

Tesis de Posgrado

Piruvato quinasa de mamíferos : Estudios cinéticos de la isoenzima L (hígado) y de la isoenzima M (músculo esquelético)

Rozengurt, Enrique

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:

Rozengurt, Enrique. (1971). Piruvato quinasa de mamíferos : Estudios cinéticos de la isoenzima L (hígado) y de la isoenzima M (músculo esquelético). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1381_Rozengurt.pdf

Cita tipo Chicago:

Rozengurt, Enrique. "Piruvato quinasa de mamíferos : Estudios cinéticos de la isoenzima L (hígado) y de la isoenzima M (músculo esquelético)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1971.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1381_Rozengurt.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Piruvato quinasa de mamíferos: estudios cinéticos de
la isoenzima L (hígado) y de la isoenzima M (músculo esquelético)

Autor : Enrique Rozengurt

Director : Dr. Héctor Carminatti

Lugar de Trabajo : Instituto de Investigaciones Bioquímicas

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

F1381

- 1971 -

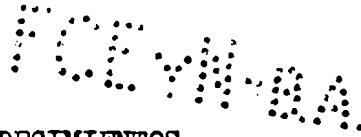
130
2

CONFINA

A mi madre

A mi padre

A Nora



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Héctor Carminatti por el amplio apoyo que en todo momento me ha dispensado durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Luis F. Leloir por haberme permitido realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas.

A los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas por su cooperación y críticas.

Al Dr. Luis Jiménez de Asúa, mi compañero de laboratorio, sin cuya colaboración muchos de los experimentos de esta tesis no hubieran sido posibles.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por el apoyo material que me proporcionó durante la realización de este trabajo.

A la Srta. Beatriz Keledjian por su paciente tarea en la copia de los manuscritos.

RESUMEN

Se ha estudiado algunas propiedades cinéticas de las piruvato quinazas de dos tejidos metabólicamente diferentes; uno gluconeogénico, el hígado y otro glucolítico, el músculo. Por consiguiente, se pueden considerar dos aspectos en esta investigación:

a) Isoenzima L de hígado: esta forma de piruvato quinasa fue purificada entre 400 a 600 veces. Estudiando la cinética de activación por K^+ y NH_4^+ se encontró que la enzima exhibe efecto cooperativo homotrópico con respecto a estos activadores. Tanto el PEP como el FDP (el efector alostérico positivo) ejercen un marcado efecto heterotrópico positivo sobre la cooperatividad homotrópica del K^+ . Estos efectos son prácticamente independientes del buffer utilizado como así también de la fuerza iónica del medio.

El pH ejerce una influencia compleja sobre la forma de la curva de saturación del K^+ ; el efecto cooperativo homotrópico de este activador es máximo a pH 7.5 declinando marcadamente a valores de pH superiores (8.35) o inferiores (6.0).

En experimentos diseñados para estudiar el comportamiento del K^+ como ligando heterotrópico se comprobó que este activador, a diferencia del FDP, sólo ejerce una pequeña influencia sobre la cooperatividad del sustrato (PEP) y la del inhibidor alostérico (ATP).

La cinética de activación por Mg^{++} también fue sigmoide a una concentración baja de PEP; en presencia de FDP o de niveles altos de PEP la curva de saturación del catión divalente se transforma en hiperbólica.

El K^+ y el Mg^{++} estabilizan la enzima contra la inactivación producida por tripsina y por pronasa mientras que en presencia de FDP la enzima es inactivada más rápidamente por ambas proteasas. Los sustratos

no ejercen un efecto significativo.

Los resultados obtenidos indican que la cinética de activación por K^+ es de naturaleza alostérica. Estos estudios sugieren que el comportamiento cinético de la isoenzima L no se ajusta al modelo propuesto por Monod, Wyman y Changeux (J. Mol. Biol. 12, 88 (1965)).

b) Isoenzima M de músculo: esta enzima es inhibida en forma específica por la fenilalanina. Este efecto es revertido por alanina, serina y cisteína. La inhibición es de tipo mixto con respecto al PEP y no competitiva con respecto al ADP; los gráficos de actividad en función de la concentración de ambos sustratos son hiperbólicos, aún en presencia de altas concentraciones del inhibidor.

Cuando se estudió la variación de la actividad enzimática en función de la concentración de fenilalanina se obtuvieron curvas sigmoideas. A niveles altos de PEP o en presencia de los aminoácidos reactivantes aumenta significativamente el valor de $I_{0.5}$ pero no se modifica la cooperatividad del inhibidor. El grado de inhibición y el efecto cooperativo de la fenilalanina son marcadamente modificados cuando se varía el pH del medio de incubación.

El comportamiento cinético de la fenilalanina fue comparado con el del 2-PCA, un inhibidor isostérico. La inhibición ejercida por este último metabolito se caracteriza por lo siguiente: es de tipo puramente competitivo con respecto al PEP, es independiente del pH de la mezcla de incubación y no es revertida por alanina. Además, la curva de inhibición por 2-PCA es hiperbólica.

El efecto cooperativo homotrópico de la fenilalanina fue marcadamente disminuido en las siguientes condiciones experimentales: cuando la enzima fue disociada y renaturalizada; cuando el experimento se realizó a pH 7.25 ó al mantenerse la enzima diluida a 4°C durante dos semanas.

Los resultados obtenidos indican que la inhibición ejercida por la fenilalanina es de naturaleza alostérica. El comportamiento cinético de la isoenzima M de músculo no se ajusta al modelo de Monod y col.; se propone un esquema que permite explicar cualitativamente las propiedades cinéticas de la enzima.

INDICE

	Pág.
Abreviaturas	1
 <u>I. INTRODUCCION</u>	
Puntos de Control de la Glucólisis y Gluconeogénesis . . .	3
Enzimas Reguladoras	7
Piruvato Quinasa	12
Objeto de la Presente Investigación	17
 <u>II. MATERIALES Y METODOS</u>	
Reactivos	21
Enzimas	21
Ensayo de la Actividad Enzimática	25
Otros Métodos	26
 <u>III. RESULTADOS</u>	
<u>Piruvato Quinasa Tipo L de Hígado</u>	
Cinética de Activación por K^+ y NH_4^+	27
Efecto de los Bufferes Diferentes	33
Efecto de la Fuerza Iónica	36
Cinética de Activación por K^+ a Diferentes Valores de pH .	36
Efecto de la Concentración de Mg^{++}	38
Efecto del K^+ sobre la Curva de Saturación del PEP	40
Interacción entre el K^+ y el ATP	40
Cinética de Activación por Mg^{++}	46

Estabilidad Térmica	49
Inactivación en Presencia de Enzimas Proteolíticas	53
<u>Piruvato Quinasa de Músculo</u>	
Cinética en Función de la Concentración de Sustratos	64
Efecto de la Concentración de Fenilalanina sobre la Velocidad de Reacción	64
Efecto de la Alanina, Serina y Cisteína sobre la Curva de Inhibición	69
Cinética de Inhibición por 2-PGA	69
Interacción entre la Alanina y los Inhibidores	73
Influencia del pH sobre la Inhibición Producida por la Fenilalanina	76
Efecto de la Disociación y Renaturalización	81
 <u>IV. DISCUSION</u>	
 <u>Piruvato Quinasa Tipo L de Hígado</u>	
Consideraciones Generales	88
Teorías Alostéricas	90
Aplicación de las Teorías Alostéricas a los Datos Cinéticos Obtenidos con la Isoenzima L de Hígado	93
 <u>Piruvato Quinasa de Músculo</u>	
Consideraciones Generales	96
Aplicación de las Teorías Alostéricas a los Datos Cinéticos Obtenidos con la Isoenzima M de Músculo	100
Modelo Propuesto para la Piruvato Quinasa de Músculo	101
Apéndice	110
Bibliografía	113

ABREVIATURAS

ADP	5' Adenosina Disfosfato
AMP	5' Adenosina Monofosfato
ATP	5' Adenosina Trifosfato
DHAP	D1 Hidroxi Acetona Fosfato
1,3 di PG	1,3 Difosfo Glicérico
EDTA	Etilendiamintetraacetato
FDP	Fructosa 1,6 Difosfato
F-6-P	Fructosa - 6 - Fosfato
GDP	5' Guanosina Difosfato
G-3-P	Gliceraldehido - 3 - Fosfato
G-6-P	Glucosa - 6 - Fosfato
GTP	5' Guanosina Trifosfato
HEPES	N-2-Hidroximetilpiperacina-N'-2-Etansulfónico
MES	2-(N-Morfolino) Etansulfónico
NADH	Difosfo Piridín Nucléotido Reducido
PEP	Fosfo-Enol-Pirúvico
PFK	Fosfo-Fructo-Quinasa
3PG	3-Fosfoglicérico
2PGA	2-Fosfoglicérico
Pi	Fosfato Inorgánico
PPi	Pirofosfato
TES	N-Tris(Hidroximetil) Metil-2-Aminoetan Sulfónico
TMA	Hidróxido de Tetrametil Amonio
TRIS	Tris (Hidroximetil) Amino Metano
UDPG	Uridina Difosfato Glucosa

I. INTRODUCCION

En la última década se ha efectuado un gran avance en el conocimiento de los mecanismos que regulan el metabolismo celular. Los estudios efectuados revelaron la existencia de complejos circuitos de regulación que controlan el flujo de metabolitos a través de las diferentes vías metabólicas (1). Se considera que gran parte de la regulación metabólica se efectúa mediante dos mecanismos fundamentales (2): a) regulación selectiva de la velocidad de síntesis de una o varias enzimas (3) y b) variación de la actividad catalítica de las mismas en presencia de metabolitos específicos. A estos sistemas de control debemos añadir los fenómenos de interconversión enzimática (4), principalmente observados en las enzimas relacionadas al metabolismo del glucógeno (5). Otros mecanismos (por ej.: debidos a la compartimentalización ó a la unión de las enzimas a otras macromoléculas o estructuras celulares) son menos conocidos (6 - 8).

Uno de los mecanismos fundamentales de control metabólico fue aclarado por Umbarger (9) estudiando la biosíntesis de isoleucina y por Yates y Pardee (10) investigando la formación de pirimidinas. Estos investigadores demostraron que el producto final de una vía metabólica biosintética es capaz de inhibir la actividad catalítica de la primer enzima de la secuencia (retroinhibición). Actualmente, se conoce un considerable número de enzimas susceptibles al control por retroinhibición (11 - 13).

La activación por precursor que consiste en la estimulación de la última enzima de la secuencia metabólica por el primer metabolito de la misma (13), constituye un mecanismo de regulación importante principalmente en las vías anfibólicas (14). Este efecto fue descubierto por Leloir y col. (15 - 16) quienes demostraron que la glucoógeno sintetasa

de músculo e hígado se activa por G-6-P, un precursor del glucógeno.

Mediante diferentes procedimientos, se demostró que las moléculas de inhibidores o activadores se unen a receptores específicos de la enzima, topográficamente separados del centro catalítico (17 - 19), y denominados sitios alostéricos (1). Las proteínas reguladoras tienen estructura cuaternaria (20 - 21) y la dependencia de la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de sustratos o efectos frecuentemente se aparta de la ecuación de Michaelis - Menten (22)

Como se mencionó anteriormente, la primer enzima de una secuencia biosintética no ramificada, es alostéricamente inhibida por el producto final de la misma. Por el contrario, en secuencias multifuncionales, la identificación de los puntos de control es más compleja. En lo que sigue nos referiremos a los criterios utilizados por diferentes investigadores para determinar cuales son las enzimas reguladoras de la glucolisis y gluconeogénesis en tejidos de mamíferos.

Puntos de Control de la Glucolisis y Gluconeogénesis

La glucolisis constituye una secuencia metabólica de gran importancia desde el punto de vista energético y anabólico íntimamente vinculada al resto del metabolismo celular (23). Durante alrededor de cuatro décadas las enzimas del ciclo glucolítico fueron intensamente estudiadas y ya se conocen muchos detalles de estas reacciones (24). Recientemente se ha renovado el interés por esta vía metabólica pero con un enfoque diferente: el de su regulación.

Las enzimas susceptibles a control en una cadena metabólica son aquellas que catalizan reacciones fisiológicamente unidireccionales y que en ciertas condiciones, son las etapas limitantes del flujo de metabolitos a través de la vía. Estudiando los mecanismos que controlan la

glucólisis en diferentes sistemas, se llegó a la conclusión de que algunas enzimas de esta vía metabólica, constituyen puntos potenciales de regulación (25 - 27).

En principio se intentó identificar las etapas reguladoras determinando las velocidades máximas de las enzimas de esta secuencia; las que disponen de menor capacidad catalítica fueron consideradas las etapas limitantes de la cadena metabólica (28, 29). Sin embargo, mediante este procedimiento no se toma en cuenta la concentración y distribución de los metabolitos "in vivo", el efecto de activadores o inhibidores, como así tampoco frecuentemente, los parámetros cinéticos de las enzimas en el tejido particular que se investiga. Esta serie de extrapolaciones limitan considerablemente la validez de este criterio (27, 30).

Un procedimiento más directo para identificar las etapas fisiológicamente unidireccionales, consiste en calcular las velocidades de cada reacción en ambos sentidos, catabólico y sintético (31). Para obtener esta información es necesario conocer: a) K_{app} , la constante termodinámica de equilibrio; b) Γ , la relación de acción de masas, que se determina conociendo las concentraciones de los intermediarios metabólicos en el estado estacionario (32) y c) el flujo neto a través de la vía glucolítica (V_n). Con estos datos se está en condiciones de calcular las velocidades de reacción de cada etapa en ambas direcciones, de acuerdo a las ecuaciones:

$$v_1 = \frac{V_n}{1 - \frac{\Gamma}{K_{app}}}$$

$$v_{-1} = \frac{V_n}{\frac{K_{app}}{\Gamma} - 1}$$

donde v_1 y v_{-1} representan las velocidades en cada dirección y V_n la velocidad neta a través de la vía metabólica (la deducción de estas ecuaciones se encuentra en la ref. 31). Este análisis fue aplicado a la glucólisis de células de tumor ascítico y permite disponer de un cuadro dinámico de este proceso.

Los resultados esquematizados en la Fig. 1 indican que las reacciones catalizadas por la mayoría de las enzimas, presentan una pequeña desviación de la condición de equilibrio, según la cual las velocidades de la reacción en ambos sentidos (sintético y catabólico) son aproximadamente iguales. La actividad de estas enzimas se adecúa al flujo glucolítico simplemente por acción de masas, de manera que frecuentemente no están sujetas a regulación alostérica.

Por el contrario se puede ver que la enzima fosfofructoquinasa cataliza la conversión de 27μ moles seg.^{-1} de producto respectivamente en la dirección glucolítica mientras que la velocidad de la reacción inversa es marcadamente inferior (3 órdenes de magnitud). Además cabe señalar que las reacciones catalizadas por la hexoquinasa y la piruvato quinasa presentan características similares. Por consiguiente, estas enzimas catalizan reacciones muy alejadas del equilibrio, de manera que en condiciones fisiológicas son esencialmente unidireccionales y por lo tanto, puntos potenciales de control metabólico. Además, se puede apreciar que la PFK, la primer enzima propiamente glucolítica, es la reacción limitante de la cadena. Resulta interesante destacar que en ciertas condiciones fisiológicas la característica de la etapa limitante se transfiere a otros puntos de control como la piruvato quinasa (33, 34). Estas conclusiones no se limitan al caso esquematizado en la Fig. 1 que nos permitió apreciar cuantitativamente las velocidades de cada etapa de la glucólisis, sino se han extendido a otros sistemas en los que se ha estudiado las variaciones de concentración de los intermediarios glucolíticos.

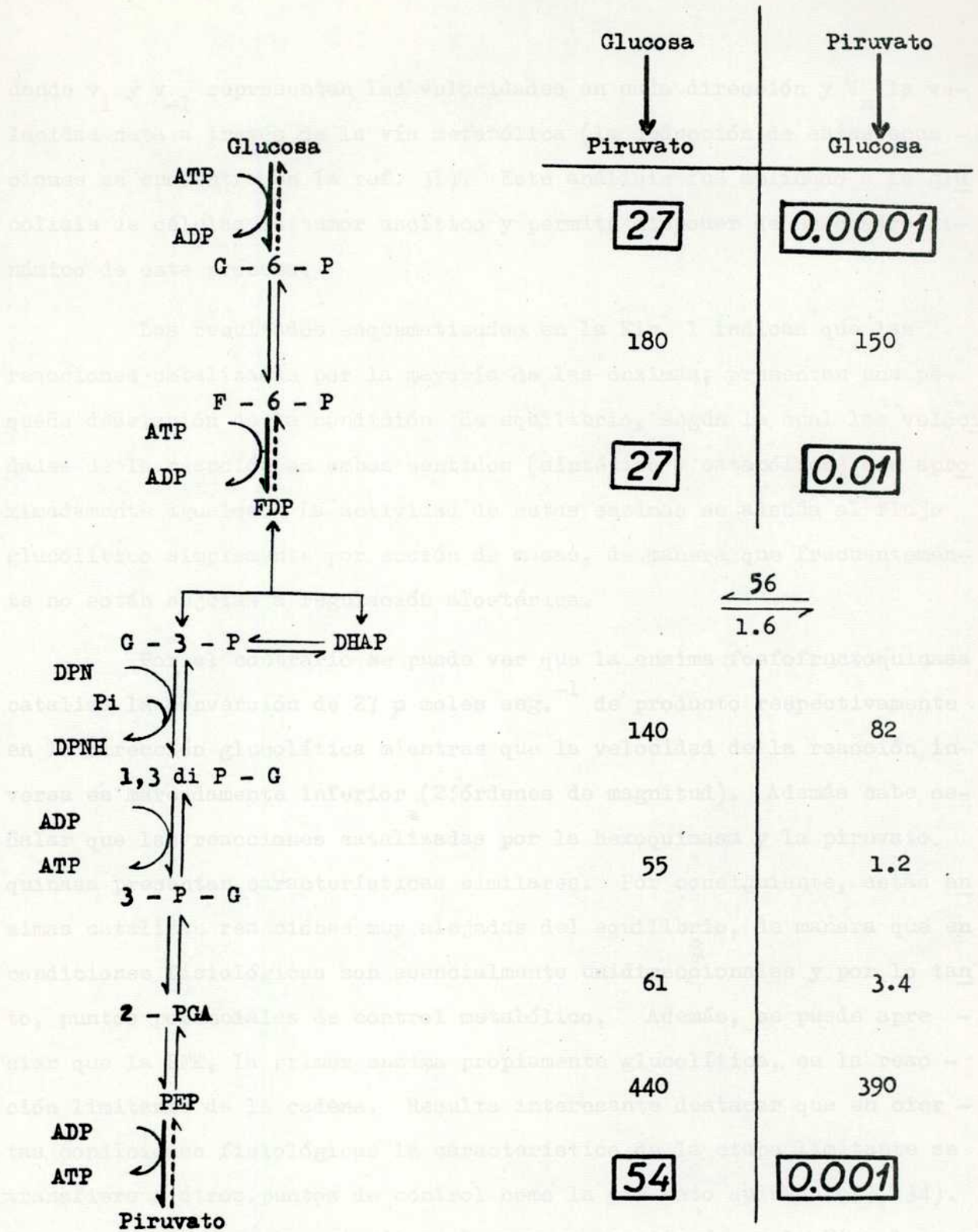


Fig. 1 Flujo glicolítico en células de tumor ascítico. Los datos representan μ moles sec.^{-1} y fueron obtenidos de Hess y Brand (31).

ticos (35 - 39). Además, la conducta oscilatoria de los cofactores y metabolitos de la glucolisis también refleja la operación cooperativa de varios puntos de control distribuidos en la secuencia de reacciones (40, 41). Por consiguiente, las evidencias reunidas en los estudios previos, indican que la hexoquinasa, la PFK y la piruvato quinasa constituyen e - tapas en las cuales se regula el flujo glucolítico.

En los tejidos gluconeogénicos, como el hígado y el riñón, la secuencia de reacciones mostrada en la Fig. 1 tiene un carácter bidireccional. En este caso existen enzimas adicionales que permiten sortear las tres etapas glucolíticas fisiológicamente irreversibles, como se puede ver en la Fig. 2. Atkinson (42) señaló que estos sitios del metabo - lismo deben estar sujetos a regulación con el fin de evitar corto circui - tos metabólicos cuya consecuencia es el gasto continuo de energía sin flujo metabólico neto. Sin embargo la supresión de una vía cuando opera la otra no es completa, sino que estos ciclos podrían tener un funciona - miento basal (43). Se puede concluir que pequeñas variaciones recíprocas en la actividad de estas enzimas determinarán la dirección del flujo me - tabólico (44).

Habiéndose identificado "in vivo" cuales son los puntos de control metabólico corresponde dilucidar "in vitro" cuales son los factores que modifican la actividad enzimática y determinar su mecanismo de ac - ción.

Enzimas Reguladoras

Las enzimas que regulan las tres etapas unidireccionales de la glucolisis y gluconeogénesis han recibido considerable atención; a conti - nuación nos referiremos brevemente a ellas:

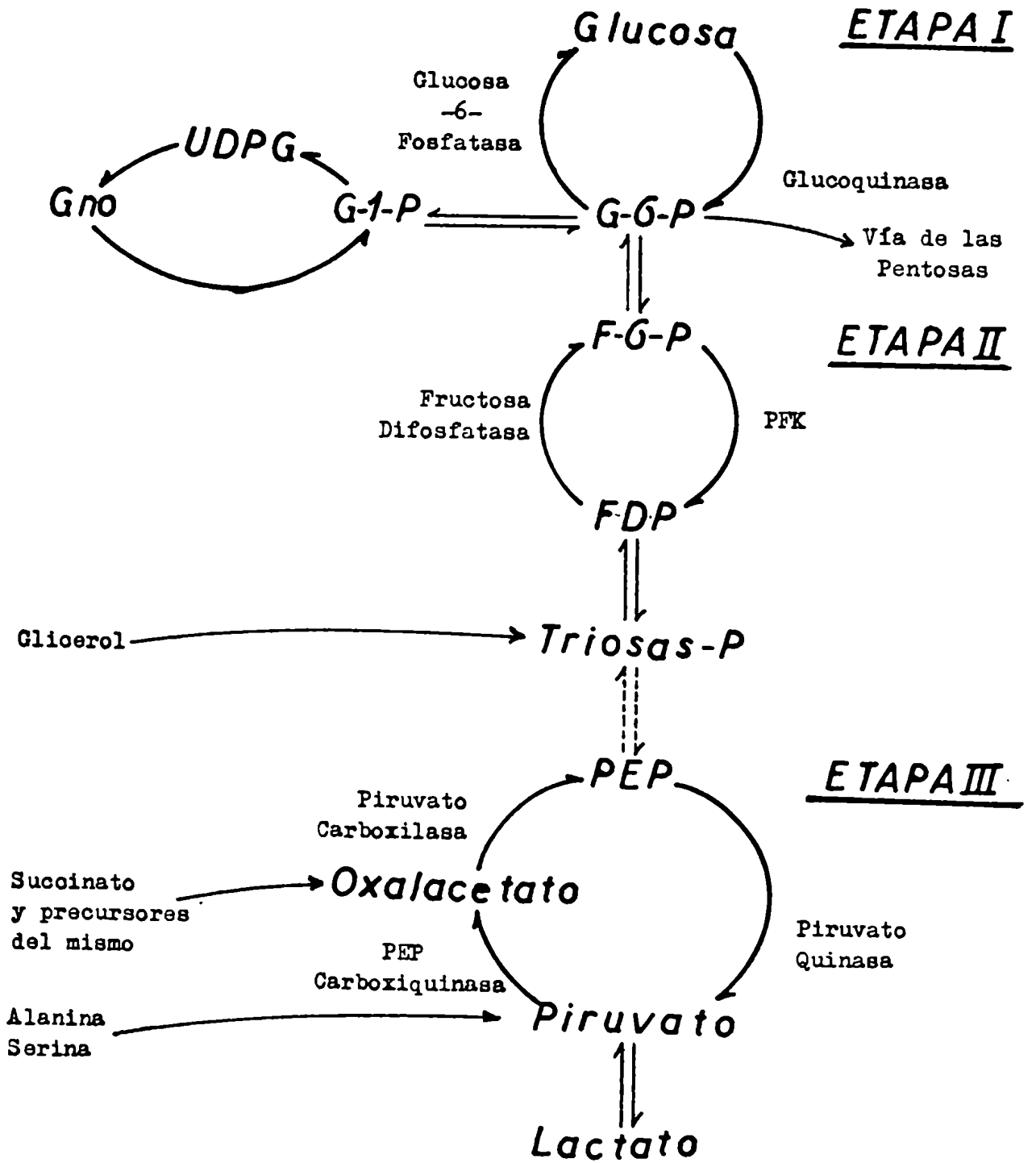
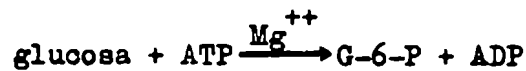


Fig. 2. Vías de la glucólisis y gluconeogénesis en el hígado (estos caminos metabólicos no excluyen otras posibles rutas (27)).

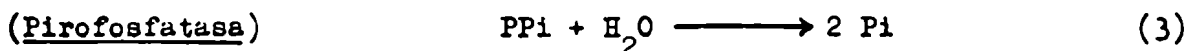
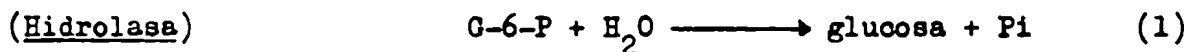
Etapa I

a) Hexoquinasas: catalizan la reacción



La actividad enzimática es inhibida por G-6-P (45 - 47), AMP, ADP (48) y ATP (49). El Pi (49 - 50) y el glicerofosfato (49) revierten la inhibición por G-6-P. Existen al menos cuatro diferentes isoenzimas en el hígado (51) y también se observaron varias formas en otros tejidos (52). Una de las isoenzimas de hígado, denominada glucoquinasa, tiene una Km alta por glucosa (53 - 54) no es inhibida por G-6-P (55) y su nivel fluctúa de acuerdo al estado dietético y hormonal (56). Se cree que la actividad de esta isoenzima es un factor importante en la regulación de la glucemia (27).

b) Glucosa 6 fosfatasa: esta enzima microsomal es multifuncional, catalizando las reacciones:



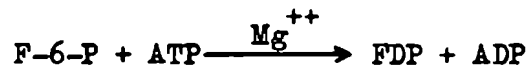
Las reacciones (1) y (2) son inhibidas por HCO_3^- (57) y Pi (58). La reacción (1) es inhibida por ATP y otros nucleótidos; este efecto es potenciado por detergentes (59). Los factores dietéticos y hormonales influyen marcadamente estas actividades y fueron recientemente revisados (60).

Etapa II

c) Fosfofructoquinasa: conviene destacar que la G-6-P, producto de la reacción catalizada por la hexoquinasa, puede seguir diferentes ca

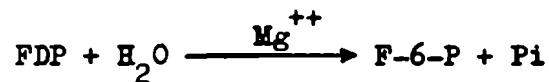
minos metabólicos, como se puede ver en la Fig. 2. Por el contrario, el FDP es el primer intermediario metabólico propiamente glicolítico por lo cual se considera a la PFK la primer enzima de la secuencia.

La enzima cataliza la reacción:



Los estudios efectuados con la PFK obtenida de diferentes fuentes, revelaron que es una proteína alostérica, capaz de mediar complejas interacciones indirectas, entre un considerable número de señales reguladoras (61 - 69). La enzima es inhibida por ATP y citrato; estas inhibiciones son revertidas por: F-6-P, FDP, Pi, AMP, 5'3' AMP cíclico y ADP. El K^+ y el NH_4^+ aumentan la actividad enzimática pero no revierten el efecto de los metabolitos inhibidores. Se ha postulado la existencia de siete a doce sitios para los sustratos y efectores alostéricos (67). Recientemente se logró desensibilizar la proteína al ATP (70) y a otros efectores (71).

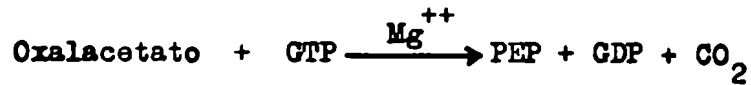
d) La fructosadifosfatasa cataliza la reacción:



La enzima de diferentes fuentes es inhibida por AMP (72 - 73) el cual se une a un sitio alostérico (74). Se ha postulado que la relación inversa entre los efectos del AMP sobre la PFK y la fructosadifosfatasa constituye un mecanismo para el control recíproco de ambas enzimas.

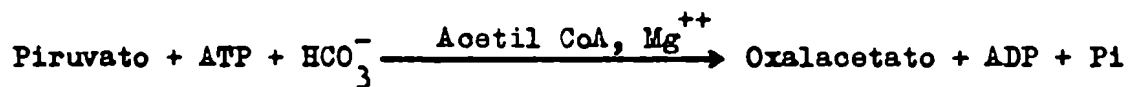
Etapa III

e) La fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa cataliza la reacción:



No se conoce hasta el presente regulación alostérica por metabolitos, pero su nivel fluctúa considerablemente en diferentes condiciones hormonales o dietéticas (75 - 77).

f) La piruvato carboxilasa cataliza la reacción:



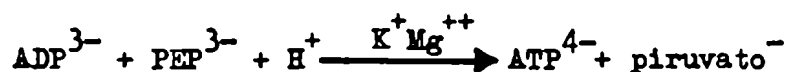
En ausencia de acetil - CoA, las enzimas purificadas de tejidos de mamíferos y de aves, son esencialmente inactivas; por el contrario las obtenidas de *Pseudomonas citronellolis* y *Aspergillus niger* no requieren este metabolito para su actividad (78). En el caso de la piruvato carboxilasa de hígado se observó que exhibe efecto cooperativo homotrópico con respecto al acetil CoA; este efecto depende del pH de la mezcla de incubación (78).

En algunas especies se observó que las enzimas gluconeogénicas que sintetizan PEP a partir de piruvato están compartimentalizadas. Este hecho agrega nuevos puntos de regulación tal, como por ejemplo, el transporte de los metabolitos a través de las membranas mitocondriales ya que el oxalacetato no es libremente permeable a través de las mismas (79 - 82, pero también vease 83 para una opinión diferente).

g) Piruvato quinasa: nuestro interés se dirigió al estudio de algunas propiedades cinéticas de la piruvato quinasa de músculo e hígado es decir de tejidos glucolíticos y gluconeogénicos. A continuación nos referiremos con mayor detalle a esta enzima.

Piruvato Quinasa

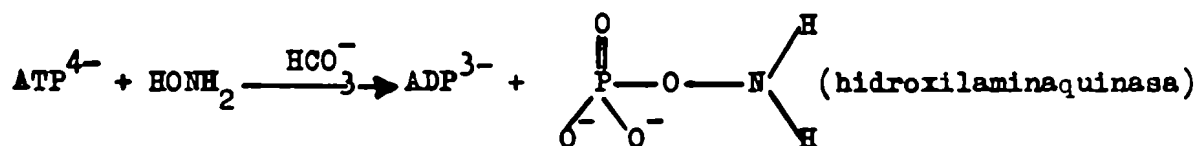
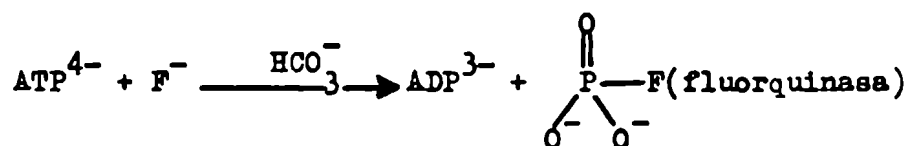
a) Piruvato quinasa de músculo: esta enzima cataliza la conversión de PEP en piruvato de acuerdo a la reacción:



que se encuentra predominantemente desplazada hacia la derecha (84).

Como se vió anteriormente, la reacción es fisiológicamente unidireccional. La reversibilidad "in vitro" fue demostrada, comprobándose que se intercambia C^{14} entre piruvato y PEP (85 - 87). A pH 7.4, la constante de equilibrio es aproximadamente 6.450 (86).

La enzima cataliza, además, las siguientes reacciones:



de menor interés fisiológico (88-90). Se debe destacar que la enzima tiene un requerimiento de HCO_3^- para catalizar las reacciones de fosforilación del F^- y de la HONH_2 .

Los estudios cinéticos demostraron que la K_m para un sustrato es independiente de la concentración del otro. En el gráfico de las inversas se obtiene una familia de curvas que interceptan en un punto del eje de las abscisas (91). Estos resultados indicaron que el PEP y el ADP

se unen a la enzima en una reacción rápida al azar, siendo la etapa limi tante la conversión del complejo ternario (92).

Las reacciones catalizadas por la piruvato quinasa requieren un catión monovalente, como el K^+ , el cual puede sustituirse por NH_4^+ ó Rb^+ (93 - 95). Además, la enzima tiene un requerimiento absoluto de un catión divalente como el Mg^{++} ó Mn^{++} (88). Estos últimos pueden unirse a la enzima directamente (96) o bien formar inicialmente un complejo $Mg ADP^-$ que luego se une al sitio activo (97). La reacción de hidroxilamina quinasa tiene un requerimiento diferente de metales divalentes (98).

Se han identificado algunos inhibidores de la piruvato quinasa muscular, tales como Ca^{++} (94, 99), AMP (100), Pi (101) y ATP (91, 96, 102). El AMP y Pi sólo inhiben a concentraciones altas.

Estudios recientes indicaron que la inhibición por ATP se debe principalmente a la formación de complejos con iones Mg^{++} (103, 104); es te efecto se produce como consecuencia de la marcada diferencia entre las constantes de disociación de los complejos $Mg ADP^-$ y $Mg ATP^{2-}$ (105 - 107).

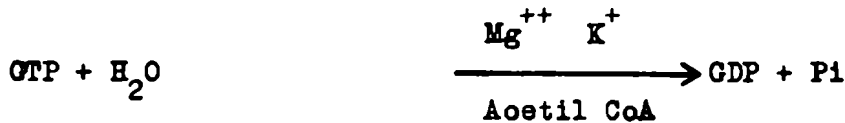
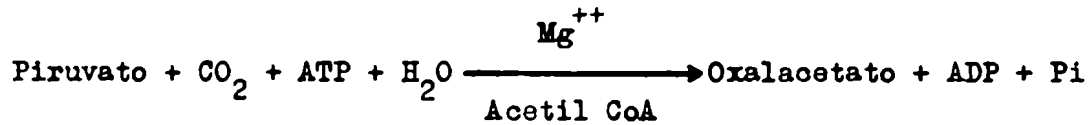
En base al número de moles de PEP y Mn^{++} que se unen por mol de proteína, se ha postulado que esta enzima tiene dos sitios activos (91, 108). Mediante diferentes técnicas tales como diferencia en el espectro ultravioleta, dispersión óptica rotatoria, fluorescencia, velocidad de sedimentación, etc., se ha demostrado que la piruvato quinasa mus cular es una proteína flexible; ésta experimenta cambios conformacionales en las siguientes condiciones: 1) en presencia de los cationes monovalentes o divalentes necesarios para la actividad enzimática. 2) en presencia de PEP o piruvato. 3) cuando se modifica el pH o la temperatu ra de la preparación enzimática. 4) cuando se agrega urea o triton x

100 (109 - 114). Además se ha observado que los sustratos y cationes activadores protegen a la enzima de la inactivación por piridoxal 5' P (115) y p- cloromercuribenzoato (116), probablemente produciendo cambios conformacionales de la proteína.

El peso molecular de la piruvato quinasa muscular es de 237.000 (117). En presencia de concentraciones suficientes de urea o clorhidrato de guanidina, la proteína se disocia en subunidades de un peso molecular de 57.200, indicando que la enzima es un oligómero formado por cuatro subunidades (118 - 120). En base a diferentes criterios se concluyó que las subunidades son muy similares entre sí, aunque no se descartaron pequeñas diferencias estructurales (121, 122).

Recientemente se ha desarrollado un procedimiento mediante el cual ha sido posible disociar la proteína en subunidades y luego efectuar la reasociación de las mismas, obteniéndose una recuperación considerable de la actividad enzimática (122, 123).

b) Piruvato quinasa de hígado: las actividades de la PEP carboxiquinasa y la piruvato quinasa determinadas en homogenatos de hígado son de 8.0 y 55.0 unidades/g de hígado, respectivamente (83). Ambas enzimas están ubicadas en el citoplasma, en la rata. Por consiguiente, en esta especie, la actividad de la piruvato quinasa sería suficiente para convertir todo el PEP sintetizado "de novo" por la vía gluconeogénica en piruvato. La acción combinada de estas enzimas se puede representar por las ecuaciones:



Por consiguiente, resulta necesario que la piruvato quinasa es té sujeta a algún tipo de control que disminuya su actividad cuando funciona la vía gluconeogénica. Estos hechos despertaron un considerable interés en los factores que regulan la actividad de la enzima de hígado.

Estudios efectuados en diferentes laboratorios, demostraron que en el hígado de rata existen dos isoenzimas de piruvato quinasa, designadas tipo L y tipo M (124 - 126).

Ambas formas pueden diferenciarse inmunológicamente: la isoenzima L, típica del hígado, no es neutralizada por anticuerpos preparados contra la piruvato quinasa de músculo, mientras que la forma M de hígado es completamente neutralizada (127). Ambas isoenzimas pueden separarse mediante diferentes procedimientos: precipitación fraccionada con sulfa-

to de amonio, cromatografía en DEAE - celulosa o CM - celulosa, electroforesis en diferentes sistemas, etc. Además, en nuestro laboratorio se ha visto que la enzima puede ser eluida de columnas de CM - celulosa por sus efectores alostéricos (128).

El nivel de la piruvato quinasa de hígado varía en diferentes condiciones dietéticas y hormonales (129 - 134) habiéndose demostrado que predominantemente fluctúa la concentración de isoenzima L (127). Esta última representa la mayor parte de la actividad de piruvato quinasa hepática siendo la relación de la concentración de la forma L a forma M, aproximadamente tres, en condiciones fisiológicas (127).

Los estudios efectuados con la isoenzima L, revelaron que el comportamiento cinético difiere marcadamente del de la piruvato quinasa de músculo. Así, la dependencia de la velocidad inicial de reacción en función de la concentración de uno de los sustratos, PEP, es típicamente sigmoide (126, 135, 137). La enzima es marcadamente activada por el FDP, en presencia del cual la curva de saturación para el PEP, se transforma de sigmoide en hiperbólica, aumentando la afinidad aparente de la enzima para este sustrato (135 - 139). Por el contrario, el ATP (137, 140) y la alanina (83, 141 - 142) modifican la actividad enzimática en sentido opuesto, esto es, inhibiéndola y aumentando el efecto cooperativo homotrópico del sustrato. Las propiedades alostéricas se modifican marcadamente en función del pH de la mezcla de incubación (140 - 144).

Aunque aún no se ha demostrado experimentalmente que esta isoenzima esté formada por subunidades, su peso molecular de 208.000 (127) y su comportamiento cinético alostérico, permiten suponer que, como en el caso de la piruvato quinasa muscular, esta proteína posee estructura cuaternaria.

Objeto de la Presente Investigación

Como se mencionó previamente nuestro interés se dirigió al estudio de algunas propiedades cinéticas de las piruvato quinasa de dos tejidos cuyas características metabólicas son marcadamente diferentes: uno gluconeogénico (el hígado) y otro glucolítico (el músculo esquelético). Por consiguiente se pueden considerar dos aspectos en esta investigación:

a) Piruvato Quinasa Hepática (Tipo L).

Durante mucho tiempo, la piruvato quinasa ha sido considerada un caso típico de aquellas enzimas que requieren un catión monovalente para su actividad (145). Sin embargo, los estudios recientes efectuados con piruvato quinasa obtenidas de diferentes fuentes han demostrado que este requerimiento es variable como así también la activación por FDP. En la Tabla I se puede apreciar que la actividad de las piruvato quinasa de *E. coli* (147) y *Acetobacter xilinum* (146) es totalmente independiente de la presencia de cationes monovalentes.

Este hecho resulta particularmente interesante porque recientemente se ha propuesto que en las reacciones donde interviene un intermediario con la estructura:



son activadas por un catión monovalente (154). La estructura del PEP se ajusta a la del intermediario propuesto. Sin embargo la observación de que la piruvato quinasa de *E. coli* y *Acetobacter xilinum* no son activadas por K^+ debilita considerablemente esta hipótesis. Además, este modelo de activación, predice que las curvas de saturación para el

Tabla I

Efecto del K^+ y del FDP sobre la actividad de piruvato quinasa aislada de diferentes fuentes.

Origen	Activación <u>a</u>		Referencia
	K^+	FDP	
Acetobacter xilinum	-	-	(146)
Escherichia Coli	-	+	(147)
Mucor rouxii	+	+	nota b
Levadura	+ <u>c</u>	+	(148,149)
Plantas	+	- <u>d</u>	(145)
Salmo irideus	- <u>e</u>	-	(150)
Músculo esquelético	+ <u>f</u>	-	(94,135)
Músculo cardíaco	+ <u>f</u>	-	(151)
Cerebro	+	-	(36)
Tejido adiposo	+ <u>f</u>	+	(152)
Hígado (tipo M)	+	-	(153)
Hígado (tipo L)	+ <u>f</u>	+	(136)

a - El signo menos indica que la actividad enzimática no es modificada en presencia del activador.

b - Passeron, S. y Terenzi, H. Comunicación personal.

c - La FDP puede reemplazar el requerimiento de K^+ .

d - No hay datos.

e - Es sólo ligeramente activada.

f - El requerimiento de cationes monovalentes es absoluto.

cación activador son hiperbólicas. En el caso de la piruvato quinasa de levadura y tejido adiposo, se obtuvieron cinéticas de activación sigmoide (148, 152). Además, en algunas enzimas alostéricas se ha observado que el efecto de un modificador positivo varía según la fuente de la que se ha obtenido la enzima; por ejemplo el efecto del G-6-P sobre la glucógeno sintetasa (155) y el del acetyl CoA sobre la piruvato carboxilasa (78). Considerando que el mecanismo de activación de la piruvato quinasa por iones monovalentes no está aclarado, resultó interesante efectuar un estudio cinético detallado de esta activación en la isoenzima L de hígado, algunas de cuyas propiedades alostéricas eran conocidas.

En diferentes sistemas se ha demostrado que la adición de sustratos (156 - 161) o efectores alostéricos (162, 163) modifica apreciablemente la velocidad de inactivación por enzimas proteolíticas, interpretándose que estos efectos son debidos a cambios conformacionales de la proteína. Por lo tanto se consideró de interés estudiar la susceptibilidad de la isoenzima L, a las enzimas proteolíticas en presencia de los cationes monovalentes y de los otros efectores alostéricos de la enzima.

b) Piruvato Quinasa de Músculo Esquelético

Todos los estudios anteriores efectuados con esta enzima son coincidentes en demostrar que la dependencia de la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de los sustratos o cationes activadores es estrictamente hiperbólica. Por consiguiente, a pesar de que la enzima experimenta cambios conformacionales en diferentes condiciones, y que posee estructura cuaternaria, no se han obtenido evidencias cinéticas que permitan suponer que esta enzima tiene propiedades alostéricas. Recientemente se observó que la enzima de músculo esquelé-

tico y otras isoenzimas M son inhibidas por fenilalanina (164, 165) y que este efecto es revertido por alanina (165). Considerando que no existe una marcada similitud estructural entre el inhibidor y los sustratos de las diferentes reacciones que cataliza la enzima resultó interesante estudiar detalladamente este efecto para establecer el mecanismo de esta inhibición y analizar el efecto de la disociación y reasociación de la enzima sobre estas propiedades.

II MATERIALES Y METODOS

Reactivos

El ATP, 2-PGA, TRIS, la tripsina, pronasa y quimotripsina fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (U.S.A.). El MES, TES, HEPES y ditiotreititol fueron comprados en Calbiochem. El hidróxido de TMA lo fue en The British Drug Houses (Gran Bretaña). El PEP y el ADP fueron adquiridos en Boehringer & Soehne (Alemania). La DEAE - celulosa, la CM - celulosa y la Sefadex G₂₅ fueron obtenidas de Serva, Bio-Rad y Pharmacia respectivamente.

El 2 - PGA, como sal de bario, fue convertido a sal de K⁺ pasando el compuesto por una resina Dowex 50, forma H⁺ (previamente lavada con HCl 1N y H₂O destilada) y luego neutralizando con HOK. Los bufferes TES, HEPES y MES fueron ajustados al pH requerido utilizando una solución 2N de hidróxido de TMA.

Las demás drogas usadas fueron de origen comercial de la más alta pureza posible y se utilizaron sin purificación previa.

Enzimas

Purificación de la Isoenzima L de Piruvato Quinasa de Hígado

En el curso de la purificación de la piruvato quinasa tipo L se utilizaron las siguientes soluciones:

Buffer A) TRIS - HCl 25 mM - sacarosa 250 mM - EDTA 1 mM, pH 7.5

Buffer B) Igual al Buffer A) + ditiotreititol 1 mM

Buffer C) TRIS - maleato 5 mM - EDTA 1 mM - ditiotreititol 1 mM, pH 6.0

Se utilizaron ratas Wistar alimentadas con una dieta de laboratorio y que recibieron agua "ad libitum". Los animales se decapitaron y

desangraron. Los hígados fueron extraídos rápidamente, pesados y homogeneizados con 1.5 volúmenes de Buffer A, utilizándose un homogeneizador de vidrio - teflon. Durante todas las operaciones siguientes la temperatura se mantuvo entre 0° y 4°C.

El homogeneizado se centrifugó a 100.000 x g durante 60 minutos. El sobrenadante obtenido fue fraccionado con una solución saturada de sulfato de amonio, conteniendo EDTA 0.4 mM. La piruvato quinasa tipo L precipita entre 30 - 45% de saturación, mientras que la isoenzima M lo hace entre 55 - 70%. La fracción que precipita entre 30 - 45% de saturación fue centrifugada a 28.000 x g durante 15 minutos. El precipitado obtenido se disolvió en un pequeño volumen (aproximadamente 10 ml) de buffer A y se pasó por una columna de Sephadex G₂₅ (3 x 30cm, grano fino) previamente equilibrada con buffer A. Esta etapa es necesaria para eliminar el exceso de sulfato de amonio que interfiere en el siguiente paso de purificación.

Las fracciones activas sin sulfato (cualitativamente ensayado con (HO)₂Ba) fueron combinadas y sembradas en una columna de DEAE - celulosa. El intercambiador iónico fue previamente tratado de acuerdo al método de Peterson y Sober (166) y equilibrado con el buffer B. La columna fue lavada con 150 ml de buffer B y luego se aplicó un gradiente lineal de TRIS - HCl de 25 a 250 mM preparado en el buffer B, recogándose 60 fracciones de 15 ml. La enzima eluye a una concentración de 120 mM de TRIS - HCl.

Las fracciones con mayor actividad eluidas de la columna de DEAE - celulosa fueron combinadas y ajustadas a 50% de saturación con sulfato de amonio sólido. Esta operación se efectuó lentamente y la solución enzimática fue agitada continuamente. La suspensión se dejó durante 20 minutos en frío y se centrifugó a 28.000 x g durante 20 minutos.

El precipitado obtenido se resuspendió en el buffer C y se pasó por una columna de Sephadex G₂₅ (1.5 x 20 cm) previamente equilibrada con buffer C. Las fracciones activas sin sulfato detectable fueron combinadas y sembradas en una columna de CM - celulosa (1 x 14 cm) previamente tratada (166) y equilibrada con buffer C. La columna fue lavada con 50 ml de buffer C y la enzima fue eluida aplicándose un gradiente lineal de TRIS - maleato de 5 a 50 mM, preparado en el buffer C. La enzima eluye con una concentración de 30 mM. Las fracciones con mayor actividad fueron combinadas y el pH se ajustó a 7.5. Esta fracción fue utilizada en la mayoría de los experimentos. Un resumen del método de purificación empleado se describe en la Tabla II.

La actividad específica de la preparación obtenida fue variable, generalmente entre 90 y 120 unidades por mg de proteína. El factor de purificación obtenido fue entre 400 a 600 veces, con respecto al extracto crudo.

Considerando la actividad específica de la preparación homogénea obtenida por Tanaka y col. (127), la fracción recuperada después de la cromatografía en CM-celulosa es 30 a 50% pura. La enzima es inestable y se inactiva rápidamente en el curso de la purificación. Una estabilización parcial se logró mediante la adición de ditiotreitól 1 mM y sacarosa 250 mM. Un resultado similar fue obtenido por Tanaka y col. (127).

Piruvato Quinasa de Músculo

La piruvato quinasa de músculo de conejo fue obtenida comercialmente de Sigma. Antes de los ensayos cinéticos la enzima fue dializada contra 4.000 volúmenes de TRIS - HCl, pH 7.5, 25 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM y mercaptoetanol 1 mM a 4 - 6°C durante aproximadamente 12 hs. La inclusión de KCl en el buffer de diálisis se efectuó teniendo en

TABLA II

Purificación de la piruvato quinasa tipo L de hígado

Las determinaciones de la actividad fueron efectuadas de acuerdo al ensayo colorimétrico descrito en esta sección. La unidad de enzima se define como la cantidad que cataliza la formación de un micromol de piruvato por minuto, en las condiciones del ensayo colorimétrico.

Fracción	Volumen ml	Actividad unidades ml ⁻¹	Proteína mg.ml ⁻¹	Actividad específica	Recuperación	Purificación
I-Extracto Crudo	200	21.8	108	0.20	100	1.0
II-Sobrenadante de 100.000 x g	100	23.3	58	0.40	54	2.0
III-Sulfato de Amonio 30-45% <u>a</u>	20	29.0	43	0.68	13	3.4
IV-DEAE-celulosa <u>b</u>	4	27.0	2.8	9.35	2.5	47.0
V-CM-celulosa	15	4.0	0.044	91.0	1.3	455.0

a Esta etapa también incluye el 1^{er} pasaje por Sefadex G₂₅.

b La actividad específica de esta fracción se determinó luego de la precipitación con sulfato de amonio (0-50%) y posterior filtración por la 2^{da} columna de Sefadex G₂₅.

cuenta que este catión estabiliza la enzima, evitando la inactivación por dilución (112).

La disociación y reasociación de la piruvato quinasa de músculo se efectuó de acuerdo al método descrito por Johnson y col. (123) con pequeñas modificaciones. La enzima (4 mg/ml) se disoció durante una hora a 0°C, en presencia de: clorhidrato de guanidina 5M, TRIS - HCl pH 7.5, 50 mM, EDTA 1 mM, y mercaptoetanol 120 mM. El pH final de esta mezcla fue 6.7. Este tratamiento produce la disociación completa de la proteína, el desplegamiento de las subunidades y la pérdida completa de la actividad enzimática (123). Las enzimas controles se trataron de la misma manera excepto que se omitió el agente disociante. La renaturalización se efectuó diluyendo la enzima disociada 100 veces, en una mezcla conteniendo KCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, TRIS - HCl pH 7.5, 40 mM, EDTA 1 mM y mercaptoetanol 0.060 M, enfriada previamente a 0°C. La enzima diluida se mantuvo a 0°C durante 10 minutos y luego se transfirió a 16°C. Esta temperatura como así también la concentración final de la proteína (0.04 mg/ml) son las óptimas para obtener el máximo de recuperación de actividad enzimática.

El proceso de renaturalización fue seguido determinando la reaparición de la actividad enzimática; éste requiere de cuatro a seis horas para alcanzar el plateau. Las recuperaciones obtenidas fluctúan entre 50 y 70% con respecto a los controles que no fueron disociados. De acuerdo a los resultados obtenidos por Johnson y col. (123) la proteína activa recuperada es un tetrámero. Las enzimas tratadas y controles fueron dializadas durante aproximadamente 5 horas contra TRIS - HCl 50 mM, pH 7.5, KCl 50 mM, EDTA 1 mM antes de utilizarlas en los ensayos cinéticos.

Ensayo de la Actividad Enzimática

Se utilizaron dos métodos diferentes: colorimétrico y espectrofotométrico.

a) El ensayo colorimétrico fue efectuado de acuerdo a Leloir y Goldemberg (167). La mezcla de incubación contiene: TRIS - HCl, 100 mM pH 7.5, KCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, PEP 3 mM y ADP 3 mM en un volumen final de 0.150 ml. La enzima fue incubada durante tres minutos a 30°C. En estas condiciones el ensayo es lineal con respecto a la concentración de enzima aún con las fracciones menos purificadas. Este método se utilizó rutinariamente para seguir la actividad enzimática en el curso de la purificación.

b) El ensayo espectrofotométrico fue realizado de acuerdo al método de Bücher y Pfleiderer (168) acoplado la reacción de la piruvato quinasa con NADH y un exceso de lactato deshidrogenasa. La oxidación del NADH fue seguida a 340 nm en un espectrofotómetro equipado con registrador. La mezcla de incubación contiene: TRIS - HCl 100 mM, pH 7.5, MgSO₄ 8 mM, KCl 100 mM, PEP 0.6 mM, ADP 1 mM, NADH 0.2 mM y exceso de lactato deshidrogenasa. Las reacciones se comenzaron adicionando la enzima y el registro de la actividad se comenzó veinte segundos después. La temperatura del ensayo fue 30°C.

Otros Métodos

La actividad de la tripsina, pronasa y quimotripsina fueron determinadas de acuerdo al método de Laskowski (169).

Las determinaciones se efectuaron utilizando una concentración de enzima tal que la actividad proteolítica fue proporcional al tiempo de incubación.

Las determinaciones de proteínas fueron efectuadas de acuerdo al método de Lowry y col. (170).

III RESULTADOS

Piruvato Quinasa Tipo L de Hígado

En este laboratorio se había observado previamente que esta enzima tiene un requerimiento absoluto de cationes monovalentes para su actividad (136). Esto fue confirmado en el presente trabajo utilizando una preparación enzimática mucho más purificada. Contrariamente a lo observado por Hess (148) con la piruvato quinasa de levadura, el FDP no reemplaza a los cationes monovalentes. Además, el Na^+ no sustituye al K^+ , pero en presencia de FDP se obtiene aproximadamente 10% de la actividad que se observa con K^+ y FDP.

Cinética de Activación por K^+ y NH_4^+

En la Fig. 3 se muestran los gráficos de velocidad inicial en función de la concentración de K^+ y NH_4^+ a una concentración relativamente baja de PEP (0.6 mM) y en ausencia o presencia de FDP, el efector alostérico positivo. Se puede ver que la dependencia de la velocidad inicial de la reacción en función de ambos cationes activadores, es marcadamente sigmoide. En presencia de FDP, las curvas de saturación se transforman en hiperbólicas. Aunque el requerimiento por cationes monovalentes de la enzima es satisfecho tanto por NH_4^+ como por K^+ , la V (velocidad máxima), obtenida con el primero fue 90% más alta, indicando que el NH_4^+ es un catión más eficiente en la activación de la isoenzima L.

En la Fig. 4, se puede observar que a 2.5 mM de PEP también se obtienen efectos cooperativos cuando se varía la concentración de los cationes monovalentes. Con el fin de cuantificar el grado de interacción entre los sitios del activador, los datos fueron graficados de acuerdo a la ecuación de Hill (171 - 172):

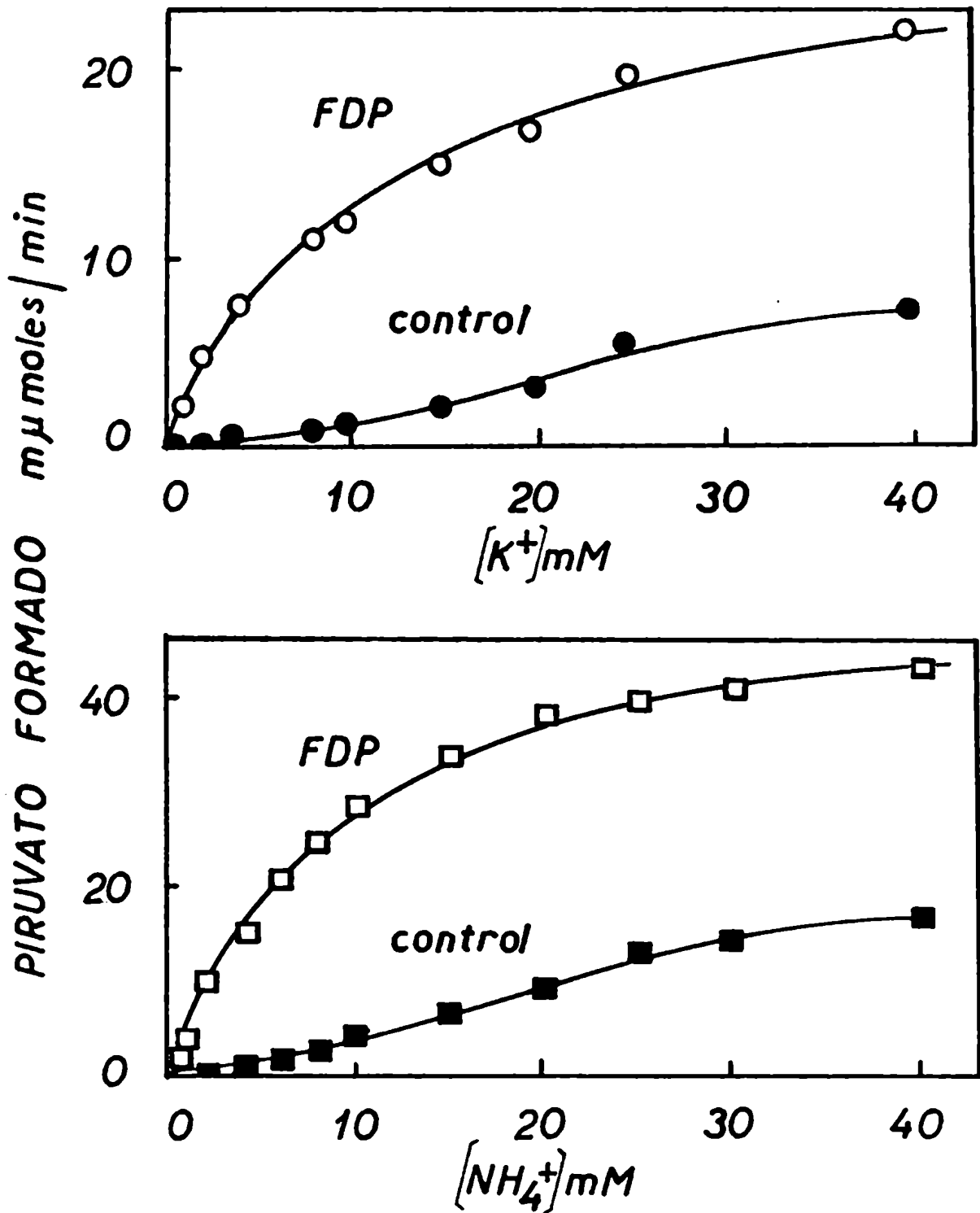


Fig. 3. Efecto de la concentración de K^+ ó NH_4^+ sobre la velocidad de reacción de la isoenzima L en ausencia y en presencia de FDP, 0.1 m*M*. El ensayo espectrofotométrico se efectuó como fue descrito en Materiales y Métodos; la concentración de los cationes se varió como se indica.

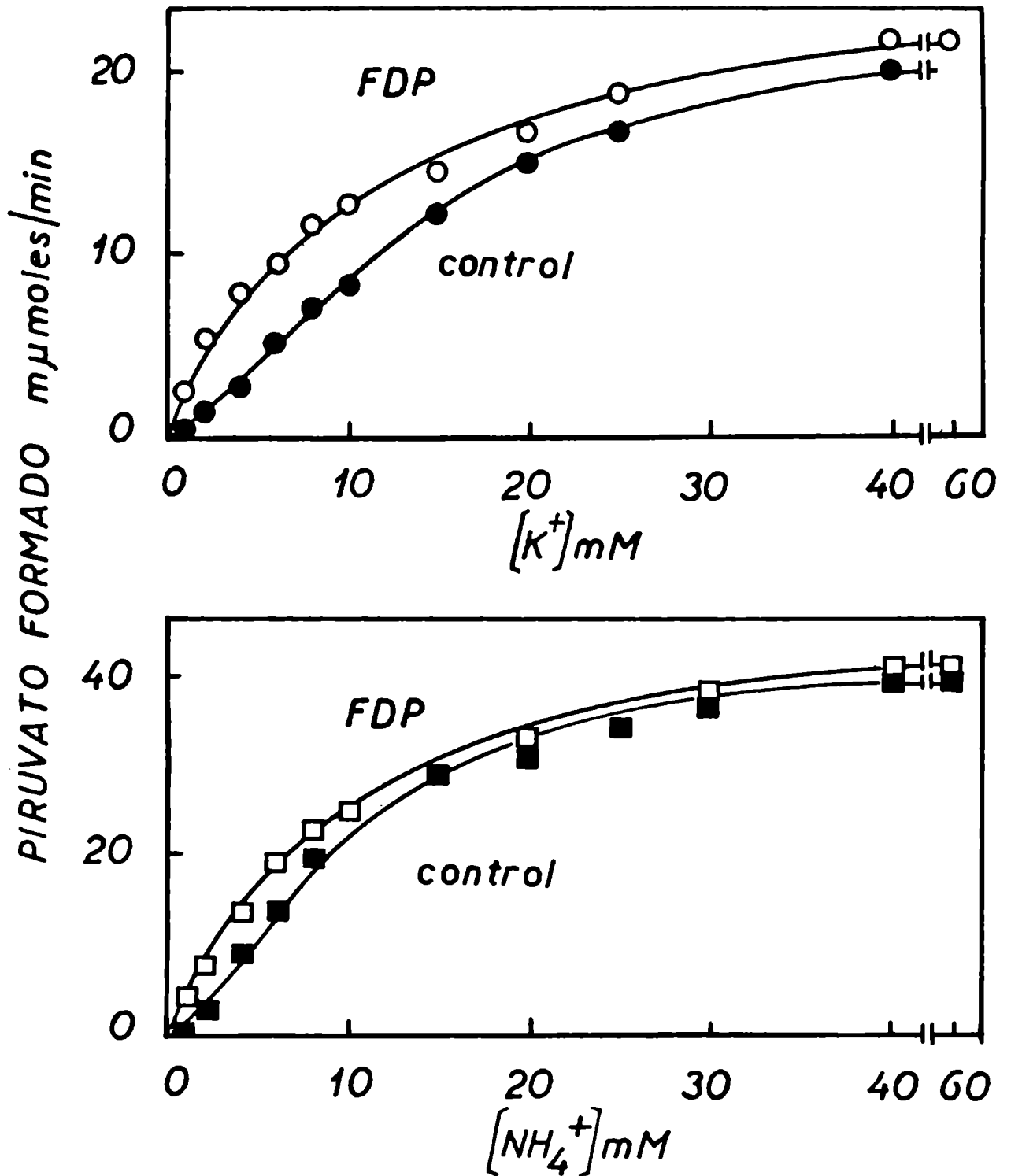


Fig. 4. Efecto de la concentración de K^+ ó NH_4^+ sobre la actividad de piruvato quinasa (tipo L) en ausencia y en presencia de FDP, 0.1 mM. El ensayo se efectuó como fue descrito en la Fig. 3, excepto que la concentración de PEP fue 2.5 mM.

$$\log \left(\frac{v}{V-v} \right) = n \log A - \log K$$

donde: v velocidad inicial de reacción
 V velocidad máxima de reacción
 A concentración de activador
 K constante
 n_H es un valor que depende del grado de interacción y del número de sitios interactuantes.

Cuando existe una fuerte interacción entre los receptores, la pendiente del gráfico de Hill (n_H) se aproxima al número de sitios que tiene la enzima para el ligando.

Como se muestra en la Fig. 5, los valores de n_H fueron 2.25 y 2.1 para K^+ y NH_4^+ respectivamente, a 0.6 mM de PEP; los valores obtenidos a un nivel mayor de PEP fueron prácticamente similares para el NH_4^+ e inferiores cuando se varió el K^+ . Estos resultados indican claramente que el K^+ y el NH_4^+ tienen un marcado efecto cooperativo homotrópico. En presencia del FDP los valores de n_H disminuyen apreciablemente, aproximándose a la unidad (Fig. 5).

El hecho que los valores de los coeficientes de Hill variaron sólo ligeramente a las concentraciones de PEP utilizadas, puede indicar que un nivel de 2.5 mM de este último (aproximadamente el doble del valor de $S_{0.5}$) es insuficiente para producir efecto heterotrópico positivo. Con el fin de establecer si el efecto cooperativo homotrópico del K^+ depende de la concentración de PEP, la curva de saturación para el catión monovalente se efectuó en presencia de un nivel saturante (10 mM) de este sustrato. En este caso la dependencia de la velocidad inicial de reacción en función de la concentración de K^+ fue hiperbólica, como se mues-

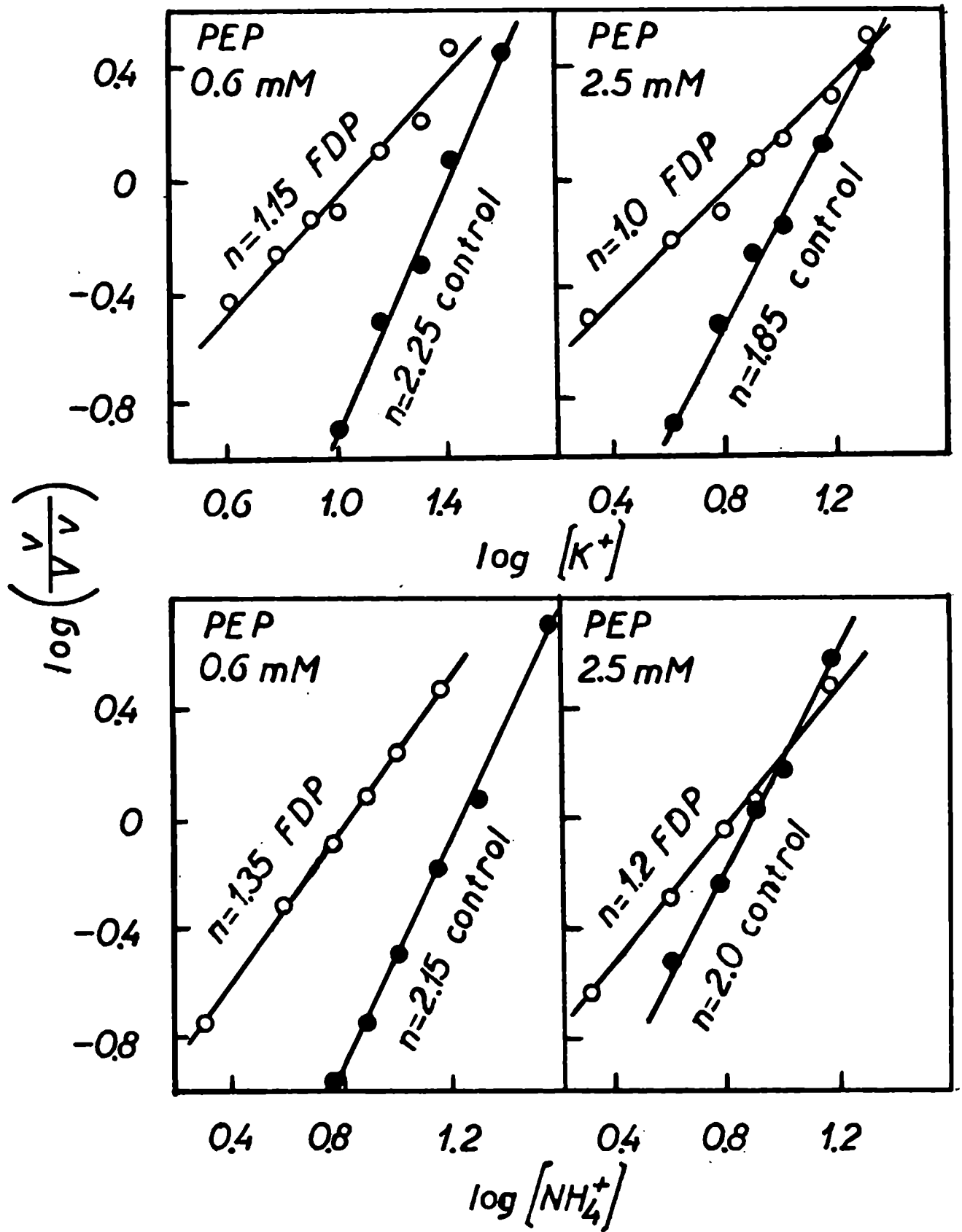


Fig. 5. Gráficos de Hill para los datos de las Fig. 3 y 4.

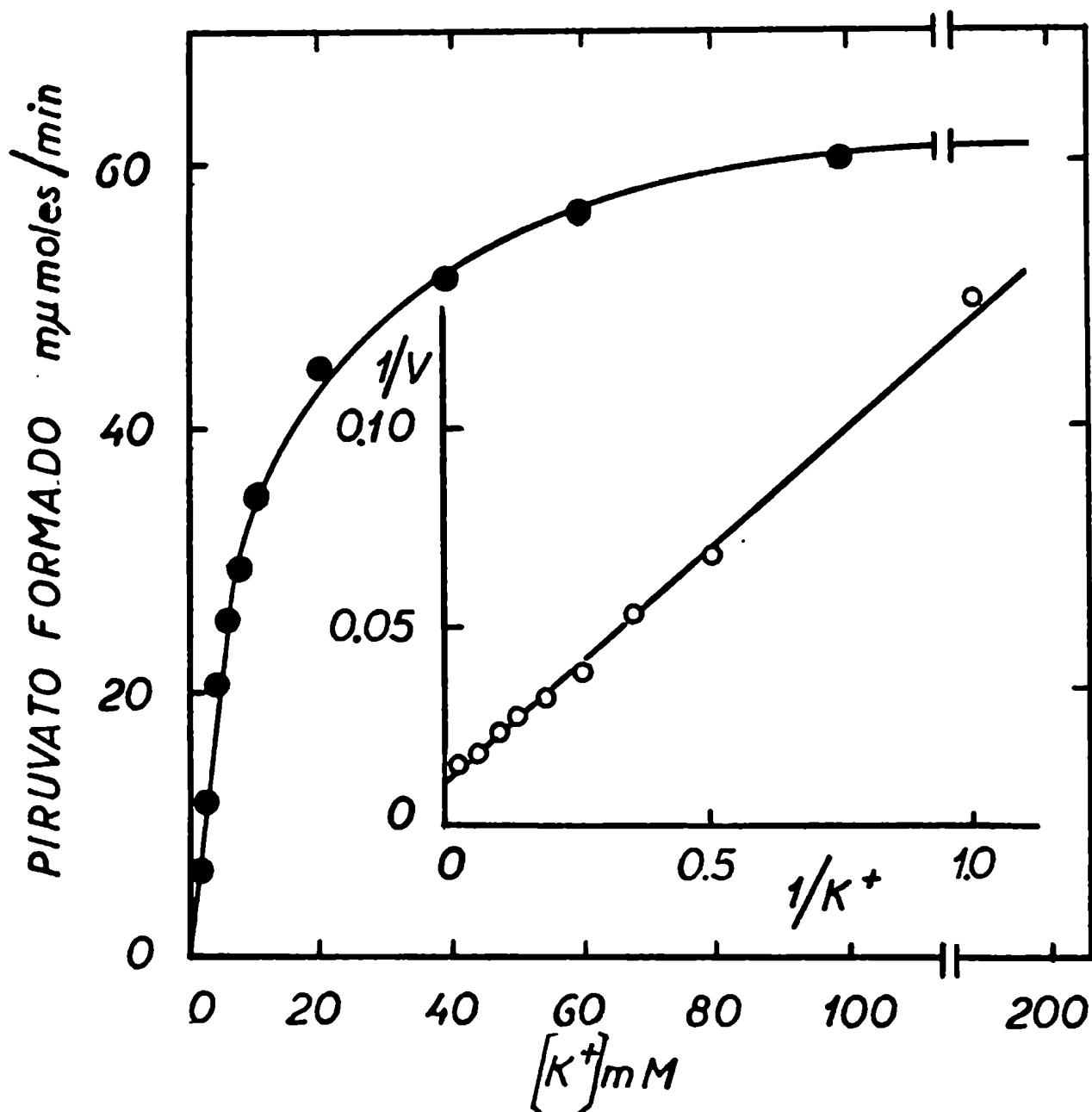


Fig. 6. Efecto de la concentración de K^+ sobre la velocidad de reacción de la piruvato quinasa (tipo L). Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 3 excepto que la concentración de PEP fue 10 mM. En la figura también se muestra el gráfico de las inversas para los mismos datos.

tra en la Fig. 6; también se aprecia que el gráfico de las inversas es rectilíneo. Por consiguiente, se puede concluir que tanto el FDP como el PEP ejercen efectos heterotrópicos positivos sobre las interacciones homotrópicas del K^+ .

Efecto de los Bufferes Diferentes

En los experimentos presentados en las Fig. 3 - 6, se utilizó TRIS-HCl como buffer. Recientemente, Betts y Evans (173) observaron que la enzima de músculo es inhibida por este buffer. Por consiguiente, se planteó la posibilidad de que el efecto cooperativo observado cuando se hizo variar las concentraciones de K^+ se deba principalmente a la presencia de TRIS en la mezcla de incubación. Con el fin de investigar este punto las curvas de saturación de K^+ fueron repetidas utilizando TES - TMA y HEPES - TMA como bufferes a dos niveles diferentes de PEP, 0.6 y 2.5 mM. Además, estos experimentos se efectuaron en ausencia y presencia de FDP.

Las curvas de velocidad inicial de reacción en función de la concentración de K^+ se muestran en la Fig. 7 y los correspondientes gráficos de Hill en la Fig. 8. Estos experimentos demuestran que a 0.6 mM de PEP se obtiene un marcado efecto cooperativo homotrópico en presencia de todos los bufferes utilizados; en efecto las pendientes de los gráficos de Hill dieron entre 2.2 a 2.4 y disminuyeron a 1.2 en presencia de FDP. A diferencia de lo que se había observado previamente con TRIS - HCl, un nivel de PEP de 2.5 mM fue suficiente para producir un marcado efecto heterotrópico positivo cuando los experimentos se realizaron en presencia de TES - TMA ó HEPES - TMA. Una curva control efectuada con esta misma preparación enzimática en presencia de TRIS - HCl y a 2.5 mM de PEP tuvo una forma sigmoide ($n_H = 1.6$) coincidiendo con los resulta -

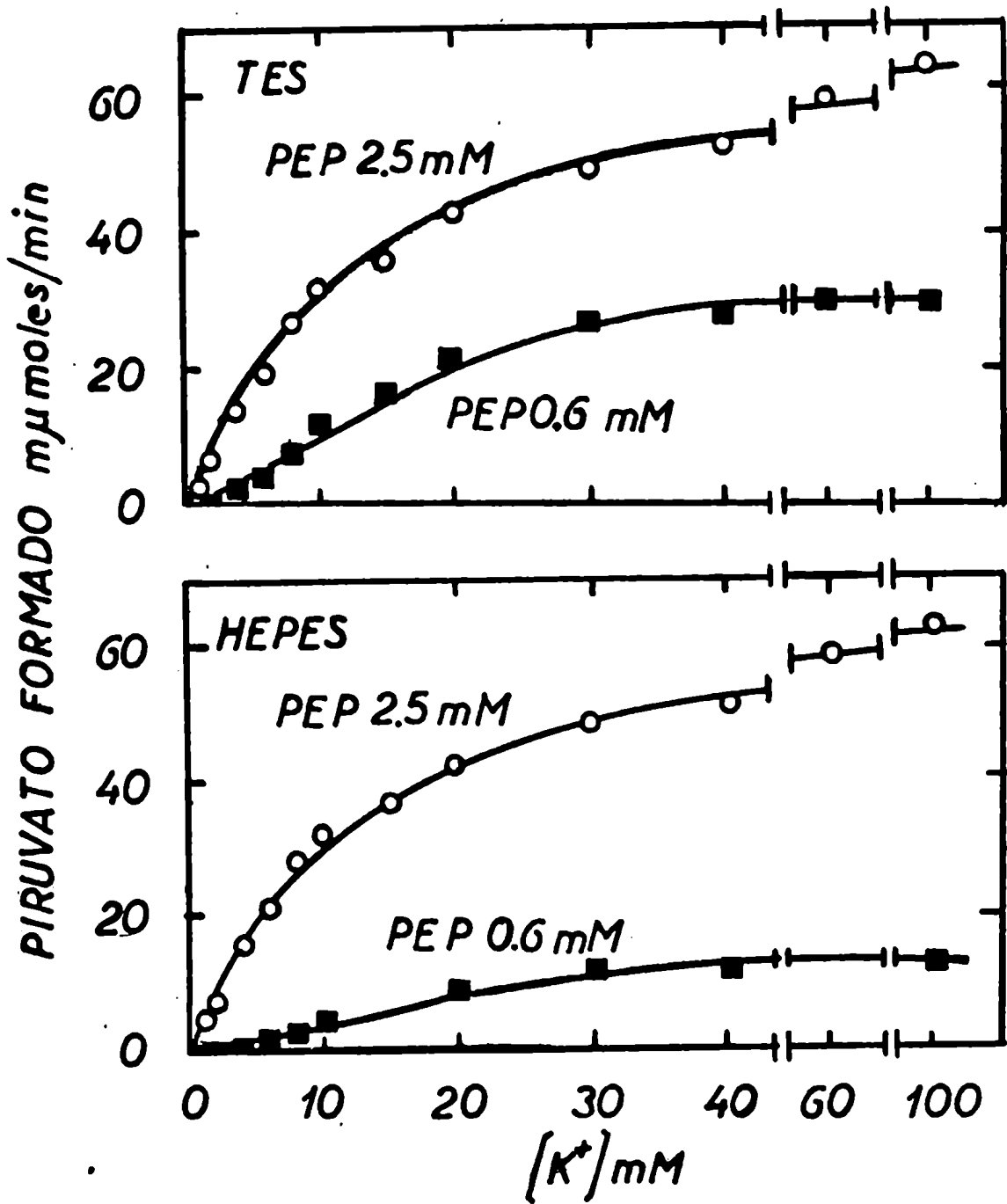


Fig. 7. Efecto de la concentración de K^+ sobre la velocidad de reacción de la piruvato quinasa (tipo L) en presencia de TES - TMA y HEPES - TMA como buffers a dos niveles diferentes de PEP (0.6 y 2.5 mM como se indica sobre las curvas). La concentración de los buffers fue 100 mM y el pH 7.5. Otras condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 3.

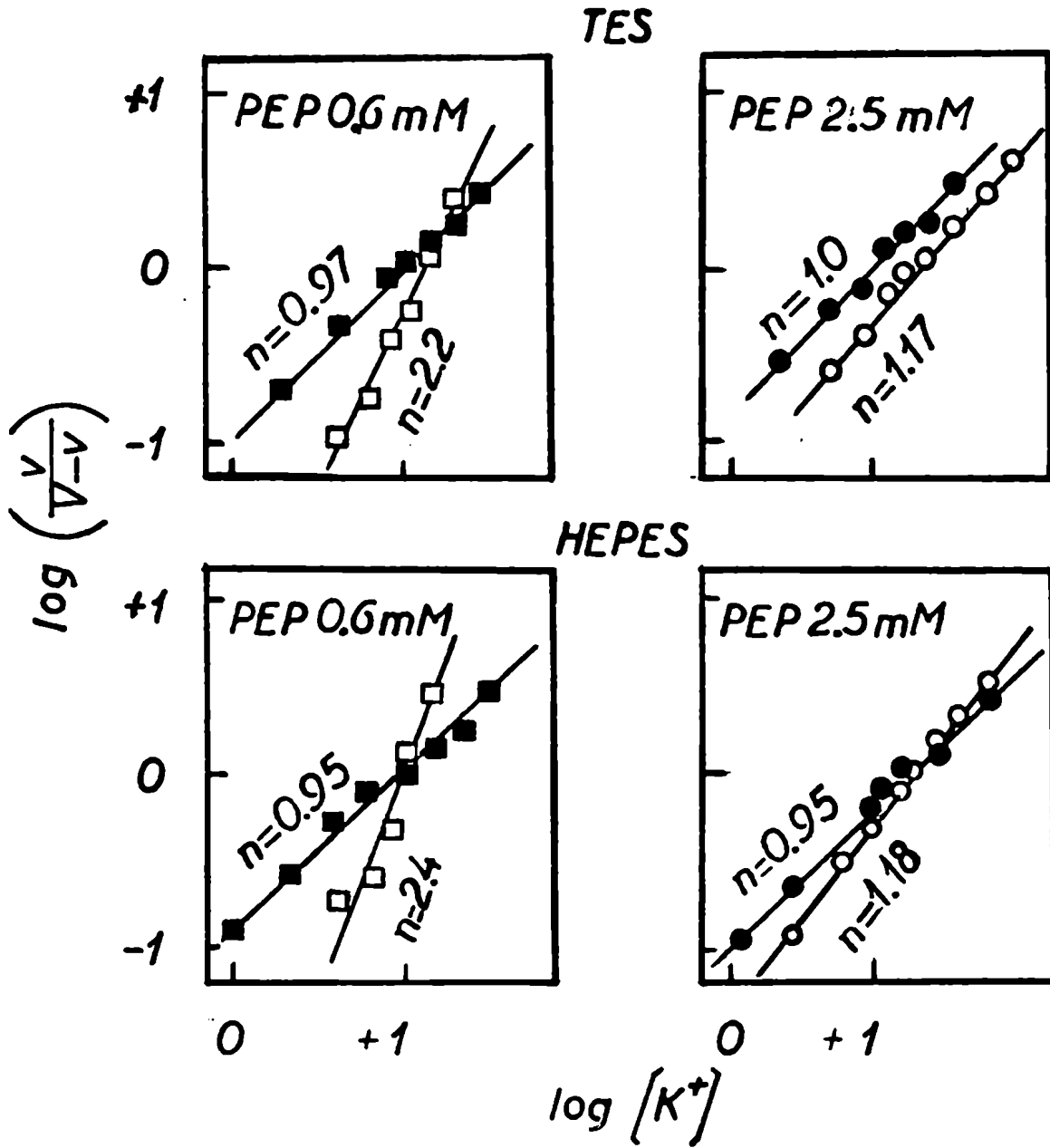


Fig. 8. Gráficos de Hill para los datos de la Fig. 7. Se muestran también las curvas efectuadas en presencia de FDP 0.1 mM (símbolos llenos).

dos mostrados en la Fig. 4.

Se puede concluir que el efecto cooperativo del K^+ es casi independiente del buffer utilizado ya que se han obtenido curvas sigmoideas en las diferentes condiciones empleadas. Además tanto el FDP como el PEP ejercen efectos heterotrópicos positivos, aunque el nivel de PEP necesario para producir este efecto es mayor en presencia de TRIS - HCl que en los otros buffers empleados.

Efecto de la Fuerza Iónica

Como se había indicado previamente, el requerimiento por cationes monovalentes no es satisfecho por Na^+ ; además este ión no produce inhibición de la actividad de la piruvato quinasa tipo L de hígado.

En la Fig. 9 se muestran los gráficos de Hill de la actividad enzimática en función de la concentración de K^+ a dos niveles diferentes de PEP, manteniendo constante la fuerza iónica. Esto se efectuó utilizando mezclas de KCl y NaCl a diferentes relaciones molares, con el fin de obtener una concentración final de 100 mM. Se puede apreciar que la conducta cinética de la enzima con respecto al K^+ es independiente de la fuerza iónica del medio, ya que los resultados obtenidos en este experimento no difieren de los que se habían presentado previamente en la Fig. 7 y la 8.

Cinética de Activación por K^+ a Diferentes Valores de pH

Como se mencionó previamente, las propiedades alostéricas de la isoenzima L dependen del pH de la mezcla de incubación. Así, a pH 6 la dependencia de la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de PEP es hiperbólica, mientras que a valores de pH superiores a 7.0 la enzima exhibe efecto cooperativo homotrópico con respecto a

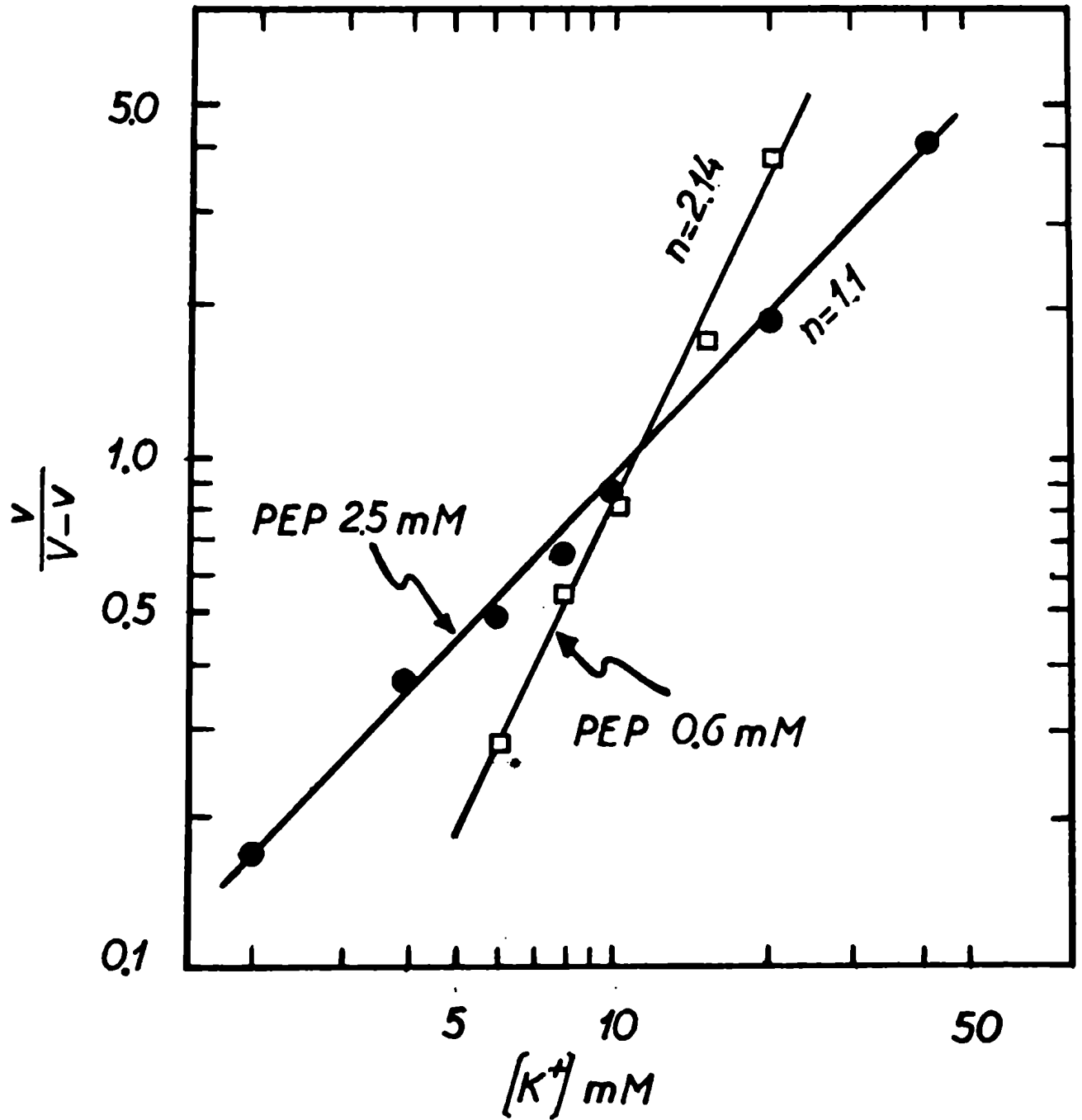


Fig. 9. Gráficos de Hill de la actividad enzimática en función de la concentración de K^+ a dos niveles diferentes de PEP (0.6 y 2.5 mM como se indica sobre las curvas). Los experimentos se efectuaron en presencia de TES - TMA 100 mM, pH 7.5. Otras condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 7, excepto que la fuerza iónica de la mezcla de incubación se mantuvo constante mediante la adición de cantidades apropiadas de ClNa.

este sustrato; este efecto aumenta marcadamente a medida que se incrementa el pH de la mezcla de incubación (140 - 144). Por consiguiente, se consideró de interés estudiar la influencia del pH sobre el efecto cooperativo del K^+ .

Anteriormente se había demostrado que la forma de la curva de saturación de K^+ depende del nivel de PEP que se utiliza y además se conoce que la concentración de este sustrato que produce 50% de la V varía con el pH. Por consiguiente, para que las curvas de la velocidad de reacción en función de la concentración de K^+ obtenidas a diferentes pH fueran comparables, se efectuaron a los niveles de PEP correspondientes a los valores de $S_{0.5}$ a cada pH. En la Fig. 10 A se puede observar que contrariamente a lo que ocurría a pH 7.5 (donde hay un marcado efecto cooperativo del K^+ , como se vió en las Fig. 5 y 8) a pH 6 el efecto cooperativo del K^+ es negligible. Por lo tanto, el comportamiento cinético de la enzima con respecto al K^+ y al PEP es similar entre los valores de pH 6.0 y 7.5.

A pH 8.35, el efecto cooperativo del K^+ disminuyó marcadamente comparándolo con el que se había observado a pH 7.5. En efecto, el n_H para el K^+ obtenido a pH 8.35 fue de 1.4 mientras que a pH 7.5 el valor obtenido fue 2.2. Por consiguiente, el comportamiento cinético de la enzima con respecto al sustrato y al catión activador no varía en el mismo sentido cuando se aumenta el pH: mientras ésta tiene un marcado efecto cooperativo para el PEP (el valor de n_H fue 3.3, Fig. 10 B) la cooperatividad de la curva de saturación para el K^+ disminuye considerablemente.

Efecto de la Concentración de Mg^{++}

Todos los experimentos descriptos hasta ahora se han efectuado a un nivel saturante de Mg^{++} . Con el fin de evaluar si el comporta-

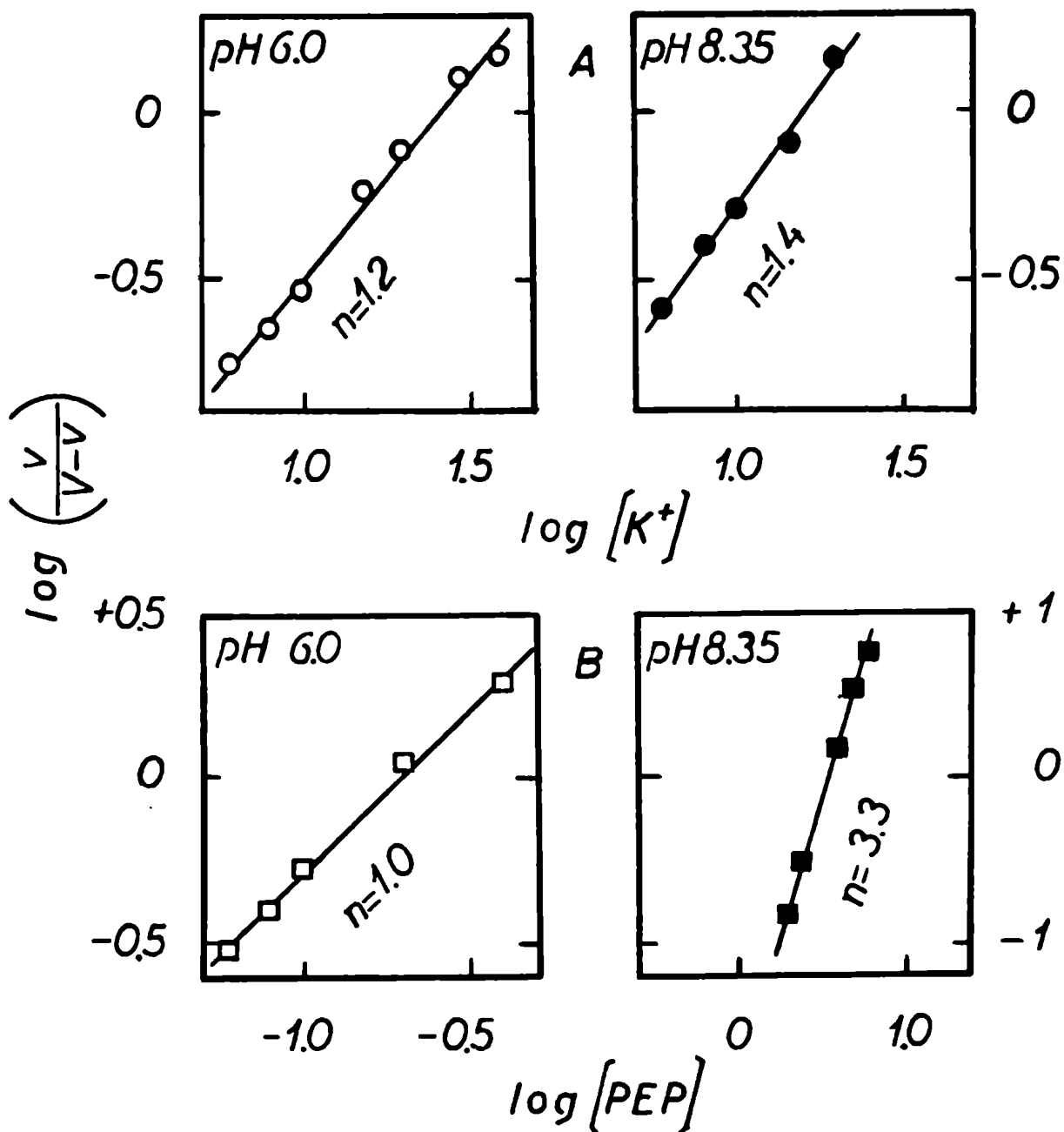


Fig. 10. A) Gráficos de Hill de la actividad enzimática en función de la concentración de K^+ . Las condiciones fueron similares a las de la Fig. 3 excepto para el buffer y la concentración de PEP: \circ en presencia de MES - TMA 100 mM, pH 6.0 y PEP 0.3 mM; \bullet en presencia de TES - TMA 100 mM, pH 8.35 y PEP 3 mM. B) Gráfico de Hill de la actividad enzimática en función de la concentración de PEP. Las condiciones experimentales fueron similares a las de la Fig. 3 excepto para: la concentración de KCl que fue 100 mM; el PEP, que se varió como se indica y el buffer que fue MES - TMA 100 mM, pH 6.0 (\square) ó TES - TMA 100 mM, pH 8.35 (\blacksquare).

miento cinético de la enzima con respecto al K^+ depende de la concentración del catión divalente, se efectuó una curva de saturación de K^+ en presencia de Mg^{++} 2.5 mM. En estas condiciones el nivel de Mg^{++} libre disminuye aproximadamente cuatro veces. En la Fig. 11 se puede apreciar que la curva obtenida es hiperbólica; el gráfico de las inversas es rectilíneo. Por lo tanto, este experimento indica que el comportamiento cinético de la enzima con respecto al K^+ no es modificado por el nivel de Mg^{++} libre, ya que este resultado es similar al que se había obtenido previamente con Mg^{++} 8 mM (Fig. 8 y 9).

Efecto del K^+ sobre la Curva de Saturación del PEP

En la Fig. 12 se muestran los gráficos de velocidad inicial de reacción en función de la concentración de PEP, a dos niveles de K^+ y en presencia o ausencia de FDP utilizando TES - TMA como buffer. Los experimentos fueron efectuados también en presencia de TRIS - HCl (Fig. 13). Los resultados obtenidos demuestran que el efecto cooperativo homotrópico del PEP no es modificado por el nivel de K^+ , ni tampoco por el buffer utilizado; en efecto, las pendientes de los gráficos de Hill fueron aproximadamente 2.4 en todos los casos (Fig. 14). También se observó que los valores de $S_{0.5}$ fueron mayores (aproximadamente 50%) cuando se utilizó TRIS - HCl como buffer. Además en todos los casos, la adición de FDP alteró la forma de la curva de saturación para el sustrato, transformándola de sigmoide en hiperbólica, aumentando la afinidad aparente de la enzima por el PEP.

Interacción entre K^+ y el ATP

En la Fig. 15 se han graficado las curvas de inhibición por ATP a dos niveles diferentes de K^+ . A pH 7.5 y a 3 mM de PEP, la depen-

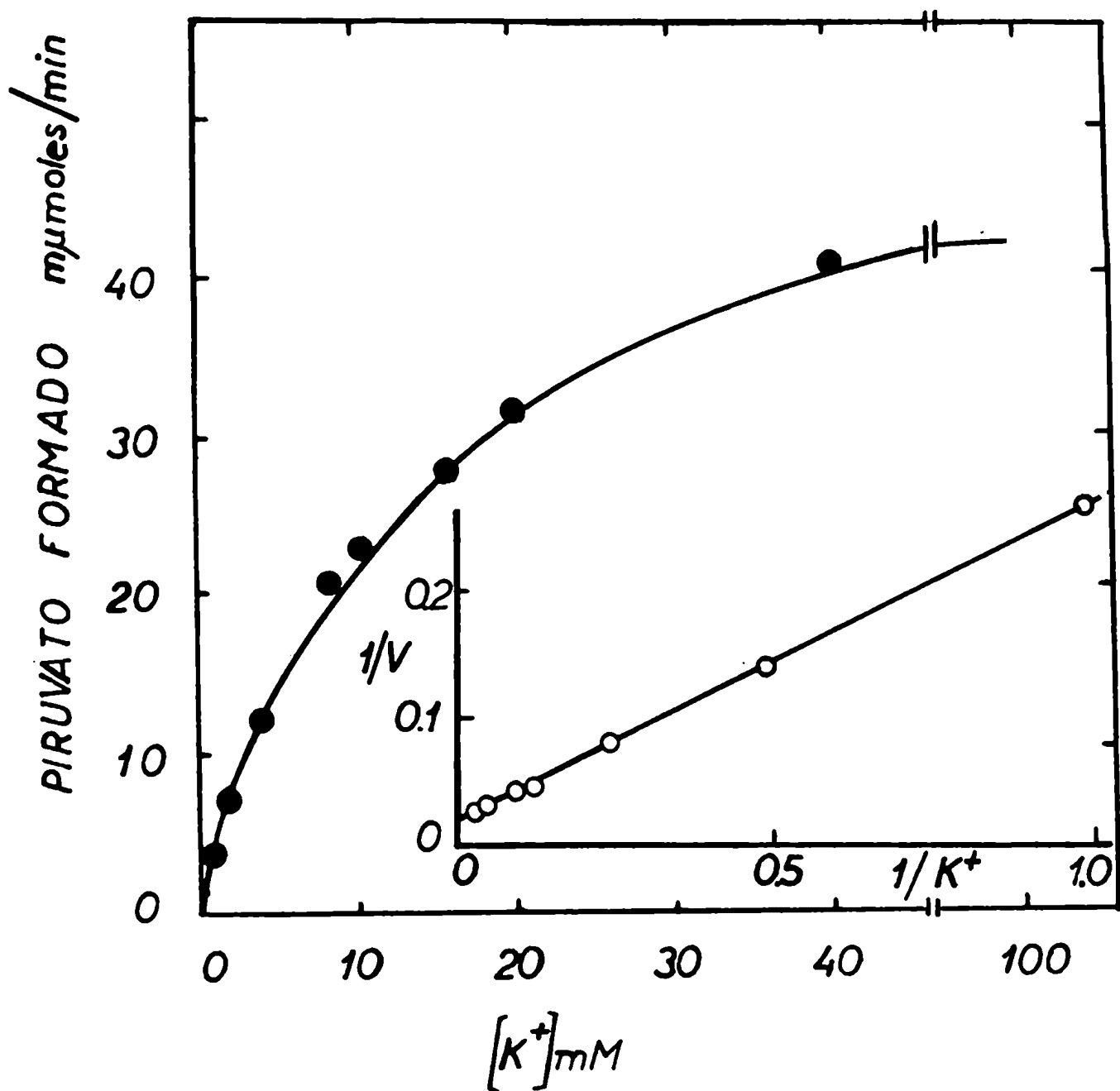


Fig. 11. Efecto de la concentración de K^+ sobre la velocidad de reacción de la piruvato quinasa (tipo L). Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 7 excepto que se utilizó TES - TMA 100 mM como buffer y que el nivel de Mg^{++} fue 2.5 mM.

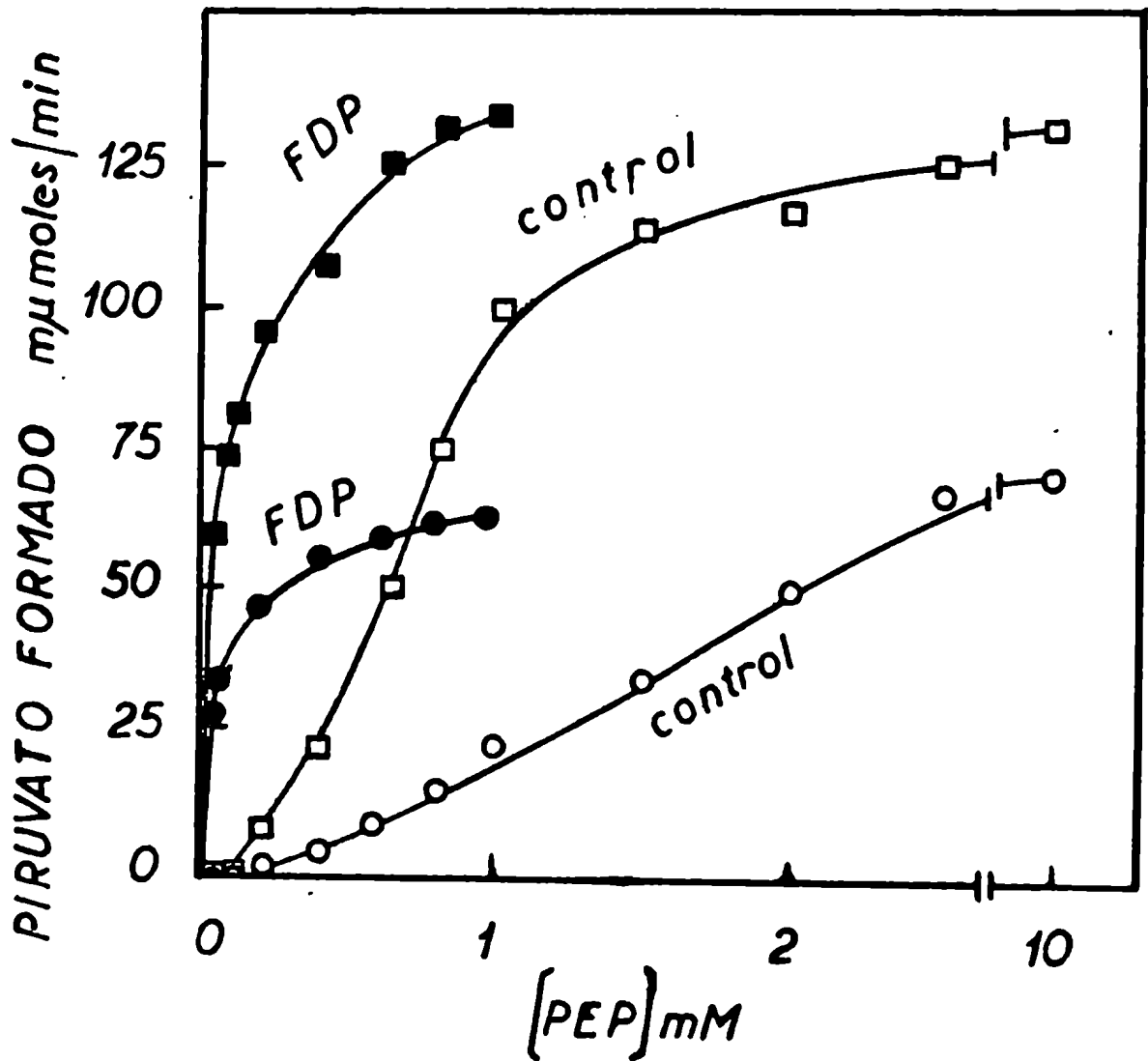


Fig. 12. Efecto de la concentración de PEP sobre la velocidad de reacción de la piruvato quinasa (tipo L) a dos niveles de K^+ y en ausencia o presencia de FDP 0.1 mM, como se indica sobre las curvas. Los círculos indican las actividades determinadas en presencia de K^+ 10 mM; los cuadrados representan las mediciones efectuadas en presencia de KCl 100 mM. El buffer empleado fue TES - TMA, 100 mM, pH 7.5. Otras condiciones experimentales fueron iguales a las descritas en la Fig. 10, B.

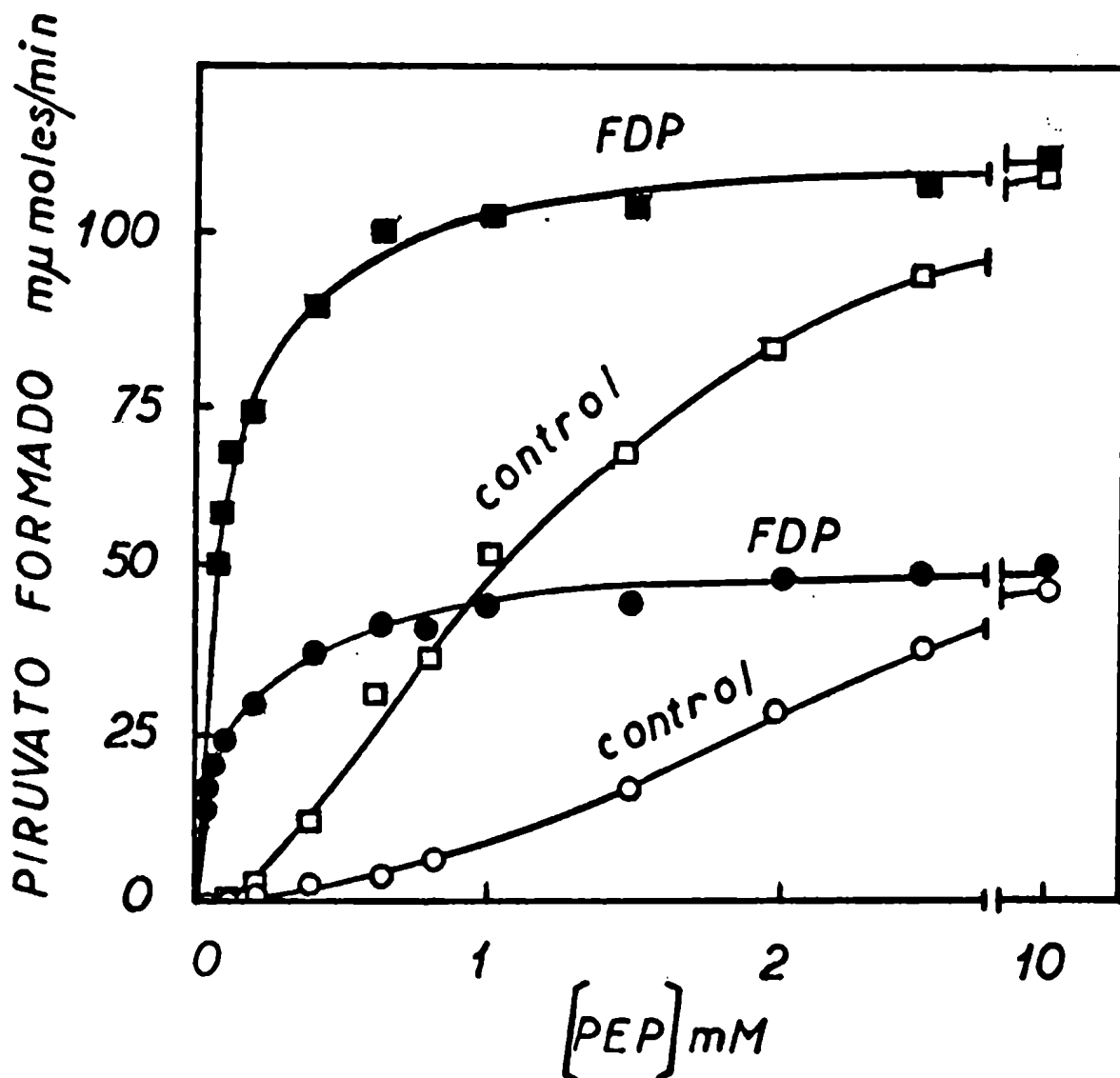


Fig. 13. Efecto de la concentración de PEP sobre la velocidad de reacción de la piruvato quinasa (tipo L), a dos niveles de K⁺ y en ausencia o presencia de FDP 0.1 mM. Los círculos indican las actividades determinadas en presencia de K⁺ 10 mM; los cuadrados representan las mediciones efectuadas en presencia de KCl 100 mM. El buffer empleado fue TRIS-HCl, 100 mM, pH 7.5. Otras condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 12.

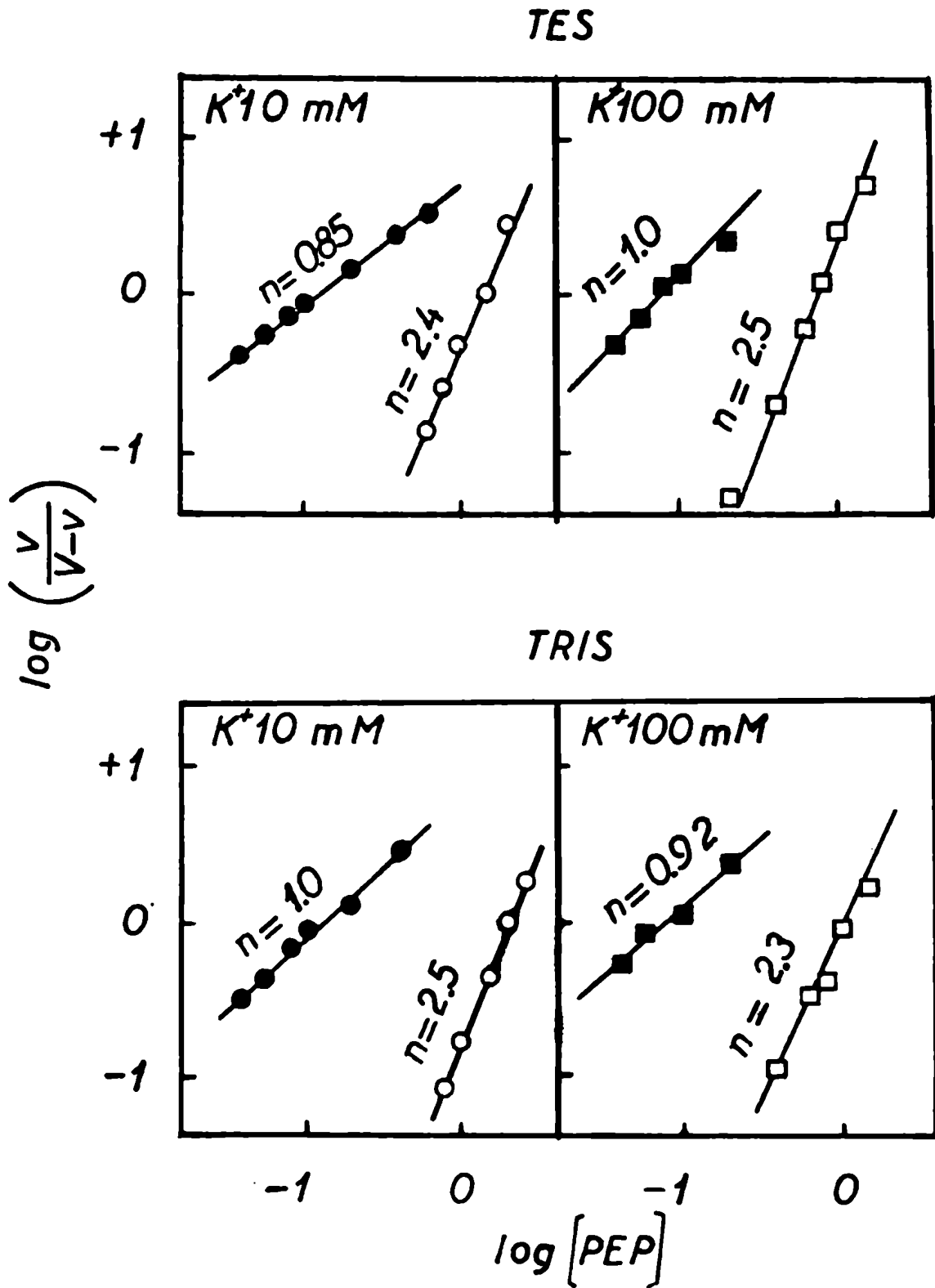


Fig. 14. Gráficos de Hill para los datos de la Fig. 12 y la 13.

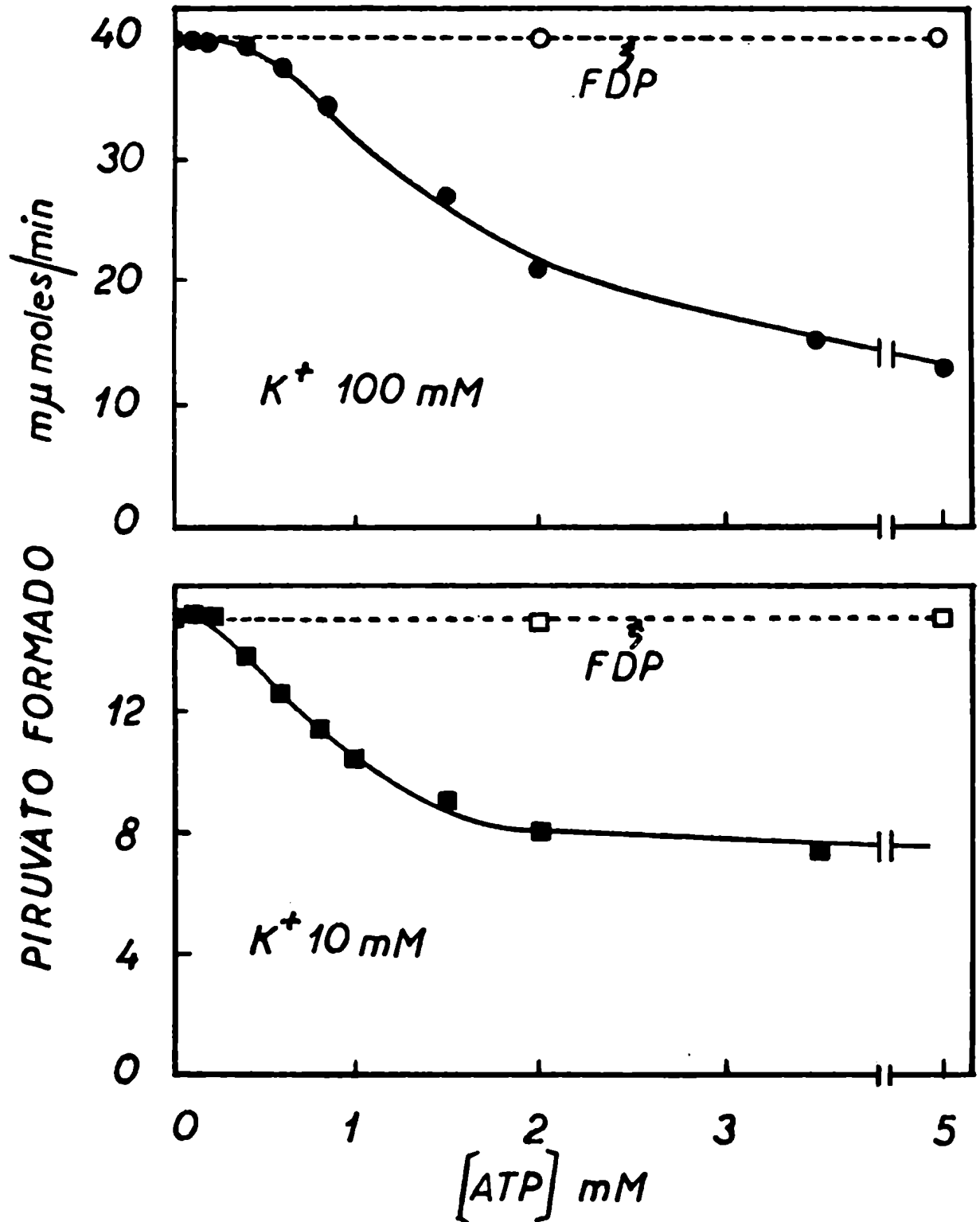


Fig. 15. Efecto de la concentración de ATP sobre la velocidad de reacción de la piruvato quinasa (tipo L) a dos niveles diferentes de K^+ (10 y 100 mM como se indica) y en ausencia o presencia de FDP 0.1 mM. Las condiciones experimentales fueron como las descritas en la Fig. 12 excepto que las concentraciones de PEP y ADP fueron 3 y 0.3 mM respectivamente.

dencia de la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de ATP es marcadamente sigmoide. El grado de interacción entre los sitios del inhibidor y la concentración de éste necesaria para producir 50% de inhibición ($I_{0.5}$) fueron calculados de los correspondientes gráficos de Hill. En este caso se utilizó la ecuación de Jensen y Nester (174) que introduce un factor de corrección para los casos en que el efecto negativo no produce 100% de inhibición. Los valores de $I_{0.5}$ fueron 0.8 y 1.6 mM a 10 y 100 mM de K^+ . Los valores de las pendientes de los gráficos de Hill fueron 2.3 en ambos casos. Además, se puede ver que el FDP revierte la inhibición por ATP tanto a 10 como a 100 mM de K^+ .

De acuerdo a los experimentos presentados en las Fig. 12 - 15, se puede concluir que contrariamente al efecto del FDP, el K^+ ejerce sólo una pequeña interacción heterotrópica positiva sobre la cooperatividad homotrópica del sustrato (PEP) y del inhibidor (ATP).

Cinética de Activación por Mg^{++}

Previamente se había observado que la piruvato quinasa hepática tipo L, tiene un requerimiento absoluto por Mg^{++} , además de la necesidad de un catión monovalente, para su actividad. Como se demostró que la enzima exhibía un marcado efecto cooperativo para el K^+ se consideró de interés estudiar también la cinética de activación por el catión divalente.

En la Fig. 16 se muestra el efecto de la concentración de Mg^{++} sobre la actividad enzimática, a dos niveles diferentes de PEP y en ausencia o presencia de FDP. Se puede ver que la dependencia de la velocidad inicial de reacción en función de la concentración de Mg^{++} es sigmoide, cuando el experimento se efectúa a niveles bajos de PEP (0.6 mM). A niveles mayores de sustrato o en presencia de FDP, la curva se transforma en hiperbólica. En efecto el valor de n_H obtenido al nivel bajo de

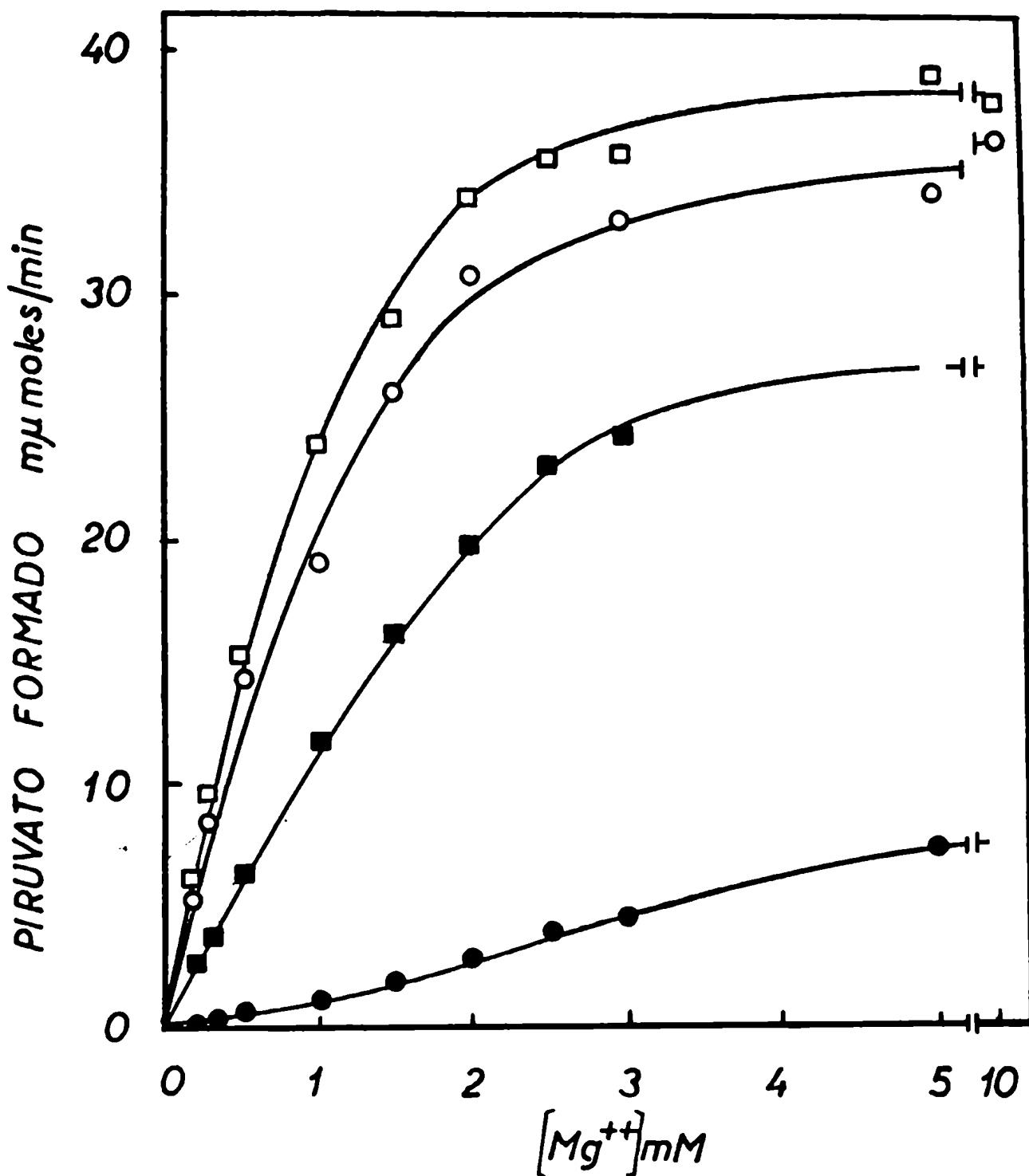


Fig. 16. Efecto de la concentración de Mg^{++} sobre la velocidad de reacción de la piruvato quinasa (tipo L) a dos niveles diferentes de PEP y en ausencia o presencia de FDP 0.01 mM. Los círculos representan las actividades determinadas en presencia de 0.6 mM de PEP; los cuadrados, las mediciones realizadas en presencia de PEP 2 mM. Los símbolos llenos representan los ensayos en presencia de FDP. Otras condiciones fueron como en la Fig. 12, excepto que la concentración de KCl fue 100 mM.

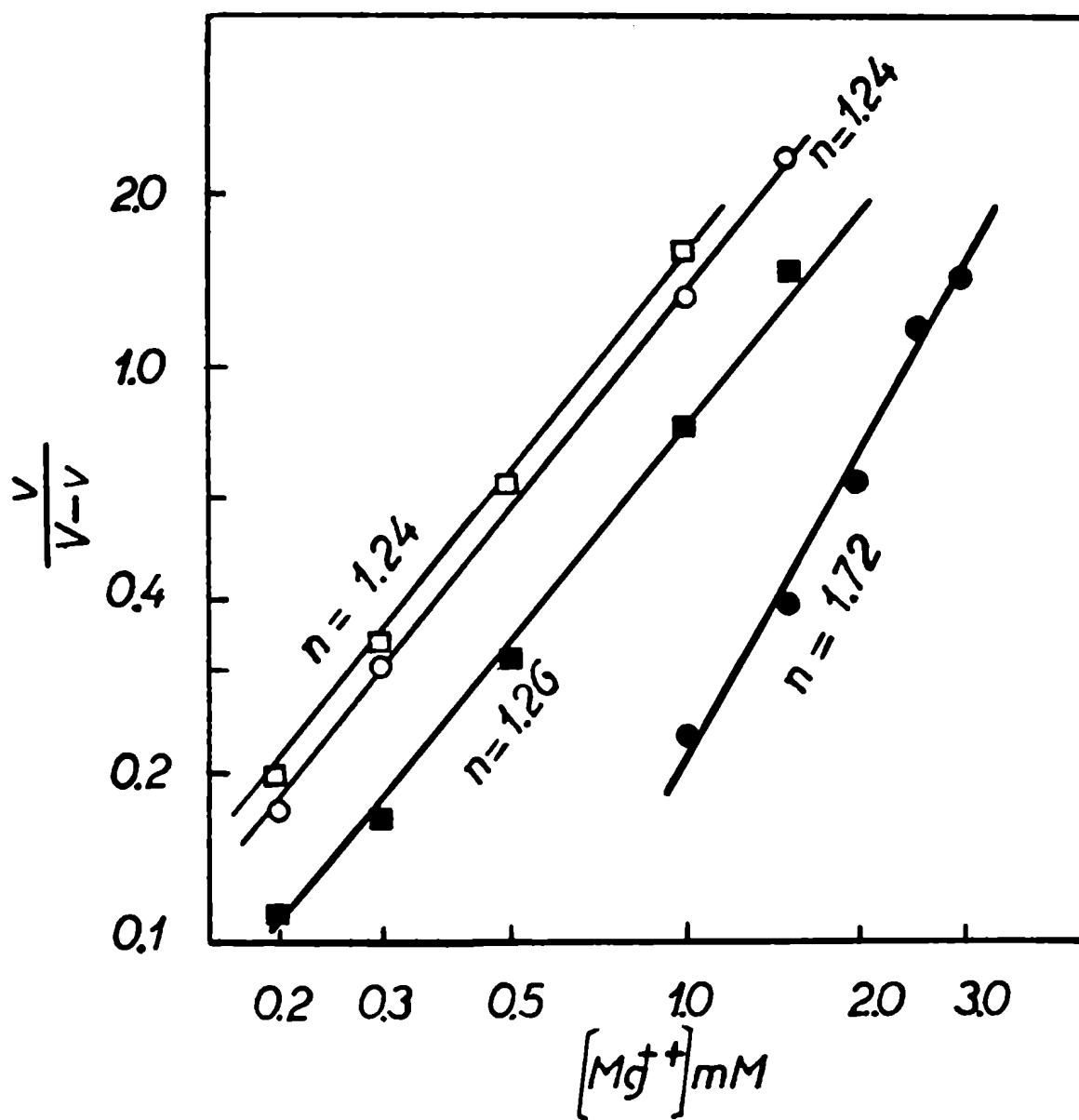


Fig. 17. Gráfico de Hill para los datos de la Fig. 16. Los símbolos tienen el mismo significado que en esta última figura.

PEP fue de 1.7 el cual disminuye a 1.25 en presencia de FDP o a una concentración más alta de PEP (Fig. 17). Resulta interesante destacar que a diferencia de lo que se había observado previamente con la piruvato quinasa de tejido adiposo (152) la respuesta sigmoide que se obtiene cuando se varía el Mg^{++} , es modificada por el efector alostérico positivo (FDP) o el sustrato (PEP).

Estabilidad Térmica de la Isoenzima L de Piruvato Quinasa

Los estudios cinéticos expuestos en este trabajo demuestran que la enzima tiene un marcado efecto cooperativo homotrópico para el K^+ ; las diferentes teorías propuestas para explicar estas cinéticas que se apartan marcadamente de la ecuación de Michaelis-Menten, se basan en que estos efectos se producen a través de cambios conformacionales de la proteína. Con el fin de determinar si la enzima experimenta realmente cambios conformacionales en presencia de los ligandos que modifican su actividad, se estudió la estabilidad y la susceptibilidad a la inactivación por enzimas proteolíticas.

En la Fig. 18 se ha graficado el logaritmo del porcentaje de actividad enzimática en función del tiempo en ausencia o presencia de ligandos. Se puede ver que la inactivación de la enzima a 30°C, sigue una cinética de primer orden, teniendo una vida media de 300 minutos. En presencia de concentraciones saturantes de K^+ ó Mg^{++} la enzima es marcadamente estabilizada. Por el contrario, cuando los sustratos es -
tán presentes durante la preincubación, la enzima se inactiva más rapidamente. El FDP sólo ejerce un efecto pequeño en este experimento. Cabe señalar que en otros experimentos efectuados a 50°C la adición de FDP aumentaba la inactivación de la enzima. Se puede concluir, que la enzima adquiere conformaciones diferentes en presencia de los activadores y sustratos que se comportan cinéticamente como ligandos alostéricos.

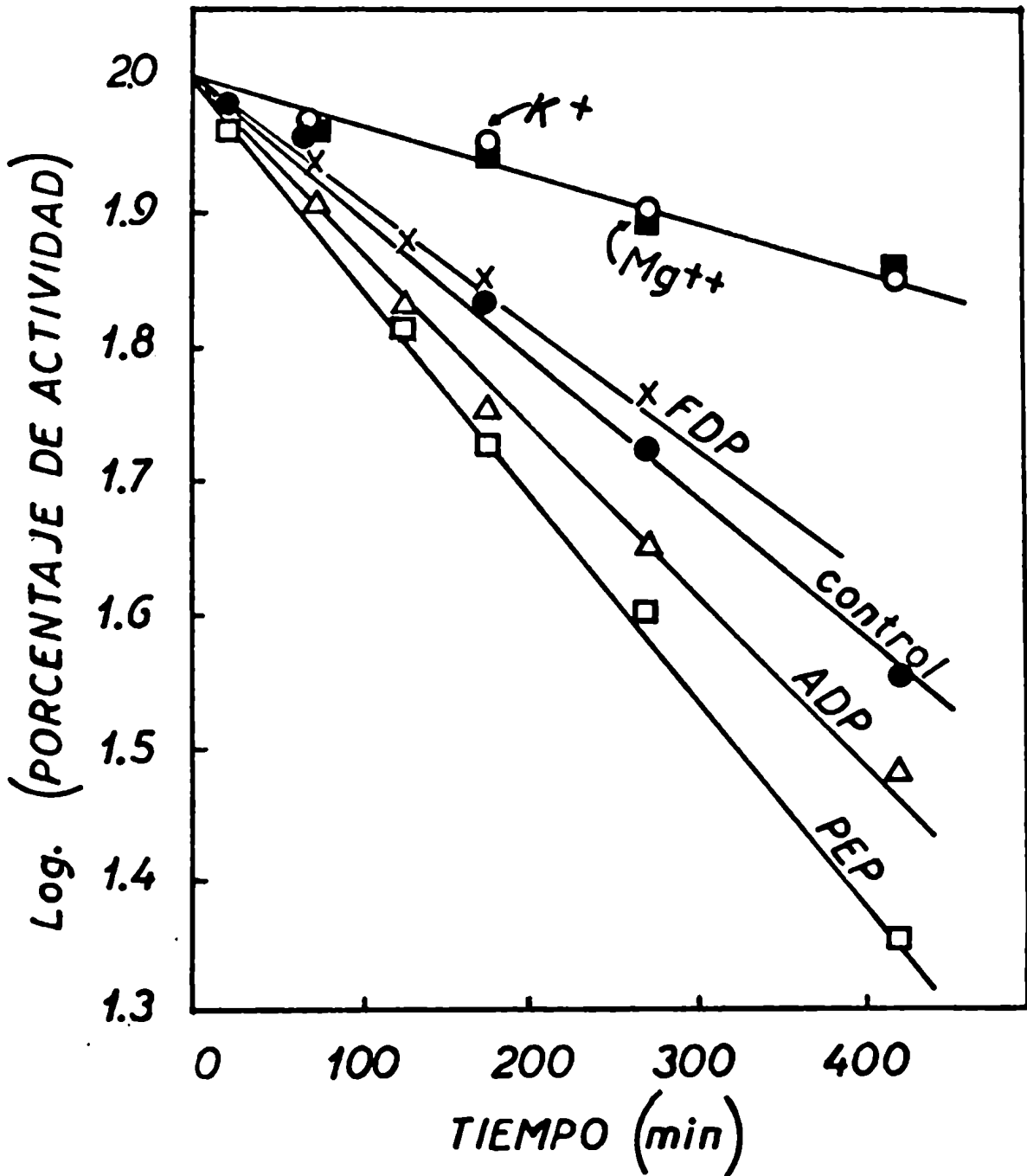


Fig. 18. Estabilidad de la piruvato quinasa (tipo L) a 30°C en ausencia o presencia de sustratos o activadores. La enzima control (150 µg/ml) está en un medio de buffer TRIS - maleato, pH 7.5 ; EDTA 1 mM y ditioneitol 1 mM. Alicuotas de esta preparación fueron preincubadas en presencia de KCl 100 mM; MgCl₂ 8 mM; ADP 2 mM; PEP 3 mM y FDP 0.1 mM como se indica. El ensayo se efectuó utilizando el método colorimétrico descrito en Materiales y Métodos.

La estabilidad de la enzima también fue estudiada a 0°C; en esta condición se observó un aumento de la actividad enzimática que alcanza un máximo a las tres horas y luego declina. Un efecto similar fue observado con la piruvato quinasa de levadura cuando el experimento se efectúa a concentraciones similares de proteína (175). Cabe destacar que el aumento de actividad es marcadamente diferente en presencia de PEP ó FDP, lo que conduce a una conclusión similar a la que se había obtenido cuando el experimento se realizó a 30°C, ésto es que estos ligandos estabilizan diferentes estados conformacionales.

Resulta interesante destacar que al cabo de tres horas de preincubación a 0°C la enzima continúa sensible al FDP. Estos resultados no coinciden con los publicados por Sols y col. (141), quienes observaron que la preincubación a 0°C produce la desensibilización de la enzima hacia este efector alostérico. Sin embargo, los experimentos de Sols fueron efectuados con extractos crudos mientras que los que se presentan aquí fueron realizados con una preparación purificada. Con el fin de aclarar esta discrepancia, se efectuaron experimentos con extractos crudos (sobrenadante de 28.000 x g. 30 min.); los resultados obtenidos se pueden resumir de la siguiente manera (Tabla III):

1) Cuando se obtiene la enzima cuidando que en la extracción y en el manipuleo, la temperatura permanezca entre 0 y 4°C, la estimulación de la actividad enzimática por FDP es pequeña.

2) Si el extracto se preincuba a 25°C durante 30 min., la enzima es sensible al FDP. Los puntos 1) y 2) coinciden con los resultados de Sols y col. (141).

3) Cuando una preparación que se preincuba a 25°C durante 30 min., se la incuba luego a 0°C durante un período similar, la enzima conserva la sensibilidad al FDP. Por lo tanto un tratamiento como el

TABLA III

Efecto de diferentes tratamientos sobre la sensibilidad al FDP

Los hígados de ratas fueron homogeneizados en TRIS - HCl 50 mM sacarosa 250 mM a 4°C y luego centrifugados a 28.000 x g en centrifuga refrigerada durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se mantuvo a 4°C y fue sometido a los tratamientos que se indican. Las determinaciones se realizaron como se indicó en Materiales y Métodos excepto que la concentración del PEP utilizada fue 0.2 mM.

Tratamiento	Relación de Activación (+ FDP / - FDP)
ninguno	1.5 - 2
preincubación 25°C 30 min.	13
25°C, 30 min. → 0°C, 30 min.	14
Sefadex G ₂₅ ^a	13

^a 1 ml de sobrenadante se pasó por una columna de Sefadex G₂₅ (grano fino), de 1.5 x 50 cm, equilibrada con TRIS - HCl 50 mM - sacarosa 250 mM.

descrito en 2) no es reversible.

4) La preparación enzimática que eluye de una columna de Sefadex G₂₅ es marcadamente estimulada por FDP.

5) La adición de FDP (concentración final 30 μ M) al eluido de Sefadex determina un comportamiento similar al descrito en los puntos 1) y 2).

La discrepancia fundamental entre nuestros resultados y los descritos por Sols y col. (141) están indicados en los puntos 3 a 5. Hemos repetido cuidadosamente estos experimentos en las condiciones que dichos investigadores indican y los resultados se nos reproducen perfectamente. Además las curvas de tiempo en ausencia de efectores no son lineales produciéndose una aparente y muy marcada pérdida de actividad en función del tiempo la cual puede recuperarse cuando se adiciona FDP. Nuestra conclusión al respecto es que los extractos crudos de piruvato quinasa contienen suficiente FDP, como para enmascarar el efecto de la adición exógena de este metabolito, el cual se consume durante la preincubación a 25°C. Con esta explicación están de acuerdo los experimentos relatados previamente y además el hecho, observado por diferentes investigadores que durante la purificación de la enzima, aumenta marcadamente la sensibilidad al FDP. Por consiguiente, los experimentos efectuados indican que la preincubación a 0°C no conduce a la desensibilización de la piruvato quinasa tipo L. Sin embargo, los resultados no excluyen la posibilidad de que ocurran cambios conformacionales rápidos y reversibles que pueden modificar las propiedades cinéticas de la enzima. La existencia de estos efectos debería investigarse estudiando la cinética de la enzima a diferentes temperaturas.

Inactivación en Presencia de Enzimas Proteolíticas

Los cambios conformacionales que se producen cuando se unen efectores alostéricos o sustratos han sido detectados en diferentes enzimas como una modificación en la susceptibilidad a la proteólisis (156 - 162). Con el fin de obtener alguna información en este sentido, se estudió la susceptibilidad de la isoenzima L de piruvato quinasa al ataque por tripsina o pronasa en ausencia o presencia de sustratos y efectores alostéricos. En la Fig. 19 se muestran las curvas de inactivación por tripsina. Se puede apreciar que este proceso sigue una cinética de primer orden. Las actividades residuales fueron determinadas utilizando concentraciones saturantes de sustratos y cationes activadores de manera que estas mediciones representan V y por lo tanto son proporcionales a la concentración de enzima activa remanente.

Los cationes mono y divalente producen una marcada protección contra el ataque triptico. El tiempo necesario para que la actividad disminuya al 50% del valor control, aumenta 2,5 veces en presencia de estos ligandos. Por el contrario, el FDP inestabiliza a la enzima, acelerando la inactivación; además, en presencia de este efector la curva de inactivación resultó bifásica. Este hecho no se observó con los otros efectores y fue reproducible en diferentes preparaciones enzimáticas.

El ATP no produce un efecto apreciable pero el MgATP protege a la enzima (Tabla IV); este complejo se forma cuando se utilizan cantidades equimoleculares de Mg y ATP. Es interesante destacar que en el caso de la isoenzima L la especie molecular inhibidora es el complejo mencionado. También se aprecia que las curvas de inactivación en presencia de los sustratos, ADP ó PEP no difieren de la curva control.

El efecto de algunas combinaciones de efectores fue también estudiado. Se puede ver en la Tabla IV, que los efectos del K^+ y Mg^{++} no son aditivos, pero cuando está presente el K^+ , los sustratos tienen un

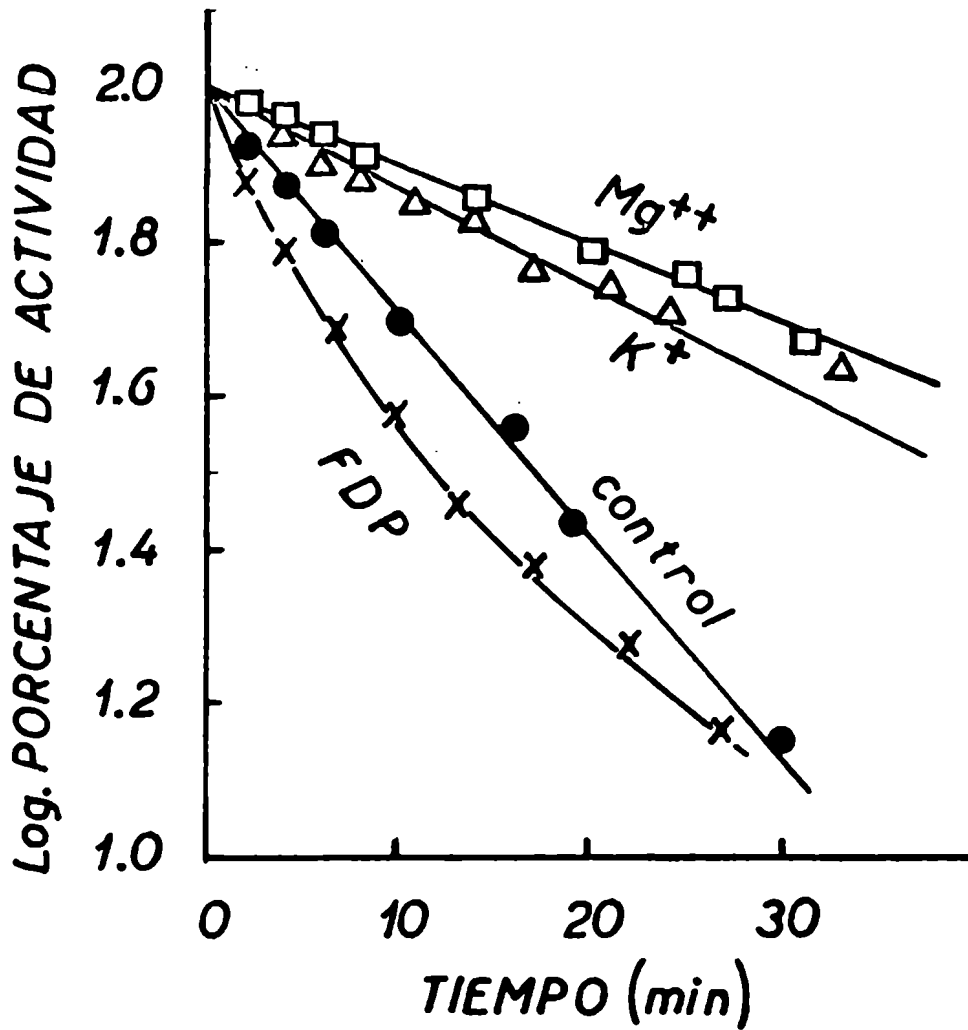


Fig. 19. Inactivación de la piruvato quinasa (tipo L) por tripsina, en ausencia o presencia de los cationes activadores y FDP. La enzima control (32 $\mu\text{g/ml}$) fue digerida con tripsina (10 $\mu\text{g/ml}$), en ausencia o presencia de: KCl 100 mM; MgCl_2 8 mM y FDP 0.1 mM determinándose las actividades residuales a los tiempos indicados. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 12, excepto que las concentraciones de PEP y ADP fueron 5 y 3 mM respectivamente.

TABLA IV

Efecto de los efectores alostéricos y sustratos sobre
la inactivación por tripsina

La preparación (32.8 µg/ml) fue digerida con tripsina (10 µg/ml) determinándose la actividad residual a diferentes tiempos. Las condiciones de ensayo fueron similares a la Fig. 19. Los tiempos requeridos para producir 50% de inactivación ($t_{\frac{1}{2}}$) fueron expresados como porcentaje del control sin adiciones.

Adiciones	$t_{\frac{1}{2}}$ %
- <u>a</u>	100
PEP 3 mM	90
ADP 1.5 mM	90
Alanina 2 mM	130
ATP 1.5 mM	110
Mg ATP 1.5 mM	157
K ⁺ 100 mM	250
Mg ⁺⁺ 8 mM	276
K ⁺ 100 mM + PEP 3 mM	372
K ⁺ 100 mM + Mg ⁺⁺ 8 mM	336
K ⁺ 100 mM + Mg ATP 1.5 mM	386
K ⁺ 100 mM + Alanina 2 mM	240

a El $t_{\frac{1}{2}}$ del control fue 10 minutos.

efecto protector que no fue detectado en ausencia del ión monovalente. Los controles efectuados (midiendo la actividad de la tripsina utilizando caseína desnaturalizada como sustrato en ausencia y en presencia de la concentración correspondiente de los ligandos) indican que los efectos observados no son la consecuencia de una variación de la actividad de la enzima proteolítica.

La tripsina es una enzima específica que hidroliza los enlaces peptídicos en los cuales un residuo de L-arginina o L-lisina aporta el grupo carbonilo. Por lo tanto, resulta importante utilizar otra enzima proteolítica con especificidad diferente con el fin de determinar si los efectos de protección son debidos a fenómenos locales o bien la consecuencia de cambios conformacionales. Para investigar este punto se eligió la pronasa ya que esta enzima no tiene una especificidad de grupo de finida como la tripsina.

En la Fig. 20 se muestran las curvas de inactivación por pronasa en presencia de los efectores alostéricos. Se puede observar que en presencia de KCl 100 mM la velocidad de inactivación es marcadamente menor con respecto al control, sin adiciones; el efecto protector depende de la concentración empleada ya que el KCl a 28 mM ejerce un efecto menor. Resulta de interés destacar que la curva de inactivación en presencia de NaCl a 50 mM es casi igual al control, indicando que estos efectos no son debidos a un cambio de la fuerza iónica del medio. El Mg^{++} también estabiliza la enzima contra el ataque por pronasa. Contrariamente al efecto producido por la adición de los cationes activadores, la enzima se inactiva más rápidamente en presencia de FDP. Este efecto fue confirmado utilizando una concentración inferior de pronasa (3 $\mu g/ml$) En este caso el tiempo medio de inactivación fue 9.0 min. para el control y 4.5 min. para la curva en presencia de FDP. Finalmente como se

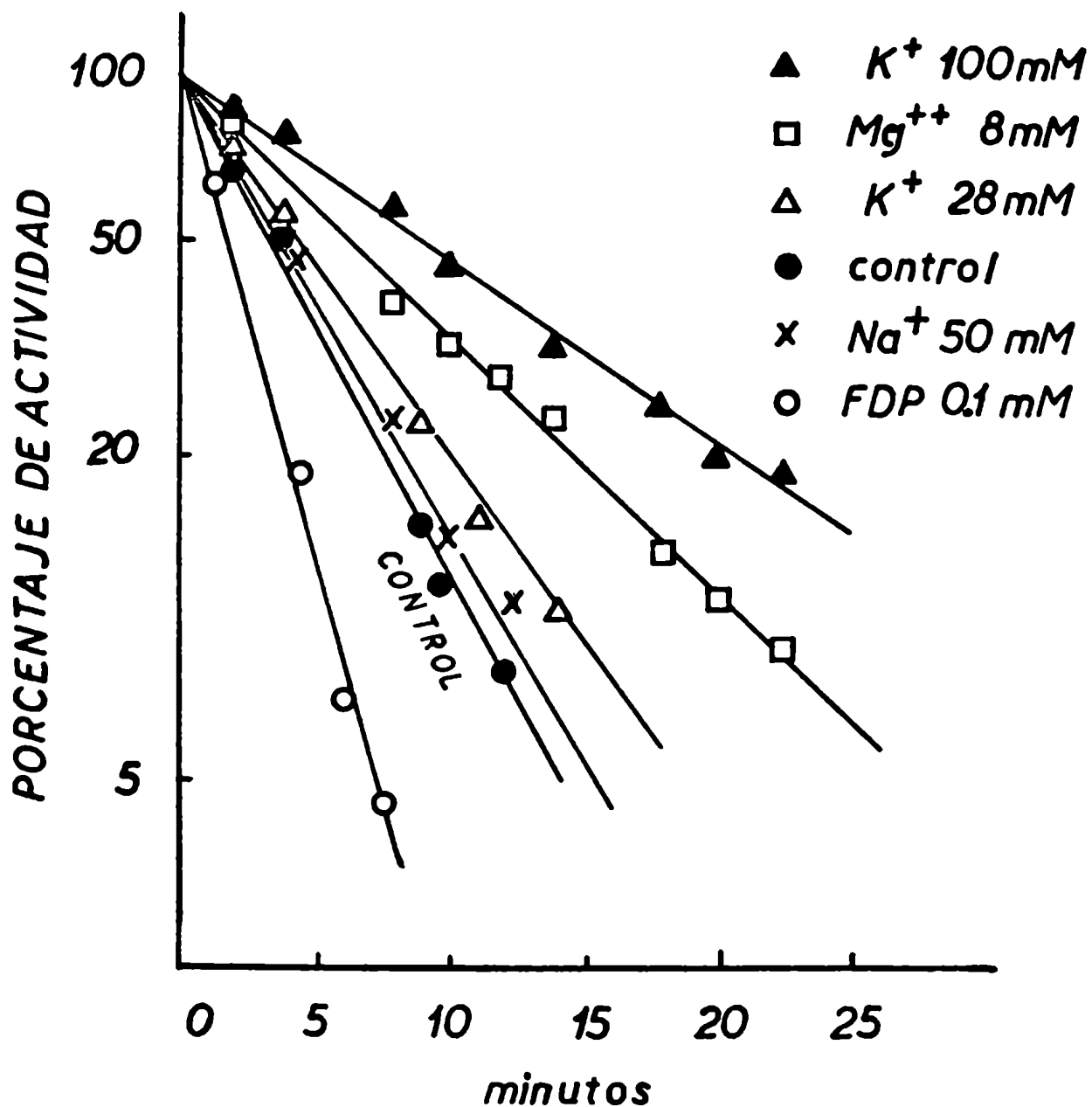


Fig. 20. Inactivación de la piruvato quinasa (tipo L) por pronasa, en ausencia o presencia de los cationes activadores y FDP. La enzima control (32 $\mu\text{g/ml}$) fue digerida con pronasa (10 $\mu\text{g/ml}$) en ausencia o presencia de : KCl 100 mM, 6 28 mM; $MgCl_2$ 8 mM; NaCl 50 mM y FDP 0.1 mM. Otras condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 19.

TABLA V

Efecto de los inhibidores y sustratos sobre la velocidad
de inactivación por pronasa

Las condiciones experimentales y la expresión de los resultados fueron similares a los descritos en la Tabla IV.

Adiciones	$t_{\frac{1}{2}}$ %
-	100
ATP 1.5 mM	108
Mg ATP 1.5 mM	117
Alanina 2 mM	111
PEP 3 mM + ADP 2 mM	123

puede ver en la Tabla V, los sustratos y efectores sólo ejercen un pequeño efecto protector. Controles apropiados, midiendo la actividad de la pronasa en presencia de los ligandos (como se describió en Materiales y Métodos) indican que los efectos observados no son atribuibles a una modificación de la actividad de la enzima proteolítica. Estos controles son particularmente importantes cuando se estudian efectos de protección.

En otros experimentos se observó que el Mg^{++} también estabiliza la enzima contra la inactivación por quimotripsina.

De acuerdo a los experimentos presentados se puede concluir que los cationes activadores estabilizan marcadamente la enzima contra la inactivación espontánea a 30°C y también contra la producida por las enzimas proteolíticas: tripsina y pronasa. Por el contrario, en presencia de FDP, la enzima es inactivada más rápidamente por ambas proteasas.

Piruvato Quinasa de Músculo

Recientemente se observó que la fenilalanina es un inhibidor de la piruvato quinasa de músculo (164). Considerando que este metabolito no tiene una marcada analogía estructural con los sustratos de esta enzima, fue interesante determinar si los otros aminoácidos ejercen un efecto similar.

En la Tabla VI se muestra que la fenilalanina a una concentración de 5 mM produce una marcada inhibición de la actividad de la piruvato quinasa muscular. Por el contrario, los otros aminoácidos probados (enumerados en la Tabla VI) no modifican significativamente la actividad enzimática. La tirosina ensayada a 2.5 mM debido a su baja solubilidad, tampoco afectó la actividad mientras que a esa concentración, la fenilalanina produce una inhibición de 35%. Este experimento indica que el efecto de la fenilalanina es considerablemente específico. A pH 6.3, la inhibición disminuye marcadamente, sugiriendo que ésta depende del pH del medio de incubación. Los otros aminoácidos tampoco ejercieron efecto a este pH.

El efecto inhibitorio específico de la fenilalanina fue también observado utilizando una preparación enzimática purificada de acuerdo al método de Tietz y Ochoa (88).

En la Tabla VII se muestra el efecto de la adición de algunos aminoácidos sobre la actividad de la enzima inhibida por fenilalanina. Se observa que la alanina, serina y cisteína, revierten completamente la inhibición; la treonina fue menos efectiva a la concentración empleada (5 mM). Otros aminoácidos no tuvieron efecto.

TABLA VI

Efecto de distintos aminoácidos sobre la actividad enzimática

Las determinaciones de velocidad inicial fueron efectuadas espectrofotométricamente como se describió en Materiales y Métodos. La mezcla de incubación contiene: TES - TMA 100 mM, pH 7.5, MgSO₄ 8 mM; ADP 1.5 mM; PEP 0.1 mM; KCl 100 mM. Las mediciones a pH 6.3 fueron realizadas utilizando una mezcla similar, excepto que se empleó MES - TMA como buffer.

Adiciones	concentración	pH 7.5		pH 6.3	
		μmol/min	%	μmol/min	%
—	—	33.7	100	31.4	100
L-fenilalanina	2.5mM	20	59	-	-
L-fenilalanina	5 mM	7.2	21.4	29.8	95
L-tirosina	2.5mM	34.5	102	-	-
L-triptofano	5 mM	31.8	94	-	-
L-histidina	5 mM	34.5	102	31	99
L-prolina	5 mM	34.3	102	31.2	100
L-isoleucina	5 mM	31.3	93	29.6	94
L-leucina	5 mM	32.1	95	30.2	96
L-aspartato	5 mM	33.2	96	29.2	93
L-glutamato	5 mM	34.2	101	29.7	95
L-valina	5 mM	33.9	100	30.4	97
L-treonina	5 mM	33	98	34.8	110
L-alanina	5 mM	34.5	102	32.4	106
L-cisteína	5 mM	33.9	100	31.3	100
L-serina	5 mM	34.5	102	30.9	99
L-metionina	5 mM	30.5	91	31.4	100
L-glicina	5 mM	34.5	102	32.7	104

TABLA VII

Efecto de distintos aminoácidos sobre la inhibición
producida por la fenilalanina

Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Tabla VI. Las determinaciones se efectuaron en presencia de L- fenilalanina 5 mM; los otros aminoácidos fueron agregados a esta misma concentración.

Adiciones	μ moles/min.	%
- <u>a</u>	11.2	24
L-alanina	46.5	98
L-cisteína	49.0	103
L-serina	48.0	101
L-treonina	26.8	57
L-glicina	19.2	40
L-valina	16.0	34
L-triptofano	13.6	28
L-aspartato	13.6	28
L-histidina	12.8	27

a La actividad en ausencia de fenilalanina fue de 47.5 μ moles de piruvato formado por minuto.

Cabe consignar que los aminoácidos reactivantes no ejercen ningún efecto sobre la actividad enzimática en ausencia de fenilalanina, como se había mostrado en la Tabla VI.

Cinética en Función de la Concentración de Sustratos

En la Fig. 21 se muestra el gráfico de las inversas de la velocidad inicial de reacción en función de la concentración del PEP en ausencia y presencia de diferentes niveles de fenilalanina. En presencia del inhibidor disminuye la V y aumenta apreciablemente la K_m de la enzima por el PEP. Por consiguiente, la inhibición puede considerarse de tipo mixto. En la Fig. 22 se grafica un experimento similar pero en el que se varió la concentración de ADP. En este caso, el efecto de la fenilalanina consiste en disminuir la V ; por lo tanto, el tipo de inhibición es no competitivo.

Se debe destacar que las curvas de saturación para ambos sustratos fueron estrictamente hiperbólicas aún en presencia de concentraciones elevadas del inhibidor como lo indica la linealidad de los gráficos de las inversas.

Efecto de la Concentración de Fenilalanina Sobre la Velocidad de Reacción

En la Fig. 23 se muestra la dependencia de la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de fenilalanina, en presencia de diferentes niveles de PEP. Se puede apreciar que las curvas de inhibición son típicamente sigmoides.

Los valores de las pendientes de los gráficos de Hill fueron 1.6 en todos los casos (Fig. 24); las concentraciones de fenilalanina necesarias para producir el 50% de inhibición ($I_{0.5}$) fueron 3.5 mM a 0.15 mM de PEP y aumenta a 11 mM en presencia de 0.6 mM de PEP.

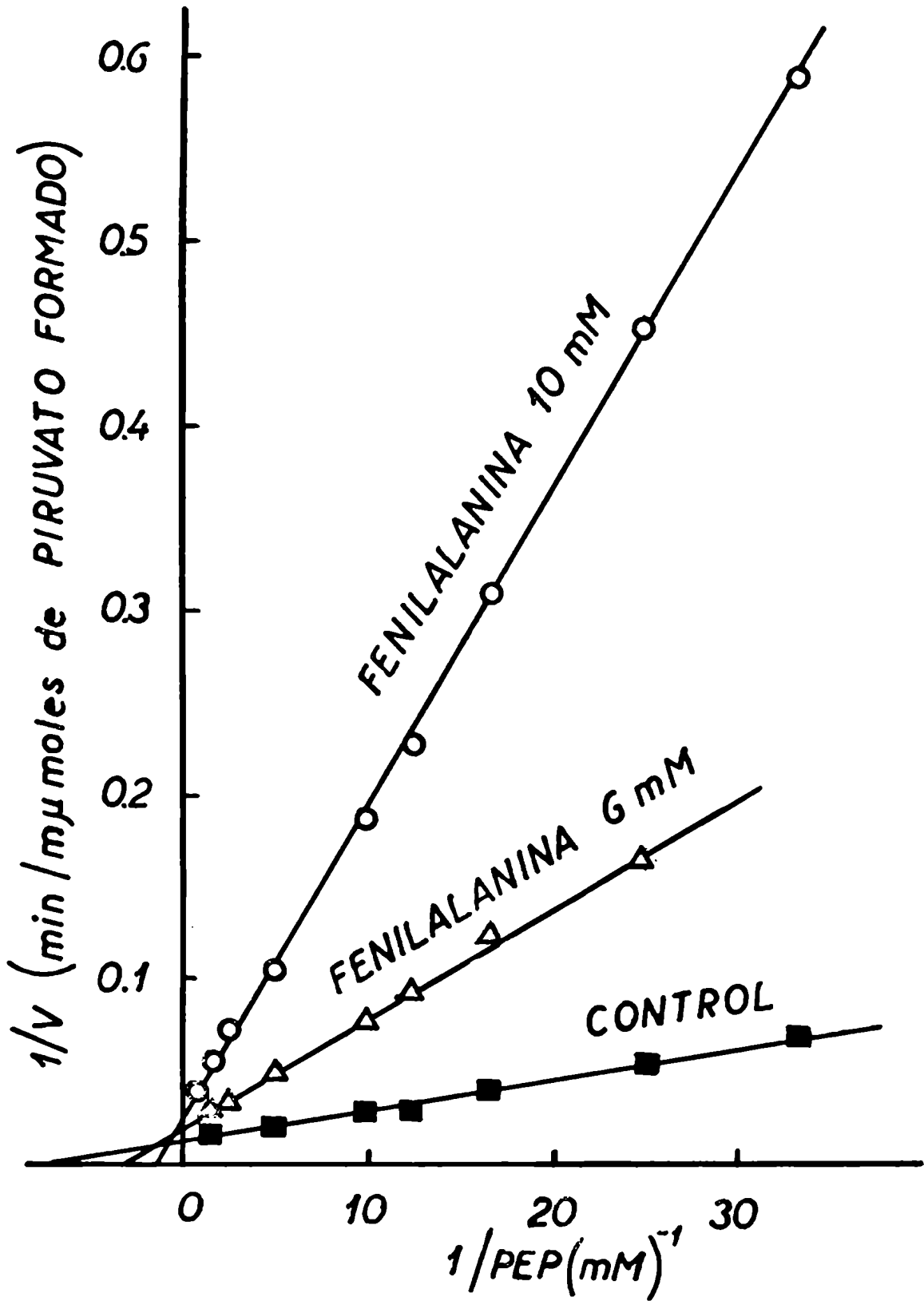


Fig. 21. Efecto de la concentración de PEP sobre la actividad de la piruvato quinasa de músculo, en ausencia y en presencia de fenilalanina. Los ensayos se efectuaron como se indica en la Tabla VI.

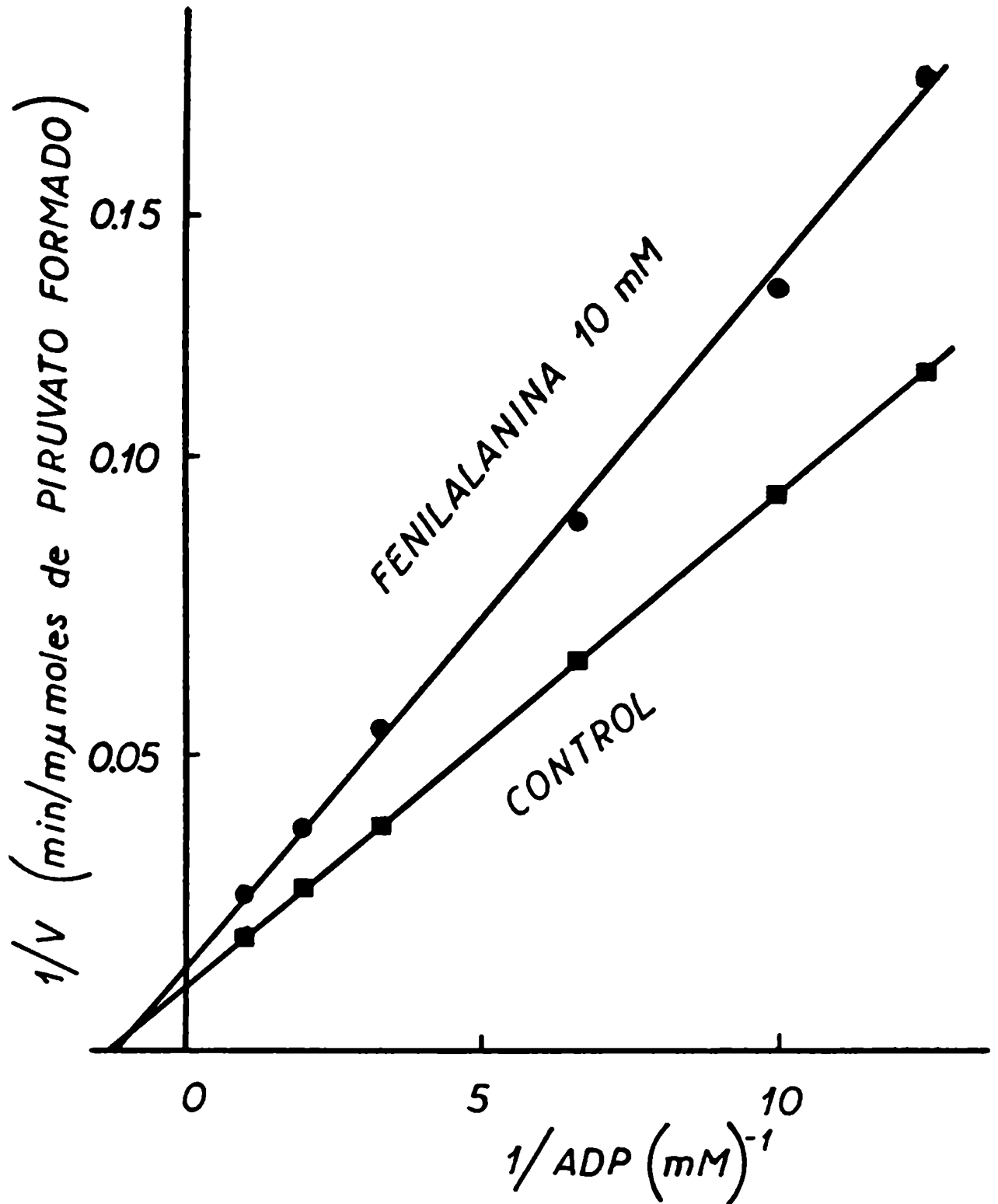


Fig. 22. Efecto de la concentración de ADP sobre la actividad de la piruvato quinasa de músculo, en ausencia y presencia de fenilalanina. Los ensayos se efectuaron como se indicó en la Fig. 21 excepto que la concentración de PEP fue de 0.5 mM y la de ADP que se varió como se indica.

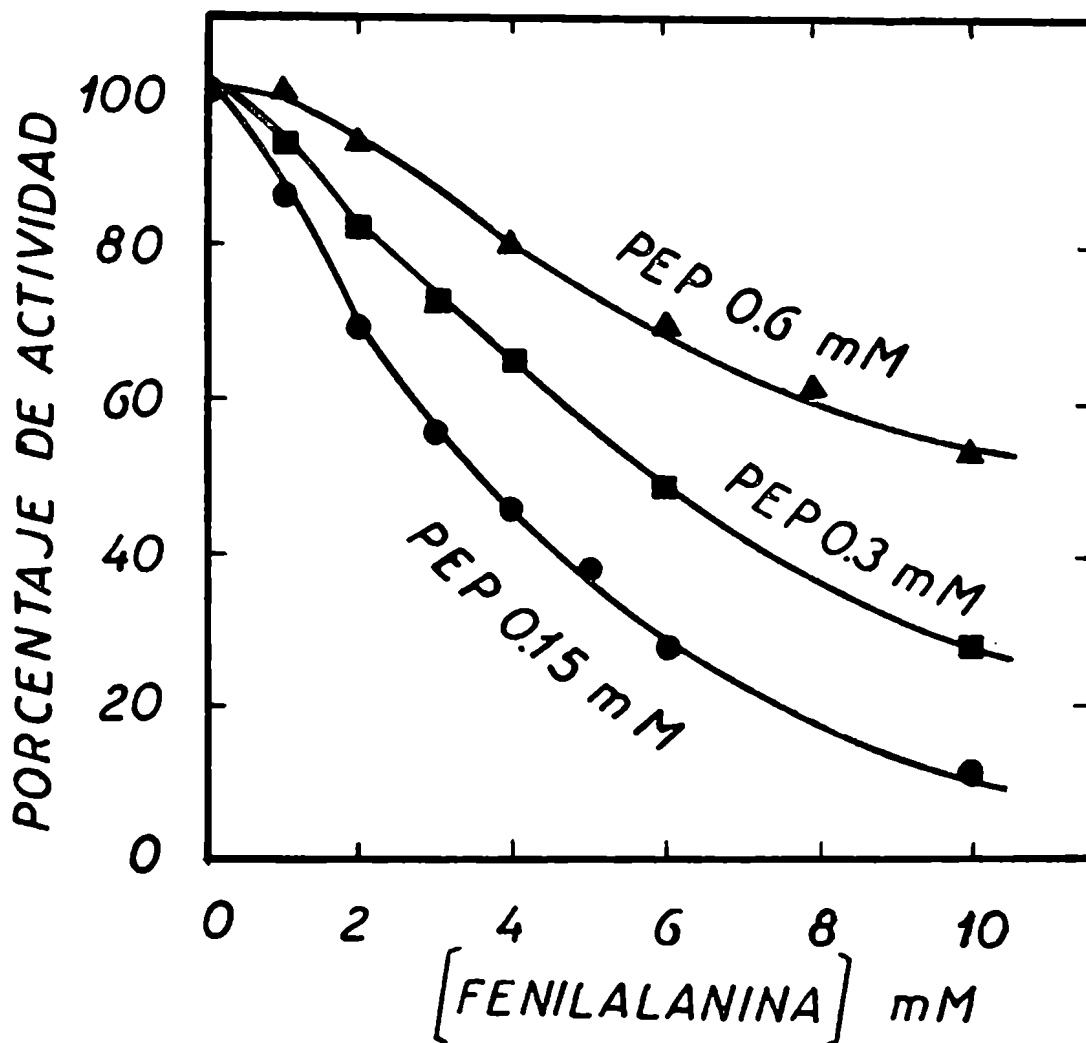


Fig. 23. Efecto de la concentración de fenilalanina sobre la velocidad de reacción, a diferentes niveles de PEP. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 21 excepto que los niveles de PEP fueron 0.15, 0.30 y 0.6 mM como se indica; las actividades en ausencia de fenilalanina fueron: 96, 121, y 132 μ moles de piruvato formado por minuto respectivamente.

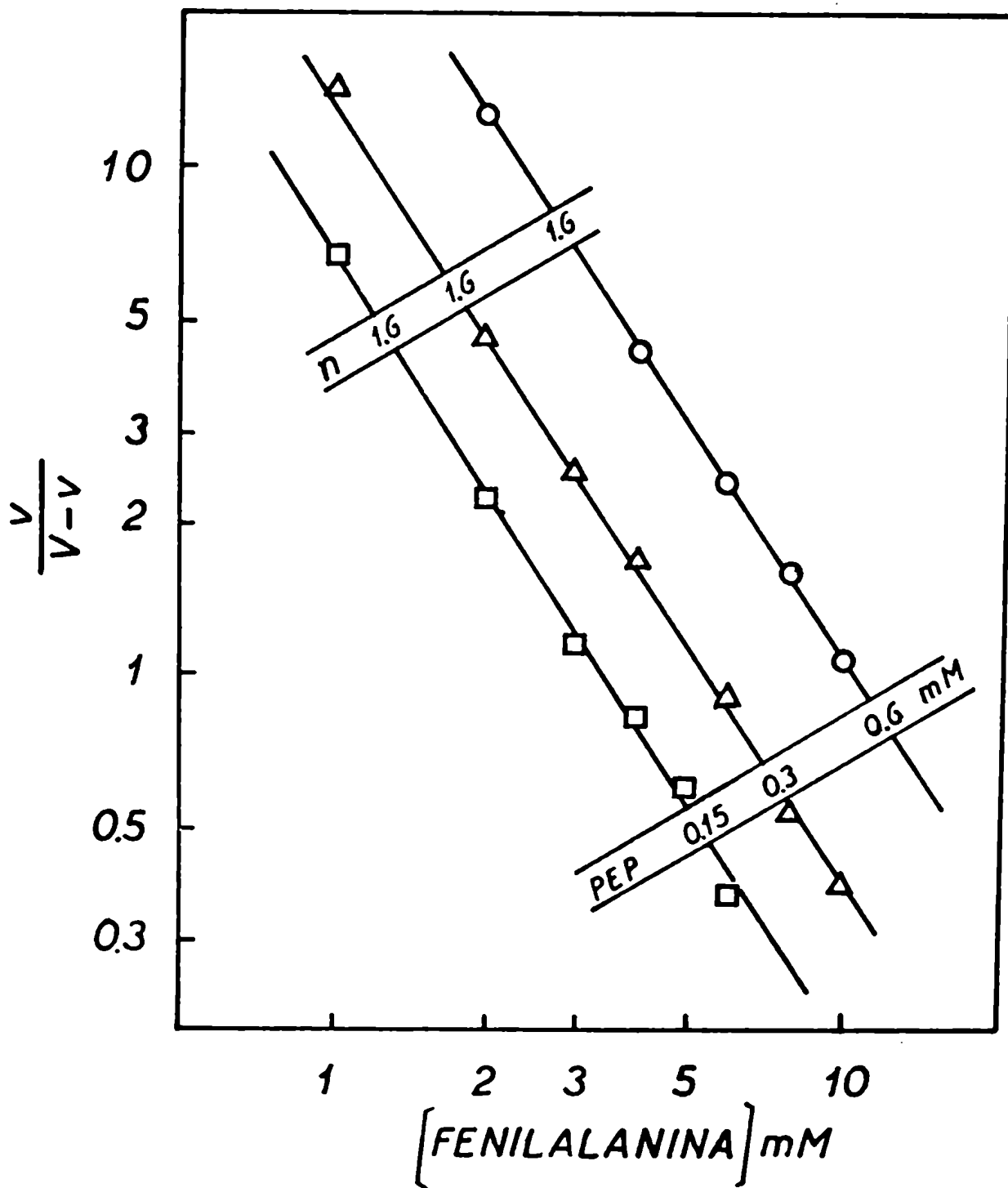


Fig. 24. Gráficos de Hill para los datos de la Fig. 23.

El efecto cooperativo observado cuando se varió la concentración de inhibidor, resultó particularmente interesante ya que previamente no se habían observado cinéticas de tipo sigmoide con esta enzima.

Efecto de la Alanina, Serina y Cisteína Sobre la Curva de Inhibición

En la Tabla VII se había mostrado que la alanina, serina y cisteína revierten la inhibición por fenilalanina. Por lo tanto, resultó de interés estudiar el efecto de estos aminoácidos sobre la forma de la curva de inhibición producida por fenilalanina. En las Fig. 25 y 26 se puede apreciar que los valores de $I_{0.5}$ aumentan marcadamente en presencia de los aminoácidos reactivantes pero éstos no modificaron la cooperatividad de la curva de inhibición. En efecto, las pendientes de los gráficos de Hill no variaron significativamente, como se muestra en la Fig. 27.

Cinética de Inhibición por 2 - PGA

Los resultados obtenidos sugieren que la piruvato quinasa de músculo exhibe propiedades cinéticas características de un sistema alostérico. Con el fin de examinar más detalladamente esta posibilidad se comparó la conducta cinética de la fenilalanina con la de un inhibidor puramente competitivo.

En el curso de estos estudios se observó que el 2-PGA era un inhibidor de la piruvato quinasa muscular. En la Fig. 28 se muestran los gráficos de las inversas de las velocidades iniciales de la reacción en función de la concentración de PEP en ausencia y en presencia de dos niveles de 2-PGA. En presencia de este último, se modifica únicamente la K_m de la enzima para el PEP; por lo tanto la inhibición es de tipo competitivo. Sin embargo esta evidencia es insuficiente para asegurar

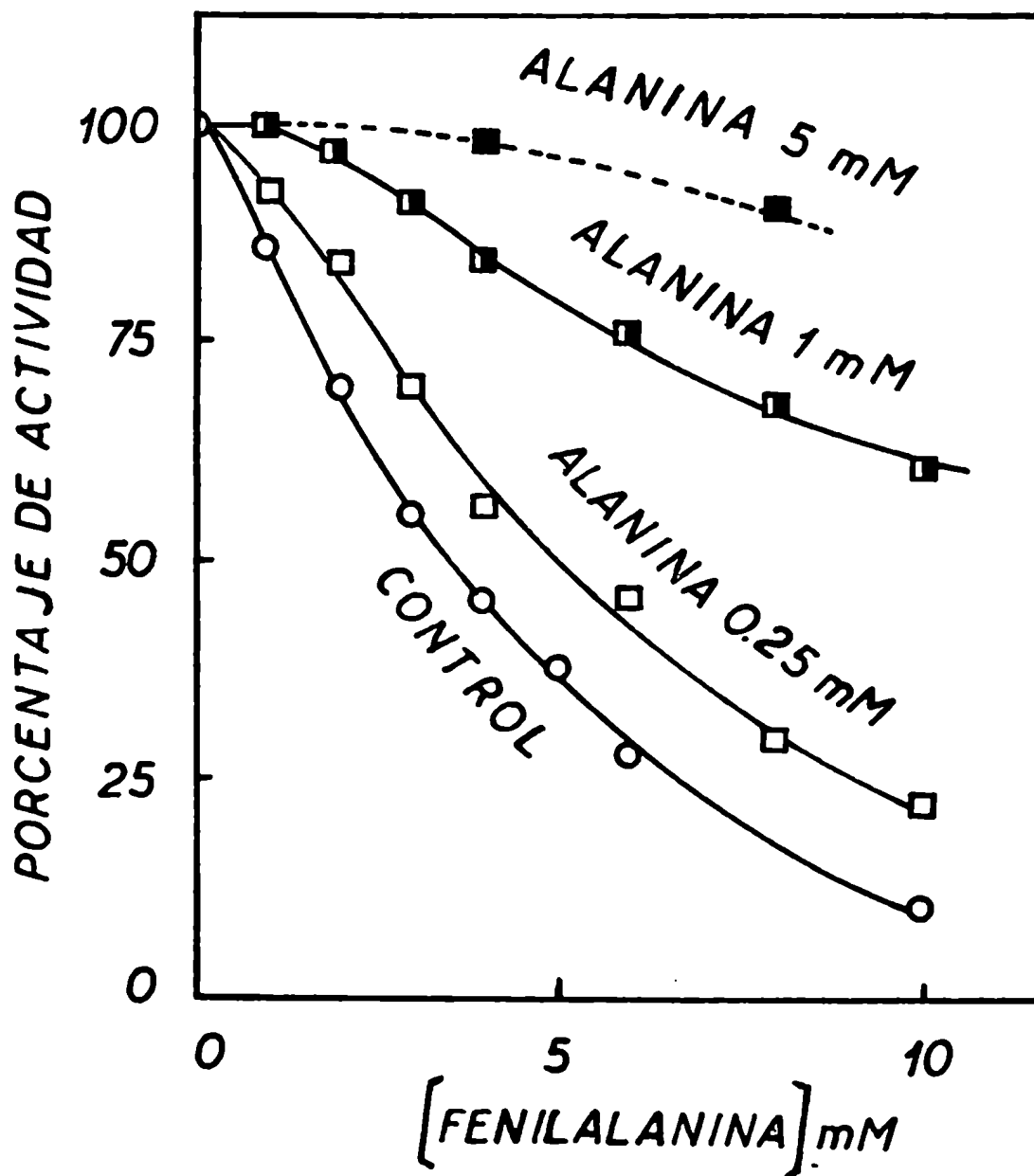


Fig. 25. Efecto de la concentración de fenilalanina sobre la velocidad de reacción de la piruvato quinasa de músculo, en presencia de diferentes niveles de alanina. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 23. El nivel de PEP utilizado fue 0.15 mM.

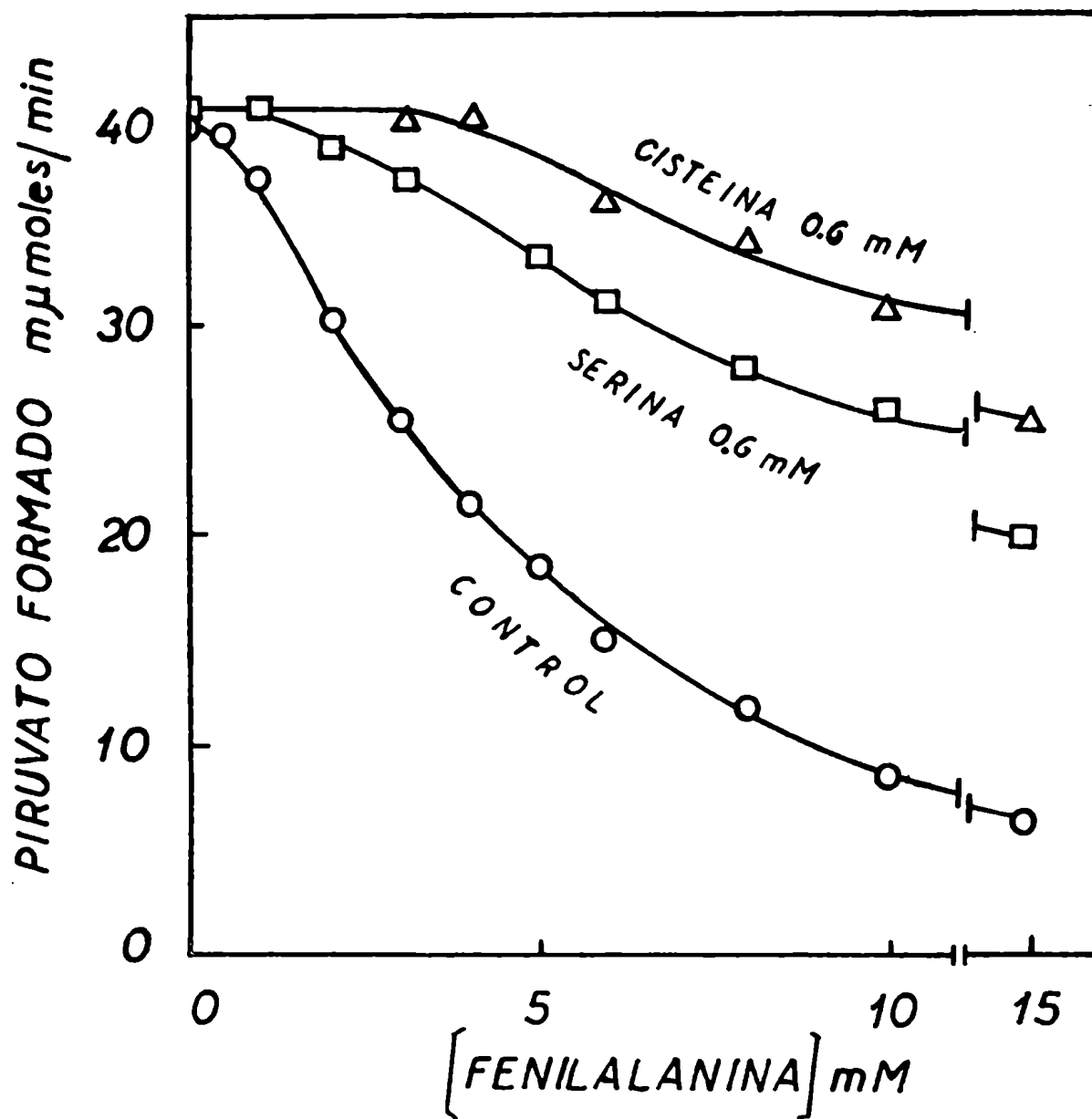


Fig. 26. Efecto de la concentración de fenilalanina sobre la velocidad de reacción de la piruvato quinasa de músculo, en presencia de serina y cisteína 0.6 mM. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 25.

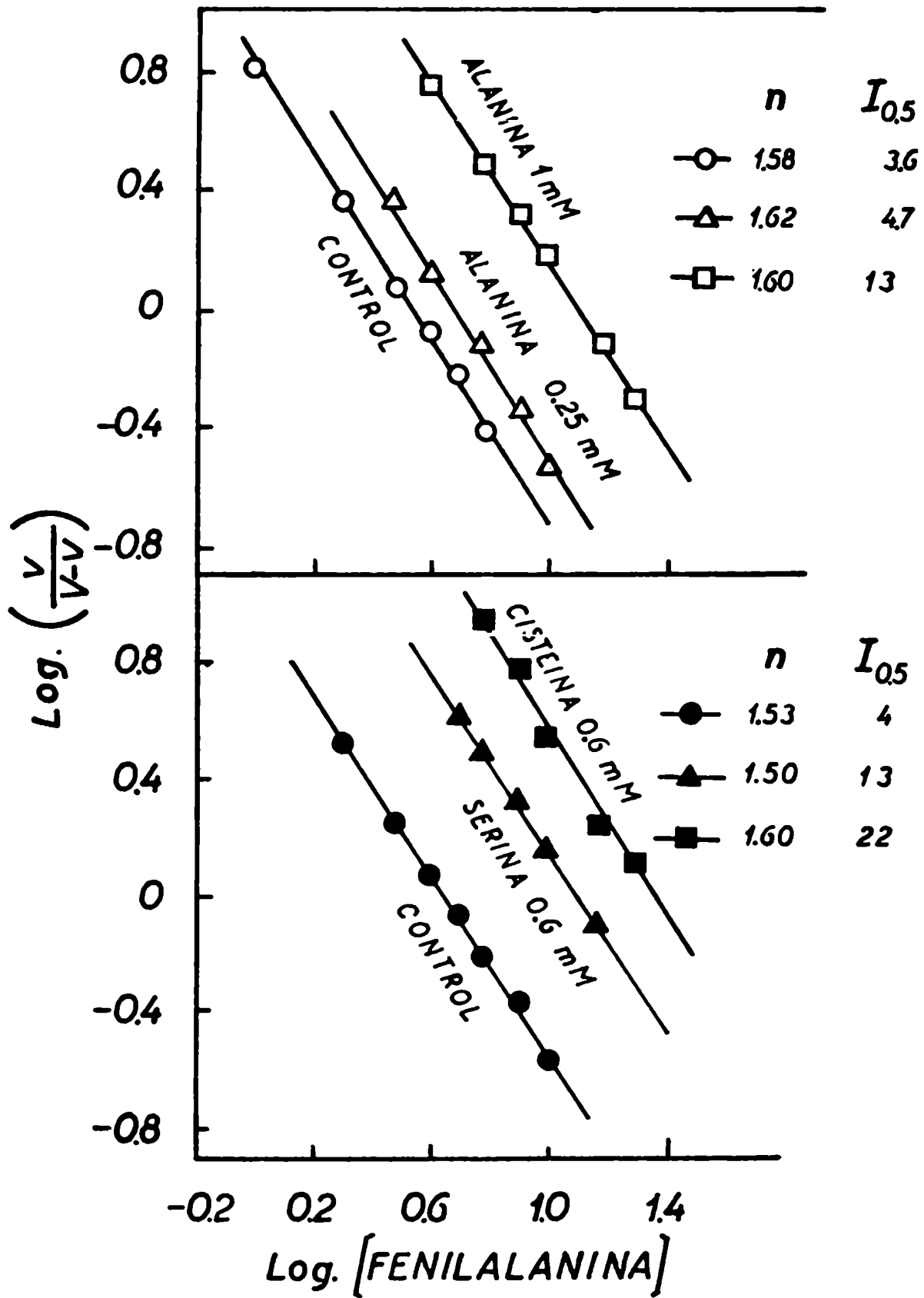


Fig. 27. Gráficos de Hill para los datos de las Fig. 25 y 26.

que el 2-PGA y el PEP se encuentran compitiendo por un sitio común; es necesario descartar la posibilidad de que el 2-PGA fuera un inhibidor parcialmente competitivo o bien exhiba efecto cooperativo. Con el fin de aclarar este punto se efectuó el experimento presentado en la Fig. 29 que describe la dependencia de la velocidad inicial de la reacción en fun - ción de la concentración de 2-PGA y el correspondiente gráfico de Dixon. Se puede apreciar que contrariamente a lo que se había observado previa - mente con la fenilalanina, la curva de inhibición es típicamente hiperbó - lica. Recientemente, Wang (176) destacó la utilidad del método gráfico de Dixon (177) para discriminar entre inhibidores que actúan en forma competitiva pura o parcial. Cuando los datos se disponen en un gráfico de $1/v$ vs. I se obtuvo una recta lo que descarta la inhibición parcial - mente competitiva (en este último caso la curva es hiperbólica) y la existencia de efecto cooperativo; en efecto, la pendiente del gráfico de Hill de estos datos fue 1.07.

Por consiguiente, el análisis cinético de la inhibición por 2-PGA sumado al hecho de que este metabolito es un análogo estructural del PEP, permite concluir que este inhibidor ejerce su efecto desplazando al sustrato mencionado del sitio activo de la enzima, es decir, está actuando como un inhibidor isostérico.

Interacción entre la Alanina y los Inhibidores

El experimento que se muestra en la Fig. 30 se efectuó con el fin de investigar el efecto de la alanina, uno de los aminoácidos reactivantes, sobre la inhibición producida por la fenilalanina y 2-PGA. La actividad enzimática fue determinada en ausencia y presencia de estos inhibidores a concentraciones crecientes de alanina. Se puede apreciar que esta última no modifica la actividad enzimática aún a concentracio -

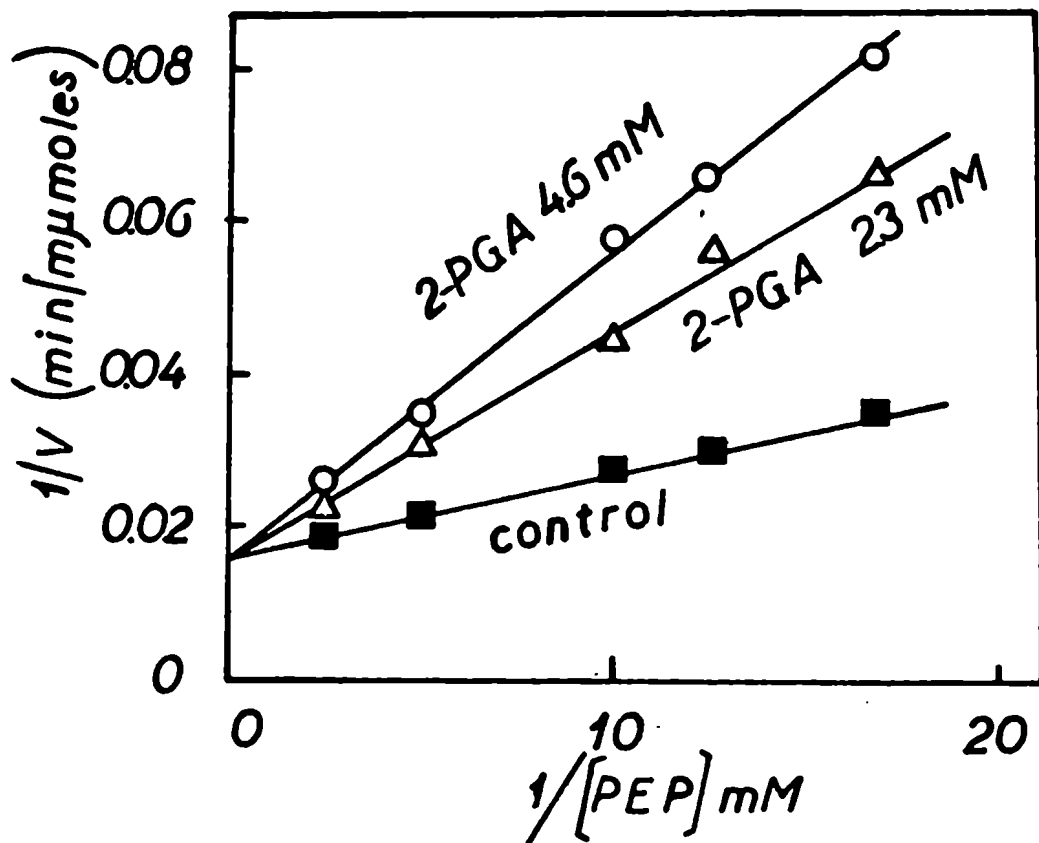


Fig. 28. Efecto de la concentración de PEP sobre la actividad enzimática en ausencia y en presencia de 2-PGA. Las condiciones experimentales son similares a las descritas en la Fig. 21.

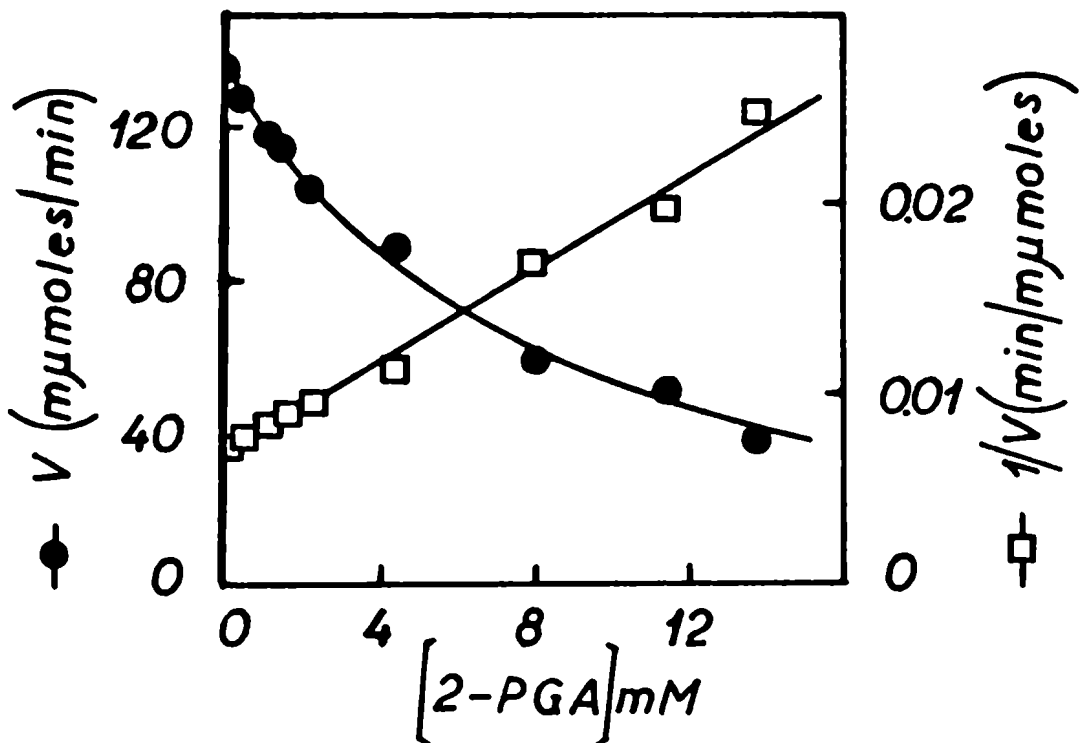


Fig. 29. Efecto de la concentración de 2-PGA sobre la actividad enzimática; los cuadrados representan un gráfico de Dixon para los mismos datos. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 25.

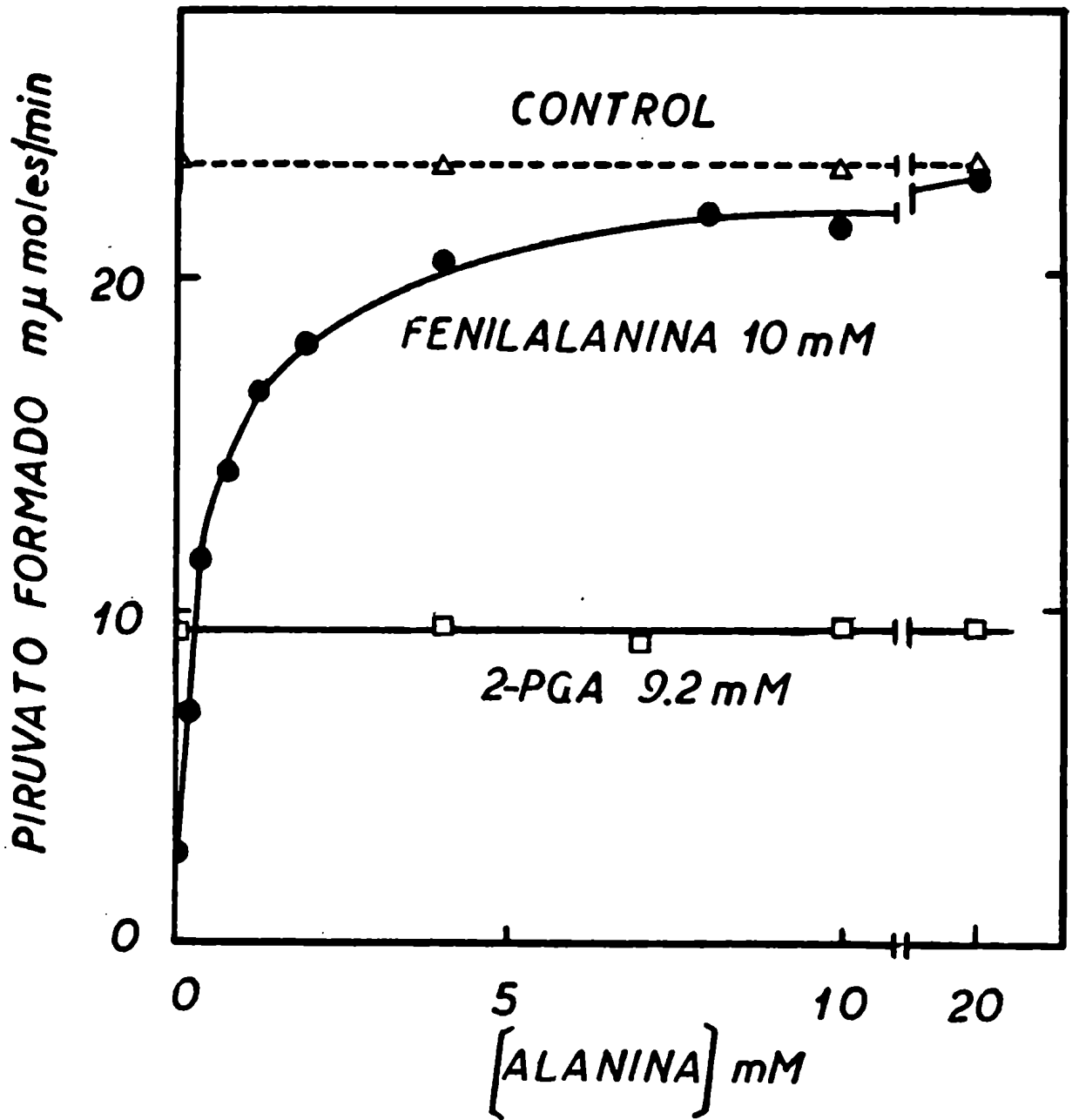


Fig. 30. Efecto de la concentración de alanina sobre la actividad de la piruvato quinasa de músculo en ausencia o presencia de fenilalanina ó 2-PGA, como se indica sobre las curvas. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 23.

nes muy altas (20 mM), coincidiendo con lo que se había mostrado en la Tabla VI. Por el contrario cuando la enzima fue inhibida por la adición de fenilalanina, la alanina ejerce un marcado efecto reactivante mientras que no tiene ningún efecto sobre la inhibición producida por el 2-PGA. Resulta de interés destacar que la forma de la curva de reactivación es hiperbólica. Además, como se discutirá más adelante, este experimento constituye una evidencia importante para establecer que el efecto de la fenilalanina es de naturaleza alostérica.

Influencia del pH sobre la Inhibición Producida por la Fenilalanina.

Anteriormente se había observado en nuestro laboratorio que las propiedades alostéricas de la piruvato quinasa hepática (tipo L) dependen marcadamente del pH de la mezcla de incubación (140 - 144). Con el fin de determinar si la enzima de músculo tiene una conducta cinética similar se determinó el efecto de los inhibidores a diferentes valores de pH de la mezcla de incubación. Una evidencia preliminar en este sentido se había mostrado en la Tabla VI. En la Fig. 31 se puede ver que la inhibición por fenilalanina varía marcadamente con el pH; así, por ejemplo, a pH 8.0 se obtuvo una inhibición del 95% mientras que a pH 7.0 ésta sólo fue de 15%. La adición de serina revirtió completamente el efecto inhibitorio, a todos los valores de pH. En marcado contraste al comportamiento cinético de la fenilalanina, el inhibidor isostérico produce un efecto constante en todo el rango de pH en que se efectuaron las determinaciones.

Los resultados de la Tabla VIII demuestran que la influencia del pH es prácticamente independiente del buffer utilizado. Se debe mencionar que aunque la actividad observada cuando se utilizó TRIS-maleato como buffer fue marcadamente menor, la influencia del pH sobre la inhi -

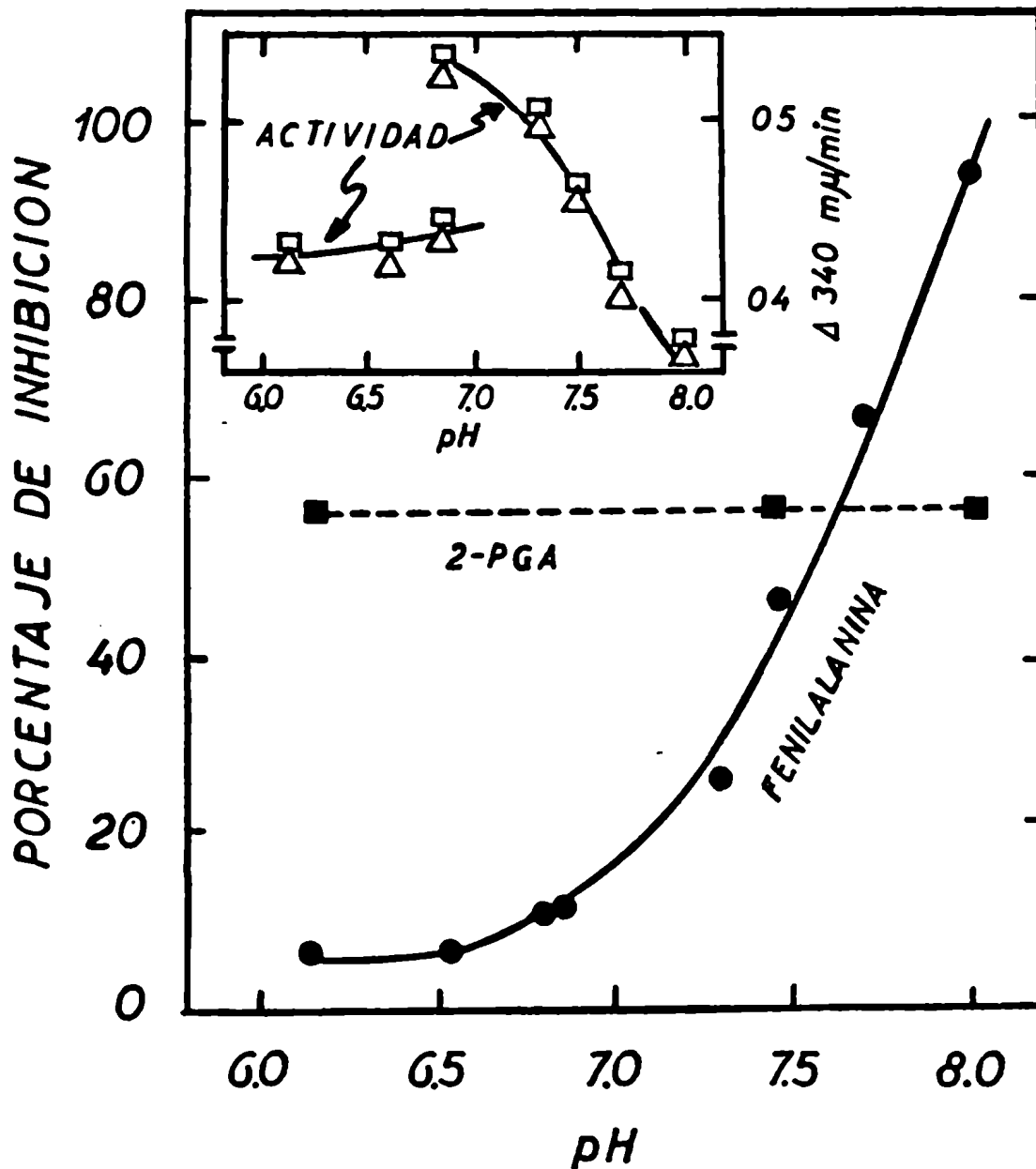


Fig. 31. Porcentaje de inhibición por fenilalanina o 2 - PGA, a diferentes valores de pH. Las condiciones experimentales fueron similares a las descriptas en la Fig. 23, excepto que la concentración de PEP utilizada fue 0.15 mM. Se utilizaron MES - TMA y TES - TMA como bufferes; el primero para las determinaciones en el rango ácido y el segundo para las mediciones realizadas a valores de pH superiores a 7. Las concentraciones de 2 - PGA y fenilalanina fueron 9.2 y 5 mM respectivamente. En el recuadro interno se representó la actividad enzimática en función del pH; —□— en ausencia de adiciones; —△— en presencia de fenilalanina 5 mM y serie 5 mM.

TABLA VIII

Efecto de diferentes bufferes en la inhibición por fenilalanina

Las condiciones experimentales fueron como las descriptas en la Tabla VI, excepto el buffer que se varió como se indica.

Buffer	pH	Adiciones		
		-	Fenilalanina 5 mM	Fenilalanina 5mM+ Serina 5 mM
MES-TMA	6.1	68. ^a	65.0	69.0
Cacodilato	6.1	65.0	62.0	67.0
TRIS - maleato	6.1	16.8	15.6	15.2
TES-TMA	8.0	57.5	4.8	58.0
HEPES-TMA	8.0	46.0	5.6	45.0
TRIS - maleato	8.0	25.0	2.6	21.0

^a Los datos representan las velocidades iniciales expresadas como μ -moles de piruvato formado por minuto.

bición no fue modificada.

La marcada dependencia de la inhibición por fenilalanina con el pH puede deberse a que el efecto inhibitorio es producido por una especie iónica determinada o bien a que la enzima adopta diferentes estados conformacionales a los distintos pH. Estas alternativas dan lugar a predicciones diferentes en lo que respecta a la forma de las curvas de inhibición determinadas a diferentes valores de pH. En el primer caso (el inhibidor es una forma iónica definida de la fenilalanina) se obtendrían curvas de igual cooperatividad, pero con diferentes valores de $I_{0.5}$; en otras palabras, las curvas serían fácilmente superponibles modificando adecuadamente la escala de abscisas. Por el contrario, si el efecto observado en la Fig. 31 y en la Tabla VIII es mediado por cambios conformacionales de la enzima, se esperaría obtener curvas de inhibición de cooperatividad diferente a los distintos pH o sea, marcadas diferencias entre los coeficientes de Hill. Por lo tanto, resultó de interés determinar si la cooperatividad de la curva de inhibición es modificada por el pH.

En la Fig. 32 se puede apreciar que el efecto cooperativo del inhibidor varía marcadamente con el pH; los valores de $I_{0.5}$ y n_H obtenidos de esos gráficos se encuentran en la Tabla IX. A pH 7.0 el n_H es inferior a la unidad; este resultado fue también observado en otro experimento en el que se obtuvo un n_H de 0.65. La cooperatividad de la curva de inhibición aumenta marcadamente a medida que se incrementa el pH, observándose un coeficiente de Hill de 2.0 cuando el experimento se efectuó a pH 8.0. De acuerdo a lo que se discutió anteriormente, este experimento sugiere que la enzima adopta diferentes estados conformacionales a los distintos pH.

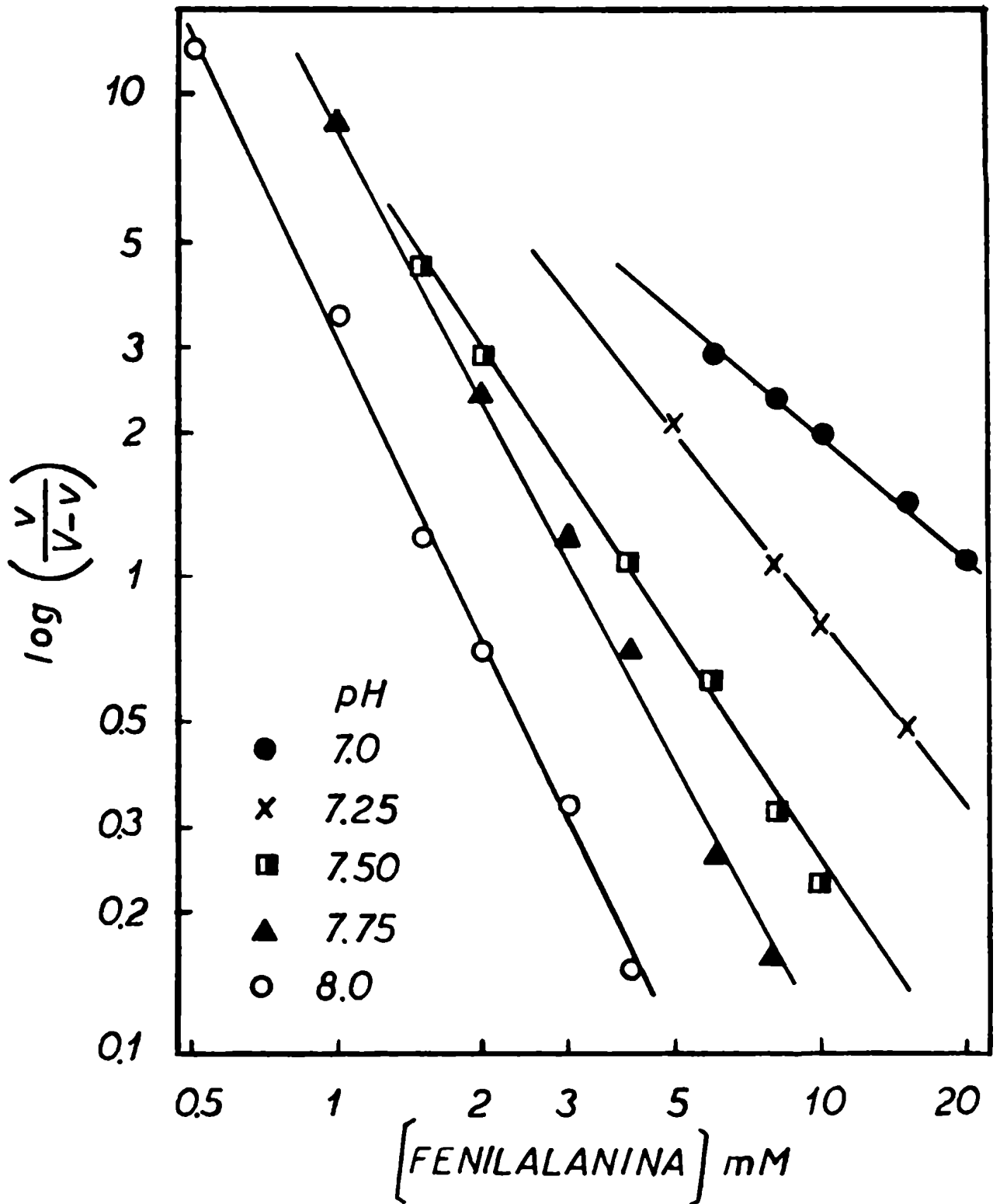


Fig. 32. Gráficos de Hill de la actividad enzimática en función de la concentración de fenilalanina a diferentes pH. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 25.

TABLA IX

Variación del n_H e $I_{0.5}$ en función del pH

Los datos fueron obtenidos de la Fig. 32

pH	$I_{0.5}$	n_H
8.00	1.7	2.0
7.75	3.1	1.85
7.50	4.0	1.53
7.25	8.5	1.28
7.00	21.0	0.82

Efecto de la Disociación y Renaturalización

La piruvato quinasa de músculo puede ser disociada en cuatro subunidades y luego reasociada, de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Nuestro interés en este proceso fue determinar si la enzima renaturalizada "in vitro" exhibía un comportamiento cinético similar al de la enzima nativa.

Como se puede ver en la Fig. 33 la disociación y renaturalización de la enzima altera el comportamiento cinético de ésta con respecto a la fenilalanina. La enzima que fue tratada exhibe un efecto cooperativo homotrópico con respecto a la fenilalanina marcadamente menor que el observado con la enzima nativa. La adición de serina 0.5 mM no modifica

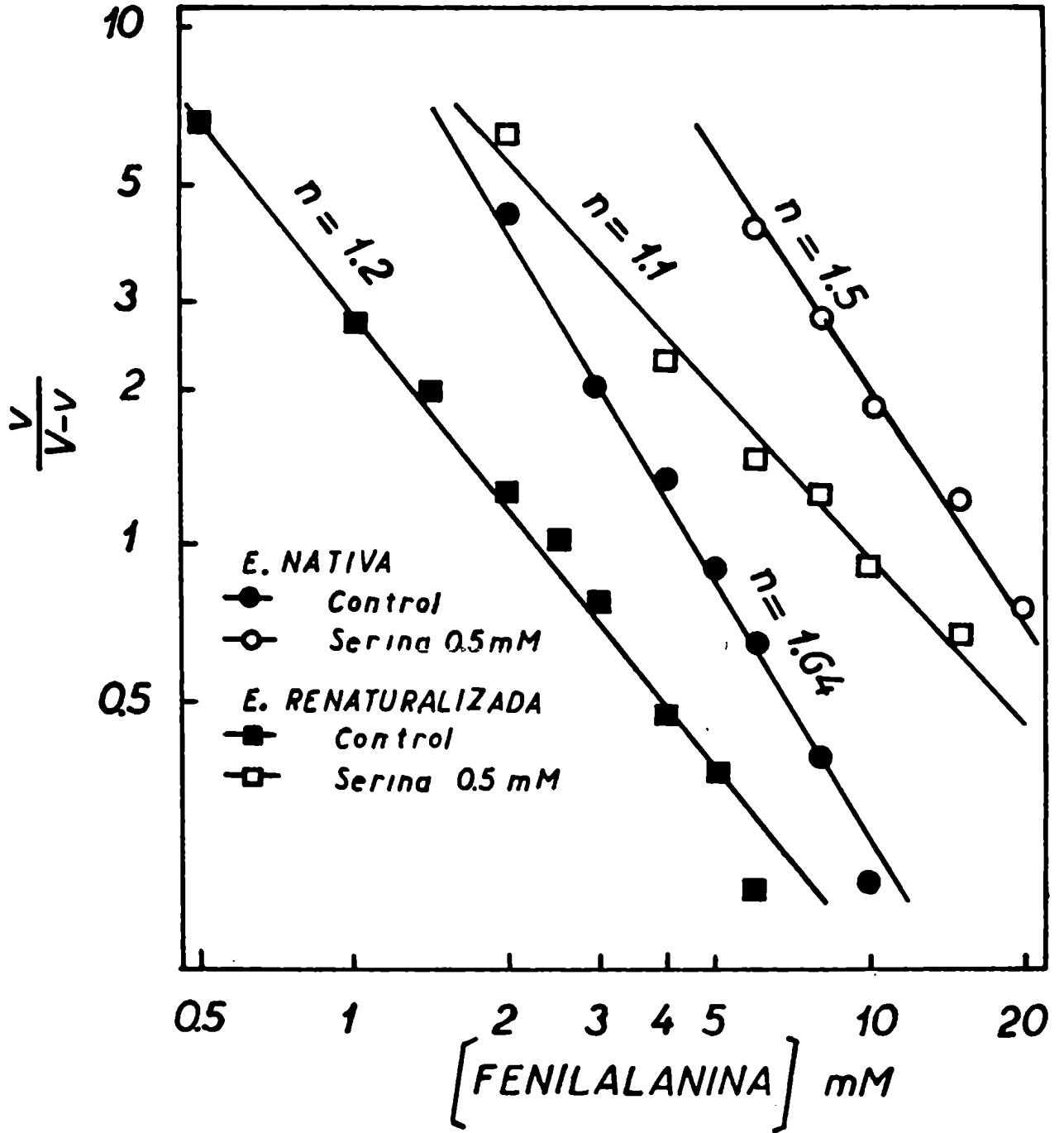


Fig. 33. Efecto de la concentración de fenilalanina sobre la actividad enzimática en ausencia y en presencia de serina 0.5 mM, como se indica en la figura. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 25.

el n_H pero aumenta marcadamente el $I_{0.5}$ para la fenilalanina. Por lo tanto, la disociación y renaturalización enzimática conduce a la desensibilización de la enzima la cual pierde el efecto cooperativo para el inhibidor.

En la Fig. 34 se muestran las curvas de inhibición por fenilalanina de la enzima nativa y de la renaturalizada en presencia de diferentes niveles de PEP. Se puede ver que tanto a 0.3 mM como a 0.6 mM de PEP la enzima tratada tiene un efecto cooperativo negligible con respecto a la fenilalanina, mientras que con la enzima control se observa un comportamiento usual para la fenilalanina, en estas condiciones (ver los valores de las pendientes del gráfico de Hill, Fig. 34).

Teniendo en cuenta que el comportamiento cinético de la enzima nativa es influenciado por el pH (Fig. 32), resultó de interés estudiar el efecto de este último sobre la enzima renaturalizada. El experimento mostrado en la Fig. 35 indica que el pH ejerce una influencia pequeña sobre el efecto cooperativo homotrópico de la enzima tratada, contrariamente a lo que se había observado con la enzima nativa (Fig. 32 y Tabla IX).

Se debe mencionar que entre las diferentes preparaciones renaturalizadas existe una cierta variabilidad en el grado de desensibilización obtenido; sin embargo en todos los casos se observó inhibición por fenilalanina.

En el curso de estos estudios se vió que cuando la enzima control se guardaba diluida (0.040 mg/ml) a 4°C durante varios días se producía una pérdida gradual del efecto cooperativo. En la Fig. 36 se puede ver que la enzima nativa diluida 24 horas antes exhibe un marcado efecto cooperativo comparable al que se había mostrado en el experimento de la Fig. 32. Por el contrario la enzima diluida que permaneció duran-

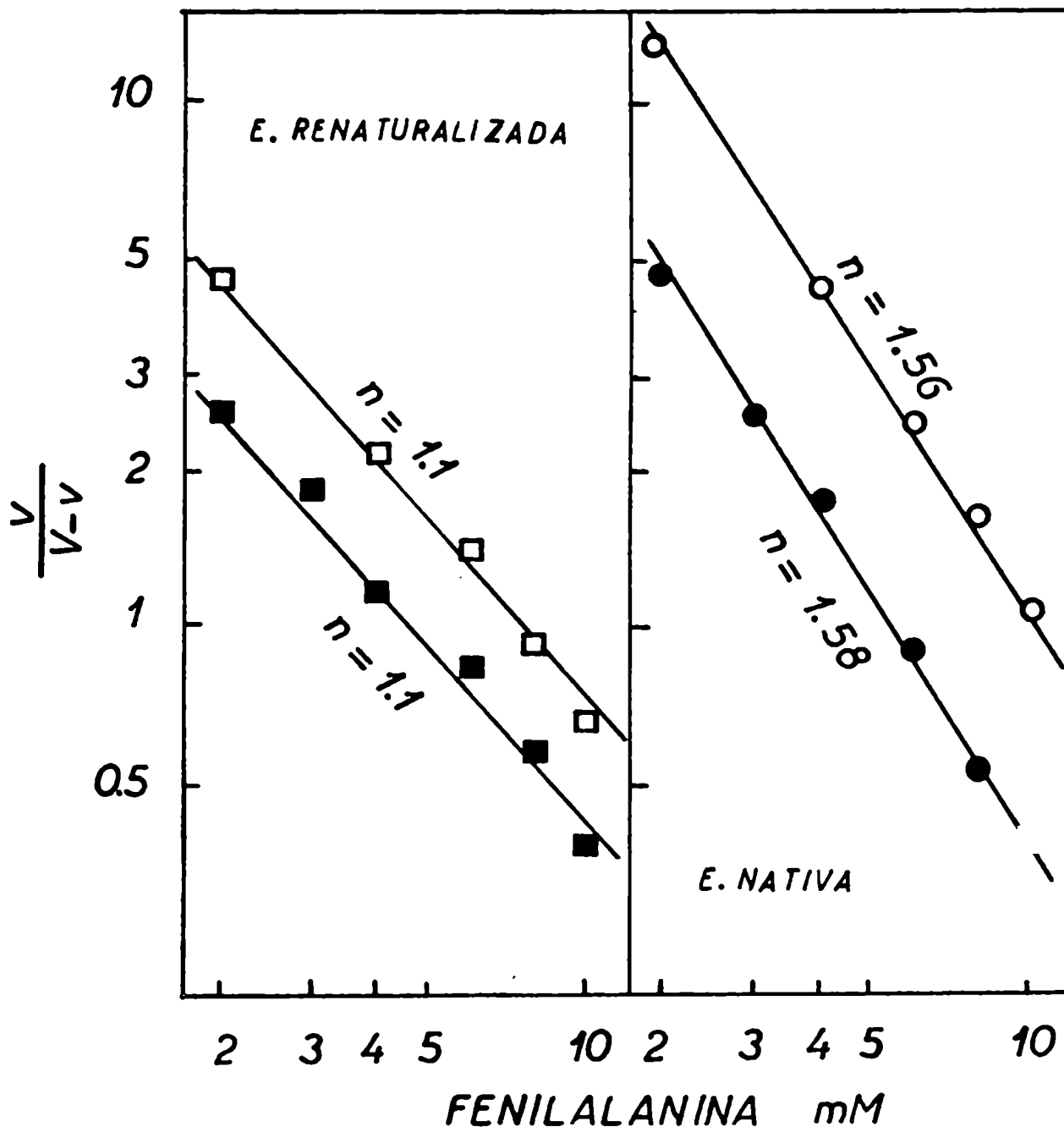


Fig. 34. Efecto de la concentración de fenilalanina sobre la actividad enzimática a diferentes niveles de PEP. Los círculos representan las determinaciones efectuadas con la piruvato quinasa nativa: ● en presencia de PEP 0.3 mM; ○ en presencia de PEP 0.6 mM. Los cuadrados representan las mediciones realizadas con la enzima renaturalizada: ■ en presencia de PEP 0.3 mM; □ en presencia de PEP 0.6 mM.

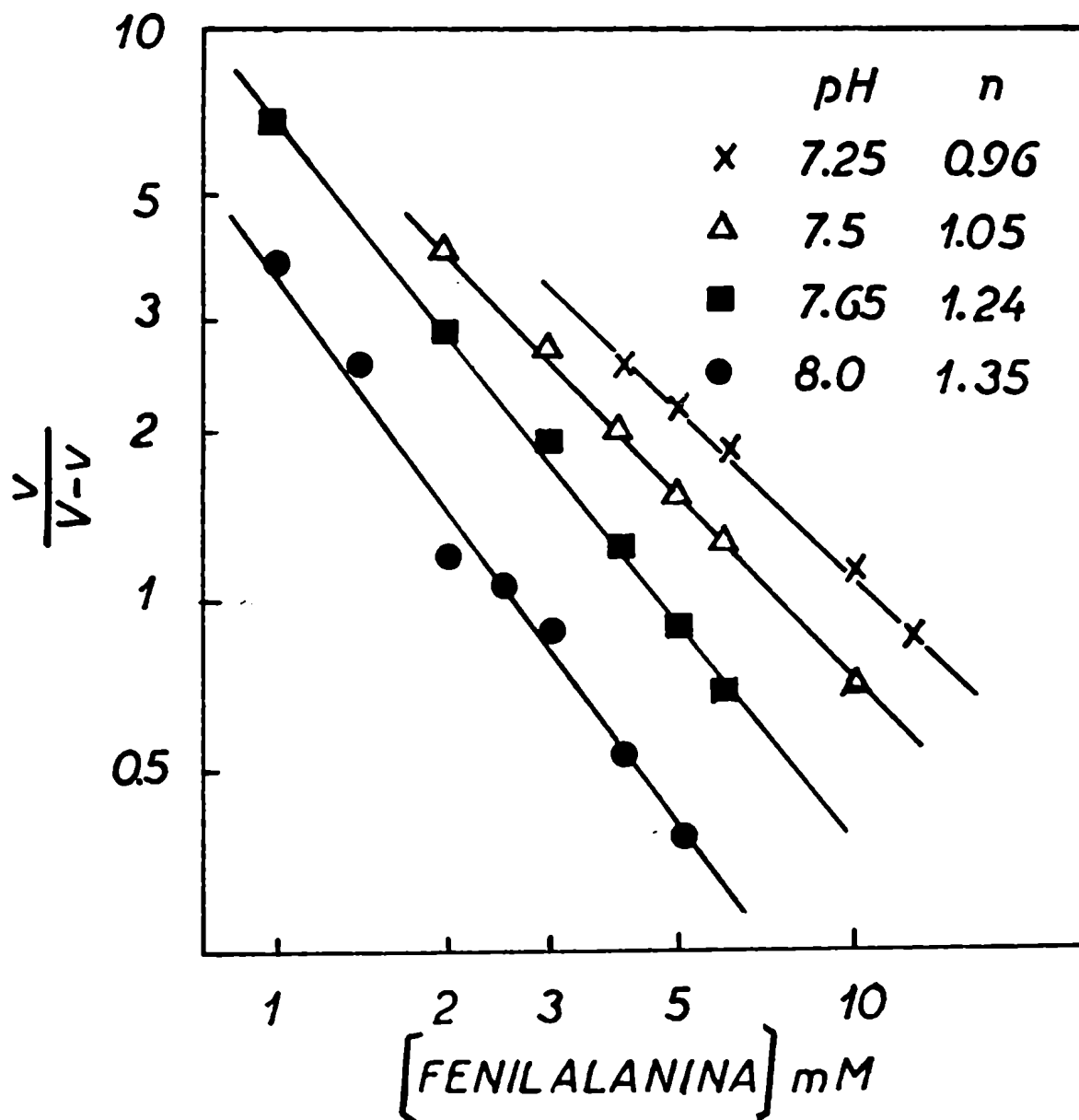


Fig. 35. Gráficos de la actividad de la enzima renaturalizada en función de la concentración de fenilalanina, a diferentes valores de pH. Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en la Fig. 25 excepto el pH que se varió como se indica en el gráfico.

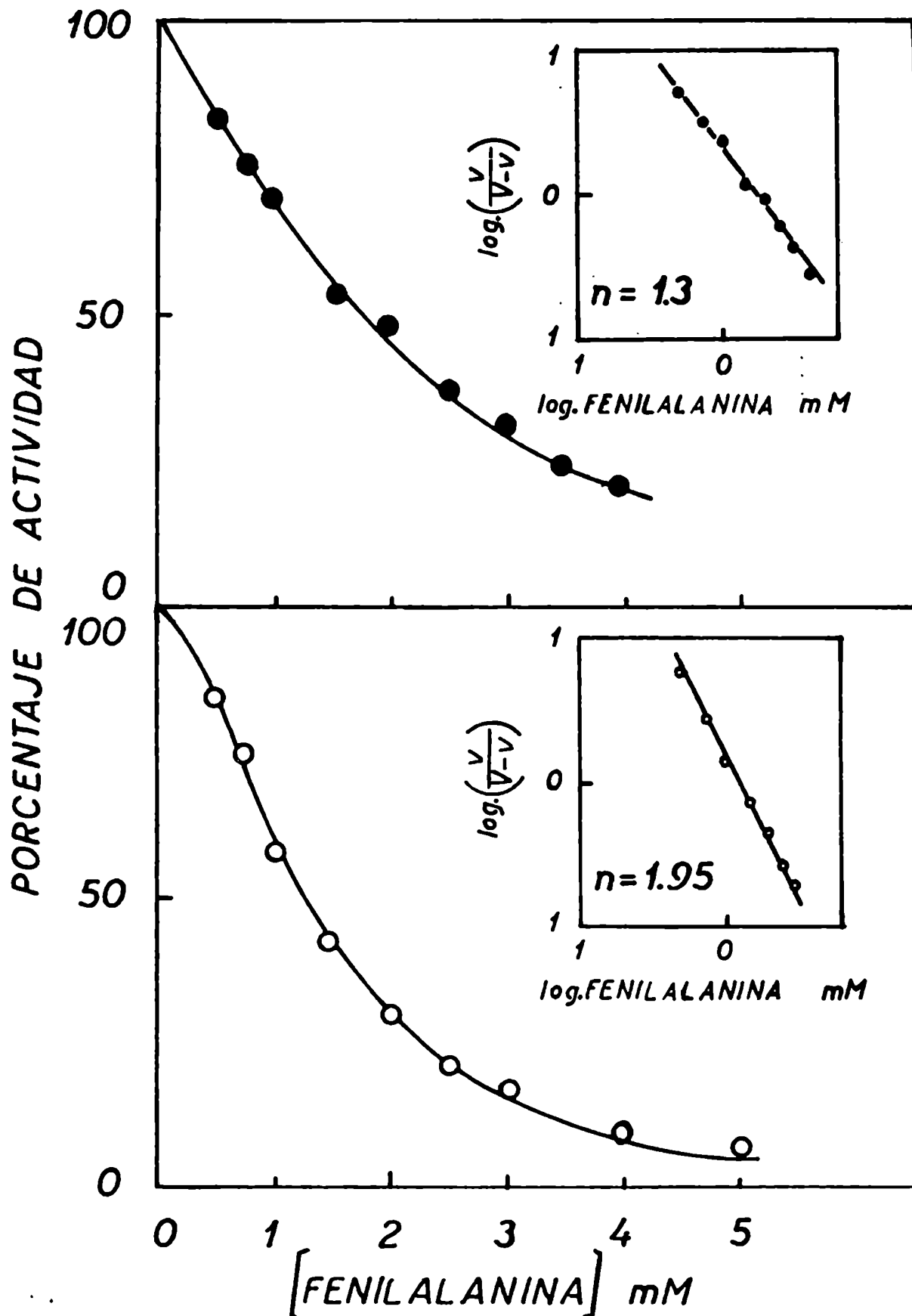


Fig. 36. Efecto de la fenilalanina sobre la actividad enzimática. La enzima diluida (0.04 mg/ml) fue dializada como se indicó en Métodos y se mantuvo a 4°C durante un día (—○—) ó 15 días (—●—). Las condiciones como en la Fig. 25 excepto que el pH fue 8.0.

te quince días a 4°C exhibe un efecto cooperativo marcadamente menor. Una curva de fenilalanina efectuada a los siete días de envejecimiento dió un coeficiente de Hill intermedio ($n_H = 1.45$).

IV DISCUSION

En el presente trabajo se estudiaron algunas propiedades cinéticas de las piruvato quinatas de dos tejidos cuyas características metabólicas difieren marcadamente: uno gluconeogénico, el hígado y otro predominantemente glucolítico, el músculo esquelético. Por razones de claridad desarrollaremos en forma separada la discusión de los resultados obtenidos con estas isoenzimas.

Piruvato Quinasa Tipo L de Hígado

Consideraciones Generales

La cinética de activación de la piruvato quinasa tipo L por los cationes puede considerarse de naturaleza alostérica. Los siguientes resultados experimentales favorecen esta interpretación:

a) A pH 7.5, se observó un marcado efecto cooperativo homotrópico cuando se varió la concentración de K^+ ó NH_4^+ .

b) A niveles saturantes de PEP o en presencia de FDP las curvas de saturación se transforman de sigmoides en hiperbólicas. Modificaciones de este tipo en la forma de las curvas de saturación, se consideran como una indicación de que la interacción entre los ligandos es indirecta o alostérica (178).

c) El efecto cooperativo de los cationes monovalentes varía marcadamente en función del pH. Así, a pH ácido, cuando las interacciones alostéricas del PEP y del FDP han desaparecido, la cinética de activación por K^+ es hiperbólica.

d) Los resultados cinéticos también sugieren que la interacción

del Mg^{++} con la enzima es alostérica ya que la curva sigmoide obtenida cuando se graficó la actividad de la enzima en función de la concentración de Mg^{++} , se transformó en una hipérbola en presencia de FDP o de niveles altos de PEP.

e) Una de las predicciones, común a la mayoría de los modelos propuestos para explicar la cinética de las enzimas alostéricas, es que las interacciones homotrópicas y heterotrópicas de los ligandos se producen a través de cambios conformacionales de la proteína. En el presente trabajo se observó que el K^+ y el Mg^{++} protegen a la enzima contra la inactivación producida por dos enzimas proteolíticas de especificidad diferente: la tripsina y la pronasa. Además, estos cationes estabilizan marcadamente la enzima a 30°C. Estos resultados sugieren que los cationes promueven un estado conformacional de la enzima más compacto. Por el contrario, el FDP parece llevar la proteína a una forma más desplegada, permitiendo una inactivación más rápida por las enzimas proteolíticas. Por otro lado, los sustratos no modifican la velocidad de proteólisis.

Se debe mencionar que estos resultados no permiten discriminar si el estado conformacional que la enzima adquiere en presencia de K^+ es igual o diferente al que adopta cuando se une al Mg^{++} ; ni tampoco permiten afirmar que el PEP (en ausencia de K^+) no induce cambios conformacionales, sino que mediante los métodos indirectos empleados, en el caso de que existieran, éstos no han sido detectados. A pesar de estas limitaciones se puede concluir que, en presencia de los cationes, el FDP y los sustratos, la enzima adquiere diferentes estados conformacionales.

La significación fisiológica de los iones monovalentes en la regulación de los procesos metabólicos no está aún aclarada. Resulta interesante el hecho que además de la piruvato quinasa, otras enzimas reguladoras como la glucoquinasa (179) y la fosfofructoquinasa (180) son sensi-

bles a variaciones en el medio iónico, especialmente a cambios en la concentración de K^+ .

Considerando la concentración de NH_4^+ determinada por Krebs (181) en el hígado (0.47μ Moles/g de tejido) parece improbable que este catión ejerza un efecto significativo sobre la actividad enzimática. Por otra parte, el nivel intracelular de K^+ es suficiente para producir la activación máxima de la enzima en el ensayo "in vitro". Sin embargo, se ha observado que una parte considerable del K^+ muscular se encuentra en forma unida (182). Si en el hígado existe una situación similar, cabe la posibilidad de que pequeñas fluctuaciones en el nivel de K^+ libre modulen la actividad de la enzima "in vivo". Otro aspecto de interés desde el punto de vista biológico, es que el K^+ aún a concentraciones saturantes no suprime las interacciones cooperativas del PEP y ATP con la enzima, permitiendo así que ésta continúe sensible a estas señales reguladoras.

Teorías Alostéricas

Varios modelos han sido propuestos para interpretar las propiedades cinéticas de las enzimas alostéricas. En el esquema propuesto por Monod, Wyman y Changeux (22) se postula que, en ausencia de ligandos, los oligómeros alostéricos se distribuyen en dos estados conformacionales, designados R_0 y T_0 , los cuales se encuentran en equilibrio; la relación entre ambos estados debe satisfacer la constante alostérica L . Además, se supone que las proteínas poliméricas son estructuras simétricas y que esta simetría se conserva cuando se produce una transición de un estado a otro. Por consiguiente, los cambios conformacionales que se producen en un protómero, son acompañados por cambios iguales en los otros, de manera que la transición es concertada, no existiendo estructuras híbridas (por ej. algunos protómeros en estado R y otros en estado T).

De acuerdo con este modelo, los efectos homotrópicos y heterotrópicos son debidos exclusivamente al desplazamiento del equilibrio espontáneo $R_0 \rightleftharpoons T_0$. Esta suposición implica que los efectos homotrópicos y heterotrópicos están íntimamente relacionados; por ej. una interacción heterotrópica positiva de un ligando debe ser acompañada invariablemente por la disminución del efecto cooperativo de otro ligando que favorece el mismo estado conformacional. Además como la transición es concertada, las constantes de disociación de los ligandos son iguales para todos los sitios homólogos en cada uno de los dos estados y sólo estarán relacionadas entre sí por factores estadísticos. Por esta razón, este modelo sólo predice efectos homotrópicos positivos.

El modelo original fue extendido por Rubin y Changeux (183) con nuevas predicciones derivadas del concepto de "unión no exclusiva" de los ligandos por uno u otro estado conformacional. Una de las características más interesantes de estos estudios es que predicen que cuando la cooperatividad del sustrato es máxima los efectos heterotrópicos de ligandos que no se unen exclusivamente a R_0 se pueden manifestar únicamente como variaciones de las afinidades aparentes, sin afectar los coeficientes de Hill.

El modelo desarrollado en el laboratorio de Koshland (184 - 187) se basa fundamentalmente en el concepto de "Induce fit", según el cual el cambio conformacional que es inducido en una proteína flexible depende de la estructura del ligando. Cuando la proteína constituye un monómero que está integrado en una estructura oligomérica, el cambio conformacional inducido por el ligando será transmitido a los protómeros vecinos (cuyos sitios no están ocupados) con diferentes grados de eficiencia, dependiendo de la intensidad de la interacción entre subunidades. Así cuando esta última es débil, el cambio conformacional en una subunidad estará muy poco acoplado a la conformación de los protómeros vecinos y la cinética seguirá la ley de Michaelis - Menten. Por el contrario, cuando el cambio con-

formacional inducido por un ligando se transmite a las subunidades vecinas, éstas pueden modificarse parcial o totalmente adquiriendo una configuración igual o diferente a la que adoptó el protómero que tiene el ligando unido. Cuando la modificación de la subunidad vecina, es sólo parcial, ésta puede aumentar o disminuir la afinidad por la siguiente molécula del ligando. Por esta razón este modelo predice efectos homotrópicos cooperativos positivos y negativos. En el caso que todas las subunidades adquirieran la misma conformación al unir ligando una de ellas (transición concertada), el modelo no difiere del propuesto por Monod, Wyman y Changeux (22) que por lo tanto constituye un caso límite del modelo de Koshland. Un aspecto de gran interés de éste modelo más flexible (ya que los cambios conformacionales de los protómeros son frecuentemente secuenciales más bien que concertados) es que no existe una relación obligatoria entre los efectos homotrópicos y heterotrópicos. Esta importante conclusión se puede ejemplificar de la siguiente manera: cuando un ligando induce un cambio conformacional que repercute levemente en las subunidades vecinas, la conducta cinética que se espera es Michaeliana, pero este ligando puede modificar la unión de otro ligando que se una a esa subunidad. De esta manera, un ligando que carece de efectos homotrópicos puede ejercer efectos heterotrópicos.

Atkinson y col. (172 - 188) han propuesto un importante modelo para explicar las propiedades cinéticas de las enzimas alostéricas, el cual también difiere significativamente de la teoría de Monod y col. y que se basa en la existencia de cambios progresivos de las interacciones entre los sitios de un ligando. Así, la unión de este último a un sitio de la proteína puede aumentar o disminuir la afinidad del ligando por un segundo sitio, el cual a su vez puede afectar la unión a un siguiente receptor. De esta manera las predicciones de este modelo se aproximan a las del modelo de Koshland, aunque el tratamiento matemático difiere en

ambos casos.

Se debe mencionar que cuando se comparan datos cinéticos experimentales con las predicciones teóricas derivadas de estos modelos se asume implícitamente que la suposición Michaeliana es válida.

Aplicación de las Teorías Alostéricas a los Datos Cinéticos Obtenidos con la Isoenzima L de Hígado.

De acuerdo al modelo de Monod y col. (22) la curva de saturación del sustrato proporciona información sobre la relación que existe entre ambos estados conformacionales propuestos, R_0 y T_0 . Así el hecho que la enzima exhiba efecto cooperativo para el sustrato a pH 7.5 significa que el estado conformacional T_0 es el que estadísticamente predomina. En esta condición el modelo predice que la curva de saturación para un activador alostérico debe ser sigmoide a bajas concentraciones del sustrato e hiperbólica a niveles altos de éste. Esta predicción se cumple para el caso del K^+ , en diferentes condiciones experimentales (Fig. 3 - 10). Además la adición de un activador alostérico a concentraciones saturantes debe abolir las interacciones homotrópicas de otro efector positivo ya que ambos promueven la misma transición alostérica. El efecto heterotrópico del FDP sobre la cooperatividad del K^+ , cumple con esta predicción del modelo (Fig. 3 - 10). La influencia del pH sobre la conducta alostérica de la enzima se interpretó asumiendo que el valor de la constante alostérica L , varía en función del pH (140, 144). A pH ácido, el estado R_0 es el predominante; por lo tanto se debe esperar que en estas condiciones la curva de saturación de K^+ siga la ley de Michaelis - Menten, lo cual se cumple experimentalmente (Fig. 10A). Por el contrario, cuando se aumenta el pH, se observa un marcado incremento de la cooperatividad del PEP. El modelo predice un aumento paralelo del efecto cooperativo homotrópico del

K^+ , ya que la cinética de activación también refleja el fenómeno de la transición alostérica $R_o \rightleftharpoons T_o$. El experimento de la Fig. 10 revela que esta predicción no se cumple. Además, otras discrepancias con esta teoría fueron observadas cuando se estudió el efecto heterotrópico del K^+ sobre las interacciones homotrópicas del sustrato (PEP) y del inhibidor (ATP). Según el modelo, el efecto cooperativo del K^+ constituye la expresión cinética de la transición $R_o \rightleftharpoons T_o$; por lo tanto se debe esperar que a medida que se aumenta el nivel de K^+ , disminuya el efecto cooperativo del sustrato y aumente el correspondiente al inhibidor. Ninguno de estos efectos heterotrópicos fue observado, como se puede apreciar en los experimentos presentados en las Fig. 12 - 15. Además si el Mg^{++} también induce una transición $R_o \rightleftharpoons T_o$, se deberá esperar que cuando se disminuye su nivel en el ensayo, permita la expresión del efecto cooperativo del K^+ . El experimento de la Fig. 11 también indica que esta predicción no se cumple. Las discrepancias cinéticas observadas sugieren que la activación por K^+ no sigue el modelo concertado de transiciones alostéricas.

Como dijimos anteriormente, el modelo de Monod y col. predice que a concentraciones saturantes del sustrato (para el cual la enzima exhibe efecto cooperativo homotrópico) y de los efectores alostéricos positivos se estabiliza el estado conformacional R. Las pruebas conformacionales efectuadas sugieren que esta predicción tampoco se cumple, ya que los cationes activadores, el FDP y los sustratos parecen estabilizar esta dos conformacionales diferentes. Además resulta de interés mencionar que la unión no exclusiva de estos efectores a los estados conformacionales R_o y T_o determinarían diferentes grados de estabilización del estado R; es decir, que los efectos que se esperan serían similares aunque con diferencias cuantitativas. Sin embargo, los datos indican que mientras el FDP acelera la inactivación por pronasa o tripsina los cationes activadores ejercen el efecto opuesto.

Considerando que el K^+ es un requerimiento absoluto para la reacción (aumenta la velocidad máxima), la piruvato quinasa se podría clasificar como un sistema V (22); sin embargo, en los sistemas V, el sustrato no exhibe efecto cooperativo, a diferencia de lo que ocurre en el caso de la isoenzima L de hígado. Es decir, que el comportamiento cinético de esta enzima parecería ajustarse en muchos aspectos a un sistema tipo K y en otros a un sistema tipo V. Por consiguiente la cinética de esta enzima, se ajusta más bien a un sistema mixto, donde aparecen ambos tipos de efectos. Con el fin de explicar los resultados cinéticos y de estabilidad presentados aquí, se puede sugerir que la enzima experimenta transiciones alostéricas de dos tipos: a) una que capacita catalíticamente a la enzima (influencia sobre V) y b) otra que afecta principalmente la afinidad de la enzima por el sustrato. Así la unión del K^+ produce una transición alostérica relacionada con el punto a), mientras que el FDP induce un cambio conformacional relacionado al punto b). El efecto cooperativo del PEP constituye la expresión cinética del efecto b) entre las moléculas del sustrato; éste no tiene capacidad de inducir la transición que capacita catalíticamente a la enzima (en ausencia de K^+ la enzima es inactiva). Este esquema que implica múltiples formas de la enzima, también permite interpretar los datos de estabilidad; en efecto se puede considerar que cuando la enzima experimenta la transición relacionada a la actividad catalítica adquiere una forma compacta mientras que la transición que se produce en presencia de FDP, se detecta como un aumento de la inactivación por proteasas. Aunque los resultados son aún insuficientes para presentar un modelo molecular detallado de esta enzima, los datos más bien favorecen un modelo flexible donde el estado conformacional final resulta de la interacción complementaria entre el ligando y la proteína y en el cual las interacciones homotrópicas y heterotrópicas no estén rigidamente relacionadas como predice el modelo propuesto por Koshland (ver sección Teo -

rías Alostéricas)

Piruvato Quinasa de Músculo

Consideraciones Generales

Los resultados indican que la inhibición por fenilalanina de la piruvato quinasa de músculo es de naturaleza alostérica. Esta conclusión es particularmente interesante ya que los estudios cinéticos que se habían efectuado previamente no habían sugerido que esta proteína era capaz de mediar interacciones indirectas. En apoyo de esta hipótesis se pueden considerar los siguientes resultados experimentales:

a) La enzima exhibe efecto cooperativo homotrópico con respecto a la fenilalanina. Por el contrario, la curva de inhibición para el 2-PGA, un efector isostérico, es hiperbólica.

b) El tipo de inhibición producido por la fenilalanina con respecto al PEP es mixto, mientras que el 2-PGA produce una inhibición de tipo puramente competitivo.

c) La evidencia más decisiva en el sentido que el sitio inhibitorio está topográficamente separado del sitio activo proviene de lo siguiente (1) : si se supone que el inhibidor y el sustrato se unen al mismo sitio, excluyéndose mutuamente, todo compuesto que compite con el inhibidor por su sitio, debería competir asimismo, con el sustrato; o sea debería comportarse como un inhibidor competitivo de la enzima. Si por el contrario, se considera que los sitios del inhibidor y del sustrato son diferentes, se puede esperar que algunos compuestos desplacen al efector negativo de su sitio, no actuando como inhibidores competitivos. El efecto de la alanina, serina y cisteína se puede encuadrar dentro de esta

última alternativa. En efecto, estos compuestos revierten la inhibición producida por fenilalanina pero no modifican la actividad enzimática en ausencia de este inhibidor. Contrariamente a lo observado con el efector alostérico, cuando la actividad enzimática es disminuida por un inhibidor que excluye al sustrato del sitio activo, como el 2-PGA, los aminoácidos reactivantes no ejercen ningún efecto.

d) La inhibición y el grado de interacción entre los sitios depende marcadamente del pH del medio de incubación mientras que el efecto ejercido por el inhibidor isostérico es independiente del pH. Desde la observación inicial efectuada con la hemoglobina, se vió que las propiedades alostéricas de un considerable número de enzimas depende del pH del medio de incubación, incluyendo la piruvato quinasa tipo L de hígado como se demostró previamente (189 - 195).

En algunos casos se pudo comprobar claramente que la influencia del pH está relacionada a la estructura cuaternaria de la proteína. Así, en el caso de la hemoglobina, el efecto Bohr se observa con el tetrámero pero no con la mioglobina ni con las subunidades aisladas. En el caso de la aspárticotranscarbamilasa, el efecto del pH sobre las propiedades cinéticas de la enzima se observa unicamente cuando el estado oligomérico nativo es conservado (189, 195).

Mediante diferentes procedimientos, se demostró que la piruvato quinasa de músculo experimenta cambios conformacionales cuando se varía el pH de la solución enzimática. Así, por ejemplo, la velocidad de sedimentación aumenta cuando se disminuye el pH de la solución enzimática de 7.8 a 7.0 (113). Resulta interesante especular con la posibilidad de que la marcada variación del efecto cooperativo de la fenilalanina con el pH constituya una expresión cinética de los cambios conformacionales detectados en esta enzima.

e) Una de las características de las enzimas alostéricas es que las interacciones homotrópicas y heterotrópicas son propiedades lábiles que pueden perderse cuando se altera la integridad del estado nativo de la proteína (1, 22). En estas condiciones la actividad enzimática no se modifica o sólo lo hace parcialmente, ya que ésta depende de la integridad del sitio activo.

En el caso de la piruvato quinasa de músculo, el efecto cooperativo homotrópico del inhibidor, fue marcadamente disminuido en las siguientes condiciones: a) cuando la curva de inhibición se efectuó a valores de pH inferiores a 7.3. b) mediante la disociación de la proteína en subunidades y posterior renaturalización. c) cuando la enzima se mantuvo diluida a 4°C, durante algunas semanas. En otros sistemas alostéricos, como en la fosforilasa b, algunos tratamientos también suprimen los efectos cooperativos pero no modifican las interacciones heterotrópicas (196).

Los experimentos efectuados no permiten identificar los cambios físicos o químicos que producen estos tratamientos. El efecto de la disociación y renaturalización puede deberse a la modificación del plegamiento y de la estructura cuaternaria de la enzima. En efecto ciertas características del fenómeno de renaturalización "in vitro" difieren marcadamente de aquellas que prevalecen "in vivo". Así, la temperatura fue 16°C ya que en estas condiciones se obtiene la máxima recuperación; sin embargo, con este sistema de renaturalización no se consigue obtener enzima activa a 37°C, la temperatura fisiológica (se debe mencionar que el oligómero nativo experimenta cambios conformacionales cuando se varía la temperatura (113)). A 16 °C el proceso de plegamiento y asociación de las subunidades es lento, requiriendo aproximadamente seis horas para alcanzar el plateau y además, no se logra recuperar el 100% de la actividad. Por otra parte, el fenómeno de plegamiento "in vivo" es polarizado, produciéndose a medida que crece la cadena polipeptídica, a partir del residuo amino terminal.

La situación "in vitro" es distinta ya que pueden operar diferentes núcleos de plegamiento determinando conformaciones finales que difieren de las que se producen fisiológicamente (197).

Además, en algunos casos se demostró que la recuperación de enzima activa, sólo se logra cuando en el curso de la renaturalización están presentes los sustratos o cofactores de la reacción. Este hecho se interpretó considerando que las subunidades disociadas y desplegadas, recuperan su estructura terciaria y cuaternaria sólo en presencia de metabolitos que estabilizan una conformación apropiada (198, 199). Por lo tanto, aunque en general se considera que la estructura primaria de una proteína, determina la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria (200) es posible que, en ciertas condiciones experimentales no se logre recuperar exactamente la estructura nativa después del proceso de renaturalización. El efecto de alguno de los factores mencionados o bien el conjunto, pueden probablemente explicar el fenómeno de desensibilización de la piruvato quinasa de músculo por disociación y renaturalización.

La significación fisiológica del efecto inhibitorio de la fenilalanina no se conoce aún. Recientemente, Jensen (201) observó una serie de efectos de inhibidores y activadores alostéricos sobre enzimas reguladoras bacterianas que le sugirieron que además de los circuitos de control simples (como la retroinhibición o la activación por precursor) existen efectos cuya significación fisiológica parece menos evidente pero que formarían parte de una super estructura reguladora cuya finalidad es interconectar diferentes vías metabólicas. La inhibición por fenilalanina de la piruvato quinasa puede considerarse un ejemplo de este tipo de fenómeno de control en tejidos de mamíferos. Sin embargo, considerando las concentraciones necesarias para producir inhibición de la actividad de la enzima de músculo parece difícil que este efecto constituya un mecanismo

regulador de importancia en este tejido. Se debe mencionar que la isoenzima M de hígado es inhibida por bajas concentraciones de fenilalanina (144, 153). Resulta de interés destacar que el efecto de la fenilalanina, la alanina y otros aminoácidos ha constituido el criterio principal para caracterizar isoenzimas de piruvato quinasa que no se diferencian inmunológicamente entre sí.

Aplicación de las Teorías Alostéricas a los Datos Cinéticos Obtenidos con la Isoenzima M de Músculo.

De acuerdo al modelo propuesto por Monod y col. (22), la ausencia de efecto cooperativo del sustrato indica que predomina el estado conformacional R; en este caso el efecto heterotrópico del inhibidor se interpreta como debido al desplazamiento del equilibrio $R \rightleftharpoons T$ hacia T, el estado conformacional con menor afinidad por el sustrato. El efecto de la fenilalanina puede interpretarse de este modo ya que en presencia de este efector aumenta marcadamente la K_m aparente de la enzima por el PEP.

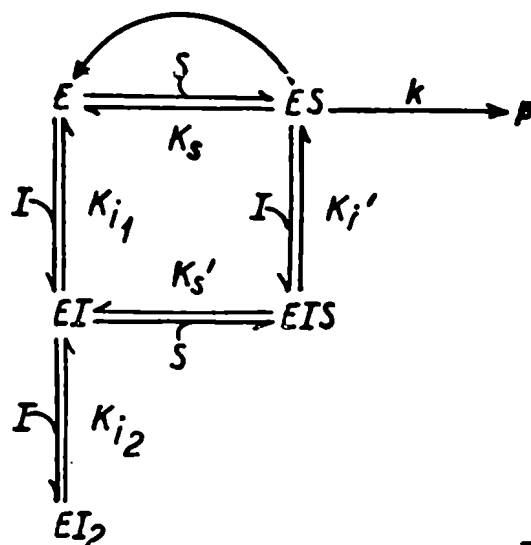
Sin embargo una predicción importante de este modelo es que la enzima debe exhibir efecto cooperativo homotrópico, cuando la curva de saturación del sustrato se efectúa en presencia del inhibidor. Claramente, el experimento mostrado en la Fig. 21 demuestra que esta predicción no se cumple. Además, a pH 7.0 se observó que la curva de saturación del inhibidor exhibe cooperatividad negativa, considerando el valor de la pendiente del gráfico de Hill obtenida. Anteriormente (en sección Teorías Alostéricas) se había puntualizado que el efecto cooperativo negativo no puede explicarse en términos del modelo concertado.

En base a que únicamente se obtuvo efecto cooperativo para el inhibidor, podría argumentarse que el comportamiento cinético de la enzima se ajusta más bien a un sistema V, en el cual ambos estados conforma -

cionales difieren en su actividad catalítica. En este caso, el modelo predice que el efector negativo debe producir una inhibición de tipo pura mente no competitivo (202). El experimento de la Fig. 21 claramente de - muestra que la piruvato quinasa de músculo no cumple con esta predicción de los sistemas V. Por consiguiente se puede concluir que los resultados cinéticos obtenidos con esta enzima no pueden interpretarse en base al mo delo de Monod y col. (22).

Modelo Propuesto para la Piruvato Quinasa de Músculo

En el esquema I se ilustra un mecanismo de reacción que está de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos con la piruvato quina sa de músculo:



donde, E, S e I representan la enzima, el PEP y la fenilalanina respectivamente; K_{i1} , K_{i2} y $K_{i'}$ representan las constantes de disociación para las reacciones de I con E, EI y ES respectivamente; K_s y $K_{s'}$ representan las constantes de disociación de S con E y EI respectivamente. Con el fin de simplificar la deducción de las ecuaciones cinéticas, se consideró que la enzima cataliza una reacción en la que interviene un solo sustrato (que representa el PEP, como se indicó).

El esquema I es formalmente consistente con un modelo en el cual la unión del inhibidor a un sitio alostérico específico, induce un cambio conformacional que:

a) altera el poder catalítico de la enzima; se considera que el complejo EIS no da producto

b) facilita la unión de una segunda molécula del inhibidor al sitio activo de la enzima.

El punto a) corresponde al efecto de un inhibidor no competitivo actuando sobre una enzima flexible, como fue discutido por Koshland (186). La suposición b) se basa en parte en que la piruvato quinasa de músculo dispone de un sitio catalítico marcadamente flexible capaz de catalizar distintas reacciones con sustratos que difieren marcadamente entre sí (ver Introducción). Además resulta interesante mencionar, que el control alostérico de la especificidad de un sitio activo fue elegantemente demostrado por Brown y Reichard (203) en el caso de la ribonucleósido-difosfatoreductasa.

El esquema I es también consistente con un modelo en el cual ambos sitios inhibitorios son específicos. En este caso es necesario suponer que los complejos EIS y EI₂ han adquirido una conformación que impide la unión de otra molécula de I ó S respectivamente (es decir, que las correspondientes constantes de disociación tienen un valor suficientemente alto como para que el complejo EI₂S no alcance una concentración significativa).

Suponiendo que las especies moleculares consideradas en el esquema I se encuentran en un equilibrio rápido entre sí siendo la etapa limitante de la actividad catalítica la formación de producto, la ecuación de velocidad inicial se puede expresar como:

$$v = \frac{V \cdot \frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_1}} \right) + \frac{[I]}{K_{i_1}} \left(1 + \frac{[I]}{K_{i_2}} \right)} \quad (1)$$

donde $V = k$. Et (ver apéndice).

Las curvas teóricas que predice la ecuación 1 cuando se hace variar S (Fig. 37), son cualitativamente similares a las experimentales (Fig. 21); a medida que aumenta la concentración del inhibidor, disminuyen la afinidad aparente y la V en ambos casos. Además, cuando se hizo variar I en la ecuación (1) se obtuvieron curvas sigmoides, cuyos coeficientes de Hill fueron independientes del nivel de S (Fig. 38); a mayores concentraciones de éste, las curvas se desplazan a la derecha (aumenta el $I_{0.5}$). Estas curvas son similares a las mostradas experimentalmente en la Fig. 24. De esta manera, el modelo permite explicar el efecto cooperativo del inhibidor y las interacciones entre las afinidades aparentes del ligando alostérico y del sustrato, aún cuando este último no exhibe efecto cooperativo.

El efecto de los compuestos que revierten la inhibición se puede interpretar considerando que éstos se unen al sitio alostérico, compitiendo con el inhibidor pero no induciendo cambios conformacionales que afecten la actividad catalítica y la afinidad por el sustrato. De esta manera, el estado conformacional final que adquiere la proteína al unirse un ligando a un determinado sitio, depende de la estructura del compuesto que se una; ésta es una suposición importante del modelo de Koshland.

Incorporando al esquema I las especies moleculares que tienen unido el reactivador, se tiene:

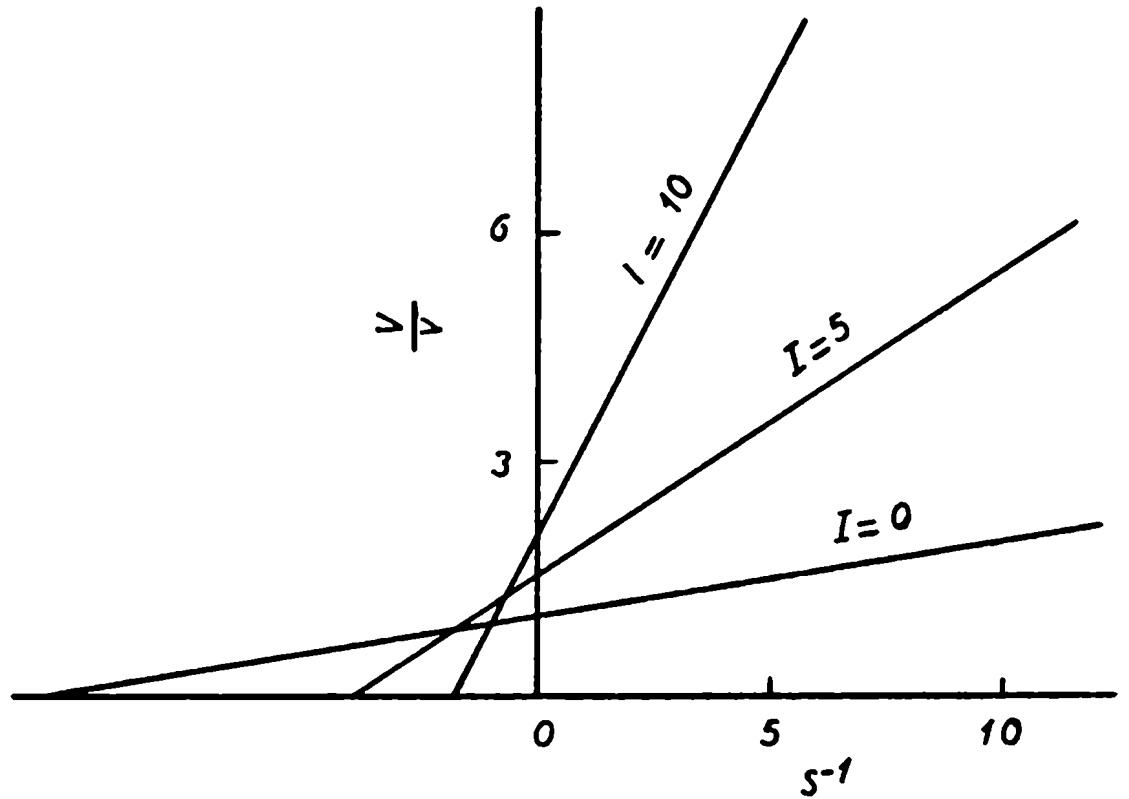


Fig. 37. Gráficos teóricos obtenidos utilizando la ecuación (1); se consideró que $K_s = K_s'$ y que $Ki_1 = Ki_1' = 10$ y $Ki_2 = 1$.

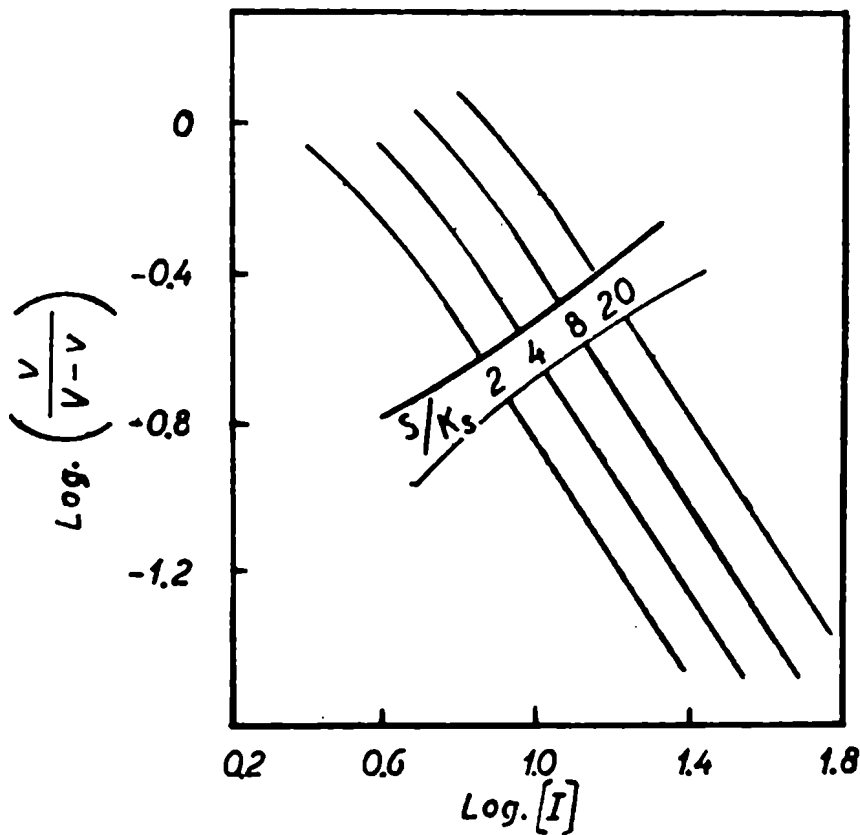
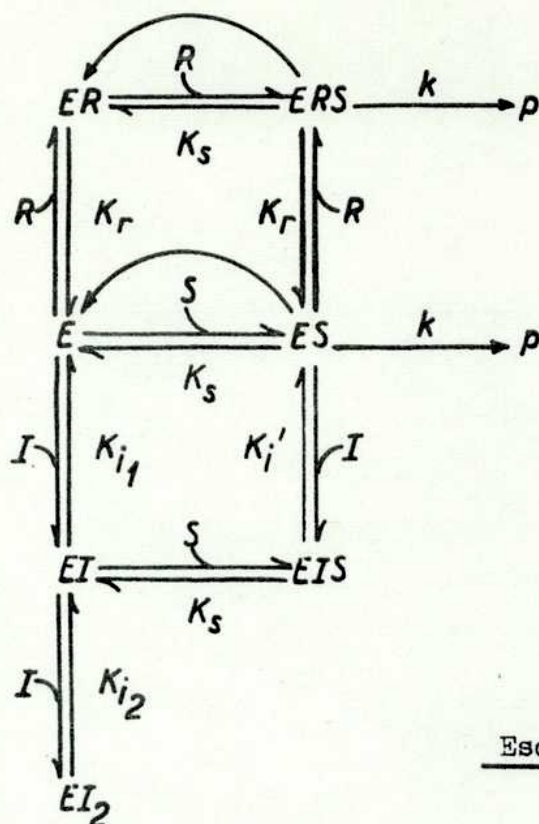


Fig. 38. Gráficos de Hill obtenidos utilizando la ecuación (1). Los valores asignados a las constantes fueron similares a los detallados en la Fig. 37.



donde K_r representa la constante de disociación para las reacciones de R (compuesto reactivador) con E y ES (el significado de las otras especies es similar al del esquema I). La ecuación de velocidad (ver apéndice), se puede expresar como:

$$v = \frac{v \left(\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S][R]}{K_s K_r} \right)}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[R]}{K_r} + \frac{[S][R]}{K_s K_r} + \frac{[S][I]}{K_s K_{i1}} + \frac{[I]}{K_{i1}} + \frac{[I]^2}{K_{i1} K_{i2}}} \quad (2)$$

En ausencia del inhibidor la ecuación se transforma en:

$$v = \frac{v \left(\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S][R]}{K_s K_r} \right)}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[R]}{K_r} + \frac{[R][S]}{K_r K_s}} = \frac{v \frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[R]}{K_r} \right)}{1 + \frac{[R]}{K_r} + \frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[R]}{K_r} \right)} = \frac{v [S]}{K_s + [S]}$$

que reordenándola se reduce a la clásica ecuación de Michaelis-Menten. Por lo tanto, el modelo predice que en ausencia del inhibidor, los compuestos reactivantes no modifican la cinética enzimática; esta predicción se cumple en la Tabla VI y también en la curva control mostrada en la Fig. 30.

Las curvas calculadas haciendo variar I en la ecuación (2) son sigmoides; asignando diferentes valores a $\frac{R}{K_r}$, la cooperatividad de las curvas no se modifica, pero aumenta marcadamente el $I_{0.5}$ (Fig. 39). Así, el modelo puede explicar el efecto de los aminoácidos reactivantes, que se habían mostrado en la Fig. 25.

En otras enzimas alostéricas se observa frecuentemente, que las curvas de saturación de un activador en presencia de niveles elevados de un inhibidor alostérico son sigmoides (22). En cambio las curvas obtenidas cuando se varió la alanina en presencia de fenilalanina fueron de tipo hiperbólico. El modelo propuesto permite interpretar esta cinética. Así cuando se hace variar $\frac{R}{K_r}$ en la ecuación (2), a un nivel fijo de I , se obtiene una curva teórica de reactivación marcadamente similar a la contenida experimentalmente (Fig. 40). Además se puede demostrar que R no modifica la inhibición producida por un inhibidor isostérico. En efecto, incorporando las especies EIC y EICR que representan los complejos de la enzima con el inhibidor competitivo (IC) y de la enzima con inhibidor competitivo y reactivador, se calculó la curva correspondiente de la Fig. 40.

Como dijimos anteriormente, se ha comprobado en forma experimental que la enzima adquiere diferentes estados conformacionales cuando se varía el pH; si se supone que el ligando alostérico induce un cambio conformacional que depende de la configuración de la proteína (una suposición frecuente en las interpretaciones cinéticas de Koshland, por ejem -

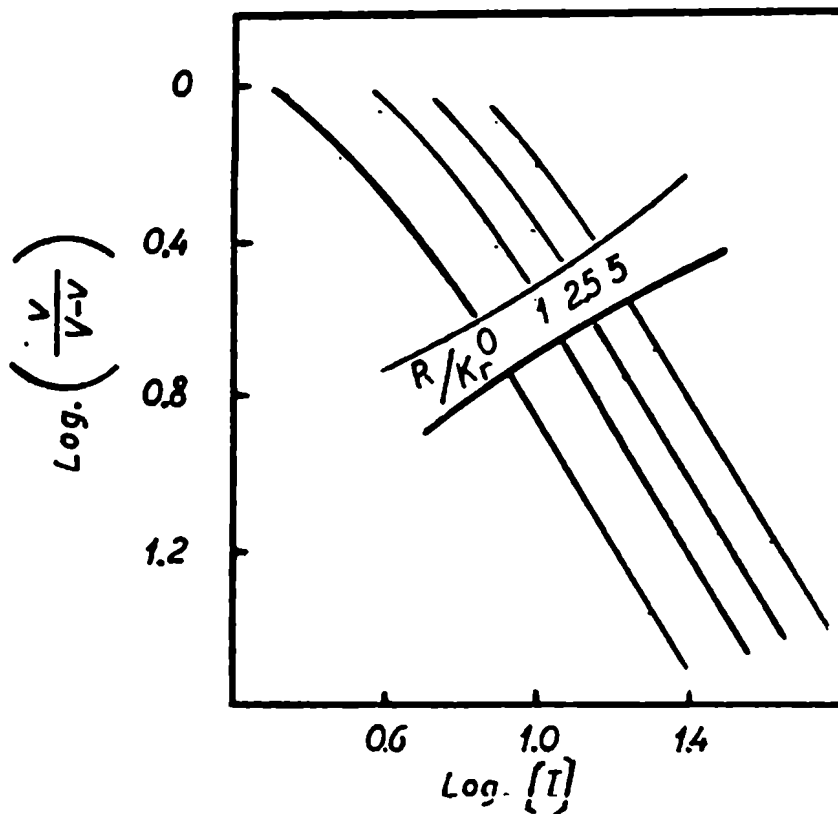


Fig. 39. Gráficos de Hill obtenidos utilizando la ecuación (2). Los valores asignados a las constantes fueron similares a los detallados en la Fig. 37.

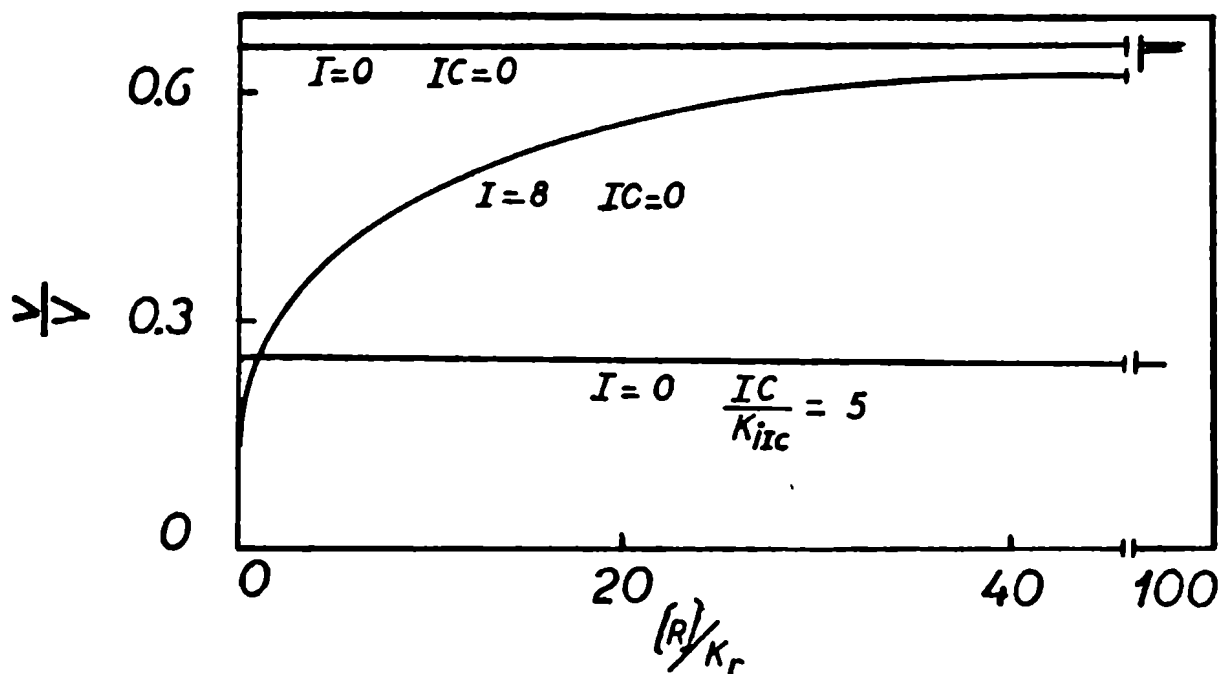


Fig. 40. Curvas teóricas de reversión en ausencia o presencia del inhibidor alostérico o isostérico. Los cálculos se efectuaron utilizando la ecuación (2) del modelo; los valores de las constantes fueron iguales a los de la Fig. 37.

plo, véase ref. 204) el modelo también permite interpretar el efecto del pH sobre el efecto cooperativo homotrópico de la fenilalanina. En otras palabras, la suposición consiste en que al unirse el inhibidor al sitio alostérico específico puede facilitar, no modificar o entorpecer la unión de la siguiente molécula al centro activo de la enzima, dependiendo este efecto del estado conformacional estabilizado por el pH. En efecto asignando diferentes valores al grado de interacción entre los sitios del efector negativo se puede obtener una familia de curvas cuyos coeficientes de Hill aumentan a medida que se incrementa el pH, como fue obtenido experimentalmente (Fig. 32).

Se debe puntualizar que el acuerdo cualitativo entre las predicciones teóricas y los resultados experimentales no constituye una prueba de la corrección del modelo. Así, el hecho que la segunda molécula de inhibidor se una al sitio activo no parece probable a primera vista ya que no existe una analogía estructural evidente entre el PEP y el inhibidor. Sin embargo, esta suposición se efectuó porque el sitio activo de la piruvato quinasa muscular es considerablemente flexible, pudiendo catalizar, en presencia de HCO_3^- , reacciones en las que intervienen sustratos marcadamente diferentes al PEP como el fluoruro y la hidroxilamina; los tres sustratos mencionados aparentemente se unen a un subsitio común del sitio activo. Además, esta suposición, permite formular un modelo considerando solamente un sitio alostérico y un sitio activo. Otras suposiciones, como que $K_i' = K_{i_1}$ y $K_s = K_s'$ son arbitrarias, pero no existiendo ninguna base para asignarle valores reales se supuso la igualdad. A pesar de estas limitaciones resulta particularmente interesante el hecho que un modelo relativamente simple como el propuesto y ecuaciones deducidas en base a suposiciones Michaelianas, permiten predecir cualitativamente todos los resultados cinéticos obtenidos mientras que éstos no pueden interpretarse en base al modelo propuesto por Monod, Wyman y

Changeux (22) para explicar los sistemas alostéricos K y V.

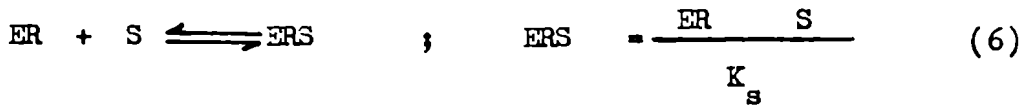
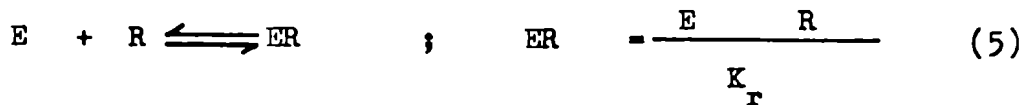
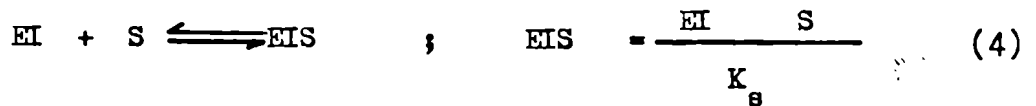
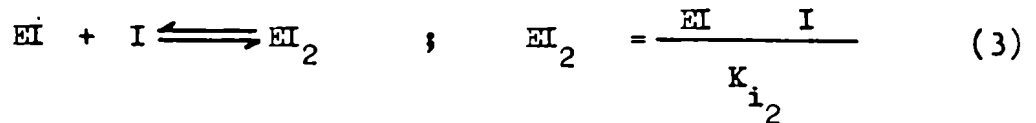
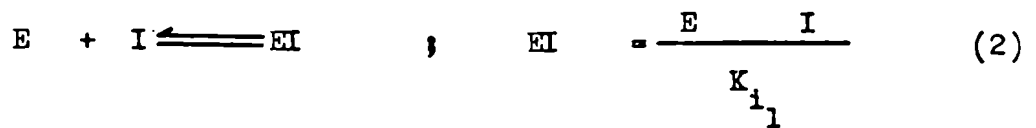
Como se había mencionado previamente, la piruvato quinasa de músculo está formada por cuatro subunidades pero sólo se ha demostrado que se unen dos moles de PEP ó Mn^{++} por mol de enzima; este hecho sugiere que la enzima tiene dos sitios activos y que un par de subunidades dan lugar a un protómero (119). Así, la enzima podría considerarse como un oligómero formado por dos protómeros, cada uno de los cuales se puede resolver en dos subunidades. En base a los máximos coeficientes de Hill obtenidos para la fenilalanina se puede sugerir que existen dos sitios interactuantes para el efector negativo. Si esta estimación es correcta podría concluirse que cada protómero de la enzima dispone de un centro catalítico y de un sitio para el inhibidor. Considerando el modelo cinético propuesto se puede especular con la posibilidad de que la interacción alostérica se produce entre las subunidades que forman cada protómero, mientras que la relación interprotomérica es de menor significación en la expresión cinética de los efectos alostéricos.

Se debe puntualizar que los datos cinéticos no son suficientes para dilucidar completamente los mecanismos de reacción. Evidentemente, será necesaria mayor información experimental antes de aceptar la hipótesis propuesta. Sería de particular interés realizar estudios termodinámicos como los efectuados por Changeux y col. (205) con la aspartato-transcarbamilasa, los cuales permitirían conocer con exactitud, el número de sitios para cada ligando como así también determinar las curvas de saturación sin las suposiciones inherentes a los estudios cinéticos.

APENDICE

Deducción de la Ecuación General del Modelo Propuesto
para la Piruvato Quinasa de Músculo

En presencia de I (inhibidor alostérico), IC (inhibidor isostérico) y R (compuesto reactivante) se tendrán los siguientes equilibrios que permiten calcular la concentración de cada especie molecular de la enzima:



considerando que $K_s = K'_s$ en la ecuación (4).

La ecuación de conservación se puede expresar como:

$$E_t = E + ES + EI + EI_2 + EIS + ER + ERS + EIC + ERIC \quad (9)$$

donde E_t representa la concentración total de enzima.

La ecuación de velocidad inicial es:

$$v = k \left(ES + ERS \right) \quad (10)$$

donde k es la correspondiente constante de velocidad.

Utilizando las ecuaciones (1) a (9) se puede reemplazar en la (10), obteniéndose la ecuación de velocidad:

$$v = \frac{v \cdot \left(\frac{S}{K_s} + \frac{S \cdot R}{K_s K_r} \right)}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{I}{K_{i_1}} + \frac{I^2}{K_{i_1} K_{i_2}} + \frac{I \cdot S}{K_{i_1} K_s} + \frac{R}{K_r} + \frac{R \cdot S}{K_r K_s} + \frac{IC}{K_{ic}} + \frac{R \cdot IC}{K_r K_{ic}}} \quad (11)$$

a partir de la cual se obtuvieron las ecuaciones para calcular las curvas teóricas.

En ausencia del IC (inhibidor competitivo), la ecuación (11) se reduce a:

$$v = \frac{v \cdot \left(\frac{S}{K_s} + \frac{S \cdot R}{K_s K_r} \right)}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{I}{K_{i_1}} + \frac{I^2}{K_{i_1} K_{i_2}} + \frac{I \cdot S}{K_{i_1} K_s} + \frac{R}{K_r} + \frac{R \cdot S}{K_r K_s}} \quad (12)$$

que fue la ecuación utilizada para el cálculo de las Fig. 39 y 40.

En ausencia de IC y R, se tiene:

$$v = \frac{V S K_s^{-1}}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{I}{K_{i_1}} + \frac{I^2}{K_{i_1} K_{i_2}} + \frac{I \cdot S}{K_{i_1} S}} \quad (13).$$

que fue la ecuación utilizada para el cálculo de las Fig. 37 y 38. Como se vió en el texto, en ausencia de I la ecuación (13) se transforma en la clásica ley de Michaelis-Menten.

Los gráficos de Hill se calcularon en base a la identidad:

$$\frac{v}{V - v} = \frac{\frac{v}{V}}{1 - \frac{v}{V}}$$

BIBLIOGRAFIA

- 1) Monod, J., Changeux, J.P., and Jacob, J. J. Mol Biol. 6, 306 (1963)
- 2) Monod, J. and Jacob, F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 389 (1961).
- 3) Jacob, J. and Monod, J. J. Mol. Biol. 3, 318 (1961).
- 4) Holzer, H. Advan. Enzymol. 32, 297 (1969)
- 5) Leloir, L.F. Proc. Sixth Pan American Congr. Endocrinol. México, Excerpta Med., 65 (1965).
- 6) Karpatkin, S. J. Biol. Chem. 242, 3525 (1967)
- 7) Copley, M., Fromm, H. J. Biochemistry 6, 3503 (1967)
- 8) Rose, I.A., Warms, J.V. J. Biol. Chem. 242, 1635 (1967)
- 9) Umbarger, H.E. Science 123, 848 (1956)
- 10) Yates, R.A. and Pardee, A.B. J. Biol. Chem. 221, 757 (1956)
- 11) Atkinson, D.E. Ann. Rev. Biochem. 35, 85 (1966).
- 12) Umbarger, H.E. Ann. Rev. Biochem. 38, 323 (1969)
- 13) Sanwal, B.D. Bact. Rev. 34, 20 (1970)
- 14) Davis, B.D. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 1 (1961)
- 15) Leloir, L.F., Olavarría, J.M., Goldemberg, S.H. and Carminatti, H.C. Arch. Biochem. Biophys. 81, 508 (1959)
- 16) Leloir, L.F. and Goldemberg, S.H. J. Biol. Chem. 235, 919 (1960)
- 17) Gerhart, J.C. and Pardee, A.B. Fed. Proc. 20, 224 (1961)
- 18) Gerhart, J.C. and Pardee, A.B. J. Biol. Chem. 237, 891 (1962)
- 19) Changeux, J.P. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 313 (1961)
- 20) Schachman, H. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 408 (1963)
- 21) Brookhaven Symposium (1964) Subunit Structure of Proteins, N° 17.
- 22) Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J.P. J. Mol. Biol. 12, 88 (1965)
- 23) Axelrod, B. en Metabolic Pathways, editado por D.H. Greenberg, I, 112 (1967).

- 24) Boyer, P.D., Lardy, H.A. and Myrback, K. (eds.). The Enzymes 2nd ed. Vols. 4-7 Academic Press, New York (1960 - 1963).
- 25) Wood, W.A. Ann. Rev. Biochem. 35, 321 (1966).
- 26) Caputto, R. Barra, H.S. and Cumar, F.A. Ann. Rev. Biochem. 36, 211 (1967).
- 27) Scrutton, M.C. and Utter, M.F. Ann. Rev. Biochem. 37, 247 (1968).
- 28) Krebs, H.A. Advan. Enzyme Regulation 1, 385 (1963).
- 29) Weber, G., Singhal, R.L., Stamm, N.B., Fisher, E.A., Mentendiek, M.E. Advan. Enzyme Regulation 2, 1 (1964).
- 30) Hales, G.N. Essays in Biochemistry 3, 73 (1967).
- 31) Hess, B., Brand, K. en Control of Energy Metabolism. Chance, B., Estabrook, R.W., Williamson, J.R. Eds. Academic Press, New York, (1965) p. 111.
- 32) Bücher, Th. and Rüssmann, W. Angew. Chem. 3, 426 (1964).
- 33) Williamson, J.R., J. Biol. Chem. 241, 5026 (1966).
- 34) Williamson, J.R. en Control of Energy Metabolism, Chance, B., Estabrook, R.W., Williamson, J.R. Eds. Academic Press, New York, (1965) p. 333.
- 35) Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X. and Schultz, D.W. J. Biol. Chem. 239, 18 (1964).
- 36) Lowry, O.H. and Passonneau, J.V. J. Biol. Chem. 239, 31 (1964).
- 37) Williamson, J.R. J. Biol. Chem. 240, 2308 (1965).
- 38) Rolleston, F.S. and Newsholme E.A. Biochem J. 104, 524 (1967).
- 39) Handler, J.S., Preston, A.S. and Orloff, J. J. Biol. Chem. 244, 3194 (1969).
- 40) Hess, B., Brand, K. and Cassutto, Y. Fed. Proc. 24, 537 (1965).
- 41) Hess, B. and Brand, K. Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 102 (1966)
- 42) . Atkinson, D.E. Science, 150, 851 (1965).
- 43) Gevers, W. and Krebs, H.A. Biochem.J. 98, 720 (1966).

- 44) Newsholme, E.A. and Gevers, W. *Vitamins Hormones* 25, 1 (1967).
- 45) Crane, R.K. and Sols, A. *J. Biol. Chem.* 203, 273 (1953).
- 46) Fromm, H.J. and Zewe, V. *J. Biol. Chem.* 237, 1661 (1962).
- 47) Rose, I.A. en *Control of Energy Metabolism*, Chance, B., Estabrook, R.W., Williamson, J.R. Eds. Academic Press, New York (1965) p. 177
- 48) England, P.J. and Randle, P.J. *Biochem. J.* 105, 907 (1967).
- 49) Newsholme, E.A., Rolleston, F.S. and Taylor, K. *Biochem. J.* 106, 193 (1968).
- 50) Rose, I.A. and O'Connell, E.L. *J. Biol. Chem.* 239, 12 (1964).
- 51) Gonzalez, C., Ureta, T., Sánchez, R. and Niemeyer, H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 16, 347 (1964).
- 52) Katzen, H.M. *Advan. Enzyme Regulation*, 5, 335 (1967).
- 53) Dipietro, D.L., Sharma, C. and Weinhouse, S. *Biochemistry.* 1, 455 (1962).
- 54) Ballard, F.J. and Oliver, I.T. *Biochem.J.* 90, 261 (1964).
- 55) Viñuela, E., Salas, M. and Sols, A. *J. Biol. Chem.* 238, PC 1175 (1963)
- 56) Niemeyer, H. *Nat. Cancer Ins. Monograph* 27, 29 (1967).
- 57) Dyson, J.E., Anderson, W.B. and Nordlie, R.C. *J. Biol. Chem.* 244, 560 (1969)
- 58) Vianna, A.L. and Nordlie, R.C. *J. Biol. Chem.* 244, 4027 (1969)
- 59) Nordlie, R.C., Hanson, T.L., Johns, P.T. and Lygre, D.G. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60, 590 (1968).
- 60) Nordlie, R.C. en W.J. Whelan (Edr.) *Control of Glycogen Metabolism*, Oslo University Press, Oslo (1968) p. 153
- 61) Mansour, T.E. *J. Biol. Chem.* 238, 2285 (1963).
- 62) Passonneau, J.V. and Lowry, O.H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 13, 372 (1963)
- 63) Parmeggiani, A. and Bowman, R.H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 12, 268 (1963).
- 64) Garland, P.B., Randle, P.J. and Newsholme, E.A. *Nature* 22, 169 (1963)

- 65) Ramaiah, A., Hathaway, J.A. and Atkinson, D.E. *J. Biol. Chem.* 239, 3619 (1964).
- 66) Blangy, D., Buc. H. and Monod, J. *J. Mol. Biol.* 31, 13 (1968).
- 67) Kemp, R.G. and Krebs, E.G. *Biochemistry* 6, 423 (1967).
- 68) Lowry, O.H. and Passanneau, J.V. *J. Biol. Chem* 241, 2268 (1966).
- 69) Lindell, T.J. and Stellwagen. *J. Biol. Chem.* 243, 907 (1968).
- 70) Salas, M.L., Salas, J. and Sols, A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 31, 461 (1968).
- 71) Lorenson, M.Y. and Mansour. T.E. *J. Biol. Chem.* 244, 6420 (1969).
- 72) Taketa, K. and Pogell, B.M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 12, 229 (1963).
- 73) Taketa, K. and Pogell, B.M. *J. Biol. Chem.* 240, 651 (1965).
- 74) Little, C., Sanner, T. and Pihl A. *European J. Biochem.* 8, 229(1969)
- 75) Lardy, H.A., Foster, D.O., Shrago, E. and Ray, P.D. *Advan. Enzyme Regulation* 2, 39 (1964).
- 76) Utter, M.F., Keech, D.B. and Scrutton, M.C. *Advan. Enzyme Regulation* 2, 49 (1964).
- 77) Foster, D.O., Ray, P.D. and Lardy, H.A. *Biochemistry* 5, 555 (1966)
- 78) Scrutton, M.C. and Utter, M.F. *J. Biol. Chem.* 242, 1723 (1967).
- 79) Lardy, H.A., Paetkau, V., Walter, P. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 53, 1410 (1965).
- 80) Haynes, R.C. *J. Biol. Chem.* 240, 4103 (1965).
- 81) Walter, P., Paetkau, V. and Lardy, H.A. *J. Biol. Chem.* 241, 2523 (1966).
- 82) Griffiths, D.E., Haslam. J.M. *Biochem. J.* 104, 51P (1967).
- 83) Seubert, W., Henning, H.V., Schoner, W. and L'age, H. *Adv. Enzyme Regulation* 6, 153 (1968).
- 84) Lardy, H.A. and Ziegler, J.A. *J. Biol. Chem.* 159, 343 (1945).
- 85) Harrison, W.H., Boyer, P.D. and Falcone, A.B. *J. Biol. Chem.* 215, 303 (1955).

- 86) Mc Quate, J.T. and Utter, M.F. J. Biol. Chem. 234, 2151 (1959).
- 87) Krinsky, I. J. Biol. Chem. 234, 232, (1959).
- 88) Tietz, A. and Ochoa, S. Arch. Biochem. Biophys. 78, 477 (1958).
- 89) Kupieki, F.P. and Coon M.J. J. Biol. Chem. 234, 2428 (1959).
- 90) Kupieki, F.P. and Coon M.J. J. Biol. Chem. 235, 1944 (1960).
- 91) Reynard, A.M., Hass, L.F. Jacobsen, D.D. and Boyer P.D. J. Biol. Chem. 236, 2277 (1961).
- 92) Cleland, W.W., Ann. Rev. Biochem. 36, 77 (1967).
- 93) Boyer, P.D., Lardy, H.A. and Phillips, P.H. J. Biol. Chem. 146, 673 (1942).
- 94) Kachmar, J.F. and Boyer, P.D. J. Biol. Chem. 200, 669 (1953).
- 95) Suelter, C.H., Singleton. R. Jr., Kayne, F.J., Arrington, S., Glass J. and Mildvan, A.S. Biochemistry 5, 131 (1966).
- 96) Mildvan, A.S. and Cohn, M. J. Biol. Chem. 241, 1178 (1966).
- 97) Melchior, J.B. Biochemistry 4, 1518 (1965).
- 98) Cottam G.L., Kupieki F.P., and M.J. Coon, J. Biol. Chem. 243, 1630 (1968).
- 99) Bygrave, F.L. Biochem. J. 101, 488 (1966).
- 100) Kerson, L.A., Garfinkel, D. and Mildvan, A.S. J. Biol. Chem. 242, 2124 (1967).
- 101) Rose, I.A. J. Biol. Chem. 235, 1170 (1960).
- 102) Meyerhof, O. and Oesper, P. J. Biol. Chem. 179, 1371 (1949).
- 103) Holmsen, H. and Storm, E. Biochem. J. 112, 303 (1969).
- 104) Wood, T. Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 779 (1968).
- 105) Morrison, J.F., O'Sullivan, W.S. and Ogston, A.G. Biochem. Biophys. Acta 52, 82 (1961).
- 106) O'Sullivan, W.J. and Perrin, D.D., Biochemistry 3, 18 (1964).
- 107) Phillips, R. Chem. Rev. 66, 501 (1966).
- 108) Mildvan, A.S. and Cohn, M. J. Biol. Chem. 240, 238 (1965).

- 109) Suelter, C.H. and Melander W. J. Biol. Chem. 238, PC 4108 (1963).
- 110) Kayne, F.J. and Suelter, C.H. J. Am. Chem. Soc. 87, 897 (1965).
- 111) Suelter, C.H. Biochemistry 6, 418 (1967).
- 112) Wilson, R.H., Evans, H.J. and Becker R.R. J. Biol. Chem. 242, 3825 (1967).
- 113) Kayne, F.J. and Suelter C.H. Biochemistry 7, 1678 (1968).
- 114) Sorger, G.J., Ford, R.E. and Evans, H.J. Proc. Nat. Acad. of Sci. 54, 1614 (1965).
- 115) Johnson, G.S. and Deal, W.C. J. Biol. Chem. 245, 238 (1970).
- 116) Mildvan, A.S. and Leigh, Biochem. Biophys. Acta. 89, 393 (1964).
- 117) Warner, R.C. Arch. Biochem. Biophys. 78, 494 (1958).
- 118) Steinmetz, M.A. Fed. Proc. 25, 223 (1966).
- 119) Steinmetz, M.A. and Deal, W.C. Jr. Biochemistry 5, 1339 (1966).
- 120) Cottam, G.L., Kupieki, F.P. and Coon, M.J. Fed. Proc. 25, 523 (1966)
- 121) Hollenberg, P.F., Cottam, G.L. and Coon, M.J. Fed. Proc. 26, 602 (1967).
- 122) Cottam, G.L., Hollenberg, P.F. and Coon, M.J., J. Biol. Chem. 244, 1481 (1969).
- 123) Johnson, G.S., Kayne, M.S. and Deal W.C.Jr. Biochemistry 8, 2455 (1969).
- 124) Tanaka, T., Harano, Y. Morimura, H. and Mori, R. Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 55 (1965).
- 125) Bigley, R.H., Stenzel, P., Jones, R.T., Campos, J.O. and Koller, R.D. Enzymol. Biol. Clin. 9, 10 (1968).
- 126) Susor, W.A. and Rutter, W.J. Biochem, Biophys. Res. Comm. 30, 14 (1968).
- 127) Tanaka, T., Harano, Y. Sue, F. and Morimura H., J. Biochemistry (Tokio) 62, 71 (1967).
- 128) Carminatti, H.C., Rozengurt, E. and Jiménez de Asúa, FERS Letters, 4, 307 (1969).

- 129) Krebs, H. and Eggleston, L.A. *Biochem. J.* 94, 3 C(1965)
- 130) Weber, G., Stamm, N.B. and Fisher, E.A. *Science* 149, 65 (1965)
- 131) Weber, G., Singhal, R.L., Stamm, N.B., Lea, M.A. and Fisher, E.A. *Advan. Enzyme Regulation* 4, 59 (1966)
- 132) Szepesi, B. and Freedland, R.A. *J. Nutr.* 93, 301 (1967)
- 133) Szepesi, B. and Freedland, R.A. *J. Nutr.* 94, 463 (1968)
- 134) Freedland, R.A., Cunliff, T.L. and Zinkl, J.G. *J. Biol. Chem.* 241, 5448 (1966)
- 135) Taylor, C.B. and Bayley, E. *Biochem.J.* 102, 320 (1967)
- 136) Carminatti, H.C., Jiménez de Asúa, L., Recondo, E., Passeron, S. and Rozengurt, E. *J. Biol. Chem.* 243, 3051 (1968)
- 137) Tanaka, T., Sue, F. and Morimura, H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 24, 444 (1967)
- 138) Passeron, S., Jiménez de Asúa, L. and Carminatti, H.C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27, 33 (1967)
- 139) Bailey, E., Stirpe, F. and Taylor, C.B. *Biochem. J.* 108, 427 (1968)
- 140) Rozengurt, E., Jiménez de Asúa, L. and Carminatti, H.C. *J. Biol. Chem.* 244, 3142 (1969)
- 141) Llorente, P., Marco, R. and Sols, A. *European J. Biochem.* 13, 45 (1970)
- 142) Schonor, W., Haag, V. and Seubert, W. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 351, 1071 (1970)
- 143) Carminatti, H.C., Rozengurt, E. and Jiménez de Asúa, L. *Abstr. 6th Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc., Madrid (1969) p. 399*
- 144) Jiménez de Asúa, L. *Tesis Doctoral (manuscrito en preparación).*
- 145) Evans, H.J. and Gorger, G.J. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 17, 47 (1966)
- 146) Benziman, M. *Biochem. J.* 112, 631 (1969)
- 147) Maeba, P. and Sanwal, B.D. *J. Biol. Chem.* 243, 448 (1968)

- 148) Hess, B. and Haeckel, R. *Nature* 214, 848 (1967)
- 149) Hess, B., Haeckel, R. and Brand, K. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 24, 824 (1966)
- 150) Somero, G.N. and Hochachka, P.W. *Biochem. J.* 110, 395 (1968)
- 151) Rozengurt, E., Jiménez de Asúa, L. y Carminatti, H.C. (Resultados no publicados)
- 152) Pogson, C.I., *Biochem. J.* 110, 77 (1968)
- 153) Jiménez de Asúa, L., Rozengurt, E., Devalle, J.J. and Carminatti, H.C. *Biochem. Biophys. Acta* (1971) (en prensa).
- 154) Suelter, C.H. *Science* 168, 798 (1970)
- 155) Cabib, E. and Rothman, L.B. *Natl. Cancer Inst. Monograph.* 27, 19 (1967)
- 156) Adelman, R.C., Morse, D.E., Chan, W. and Horecker, B.L. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 343 (1968)
- 157) Lui, N.S.T. and Cunningham, L.W. *Biochemistry* 5, 144 (1966)
- 158) Jacobs, G. and Cunningham, L.W. *Biochemistry* 7, 143 (1968)
- 159) Rupley, J.A. en S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Editores) *Methods in Enzymology*, Vol. XI Academic Press, New York (1967) p. 905
- 160) Zyk, N., Citri, N. and Moyed, H.S., *Biochemistry* 8, 2787 (1969)
- 161) Yang, S.T. and Deal, W.C. *Biochemistry* 8, 2814 (1969)
- 162) Mc Clintock, D.K. and Markus, G., *J. Biol. Chem.* 243, 2855 (1968)
- 163) Mc Clintock, D.K. and Markus, G., *J. Biol. Chem.* 244, 36 (1969)
- 164) Vivayvargiya, R., Schwark, W.J. and Singhal, R.L., *Can. J. Biochem.* 47, 895 (1969)
- 165) Weber, G., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 63, 1365 (1969)
- 166) Peterson, E.A. and Sober, H.A. en S.P. Colowick y N.O. Kaplan (editores) *Methods in Enzymology*, Vol. V Academic Press, New York (1962) p. 6
- 167) Leloir, L.F. and Goldemberg, S. *J. Biol. Chem.* 235, 919 (1960)

- 168) Bücher, T. and Pfeleiderer, G. en S.P. Colowick and N.O. Kaplan (editores) *Methods in Enzymology*, Vol. I Academic Press, New York (1955) p. 435
- 169) Laskowski, M. en S.P. Colowick and N.O. Kaplan (editores) *Methods in Enzymology*, Vol. II Academic Press, New York (1955) p.33
- 170) Lowry, H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951)
- 171) Changeux, J.P. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 197 (1963)
- 172) Atkinson, D.E., Hataway, J.A. and Smith, E.C. *J. Biol. Chem.* 240, 2682 (1965)
- 173) Betts, G.F. and Evans, H.J. *Biochem. Biophys. Acta* 167, 193 (1968)
- 174) Jensen, R.A. and Nester, E.W. *J. Biol. Chem.* 241, 3373 (1966)
- 175) Kuczynski, R.T. and Suelter, C.E. *Biochemistry* 9, 939 (1970)
- 176) Wang, J.H. , Tu, J. and Lo, F.M. *J. Biol. Chem.* 245, 3115 (1970)
- 177) Dixon, M. and Webb, E.C. *Enzymes*, Longmans, Green and Company, Ltd. London (1964) p. 328
- 178) Changeux, J.P. and Podleski, T.R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59, 944 (1968)
- 179) Parry, M.J. and Walker, D.G. *Biochem. J.* 99, 266 (1966)
- 180) Uyeda, K. and Racker, E. *J. Biol. Chem.* 240, 4682 (1965)
- 181) Krebs, H.A. *Natl. Cancer Inst. Monograph.* 27, 331 (1967)
- 182) Ling, G.N. and Cope, F.W. *Science* 163, 1335 (1969)
- 183) Rubin, M.M. and Changeux, J.P. *J. Mol. Biol.* 21, 265 (1966)
- 184) Koshland, D.E. Jr., Nemethy, G. and Filmer, D. *Biochemistry* 5, 365 (1966)
- 185) Kirtley, M.E. and Koshland, D.E. Jr. *J. Biol. Chem.* 242, 4192 (1967)
- 186) Koshland, D.E. Jr. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 473 (1963)
- 187) Koshland, D.E. Jr. *Advan. Enzyme Regulation* 6, 291, (1968)

- 188) Atkinson, D.E. and Walton, G.M. *J. Biol. Chem.* 240, 757 (1965).
- 189) Gerhart, J.C. and Pardee, A.B. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28, 491 (1963).
- 190) Trivedi, B. and Danforth, W.H. *J. Biol. Chem.* 241, 4110 (1966).
- 191) Sanwal, B.D., Zink, M.W. and Stachow, C.S. *J. Biol. Chem.* 239, 1597 (1964).
- 192) Léjhon, H.B. and Jackson, S. *J. Biol. Chem.* 243, 3447 (1968).
- 193) Scarano, E., Geraci, G. and Rossi, M. *Biochemistry* 6, 192 (1967).
- 194) Robichon-Szulmajster, H. de, and Magee, P.T. *European J. Biochem.* 3, 492 (1968).
- 195) Gerhart, J.C. and Pardee, A.B. *Fed. Proc.* 23, 727 (1964).
- 196) Wang, J.H. and Tu, J. *J. Biol. Chem.* 245, 167 (1970).
- 197) Tanford, C. *Advan. Protein. Chem.* 23, 122 (1968).
- 198) Hill, R.L. and Kanarek, L. *Brookhaven Symposia in Biology* 17, 80 (1964).
- 199) Deal, W.C. Jr. *Biochemistry* 8, 2795 (1969).
- 200) Gutfreund, H. and Knowles, J.R. *Essays in Biochemistry* 3, 25 (1967).
- 201) Jensen, R.A. *J. Biol. Chem.* 244, 2816 (1969).
- 202) Changeux, J.P. *Brookhaven Symposia in Biology* 17, 232 (1964).
- 203) Brown, N.C. and Reichard, P. *J. Mol. Biol.* 46, 39 (1969).
- 204) Levitzki, A., Koshland, D.E. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 62, 1121 (1969).
- 205) Changeux, J.P., Gerhart, J.C. and Schachman, H.K. *Biochemistry* 7, 531 (1968).