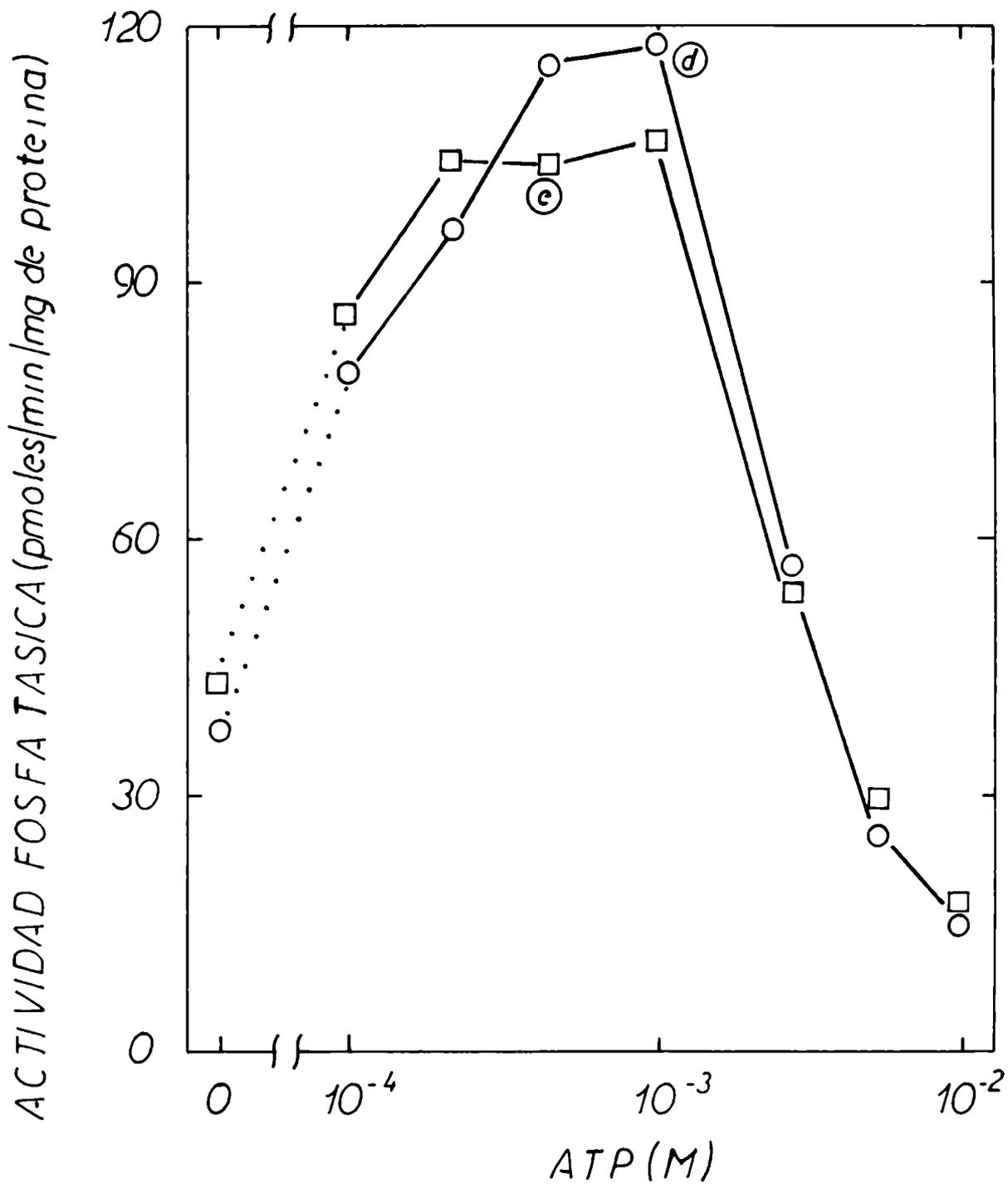
La activación máxima se observó a la concentración 2.5 mM; a concentraciones superiores disminuyó el grado de activación.

También se estudió el efecto provocado por el añadido de Mg^{++} o de creatina fosfato más Mg^{++} (en concentraciones equimoleculares) a la mezcla conteniendo ATP- Mg^{++} (curvas b y c respectivamente). Con esos

FIGURA 22.- Activación de la fosforilasa fosfatasa variando la concentración de ATP-Mg⁺⁺ o la concentración de ATP, usando N-etilmorfolina como buffer.

En las curvas b y d las mezclas de activación contenían, además, MgCl₂ 5 mM y las mezclas de activación correspondientes a las curvas c y e contenían creatina-fosfato-MgCl₂ 5 mM. Las reacciones de activación se llevaron a cabo durante 1 minuto a 37°. El resto de las condiciones son las del experimento III de la Tabla V.





agregados se consiguió una marcada estimulación de la activación, superior a la lograda por el ATP-Mg⁺⁺. No obstante, no se observaron diferencias entre la estimulación provocada por el Mg⁺⁺ o la creatina fosfato-Mg⁺⁺ en presencia de ATP-Mg⁺⁺.

En ese experimento también se probó el efecto de la variación de la concentración de ATP en presencia de una concentración fija de Mg⁺⁺ (curva d) o de creatina fosfato-Mg⁺⁺ en concentraciones equimoleculares (curva e). Se puede ver que la activación disminuye rápidamente cuando la concentración de ATP es superior a la de Mg⁺⁺ o a la de creatina fosfato-Mg⁺⁺.

A las mezclas de activación se añadió como un componente normal mercaptoetanol. No obstante, la omisión del mismo no modificó el grado de activación de la fosforilasa fosfatasa (Tabla V, experimentos I y II).

Se probaron varias sustancias para determinar su capacidad de reemplazar al ATP, en presencia de Mg⁺⁺, como activador de la fosforilasa fosfatasa.

En la Tabla VI se puede ver que el ADP, el CTP y el GTP activaron la enzima en orden decreciente y en grado inferior a la activación lograda por el ATP.

Efecto del 3'5'AMP cíclico:

Cuando se incubó la enzima con 3'5'AMP cíclico se observó un pasaje de la enzima activa a una forma menos activa. Ese efecto se logró cuando el nucleótido cíclico se añadió al comienzo o durante el proceso de activación (Figura 20).

El efecto máximo se observó a la concentración 1×10^{-5} M pero se obtuvieron respuestas significativas a concentraciones de este metabolito entre 5×10^{-7} M y 2×10^{-6} M (Figura 23).

TABLA VI

Efecto de diferentes nucleótidos y metabolitos en la activación de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

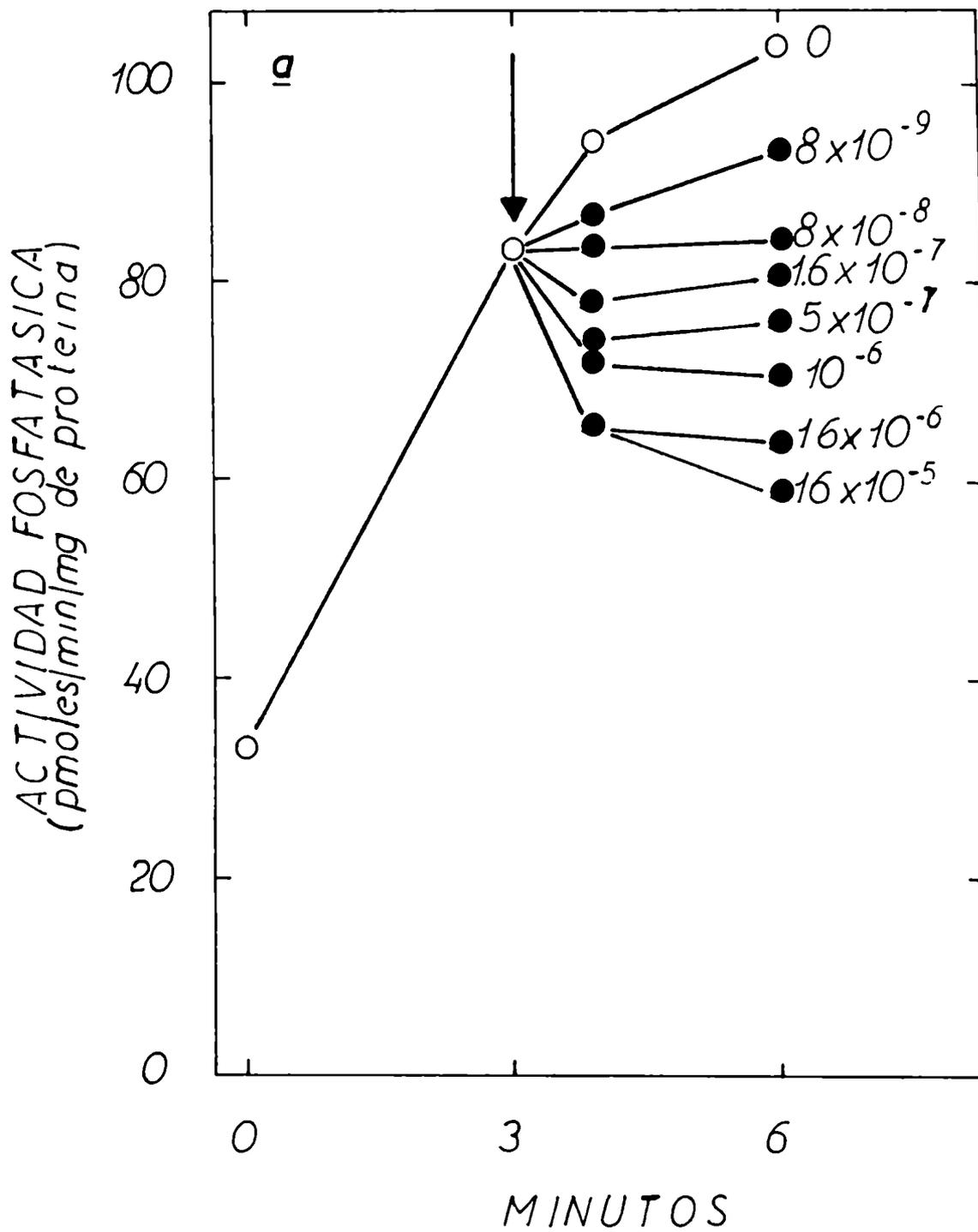
TIEMPO	ADICIONES	ACTIVIDAD (pmoles/min/mg de proteína)
0	Ninguna	23.5
0	mercaptoetanol, teofilina	55.0
3	ninguna	21.0
3	mercaptoetanol, teofilina	48.4
3	mercaptoetanol, teofilina, ATP-Mg ⁺⁺	122.0
3	mercaptoetanol, teofilina, CrP-Mg ⁺⁺	64.2
3	mercaptoetanol, teofilina, ADP-Mg ⁺⁺	76.0
3	mercaptoetanol, teofilina, AMP-Mg ⁺⁺	38.4
3	mercaptoetanol, teofilina, UTP-Mg ⁺⁺	50.4
3	mercaptoetanol, teofilina, GTP-Mg ⁺⁺	62.5
3	mercaptoetanol, teofilina, TTP-Mg ⁺⁺	36.9
3	mercaptoetanol, teofilina, CTP-Mg ⁺⁺	57.0
3	mercaptoetanol, teofilina, PPI-Mg ⁺⁺	21.8

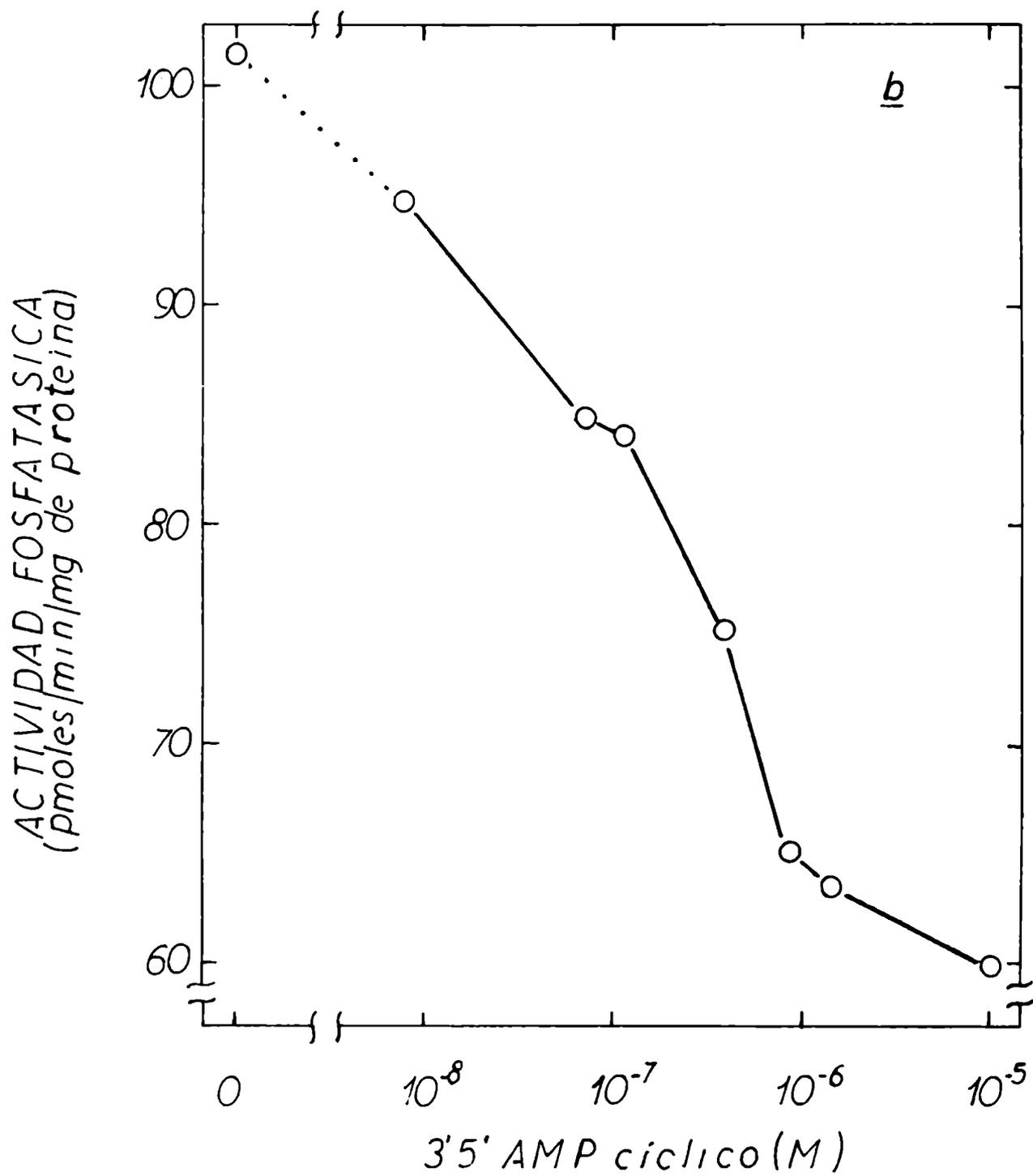
La concentración final de MgCl₂, de los nucleótidos y metabolitos fue 2.5 mM. Las condiciones del experimento son las del experimento II de la Tabla V.

FIGURA 23.- Efecto de la variación de la concentración de 3'5'AMP cíclico sobre la inactivación de la fosfatasa.

a) Las condiciones son las de la Figura 20. En el momento indicado por la flecha se agregó 3'5'AMP cíclico a las concentraciones finales indicadas.

b) Relación entre la concentración de 3'5'AMP cíclico y magnitud del efecto. Las actividades de la fosfatasa correspondientes a las incubaciones llevadas a cabo durante 3 minutos en presencia del nucleótido cíclico se graficaron en función de la concentración del metabolito.





Como la concentración de fosforilasa a depende de un balance entre su formación por la fosforilasa b quinasa y su degradación por la fosforilasa a fosfatasa, se podría pensar que el efecto del 3'5'AMP cíclico se debe a la activación de la fosforilasa b quinasa (EC 2.7.1.38) antes que a una inhibición de la fosforilasa a fosfatasa.

Sin embargo, esta suposición se puede descartar fácilmente si se considera que en las condiciones en que se realiza el ensayo (ausencia de Mg^{++}), la fosforilasa b quinasa es completamente inactiva.

Por otra parte, se llevaron a cabo experimentos para determinar si en este sistema del músculo pectoral de paloma, también se observa el efecto estimulador del 3'5'AMP cíclico sobre la activación de la fosforilasa b quinasa. En la Tabla VII se muestran los resultados de estos experimentos.

Se puede ver que cuando la concentración de ATP era igual a la concentración de Mg^{++} , la activación de la fosforilasa b quinasa era muy pequeña. En esas condiciones, el 3'5'AMP cíclico estimulaba en forma marcada la activación de la fosforilasa b quinasa. El efecto provocado por el 3'5'AMP cíclico se lograba con concentraciones de esta substancia entre 2×10^{-6} y 2×10^{-4} M. También se puede ver que, cuando se incubaba la enzima en presencia de Cl_2Ca (5 mM) se producía una franca activación de la misma .

Requerimientos para inactivar la fosforilasa a fosfatasa.

Quando se incubaron diferentes preparaciones de fosforilasa a fosfatasa de músculo pectoral de paloma con ATP (en ausencia de Mg^{++}), se observó una inactivación de la enzima dependiente de tiempo (Figura 24). La presencia de mercaptoetanol no era necesaria para lograr esta

TABLA VII

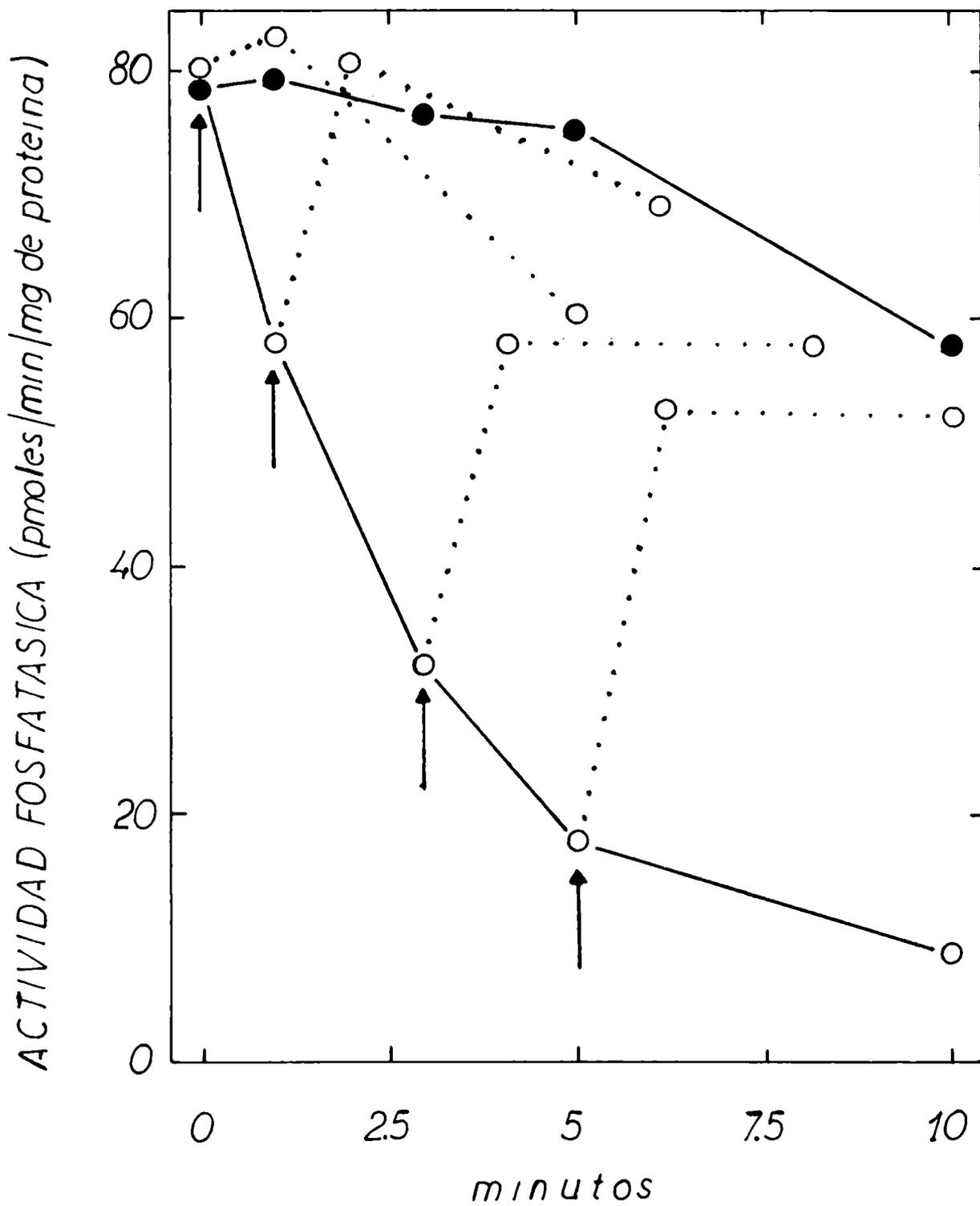
Efecto de diferentes sustancias sobre la activación de la fosforilasa b
quinasa de músculo

TIEMPO	ADICIONES	ACTIVIDAD DE QUINASA medida a pH 6.8 (nmoles/min/por ml)
0	Ninguna	23.4
2	Ninguna	20.0
0	ATP (5 mM), MgCl ₂ (5 mM)	24.0
2	ATP (5 mM), MgCl ₂ (5 mM)	29.8
2	ATP(5 mM),MgCl ₂ (5 mM), 3'5'AMP cíclico(2x10 ⁻⁶ M)	38.0
2	CaCl ₂ (5 mM)	51.0
0	ninguna	9.6
1	ATP (5 mM), MgCl ₂ (5 mM)	9.9
1	ATP(5 mM),MgCl ₂ (5 mM),3'5'AMP cíclico (2x10 ⁻⁶ M)	14.0
1	ATP(5 mM),MgCl ₂ (5 mM),3'5'AMP cíclico (2x10 ⁻⁵ M)	14.7
1	ATP(5 mM),MgCl ₂ (5 mM), 3'5'AMP cíclico(2x10 ⁻⁴ M)	16.2

Se preparó la enzima de músculo pectoral de paloma. La fracción "precipitado ácido" se preparó como se describe en Materiales y Métodos y se usó como fuente de la fosforilasa b quinasa y de las enzimas activantes. La mezcla de la reacción de activación contenía N-etilmorfolina-HCl (pH 7.0) 25 mM, mercaptoetanol 20 mM, enzima (0.04 ml) y otras adiciones en un volumen total de 0,1 ml.

FIGURA 24.- Inactivación de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

La preparación cruda se obtuvo a partir del homogenato que no se incubó a 37°. Las mezclas de reacción conteniendo mercaptoetanol 10 mM y teofilina 6.7 mM se incubaron a 37° en presencia (○—○) o ausencia (●—●) de ATP 2.5 mM. en el momento indicado por la flecha se agregaron creatinafosfato-MgCl₂ y MgCl₂ a la concentración de 5 mM final.



Como puede verse en la Figura 24 el agregado de creatina fosfat y Mg^{++} revertía el efecto del ATP.

En la Figura 25 se muestra que el grado de inactivación aumentaba con la concentración de ATP.

Se probaron varias sustancias para determinar su capacidad de reemplazar al ATP en la inactivación de la fosfatasa (en ausencia de Mg^{++}). En la Tabla VIII se puede observar que el ATP, ADP, AMP, UTP, CTP, GTP, y P actuaron como inactivadores de la enzima, mientras que el EDTA fue ineficaz como inactivador de la fosfatasa.

Reversibilidad de las reacciones de inactivación y reactivación.

Las Figuras 19, 20 y 24 muestran que la inactivación y la reactivación de la fosforilasa a fosfatasa de músculo pectoral de paloma son procesos rápidamente reversibles.

En la Tabla IX se muestra claramente este proceso.

Una preparación activa de fosforilasa a fosfatasa, ensayada después que se eluyó de una columna de Sephadex G-25, se inactivó a 37°C durante 40 minutos.

El producto de esa incubación se pasó nuevamente por una columna de Sephadex G-25 y se reactivó con ATP, creatina fosfato y Mg^{++} . Se pasó nuevamente por una columna de Sephadex y se incubó el eluido a 37°C durante 40 minutos, obteniéndose nuevamente una enzima inactiva a la que se reactivó posteriormente en las mismas condiciones anteriores.

Se obtuvieron así ciclos completos de inactivación-activación que confirmaron claramente la reversibilidad de estos procesos.

FIGURA 25.- Efecto de la variación de la concentración de ATP sobre la inactivación de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

Las condiciones son las de la Figura 14. Las mezclas fueron incubadas (●—●) o no (○—○) durante 2 minutos a 37° con las concentraciones de ATP que se indican.

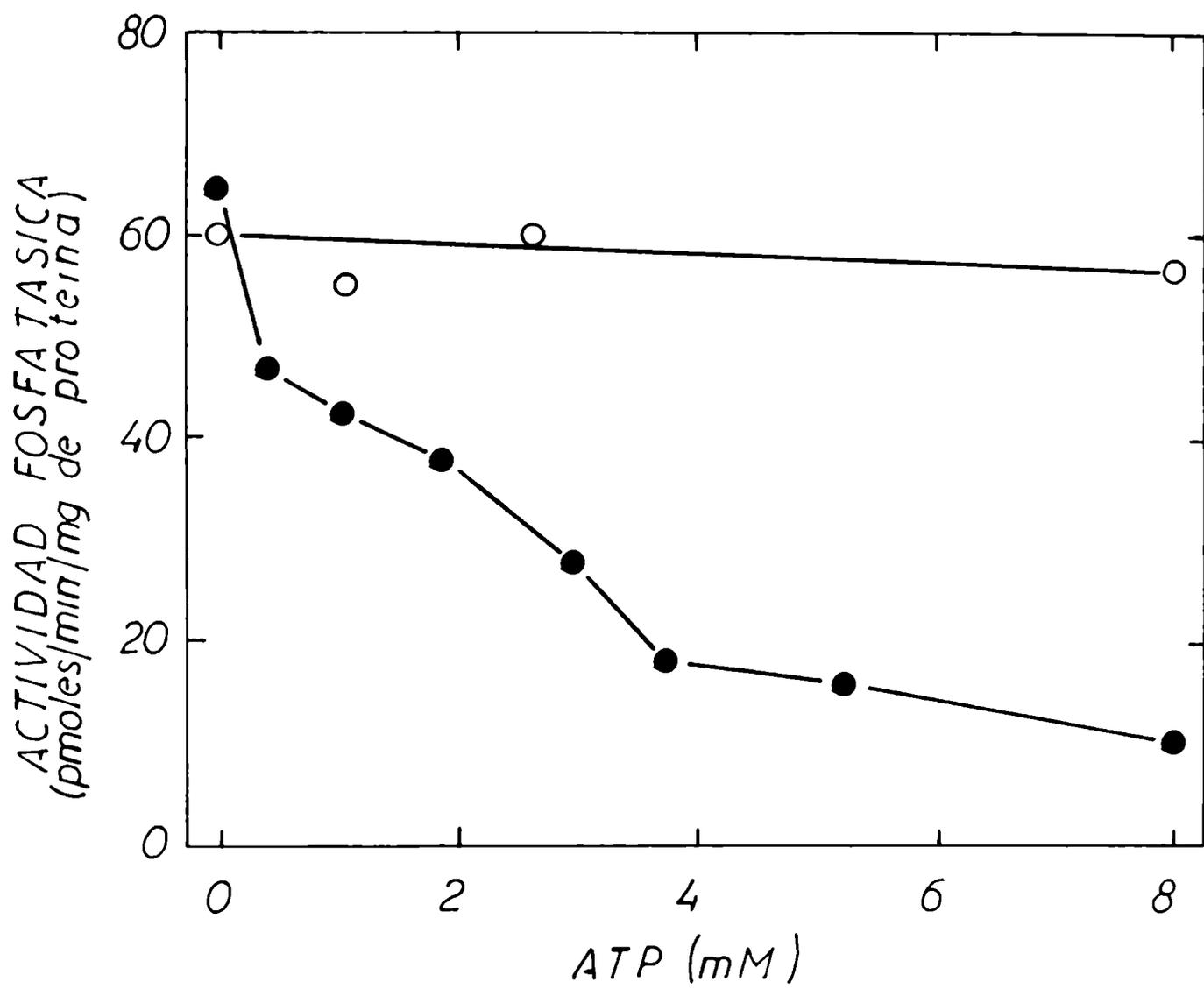


TABLA VIII

Efecto de diferentes nucleótidos, metabolitos y EDTA en la inactivación de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

TIEMPO (min)	ADICIONES	ACTIVIDAD (pmoles/min/mg de Proteín
0	mercaptoetanol, teofilina	56
2	mercaptoetanol, teofilina	53
2	mercaptoetanol, teofilina, ATP	13
2	mercaptoetanol, teofilina, ADP	0.3
2	mercaptoetanol, teofilina, AMP	0
2	mercaptoetanol, teofilina, UTP	17
2	mercaptoetanol, teofilina, CTP	18
2	mercaptoetanol, teofilina, Carbamil-P	49
2	mercaptoetanol, teofilina, CrP	46
2	mercaptoetanol, teofilina, GTP	8.1
2	mercaptoetanol, teofilina, P _{Pi}	2
2	mercaptoetanol, teofilina, P _i	56
2	mercaptoetanol, teofilina, EDTA	51

La concentración final de los nucleótidos, metabolitos y EDTA fue 5 mM. Las condiciones son las del experimento III de la Tabla V con la diferencia que el homogenato no se incubó a 37°.

TABLA IX

Inactivación y activación reversibles de la fosforilasa fosfatasa de músculo.

PREPARACION CRUDA	ACTIVIDAD (pmoles/min/por mg de proteína)
Activa	36.8
Inactiva	3.6
Inactiva-reactivada	13.6
Inactiva-reactivada-inactivada	5.5
Inactiva-reactivada-inactivada-reactivada	12.0

Se obtuvo una preparación cruda como se indica en Materiales y Métodos, a partir de un homogenato que fue incubado (preparación cruda inactiva) o no (preparación cruda activa) durante 30 minutos a 37° y se le determinó la actividad fosfatásica. La preparación cruda inactiva se incubó luego 10 minutos a 37° en presencia de mercaptoetanol 10 mM, ATP-MgCl₂ 2.5 mM y creatina-P-MgCl₂ 5mM en un volúmen final de 0.3 ml. Después de incubar se determinó la actividad fosfatásica en la mezcla (preparación cruda inactiva-reactivada) y luego se la pasó por una columna de Sephadex G-25 (0.7 x 10 cm) equilibrada con sacarosa 0.25 M conteniendo buffer glicilglicina pH 7.2, 0.05 M. El eluido se incubó luego durante 40 minutos a 37° sin agregados y se ensayó su actividad fosfatásica (preparación cruda inactiva-reactivada-inactivada). La enzima se incubó luego con ATP-Mg⁺⁺, CrP-Mg⁺⁺ como se indicó anteriormente (preparación cruda inactiva-reactivada-inactivada-reactivada). Todas las muestras a ensayar se diluyeron previamente con 9 volúmenes de buffer glicerofosfato (pH 6.8) 40 mM conteniendo EDTA 5 mM y mercaptoetanol 10 mM. Los ensayos de fosfatasa se llevaron a cabo como se indica en Material y Métodos.

DISCUSION

El glucógeno muscular es un polisacárido de gran importancia biológica, constituyendo junto con la fosfocreatina la principal reserva energética rápidamente utilizable por la célula muscular.

El glucógeno se utiliza especialmente cuando la contracción muscular se realiza en condiciones anaeróbicas. En esos casos se produce la degradación fosforolítica de este polisacárido obteniéndose la formación del ATP necesario para la contracción durante la transformación de glucosa en ácido láctico, el cual es liberado al torrente circulatorio.

De acuerdo al momento fisiológico que se considere se pueden distinguir tres fases en la utilización del glucógeno muscular:

- i) Fase de reposo: en estas condiciones la velocidad de síntesis iguala a la de degradación.
- II) Fase de contracción: donde la velocidad de degradación supera a la de síntesis.
- III) Fase de recuperación: donde la velocidad de síntesis supera a la de degradación.

Como estas diferencias se producen en períodos de tiempo muy cortos el metabolismo del glucógeno en músculo requiere un tipo de ajuste muy delicado y controlado por mecanismos regulatorios rápidos y precisos.

El paso inicial de la glucogenolisis es la fosforólisis del glucógeno catalizada por la fosforilasa. El producto de esta reacción, la glucosa-1-fosfato, es luego metabolizada a través de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas produciendo ATP.

Las evidencias obtenidas hasta el presente permiten asegurar que la glucógeno sintetasa y la fosforilasa juegan un rol muy importante en la síntesis y degradación del glucógeno muscular.

No obstante, la existencia de estas enzimas por si solas no constituye un mecanismo de regulación de las reacciones en que intervienen, máxime si se tiene en cuenta que las velocidades de las mismas varían de acuerdo a las demandas impuestas al sistema.

Es por eso que el descubrimiento de las dos formas de la fosforilasa en el músculo de conejo fue uno de los primeros indicios que existía un mecanismo de control de esta enzima. Lo que se necesitaba era determinar las condiciones de interconversión de ambas formas enzimáticas para satisfacer las demandas de la célula en un momento determinado.

Se encontraron entonces las dos enzimas responsables de estas interconversiones: la fosforilasa b quinasa que cataliza la transformación de la fosforilasa b en a y la fosforilasa a fosfatasa, que cataliza la transformación inversa.

I) FOSFORILASA b QUINASA

Los resultados presentados indican la existencia de un mecanismo regulatorio adicional de los niveles de fosforilasa b quinasa activa. Esta activación posiblemente juegue algún papel "in vivo" puesto que ocurre a concentraciones de Mg^{++} superiores a 1 mM, es decir dentro del rango fisiológico. En músculo, la concentración de Mg^{++} es aproximadamente 10 mM (77). Sin embargo, la mayor parte del catión se encuentra formando complejos de afinidad variable con el ATP y otros ésteres fosfóricos.

De todos ellos el complejo con mayor estabilidad es sin duda el que se forma con ATP.

Pese a ello, es posible que en anaerobiosis o durante la contracción muscular, condiciones que originan una caída en los niveles de ATP, cierta fracción del Mg^{++} total pueda liberarse bajo la forma iónica libre. En tales condiciones, los requerimientos para la activación de la quinasa podrían cumplimentarse.

Es de destacar que los otros mecanismos descritos para la activación de la fosforilasa b quinasa no podrían ocurrir durante la contracción muscular. Esto es:

- 1) Activación por Ca^{++} ; tiene lugar a concentraciones superiores a 0.1 mM del catión libre. Este valor es muy superior al que se ha dado para el tejido muscular.
- 2) ATP- Mg^{++} ; de acuerdo a los resultados presentados solo ocurriría en presencia de niveles adecuados de 3'5'AMP cíclico.
- 3) Tripsina; no existe en el tejido muscular.

Se puede concluir que, dado los elevados niveles de fosforilasa b quinasa en músculo, un pequeño incremento en su actividad podría ser responsable de la transformación de la fosforilasa b en a. Este mecanismo estaría, además, particularmente favorecido por el incremento del Mg^{++} libre que actuaría también como activador "alostérico" de la fosforilasa b quinasa activa.

II) FOSFORILASA a FOSFATASA

Los experimentos realizados indican que la actividad de fosforilasa a fosfatasa contenida en preparaciones de músculo pectoral de paloma parcialmente purificadas, tiene las características de una enzima

que existe en una forma activa y otra forma menos activa y que esas dos formas son interconvertibles.

La conversión de la enzima hacia la forma activa se logra preincubando la misma con Mg^{++} , ATP y/o fosfocreatina (Figura 21). Esta fracción enzimática, antes o después de ser activada, puede ser transformada en una forma total o parcialmente inactiva preincubándola con ATP o con diferentes mono, di y trinucleótidos (Tabla IV, Figura 19). La enzima inactivada, a su vez, podía ser nuevamente reactivada pudiendo repetirse este ciclo de inactivación-reactivación (Tabla IX).

Una de las propiedades interesantes de esta enzima es su capacidad de ser activada por metilxantinas (Figura 16), efecto que corrobora las observaciones previas de Wosilait y Sutherland (71) con la enzima de hígado. Por otra parte, algunos resultados obtenidos planteaban la posibilidad que la modulación de la actividad de la fosfatasa por metabolitos podía jugar un rol regulatorio "in vivo". No obstante, los intentos por demostrar este tipo de activación por metabolitos en el ensayo de fosforilasa fosfatasa resultaron infructuosos.

Estudiadas las propiedades cinéticas de ambas formas de la enzima se encontró que la velocidad máxima de la forma activada es mayor que la de la forma parcialmente inactiva medida a niveles saturante de su substrato, la fosforilasa a (Figura 13). En cambio, no se encontraron alteraciones de la afinidad de ambas formas hacia la fosforilasa a. Si estas conversiones tuviesen importancia fisiológica "in vivo", parecería evidente que la regulación de la actividad de la fosfatasa debería hacerse a través de una modificación de la velocidad máxima, ya que fisiológicamente la enzima parece actuar en condiciones en que la concentración de fosforilasa a supera la mitad del punto de saturación.

Con respecto al papel que juega el 3'5'AMP cíclico en estas conversiones, se vió que el añadido del nucleótido a la enzima activada la transforma en una forma menos activa (Figuras 20 y 23). Este efecto no se observó cuando no se preincubó la enzima previamente con ATP-Mg⁺⁺.

Esta acción del nucleótido cíclico podría consistir en la activación de la enzima(s) responsable de la inactivación de la fosfatasa o en la inhibición del sistema enzimático que activa la fosfatasa. Hasta el momento no hay evidencias experimentales que favorezcan ninguna de estas posibilidades.

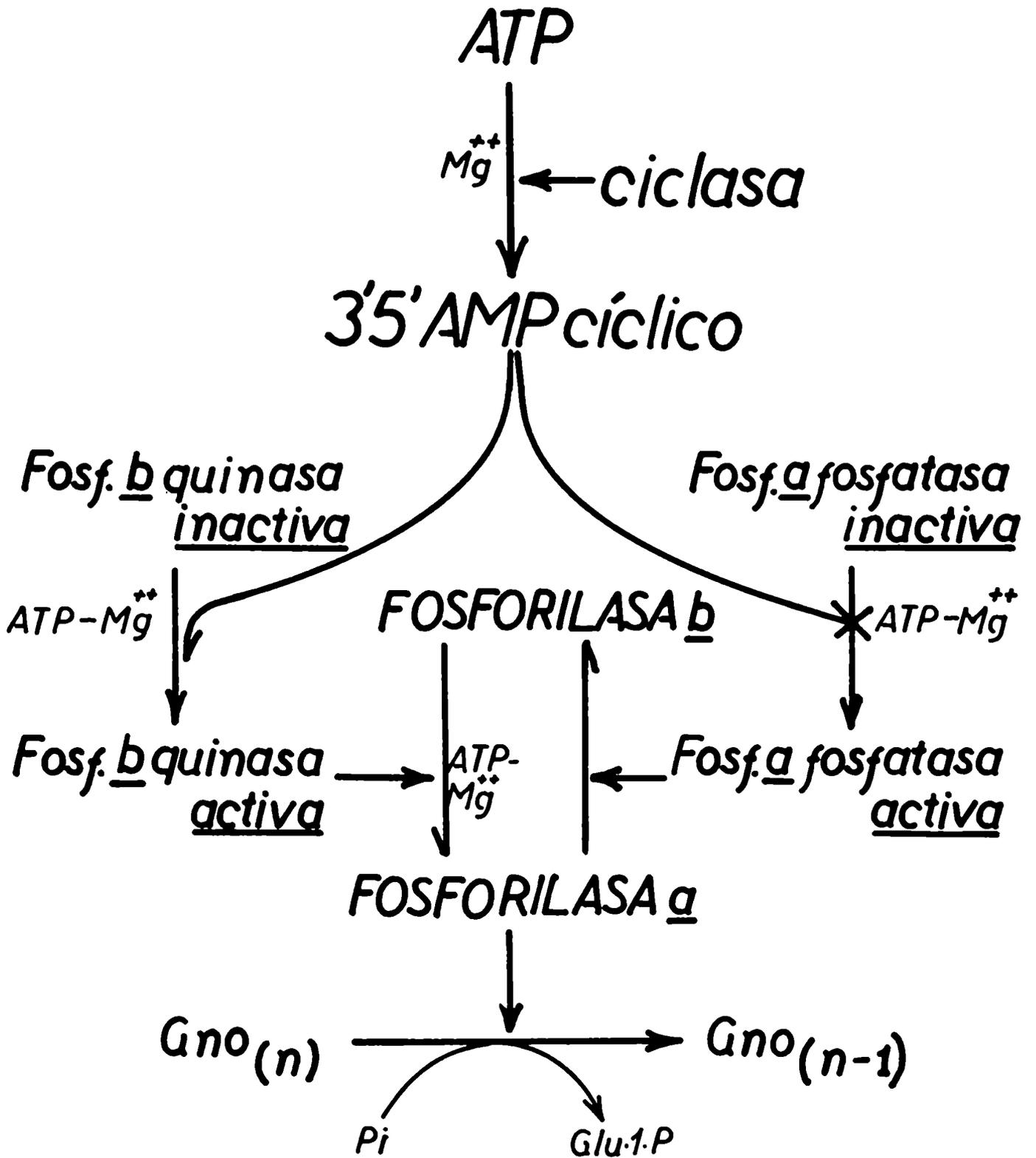
Por otra parte, si a los datos sobre el efecto del 3'5'AMP cíclico sobre la fosforilasa a fosfatasa de músculo pectoral de paloma, añadimos los obtenidos en este mismo sistema en los que se muestra la estimulación de la fosforilasa b quinasa activada por ATP-Mg⁺⁺ (Tabla VII), se podría especular que el 3'5'AMP cíclico es la substancia clave que coordina los dos sistemas enzimáticos responsables de los niveles de fosforilasa activa (Figura 26).

Las fosforilasa b quinasa y fosforilasa a fosfatasa se añaden a una serie de enzimas en cuyo mecanismo de interconversión intervienen los nucleótidos de adenina, incluyendo el 3'5'AMP cíclico, y cuyo número ha ido aumentando a medida que se estudiaron algunas enzimas en detalle.

Además de la fosforilasa y de la glucógeno sintetasa, enzimas que constituyen ejemplos clásicos de estos mecanismos, se pueden mencionar las siguientes:

Mansour y colaboradores (72) observaron que la simple incubación de un extracto concentrado de corazón de oveja conduce a una inactivación

FIGURA 26.- Efecto del 3'5'AMP cíclico sobre la fosforilasa b quinasa y sobre la fosforilasa a fosfatasa.



de la fosfofructoquinasa y encontraron que esta enzima se reactiva por incubación con ATP-Mg⁺⁺; la fructosadifosfatasa de hígado puede ser inactivada por incubación con ATP y reactivada por diálisis e incubación con ortofosfato (73); la triptofano pirrolasa inactiva de hígado puede ser reactivada por incubación con 3'5'AMP cíclico (74); la fosforilasa b quinasa de músculo esquelético (63) y de músculo cardíaco (75) se interconvierten por los mecanismos ya mencionados; el complejo multienzimático de la piruvato dehidrogenasa de mitocondrias de riñón de ternera está regulado por un proceso de fosforilación-defosforilación (76); la fosforilación y la inactivación que produce está catalizada por una quinasa específica para el ATP y la defosforilación y la concomitante reactivación están catalizadas por una fosfatasa dependiente de Mg⁺⁺. Ese mismo tipo de conversión se encontró en la piruvato-deshidrogenasa de corazón de cerdo (69) siendo en este caso estimulada la reactivación por el 3'5'AMP cíclico.

Es importante destacar que este tipo de mecanismo de interconversión se ha encontrado también en células bacterianas.

En Escherichia coli B se ha encontrado que la glutamino-sintetasa puede existir en dos formas: una activa y la otra inactiva y que la transformación de la primera forma en la segunda es provocada por un proceso de adenilación (70) que requiere ATP-Mg⁺⁺.

Recientemente (62) se ha encontrado en nuestro laboratorio un mecanismo similar de regulación de la RNA polimerasa de Escherichia coli. La enzima activa se transforma en inactiva por un proceso de adenilación que requiere ATP-Mg⁺⁺; la enzima inactiva, a su vez, puede ser reactivada por el agregado de una fracción con actividad desadenilante. Considerando que la RNA polimerasa es la enzima responsable de la síntesis de todos los tipos de RNA celular se puede concluir que este mecanismo puede

tener considerable importancia como regulador de la expresión genética.

CONCLUSIONES

Los datos experimentales presentados en esta tesis permiten asegurar que se ha encontrado un nuevo mecanismo de activación de la fosforilasa b quinasa de músculo, que se manifestaría en condiciones de anaerobiosis.

Dicho mecanismo actuaría en condiciones en que, consumido el ATP necesario para la liberación de energía durante la contracción muscular, el Mg^{++} inicialmente complejado con el ATP pasaría a la forma iónica libre, quedando en condiciones de activar a la fosforilasa b quinasa.

Por otra parte, se ha encontrado que la fosforilasa a fosfatasa, enzima que actúa en sentido inverso a la anterior, existe en músculo en dos formas interconvertibles. Ambas formas pueden constituir un nuevo punto de regulación del metabolismo del glucógeno en el músculo esquelético.

Se ha visto también que el 3'5'AMP cíclico actúa por una parte estimulando la activación de la fosforilasa b quinasa por $ATP-Mg^{++}$ y por otra parte convirtiendo la fosforilasa a fosfatasa de una forma activa a una forma parcialmente inactiva. Este metabolito, actuando en forma sinérgica, podría ser el responsable de los niveles de fosforilasa a en músculo.



Hector N. Torres

Instituto de Investigaciones Bioquímicas

BIBLIOGRAFIA

- 1) Manners, D.J.; "The Molecular Structure of Glycogens", Adv. Carbohydrate Chem., 12, 269 (1957).
- 2) Brown, D.H. y Illingworth Brown, B.; "Action of a Muscle Branching Enzyme on Polysaccharides enlarged from UDP ¹⁴C Glucose", Biochim. Biophys. Acta, 130, 263 (1966).
- 3) Cori, G.T. y Larner, J.; "Action of Amylo-1,6-Glucosidase and Phosphorylase on Glycogen and Amylopectin", J. Biol. Chem., 188, 17 (1951).
- 4) Torres, H.N. y Olavarría, J.M.; "Metabolism of Malto-Oligosaccharides", Acta Physiol. Latinoam., 11, 95 (1961).
- 5) Lukomskaya, I.S.; "The Synthesis of Oligosaccharides with Different Types of Linkage in Animal Tissues", Enzymologia, 24, 327 (1962).
- 6) Abdullah, M., Taylor, P.M. y Whelan, W.J.; "The Enzymic Debranching of Glycogen and The Role of Transferase", Ciba Found. Symp., "Control Glycogen Metabolism", pag. 123 (1964).
- 7) Rosenfeld, E.L.; "Animal Tissue α -Amylase and its Role in the Metabolism of Glycogen", Ciba Found. Symp., "Control Glycogen Metabolism", pag. 176 (1964).
- 8) Robbins, P.W., Traut, R.R. y Lipmann, F.; "Glycogen Synthesis from Glucose, Glucose-6-Phosphate, and Uridine Diphosphate Glucose in Muscle Preparations", Proc. Natl. Acad. Sci., 45, 6 (1959).
- 9) Leloir, L.F. y Cardini, C.E.; "Biosynthesis of Glycogen from Uridine Diphosphate Glucose", J. Am. Chem. Soc., 79, 6340 (1957).
- 10) Villar-Palasi, C. y Larner, J.; "A Uridine Coenzyme-Linked Pathway of Glycogen Synthesis in Muscle", Biochim. Biophys. Acta, 30, 449 (1958).

- 11) Leloir, L.F., Olavarría, J.M., Goldemberg, S.H. y Carminatti, H.; "Biosynthesis of Glycogen from Uridine Diphosphate Glucose", Arch. Biochem. Biophys., 81, 508 (1959).
- 12) Villar-Palasi, C. y Larner, J.; "Insulin-mediated Effect on the Activity of UDPG-Glycogen Transglucosylase of Muscle ", Biochim. Biophys. Acta, 39, 171 (1960).
- 13) Friedman, D.L. y Larner, J.; "Studies on UDPG- α -Glucan Transglucosylase", Biochemistry, 2, 669 (1963).
- 14) Larner, J. y Sanger, F.; "The Amino Acid Sequence of the Phosphorylation Site of Muscle Uridine Diphosphoglucose α -1,4-Glucan α -4-Glucosyl Transferase", J. Mol. Biol., 11, 491 (1965).
- 15) Rosell Perez, M. y Larner, J; "Studies on UDPG: α -1,4-Glucan α -4-Glucosyl Transferase", Biochemistry, 3, 773 (1964).
- 16) Appleman, M.M., Belocopiotw, E. y Torres, H.N.; "Factors Affecting the Activity of Muscle Glycogen Synthetase", Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 550 (1964).
- 17) Friedman, D.L. y Larner, J.; "Studies on Uridine Diphosphate Glucose: α -1,4-Glucan α -4-Glucosyltransferase", Biochemistry, 4, 2261 (1965).
- 18) Appleman, M.N., Birnbaumer, L. y Torres, H.N.; "Factors Affecting the Activity of Muscle Glycogen Synthetase", Arch. Biochem. Biophys., 116, 39 (1966).
- 19) Belocopitow, E., Appleman, M.M. y Torres, H.N.; "Factors Affecting the Activity of Muscle Glycogen Synthetase", J. Biol. Chem., 240, 3473 (1965).
- 20) Meyer, W.L.; "A Calcium Dependent System for the Activation of Phosphorylase b Kinase in Muscle", Federation Proc.- 21, 83 (1962).

- 21) Belocopitow, E., García Fernández, M.C., Birnbaumer, L. y Torres, H.N.; "Factors Affecting Muscle Glycogen Synthetase Activity", J. Biol. Chem. 242, 1227 (1967).
- 22) Belocopitow, E.; "The Action of Epinephrine on Glycogen Synthetase", Arch. Biochem. Biophys., 93, 457 (1961).
- 23) Craig, J.W. y Larner, J.; "Influence of Epinephrine and Insulin on Uridine Diphosphate Glucose- α -Glucan Transferase and Phosphorylase in Muscle", Nature, 202, 971 (1964).
- 24) Green, A.A. y Cori, G.T.; "Crystalline Muscle Phosphorylase. I) Preparation, Properties, and Molecular Weight", J. Biol. Chem., 151, 21 (1943).
- 25) Cori, G.T. y Green, A.A.; "Crystalline Muscle Phosphorylase. II) Prosthetic Group", J. Biol. Chem., 151, 31 (1943).
- 26) Cori, G.T., Illingworth, B. y Keller, P.J.; "Muscle Phosphorylase" (1955) en Methods in Enzymology, Vol. 1, pág. 200, Academic Press, New York.
- 27) Fischer, E.H. y Krebs, E.G.; "Muscle Phosphorylase b", (1962) en Methods in Enzymology, (S.P. Colowick y N.O. Kaplan, editores), Vol.5, pág. 369, Academic Press, New York.
- 28) Yunis, A.A., Fischer, E.H. y Krebs, E.G.; "Crystallization and Properties of Human Muscle Phosphorylases a and b", J. Biol. Chem., 235, 3163 (1960).
- 29) Seery, V.L., Fischer, E.H. y Teller, D.C.; "A Reinvestigation of the Molecular Weight of Glycogen Phosphorylase", Biochemistry, 6, 3315 (1967).
- 30) Brown, D.H. y Cori, C.G.; "Animal and Plant Polysaccharide Phosphorylases", en The Enzymes (P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrback, editores) Vol. 5, pág. 207, 2ª edición, Academic Press, New York (1961).

- 31) Fischer, E.H. y Krebs, E.G.; "Conversion of Phosphorylase b to Phosphorylase a in Muscle Extracts", J. Biol. Chem. 216, 121 (1955).
- 32) Krebs, E.G., Kent, A.B. y Fischer, E.H.; "The Muscle Phosphorylase b Kinase Reaction", J. Biol. Chem., 231, 73 (1958).
- 33) Fischer, E.H., Graves, D.J., Crittenden, E.R.S. y Krebs, E.G.; "Structure of the Site Phosphorylated in the Phosphorylase b to a Reaction", J. Biol. Chem., 234, 1698 (1959).
- 34) Krebs, E.G., Graves, D.J. y Fischer, E.H.; "Factors Affecting the Activity of Muscle Phosphorylase b Kinase", J. Biol. Chem., 234, 2867 (1959).
- 35) Meyer, W.L., Fischer, E.H. y Krebs, E.G.; "Activation of Skeletal Muscle Phosphorylase b Kinase by Ca^{++} ", Biochemistry, 3, 1033 (1964).
- 36) Huston, R.B. y Krebs, E.G.; "Activation of Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase by Ca^{++} ", Biochemistry 7, 2116 (1968).
- 37) Krebs, E.G., De Lange, R.J., Kemp, R.G. y Riley, W.D.; "Activation of Skeletal Muscle Phosphorylase", Pharmacol. Rev., 18, 163 (1966).
- 38) De Lange, R.J., Kemp, R.G., Riley, W.D., Cooper, R.A. y Krebs, E.G.; "Activation of Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase by Adenosine Triphosphate and Adenosine 3'5'-Monophosphate", J. Biol. Chem., 243, 2200 (1968).
- 39) Walsh, D.A., Perkins, J.P. y Krebs, E.G.; "An Enzyme Catalyzing the Cyclic 3'5'-AMP Dependent Activation of Phosphorylase Kinase", Federation Proc., 27, 339 (1968).
- 40) Riley, W.D., De Lange, R.J., Bratvold, G.E. y Krebs, E.G.; "Reversal of Phosphorylase Kinase Activation", J. Biol. Chem., 243, 2209 (1968).

- 41) Riley, W.D. y Krebs, E.G.; "Reversal of the Mg-ATP Activation of Phosphorylase b Kinase", *Federation Proc.*, 25, 220 (1966).
- 42) Keller, P.J. y Cori, G.T.; "Enzymic Conversion of Phosphorylase a to Phosphorylase b", *Biochim. Biophys. Acta*, 12, 235 (1953).
- 43) Krebs, E.G. y Fischer, E.H.; "The Phosphorylase b to a Converting Enzyme of Rabbit Skeletal Muscle", *Biochim. Biophys. Acta*, 20, 150 (1956).
- 44) Graves, D.J., Fischer, E.H. y Krebs, E.G.; "Specificity Studies on Muscle Phosphorylase Phosphatase", *J. Biol. Chem.*, 235, 805 (1960).
- 45) Fischer, E.H., Graves, D.J. y Krebs, E.G.; "Phosphopeptides from ³²-P labelled phosphorylase a", *Federation Proc.*, 16, 180 (1957).
- 46) Holmes, P.A. y Mansour, T.E.; "Glucose as a Regulator of Glycogen Phosphorylase in Rat Diaphragm. I. Effect of Glucose and Related Compounds on Phosphorylase and Glycogen Levels", *Biochim. Biophys. Acta*, 156, 266 (1968).
- 47) Holmes, P.A. y Mansour, T.E.; "Glucose as a Regulator of Glycogen Phosphorylase in Rat Diaphragm. II. Effect of Glucose and Related Compounds on Phosphorylase Phosphatase", *Biochim. Biophys. Acta*, 156, 275 (1968).
- 48) Riley, G.A. y Haynes, R.C.; "The Effect of Adenosine 3',5'-Phosphate on Phosphorylase Activity in Beef Adrenal Cortex", *J. Biol. Chem.*, 238, 1563 (1963).
- 49) Merlevede, W. y Riley, G.A.; "The Activation and Inactivation of Phosphorylase Phosphatase from Bovine Adrenal Cortex", *J. Biol. Chem.*, 241, 3517 (1966).
- 50) Fischer, E.H., Hurd, S.S., Koh, P., Seery, V.L. y Teller, D.C.; "Phosphorylase: Relation of Structure to Activity", en Control of Glycogen Metabolism, pág. 19, Universitetsforlaget, Oslo (1968).

- 51) Sutherland, E.W.; "The Effect of the Hyperglycemic Factor and Epinephrine on Enzyme Systems of Liver and Muscle", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 54, 693 (1951).
- 52) Cori, G.T. e Illingworth, B.; "The Effect of Epinephrine and Other Glycogenolytic Agents on the Phosphorylase a content of Muscle", *Biochim. Biophys. Acta*, 21, 105 (1956).
- 53) Posner, J.B., Stern, R. y Krebs, E.G.; "Effects of Electrical Stimulation and Epinephrine on Muscle Phosphorylase, Phosphorylase b Kinase, and Adenosine 3',5'-Phosphate", *J. Biol. Chem.*, 240, 982 (1965).
- 54) Torres, H.N., Marechal. L.R., Bernard, E. y Belocopitow, E.; "Control of Muscle Glycogen Phosphorylase Activity by Insulin", *Biochim. Biophys. Acta*, 156, 206 (1968).
- 55) Parmeggiani, A. y Morgan, H.E.; "Effect of Adenosine Nucleotides and Inorganic Phosphate on Muscle Phosphorylase Activity", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 252 (1962).
- 56) Morgan, H.E. y Parmeggiani, A.; "Regulation of Glycogenolysis in Muscle", *J. Biol. Chem.*, 239, 2435 (1964).
- 57) Morgan, H.E. y Parmeggiani, A.; "Regulation of Glycogenolysis in Muscle", in Control Glycogen Metabolism, Ciba Foundation Symp., pág. 254 (1964).
- 58) Chelala, C.A. y Torres, H.N.; "Activation of Muscle Phosphorylase b Kinase by Mg^{++} ", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 32 (4), 704 (1968).
- 59) Chelala, C.A. y Torres, H.N.; "Interconvertible forms of Muscle Phosphorylase Phosphatase", *Biochim. Biophys. Acta*, 178, 423 (1969).
- 60) Torres, H.N. y Chelala, C.A.; "Regulation of Skeletal Muscle Phosphorylase Phosphatase activity. I. Kinetic Properties of the Active and Inactive Forms", *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 495 (1970).

- 61) Chelala, C.A. y Torres, H.N.; "Regulation of Skeletal Muscle Phosphorylase Phosphatase Activity. II. Interconversions", *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 504 (1970).
- 62) Chelala, C.A., Hirschbein, L. y Torres, H.N.; "Interconvertible Forms of Escherichia Coli RNA Polymerase", *Proc. Natn. Acad. Sci.* (en prensa).
- 63) Krebs, E.G., Love, D.S., Bratvold, G.E., Trayser, K.A., Meyer, W.L., y Fischer, E.H.; "Purification and Properties of Rabbit Skeletal Muscle Phosphorylase b Kinase", *Biochemistry*, 3, 1022 (1964).
- 64) Fiske, C.H. y Subbarow, Y.; "The Colorimetric Determination of Phosphorus", *J. Biol. Chem.*, 66, 375 (1925).
- 65) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.; "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- 66) Bray, G.A.; "A Simple Efficient Liquid Scintillator for Counting Aqueous Solutions in a Liquid Scintillation Counter", *Anal. Biochem.*, 1, 279 (1960).
- 67) Lowenstein, J.M.; "Chemical Synthesis of Adenosine Di and Triphosphates containing P³²", Biochemical Preparations, Vol 7, John Wiley and Sons, New York, pág. 5 (1960).
- 68) Paladini, A.C. y Leloir, L.F.; "Studies on Uridine-Diphosphate-Glucose", *Biochem. J.*, 51, 426 (1952).
- 69) Wieland, O. y Siess, E.; "Interconversion of Phospho- and Dephospho-Forms of Pig Heart Pyruvate Dehydrogenase", *Proc. Natn. Acad. Sci.*, 65, 947 (1970).
- 70) Holzer, H.; "Regulation of Enzymes by Enzyme-Catalyzed Chemical Modification", en Advances in Enzymology, Vol. 32, pág 297, Interscience Publishers (1969).

- 71) Wosilait, W.D. y Sutherland, E.W.; "The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase", J. Biol. Chem., 218, 469 (1956).
- 72) Mansour, T.E., Wakid, N.W. y Sprouse, H.M.; "Purification, Crystallization and Properties of Activated Sheep Heart Phosphofructokinase", Biochim. Biophys. Res. Commun., 19, 721 (1965).
- 73) Taketa, K. y Pogell, B.M.; "Reversible Inactivation and Inhibition of Liver Fructose-1,6-Diphosphatase by Adenine Nucleotides", Biochim. Biophys. Res. Commun., 12, 229 (1963).
- 74) Chytil, F. y Skrivandva, J.; "Reactivation of Cortisone-Induced Liver Tryptophan Pyrrolase by Boiled Liver Cell Sap and by Cyclic Adenosine 3'5'-phosphate", Biochim. Biophys. Acta, 67, 164 (1963).
- 75) Drummond, G.I., Duncan, L. y Friesen, A.J.D.; "Some Properties of Cardiac Phosphorylase b Kinase", J. Biol. Chem., 240, 2778 (1965).
- 76) Linn, T.C., Pettit, F.H. y Reed, L.J.; " -Keto Acid Dehydrogenase Complexes", Proc. Natn. Acad. Sci., 62, 234 (1969).
- 77) Walser, M.; "Magnesium Metabolism", en Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie, (R. Jung y colaboradores, editores), Band 59, pág. 185, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg (1967).