Tesis de Posgrado



Propiedades cinéticas de la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo M

Jiménez de Asúa, Luis A.F.

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:

Jiménez de Asúa, Luis A.F.. (1971). Propiedades cinéticas de la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo M. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1387_JimenezdeAsua.pdf

Cita tipo Chicago:

Jiménez de Asúa, Luis A.F.. "Propiedades cinéticas de la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo M". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1971. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1387_JimenezdeAsua.pdf

EXACTAS

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Propiedades cinéticas de la piruvato quinasa hepática Tipo L y Tipo M

Autor : Luis A. F. Jiménez de Asúa

Director : Hector Carminatti

Lugar de Trabajo : Instituto de Investigaciones Bioquimicas

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
ORIENTACION QUINICA BIOLOGICA

- 1971 -

=1387 y 2

. 1387

A Stella o Ignacio

A mi madre

A mi abuelo Pelipe Jiménez de Asúa quien con su apoyo moral, fé y ejemplo me estimulé en mi ini ción en la investigación científica.

AGRA DECIMIENTOS

Al Dr. Hector Carminatti por el apoyo y enseñanzas que me brindo en mi iniciación en la investigación bioquímica.

À los Dres. Luis F. Leloir y Carlos E. Cardini 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. Enrique Rozongurt, mi compañero de laboratorio, gracias a cuya colaboración y esfuerzo fueron posibles muchos de los experimentos de esta tesis. A 61 también debo agradecerle la lectura y discusión del manuscrito.

A la Dra. Susana Passeron por su ayuda y consejos en el comienzo de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haberme dado el apoyo material duranto la realización de este trabajo.

Al Sr. Ignacio Acquarone por habermo brindado el apoyo financie ro necesario para la impresión de esta tesis.

A los Sres. Guillermo Anderson, Ricardo Arena y Mercedes R. de Harrison por la copia y diagramación del manuscrito.

RESUMEN

En el presente trabajo se han estudiado argunas propiedades cinéticas de la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo E. Por consiguiente, se pueden considerar dos aspectos en esta investigación:

Piruvato quinasa hopática tipo L: la isoenzima L de hígado de rata fue purificada aproximadamento entre 40 a 60 veces. Estudiando la variación de la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de PEP, se observó que a pH 7.5 la enzima tiene un marcado efecto cooperativo homotrópico para dicho sustrato. En presencia de FDP las curvas de sa turación se transforman de signoides en hiperbólicas, aumentando marcada mente la afinidad de la enzima por el PEP.

Por el contrario, el ATP regula la actividad de la isoenzima L de hígado en sentido opuesto comportándose como un inhibidor alostérico. A pH 7.5 y a niveles bajos de PEP la curva de inhibición por ATP es hiper bólica, convirtiéndose en marcadamente sigmoide en presencia de concentra ciones muy bajas de FDP (0.002 mH) o a niveles muy altos de PEP. El ATP a su vez, también ejerce un marcado efecto heterotrópico negativo sobre la curva de saturación de esta enzima para el PEP.

Las propiedades reguladoras de la piruvato quinasa hepática tipo L son marcadamente modificadas por variaciones en el pli del medio de
incubación. A valores de pli inferiores a 7.0, la curva de saturación para
el PEP es hiperbólica, el PDP no tiene efecto activador y la cinética de
inhibición por ATP es sigmoide.

A valores de pH superiores a 7.0, el efecto cooperativo homotr<u>ó</u> pico de la isoenzima L de hígado con respecto al PEP aumenta marcadamente a medida que se incrementa el pH del medio de incubación. En estas condiciones la cinótica de inhibición de la enzima por ATP es de tipo Michaelia no y el FDP tiene un marcado efecto activador.

Estos cambios también se apreciaron cuando se los estudió en el rango de pH intracelular hepático.

Los datos cinéticos obtenidos con la piruvato quinasa hepática tipo L fueron interpretados de acuerdo al modelo propuesto por Monod, Wyman y Changeux. Se discute la significación fisiológica de los resultados encontrados.

Piruvato quinasa hopática tipo M: la isoenzima E de hígado de rata fue purificada aproximadamente 10 veces. Estudiando el efecto de diferentes meta bolitos sobre la actividad de esta enzima se observó que la misma es marca damente inhibida por los siguientes aminoácidos: alanina, fenilalanina, triptofano, tirosina, prolina y treonina. Este comportamiento difiere apreciablemente del de la piruvato quinasa de músculo esquelótico, cuya actividad es específicamente inhibida por fenilalanina, fenómeno que depende del pli del medio de incubación.

La cinética de inhibición por alanina y fenilalanina de la isoenzima M de hígado fue estudiada con mayor detalle, demostrándose que estos aminoácidos son inhibidoros del tipo mixto con respecto al PEP. Además, las curvas de actividad enzimática en función de la concentración de alanina y fenilalanina son hiperbólicas. El efecto de estos dos aminoácidos es independiente del pH del medio de incubación.

Se concluyó que esta enzima tiene propiedades cinéticas distintas a las de la piruvato quinasa de músculo esquelético. La significación fisio lógica de los resultados obtenidos con la isoenzima M de hígado en condicio nes de gluconeogénesis crónica también se discuten.

Con fines comparativos se estudió además las propiedades cinóticas de las isoenzimas presentes en la corteza renal. A partir de extractos crudos de este tejido se purificó parcialmente dos formas de piruvato quinasa a las que se denominó I y II. Esta última se encuentra en monor proporción y tione características reguladoras similares a las de la iscenzima L de hígado.

vato quinasa hepática tipo L y tipo M, ya que se observó que la misma tiene efecto cooperativo homotrópico con respecto al PEP, pero su actividad no
es modificada per la presencia de ATP y PDP. También se demostró que cambios
en el pH de incubación (6.8-7.5) no producen variaciones en la cooperatividad de las curvas de saturación de esta enzima para el PEP. Además, la alanina inhibo marcadamente la actividad de la forma II, pero este efecto no
es revertido per el FDP.

So concluyo que la forma II de piruvato quinasa de corteza renal tiene propiedades similares a las descriptas en este trabajo para las isoenzimas L y N de higado.

INDICE

									Påg.
Abre	eviaturas	•	•	•	•	•	•	•	1
<u>1.</u>	INTRODUCCION								
	Consideraciones Generales	•	•	•	•	•	•	•	3
	Gluconeogénesis y Glucólisis	•	•	•	•	•	•	•	7
	Identificación de los Sitios de Control de la	G)	lu	c 6]	liε	sia	3 3	Ţ	
	Gluconeogénesis	•	•	•		•	•	•	9
	Enzimas Reguladoras de la Glucólisis	•	•	•	•		•	•	13
	Enzimas Reguladoras de la Gluconeogénesis	•	•			•		•	16
	Sintesis del PEP a partir de Piruvato	•	•	•	•	•	•	•	16
	Regulación de la Glucólisis y Gluconeogénesis	•	•	•		•	•	•	2 2
	Piruvato Quinasa	•	•	•	•	•		•	24
	Finalidad de la Presente Investigación	•	•	•	•	•	•	•	26
II.	MATERIALES Y METODOS								
	Reactivos y Enzimas	•	•	•	•	•	•	•	29
	Métodos Analíticos								
	Proteinas	•	•	•	•	•	•	•	29
	Intercambiadores Iónicos	•	•	•	•	•	•	•	30
	Ensayos Enzimáticos								
	Piruvato Quinasa		•	•		•		•	30
	Enolasa	•	•	•	•	•	•	•	31
	Aldolasa	•	•	•	•	•	•	•	32
	Fructosa-1.6-Difosfatasa					_			32

Purificación de la Piruvato Quinasa Repática Tipo L y Tipo R	
Preparación del Sobrenadante de 100.000 xc Conteniendo	
ambas Pormas de Piruvato Quinasa Hepática	32
Piruvato Quinasa Hepática Tipo L	33
Piruvato Quinasa Hepávica Pipo A	36
III. RESULTADOS	
<u>Piruvato Quinasa Hepática Tipo L</u>	
Activación de la Piruvato Quinasa Hepática Tipo L por el FDP	
en Función de la Concentración de PEP y del pH	38
Variación de la Actividad de la Piruvato Quinasa Hepática	
Tipo L en Función de la Concentración de PEP y ADP a Diferen-	
tos Valores de pH	40
Comportamiento de la Piruvato Quinasa Hepática Tipo L con	
Distintos Bufferes	45
Reversibilidad del Efecto del pH sobre las Propiedades de la	
Piruvato Quinasa Hepática Tipo L	48
Efecto dol ATP y dol FDP en la Actividad de la Piruvato Qui-	
nasa Hepática Tipo L en Función del Tiempo	50
Variación de la Actividad de la Piruvato Quinasa Hepática Ti-	
po L en Función de la Concentración de ATP. Características	
de la Inhibición	50
Variación de la Actividad de la Piruvato Quinasa Hepática Ti-	
po L en Función de la Concentración de PEP en Presencia de	
ATP y FDP	55
Variación de la Actividad de la Piruvato Quinasa Hepática Ti-	
po L en Función de la Concentración de ATP a pH 5.9 y 8.15 .	58
Efecto do las Variaciones Fisiológicas de pH en las Propieda-	
des Reguladoras do la Piruvato Quinasa Hepática Tipo L	62

Variación del Coeficiente n _H y de la Constante S _{O.5} de la	
Piruvato Quinasa Hepática Tipo L para el PEP en Función	
del pH	64
Piruvato Quinasa Hopática Tipo M	
Consideraciones Generales	69
Efecto del pli sobro la Actividad de la Piruvato Quinasa ile-	
patica Tipo M	71
Variación de la Actividad de la Picuvato Quinasa Repática Ti	
po N en Función de la Concentración de PEP y ADP	71
Efecto de Distintos Motabolitos en la Actividad de la Piruva	
to Quinasa Hopática Tipo H	73
Efecto del ATP, Citrato y Ca en la Actividad de la Piruva-	
to Quinasa Hepática Tipo H a Diferentes Concentraciones de	
Mg ++	76
Efecto de Distintos Aminoácidos en la Actividad de la Piruva	
to Quinasa Hepática Tipo M y de Músculo Esquelético	78
Variación de la Actividad de la Piruvato Quinasa Hopática Ti	
po M en Función de la Concentración de PEP en Ausencia y en	
Presencia do Alanina y Fenilalanina	80
Variación de la Actividad de la Piruvato Quinasa Hepática E	
po M en runción de la Concentración de Alamina y Fomilalani-	
na	85
Efecto del pH en la Actividad de la Piruvato Quinasa Hepáti-	
ca Tipo M en Ausencia y en Presencia de Alamina y Fenilalani	
na	87
Efecto de la Alanina y Proonina en la Inhibición por Fenil-	
alanina de la Piruvato Quinasa Hepática Tipo H y de Edsculo	
Esquelôtico	ც 7

	Electo de la Serina y Cistelna en la Inhibición de la Piru-	
	vato Quinasa Hepática Tipo H por Algunos Aminoácidos	89
	Piruvato Quinasa de Corteza Renal	
	Separación de las Isoenzimas de Piruvato Quinasa de Corteza	
	Renal	93
	Efecto del pH y del FDP en la Actividad de la Piruvato Quina	
	sa de Corteza Renal I y II a Distintos Valores de pH	96
	Propiedades Cinéticas de la Piruvato Quinasa de Corteza Renal	
	I y II	98
	Efecto del pH en las Propiedades Reguladoras de la Forma II	
	de la Piruvato Quinasa de Corteza Renal	104
IV.	DISCUSION	
	Consideraciones Generales	107
	Piruvato Quinasa Hepática Tipo L	
	Consideraciones Cinéticas Generales	108
	Teorías y Modelos de Regulación Alostérica	110
	Aplicación de la Teoría de Monod, Wyman y Changeux a la Piru	
	vato Quinasa Hepática Tipo L	114
	Influencia del pH en las Enzimas Reguladoras	116
	Piruvato Quinasa Hepática Tipo M	
	Consideraciones Cinéticas Generales	122
	Significación Misiológica de los Resultados Obtenidos con la	
	Piruvato Quinasa Hepática Tipo L y Tipo M	124
	Piruvato Quinasa de Corteza Renal Forma I	127
	Piruvato Quinasa de Corteza Renal Forma II	129
Bib	liografía	130

ABREVIATURAS

ATP 5' Adenosina Trifosfato

ADP 5' Adenosina Difosfato

AMP 5' Adenosina Monofosfato

GTP 5 Guanosina Trifosfato

GDP 5' Guanosina Difosfato

UTP 5' Uridina Trifosfato

UDPG 5' Uridina Difosfato Glucosa

UMP 5' Uridina Monofosfato

G-6-P Glucosa - 6 - Fosfato

F-6-P Fructosa - 6 - Fosfato

FDP Fructosa 1,6 Difosfato

DHAP Di Hidroxi Acetona Posfato

GA-3-P Gliceraldehido - 3 - Fosfato

1,3-PGA 1,3 Difosfo Glicérico

3-PGA 3-Posfoglicérico

2-PGA 2-Fosfoglicérico

PEP Posfo-Enol-Pirúvico

OOA Oxalacetato

Carbamil-P Carbamil Fosfato

P-Creatina Fosfocreatina

Pi l'osfato Inorganico

PPi Pirofosfato

PFK Posfo-Fructo-Quinasa

NADH Nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADPH Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

TRIS Tris (Hidroximetil) Amino Metano

TES N-Tris (Hidroximetil) Netil-2-Aminoetan Sulfonico

HEPES N-2-Hidroximetilpiperacina-N'-2-Etansulfónico

THA Hidróxido de Tetramotil Amonio

EDTA Etilendiamintotraacetato

I INTRODUCCION

Una de las características mas importantes que poseen todos los organismos vivientes es la capacidad de coordinar su actividad celular asegurando un balance adecuado entre los procesos degradativos y biosintéticos necesarios para su supervivencia (1,2).

En los últimos años se han efectuado numerosos progresos en el conocimiento de los mecanismos de control metabólico. Distintos estudios han permitido establecer que en las cálulas existen circuitos muy complejos cuya función es la de regular la velocidad del flujo de intermediarios en las diferentes vías metabólicas, así como también la biosíntesis de macromoléou las (3).

En la actualidad es generalmente aceptado que la regulación del metabolismo celular se efectúa por medio de dos mecanismos fundamentales (4):

- A) Control metabólico de la actividad enzimática
- B) Control en el nivel de las enzimas (5)

Junto con estos mecanismos, la interconversión de enzimas en for mas mas o menos activas representa otro sistema de regulación metabólica. El mismo ha sido muy estudiado en las enzimas que participan en la síntesis y degradación del glucógeno y en la glutamina sintetasa (6).

En los mamíferos, en los cuales la complejidad celular es mayor, la coordinación de estos mecanismos entre los distintos tejidos es asegura da por el sistema nervioso y hormonal (7).

En un sistema metabólico compuesto de vías sintéticas y degradativas relacionadas entre sí, la regulación de ciertas enzimas estratégicas es crítica para el mantenimiento de un balance adecuado entre estos procesos. Las primeras observaciones sobre la existencia de sitios de control en el metabolismo fue provista por Dische, quien demostró el efecto inhibidor del 3-PGA en la fosforilación de la glucosa (8).

La regulación del flujo de intermediarios en las vías metabólicas por el producto final de las mismas, fue inicialmente propuesto por Lovick y Szilard (9). Posteriormente, los trabajos de Umbarcer (10) y Yates y Pardee (11) estudiando la biosíntesis de la isoleucina y de las pirimidinas respectivamente, demostraron que este mecanismo de control se efectúa por inhibición de la primera enzima de la secuencia metabólica. El mismo puede ser ocquematizado de la siguiente manera:

$$A \xrightarrow{\int} B \longrightarrow C \longrightarrow D \longrightarrow E \longrightarrow F$$

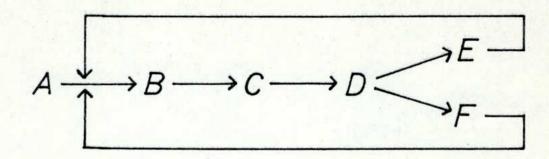
En la actualidad, el número de enzimas cuya actividad se regula de esta forma es considerable (12,13).

La comprensión de los mecanismos de control se hace mas difícil a modida que aumenta la complejidad de las secuencias metabólicas, ya sea porque una vía da lugar a la formación de dos productos finales; porque presenta ramificaciones o un producto común a muchas de ellas, o bien cuan do dos procesos opuestos (catabólico y anabólico) utilizan en común enzimas que catalizan reacciones reversibles.

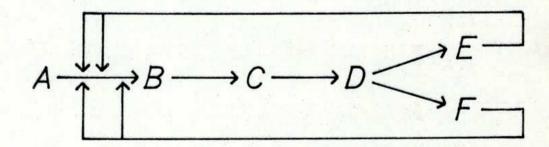
El control de una vía metabólica que da lugar a la formación de dos productos finales se efectúa por:

1) Inhibición concertada, en la cual es necesario que los dos productos fi

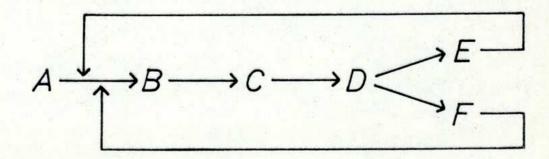
nales estén presentes para que ésta se produzca.



2) <u>Inhibición cooperativa o sinergística</u>, en la cual la presencia de los dos inhibidores produce un efecto mayor que la suma de los efectos ais lados.



3) Inhibición acumulativa. En este caso la presencia de los dos inhibidores produce un efecto igual a la suma de los efectos aislados.



En algunos casos, la primera reacción de estos caminos metabólicos es catalizada por isoenzimas cuya sensibilidad a la inhibición por los productos finales es distinta (14). En general, estos mecanismos de control han sido estudiados en las vías que sintetizan aminoácidos.

Los ejemplos presentados han sido demostrados con la aspartoquinasa (15), glutamina fosforibosilpirofosfato amidotransferasa (16) y la glutamina sintetasa (17) respectivamente.

Cuando varias vías metabólicas están conectadas por un intermediario común, el flujo del mismo en los diferentes caminos dependerá
de su disponibilidad, la cual se encuentra bajo un estricto control. Un
ejemplo típico de ósto es la posición del G-6-P en el metabolismo de los
hidratos de carbono.

GLUCOLISIS
$$\longleftarrow$$
 $G-6-P$

SINTESIS DEL GLUCOGENO

CICLO DE LAS PENTOSAS

La activación de la última enzima de una secuencia metabólica por el precursor de la misma es otro mecanismo de regulación importante. La misma representa una forma de control positivo de sentido opuesto a la retroinhibición (18,19).

La característica principal de este tipo de control es que la activación ocurre en una etapa en la cual el nivel de sustrato intermedia rio es limitante para la reacción. La activación de la glucógeno sintetasa por el G-6-P descubierta en músculo y en hígado por Leloir y col.(20,21) y el efecto activador del citrato en la acetilcoa carboxilasa demostrado por Lowenstein (22) con ejemplos típicos de este fenómeno.

Gluconeogénesis y glucólisis.

La gluconeogénesis es un proceso metabólico de gran importancia fisiológica mediante el cual se forma glucosa a partir de otros precursores tales como aminoácidos, lactato, fumarato, succinato y propionato. En los mamíferos ocurre en el tejido hepático y en la corteza renal y constituye uno de los mecanismos que asogura un aporte constante de glucosa al sistema nervioso central (23,24). Por otra parte, en los tejidos menciona dos, la glucólisis es un proceso metabólico importante bajo el punto de vista energético y anabólico, intimamente vinculado al resto del metabolis mo celular (25).

La glucólisia y gluconeogénesia constituyen dos procesos metabólicos opuestos en los cuales la regulación del flujo de intermediarios en
la secuencia de reacciones es más complejo que en las vías metabólicas sim
ples como se mencionó anteriormente. Ambos se caracterizan por tener enzimas propias a cada uno de ellos que catalizan reacciones fisioló, jicamente
unidireccionales y por utilizar en común enzimas que catalizan reacciones
reversibles.

Dado la intima relación que existe en el higado y en la corteza renal entre ambos procesos (glucólisis y gluconeogénesis), el estudio del control de las enzimas que participan en los mismos debe ser considerada en conjunto (26).

La secuencia de reacciones que conducen a la síntesis y degrada ción de la glucosa se muestra en la Pig.l.

El carácter unidireccional de las reacciones propias de cada uno de estos procesos "in vivo" está asegurado por el hecho de ser altamente exergónicas en una sola dirección. En la glucólisia, la fosforilación de la glucosa y del r-6-P constituyen reacciones prácticamente irreversibles

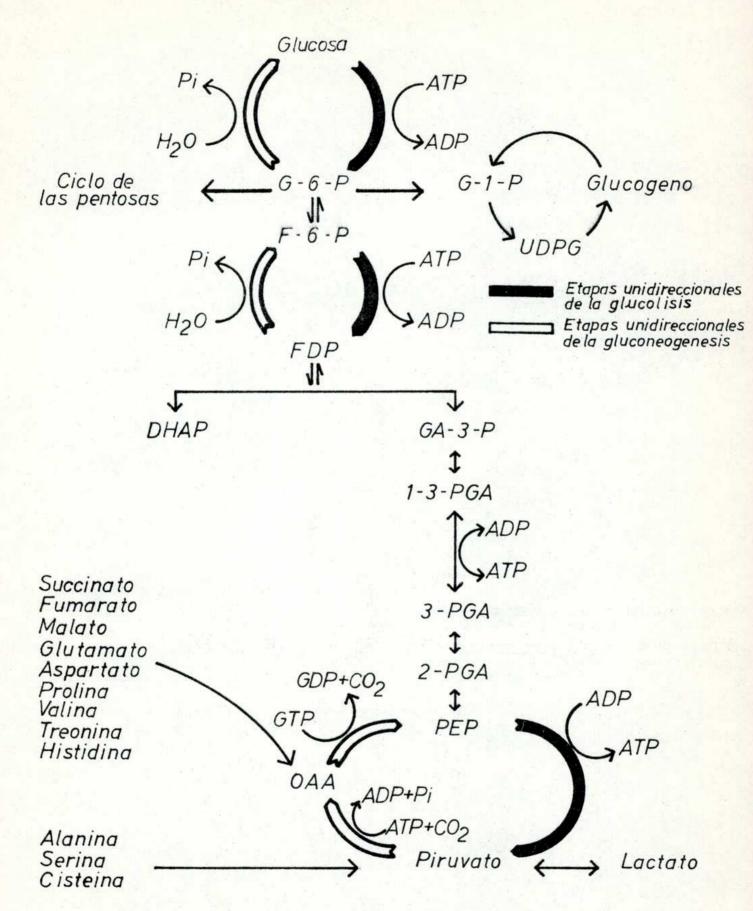


Fig. 1. Vías de la glucólisis y gluconeogénesis en el hígado y en la corteza renal.

en condiciones fisiológicas (27).

Por el contrario, en la gluconeogénesia, las barreras termodinámicas mencionadas son sorteadas mediante reacciones fuertemente exergé nicas de sentido opuesto como la hidrólisis del F-6-P y el G-6-P.

la presencia de este tipo de reacciones involucra necesariamente la existencia de un estricto control de las mismas, ya que en ausencia
de este ocurriría su acoplamiento dando lugar a la formación de corto cir
cuitos metabólicos que producirían un gasto continuo de la energía celular
(28).

Las evidencias experimentales presentes han demostrado que estos corto circuites son controlados y el sentido final del flujo de intermedia rios en estas vías está asegurado por la regulación de la actividad de las enzimas que catalizan reacciones unidireccionales de sentido opuesto.

Identificación de los sitios de control de la glucólisis y gluconeogénesis.

El estudio de la identificación de los sitios de control en ambos procesos ha sido efectuado por diferentes criterios (26).

La aproximación mas directa para reconocer las etapas de control de la glucólisis y gluconeogénesis ha sido basado en la comparación de la actividad catalítica máxima de las enzimas que participan en estos procesos en condiciones experimentales cercanas a las óptimas.

Krebs (23,29) señaló que por lo general las enzimas que constitu yen puntos de control metabólico, tienen menor actividad catalítica que aquellas sin función reguladora.

Sin embarço, este método tiene ciertas restricciones, ya que por lo general las determinaciones de actividad se efectúan a concentraciones saturantes de sustrato, condiciones en las cuales no se puede observar el efecto de metabolitos activadores e inhibidores (29,32).

En la Taula I se han expuesto resultados obtenidos con las en zimas glucolíticas y gluconeogénicas de hígado y corteza renal de rata, recopilados por Scrutton y Utter (32) y algunos calculados a partir de datos publicados por Weber y col.(30). Se puede apreciar que la hexoquinasa, glucoquinasa, P.K, piruvato carboxilasa, PEP-carboxiquinasa, fructosa-1,6-difesfatasa y glucosa-6-fesfatasa tienen menor actividad cata-lítica que aquellas enzimas que catalizan reacciones reversibles en condiciones fisiológicas.

Las reacciones catalizadas por la piruvato carboxilasa, PEP-carboxiquinasa, fructosa-1,6-difosfatasa y glucoca-6-fosfatasa son sitios importantes de control en la gluconeogenesis. Estas enzimas estan presentes únicamente en el hígado y en la corteza renal (33).

Otro de los criterios empleados para identificar las enzimas que catalizan reacciones unidireccionales, es establecer la velocidad de cada reacción en ambos sentidos, catabólico y sintético (34). Para calcular ésto, es necesario conocer:

- a) Velocidad máxima y la Km aparente para cada sustrato en los dos sentidos de la reacción.
 - b) La concentración de los sustratos en el estado estacionario.

En las enzimas que catalizan reacciones reversibles, las velocidades en uno u otro sentido no difieren mucho y el sentido neto de la reacción dependerá de la concentración de sustrato (34,35).

Por el contrario, en las enzimas que cavalizan reacciones unidireccionales, la velocidad de formación de producto en ambos sentidos es marcadamente diferente (3 ordenes de magnitud). Este método ha sido muy útil para determinar que en los tejidos glucolíticos la hexoquinasa, la PFK y la piruvato quinasa catalizan en condiciones fisiologicas, reaccio nes unidireccionales (36-41). En la Tabla 2 se exponen datos obtenidos

Actividad cataíftica máxima de algunas enzimas que participan en la glucólisis y gluconcogénesis en el hígado y en la corteza renal de rata

Los datos expuestos han sido extrafdos de la recopilación efectuada por Scrutton y Utter (32) y calculados a partir de los publicados por meber y col.(30).

Enzimas a	ii f gado	ki <i>n</i> on
llexoquinasa	0.7	7•9
Glucoquinasa	4•3	<u> </u>
Glucosa-6-isomerasa	135	-
PirK	3•3	5•7
Aldolasa	10	iO
Triosafosfato icomerasa	560	_
Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa	170	200
Posfoglicerato quinaca	150	170
Enolasa	17	53
Piruvato quinasa	50	50
Lactato dehidrogenasa	230	170
Piruvato carboxilasa	6.7	5.8
PEP-carboxiquinasa	6.7	6.7
Fructosa-1,6-difosfatasa	15	17
Flucosa-6-fosfatasa	17	13

a La actividad enzimática ha sido expresada en u moles de producto for mado por minuto por gramo de peso húmedo a 37°C.

Velocidad de formación de producto en ambos sentidos de la reacción

de algunas enzimas glucolíticas en células de tumor ascítico

Enzimas	Glucos a Piruvato	Piruvato Glucosa
ilexoquinasa.	27	10-4
Hexosa Isomerasa.	180	150
PĿĸ	27	10 ⁻²
Gliceraldehido-3 -fosfato dehidro Genasa.	140	82
Fosfoglicerato quinasa.	55	1.2
Posfo _c licerato mutasa.	61	3•4
Enolasa.	440	390
Piru vat o quinasa.	54	10-3

<u>a</u> Los datos han sido expresados en um moles de producto formado \underline{x} segundo⁻¹, y fueron obtenidos de Hess y Brand (34).

con células de tumor ascítico (34). No obstante, la aplicación de este criterio en el higado y en la corteza renal es limitada, debido a la existencia de dos procesos metabólicos opuestos (26). Sin embargo, actualmente se asume que en los tejidos gluconeogénicos, las ensimas glucóliticas menoionadas catalizan reacciones unidireccionales.

Otra de las propiedades presentes en las enzimas reguladoras es que su comportamiento cinético se aparta del que predice la ley clácica de Michaelis-Menten. Por lo tanto, la identificación "in vitro" de enzimas cuya cinética es de naturaleza alostérica indica, en general, que estas proteinas constituyen sitios de control en el metabolismo celular (3).

Enzimas reguladoras de la glucólisis.

a) Hexoquinasa.

La hexoquinasa cataliza la siguiente reacción:

Crane y Sols demostraron que la hexoquinasa de tejidos de mamifero es inhibida por el G-6-P (42). Este metabolito es un inhibidor alos térico de esta enzima (43) y su efecto es revertido específicamente por el Pi, el cual actua aumentando la Ki para el G-6-P (44,45). El ATP también modifica el valor de esta constante pero en sentido opuesto (45,46) y por lo tanto ambos metabolitos (Pi y ATP) podrian tener funciones reguladoras modulando el efecto del G-6-P sobre la actividad de la hexoquina sa. El glicerofosfato también revierte la inhibición por G-6-P (45). Por el contrario, el AMP y ADP son inhibidores de esta enzima (47).

La inhibición por 3-PGA y 1,2-PGA de la fosforilación de la glucosa descripta por Dische (3) no ha sido estudiada en detalle en la acti-

vidad do la hoxoquinasa.

En el higado de rata existen cuatro iscenzimas de hexoquinasa (43). El tipo I y III son específicamente inhibidas por el G-6-P (49). Una de éstas, llamada glucoquinasa, se caracteriza por tener un valor de Km alto para la glucosa (50,51) y no se inhibe por G-6-P (52). El nivel de esta enzima depende del estado hormonal y nutricional, ya que la administración de insulina o de glucosa produce un marcado aumento del mismo (53,54).

La importancia en los mamíferos de la hexoquinasa como sitio de control de la glucólisis, ha sido demostrado por experimentos de reconstitución con sistemas enzimáticos por Uyeda y Macker (55).

Se cree que la actividad de la glucoquinasa es un factor impo \underline{x} tante en la regulación de la glucemia (56).

b) Fosfofructoquinasa.

Esta enzima ataliza la siguiente reacción:

ATP +
$$r-6-P \longrightarrow FDP + ADP$$

Distintos estudios efectuados con la PFK obtenida de diferentes fuentes, han demostrado que es una proteína cuya actividad es modificada por distintos metabolitos (56,64). La enzima tiene efecto cooperativo homotrópico para el F-6-P y es marcadamente inhibida por el citrato y el ATP. Por el contrario, el Pi, F-6-P, FDP, AMP y el 3'5'AMP cíclico, revierten la inhibición por ATP y citrato. El NH₄ y el K únicamente tiene efecto activador en ausencia de estos metabolitos.

La cinética de interacción de la PFK con los sustratos, activadores e inhibidores es muy compleja y se ha postulado que la misma tiene de siete a doce sitios para sus efectores (63). La existencia de un sitio catalítico y regulador para el ATP en la PFK ha sido demostrada por el hecho de que el GTP y el ITP que pueden ser sustratos de la reacción no son inhibidores de esta enzima (61.65).

La inhibición de la PFK por el ATP se produce por un aumento en el valor de la Empara el F-6-P. Debido a que el efecto del Pi, AEP y 3'5'AMP cíclico es aumentar el valor de la Empara el ATP se puede concluir que la reversión de la inhibición por este metabolito ocurre por cambios en la afinidad con que se une al sitio regulador de la enzima. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, como por ejemplo cuando el nivel de ATP no es suficiente para inhibir a la PFK, los metabolitos mencionados actúan únicamente como activadores. Por lo tanto, la reversión o la activación dependerá del grado de unión del ATP con el sitio regula dor y de las variaciones en la concentración intracelular del mismo.

Los cambios en el nivol de F-6-P también modifican la acción de los inhibidores y activadores sobre la PFK. Así, a una concentración alta de este sustrato, ninguno de los metabolitos mencionados tienen efecto en la actividad de esta enzima.

Recientemente Salas y col.(66), y Lorenzon y Mansour (67) han desensibilizado esta enzima al ATP y otros efectores. Es interesante también señalar que distintos estudios han demostrado que la PFK existe en dos formas interconvertibles (68-71). El nivel de esta enzima en la célula hepática aumenta marcadamente después de la administración de insulina (72).

c) Piruvato Quinasa.

Por ser el tema de estudio de esta tesis, nos referiremos a ella en forma detallada, mas adelante.

Enzimas reguladoras de la gluconeogénesis. Entesis del PEP a partir de piruvato.

a) Glucosa-6-fosfatasa:

Esta enzima se encuentra locarizada en los microsomas. Estudios efectuados por Arion y Nordlie (73) y Stetten y Taft (74) han demostrado que la glucosa-6-fosfatasa cataliza tres reacciones diferentes:

El ATP y el Pi inhiben la actividad de hidrolasa (75,76). Este último metabolito es un inhibidor competitivo con respecto a la hidrólisis del G-6-P. La actividad de fosfotransferasa es inhibida por el CO₃H (77). Debido a que la hidrólisis del G-6-P es la última etapa de la gluconeogénesis, esta enzima ocupa un sitio importante en la regulación metabólica ya que su actividad permite mantener en esas condiciones un nivel adecuado de glucosa en la sangre.

En la actualidad se conoce muy poco sobre los mecanismos de control de la glucosa-6-fosfatasa. Sin embargo, aunque no existen pruebas directas algunas evidencias sugieren que la inhibición de esta enzima por el Pi actuaría canalizando el G-6-P hacia la formación de glucógeno.

El nivel de esta enzima en los mamíreros está bajo control hor monal y dietético (30). El sentido ficiológico del carácter multifuncional de la glucosa-6-fosfatasa no se conoce.

b) Fructosa-1,6-difosfatasa:

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

FDP +
$$H_2^0$$
 \longrightarrow F-6-P + Pi

Los estudios efectuados con la Tructosa-1,6-difosfatasa de diferente origen han demostrado que el AMP es un inhibidor alostérico de esta enzima (78,79). La cinética de inhibición por este metabolito no es competitiva con respecto al FDP sugiriendo que el AMP se une al sitio regulador de la enzima modificando su actividad catalítica (79,80). En efecto, el tratamiento de la misma con papaína elimina la inhibición por AMP sin alterar la actividad enzimática. Concentraciones muy altas de FDP también tienen efecto inhibidor (78,81-83).

La inhibición de la fructosa-l, 6-difosfatasa, y la activación de la PFK por AMP es de gran importancia, pues provee de un estricto sistema de control recíproco entre ambas enzimas.

Estudiando los niveles de metabolitos con homogenatos de hígado Krebs (84) demostró que en ausencia de lactato el agregado de AMP producía una acumulación de FDP. Este resultado es consistente con la interpretación de que en ausencia de lactato, el AMP inhibe a la fructosa-1,6-difosfatasa. En presencia de lactato o de otros precursores gluconeogénicos esta inhibición se revierte. En efecto, por oxidación de lactato a piruvato el NADH disponible aumenta, permitiendo reducir el DHAP en a-glicerofosfato, lo cual desplazaría el equilibrio entre el FDP y las triosas fosfato hacia la formación de estas últimas. De esta forma el efecto inhibidor del FDP sobre la fructosa-1,6-disfofatasa disminuiría apreciablemente.

Por otra parte, la oxidación del lactato por vía del ciclo de

Krebs (acoplado a la fosforilación exidativa) aumentaría la conversión del AMP en ATP, disminuyendo el efecto inhibidor del primero sobre la fructosa-l,6-difosfatasa y permitiendo canalizar el flujo de metabolitos en el sentido gluconeogónico. Estos efectos quedan aun por verificerse "in vivo".

En la actualidad existen evidencias que indican que la fructosa-1,6-difosfatasa puede existir en dos estados interconvertibles en
tre sf. La conversión de las distintas formas de esta enzima no involu
cra cambios de asociación o disociación de sus subunidades. El paso de
inactiva a activa es dependiente de la temperatura y del pH del medio
de incubación y se inhibe por FDP (85). La significación fisiológica de
este fenómeno no se conoce.

La conversión del piruvato en PEP en el hígado y en la corteza renal puede ocurrir hasta el presente por tres caminos metabólicos distintos que se exponen en la Fig.2.

Distintas evidencias indican que en los mumíferos los mecanismos I y III tienen poca importancia fisiológica en la gluconeogénesis (86-89).

- 1) La actividad de la piruvato quinasa en el sentido de la formación de PEP es muy baja, como se señaló anteriormente.
- 2) El valor de la Km de la piruvato quinasa y de la enzima málica para el piruvato y CO₃H⁻ respectivamente es superior a la concentración físio-lógica de estos metabolitos en los tejidos mencionados (86-89).

Por el contrario, el rol fisiológico del mecanismo II está apoyado por la presencia de la piruvato carboxilasa y PEP-carboxiquinasa en el hígado y en la corteza renal. El valor de la Km para los sustratos de

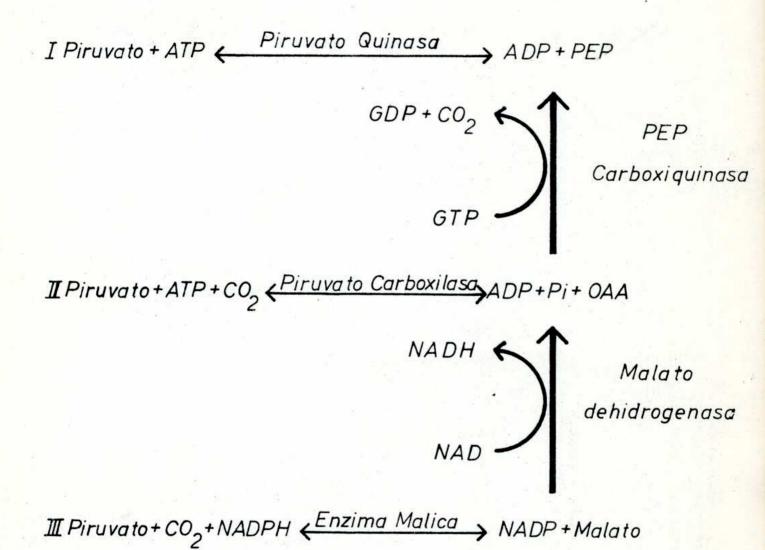


Fig. 2. Mecanismos posibles para la síntesis de PEP.

estas enzimas está por debajo de la concentración fisiológica de los mismos en estos tejidos (86-89). La importancia de la piruvato carboxilasa como enzima potencialmente gluconeogénica está apoyada directamente por el hecho de que los tejidos que no tienen esta función carecen de la misma.

El mecanismo II requiere dos equivalentes de ATP (ATP + GTP)
para la síntesis de PEP, mientras que el mecanismo I requiere uno solo.

De acuerdo a ésto el mecanismo I es altamente endergónico en el sentido de la gluconeo génesis y constituye una barrera energética. El mecanismo II es exergónico y por lo tanto no presenta ningún obstáculo energético.

c) Piruvato carboxilasa:

En el hígado y en la corteza renal la piruvato carboxilasa se encuentra localizada en la mitocondria y cataliza la siguiente reacción:

ATP +
$$CO_2$$
 + Enzima \longrightarrow ADP + Pi + Enzima- CO_2
Enzima- CO_2 + piruvato \longrightarrow Enzima + OAA
ATP + CO_2 + piruvato $\xrightarrow{Mg^{++}}$ OAA + ADP + Pi

La enzima tiene un requerimiento absoluto de Acetil-CoA para que la primera etapa de la reacción ocurra (89,90). Este metabolito es un activador alostérico de la misma y su efecto depende marcadamente del pH del medio de incubación (90,91). Utter y col.(89) y Krebs (29) han se ñalado que la activación de la piruvato carboxilasa por el Acetil-CoA es un mecanismo de control muy importante en la síntesis de OAA a partir de piruvato. En efecto, el OAA es un intermediario necesario para la oxidación del Acetil-CoA en el ciclo de Krebs. Por otra parte, la conversión de piruvato en OAA es el mecanismo principal de la síntesis de intermedia

rios del ciclo tricarboxílico y constituye un sitio de control para la formación de sustratos a partir de dichos intermediarios, como por ejem plo el PEP.

al APP es un inhibidor competitivo de esta enzima con respecto al ATP (88). Aunque el sentido fisiológico de esta inhibición no se cono ce, algunas evidencias indicarían que cambios en la relación APP/ATP en la mitocondria modificarían la actividad de la piruvato carboxilasa. El nivel de esta enzima se encuentra bajo control hormonal y nutricional. (92, 93).

d) FEP-carboxiquinasa:

Esta enzima catalina la siguiente reacción:

El nivel de esta enzima fluctúa marcadamente en distintas condiciones hormonales y nutricionales (89,94,95). Hasta el presente no se conoce ningún tipo de control de su actividad por metabolitos.

La distribución intracelular de esta enzima varía según la especie (26). En el hígado y en la corteza renal de rata está localizada en el citoplasma de las células (96,97), mientras que en el hígado de paloma es intramitocondrial (98). En otros casos esta enzima puede estar en ambas fracciones celulares (96).

Debido a la distinta distribución intracelular de la piruvato carboxilasa y la PEP-carboxiquinasa en el hígado de rata, y a que la mitocondria es impermeable al CAA, Lardy y col.(99) y Haynes (100) han propuesto la existencia en este tejido de un mecanismo por el cual el CAA se transfiere al citoplasma permitiendo el acoplamiento de las reacciones que

catalizan las enzimas mencionadas. Este hecho permite a la célula tener otros sitios suceptibles de control metabólico (99).

En las especies en las cuales la piruvato carboxilasa y la PEP-carboxiquinasa se encuentran en la mitocondria, se cree que el PEP sintetizado por estas enzimas atraviesa libremente la membrana (101). Sin embargo, no se puede descartar que exista un sistema específico de transporte para este metabolito (102).

Regulación de la glucólisis y gluconeogénesis.

Atkinson señaló que la regulación de las etapas unidireccionales de la glucólisis y gluconeogénesis mediante la clausura total de una u otra vía metabólica, según la dirección del flujo de intermediarios en las mismas, representaría un sistema de control muy eficaz que evitaría el acoplamiento entre las roucciones de distinto sentido con gasto do la energía celular (28).

Sin embargo, existen evidencias que indican que la supresión de la actividad de una vía metabólica cuando funciona la opuesta no es total, y el flujo neto de intermediarios en uno u otro sentido parece estar regulado por los cambios recíprocos en la actividad de las enzimas que catalizan reacciones opuestas. De esta forma las vías metabólicas tendrían un cierto funcionamiento basal (26).

Cambios recfprocos en la actividad de la PFK y la fructosa-1,6-difosfatasa pueden modificar a este nivel el flujo de intermediarios en uno u etro sentido del metabolismo (Fig.1). El hecho de que la PFK sea regulada por varios inhibidores (ATP y citrato) y activadores (AMP y Pi), le da mayor capacidad de control que a la fructosa-1,6-difosfatasa, la cual es solamente inhibida por AMP. De este modo, el gasto de energía por el funcionamiento basal de estes corto circuitos metabólicos está compensado por

una mayor flexibilidad en la regulación de la actividad enzimática (26).

Cuando se compara la relación entre la actividad máxima de las enzimas que catalizan las reacciones unidireccionales de la glucólisis y gluconeogénesis (calculados a partir de la recopilación de Scrutton y Utter (32) o de los expuestos por deber y col. (103)) se puede ver que la actividad de las enzimas que catalizan las dos últimas etapas de la gluconeogénesis predomina sobre la de las enzimas glucolíticas:

Por el contrario, la relación entre la suma de la actividad de la PEP-carboxiquinasa y la piruvato carboxilasa con la piruvato quinasa es muy pequeña, indicando que la actividad de esta última enzima es mucho mayor que la de las otras dos.

Como consecuencia de que la relación entre estas enzimas es tan desfavorable en el sentido de la gluconeogénesis, todo el PEP formado por la vía señalada anteriormente (Fig.2) será nuevamente convertido en piruvato dando lugar a un corto circuito metabólico continuo con el gasto de un equivalente de ATP (GTP).

El control de la glucólisis a nivel de la piruvato quinasa en el hfgado y en la corteza ronal es un sitio estratégico de regulación, ya que cambios recíprocos de la actividad de esta enzima y de las que parti-

cipan en la síntesis de PEP determinarán la dirección del flujo de este metabolito en el sentido de la glucólisis o de la gluconcogónosis.

Piruvato Quinasa

Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

PEP + ADP
$$\xrightarrow{K^+}$$
 Piruvato + ATP

De acuerdo a lo quo se mencionó anteriormente, nuestro interés se dirigió al estudio de las propiedades cinéticas de la piruvato quinasa hepática. Trabajos efectuados en distintos laboratorios han demostrado que en el hígado de rata existen dos isoenzimas denominadas tipo L y
tipo M (104-106).

Ambas formas de piruvato quinasa han sido caracterizadas en base a sus propiedades inmunológicas y a su movilidad electroforótica. Los anticuerpos específicos preparados con la enzima de músculo esquelético neutralizan únicamento a la isoenzima M (107).

La separación de ambas formas de piruvato quinasa hepática puede ser efectuada mediante diferentes procedimientos tales como electroforesis en distintos sistemas, precipitación fraccionada con sulfato de amonio y cromatografía en DEAE-celulosa y Cii-celulosa. Además, estudios efectuados en nuestro laboratorio han permitido desarrollar un nuevo método de purificación de la isoenzima L en columnas de CM-celulosa basado en la elución selectiva de la misma por sus efectores alestóricos (108).

La piruvato quinasa tipo L representa un 66-70% de la actividad total y se la considera típica del hígado. Por el contrario, la iscenzima M parece estar presente en todos los tejidos, y su nivel en dicho órgano

es constante. La relación entre la concentración de la forma L y la forma M en condiciones normales es aproximadamente 3.0 (107).

Sin embargo, debido a que el nivel de la piruvato quinasa hepática varía en diferentes condiciones dietéticas y hormonales (72,108-112) a expensas de cambios en la concentración de la isoenzima L el valor de la relación de actividad entre ambas formas (L/M) no es constante (107).

Así por ejemplo, durante el ayuno prolongado, la alimentación hiperproteica (dietas ricas en caseína) y en la diabetes, el nivel de la isoenzima L disminuye apreciablemente y la relación L/M es cercana o menor que la unidad. De esta forma el 50-60% de la actividad total de piruvato quinasa hepática está representada por la isoenzima M (107).

Por el contrario, la alimentación con carbohidratos o la administración de insulina aumentan apreciablemente el nivel de la piruvato quinasa hepática tipo L.

El hecho de que la concentración intracelular de esta enzima sea modificada en forma muy marcada por distintos factores sugiere que la misma es una protefna reguladora, cuya actividad posiblemente también sea controlada por metabolitos activadores e inhibidores (107).

Algunas de las propiedades cinéticas de la isoenzima L encontradas independientemente en nuestro laboratorio y en otros, antes de la iniciación del estudio que comprende esta tesis, serán comentadas en la siguiente sección.

Finalidad de la presente investigación

Toniendo en cuenta que en el hígado la regulación de la actividad de la piruvato quinasa tipo L y tipo M representa un importante
sitio de control metabólico, el interés de la presente investigación fue
estudiar las propiedades cinéticas de estas isoenzimas.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio y simultáneamente en otros (106,113-115), demostraron que la isoenzima L tiene propiedades distintas a las de la piruvato quinasa de músculo esquelético:

- 1) La curva de velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de PEP es sigmoide, indicando que la enzima tiene un marcado efecto cooperativo homotrópico para dicho sustrato (106,113-115).
- 2) En presencia de FDP la enzima se activa marcadamente y la curva de sa turación para el PEP se transforma en una hipórbola. En estas condiciones, la cinética con respecto a este sustrato es Nichaeliana y la afinidad de la enzima por el mismo aumenta apreciablemente (113-117).
- 3) Tanaka y col.(114) encontraron que el ATP inhibe a la isoenzima L de hígado, pero las características cinéticas de este fenómeno no fueron estudiadas detalladamente.

De acuerdo a estos resultados la regulación de la piruvato quinasa hepática tipo L se efectuaría por cambios en el efecto cooperativo
homotrópico para el PEP en presencia de efectores alostéricos negativos o
positivos. Sin embargo, un aspecto de la regulación metabólica de conside
rable interés, tal como la influencia del pH en el comportamiento cinéti-

co de esta enzima no había sido aún estudiado.

Trabajos efectuados en distintos laboratorios con enzimas alostéricas de diferente origen han demostrado que el pH es un factor de gran importancia en la modulación de su actividad, como también en la respuesta a los efectores alostéricos.

Asi por ejemplo, Trivedi y Danforth (118) encontraron que la PFK presenta cambios notables de actividad como respuesta a pequeñas variacio nes en el pH del medio de incubación. Por otra parte, Gerhart y Pardee (119) estudiando las propiedades de la aspártico transcarbamilasa demostra ron que las mismas se modificaban drásticamente a diforentes valores de pH.

Resulta relevante también mencionar que en estudios preliminares efectuados en nuestro laboratorio con la isoenzima L de hígado de ratón (115) se demostró que la activación de esta enzima por el FDP dependía mar cadamente del pli del medio de incubación.

Por consiguiente, resultó de gran interés estudiar detalladamente la influencia del pH sobre el comportamiento cinético de la piruvato quinasa hepática tipo L.

Como se mencionó anteriormente, en condiciones normales la relación de actividad entre las isoenzimas L y M es aproximadamente 3.0. Sin embargo, durante la Eluconocgénesis extrema esta relación es menor que 1.0 indicando que la mayor parte de la actividad de piruvato quinasa hepática está representada por la isoenzima M, de manera tal que el control metabólico de la misma es de primordial importancia.

Con el fin de disponer de un panorama completo sobre el control de la actividad de la piruvato quinasa hepática, resultó también de interés estudiar las propiedades cinéticas de la isoenzima M.

En la corteza renal, el otro tejido gluconeogénico de los mamíferos, también se ha demostrado (mediante procedimientos electrofóréticos)
la presencia de isoenzimas de piruvato quinasa (104-107,120). Sin embargo,
las propiedades cinéticas de las mismas no han sido aun estudiadas. Además,
algunos resultados previos obtenidos con extractos crudos no son coinciden
tes respecto a la activación per FDP (105,107).

Por lo tanto, nuestro objetivo también incluyé el estudio de las propiedades cinéticas de las isoenzimas de corteza renal, con el fin de aclarar las contradicciones mencionadas y comprobar si las mismas tienen características similares a las de la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo M.

TI MATERIALES Y METODOS

Reactives.

El ATP, UTP, GTP, 5' AMP, 3'5' AMP efelico, 5' UMP, UMBP, DHAP, 2-PGA (sal de bario), 3-PGA (sal de bario), G-6-P, PDP, P-creatina, carba mil-P, MADH, Tris (base libre), EDTA, clicilclicina (base libre) y amino-feidos se obtuvieron de Sigma Chemical Company (EE,UU.).

El ADP y PEP fueron obtenidos de Boehringer y Soehne (Alemania).

El ditiotreitol, EES, TES y HEPES se recibieron de Calbiochem (EE.UU.). El hidróxido de TMA lo fue de The British Drug Houses (Gran Bretaña).

La CM-celulosa y la DEAE-celulosa fueron obtenidas de Bio-Rad Laboratory (EE.UU.) y de Serva (Alemania) respectivamente. La Sefadex G-25 fue adquirida en Pharmacia (Alemania).

Todas las otras drogas emploadas fueron de origen diverso y de un alto grado de pureza.

Enzimas.

La lactato dehidrogenasa, piruvato quinasa (de músculo esquelético utilizada en algunos experimentos como enzima auxiliar), enclasa, triosafosfato isomerasa, aldolasa y la glicerofosfato dehidrogenasa, preparadas a partir de diferentes fuentes se obtuvieron de Sigma Chemical Company (EE.UU.).

Hotodos analíticos.

1. Protoinas.

La determinación de proteínas se efectuó de acuerdo al método de Lowry y col.(121) después de precipitar con 5% de ácido tricloro-

acético.

2. Intercambiadores iónicos.

La DEAE-celulosa y CM-celulosa fueron lavadas y ajustadas al pH al que se las utilizó, de acuerdo al método de Peterson y Sober (122).

La Dowex-50 (H⁺) se lavé previamente con agua destilada para eliminar impurezas coloreadas solubles.

Ensayos enzimáticos.

1. Piruvato quinasa.

a) Método colorimétrico.

Durante el proceso de purificación la actividad de piruvato quinasa se midió por la formación de piruvato de acuerdo al método descripto por Friedemann y Haugen (123) modificado por Leloir y doldemberg (124). La mezcla de incubación contenía Tris-HCl 100 mM pH 7.5, ClK 100 mM, SO₄HC 10 mM, ADP 3.0 mM, PEP 3.0 mM y enzima en un volumen final de 0.150 ml. En los blancos de reacción se omitió el agregado de ADP. Las incubaciones se efectuaron a 30°C durante 3 minutos. La densidad óptica se midió a 520 mu

Los resultados de las distintas etapas de purificación de las iscenzimas L y E se expresaron en unidades de actividad de piruvato quinasa por miligramo de proteína (actividad específica).

La unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un micromol de piruvato por minuto en las condiciones especificadas de ensayo.

b) Método espectrofotométrico.

En los estudios cinéticos efectuados, la actividad de piruvato

quinama se midió acoplando al sistema lactato dehidro, enasa y NADN de acuerdo al método de nüchor y l'fleiderer (125).

La mezcla de incubación contenía Tris-Haleato 100 mL, pH 7.5, Clk 100 mL, SO Mg 10 mL, ADP 2.0 mM, PEP 2.0 mL, NADH 0.2 mL, exceso de lactato dehidrogenasa, en un volumen final de 0.5 ml, excepto en ciertos ensayos en los cuales el Tris-Haleato se reemplazó por otros bufferes según se indica en los experimentos. La reacción se inició por el agregado de enzima y la exidación del NADH fue registrada a 340 mu en forma continua en un espectrofotómetro Gilford Modelo 2000 con cambiador automático de muestras, has incubaciones se efectuaron a 30°C. Los resultados obtenidos se expresan en milimicromoles de piruvato formados por minuto, calculados luego de 20 segundos de iniciada la reacción.

La unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de l micromol de NADH por minuto en las condiciones especificadas de ensayo.

2. Enolasa.

La actividad de enclasa so determinó de acuerdo al método descripto por Grisolfa (126) para la estimación de 2-3-PGA con algunas mo dificaciones (127). La mexcla de incubación contenfa Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, CTH 400 mM, 50 Mg 10 mM, ADP 2.0 mM, 2-PGA 1.0 mM, HADH 0.2 mM, exceso de piruvato quinasa y lactato dehidrogenasa en un volumen de 0.5 ml. La reacción se inició por el agregado de enzima y la exidación del NADH se midió como se indicó anteriormente. Las incubaciones se efectuaren a 30°C. El 2-PGA sal de bario fue convertido antes de utilizarse en forma ácida por pasaje a través de una columna de Dowex-50 (H⁺). El elufdo se neutralizó con hidróxido de sodio. La concentración de 2-PGA fue determinada valorando el fósforo total esterificado de acuerdo al mětodo de Piske y Subbarou (128).

3. Aldolasa.

La actividad de aldolasa se determinó de acuerdo al método des cripto por Mandl y Neuberg (129) para la estimación de FDP, con algunas modificaciones. La mezola de incubación contenía Pris-HCl 100 mM, pH 7.5, FDP 0.1 mM, MADH 0.2 mM, exceso de triosafosfato isomerasa y glicerofosfato dehidrogenasa en un volumen de 0.5 ml. La reacción se inició por el agregado de enzima. La exidación del NADH se midió como se indicó anteriormente y la temperatura de incubación fue de 30°C.

4. Fructosa-1, 6-difosfatasa.

La actividad de fructosa-1,6-difosfatasa se determinó de acuer do al método descripto por Pontremoli y col. (130) con algunas modificaciones. La mescla de incubación contenfa Tris-HCl 100 mM, pH 7.5, FDP 1.0 mM, Cl₂ig 1.0 mM en un volumen final de 0.2 ml. La reacción se inició por el agregado de enzima y la actividad se midió por liberación del Pi formado de acuerdo al método de Fiske y Subarros (128).

Purificación de la piruvato quinasa hepática Tipo L y Tipo h.

Los métodos empleados en la preparación y purificación de ambas formas de piruvato quinasa hepática con excepción de algunas modificaciones que se indican, fueron similares a los descriptos en la literatura (106,107,115).

1. Preparación del sobrenadante de 100.000 xg conteniendo ambas formas de piruvato quinasa hepática.

Se utilizó rata: de 150-200 gramos, alimentadas con una dieta balanceada y agua ad libitum. Los animales fueron sacrificados por decapitación y se los dojó desangrar exhaustivamente. El hígado fue

rápidamente extraído, pesado y homogeneizado con un volumen y medio de una solución que contenía buffer Tris-HC1 25 mM, pH 7.5, EDTA 1.0 mM, ClK 150 mM y sacarosa 250 mM. En el curso de esta etapa y on las subsiguientes la temperatura se mantuvo a 4°C.

El extracto crudo, por lo general de un volumen de 200 ml, fue centrifugado a 8000 xg durante 20 minutos para eliminar restos de teji dos. El sobrenadante obtenido fue nuevamente centrifugado a 100.000 xg por 60 minutos, en una centrífuga preparativa Spinco Modelo L.

Después de esta etapa el sobrenadante de 100.000 xg fue utilizado indistintamente en la purificación de la piruvato quinasa tipo L y M según el procedimiento que se indica a continuación para cada una de ellas.

2. Piruvato quinasa hepática tipo L.

El sobrenadante de 100.000 xg, aproximadamento 100 ml fue fraccionado con solución de sulfato de amonio entre 30-45, de saturación. El precipitado obtenido se suspendió en un pequeño volumen (aproximada mente 10 ml) de una solución quo contenía Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, EDTA 1.0 mM y sacarosa 250 mM. Para eliminar ol sulfato de amonio, la preparación enzimática fue cromatografiada por una columna de Sefadex G-25 de 30 mm de diametro y 350 mm de altura. Esta fue previamente equilibra da, haciendo pasar 1.000 ml de la solución utilizada en la resuspensión del precipitado. La ausencia de sulfato de amonio en cada una de las fracciones recogidas fue determinado con solución de hidróxido de bario.

Esta preparación (20 ml), que contenía unos 800 miligramos de proteínas fue aplicada a una columna de DEAE-celulosa de 20 mm de diametro y 250 mm de altura, equilibrada de igual forma que la columna de Sefadex G-25. Después de absorbida la preparación, se lavó exhaustiva-

mento haciendo pasar 500 ml de la solución de equilibrio.

La clución de la onzima so efectuó de acuerdo a Susor y Mutter (106) haciendo pasar un gradiento lineal de una solución de buffer Tris-HCl, pli 7.5 entre 25 y 300 mM que además contenía EDTA 1.0 mM y sacarosa 250 mM. El flujo de la columna fue de 3 ml por minuto. Los volumenes correspondientes al lavado y al gradiente se recogieron en 60 fracciones de 15 ml cada una.

En estas condiciones la enzima eluyo en forma de un pico simétrico a partir de una concentración de 120 mH de Tris-HCl. Estas características fueron reproducibles en todas las cromato rafías efectuadas y el grado de purificación alcanzado fluctuó entre 10 y 15 veces con respecto a la fracción de Sefadex G-25 que se aplicó a la columna.

Los resultados del proceso de purificación de la enzima se exponen en la Tabla 3. Se puede aprociar que después de las cuatro etapas descriptas la purificación alcanzó 50 veces y el percentaje de recuperación fluctuó entre 2-4,5 en la mayorfa de los casos. Las preparaciones obtenidas están libres de aldolasa, enclasa pero contienen fructosa-1,6-difesfatasa.

Durante la purificación de la piruvato quinasa hepática tipo L a partir de hígado de rata, se observó que la enzima pierde actividad si se la guarda a 4°C sin ninguna protección. Aunque la inactivación ocurre en todas las etapas, la misma es mucho mas marcada después de la cromatografía en DEAE-Celulosa, en la cual la concentración de proteínas es monor.

La estabilización de la enzima en la última etapa de purificación se consiguió durante 84 horas por el apregado de sacaresa 250 mH y
de ditiotreitel 1.0 mM. Este resultado también ha sido observado por
Tanaka y col. (107) con la diferencia de que además de este reactivo, la

TABLA III

Purificación do la piruvato quinasa hepática Tipo L

r'racción	Volumen / ml.	Proteina total mg.	Actividad ospocífica	ractor de purificac.	Recupe- ración
Homogenato	220	23•7 x 10 ³	0•2	1.0	100
100.000 xg	100	5.8 x 10 ³	0.42	2.0	50
Sefadex G-25	20	υ•β6 x 10 ³	U•70	3.5	12
DEAE_Celulo-	60	0.98 x 10	10	50	2

<u>a</u> La actividad ospecífica se expresé en unidades de piruvato quinasa por miligramo de proteína.

preparación enzimática fue protegida en presencia de 0.5 mM de PEP y ADP respectivamente.

3. Piruvato quinasa hepática tipo M.

La purificación de la piruvato quinasa hepática tipo M se efectuó a partir del sobrenadante de 100.000 xs, el cual se obtuvo como se indicó anteriormente. No obstante, convione destacar que el volumen del homogeneizado que se preparó con este fin fue menor.

El sobrenadante fue fraccionado con solución de sulfato de amonio entre 55-70% de saturación. El precipitado obtenido fue resuspendido en un pequeño volumen de una solución que contenía buffer Tris-Malea
to 10 mM, pH 6.0, EDTA 1.0 mM y ditiotreitol 1.0 mM.

El sulfato de amonio presente en la preparación fue eliminado por cromatografía en Sofadex G-25. La columna empleada fue de 25 mm de diametro y 200 mm de altura y se la equilibró haciendo pasar 700 ml de la solución con que se resuspendió el precipitado. La ausencia de sulfa to de amonio en las fracciones recogidas se detectó como se indicó ante riormente.

La preparación obtenida, de unos 200 miligramos de proteína, fue aplicada a una columna de CM-colulosa de 18 mm de diametro y 200 mm de altura equilibrada del mismo modo que la columna de Sefadex G-25. Terminada la adsorción, la resina se lavó haciendo pasar 50 ml de la solución de equilibrio. La elución se efectuó aplicando un gradiente lineal entre 0 y 160 mM de una solución de ClK que además contenía los reactivos presentes en la solución. Los volumenes correspondientes al lavado y al gradiente fueron recogidos en fracciones de 2.0 ml cada uno. Duram te esta etapa de purificación, la enzima pierde mucha actividad. Sin embargo, ésto se pudo provenir efectuando la cromatografía rápidamente, ajustando el flujo de la columna entre 6 y 8 ml por minuto. En estas con

diciones la enzima eluye en forma de un pico simétrico a una concentración de 70 mil de ClK.

El grado de purificación alcanzado después de la cromatografía en CH-Celulosa fue de 8 a 10 veces respecto de la fracción de Sefadex G-25. Este valor ha sido considerado como el grado total de purificación, ya que el valor obtenido después de la cromatografía en Sefadex G-25 no puede ser comparado con respecto al homogenato, si se considera que en éste la isoensima # sólo representa menos de la tercora parte de la actividad total de piruvato quinasa hepática. Debido a la ines tabilidad de las preparaciones se las utilizó 24 horas después de obtenidas. Las mismas fueron libros de aldolasa, enclasa y fructosa-1,6-di fosfatasa.

III RESULTANOS

Piruvato quinaca hepática Tipo L

Estudios previos efectuades en nuestro laboratorio con prepara ciones de piruvato quinasa hepática tipo L obtenidas a partir de hígado de ratón demostraron que la activación de esta enzima por el FDP depende del pH del medio de incubación (115). Este fenómeno fue estudiado en el presente trabajo en forma mucho mas detallada con la enzima purificada a partir de hígado de rata.

Activación de la piruvato quinasa hepática tipo L por ol FDP en función de la concentración de PEP y del pll.

La activación por PDP se determinó a concentraciones de 0.2, 1.0 y 5.0 mH de PEP y a diferentes valores de pH de la mezcla de incubación. La actividad enzimática se midió en ausencia y en presencia de 0.1 mH de PDP.

Los resultados obtenidos en este experimento se expresaron como relación de activición, la cual está dada por la siguiente expresión:

Relación de activación =
$$\frac{\text{Vi + A}}{\text{Vi - A}}$$

donde Vi + A es la velocidad inicial de la reacción en presencia del activa dor.

Vi - A es la velocidad inicial do la reacción en ausoncia del activador.

De esta forma se puede comparar entre sí el efecto del r'DP en cada una de las condiciones indicadas.

Como se indica en la Fig.3, a pH 5.9 el valor de la relación de activación a las tres concentraciones de PEP empleadas fue 1.0, demostran-

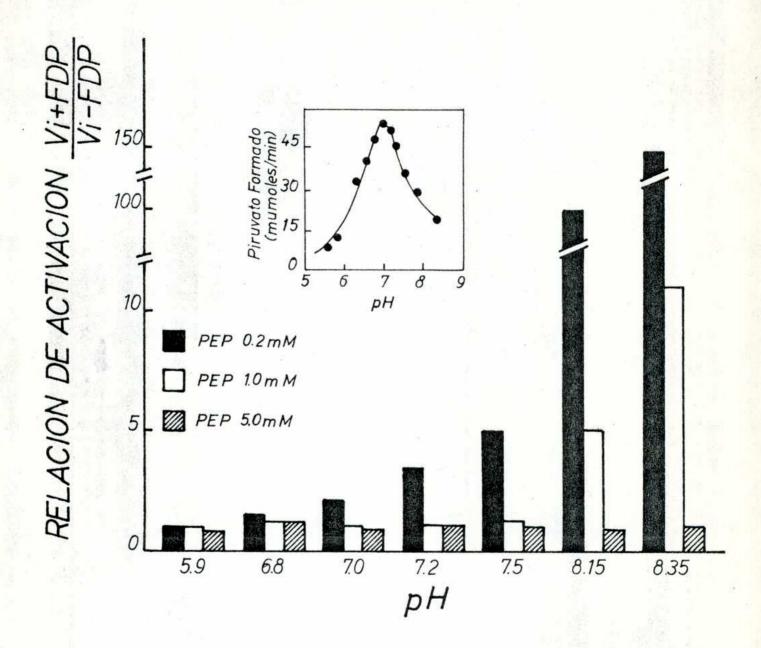


Fig. 3. Activación de la piruvato quinasa hepática tipo L por el FDP en función del pH y a diferentes niveles de PEP. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos, excepto el pH del buffer y la concentración de PEP que varió como se indica. La actividad se midió en ausencia y en presencia de FDP 0.1 mM. Los resultados mediante la relación de activación como se indicó en el texto.

do que a este oil el agregado de PoP no modifica la actividad ensimática.

bajo do PEP (0.2 mi) la relación de activación aumento apreciablemente al canzando el máximo al pil mas alcalino. Se puede apreciar que a esta concentración de sustrato y a pil 8.35 el valor obtenido fue de 150, lo cual indica un marcado efecto activador del PDP sobre la piruvato quinasa hepática tipo L.

Es interesante destacar que a un nivol alto de PEP (5.0 mm) el valor de la relación de activición fue de 1.0 y no varió a ninguno de los valores de pil en los que se efectuó las determinaciones. Además, a una con contración intermedia de PEP (1.0 mm) el PDP activa únicamente a valores de pil superiores a 8.0.

dor del rDP a diferentes valores de pli se debe a un marcado cambio en la afinidad de la enzima por el PEP y no a modificaciones en la velocidad máxima de la reacción, ya que a un nivel próximo a la saturación (5.0 mil) no hubo cambios en la relación do activación.

Pambién se muestra (Fig.3) que la curva de pli éptimo de la enzima fluctúa entre é.o y 7.2.

Variación de la actividad de la piruvato quinasa hopática tipo L en función de la concentración do PEP y ADP a diferentes valores de pli.

El experimento emprento en la Pig. 3 demostró que la activación de la piruvato quinasa hepática tipo i por el PDP depende marcadamente del pil del medio de incubación.

La posibilidad de quo esto factor también modificase las propieda des cinéticas de esta enzima con respecto al PEP fue estudiada.

En la Fig.4-A se puede vor que a pli 8.15 (a un nivel saturante de ADP, 2.0 m.1). La curva de velocidad inicial de la reacción en función de

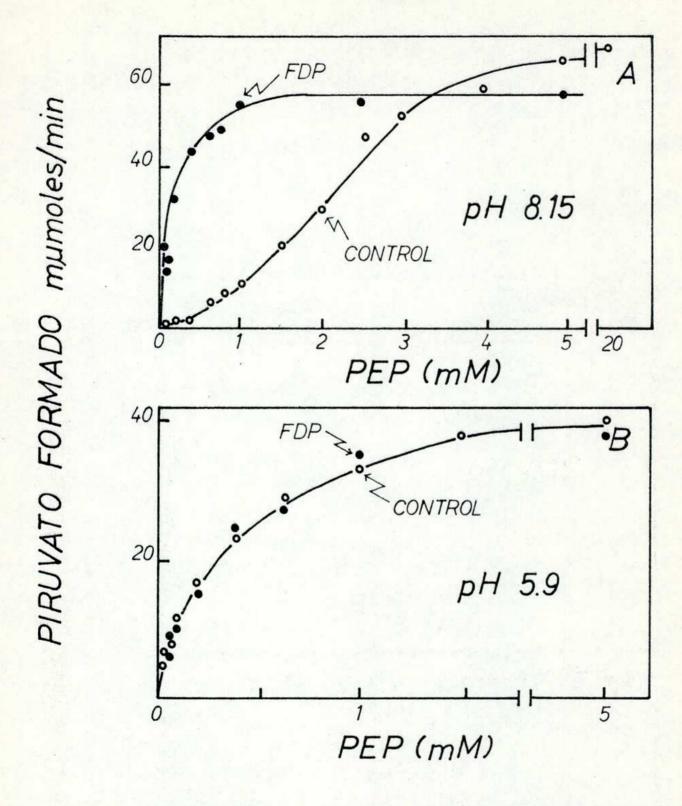


Fig. 4. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de PEP a pH 8.15 y 5.9. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos, excepto el pH del buffer como se indica.

la concentración de PEP es sigmoide, indicando que la enzima tiene un marcado efecto cooperativo homotrópico para este sustrato.

Por el contrario, cuando el mismo experimento se efectuó en presencia de 0.1 mM de FDP, la curva de saturación del PEP se transforma de
sigmeide en una hipórbola Michaeliana. Se puede ver además que a niveles
altos de PEP (2.5 mM) el FDP es necesario para alcanzar la velocidad máxima. Cabe mencionar que la disminución de la velocidad máxima observada en
presencia de este metabolito no fue obtenida en etros experimentos.

La curva de saturación del PEP a pH 5.9 es distinta. Como se observa en la Fig.4-B, la misma tiene forma hiperbólica y el agregado de 0.1 mH de FDP a la mezela de incubación no tiene efecto activador.

Para cuantificar los resultados de experimentos cinéticos obtenidos con enzimas rejuladoras, se utiliza la ecuación de Hill (12), la cual está dada por la siguiente expresión:

$$\log \left(\frac{\mathbf{v}}{\mathbf{v} - \mathbf{v}} \right) = n \log S - \log K$$

donde v es la velocidad inicial do la reacción

V es la velocidad máxima de la reacción

S os la concentración del ligando cuyo efecto se estudia

n es una constante

 \mathbf{n}_{li} es un valor que depende del grado de interacción y del número de sitios interactuantes.

Cuando existe una fuorte interacción entre los receptores, el valor de la pendiente que se obtiene después de graficar los datos experimentales según esta ecuación, se aproxima al número de sitios que tiene la enzima para el ligando (12).

Cuando las enzimas siquon una cinética clásica, la constante de

Lichaelis (Km) y la velocidad máxima (Vmax) son suficientes para relacionar la velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de sustrato.

Por el contrario si la cinética es sigmoide unicamente es aplica ble la <u>Vmax</u>. En estos casos, la concentración de sustrato nocesaria para obtener la mitad de la <u>Vmax</u> se la ha designado constante S_{0.5} (131). El valor de la misma se obtiene graficando la ecuación de Hill.

Los resultados experimentales mostrados en la rig.4-A y B se han representado de acuerdo a dicha ecuación. En la rig.5 se puede ver que a pli 8.15 el valor del coeficiente n_H es de 2.4 lo cual indica una marcada cooperatividad de la enzima para el PEP. La presencia de FDP modifica la respues ta de la misma y el valor de n_H obtenido fué de 1.19.

A pH 5.9 no hay cooperatividad para este sustrato. El agregado de 0.1 mH de PDP a la mezcla de incubación no produce ningún cambio en la característica de control de la enzima por el PEP. El valor de $n_{\rm H}$ fue de 1.03 en ausencia y en presencia del activador.

A partir de los mismos datos se calculó la afinidad aparente de la ensima para el PEP. El valor de $S_{0.5}$ obtenido a pH 5.9 en ausencia y en presencia de FDP fue de 0.32 mM. A pH 8.15 la afinidad de la ensima por el PEP es menor y el $S_{0.5}$ que se octuvo en estas condicionos fue de 2.1 mM. El aprezado de 0.1 mM de FDP aumenta notablemente la afinidad de la ensima por el sustrato. En presencia del activador el valor de $S_{0.5}$ fue de 0.23 mM.

Para determinar si cambios en el pH del medio de incubación modiricaban también la respuesta de la enzima a variaciones en la concentración de ADP se efectuó un experimento similar al expuesto en las figuras 4-A y B pero a un nivel saturanto de PEF (5.0 mH).

los resultados obtenidos se han expresado de acuerdo a la ecuación

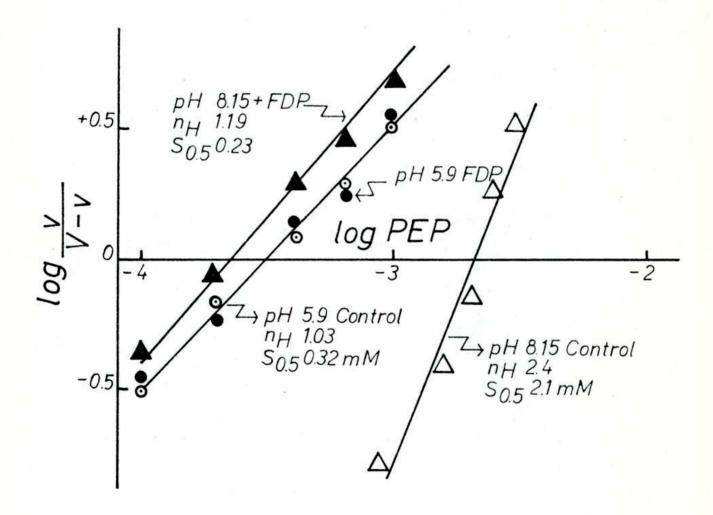


Fig. 5. Gráficos de Hill calculados a partir de los datos experimenta les expuestos en la Fig. 4.

de Linoweaver-Burk (132). Como se puede aprociar en la Fig.6, los mismos dan una relación lineal tante a pli 8.15 y 5.9. Los valores de Em calcula dos a partir de los mismos datos fueron de 0.5 y 1.4 mli respectivamente. El agregado de PDP no tuvo efecto activador, aun a concentraciones bajas de ADP (0.2 ml).

Estos resultados indican que las variaciones en el pH del medio de incubación únicamente modifican marcadamente la afinidad de la enzima por el PEP.

Comportamiento de la piruvato quinasa hepática tipo L con distintos buffores.

Los experimentos expuestos en las Fig.3, 4 y 6 se efectuaron utilizando buffer Tris-Aleato. Con el fin de demostrar que el efecto del pH sobre las propiedades de la enzima no depende del buffer empleado en el medio de incubación, se estudió la activación por el FDP a pH 5.9 y 8.15 en presencia de diferentes bufferes. La concentración de PEP que se eligió para este experimento fue de 0.2 mH. En estas condiciones y a pH alealino la activación por el FDP es muy marcada (Fig.3 y 4-A).

Los resultados de la Tabla 4-A expresados mediante la relación de activación demuestran que aunque la actividad de la enzima varía según los diferentes bufferes empleados, el efecto activador del FDP únicamente ocurre a pN 8.15.

También se demostró que pequeñas variaciones del pH del modio de incubación modifican totalmente la activación por este metabolito. En efecto como se ve en la Tabla 4-B a pH 6.8 ol FDP no modifica la actividad de la enzima.

Por el contrario a pli 7.2 la activación es apreciable. Los resultados obtenidos demuestran que los cambios en las propieades de la enzima expuestos anteriormente (Fig.3 y 4) dependen unicamento del pli del medio de incubación y no del buffer empleado en el mismo.

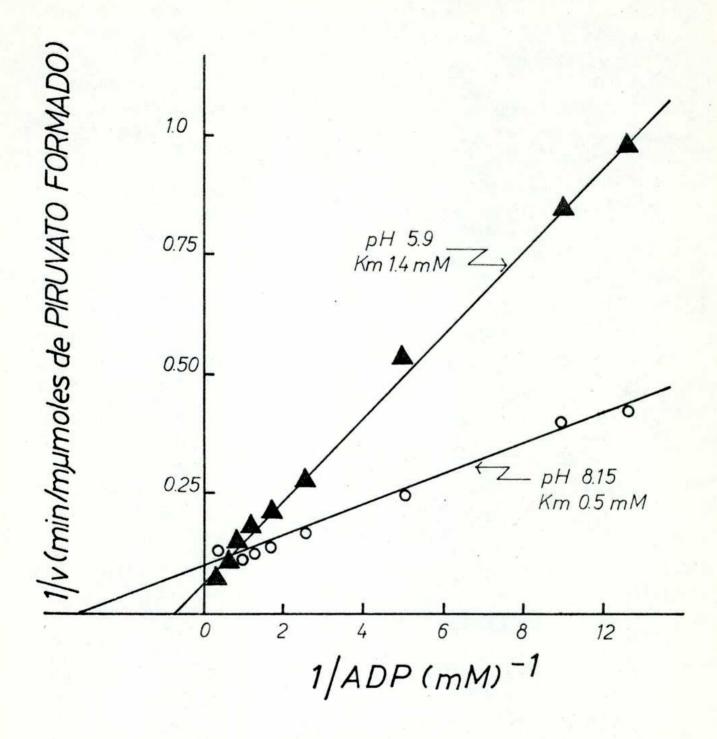


Fig. 6. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de ADP a pH 8.15 y 5.9. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos excepto el pH del buffer y la concentración de PEP que fue de 5.0 mM.

Comportamiento de la ensima con distintos bufferes

Las condiciones experimentales son las descriptas en Natoriales y Métodos con excepción de los bufferes empleados y de la concentración de P.P y ADP que fue de 0.2 y 2.0 mis respectivamente.

Buffer (100 mA)	рΗ	Actividad o	enzimática <u>+ FDP</u>	Relación de activación
A Tris-Maleato Cacodilato Tris-Maleato Glicil@licina Tris-HCl	5.9 5.9 8.1 8.1	23 67 0.89 1.78 0.71	23 71 78 96 78	1.00 1.06 88.0 54.0 110.0
B Tris-Haleato Tris-Haleato TES TES HEPES HEPES	6.8 7.2 6.8 7.2 6.8 7.2	27 5•3 38 5•9 35•5 13•1	36 40•5 50 54•5 61 50	1.33 7.65 1.31 9.2 1.73 3.84

a La relación de activación de calculó como en la Fig.3.

Reversibilidad del efecto del phisobre las propiedades de la piruvato quinasa hepática tipo L.

Ante la posibilidad de que la pérdida do sensibilidad de la enzima al PDP a pii 5.9 fuera debida a una modificación del sitio al cual se une el activador, o bien a cambios reversibles en las propiedades alestóricas de la misma, se efectuaren des experimentes diferentes.

Uno de ellos consistió en tomar alfeuetas de una misma preparación enzimática cuyo pú inicial fue de 7.5 y se las expuso a pli 5.9 y 8.15. La actividad de éstas se midió inmediatamente en las condiciones descriptas en el experimento anterior (Tabla 4) y al mismo pli final de las muestras. Estas se dejaron a 4°0 durante 20 minutos y luego el pli fue nuovamente reajustado con solución de ácido maleico o de Tris, de tal forma que a la alícuota que estaba a pli ácido se la llevó a pli 8.15 y a la que estaba a pli alcalino se la llovó a pli 5.9. La actividad enzimática se midió nuovamente en las condiciones mencionadas.

Como se observa en la Tabla 5-A y B, el tratamiento previo de la enzima a pH 5.9 no modifica la propiedad de ser activada por el FDP cuando la actividad enzimática se midió a pH 8.15. Del mismo modo, cuando el pH de la enzima fue inicialmente ajustado a 8.15 y luego se reajustó a pH 5.9, la actividad de la misma no se modificó por el agregado de FDP a la mezcla de incubación.

Además, se puede apreciar que cuando el pH de la enzima fue modificado por dos tratamientos sucesivos a 4°C durante 20 minutos a ph ácido y luogo alcalino y por último ajustado a pH 5.9, el FDP no tuvo efecto activador. Después de estos cambios de ph la enzima perdió un 60% de actividad si se compara este resultado con el último del mismo experimento.

El otro experimento efectuado consistió en cambiar el pli de la preparación enzimática en forma menos brusca, dializando alfcuotas igua -

TABLA V

Reversibilidad del efecto del pli sobre la actividad

do la enzima

En los experimentos A y B el pH de la preparación enzimática fue rápidamente ajustado a los valores indicados agregando pequeños volumenes de ácido maleico o de solución de Tris 2.0 H. Al pH final indicado la actividad se midió en las mismas condiciones que se describió en la Tabla 4. Luego la enzima se dejó a 4°C durante 20 minutos antes del siguiente cambio de pH.

En los experimentos C y D el cambio de pH se efectuó en forma gradual mediante dialisis de 2 horas contra la solución apropiada.

pil de proincubación	Actividad enzim á tica		Relación de
de la onzima	<u>-r'DP</u>	<u>4-P'DP</u>	Activación
<u>A</u> 7•5 → 5•9	10.5	10.25	∪ • 97
$7.5 \rightarrow 5.9 \rightarrow 8.15$	0.48	15.25	32
$7.5 \rightarrow 5.9 \rightarrow 8.15 \rightarrow 5.9$	5 • 5	5.0	0.90
$\underline{B} 7.5 \rightarrow 8.15$	0.7	29.0	41
7.5 → 3.15 → 5.9	12	12.8	1.06
<u>c</u> 7•5→ 5•9	13.6	14.2	1.04
$7\overset{\sim}{.}5 \rightarrow 5.9 \rightarrow 8.15$	0.21	3.8	18
$\underline{D} 7.5 \rightarrow 8.15$	0.2	8.2	41
7.5 → 8.15→5.9	12.1	14•7	1.2

les contra soluciones bufferes cuyo pH se indica en la Tabla 5-C y D. Las determinaciones de actividad enzimática y el efecto del FDP fueron efectuadas en la misma forma que en el experimento anterior (comentado en esta Tabla).

Los resultados obtenidos en los dos experimentos son cualitativa mente similares e indican claramente que el efecto del pH sobre la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L es un proceso reversible.

Efecto del ATP y del PDP en la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función del tiempo.

La inhibición de la piruvato quinasa hepática tipo L se estudió en función del tiempo en ausencia y en presencia de 0.1 mM de FDP. Con este fin la actividad enzimática se midió a una concentración de PEP y ADP de 0.3 y 0.4 mM respectivamente.

Los resultados de este experimento se exponen en la Fig.7. Se pue de apreciar que tanto la inhibición como la activación producida por el ATP y el FDP son debidos a cambios en la velocidad inicial de la reacción. La adición de 1.0 mM de ATP produce un 76% de inhibición, la cual es totalment: revertida (5 minutos después) por el agregado de 0.1 mM de FDP. La adición simultánea de ambos metabolitos, o sólo del activador, produce únicamente un aumento de 17 veces de la actividad ensimática. Este experimento descarta la posibilidad de que el ofecto inhibidor del ATP fuera debido a la inactivación de la enzima.

Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de ATP. Características cinéticas de la inhibición.

Las características de la inhibición por ATP de esta enzima fuoron estudiadas. Como se observa en la Fig.8, la curva de actividad en función de la concentración de ATP a pH 7.5 en ausencia de FDP es hiperbólica, lo que indica que en estas condiciones la cinótica de la inhibición es de

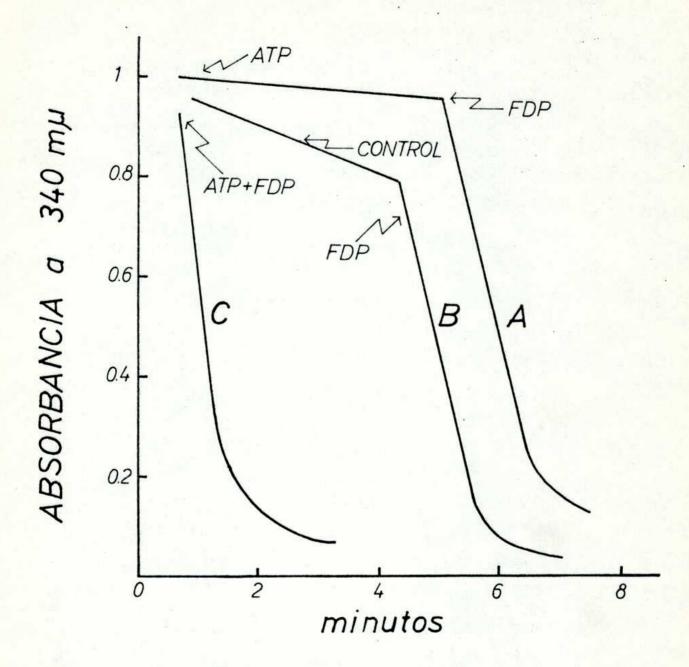


Fig. 7. Efecto del ATP y FDP en la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función del tiempo. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos excepto la concentración de PEP y ADP que fue de 0.3 y 0.4 mM respectivamente. Los metabolitos se agregaron como se indica; A: ATP 1.0 mM, B: Control y C: ATP 1.0 mM y FDP 0.1 mM. La reacción se inició por el agregado de PEP. A los 4.5 mi nutos se agregó FDP 0.1 mM a las curvas A y B.

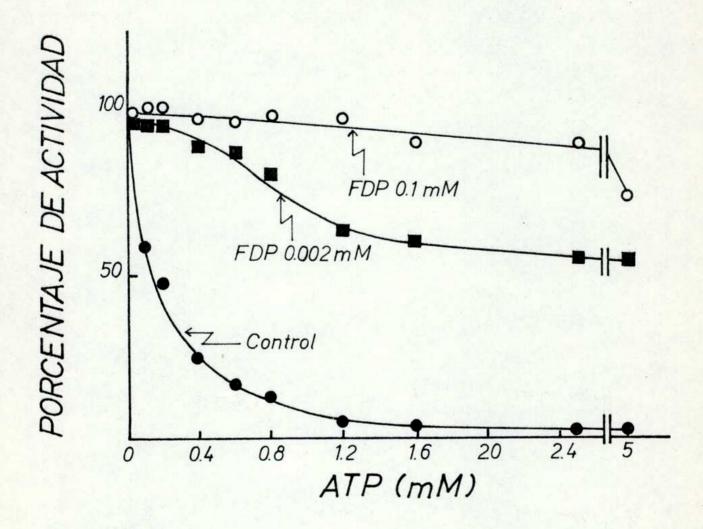


Fig. 8. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de ATP en ausencia y en presencia FDP. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos, excepto la concentración de PEP y ADP que fue de 0.5 y 0.3 mM respectivamente. El nivel de FDP fue de 0.002 y 0.1 mM como se indica.

tipo Michaeliano.

Por el contrario la presencia de concentraciones muy bajas de PDP (0.002 mM) modifica las características de la inhibición por ATP. La curva obtenida es de tipo sigmoide indicando que la enzima tiene efecto cooperativo homotrópico para el inhibidor. La concentración necesaria para obtener un efecto del 50% fue muy alta (5.0 mM). En presencia de un nivel más alto de FDP (0.1 mM) el ATP no tuvo efecto inhibidor de acuerdo a lo que se demostró anteriormente (Fig.7).

Es interesante además destacar que en las condiciones de este experimento 0.002 mM de FDP revierte totalmente la inhibición producida por una concentración de ATP 100 veces superior (0.2 mM).

El coeficiente de interacción n para el ATP fue determinado. En los casos en que la inhibición no alcanza el 100% el cálculo del mismo se efectuó de acuerdo con la modificación de la ecuación original de Hill, propuesta por Jensen y Nester (133), la cual está dada por la siguiente expresión:

$$\log \left(\frac{vi - Vsat}{v_0 - Vi}\right) = \log n - n \log I$$

donde vi es la velocidad inicial de la reacción en presencia del inhibidor vo es la velocidad inicial de la reacción en ausencia del inhibidor Vsat es la velocidad inicial de la reacción a concentración saturante del inhibidor

I es la concentración del inhibidor cuyo efecto se estudia.

En este caso se ha designado como constante $I_{0.5}$ la concentración de ligando necesario para producir 50% de inhibición.

Los resultados mostrados en la Fig.8 se han representado de acue<u>r</u> do a esta ecuación. En la Fig.9 se ve que el valor n_H en ausencia de FDP es de 1.15, resultado que se obtiene cuando la cinética de la inhibición es de tipo Michaeliano.

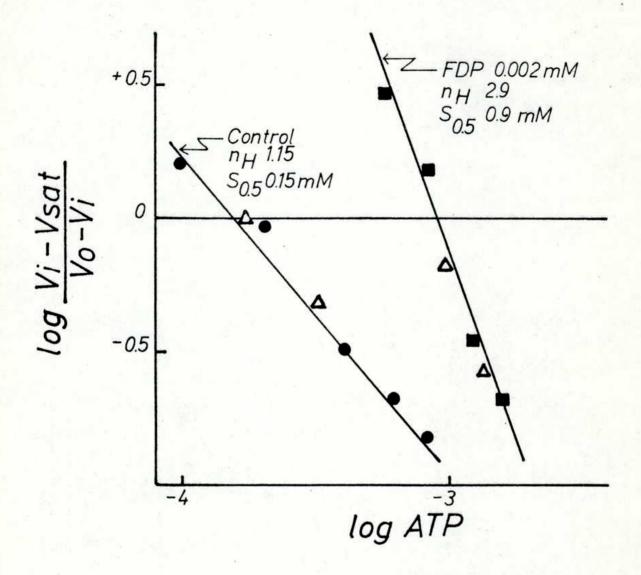


Fig. 9. Gráficos de Hill calculados a partir de los datos experimentales expuestos en la Fig. 8 según la modificación propuesta por Jensen y Nester (133). (Δ) Datos obtenidos por interpolación.

Por el contrario, en presencia de 0.002 mil de PDP el valor de $n_{\widetilde{I}\widetilde{I}}$ fue de 2.9. Este resultado demuestra que concentraciones muy bajas de activador son suficientes para que se exprese el efecto cooperativo de la enzima para el inhibidor.

A partir de estos resultados se calculó la concentración de ATP necesaria para obtener un 50% de la inhibición máxima. Los valores obtenidos de $I_{0.5}$ fueron de 0.15 y 0.9 mH en ausencia y en presencia de 0.002 LH de FDP respectivamente.

La cinética de la inhibición por ATP se estudió a tres niveles de PEP. En la Fig.10 se puede ver que cuando la actividad enzimática se midió a una concentración de 0.5 mH de PEP, la curva de inhibición por ATP es de tipo Michaeliano como on ol experimento anterior (Fig.8). A niveles mas altos de sustrato tal como 2.0 y 4.0 mH se obtuvo curvas de tipo sigmoide que demuestran el efecto cooperativo homotrópico de la enzima para el inhibidor.

Los valores del coeficiente de interacción para cada una de las curvas fue de 1.0, 1.5 y 2.4 como se observa en la Fig.ll.

A partir de estes dates también se determiné la constante I_{0.5}. Se puede ver que a 0.5 mM de PEP el valor obtenido fue de 0.11 mM aumentando a 0.75 y 1.5 mM cuando la curva de inhibición por ATP se efectué en presencia de 2.0 y 4.0 mM de PEP respectivamente. Estes resultados demuestran que la inhibición por ATP no sólo es revertida por el PDP sino que también es marcadamente disminuída a niveles altos de PEP.

Variación do la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de PEP en procencia de ATP y FDP.

Las características cinéticas de la enzima con respecto al PEP se estudiaron en presencia de ATP y FDP. El valor de pli elegido para este experimento fue de 7.5. En estas condiciones, la interacción del sustrato con

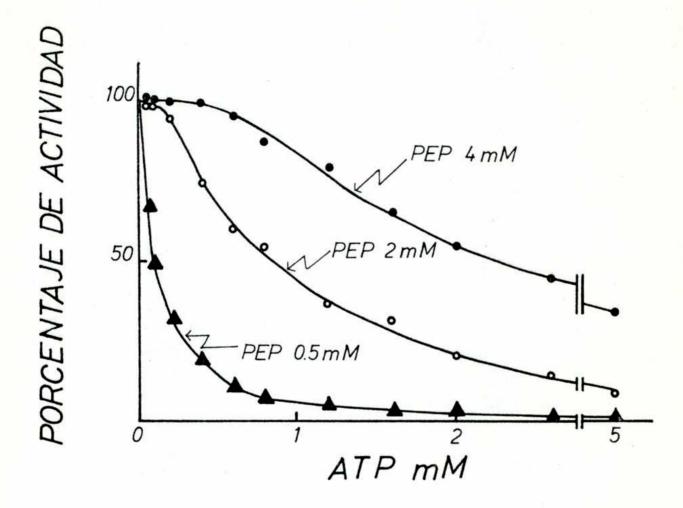


Fig. 10. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepáticatipo L en función de la concentración de ATP a tres niveles diferentes de PEP. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 8, excepto la concentración de PEP que fue de 0.5, 2.0 y 4.0 mN respectivamente como se indica.

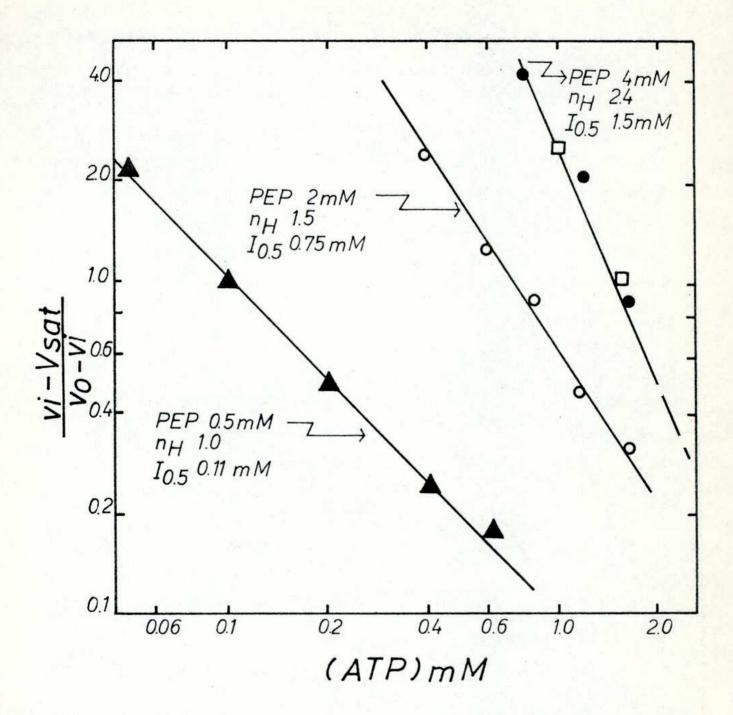


Fig. 11. Gráficos de Hill calculados a partir de los datos experimentales expuestos en la Fig. 10 según la modificación propuesta por Jensen y Nester (133). ([]) Datos obtenidos por interpolación.

la enzima no es máxima y por lo tanto permite evidenciar cambios en la cooperatividad para el PEP en presencia del inhibidor.

Como se aprecia en la Fig.12 la curva de actividad enzimática en función de la concentración de PEP sin adiciones es de tipo sigmoide. En presencia de 2.0 mH de ATP, la sigmoicidad de la curva aumenta apreciablemente. El agregado simultáneo de FDP y del inhibidor a la meucla de incubación modifican totalmente la respuesta de la enzima al PEP. La forma sigmoide de la curva se transforma en una hipérbola michaeliana.

En la Fig.13 se puede ver que en ausencia de adiciones el valor de n_H fue de 1.9. En presencia de 2.0 mH de ATP, la interacción cooperativa de la enzima con el PEP aumenta alcanzando un valor de 2.4. La adición simultánea de 0.1 mH de FDP y del inhibidor modifican el coeficiente de interacción y el valor obtenido en estas condiciones fue de 1.20.

También se observé variaciones de la constante $S_{0.5}$. Los valores obtenidos fueron de 1.0 y 1.5 en ausencia y en presencia de ATP respectivamente. El agregado simultáneo de FDP y del inhibidor producen unicamente un aumento de la afinidad de la ensima por el PEP. El valor de $S_{0.5}$ en estas condiciones fue de 0.34 mH.

Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de ATP a pH 5.9 y 8.15.

Los experimentos expuestos en las Fig.8 y 10 se efectuaron a pH 7.5. Las características de la inhibición por ATP también se estudiaron a distintos valores de pH. Como se ve en la Fig.14-A a pH 5.9 y a un nivel de 0.5 mE de PEP la curva de actividad en función de la concentración de ATP es sigmeide, demostrando que en estas condiciones la enzima tiene efecto coope rativo homotrópico para el inhibidor.

A pH 8.15 la cinética de la inhibición es Michaeliana. En la mis-

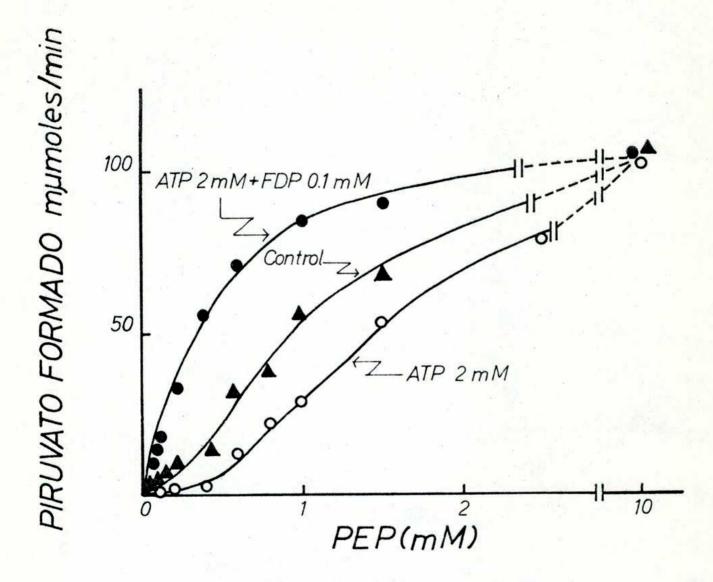


Fig. 12. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de PEP a pH 7.5 en ausencia y en presencia de ATP 2.0 mM y FDP 0.1 mM como se indica. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos.

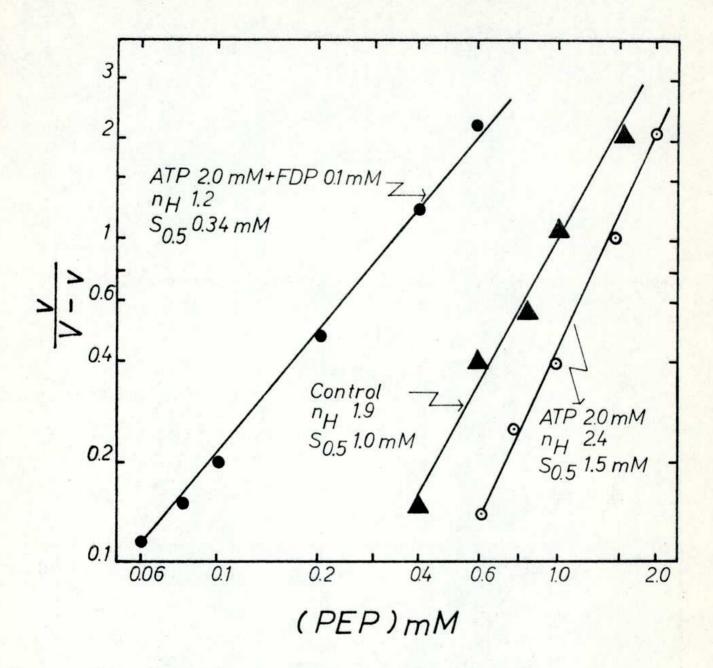


Fig. 13. Gráficos de Hill calculados a partir de los datos experimenta les expuestos en la Fig. 12.

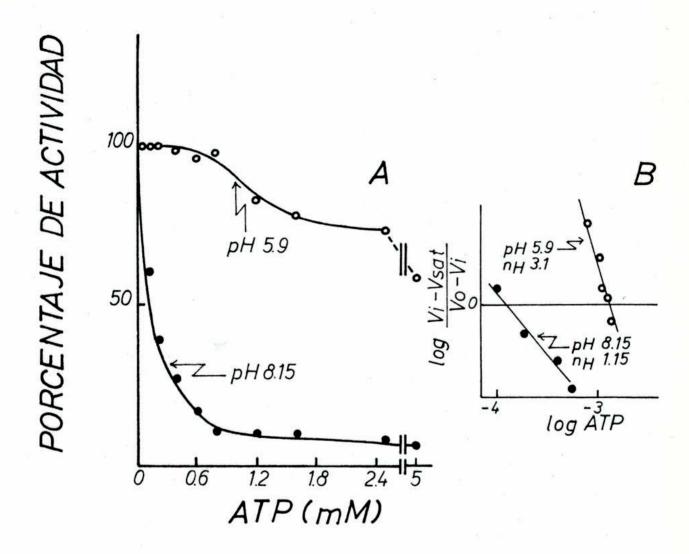


Fig. 14-A. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de ATP a pH 5.9 y 8.15. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 8, excepto el pH del buffer que vario como se indica. B. Gráficos de Hill calculados a partir de los datos expuestos en A según la modificación propuesta por Jensen y Nester (133).

ma Fig.14-B so ha representado estos datos según la ecuación de Hill. Se observa que a pli ácido la interacción con el ATP es marcada. El valor de $n_{\rm H}$ obtenido fue de 3.1. Por el contrario, a pli 3.15 en el cual la enzima no tiene efecto cooperativo para el ATP el valor de $n_{\rm H}$ fue de 1.15.

Efecto de las variaciones fisiológicas de pH en las propiedades reguladoras de la piruvato quinasa hopática tipo L.

Los ostudios precedentes demostraron que cambios apreciables en el pH del medio de incubación producen modificaciones en las propieda des cinóticas de la enzima.

Debido a que el pH intracelular del hígado fluctúa entre 6.8 y 7.3 (134-136) se determinó si en condiciones semojantes a las ficiológicas la enzima tiene cambios en sus características de regulación.

Con este fin la actividad de la enzima se estudió en función de la concentración de PEP a tres valores differentes de pH: 6.85, 7.05 y 7.25. Debe destacarse que para que los dates obtenidos fueran estrictamente comparables se utilizó una misma preparación ensimática. También se tuvo la precaución de medir el pH del medio de incubación antes y después de cada determinación.

En la Fig.15 se ve que las curvas obtenidas son mas sigmoides cuando el pH aumenta. En efecto, a pH 6.85 la curva es hiperbólica indican do que en estas condiciones la cinética de la enzima para el PEP es de tipo Michaeliano. Por el contrarlo, a pH 7.05 y 7.25 las curvas son sigmoides y la activación por FDP es mas notoria que a pH 0.85. Los datos de este experimento son cualitativamente similares a los expuestos en la Fig.4.

Estos resultados demuestran claramento que las variaciones fisio logicas de pil, que además son cercanas al óptimo do la enzima (Fig.3), modifican apreciablemente el efecto cooperativo homotrópico para el PEP

Los resultados experimentales expuestos en la Fig.15 se han expro

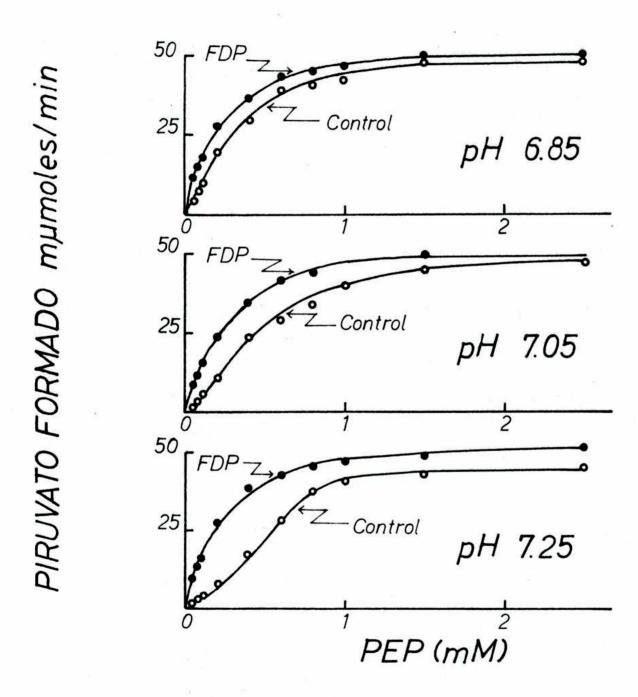


Fig. 15. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de PEP a pH 6.85, 7.05 y 7.25 en ausencia y en presencia de FDP 0.1 mM. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 4, excepto el pH del buffer que varió como se indica.

sado de acuerdo a la ecuación de Hill. En la Fig.16 se puede ver que a pH 6.85 el valor de $n_{\rm H}$ fue de 1.27.

Por el contrario, a pH 7.05 y 7.25 el valor de $n_{\overline{H}}$ fue de 1.5 y 1.8 respectivamente. La interacción cooperativa con el sustrato es mas marcada con el aumento de pH. En presencia de 0.1 mM de FDP el valor de $n_{\overline{H}}$ es prácticamente constante y cercano a la unidad.

A partir de estos mismos datos se calculó la constante $S_{0.5}$. El valor obtenido fue de 0.30, 0.47 y 0.64 mM a pH 6.85, 7.05 y 7.25 respectivamente en ausencia de FDP. Estos resultados demuestran que el aumento de pH en un rango fisiológico disminuye la afinidad de la enzima por el PEP. En presencia del activador el $S_{0.5}$ fluctuó alrededor de 0.2 mM en todos los valores de pH mencionados.

La inhibición de la actividad enzimática en función de la concentración de ATP también se estudió en un rango de pH fisiológico. La concentración de PEP elegida para este experimento fue de 0.5 mM. En la Fig.17-A se ve que a pH 6.85 la curva de inhibición por ATP es sigmoide. En estas condiciones la enzima tiene efecto cooperativo homotrópico para el inhibidor. A pH 7.25 la cinética de la inhibición es de tipo Michaeliana.

Los datos han sido expresados según la ecuación de Hill modificada como se indicó anteriormente (133). Se puede apreciar que el valor de n_H fue de 1.91 y 1.0 a pii 6.85 y 7.25 respectivamento (Fig.17-B).

Estos resultados demuestran también que pequeñas fluctuaciones del pH del medio de incubación en un rango fisiológico producen cambios aprecia bles en las características cinéticas de la inhibición por ATP.

Variación del coeficiente n y de la constante S 0.5 de la piruvato quinasa hepática tipo L para el PEP en función del pH.

El valor del coeficiente de Hill y de la constante S para el PEP que se obtuvo en los experimentos precedentes y en otros no expuestos se

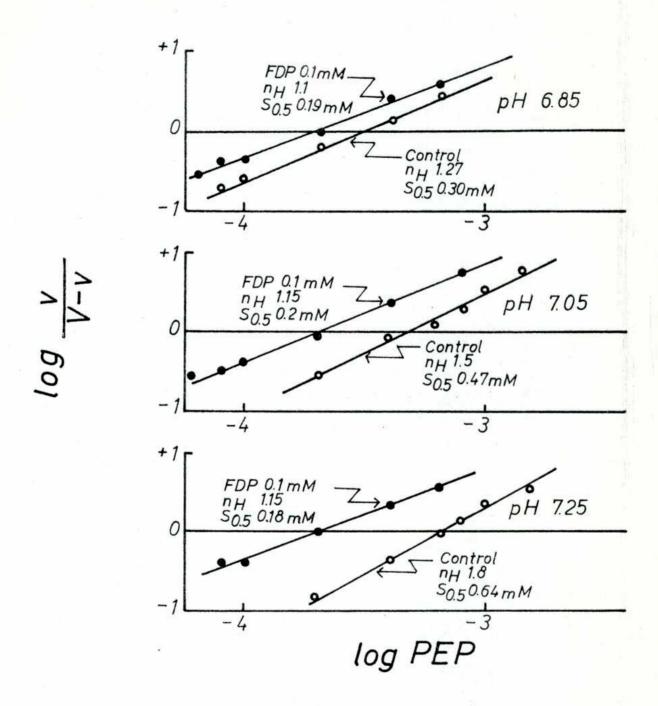


Fig. 16. Gráficos de Hill calculados a partir de los datos experimentales expuestos en la Fig. 15.

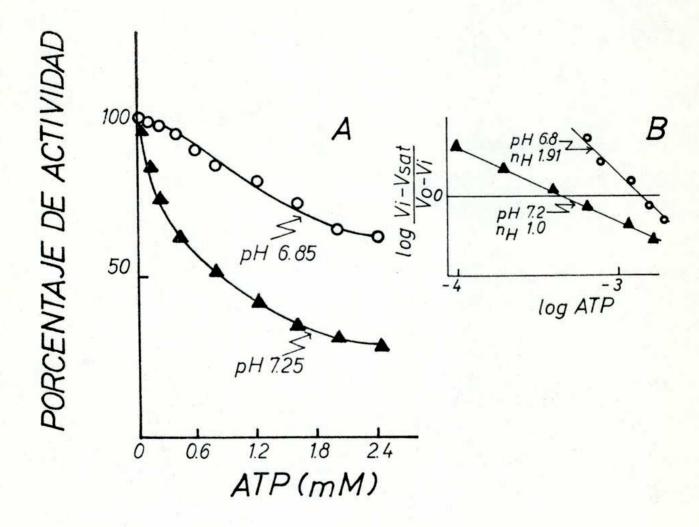


Fig. 17-A. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo L en función de la concentración de ATP a pH 6.85 y 7.25. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 8, excepto el pH del buffer que varió como se indica. B. Gráficos de Hill calculados a partir de los datos expuestos en A según la modificación propuesta por Jensen y Nester (133).

lo graficó en función del pH. En la Fig. 18-A se ve una correlación de ambos parámetros con el aumento del pH del medio de incubación. En efecto el valor de n_H a pH 5.9 fue de 1.0, mientras que a pH 8.35 el mismo alcanzó un valor de 3.0. Este aumento está asociado con el de S_{0.5} ya que ambas curvas son paralelas.

box valores de $S_{0.5}$ para el PEP en función del pH se abalizaron según el método descripto por Dixon y Webb (137). En la curva que se obtien ne representando $-\log (S_{0.5})$ en función del pH, se trazó dos rectas tangen tes con pendiente de valor 0 y l (Fig.18-B). Estas coinciden con la curva experimental y se cruzan en un punto cercano al valor de pH 6.9, indicando que en la interacción enzima-sustrato, participa un grupo ionizable que tiene este valor de pK.

Por otro lado debido a la estrecha correlación que hay entre las curvas de n y de S en función de pH en el rango estudiado entre 5.9 y 8.35 es posible suponer que un grupo ionizable de pK cercano a 6.9 puede estar asociado en el efecto cooperativo para el PEP.

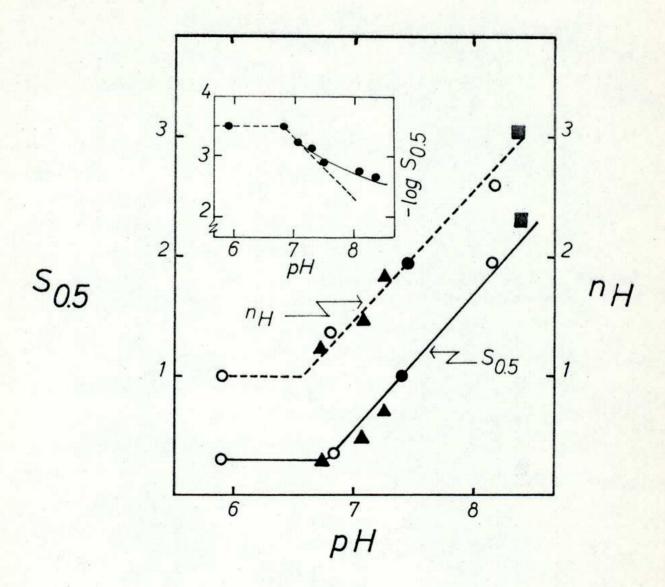


Fig. 18-A. Variación de la constante S_{0.5} y del coeficiente de Hill de la piruvato quinasa hepática tipo L para el PEP en función del pH. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 4, excepto el pH del buffer. Los distintos símbolos representan datos obtenidos con preparaciones enzimáticas diferentes. B. Los mis mos datos han sido graficados según el método de Dixon y Webb (137).

Piruvato quinasa hopática Tipo E

Como se indicó anteriormente en la Introducción, en el hígado de rata en condiciones fisiológicas normales, la relación entre la actividad de la piruvato quinasa tipo L y tipo M es aproximadamente 3.0. Es to significa que el 66% de la actividad total esta representado por la primera de ellas. Sin embargo, este valor no es constante si se tiene en cuenta que el nivel de la isoenzima L es modificado por factores nutricionales y hormonales (107).

Bajo ciertas condiciones, tal como en la diabetes o durante la gluconeogénesis provocada por la alimentación prolongada con dietas compuestas por un 96% de caseina, en las cuales el nivel de piruvato quinasa hepática tipo L disminuye apreciablemente, la relación de actividad entre ambas isoenzimas fluctúa entre 0.6 y 0.8 (107).

Teniendo en cuenta que en el hígado de rata el nivel de la iso enzima M no se modifica por la acción de estos factores, el hecho do que la relación entre la actividad de ambas isoenzimas sea cercano o menor que la unidad indica que enestas condiciones el 55-65% de la actividad de piruvato quinasa hepática está representado por la isoenzima M (107).

A pesar de que este hecho es de gran importancia fisiológica, las propiedades de esta enzima y su regulación por metabolitos no ha sido aun estudiada.

Hasta el presente, debido a que la isoenzima M tiene un comportamiento cromato ráfico e inmunológico idéntico al de la piruvato quinasa de músculo esquelético, cardiaco y cerebro de rata, y aunque existen ciertas discrepancias en cuanto a la movilidad electroforética de las mismas (106,120) se ha aceptado que la isoenzima M tiene propiedades cinéticas semejantes a las de las enzimas mencionadas.

Los estudios efectuados con la piruvato quinasa de músculo esquelético han demostrado que el valor del Km de esta enzima para el PEP fluctúa entre 0.06 y 0.08 mM (138).

Es importante tenor en cuenta que las medidas efectuadas en dis tintos laboratorios han demostrado que la concentración intracelular de PEP en el hígado de rata en condiciones de gluconeogénesis fluctúa también entre los valores anteriormente mencionados (91,139,140).

Si se acepta como válida la idea de que la isoenzima M de hígado de rata tiene un valor de Em para el PEP similar al indicado para la piruvato quinasa de músculo esquelético, y se tiene en cuenta que el mivel de dicha enzima no fluctúa durante la gluconeogénesis, hay que suponer que el PEP sintetimado en estas condiciones por la piruvato carboxilasa y PEP car boxiquinasa será convertido nuevamente en piruvato.

Este razonamiento nos lleva a predecir que la isoencima M, también debe estar sujeta a alcún tipo de control metabólico, de manera tal que la síntesis de PEP a partir de piruvato sea efectuada permitiendo al organismo adaptarse a condiciones fisiológicas o patológicas de gluconeogénesis prolongadas (ayuno, diabetes o dietas hiperproteicas).

Recientemente se observó que la fenilalanina es un inhibidor de la piruvato quinasa de músculo esquelótico (141). Trabajos efectuados en nuestro laboratorio demostraron que esta enzima tiene propiedades alostóricas (142,143). Estudiando el efecto inhibidor de la fenilalanina sobre la actividad de esta enzima, se comprobó que bajo ciertas condiciones la inhibición por este metabolito es de tipo cooperativo y depende marcadamente del pH del medio de incubación. Cabe destacarse que el efecto de la fenilalanina es completamente revertido por cisteína, serina y alanina.

Teniendo en cuenta lo expuesto hasta ahora, el estudio efectuado con la isoenzima M de higado de rata tuvo el siguiente propósito:

- a) determinar si la actividad de la misma es reculada por metabolitos.
- b) aclarar si esta enzima tiene propiedades distintas a las de la piruvato quinasa de músculo esquelético.

Los estudios efectuados fueron los siguientes:

Efecto del pil sobre la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M.

El pH óptimo de la enzima se determinó en presencia del buffer Tris-maleato y a una concentración de 2.5 mM de PEP y ADP respectivamente. Además la actividad se midió a una concentración de 0.2 mM de PEP en ausencia y en presencia de 0.1 mM de FDP.

Los resultados expuestos en la Fig.19 demuestran que el pH óptimo de la piruvato quinasa tipo M fluctúa entre 6.8 y 7.2. Estos valores están dentro del rango de pH intracelular hepático (134-136). Se puede apreciar además que el agregado de PDP a la mezcla de incubación no modifica la actividad de la isoenzima M en ninguno de los valores de pH indicados.

La falta de activación de la piruvato quinasa hepática tipo M por el FDP difiere marcadamente de lo observado con la isoenzima L.

Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M en función de la concentración de PEP y ADP.

La posibilidad de que la piruvato quinasa hepática tipo M y la enzima de músculo esquelético tuvieran propiedades cinéticas similares fue estudiada.

La constante de Michaelis para el PEP de la isoenzima " se determinó midiendo la actividad enzimática en función de la concentración de este sustrato a pli 7.5 y en presencia de 0.4, 0.8 y 2.4 mM de ADP respectivamente.

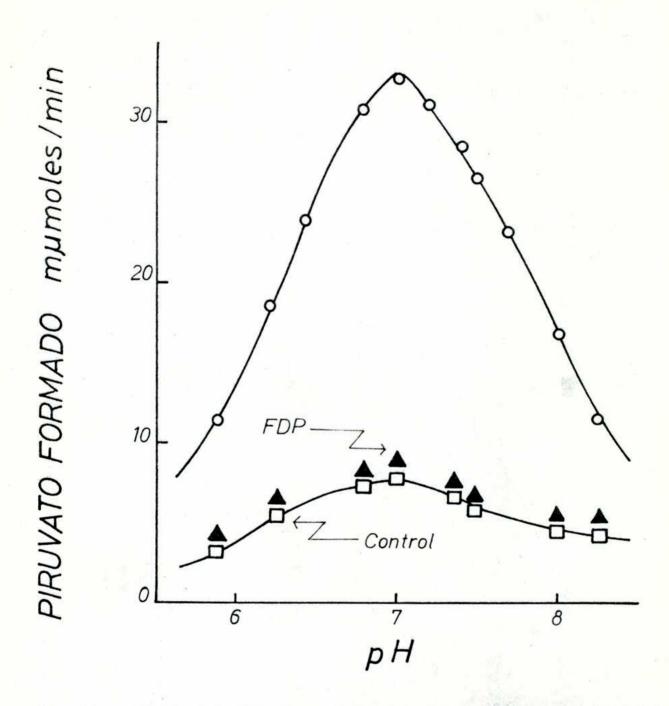


Fig. 19. Efecto del pH en la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos, excepto la concentración de PEP y ADP que fue de 2.5 mM y del pH del buffer que varió como se indica. La curva inferior representa algunas determinaciones efectuadas a un nivel de PEP de 0.2 mM en ausencia y en presencia de FDP 0.1 mM.

bos resultados de este experimento se han graficado en la Fig.20 de acuerdo a la ecuación de Lineweaver-Burk (132). Se puede ver que la relación entre la inversa de la velocidad inicial y de la concentración de PEP es lineal, lo cual indica que la cinótica de la enzima para este sustrato es Eichaeliana. El valor de Em que se obtuvo en estas condiciones fue de 0.13 mm.

El hecho de que a concentraciones distintas de ADP el valor de la Empara el PEP sea constante indica que la afinidad de la enzima por este último sustrato no se modifica por cambios en la concentración del otro.

Debido a que la leterminación anterior de la actividad enzimática se efectuó en función de la concentración de 0.08, 0.1, 0.2, 0.4 y 1.0 mM de PEP y a 0.4, 0.8 y 2.4 mM de ADP las curvas de velocidad inicial obtenidas se representaron en función de la concentración de este último sustrato pero en este caso a cinco niveles diferentes de PEP, obteniêndose una familia de cinco curvas. Estos resultados han sido expuestos en la Fig.21 según la ecuación de Lineweaver-Burk (132). En este caso la relación entre la inversa de la velocidad inicial y de la concentración de ADP también fué rectilínea. El valor de la Km para el ADP fue de 0.7 mM.

Los valores de la Km de la isoenzima M de higado para cada uno de los sustratos fué también calculado a una concentración infinita del otro, obteniéndose resultados similares a los mencionados. Esto se puede apreciar en las rectas que han sido marcadas con lineas de puntos en las Fig.20 y 21.

Estos resultados están de acuerdo con un mecanismo secuencial de reacción, en el cual los sustratos so unen a la enzima en forma rápida y al azar.(144).

Efecto de distintos metabolitos en la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M.

El efecto de diferentes metabolitos sobre la actividad de la piru-

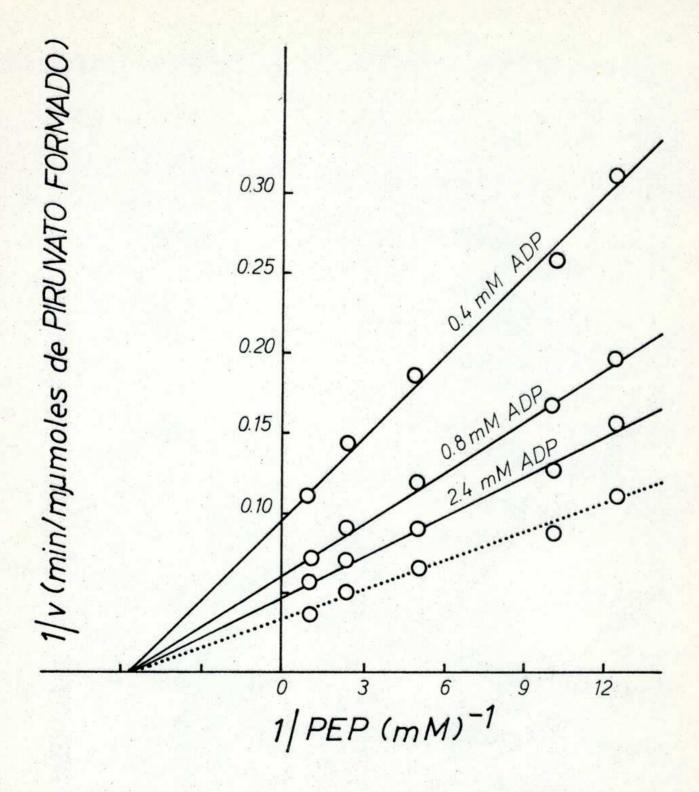


Fig. 20. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M en función de la concentración de PEP a diferentes niveles de ADP. En líneas punteadas se ha representado la curva a concentración infinita de ADP (calculada de la ordenada de la Fig. 21). Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos, excepto el buffer que fue TES-TMA 100 mM y la concentración de ADP que fue de 0.4, 0.8 y 2.4 mM respectivamente como se indica.

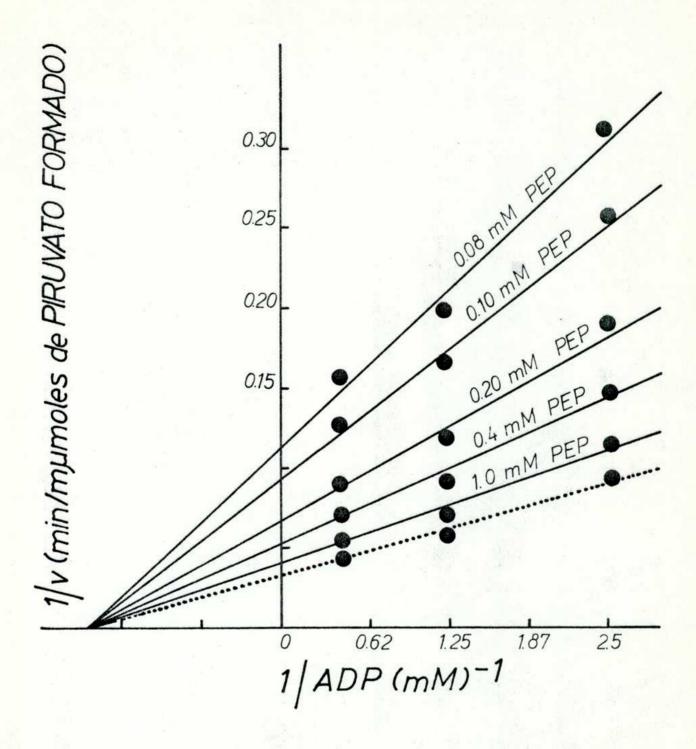


Fig. 21. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M en función de la concentración de ADP a diferentes niveles de PEP. En lineas punteadas se ha representado la curva a concentración infinita de PEP (calculada de la ordenada de la Fig. 20). Las condiciones experimenta les fueron iguales a las descriptas en la Fig. 20, excepto la concentración de PEP que fue de 0.08, 0.1, 0.2, 0.4 y 1.0 mM respectivamente como se indica.

vato quinada ne ática tipo le se estudió en presencia de una concentración de est ++, PEP y adP de 5.0, 0.15 y 0.5 am respectivamente. La elección del nivel de ambos sustratos cercanos al valor de la km, como también la concentración de Mg ++, tuvo como propósito detectar y magnificar cambios en la actividad de esta enzima, producidos por la presencia de los metabolitos apregados.

bos resultados de este experimento se han expuesto en la Tabla 6 y han sido expresados como porcentade de actividad. De puede apreciar que el agregado de 5.0 mM de ATP, UTP y STP a la mescla de incubación produce una inhibición de la actividad que varía entre 40-60% dependiendo del nucleósido trifosfato. A concentraciones de 1.0 mM ninguno de estos metabolitos fueron inhibidores. Efectos mucho menores se observaron para los esteres fosforicos y el Pi.

El agregado de 1.0 y 5.0 mM de Ca⁺⁺ a la mezcla de incubación, produce un 44 y 75% de inhibición respectivamente, mientras que el citrato únicamente tuvo un efecto de un 41% a una concentración de 5.0 mM. Debe des tacarse que los niveles de citrato y ATP que producen una inhibición de la isoenzima M de hígado en estas condiciones son superiores a la concentración intracelular de los mismos en este tejido (140,145).

Efecto del ATP, citrato y Ca⁺⁺ en la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo K a diferentes concentraciones de $\mathbb{M}_{\mathcal{C}}$.

Es conocido por diferentes trabajos que la inhibición de la actividad de la enzima de músculo esquelético producida por el ATP y citrato se debe a una disminución de la concentración de Mg⁺⁺ libre (146,147).

Por otra parte Bigrave (148) demostró que el Ca⁺⁺ inhibe a dicha enzima y a la piruvato quinasa de células de tumor ascítico en forma competitiva con respecto al Mg⁺⁺.

En base a estos datos, se consideré importante determinar si el

FABLA VI

Efocto de distintos metabolitos en la actividad de la piruvato

quinasa hopática Tipo M

Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos, excepto el buffer que fue TES-TMA 100 mM y la concentración de PEP, ADP y Mg^{++} que fueron de 0.15, 0.5 y 5.0 respectivamente.

Motabolitos	Concentración (mH)	Actividad $(\%)$
Control ^a		100
ATP	5.0	40
UTP	5.0	49
GTP	5.0	62
AMP	1.0	100
3'5' AMP ciclico	1.0	100
UDPG	1.0	86
UMP	1.0	95
шар	1.0	90
3-PGA	5.0	75
G-6-P	5.0	100
FDP	0.1	100
P-creatina	1.0	95
Carbamil-P	1.0	75
Pi	5.0	95
co Hila	10.0	90
Citrato	5. 0	59
Ca ⁺⁺	1.0	56
Ca ⁺⁺	5.0	25

<u>a</u> La actividad en ausencia de metabolites fue de 15.0 mu moles de piruva to formado por minuto.

efecto de estos metabolitos sobre la actividad de la isoenzima M de hfgado de rata tienen una explicación similar. Con este fin el efecto de los mismos fuó estudiado a tres niveles diferentes de Mg⁺⁺.

En la Tabla 7 se puede apreciar que la inhibición producida por el ATP, citrato y Ca^{++} es muy marcada a 0.5 ma de Ee^{++} . El aumento de la concentración de este catión a 2.5 y 10 mH, revierte marcadamente el efecto de estos metabolitos.

la piruvato quinasa hepática tipo a producida por la presencia de estos me tabolitos se debe principalmente a una disminución en la concentración de sig⁺⁺ libre. El efecto del Ca⁺⁺ y citrato tiene interés bajo el punto de vista regulador, ya que también modifican la actividad de otras enzimas glu colíticas tal como la hexoguinasa (45) y la PFR (149).

Efecto de distintos aminoácidos en la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo E y de músculo esquelético.

Teniendo en cuenta el hecho de que la enzima de músculo esquelético es inhibida específicamente en forma alostérica por fenilalanina y que
este fenómeno es revertido selectivamente por algunos aminoácidos (cisteína, serina y alanina) se consideró de interés:

- a) determinar si estos metabolitos producen algún cambio en la actividad de la isoenzima M de hfgado.
- b) establecer posibles diferencias en el comportamiento frente a los aminoácidos entre esta enzina y la de músculo esquelético.

Las condiciones de incubación de este experimento fueron similares en ambos casos con excepción de la concentración de ADP y PEP que fueron cercanas al valor de la Km de cada una de las enzimas mencionadas.

La piruvato quinasa de músculo esquelético fue purificada por cro

TABLA VII

Efecto del AFP, Citrato y Ca^{TT} en la actividad de la piruvato quinasa hepática Tipo E a diferentes concentraciones de ME⁺⁺

Las condiciones experimentales fueron i juales a las descriptas en la Tabla 6, excepto la concentración de Eg^{++} que fue de 0.5, 2.5 y 10 mH respectivamente.

	Netabolitos						
14g++	Control	Ca ⁺⁺		ATP		Citrato	
(mM)		<u>1 mil</u>	5 mM	<u>1 mH</u>	5 mil	<u>l ml/i</u>	<u>5 mM</u>
0.5	100 (5.2) ^a	42	4	48	2	70	6
2.5	100 (13.2) ^a	58	31	84	20	92	62
10.0	100 (13.4) ^a	95	55	97	78	96	100

<u>a</u> La actividad en ausencia de metabolitos ha sido expresada en mu moles de piruvato formado per minuto para cada concentración de Lg.

matografía en columna de Sefadex G-25 de igual características (dimensiones y solución de equilibración) que la utilizada durante la purificación de la isoenzima M de higado como se indicó en Materiales y Métodos. De esta forma se eliminó totalmente el sulfato de amonio que contienen las preparaciones comerciales de esta enzima.

Los resultados obtenidos se nan expuesto en la Tabla 8. y se expresaron como porcentajes de actividad enzimática. Como se puede apreciar los mismos demuestran en forma clara dos hechos importantes. Uno de ellos es que la presencia de algunos aminoácidos tal como la alamina, treonina, valina, prolina, tirosina y triptofano inhiben marcadamente (50-70%) la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M sin afectar a la de la enzima de músculo esquelético.

El otro, demuestra que la fenilalanina es el único aminoácido que inhibe la actividad de ambas enzimas en forma apreciable, aunque a concentraciones bajas del mismo tal como 1.0 mE solamente es inhibida la isoenzima M de hímado.

Por otra parte se vió que tanto esta última, como la piruvato qui nasa de músculo esquelético no modifican su actividad en presencia de amino ácidos estructuralmente semejantes a la alanina, tal como la serina y cisteí na.

El hecho de que ambas enzimas sean inhibidas en forma diferente por argunos aminoácidos, sugiere junto con la distinta movilidad electroforetica mencionada anteriormente que en los tejidos de rata existen al menos dos tipos de piruvato quinasa M.

Variación de la actividad de la piruvito quinasa hepática tipo E en función de la concentración de PEP en presencia de alanina y fenilalanina.

El papel de la alanina y otros aminoácidos como precursores gluco neogénicos ha sido comprobado por numerosos trabajos de investigación (150-155).

VIII Adding

Efecto de diferentes aminoácidos en la actividad de la piruvato quinasa hepática Tipo II y de músculo esquelético

Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig.23 con excepción de la concentración de PEP y ADP que fue de 0.15 y 1.5 mil respectivamente.

Amino á cidos	Concentración (mH)	Higado Tipo H	Hitsculo Tipo M
Control ^{<u>a</u>}		100	100
Penilalanina	1	41	95
Fenilalanina	5	8	21
Alanina	1	53	100
Alanina	5	45	103
Valina	5	56	100
Troonina	5	53	98
Prolina	5	50	102
Tirosin a	2 . 5	49	103
Triptofano	5	31	94
Glutamato	5	73	76
Serina	2	10	101
Cisteina	2	10	100

<u>a</u> La actividad en ausencia de aminoacidos fue de 8.0 y 33.0 mu moles de piruvato formado por minuto para la enzima de higado y de múscu lo esquelético respectivamente.

Recientemente, Schoner y col.(91) y blorente y col.(157) demostraron que la alanina es un inhibidor alostérico de la piruvato quinasa hepática tipo b y propusieron que este metabolito podría controlar la actividad de esta enzima "in vivo" ya que bajo ciertas condiciones de gluco neogénesis como después de la administración de glucocortico des el nivel de este aminoácido aumenta marcadamente (91).

Considerando que la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo E es también inhibida por alanina (Tabla 3) se consideró de interés estudiar el efecto de este metabolito en la cinética de esta enzima con respecto al PEP.

Por otra parte, dado que la fenilalanina es un precursor gluconeogénico y además un inhibidor alostérico de la piruvato quinasa de múscu
lo esquelético, se efectué un estudio similar pero en presencia de este me
tabolito.

Con este fin la actividad enminática se midió a pH 7.5 en función de la concentración de PEP a un nivel de 1.5 mE de ADP en presencia de 1.5 mE de alanina. La curva control se determinó en ausencia de este aminoácido.

El efecto de la femilalamina se estudió separadamente en condiciones de incubación similares a la anterior a una concentración 2.0 mM de este metabolito.

Los resultados obtenidos se han expuesto en las Fig.22 y 23. Se puede apreciar que la cinética de la piruvato quinasa hepática tipo M con respecto al PEP en ausencia y en presencia de alanina o fenilalanina es Michaeliana. Por otra parte, también se demuestra que el a regado de estos aminoácidos a la megola de incubación producen un marcado cambio en el valor de la Km y de la Vmax, indicando el carácter mixto de la inhibición

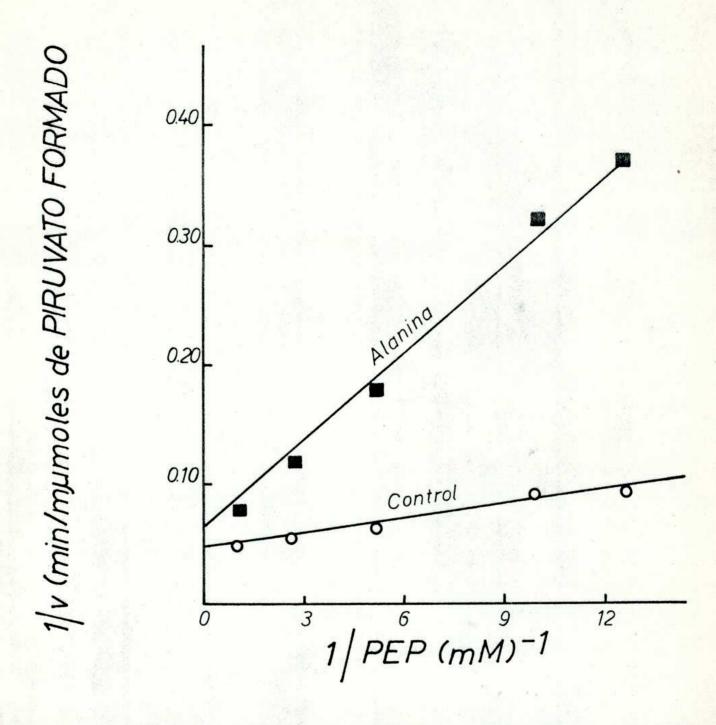


Fig. 22. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M en función de la concentración de PEP en ausencia y en presencia de 1.5 mM de alanina. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 20, excepto la concentración de ADP que fue de 1.5 mM.

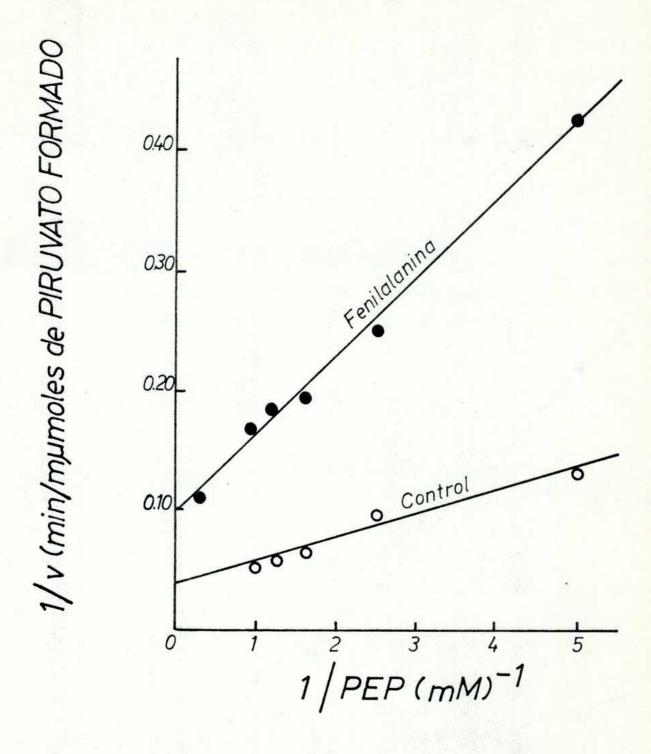


Fig. 23. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M en función de la concentración de PEP en ausencia y en presencia de 2.0 mN de fenilalanina. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 20, excepto la concentración de ADP que fue de 1.5 mM.

con respecto a dicho sustruto.

En efecto, en ausoncia de estos aminoácidos el valor de la Empara el PEP fue de 0.18 mM. Por el contrario en presencia de 1.5 mM de alanina y 2.0 mM de fenilalanina respectivamente, el valor de la Empara el PEP aumentó en ambos casos más de siete veces.

Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo .. en función de la concentración de alanina y fenilalanina.

La cinética de la inhibición de la isoenzima M de hígado por alanina y fenilalanina fue estudiada midiendo la actividad enzimática en función de la concentración de estos metabolitos. Esto se consideró de interés, ya que la fenilalanina es un inhibidor alostérico de la enzima de músculo esquelético.

La concentración de PEP y ADP elegida para este experimento fue en el valor de la hm de la enzima para cada sustrato.

En la Fig.24 se muestra que las curvas de actividad enzimática en función de la concentración de alanina y fenilalanina con hiperbólicas indicando que la inhibición por estos aminoácidos es de tipo Michaeliano. El nivel de alanina y fenilalanina necesario para producir un efecto del 50% de inhibición fue de 0.06 y 0.11 mM respectivamente.

Los resultados expuestos contrastan marcadamente con los observados en este laboratorio con la piruvato quinasa de músculo esquelético, la cual en estas condiciones tiene marcado efecto cooperativo homotrópico para la fenilalanina. Además, el valor de I_{0.5} para este inhibidor fue lo veces mayor (1.0 mM).

Es importante destacar que la curva de inhibición de la isoenzi ma 7 por alanina no llega a un valor del 100% aun a niveles muy altos de este metabolito. El hecho de que la enzima sea parcialmente inhibida por

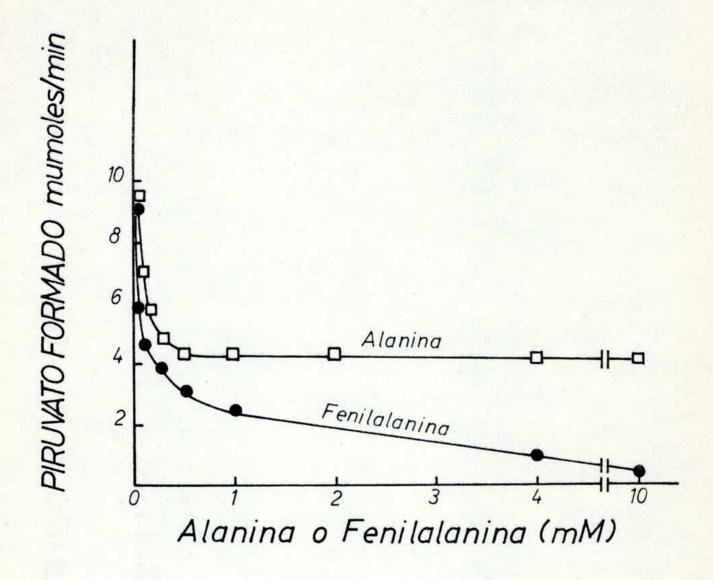


Fig. 24. Variación de la actividad de la piruvato quinasa hepática tipo M en función de la concentración de alanina y fenilalanina. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Tabla 8.

alanina indica que este efecto no se debe a que dicho aminoácido compita con los sustratos por un mismo sitio de unión.

Efecto del pH en la actividad de la piruvato quinasa hopática tipo M en ausencia y en presencia de alanina y fenilalanina.

Teniendo en cuenta que la inhibición por fenilalanina de la piruvato quinasa de músculo esquelético depende marcadamente del pH del medio de incubación, se consideró de interés estudiar si el efecto inhibidor de la alanina y fenilalanina en la isoenzima H de hígado es también dependiente del pH.

Con este fin la actividad enzimática se midió a una concentración de 0.15 mM de PEP y 1.5 de ADP. Los niveles de alamina y fenilalanina se eligieron de manera tal de obtener aproximadamente un 50, de inhibición y fueron de 1.0 a 0.5 mM respectivamente.

Los resultados de este experimento se han expuesto en la Fig.25-A. Se puede apreciar que variaciones en el pH del medio de incubación no modifican el efecto inhibidor de estos aminoácidos en la isoenzima H de hígado. En efecto, cuando los datos fueron representados como porcentaje de actividad se vió que el mismo fue constante en todos los valores de pH indicados (Fig.25-B).

Por el contrario, cuando se efectuó un estudio similar con la enzima de músculo esquelético en presencia de fenilalanina, se observó una
diferencia bien clara con los resultados obtenidos con la isoenzima ñ de hígado.

Efecto de la alanina y treonina en la inhibición por fenilalanina de la piruvato quinasa hepática tipo M y de músculo esquelético.

Debido a que la alanina revierte la inhibición por fenilalanina de la piruvato quinasa de músculo esquelético y que la alanina también inhi-

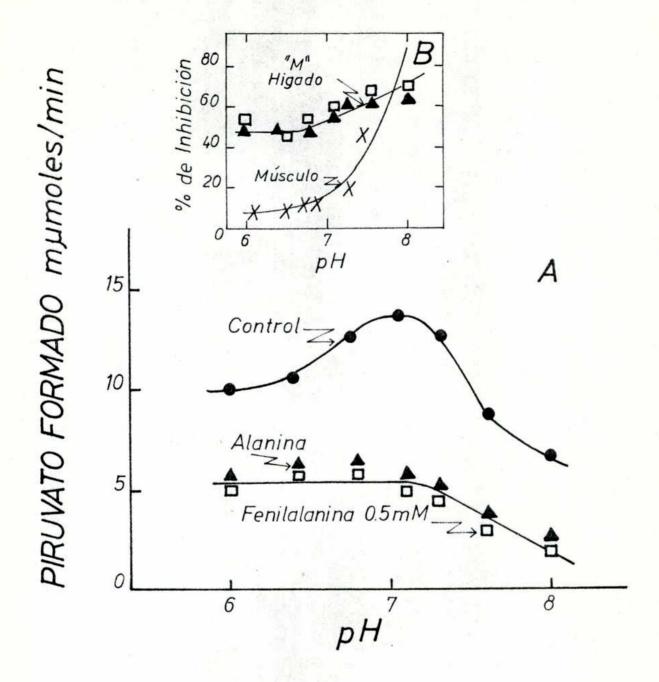


Fig. 25-A. Efecto del pH en la actividad de la piruvato quinasa hepatica tipo M en ausencia y en presencia de alanina y fenilalanina. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Tabla 8, excepto el pH del buffer que varió como se indica. MES-TMA y TES-TMA se emplearon como bufferes a una concentración de 100 mM. El primero de ellos se lo utilizó para las determinaciones en el rango ácido y el otro en el alcalino. El nivel de alanina y fenilalanina fue de 1.5 y 0.5 mM respectivamente. B. Porcentaje de inhibición de la actividad de la isoen zima M de higado y de músculo esquelético por la alanina y fenilalanina. a diferentes valores de pH: (X) Efecto de la fenilalanina en la enzima de músculo esqueletico. (A) y (C) efecto de la alanina y fenilalanina en la isoenzima M de higado.

be a la isoenzima i de higado se consideró interesante efectuar un estudio comparativo con estos aminoácidos entre ambas enzimas tratando de establecer otras diferencias. También se estudió el efecto de la treonina en la actividad de las mismas, has condiciones de incubación y el nivol de amino ácidos fue igual a las empleadas en los experimentos expuestos en la Tabla o.

En la rig.26 se han expuesto los resultados obtenidos. De puedo ver que la alanina y treonina revierten la inhibición por l'enilalanina en las dos enzimas pero en el caso de la isoenzima li de hígado, la reversión fue parcial. Este experimento constituyo una evidencia de que los aminoácidos que modifican la actividad de la isoenzima hepática ejercen su efecto unióndose a un sitio alostárico común, como se discutirá mas adelante.

Efecto de la serina y cistefna en la inhibición de la piruvato quinasa hepática tipo E por al unos aminoácidos.

Como se demostró anteriormente, la serina y cistefna no modifican la actividad de la isoenzima de híbado. Sin embargo, el hecho de que ambos metabolitos sean estructuralmente similares a la alanina, sugirió que si bien no actuaban como inhibidores podrían revertir la inhibición producida por fenilalanina, alanina y otros aminoácidos.

Conviene mencionar que on la piruvato quinasa de músculo esquelético (como se demostró en este laboratorio) la alanina, serina y cisteína reviorten totalmente la inhibición de esta enzima por l'enilalmina.

La actividad enzimática se midió en ausoncia y en presencia de algunos aminoácidos y en presencia de 2.0 mil de serina y cistefna.

Los resultados do este experimento se muestran en la Tabla 9. Se puedo ver que la presencia do serina y cistefna no modifican en absoluto la actividad de la enzima, mientras que otros aminoácidos tal como alanina, fe-

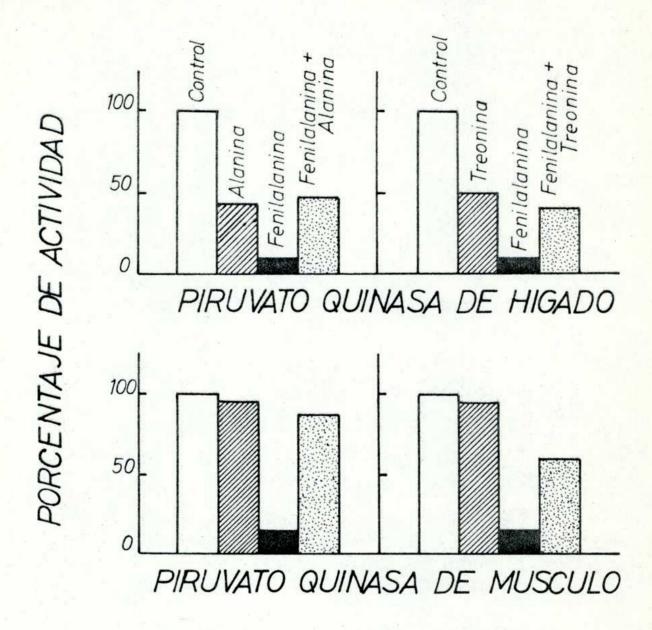


Fig. 26. Efecto de la alanina y treonina en la inhibición de la piruvato quinasa hepática tipo M y de músculo esquelético por fenilalanina. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Tabla 8.

TABLA IX

Efecto de la serina y cistefna en la inhibición de la piruvato quinasa

hepática Tipo D por algunos aminoácidos

Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Tabla &.

Aminoácidos	Concentración (ml)		2 mM Serina	2 m. Cis tef na
Control		100	103	93
Alanina	10	43	64	64
Fenilalanina	5	3	54	70
Valina	5	56	72	72
Valina	10	29	79	72
Treonina	5	54	68	65
Treonina	10	49	65	79
Prolina	5	50	86	61

<u>a</u> La actividad en ausencia de aminoácidos fue de 7.0 mu moles de <u>pi</u> ruvato formado por minuto.

nilalanina, prolina, valina y treonina producen una inhibición de la actividad enzimática de un 40-90%. Por el contrario, el agregado simultáneo de los mismos con serina o cisteína revierte totalmente el efecto inhibidor de los mismos.

Piravato quinasa de corteza renal

Como se señaló en la introducción, en la corteza renal de rata también se demostró la presencia de isoenzimas de piruvato quinasa (104-107,120). Sin embargo, y a pesar de que las mismas podrían representar un sitio importante de regulación metabólica, sus propiedades cinóticas no han sido estudiadas hasta el presente. Debe además destacarse que algunos resultados previos obtenidos con extractos crudos en diferentes la boratorios, no son coincidentes respecto al efecto del FDP sobre la actividad de estas isoenzimas (105,107).

Considerando que la cortesa renal es el otro tejido en el cual se efectúa la gluconeogenesis en los mamíferos, el objetivo de este trabajo fue también estudiar algunas de las propiedades reguladoras de las isoenzimas presentes en este tejido, tratando por otra parte de establecer si las mismas tienen características similares a las de la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo M descriptas anteriormente.

Separación de las isoenzimas de piruvato quinasa de corteza renal.

Debido a que la separación de la piruvato quinasa hepática tipo L y M a partir de un sobrenadante de 100.000 xg de este tejido se puede efectuar mediante cromatografía en columnas de DEAE-celulosa, se decidió utilizar este método para establecer la presencia de isoenzimas en la corteza renal. El homogenato de este tejido fue preparado del mismo modo que el de hígado como se indicó en Materiales y Métodos con excepción de la concentración de EDFA de la solución buffer utilizada, que fue de 5.0 mM. huego de la centrifugación a 100.000 xg las sales y compuestos de bajo peso molecular se los eliminó por cromatografía en columna de Sefadex G-25 equilibrado a pH 7.5 como se indicó en Materiales y Métodos.

El sobrenadante de corteza renal que contenía en total 22 mili-

gramos de proteína con una actividad específica de 1.8 unidades/mg., fue adsorbido a una columna analítica de DEAE-celulosa de 12 mm. de diametro y 150 mm. de altura equilibrada con una solución bufrer igual a la emplea da en la columna de Jefadex G-25 (ver Materiales y Métodos). Después de la adsorción, la columna se lavó con 50 ml. de la solución bufrer de equilibrio.

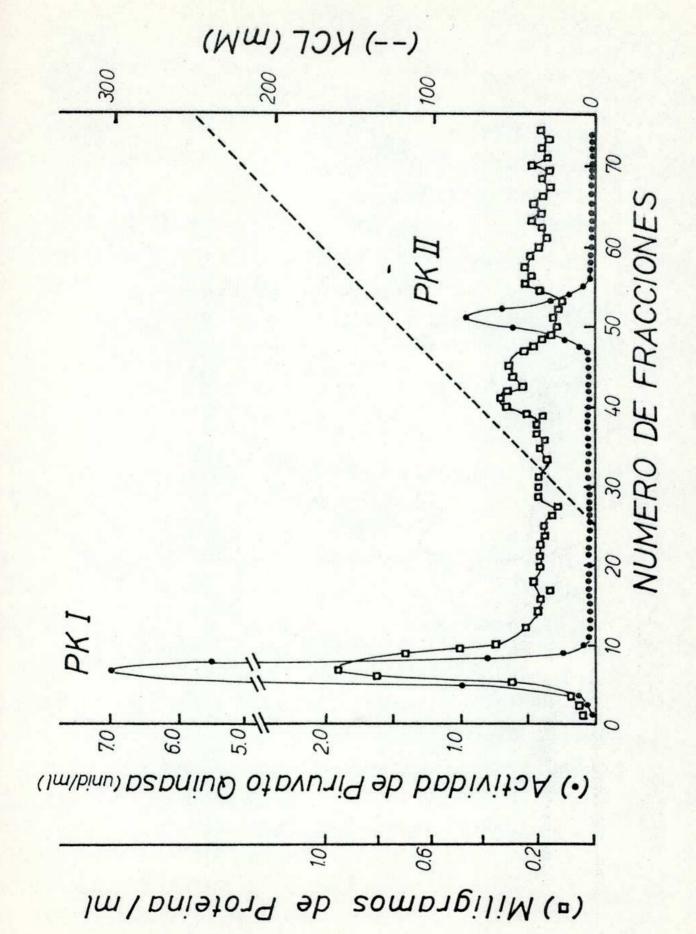
ba elución se efectuó haciendo pasar un gradiente lineal de CIK entre O a 250 mM, con la solución buffer de equilibrio. El flujo de la columna se ajustó en 2 ml. por minuto. Los volumenes correspondientes al la vado y gradiente se recogieron en 60 fracciones de 2 ml. cada una. La actividad enzimática se midió colorimétricamente.

tra en la Fig.27. Como se puede ver, el primer pico de actividad o piruva to quinasa I eluye de la columna con la solución buffer de equilibración y representa un 70% de la actividad enzimática. Esta fracción es complota mente separada del segundo pico o piruvato quinasa II, el cual eluye a 120 mM de Clk. Las características cromatos ráficas de estas enzimas es si milar a las descriptas por lanaka y col. (107) para la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo M. Sin embargo, la relación de actividades entre las enzimas de corteza renal es distinta a la descripta en el hígado (107).

Teniendo en cuenta que en el hígado las isoenzimas de piruvato quinasa difieren marcadamente respecto de la activación por el FDP, se es tudió con esta misma preparación el efecto de este metabolito sobre las formas I y II de corteza renal.

Con este fin la actividad del perfil de ambos tipos se midió a un nivel de 0.8 mM de PEP, a pH 7.5 en ausencia y en presencia de 0.1 mM de FDP.

Se puede apreciar que ambas enzimas tienen propiedades distintas



columna de DEAE-celulosa. Las condiciones experimentales fueron descriptas en el texto. Separación de las iscenzimas de piruvato quinasa de corteza renal en cromatografía en

F18. 27.

pues el PDP unicamente produjo activación en la forma II (Fig. 28).

El resultado de los dos experimentos presentados (Fig.27 y 28) indica claramente que en la corteza renal existen dos formas de piruvato quinasa, las cuales tienen aparentemente algunas características semejan tes a las de las isoenzimas de hígado.

Es importante destacar que simultáneamente con este experimento se efectuó otro en condiciones similares con módula renal, la cual es un tejido predominantemente clucolítico (158). El perfil cromatográfico de la columna de DEAE-celulosa demostró únicamente la existencia de un solo pico que eluye como la forma I de corteza. El FDP no tiene efecto sobre esta enzima, y cuando se incubó la zona del gradiente correspondiente a la zona de elución de la forma II de la corteza en presencia del metabolito mencionado, tampoco se detectó actividad (resultados no expuestos).

Este resultado sugiore que la presencia de isoenzimas de piruva to quinasa regulable por FDP (igual que la forma L de hfgado) puede estar relacionada al proceso gluconeogénico.

Efecto del ATP y el FDP en la actividad de la piruvato quinasa de corteza renal I y II a distintos valores de pH.

Con el fin de ostablecer otras diferencias entre los picos I y II de piruvato quinasa de corteza renal, el efecto del ATP y FDP se estu dió a distintos valores de pH. Debe destacarse que en el hígado de rata unicamente la isoenzima L modifica sus propiedades por variaciones en el pH del medio de incubación.

El nivel de PEP en este experimento fue de 1.0 mM. La actividad se midió en ausencia y en prosencia de 1.0 mM de ATP y 0.1 mM de FDP a pH 5.9 y 7.5 respectivamente.

Los resultados obtenidos se han presentado como relación de ac-

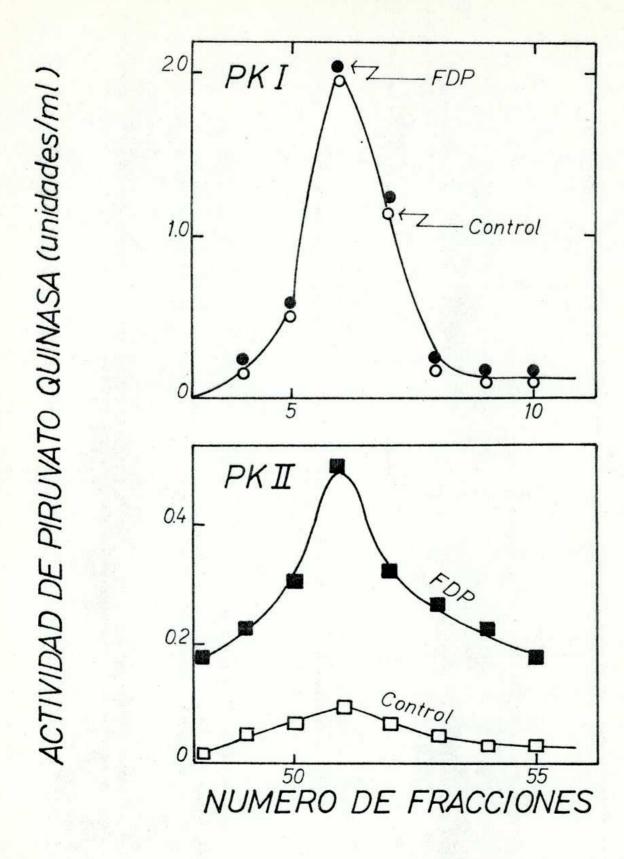


Fig. 28. Efecto del FDP en la actividad de la piruvato quinasa de corteza renal I y II. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos, excepto la concentración de PEP que fue de 0.8 mM. La actividad ensimática se midio colorime tricamente en ausencia y en presencia de FDP 0.1 mM.

tivación, inhibición y reactivación, como se indica en la Fig.29. Se puede apreciar que a pH 5.9 el ATP y el FDP carecen de efecto sobre la actividad de estas enzimas. Por el contrario a pH 7.5 estos metabolitos producen una marcada inhibición y activación del pico II. La presencia simultánea de FDP y ATP bloquea el efecto inhibidor de este último. Los mismos no modifican la actividad del pico I.

Propiedades cinéticas de la piruvate quinasa de corteza renal I y II.

Las características cinéticas de ambas formas de piruvato quinasa de corteza renal con respecto al PEP se estudiaron en ausencia y en presencia de ATP y FDP.

Con este fin las enzimas se prepararon por fraccionamiento con sulfato de amonio. La forma I precipita entre 55-70% de saturación, mientras que la forma II entre 30-45%. Luego se las purificó mediante cromatografía en columna de DEAE-celulosa (forma II) y CM-celulosa (forma I) respectivamente, como se indicó en Materiales y Métodos para las isoenzimas de hígado.

Econ resultados obtenidos se expresaron mediante la ecuación de Hill y se los ha expuesto en las Pig.30 y 31. Se puede apreciar que las características cinéticas de la forma II son similares a las de la piruvato quinasa hepática tipo L. En efecto, a pH 7.5 la ensima tiene un marcado efecto cooperativo homotrópico para el PEP. En presencia de 2.0 mH de ATP la interacción con el suntrato aumenta marcadamente. Los valores de n_H obtenidos en estas condiciones fueron de 2.98 y 3.4 respectivamento. El agregado de 0.1 mM de FDP anula el efecto cooperativo para el PEP y el valor de n_H fue de 1.0. Estos metabolitos también modifican la afinidad de la enzima por este sustrato, lo que se ve por cambios en el valor de la constante S_{0.5} como se indica en la Fig.30.

Los resultados obtenidos con la forma I (libre de enolasa) se expone en la rig.31. Se puede ver que esta enzima tiene efecto cooperativo ho

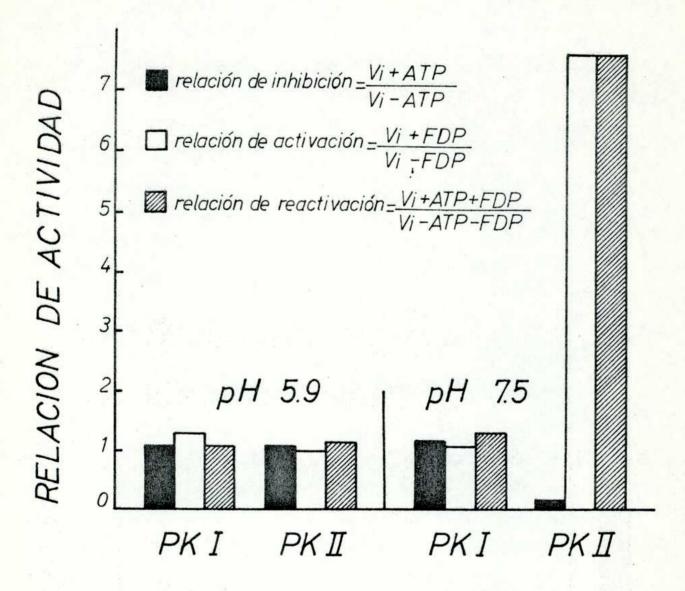


Fig. 29. Efecto del ATP y FDP en la actividad de la piruvato quinasa de corte a renal I y II a pH 5.9 y 7.5. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos, excepto el pH del buffer y la concentración de PEP que fue de 1.0 mM. El nivel de ATP y FDP fue de 2.0 y 0.1 mM respectivamente. Los datos obtenidos se han representado mediante las relaciones de inhibición, activación y reactivación, las cuales se expresan como se indica.

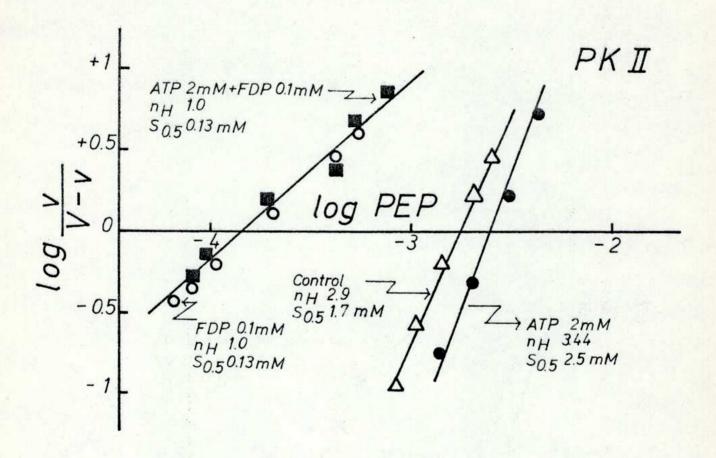


Fig. 30. Variación de la actividad de la forma II de piruvato quinasa de corteza renal en función de la concentración de PEP en ausencia y en presencia de ATP 2.0 mM y FDP 0.1 mM como se indica. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 12. Los datos obtenidos han sido graficados de acuerdo a la ecuación de Hill.

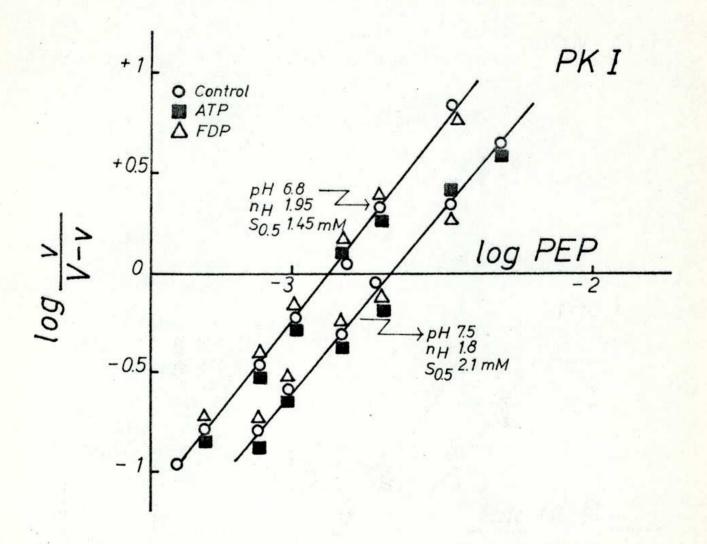


Fig. 31. Variación de la actividad de la forma I de piruvato quinasa de corteza renal en función de la concentración de PEP en ausencia y en presencia de ATP 2.0 mM y FDP 0.1 mM a pH 6.8 y 7.5 como se indica. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig. 12, excepto que en una de las curvas el pH fue 6.8. Los datos obtenidos han sido graficados de acuerdo a la ecuación de Hill.

motropico para el PEP. El valor de n, fue de 1.8.

Por el contrario a lo osservado con la forma II, el agregado de ATP y FDP no modifica la interacción de la forma I con su sustrato. En efecto, el valor de $n_{\rm H}$ en presencia de estos metabolitos fue el mismo. Tam poco hubo cambios en la afinidad de esta enzima por el PEP.

Debido a que a pH 6.8 la forma II no tiene efecto cooperativo ho motrópico para el PEP (como se verá más adelante), se determinó si cambios en el pH del medio de incubación modifican la interacción de la forma I con este sustrato. El resultado de este experimento también se expone en la Fig. 31. Se puede apreciar que a pH 6.8 y 7.5 el valor de n fue igual, modifican dose solo ligeramente la afinidad de esta enzima por el PEP.

Experimentos realizados previamente al estudio cinético mencionado demostraron que la alanina inhibe la actividad de la forma I y II de piruvato quinasa de corteza renal. El efecto de este metabolito sobre las características de las curvas de saturación para el PEP de ambas enzimas fue estudiado.

Los resultados obtenidos se expresaron de acuerdo a la ecuación de Hill y se los ha expuesto en la Tabla 10. Se puede apreciar que el agregado de alanina aumenta marcadamente la interacción cooperativa de la forma II con el PEP. El valor de n_H obtenido en ausencia y en presencia de este amino ácido fue de 2.98 y 3.7 respectivamente. La afinidad de la enzina por el sus trato también disminuyó en presencia de este metabolito ya que el valor de la constante S_{0.5} aumentó de 1.7 a 3.4 mM.

La adición de 0.1 mM de FDP revierte completamente el efecto de la alanina sobre la forma II. En estas condiciones la enzima no tiene efecto cooperativo homotrópico para el PEP y su afinidad por este sustrato aumenta marcadamente. El valor de $n_{\rm H}$ fue de 1.3 y el valor de la constante $S_{0.5}$ fue

TABLA X

Efecto do la alanina y PDP en la curva do saturación del PEP de las formas I y II de piruvato quinaca de corteza renal

Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig.15. La concentración de alamina fue de 0.2 mH y 1.0 mM para las formas I y II respectivamente. Estos niveles producen un efecto de un 50% al valor de $S_{0.5}$ para el PEP de cada una de las isoenzimas mencionadas.

Metabolitos	r'orm	a I ^a	rorma II a		
	S _{0.5} (mM)	11 H	S 0.5 (mii)	n H	
Control + Alanina + Alanina + FDP	2.1 3.6 3.6	1.72 1.96 1.96	1.7 3.4 0.13	2.98 3.7 1.3	

a los datos expuestos fueron calculados graficando los resultados obtenidos según la ecuación de Hill.

do 0.13 mM respectivamente.

Los resultados expuestos demuestran que la alamina y el ATP producen cambios similares en las propiedades de la forma II do piruvato quinasa de corteza remal, los cuales son revertidos completamente por el FDP.

Por el contrario, la alanina no aumonta la interacción cooperativa de la forma I con el PEP ya que los valores de n_H obtenidos en ausencia y en presencia de este aminoácido fueron casi iguales. Sin embargo, la alanina disminuye ligeramente la afinidad de esta enzima por el sustrato. El valor de la constante S_{0.5} aumentó de 2.1 a 3.6 mM. El agregado de 0.1 mM de FDP como se vió anteriormente no tiene ningún efecto sobre la actividad de esta enzima.

Los datos expuestos permiten concluir que las formas I y II de piruvato quinasa de corteza renal también difieren en su comportamiento frente a la alanina. Por otra parte, el fecto de este aminoácido sobre la forma II es similar al descripto por Schoner y col.(91) con la piruvato quinasa hopática tipo L.

Efecto del pH en las propiedades reguladoras de la forma II de la piruvato quinasa de corteza renal.

Teniendo en cuenta que el pli intracelular del riñón varía entre 6.7 y 7.4 (159,160) fue de interés estudiar si cambios similares en los valores del pli del medio de incubación producían modificaciones en las propiedades de la forma II de piruvato quinasa de corteza renal con respecto al PEP. También se estudió las características cinéticas de la inhibición por ATP en condiciones similares.

Los resultados de estos experimentos se expresaron de acuerdo a la ecuación de Hill y se los expone en la Tabla 11. Se puede apreciar que a pH 6.8 y 7.3 los valores de n fueron de 1.3 y 2.2 respectivamente, lo cual indica que la interacción cooperativa con el PEP es mayor con el au-

Propiedades reguladoras de la Forma II de piruvato quinasa

de corteza renal

- A. Las condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en la Fig.15, excepto el pH del buffer que fue 6.8 y 7.3 como se indica.
- B. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y Métodos, excepto el pil del buffer que fue de 6.8 y 7.3, la concentración de ADP que fue de 0.6 mM y el nivel de PEP que fue de 1.0 mM.
- C. Las condiciones experimentales son las descriptas en Materiales y M6 todos, excepto la concentración de ADP que fue 0.6 mM y el nivel de PEP que fue 1.7 y 4.0 mM respectivamente.

Lijando Variable	Condicionos	n _{il} a	⁸ 0.5
A. PEP	pH 6.8 control pH 6.8 + FDP 0.1 mM pH 7.3 control pH 7.3 + FDP 0.1 mM	1.3 1.2 2.0 1.0	0.89 0.15 1.40 0.18
B. ATP	рИ 6.8 pii 7.3	n _H 2.0 1.0	I _{0.5} 1.37 0.75
C. ATP	PEP 1.7 mid PEP 4.0 mM	1.2 2.0	0.24 1.50

<u>a</u> Los valores presentados han sido calculados expresando datos experimentales sejún la ecuación de Hill.

<u>b</u> Los valores presentados han sido calculados expresando datos experimentales según la modificación propuesta por Jensen y Nester (133).

mento de pli. En presencia do 0.1 mil de l'DP no hubo efecto cooperativo homotrópico y la afinidad de la enzima por el sustrato aumenté marcadamente.

bien modifican las características cinéticas de la inhibición por ATP. A pli 7.3 la cinética de inhibición por este metabolito es Lichaoliana. Por el contrario, a pli 6.8 la ensima tiene un marcado efecto cooperativo homotrópico para el ATP. Los valores de n_{il} obtenidos en estas condiciones fueron de 1.0 y 2.0 respectivamente. También se observó variaciones en el valor de la constanto 1_{0.5} la cual fue un 50, menor a ph 7.3 como se indica en la Tabla 11.

También se observó que a pli 7.5 cambios en el nivel de PIP de la mezela de incubación modifican las características de la inhibición de la forma II por ATP. Estos resultados también se exponen en la Tabla II.

Los resultados presentados permiten concluir que la forma Il de piruvato quinasa de corteza renal tione propiedades bastante similares a la isoenzima b de hígado.

IV DISCUSION

En el presente trabajo se han estudiado algunas propiedades cinéticas de las isoenzimas de piruvato quinasa de hígado y de corteza renal. Tal como se mencionó en la Introducción, en los mamíferos estos tejidos son los únicos en los cuales ocurren los procesos gluconeogénicos.

El control metabólico de la piruvato quinasa en el hígado y en la corteza renal tiene, como se vió anteriormente, especial importancia ya que cambios recíprocos en la actividad de esta enzima y de las que participan en la formación de PEP determinarán la dirección del flujo de este metabolito en el sentido de la glucólisis o gluconeogénesis.

Por este motivo se consideré de gran interés estudiar y comparar las características de regulación de las isoenzimas presentes en estos tejidos.

El estudio de las propiedades cinéticas de la piruvato quina sa hepática tipo L y tipo M se efectuó con mas profundidad, mientras que el de las isoenzimas I y II de corteza renal fue hecho con el fin de establecer si las mismas tenían características similares a las de las isoenzimas L y M de hígado.

En el curso de este trabajo se encontró que existe una gran similitud entre la piruvato quinasa hepática tipo L y la forma II de corteza renal.

La isoenzima M de hígado tiene algunas propiedades semejantes a las de la enzima de músculo esquelético pero presenta importantes diferencias.

La forma I de corteza renal tiene características comunes a las

de la piruvato quinasa hepática tipo L y a la enzima de músculo esquelético. De esta manera, la forma I representarfa un tercer tipo de isoenzima que tentativamente puede ser denominada LM.

Por razones de claridad los resultados obtenidos en esta investi<u>sa</u> ción serán discutidos en forma soparada.

Piruvato quinasa hegătica Tipo L

Consideraciones cinéticas generales.

Los estudios cinéticos efectuados con la piruvato quinasa hepática tipo L indican claramente que es una enzima alostérica cuyas propiedades son marcadamente modificadas por variaciones en el pli del medio de incubación. Esta interpretación está apoyada por los siguientes resultados exporimenta-les:

1) Cuando la actividad enzimática se midió en función de la concentración de PEP a valores de pH superiores a 7.0 (a niveles saturantes de ADP) se observó la aparición de ourvas sigmoides indicando que la enzima tiene efecto cooperativo homotrópico para dicho sustrato. En presencia de FDP las curvas de saturación se transforman de sigmoides en hiperbólicas (Fig.4-A y 12).

Por el contrario, a pli ácido la cinética de la enzima para el PEP es Michaeliana. La presencia de PDP no modifica sus características y carece de efecto activador (Fig.4-B).

El hecho de que los cambios en las curvas de saturación sean producidos por un metabolito estructuralmente diferente a los sustratos, como es en este caso el FDP, indica que su interacción con la enzima es indirecta o de naturaleza alostérica (161).

2) Los cambios provocados por las variaciones en el pH del medio de incubación en la interacción de la enzima con el PEP, fueron claramente demostrados por la estrecha correlación entre los distintos valores de pH con los obtonidos para el coeficiente n y la constante $S_{0.5}$ (Fig.18-A). En efecto, en el rango de pH comprendido entre 6.0 y 7.0 el valor de $n_{\rm H}$ fue siempre cercano a la unidad, lo cual contrasta marcadamente con el aumento lineal que se observa con el incremento en el pH del medio de incubación.

En forma paralela con estos cambios, también se vió que el valor de la constante $S_{0.5}$ aumenta apreciablemente indicando que la ensima dismimuye marcadamente la afinidad por el PEP a valores de pH superiores a 7.0.

Debido a que además so pudo determinar la presencia de un grupo io nizable de pK 6.9 (Fig.18-B) se indicé que les cambios en la ionización del mismo, producido por las variaciones de ph del medio de incubación estarían asociados con los distintos grados de interacción de la enzima con el PEP. Sin embargo, dado que es posible considerar al protón como un efector alestérico, estos cambios pueden interpretarse en forma distinta, como se discutirá mas adelante.

- 3) El resultado de diferentes experimentos también permite concluir que el ATP os un inhibidor alostórico de esta enzima, como también demostrar que las características de la inhibición por este metabolito son marcada mente modificadas por las variaciones de pH. En efecto se pudo ver que:
 - a) a pli 7.5 y en distintas condiciones, la inhibición por ATP es revertida completamente por concentraciones muy bajas de FDP (Fig.7 y 8), in dicando que la unión del inhibidor con la envima no ocurre en el sitio activo de la misma.
 - b) cuando la actividad se midió a pli 7.5 en función de la concentración de ATP a niveles relativamente altos de PEP (Fig.10) se observó la aparición de curvas signoidos, las cuales demuestran que la ensima tien ne efecto cooperativo homotrópico para el inhibidor. Por el contrario, a un nivel bajo de FEP la inhibición es Michaeliana.

- c) la curva de inhibición por ATP a niveles bajos de PEP, pero en presencia de concentraciones muy bajas de FDP, también es sigmoide. Se demuestra también así que en estas condiciones la enzima tiene efecto cooperativo homotrópico para el inhibidor (Fig.8). El hecho de que los cambios en el nivel de PEP y que la presencia de FDP provoque modificaciones en las características de la inhibición, demuestra la existencia de efectos heterotrópicos del sustrato y activador en la interacción de la enzima con el ATP.
- d) cambios apreciables en el pH del medio de la incubación modifican marcadamente la forma de las curvas de inhibición por ATP, siendo finicamente sigmoide a pH ficido (Fig.14-A).
- e) el ATP aumenta la cooperatividad de la enzima para el PEP, efecto que es completamente revertido en presencia del activador (Fig.12).

 Esto demuestra también que ambos metabolitos (ATP y FDP) tienen efecto heterotrópico en la interacción de la enzima con su sustrato.
- 4) Variaciones en el pH del medio de incubación en el rango fisiológico in tracelular hepático, producen también cambios apreciables en las curvas de saturación del PEP y ATP de manera tal que los mismos podrían representar un mecanismo de control que modificaría la interacción de la enzima con los metabolitos efectores (Fig.15 y 17).

Teorías y modelos de regulación alostérica.

Las primeras observaciones que permitieron dar una base molecular a las propiedades cinéticas de las ensimas cuya actividad es modifica
da por metabolitos, fué provista por el trabajo de Gerhart y Pardee (162).
Estudiando las propiedades de la aspártico transcarbamilasa estos autores
encontraron que cuando la ensima era sometida a ciertos tratamientos (calor
y urea) se perdía el efecto inhibidor del CTP (producto final de la vía me
tabólica de las pirimidinas) conservando intaneta su actividad catalítica.
Por otra parte, estos tratamientos producían la pérdida del efecto coope-

rativo del aspartato y una disminución en el coeficiente de sedimentación de la enzima.

En base a estos resultados postularon que la enzima poseía sitios independientes y específicos para el sustrato y el metabolito efector. La acción de este último sobre la enzima produciría cambios en su con
formación, los cuales se traducirían en una menor afinidad por su sustrato.

Posteriormente este hipótesis fue apoyada por los trabajos de Changeux con la troonina deaminasa (163,164) y por Mansour con la PFK (69, 70). En la actualidad existen numerosos ejemplos de enzimas reguladoras cu yo comportamiento ha sido explicado mediante la hipótesis propuesta.

La prueba concluyente que permitió comprobar estas ideas fue obtenida por Gerhart y Schachman (165) quienes mediante el uso de P-cloromer curibenzoato consiguieron disociar la aspártico transcarbamilasa en dos tipos de subunidades:

- 1) Subunidad catalítica: que tenía actividad enzimática, no era inhibida por CTP y la cinética para el aspartato era Nichaeliana.
- 2) Subunidades reguladoras: que tenían el sitio específico al cual se une el efector pero sin actividad catalítica.

La reasociación de la subunidad catalítica con las reguladoras daba lugar nuevamente a la aparición de una cinótica alostórica para el sustrato, como también a la inhibición por CTP (165).

Actualmente dado que es un hecho general que no existe en la majoria de los casos similitud estructural entre los sustratos y los metabolitos efectores, resulta obvio que para explicar las propiedades cinéticas de las enzimas reguladoras es necesario aceptar que en la molécula proteica existen sitios reguladores específicos a los cuales se unen los efectores motabólicos distintos del sitio catalítico a los cuales se une el sustrato.

Debido a que las propiedades de estas enzimas no se podían ex-

plicar por los postulados de la cinética Michaeliana clásica fué necesario formular nuevas teorías que permitieran dar una interpretación adecuada a las mismas.

Monod, Wyman y Changeux (166) han propuesto una teorfa para explicar el comportamiento de las enzimas reguladoras. La misma está basada en las siguientes suposiciones:

- 1) Las enzimas alostéricas son proteínas formadas por dos o mas subunidades idénticas llamadas protémeros, las cuales están asociadas entre sí de tal forma que ocupan posiciones simétricas en la molécula. Esta dis posición implica además que la conformación de cada subunidad está con dicionada por su asociación con las otras.
- 2) Cada subunidad posee un sitio específico para el sustrato y otro sitio específico para el efector alostérico (negativo o positivo).
- 3) La enzima puede existir por lo menos en dos estados conformacionales interconvertibles entre sí, denominados R y T que en ausencia de efectores se encuentran en equilibrio ($R \longrightarrow T$) el cual se expresa mediante la constante alestérica L ($L = R_O / T_O$).
- 4) La unión do una molócula de efector al combinarse preferencialmente con alguno de los dos estados conformacionales produce un cambio del equilibrio entre ambos, do manera tal que la afinidad par las nuevas molóculas de ligando que se unen a la proteína aumenta.

De acuerdo a este modelo, Monod, Myman y Changeux (166) demostraron matemáticamente que el ligando (sustrato o efector) tendrá efecto cooperativo que se evidenciará por la aparición de curvas de saturación sigunoides.

5) La transición entre los estados R y T ocurre en todas las subunidades en forma concertada de manera tal que la simetría de la molécula se concertada de la significa que los cambios de configuración de las subunidades

son simultáneos en todas ellas.

Como consecuencia de esta teoría es posible suponer que en ausencia de ligandos la distribución de especies moleculares reflejaría la energía libre relativa de los distintos estados conformacionales, los cuales en
definitiva estarían directamente relacionados con la interacción de las subunidades en cada estado conformacional.

Además de esta teoría, Koshland y col.(131,167-169), y Atkinson y col.(170,171) han propuesto independientemente dos modelos que difieren marcadamente del anterior.

El modelo de Koshland y col.(131,167-169) tiene como fundamento el concepto de "Induce fit", según el cual el cambio conformacional que ocurre en una proteína flexible depende de la estructura del metabolito que se une a la misma. De esta forma:

- 1) Cuando un efector se une a una subunidad el cambio de configuración producido en ella se transmite a las otras, cuyos sitios están libres, afectando de este modo la estabilidad relativa entre las subunidades adyacentes.
- 2) Si la interacción entre las subunidades es débil, el cambio de conformación sólo ocurrirá en la que el efector se une, sin modificar la configuración de las otras. De este modo la proteína puede tener estados conformacionales híbridos y el principio de simetría de la molécula no se conserva. En esta situación, el cambio de configuración en las subunidades no es concertado y por lo tanto difiere del modelo de Monod, Wyman y Changeur.
- 3) En los casos en que la unión de un efector a una subunidad modifica mucho la estabilidad de las vecinas, éstas pueden cambiar parcial o totalmente, adquiriendo una conformación igual o diferente que la que tiene el ligan-

do unido. De esta forma, la entrada de un ligando a su sitio especifico produciría un cambio de configuración que puede aumentar o disminuir la afinidad del ligando por otro sitio.

4) Cuando todas las subunidades adquieren la misma configuración al unirse un efector a una de ellas, el cambio es de tipo concertado. En este caso este modelo no difiere del de Monod, hyman y Changeux, y por lo tanto es te último constituye un caso límite del modelo de Koshland y col.

Atkinson y col.(170,171) han propuesto un modelo que también difiere en forma apreciable del de Monod y col. El mismo de basa en la existencia de cambios progresivos en la interacción de los sitios de un ligando. De esta manera, la unión con un efector a un sitio de la proteína puede aumentar o disminuir la afinidad del efector por el segundo sitio. Este modelo es en cierto modo aproximado al de Koshland y col., pero la interpretación matemática en ambos casos es diferente.

Aplicación de la teoria de Monod, Wyman y Changeux a la piruvato quinasa hepática tipo L.

Si bien los datos cinéticos que se obtienen con una enzima alosté rica permiten una evaluación de sus propiedades reguladoras, los mismos no constituyen un elemento de juicio suficiente como para distinguir claramente a cual de los modelos anteriormente discutidos ésta se ajusta.

Los resultados obtenidos con la piruvato quinasa hopática tipo L fueron comparados con el modelo de Monod, syman y Changeux (166) comprobán dose que los mismos se podían explicar en forma cualitativa y en algunos casos cuantitativamente en base a esta teoría.

Aunque la elección de este modelo para interpretar el comportamien to cinético de la isoenzima L de hígado fue arbitraria, ha resultado de gran utilidad debido a que proporcionó una hipótesis de trabajo y una forma sistemática de estudio, ya que permitió predecir muchos de los experimentos ex-

puestos.

En el caso de la piruvato quinaca hepática tipo L es posible suponer de acuerdo a este modelo, que tanto el PEP como el FDP al unirse a
la enzima actuarían desplazando el equilibrio de las especies moleculares
hacia el estado R. Por el contrario, el ATP favorecería el desplazamiento
hacia el estado T.

los resultados expuestos anteriormente demostraron que las propiedades cinéticas de esta enzima se modificaban apreciablemente por variaciones en el pli del medio de incubación. La interpretación de los mismos de acuerdo a este modelo indica que a pli ácido el equilibrio estarfa desplaza do hacia el estado 2 mientras que a pli alcalino so desplazarfa hacia el estado T. Esta suposición está apoyada por los experimentos mostrados en las Fig.4 y 12, ya que los cambios de pli actuarfan en la enzima como los efecto res metabólicos (ATP y FDP).

En efecto, a pH ácido la curva de saturación del PEP es hiperbólica y el FDP no modifica su característica. Por otra parte en estas condiciones la inhibición por ATP es de tipo cooperativo, igual que cuando se la estudió en presencia de concentraciones muy bajas de FDP.

For el contrario, a pH alcalino en el cual la curva de saturación de PEP es sigmoide, la presencia de PDP la transforma en una hipérbola. Aparentemente el efecto del pH alcalino y del mTP son similares, si se tiene en cuenta que tanto el aumento de pH como la presencia de este metabolito producen un aumento en la sigmoicidad de la curva del PEP. El hecho de que los valores obtenidos para el coeficiente n_H y la constante S_{0.5} a pH 5.15 en ausencia del inhibidor y a pH 7.5 en presencia de ATP sean similares, continua esta conclusión (Fig.13 y 18-A).

Los hechos discutidos hasta ahora permiten concluir que los resultados experimentales obtenidos con la piravato quinasa hepática tipo L están

de acuerdo cualitativamente con el modelo de Monod. Wyman y Changeux.

Para verificar si los mismos podían además ajustarse en forma cuantitativa a esta teoría, algunos datos experimentales fueron expresa dos según la ecuación de Monod y col., la que se expone en forma simplificada en las Pig.32 y 33. Para ésto, además se supuso que la ensima posee tres sitios para el PEP. Los valores de la constante alostérica L fueron elegidos arbitrariamente para cada caso.

En las Fig.32 y 33 se puede ver una perfecta coincidencia entre las curvas teóricas calculadas y las curvas experimentales expuestas en las Fig.12 y 4.

El hecho de que los resultados expuestos cumplan en ambos aspectos, cualitativo y cuantitativo, con esta teoría, ha permitido concluir que la transición alostérica de la piruvato quinasa hepática tipo L ocurriría como se expone en la Fig. 34.

Influencia del pH en las enzimas reguladoras.

Las modificaciones do las propiedades de muchas enzimas reguladoras por variaciones en el pli del medio de incubación, es un fenómeno bio lógico general.

Los resultados expuestos hasta ahora parecen demostrar que los cambios observados en las propiedades cinéticas de la piruvato quinasa hepática tipo h y en la forma II de la corteza renal, ocurren en forma cualitativamente similar en otras enzimas alostéricas de distinto origen.

Los datos recopilados en la Tabla 12 parecen apoyar esta conclusión. En la misma se han presentado los valores del coeficiente de Mill de cada ensima para su sustrato, obtenidos en condiciones extremas de pH. Estos han side extraídos directamente de la literatura y en otros casos se los calculó a partir de los resultados experimentales publicados (119,172-177).

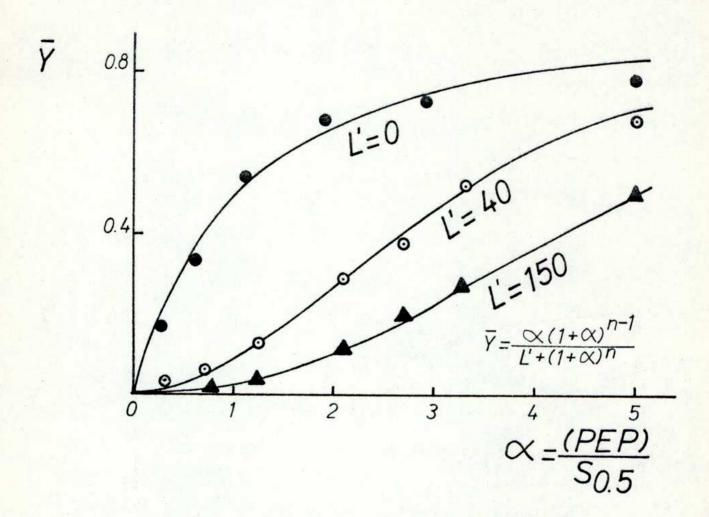


Fig. 32. Los resultados expuestos en la Fig. 12 se han gráficado como \overline{Y} en función de \propto (concentración de PEP/S_{0.5}) junto con las curvas teoricas calculadas a partir de la ecuación de Monod y col. (166) como se expresa en la figura, considerando $n_H = 3.0$ y diferentes valores de L'como se indica. (o) Control, (\triangle) en presencia de ATP 2.0 mM y (\bigcirc) en presencia de ATP 2.0 mM y de FDP 0.1 mM.

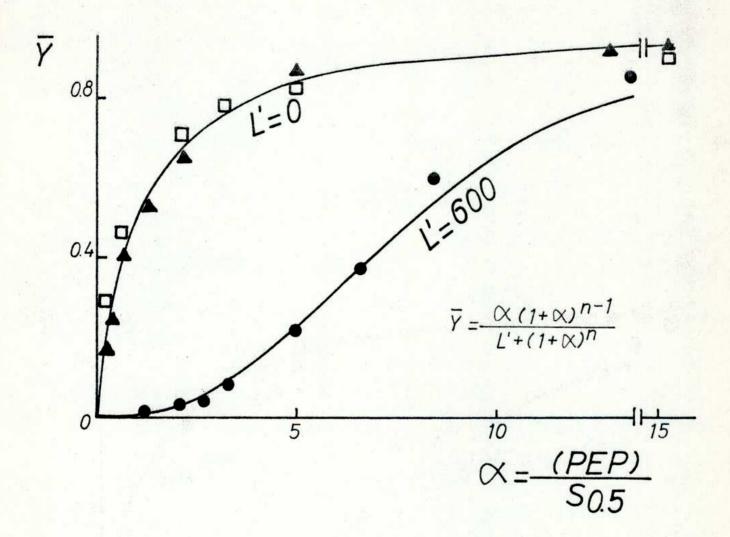


Fig. 33. Los resultados expuestos en la Fig. 4 se han gráficado como \overline{Y} en función de \propto (concentracion de PEP/S_{0.5}) junto con las curvas teoricas calculadas a partir de la ecuación de Monod y col. (166) como se expresa en la figura, considerando n_H = 3.0 y diferentes valore de L'como se indica. (\bullet) a pH 8.15 en ausencia de FDP, (\square) a pH 8.15 en presencia de FDP y (\triangle) a pH 5.9.

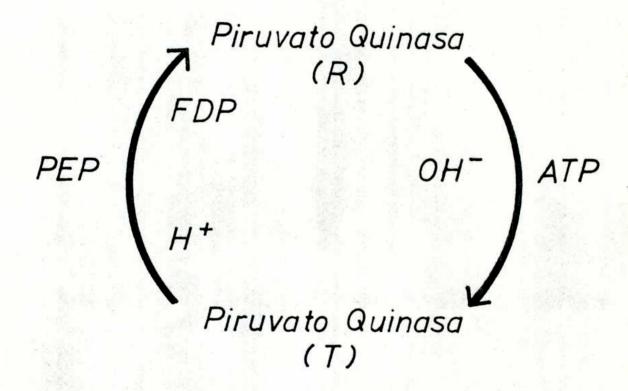


Fig. 34. Esquema de la transición alostérica de la piruvato qui nasa hepática tipo L.

TABLA AII

Efecto del pli en las propiodades alostéricas de ensimas de

diferente origen

Enzimas	Origen]).	И	nI	I	Sustrato
Aspartico transcar- basilasa.	E. Coli	6.1	8.6	1.2ª	4.0°	Aspartato (119)
Treonina deaminasa.	Levadura	7•5	9.0	1.2	3.0	Treenina (172)
Isocítrico dehidroge- nasa.	Semil las	6.4	8.0	1.0	2•9	Isocitrato (173) (174)
Deoxicitid <u>i</u> lato amino- hidrolasa.	Вало	6.5	8.0	1.0	2.9	D-Citidina (175) monofosfa- to
Glutamato d <u>e</u> hidrogenasa.	Blastocl <u>a</u> diola	8.0	10.0	1.0	3.0	Glutamato (176)
Piruvato qu <u>i</u> nasa tipo L.	Higado	5•9	8.3	1.0	3.0	PEP Este trabajo
Piruvato qu <u>i</u> nasa Forma II	Corteza renal	6.8	7•5	1.2	3.0	PEP <u>Este trabajo</u>

a El coeficiente de Hill se calculó a partir de los datos experimentales

Se puede ver claramente que:

- a) la aparición de efecto cooperativo homotrópico ocurre únicamente a pH alcalino.
- b) el comportamiento Michaeliano de estas enzimas con excepción de la glutámico dehidrogenasa es propio del pH ácido.

Datos no expuestos permiten también concluir que cambios en el pH del medio de incubación producen modificaciones en la interacción de es tas enzimas con sus inhibidores y activadores alostéricos (119,172-177).

Algunas evidencias han senalado que el protón actuaría como un modificador alostérico. El hecho de que cambios en el pli de incubación no produjeran ningún efecto en las propiodades cinéticas de subunidades activas de la aspártico transcarbamilasa (177), hemoglobina y mioglobina (178, 179) sugerían esta posibilidad. Consideraciones teóricas recientes efectuadas por Dalziel (180) basadas sobre el modelo de Monod, Myman y Changeux permiten asumir que el protón actúa como un efector alostérico.

En efecto, se cree que cambios en su concentración (\mathbb{N}^+) modifica ría la constante de disociación entre las subunidades y por lo tanto en for ma concertada la configuración de las mismas. De esta forma se podría explicar los cambios producidos en la transición $\mathbb{R} \longrightarrow \mathbb{T}$, y la mayor o menor interacción de las enximas con sus efectores metabólicos.

Esta hipótesis descarta en cierto modo, que los cambios observados en las propiedades cinéticas de enzimas alostéricas de distinto origen,
producidos por variaciones en el pli del medio de incubación sean debidos a
modificaciones en la ionización de ciertos grupos vecinos al centro activo,
o a los que se unen los metabolitos efectores. Sin embargo, un estudio mas
profundo de este problema es necesario para aclararlo totalmento.

Es de interés destacar, que además de la piruvato quinasa hepática tipo L y la forma II de corteza renal, otras enzimas reguladoras de la glucólisis y gluconeogénesis tal como la PFK (118), la piruvato quinasa de músculo (142,143) y la piruvato carboxilasa (90,91) también exhiben cambios en sus propiedades alostéricas como respuesta a variaciones fisiológicas de pH.

lares modifiquen las propiedades de enzimas regulatorias de distinto origen, permite concluir que bajo el punto de vista evolutivo el pli representaría un mecanismo primitivo de control, el cual proveería las enzimas de una gran flexibilidad para interactuar con sus efectores alostéricos.

Piruvato quinasa hepática Tipo K

Consideraciones cinéticas generales.

Los resultados cinéticos obtenidos en este trabajo con la isoenzima M de hígado demostraron que la actividad de la misma es modificada por
distintos aminoácidos. La inhibición por alanina y fenilalanina fue estudiada con mayor detalle debido a que estos metabolitos ejercen su efecto annive
les próximos a los fisiológicos.

Aunque ninguno de los resultados obtenidos con la piruvato quinasa hepática tipo M demostró la aparición de efectos cooperativos, la inhibición de esta enzima por aminoácidos puede ser considerada de naturaleza alostérica. En favor de esta conclusión existen los siguientes datos experimentales:

- 1) Los aminoácidos que tienen efecto inhibidor, con excepción de la alanina, son estructuralmente diferentes al PEP (Tabla 8).
- 2) La mayoría do los aminoácidos incluyendo a la alanina no inhiben completamente la actividad de la enzima aún a concentraciones altas. Este hecho es importante ya que indica que existen distintos sitios de unión para los sustratos e inhibidores (Tabla 8).

3) La serina y cistofna revierten parcialmente la inhibición por aminoácidos. Por otra parte, el resultado obtenido cuando se estudió la acción
combinada de los inhibidores se puede interpretar considerando que la
alanina y treonina desplazan a la fenilalanina de un sitio alostérico
común presente en la enzima, y por lo tanto producen su efecto inhibidor (Tabla 9 y Fig. 26).

Estudios previos efectuados en otros laboratorios (106,120) habían demostrado la existencia de distinta movilidad electroforética entre la piruvato quinasa hepática tipo M y la enzima de músculo esquelético. Sin embargo, el hecho de que ambas no podían ser distinguidas inmunológica mente sugería que estas enzimas tenían propiedades similares.

Los datos presentados en este trabajo clarifican considerablemente este punto, ya que se demostró que la isoenzima M de hígado y la piruvato quinasa de músculo esquelético tienen propiedades cinéticas diferentes. En efecto:

- 1) Ambas isoenzimas se inhiben por algunos aminoácidos en forma distinta (Tabla 8).
- 2) La inhibición de la isoenzima M de hígado por alanina y fenilalanina es de tipo Michaeliano (Fig.24). Por el contrario, este último aminoácido es un inhibidor alostérico de la enzima de músculo esquelético (efecto que se evidencia por la aparición de curvas sigmoides) y la alanina no produce sola ningún efecto sobre la actividad de esta última.
- 3) El efecto de estos dos aminoácidos sobre la isoenzima M de hígado no se modifica por cambios en el pH del medio de incubación, mientras que la inhibición de la enzima de músculo esquelético por fenilalanina es pH de pendiente (Fig.25-A y B).
- 4) La serina, cistefna y alanina revierten parcialmente la inhibición produ

cida por la fordialamina en la setivida i de la isoenzima E de higado (Tabla 9 y Fig. 26).

Bi_nificación fisiológica de los resultados obtenidos con la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo H.

hapática tipo L y tipo M ha rovelado la existencia de interacciones alostéricas que pueden toner significación fisiológica "in vivo". Si bien sobre la base de este tipo de estudios no se pueden extrapolar mecanismos reguladores que operan intracelularmente, los mismos proporcionan un marco en el cual se pueden proponer posibles circuitos de control cuyo sentido será necesario probar "in vivo".

Las propiedades cinéticas de mayor importancia fisiológica de la piruvato quinasa hepática tipo L son principalmente el efecto cooperativo homotrópico de esta enzima para el PEP, la inhibición alostórica por ATP y alanina, y la activación por FDP.

El efecto cooperativo para el PEP es de gran importancia, ya que de acuerdo con el valor de la constante S_{0.5} de la enzima para este sustrato y al marcado efecto do los inhibidores alostéricos sobre el mismo, la isoenzima L de hígado estaría virtualmente inactiva a la concentración fisiológica intracelular hepática de PEP, a no ser que sea activada por FDP.

En realidad los niveles de PDP medidos en diferentes laboratorios (140,181,182) son suficientes como para revertir el efecto inhibidor del ATP y de la alanina y por consiguiente la enzima estaría siempre activada. Sin embargo, los métodos convencionales para determinar PDP no permiten distinguir entre el metabolito libre y el que se encuentra unido específicamente a proteínas que disponen de sitios con alta afinidad por PDP, tal como la aldolasa y la fructosa-1,6-difosfatasa.

Así, la situación del activador en la célula es considerablemente compleja y la relación entre la concentración de metabolito libre y ligado a estas proteínas, será un factor decisivo para modular la actividad de la isoenzima L de hígado. Este aspecto del problema es muy relevante du rante la gluconeogénesis, ya que si la enzima estuviera activada continuamente (a los niveles de FDP conocidos) se produciría un corto circuito metabólico que alteraría la dirección del flujo neto de PEP hacia la formación de glucosa.

Con respecto al papel de la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo M en la regulación de la gluconeogénesis, conviene considerar dos situaciones diferentes, una aguda y otra crónica.

En el primer caso, como ocurre en todos los procesos de adaptación rápida, los mecanismos que operan fundamentalmente son de tipo alostérico.

Así por ejemplo, la administración de glucocorticoides constituye un proceso gluconeogénico agudo que se establece en un tiempo relativamente corto.

En efecto, Schoner y col.(91) han demostrado claramente que después de 6 horas de la administración de hidrocortisona se produce un aumento en el nivel intrahepático de alamina, la cual actuaría inhibiendo la iso
enzima L, y así favoreciendo la operación gluconocgénica "gatillada" por di
cha hormona. Cabe destacarse que el nivel de la PEP-carboxiquinasa también
aumenta marcadamente al mismo tiempo en que varía la concentración de alanina.

Aunque el ATP inhibe aprociablemente la isoenzima L, la constancia del nivel intrahepático de este metabolito en diferentes condiciones fisio-lógicas (140-145) parece indicar que su papel regulador es limitado. Algunos resultados obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que el efecto inhibidor del ATP y de la alanina (cuando se los estudia juntos) es de tipo acumulativo.

Los estudios cinéticos efectuados con la piruvato quinasa hepática tipo L también demostraron que su interacción con los efectores metabólicos mencionados es marcadamente modificada por variaciones fisiológicas de pH. El significado de este último factor en la regulación metabólica, será aclarado cuando se disponga de determinaciones más precisas del pH intracelular hepático durante la glucólisis y gluconeogénesis.

En condiciones de gluconeogénesis crónica, como la que se establece en la diabetes, o durante la alimentación con dietas hiperproteicas, la adaptación se efectúa mediante una drástica modificación de los niveles de la piruvato quinasa hepática tipo L. En efecto, la relación de actividad entre la isoenzima L y M en condiciones normales es 3.0, pero en la gluconeogénesis crónica este valor es a vecos menor que la unidad a expensas de una disminución de la concentración de la isoenzima L (107). Por lo tanto, en estas condiciones la regulación de la piruvato quinasa tipo M adquiere gran importancia.

Aunque durante la gluconeogénesis crónica el nivel intracelular hepático de alanina y fenilalanina disminuye de 1.23 y 0.15 a 0.46 y 0.07 umoles/gramo de tejido húmedo respectivamente (183,184) es importante señalar que dichos aminoácidos inhiben la actividad de la isoenzima E de hígado aun a bajas concentraciones.

Es importante además destacar que la serina, que revierte la inhibición de la enzima por alanina y fenilalanina (Tabla 9) también disminuye apreciablemente su nivel (1.65 a 0.32 umoles/gramo de tejido húmedo) en el hígado de animales diabéticos (184).

A pesar de que las conclusiones fisiológicas tomadas a partir de los datos cinéticos obtenidos "in vitro" tienen bastantes limitaciones, es posible suponer que cambios en la relación entre los aminoácidos inhibidores y reactivadores puedan modular la actividad de la isoenzima M en la célula hepática.

Piruvato Quinasa de Corteza denal Forma I

Los resultados expuestos han demostrado claramente que en la corteza renal existen dos formas de piruvato quinasa con distintas propiedades cinéticas.

En efecto, el perfil cromatográfico en columna de DEAE-celulosa reveló la presencia de las formas I y II, las cuales eluyen con dis tinta fuerza ionica (Fig.27). La separación de estas isoenzimas también puede ser efectuada por precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

La forma I tiene aparentemente propiedades cinéticas comunes a las de la piruvato quinasa hepática tipo L y tipo k. Esta interpretación está apoyada por los siguientes resultados experimentales:

1) Las curvas de velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de PEP a pH 7.5 es sigmoide, en forma similar a la que se obtiene cuando se estudia la cinética de saturación para este sustrato con la isoenzima L de hígado. En efecto, en estas condiciones el valor de n, fue de 1.8 (Fig.31).

Cabe destacarse que durante los estudios efectuados con la forma I purificada alrededor de 30 veces se tuvo la precaución de determinar que las preparaciones de esta enzima no contenfan enolasa, lo que descarta totalmente que las curvas sigmoides obtenidas fueran un artificio experimental.

- 2) En contraste con las propiedades de la piruvato quinasa hepática tipo L, la forma I no modifica su comportamiento cinético por cambios en el pH del medio de incubación, o por la presencia de ATP y FDP (Fig.31).
- 3) La inhibición por alumina de la forma I sólo modifica ligeramente el efecto cooperativo de esta ensima para el PEP, el cual no es revertido

en presencia de FDP. Los datos obtenidos por Schoner y col.(91) en la isoenzima L de hígado con estos metabolitos son marcadamente diferentes. (Tabla 10).

4) Debido a las características cromato/ráficas de la forma I en DEAEcelulosa y CM-celulosa, como el rango de precipitación con sulfato
de amonio, y la falta de ofecto del ATP y FDP en su actividad, se
puede suponer que esta enzima tiene propiedades similares a las de la
piruvato quinasa hepática tipo M.

De acuerdo a la separación cromatográfica en DEAE-celulosa la forma I representa el 70-80% de la actividad total de piruvato quinasa de la corteza renal. Este hecho indica en cierto modo que esta iscenzima está muy relacionada con el control metabólico de la glucólisia y gluconeogénesis en este tejido. Sin embargo, la significación fisiológica de los resultados obtenidos con la forma I no es clara, debido al hecho de que el valor de la constante 8 para el PEP es alto en comparación con la concentración intracelular de este metabolito (159).

Por otra parte, el PDP que es un activador de la piruvato qui nasa hepática tipo L y de la forma II de corteza renal, no tiene ningún efecto sobre la actividad de la forma I. Estos hechos cuestionan la función de esta isoenzima en la corteza renal. Sin embargo, los datos obtenidos no permiten descartar la posibilidad de que otros metabolitos pue dan actuar como activadores de la forma I aumentando su afinidad por el PEP. Tampoco se puede descartar que exista algún mecanismo de interconversión entre las formas I y II de piruvato quinasa de corteza renal.

La idea de que la forma I podrfa representar una enzima hfbrida (tipo LM) está apoyada en gran parte por los datos publicados por Tanaka y col.(107), los cuales habían sugerido que en el rinón de rata existiría una sola forma de piruvato quinasa con propiedades inmunológicas comunes a las de las isoenzimas L y E de hígado.

Piruvato Quinasa de Corteza Renal Forma II

Los resultados obtenidos con la forma II de piruvato quinasa de corteza renal han demostrado que esta enzima tiene propiedades similares a las de la isoenzima L de hígado. En ofecto, la curva de satura ción para el PEP es sigmoide y esta característica cinética es marcada mente modificada por cambios en el pH del medio de incubación o por la presencia de ATP y FDP.

También se demostró que en forma similar a la descripta con la isoenzima L, el ATP es un inhibidor alostérico de la forma II de cor teza renal. Por otra parte se vió que la alanina aumenta la cooperativi dad de esta enzima para el PEP en forma igual a la encontrada en la piruvato quinasa hepática tipo L por Schoner y col (91).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Stadman, E.R. Advan. Enzymot. 28, 41 (1966).
- 2) Alkinson, D. E. Ann. Rov. Microb. 23, 47 (1969).
- 3) Monod, J., Changeux, J.P. and Jacob, F. J. Hol. Biol. 6, 306 (1963).
- 4) Monod, J. and Jacob, F. Cold Spring harbor Symp. Quant. Biol. 26, 389 (1961).
- 5) Jacob, F. and Honod, J. J. Hol. Biol. 3, 318 (1961).
- 6) Holzer, H. Advan. Enzymol. 32, 297 (1969).
- 7) Umbarger, N.E. Science 145, 674 (1964).
- 8) Dische, Z. Bull. Sec. Biochem. France 23, 1140 (1940).
- 9) Movick, A. and Szilard, L. en Dynamics of Growth Processes 21 (Boell, E.J. Ed. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey, 1954).
- 10) Umbarger, H.E. Science 123, 848 (1956).
- 11) Yates, R.A. and Pardee, A.B. J. Biol. Chem. 221, 757 (1956).
- 12) Atkinson, D.E. Ann. Rev. Biochem. 35, 85 (1966).
- 13) Umbarger, H.E. Ann. Rev. Biochem. 38, 323 (1969).
- 14) Stadman, E.R., Cohen, G.N., Lebras, G. and Robichon-Szulmajter, H. de J. Biol. Chem. 236, 2033 (1961).
- 15) Paulus, H. and Gray, E. J. Biol. Chem. 239, PC 4009 (1964).
- 16) Casky, C.T., Asthon, D.H. and Hyngaarden, J.B. J. Biol. Chem, <u>239</u>, 2570 (1964).
- 17) Woolfolk, C.A. and Stadman, E.R. Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 313 (1964).
- 18) Moyed, H.S. and Umbarger, H.E. Physiological News. 42, 444 (1962).
- 19) Sanwal, B.D. Bacter. Rew. 34, 20 (1970).
- 20) Leloir, L.F., Olavarría, J.H., Goldemberg, S.H. and Carminatti, H. Arch. Biochem. and Biophys. 81, 508 (1959).
- 21) Loloir, L.F. and Goldemberg, S.H. J. Biol. Chem. 235, 919 (1960).

- 22) Lowenstein, J.M. The control of Lipids Netabolism Grant, J.K. Editado por Academic Press, New York p 57 (1963).
- 23) Krebs, R.A. Proc. Royal Society of London 159, 545 (1964).
- 24) Cahill, G.F. Advan. Enzyme Rogulation 2, 137 (1969).
- 25) Axelrod, B. en Metabolic Pathways, Editado por D.H. Groonberg, 1, 112 (1967).
- 26) Newsholme, E.A. and Gevers, W. Vitamins and Hormones 25, 1 (1967).
- 27) Krebs, H.A. and Kornberg, H.L. Energy Transformations in Living Matter Springer Verlag, Berlin (1957).
- 28) Atkinson, D.E. Science 150, 851 (1965).
- 29) Krebs, H.A. Advan. Enzyme Regulation 1, 385 (1963).
- 30) Meber, G., Singhal, R.L., Stamm, M.B., Fischer, E.A., Mentendiek, M.E. Advan. Enzyme Regulation 2, 1 (1964).
- 31) Hales, G.H. Essays in Biochemistry 3, 73 (1967).
- 32) Scrutton, M.C. and Utter, M.F. Ann. Row. Biochem. 37, 249 (1968).
- 33) Weber, G., Singhal, R.L. and Srivastava, S.K. Advan. Enzyme Regulation 3, 43 (1965).
- 34) Hess, B., Brand, R. en Control of Energy Metabolism. Chance, B., Estabrook, R. and Milliamson, J.R. Editado por Academic Press, New York, p 111 (1966).
- 35) Bücher, Th. and Rüssmann, ... Angew. Chem. 3, 426 (1964).
- 36) Loway, O.H. and Passonneau, J.V. J. Biol. Chem. 239, 31 (1964).
- 37) Williamson, J.R. J. Biol. Chom. 240, 2308 (1965).
- 38) Williamson, J.A. J. Biol. Chem. 241, 5026 (1966).
- 39) Williamson, J.R. en Control of Energy Letabolism. Chance, D., Estabrook, R.J. and Williamson, J.R. Editado por Academic Press, New York, p 333 (1966).
- 40) Rolleston, F.S. and Newsholme, E.A. Biochem. J. 104, 524 (1967).
- 41) Handler, J.S., Preston, A.S. and Orloff, J. J. Biol. Chem. <u>244</u>, 3194 (1969).

- 42) Crane, R.K. and Sols, A. J. Biol. Chem. 203, 273 (1953).
- 43) De la Fuente, G. and Sols, A. Abstr. Intern. Cong. Biochem. 6th, New York 6, 506 (1964).
- 44) Rose, I. A. and O'Connell, E.L. J. Biol. Chem. 239, 12 (1964).
- 45) Newsholme, E.A., Rolleston, F.S. and Taylor, k. Biochem. J. 106, 193 (1968).
- 46) Fromm, H.J. and Zewe, V. J. Biol. Chem. 237, 1662 (1962).
- 47) England, P.J. and Randle, P.J. Biochem. J. 105, 907 (1967).
- 48) Gonzalez, C., Ureta, T., Sanchez, R. and Niemeyer, N. Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 347 (1964).
- 49) Grossbard, L. and Shimke, R.T. J. Biol. Chem. 241, 3546 (1966).
- 50) Dipietro, D.L., Scharma, G. and Weinhouse, S. Biochemistry 1, 455 (1962).
- 51) Ballard, F.J. and Oliver, I.T. Biochem. J. 90, 261 (1964).
- 52) Salas, J., Salas, M., Viñuela, E. and Sols, A. J. Biol. Chem. 240, 1014 (1965).
- 53) Salas, H., Viíiuela, E. and Sols, A. J. Biol. Chem. 238, 3535 (1963).
- 54) Niemeyer, H. Nat. Cancer Inst. Honograph 27, 29 (1967).
- 55) Uyeda, K. and Racker, E. J. Biol. Chem. 240, 4682 (1965).
- 56) Hansour, T.E. J. Biol. Chem. 238, 2285 (1963).
- 57) Passoneau, J.V. and Lowry, O.li. Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 372 (1963).
- 58) Passoneau, J.V. and Lowry, O.H. Advan. Enzyme Regulation 2, 265 (1964)
- 59) Parmeggiani, A. and Bowman, R.H. Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 268 (1963).
- 60) Garland, P.B., Randle, P.J. and Newsholme, E.A. Hature 22, 169 (1963).
- 61) Ramaiah, A., Rathaway, J.A. and Atkinson, D.E. J. Biol. Chem. 239, 3619 (1964).
- 62) Lowry, O.H. and Passonneau, J.V. J. Biol. Chom. 241, 1268 (1966).

- 63) Kemp, R.G. and Krebs, E.G. Biochemistry $\underline{6}$, 423 (1967).
- 64) Blangy, D., Buc, H. and Monod, J. J. Rol. Biol. 31, 13 (1968).
- 65) Viñuela, E., Salas, M. and Sols, A. Biochem. Biophys. Res. Comm. 12, 140 (1963).
- 66) Salas, i.L., Salas, J. and Sols, A. Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 41 (1968).
- 67) Lorenzon, E.V. and Hansour, T.E. J. Biol. Chem. 244, 6420 (1969).
- 68) Viluola, E., Salas, L.L., Salas, H. and Sols, A. Biochem. Biophys. Ros. Comm. 15, 243 (1964).
- 69) Mansour, T.E. and Mansour J.M. J. Biol. Chem. 237, 629 (1962).
- 70) Hansour, T.E. J. Biol. Chem. 240, 2165 (1965).
- 71) Mansour, T.E., Makio, M.M. and Sprouse, H.M. Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 721 (1965).
- 72) Weber, G., Singhal, R.L., Stamm, H.B., Lea, H.A. and Fischer, E.A. Advan. Enzyme Regulation 4, 59 (1966).
- 73) Arion, W.J. and Hordlie, R.C. J. Biol. Chem. 239, 2752 (1964).
- 74) Stetten, M.R. and Taft, M.L. J. Biol. Chem. 239, 4041 (1964)
- 75) Vianna, A.L. and Nordlie, R.C. J. Biol. Chem. <u>244</u>, 4027 (1969).
- 76) Nordlie, R.C., Hanson T.L., Johns, P.T. and Lygre, D.G. Proc. Nat. Acad.Sci. 60, 590 (1968).
- 77) Dyson, J.E., Anderson, W.B and Hordlie, R.C. J. Biol. Chem. <u>244</u>, 560 (1969).
- 78) Taketa, K. and Pogell, B.D. Diochem. Biophys. Res. Comm. 12, 229 (1963).
- 79) Taketa, K. and Pogell, B.M. J. Biol. Chem. 240, 651 (1965).
- 30) Little, C., Sanner, T. and Pihl, A. European J. Biochem. 8, 229 (1969).
- 81) Mondicino, J. and Vasarhely, F. J. Biol. Chem. 238, 3528 (1963).
- 32) Salas, M., Villuela, E. and Sols, A. Abstr. Inter. Congr. Biochem. 6th, New York, 6, 526 (1964).
- 83) Underwood, A. H. and Newsholme, E.A. Biochem. J. 95, 767 (1965).

- 84) Krebs, R.A., Rewsholme, M.A., Speake, R., Gayscone, T. and Lund, P. Advan. Enzyme. Regulation 2, 71 (1964).
- 85) Luppis, B., Traniello, S., Wood, W.A. and Pontremoli, S. Biochem. Biophys. Res. Comm. 15, 453 (1964).
- 86) Proedland, R.A. Biochem. Biophys. Acta 62, 427 (1962).
- 87) Utter, N.P. and Rooch, D.B. J. Biol. Chem. 238, 2603 (1963).
- 88) Keech, D.B. and Utter, E.F. J. Biol. Chem. 238, 2609 (1963).
- 89) Utter, A.F., Keech, D.B. and Scrutton, M.C. Advan. Enzyme Regulation 2, 49 (1964).
- 90) Scrutton, M.C. and Uttor, M.F. J. Biol. Chem. 242, 1723 (1967).
- 91) Schoner, ..., haag, V. and Soubert, ... Hoppe-Seyler's 2. Physiol. Chem. 351, 1071 (1970).
- 92) Wagle, S.R. Biochem. Diophys. Res. Comm. 14, 533 (1964).
- 93) Henning, M.V., Seiffert, 1. and Soubort, M. Biochem. Biophys. Acta 77, 345 (1963).
- 94) Lardy, R.A., Foster, D.O., Shrago, E. and Ray, P.D. Advan. Enzyme Regulation 2, 49 (1964).
- 95) Foster, D.O., Ray, P.D. and Lardy, H.A. Biochemistry 5, 555 (1966).
- 96) Nordlie, R.C. and Lardy, H.A. J. Biol. Chem. 238, 2259 (1963).
- 97) Henning, H.V., Stumpf, B., Chly, B. and Seubert, W. Biochem. Z. 344, 274 (1966).
- 98) Gevers, W. Biochem. J. 103, 141 (1967).
- 99) Lardy, H.A., Paetkau, V., Halter, P. Proc. Hat. Acad. Sci. <u>53</u>, 1410 (1965).
- 100) Haynes, R.C. J. Biol. Chem. 240, 4103 (1965).
- 101) Heldt, H. a. and Elingenberg, M. Biochem. Z. 343, 433 (1965).
- 102) Chappell, J.B. Biochem. J. 100, 43P (1966).
- 103) Weber, G., Lea, M.A., Hird Convery, H.J. and Stamm, N.B. Advan. Enzyme Regulation 5, 257 (1967).
- 104) Tanaka, T., Harano, Y., Morimura, H. and Mori, R. Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 55 (1965).

- 105) Bigloy, R.H., Stonzel, P., Jones, R.T., Campos, J.O. and Koller, R.D. Enzymol. Biol. Clin. 9, 10 (1968).
- 106) Susor, A.A. and Rutter, A.J. Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 14 (1968).
- 107) Tanaka, T., Harano, V., Suo, F. and Horimura, H. J. Biochemistry (Tokio) 62, 71 (1967).
- 108) Krobs, H.A. and Eggleston, L.A. Biochem. J. 94, 30 (1965).
- 109) Weber, G., Stamm, M.B. and Fischer, E.A. Science 149, 65 (1965).
- 110) Szepesi, B. and Freedland, R.A. J. Butr. 93, 301 (1967).
- 111) Szepesi, B. and Freedland, R.A. J. Butr. 94, 463 (1968).
- 112) Freedland, R.A., Cunliff, T.L. and Sinkl, J.G. J. Biol. Chem. 241, 5448 (1966).
- 113) Taylor, C.B. and Bayley, E. Biochem. J. 102, 320 (1967).
- 114) Tanaka, T., Sue, F. and Morimura, H. Biochem. Biophys. Res. Comm. 24. 444 (1967).
- 115) Carminatti, H., Jimenez de Asúa, L., Recondo, E., Passeron, S. and Rozengurt, E. J. Biol. Chem. 243, 3051 (1968).
- 116) Passeron, S., Jimenez de Asúa, L. and Carminatti, H. Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 33 (1967).
- 117) Bayley, E., Stirpe, F. and Taylor, C.B. Biochem. J. 108, 427 (1968).
- 118) Trivedi, B. and Danforth, W.H. J. Biol. Chem. 241, 4110 (1966).
- 119) Gerhart, J.C. and Pardee, A.B. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 491 (1963).
- 120) Pogson, C.I. Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 297 (1968).
- 121) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- 122) Peterson, E.A. and Sober, H.A. on Methods in Enzymology Vol.V

 Colouick, S.P. and Kaplan, N.O. Editado por Academic Press, New York,
 p 6 (1962).
- 123) Friedemann, T.T. and Haugen, G.E. J. Biol. Chem. 147, 415 (1943).

- 124) Leloir, L.F. and Goldemberg, S.H. J. Biol. Chem. 235, 919 (1960).
- 125) Bücher, T. and Pfleiderer, G. en Methods in Enzymology Vol.I Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. Editado por Academic Press, New York, p 435 (1955).
- 126) Grisolfa, S. on Mothods in Enzymology Vol.VI Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. Editado por Academic Press, New York, p 484 (1963).
- 127) Jiménez de Asúa, L., Rozengurt, E. and Carminatti, H. Biochim. Biophys. Acta 170, 254 (1968).
- 128) Fiske, C. if and Subarrow, Y. J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
- 129) Mandl, I. and Reuberg, C. en Acthods in Enzymology Vol.III Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. Editado por Academic Press, New York, p 162 (1967).
- 130) Pontremoli, S., Grazi, E. and Accorsi, A. Biochem. Biophys. Res. Comm. 33, 335 (1968).
- 131) Koshland, D.E., Memethy, G. and Filmer, D. Biochemistry 5, 365 (1966).
- 132) Lineweaver, H. and Burk, D. J. Amer. Chem. Soc. 76, 2842 (1951).
- 133) Jensen, R.A. and Moster, E.W. J. Biol. Chem. 241, 3373 (1966).
- 134) Hastings, A.B. Proceedings of the Robert A. Welch Foundation Conference on Chemical Research, Vol. 5, 261 (1961).
- 135) Fanestil, D.D. Comunicación personal.
- 136) Waddell, A.J. and Bates, R.G. Physiological Reviews 49, 285 (1969).
- 137) Dixon, H. and Hebb, E.C. Enzymes. Longmans, Green and Company, Ltd.
 London p 135 (1964).
- 138) Reynard, A.M., Hass, L.P., Jacobsen, D.D. and Boyer, P.D. J. Biol. Chem. 236, 2277 (1961).
- 139) Hernbrook, K.R., Burch, R.B. and Lowry, O.H. Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 206 (1965).
- 140) Exton, J.H. and Park, C.R. J. Biol. Chem. 244, 1424 (1969).
- 141) Vivayvargiya, R., Schwark, W.S. and Singhal, R.L. Canad. J. Biochem. 47, 895 (1969).

- 142) Rozengurt, E., Jimenez de Asúa, L. and Carminatti, H. Febs Letters

 11, 4 (1970).
- 143) Rozengurt, E. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (1971).
- 144) Cleland, N.W. Ann. Rev. Biochem. 36, 77 (1967).
- 145) Williamson, J.R., Scholz, R. and Browning, E.T. J. Biol. Chem. 244, 4617 (1969).
- 146) Wood, T. Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 779 (1968).
- 147) Holmseen, H. and Storm, E. Biochem. J. 112, 303 (1969).
- 148) Bygrave, F.L. Biochem. J. 101, 488 (1966).
- 149) Underwood, A.H. and Newsholme, E.A. Biochem. J. 104, 206 (1967).
- 150) Exton, J. and Park, C.R. J. Biol. Chem. 242, 2622 (1967).
- 151) Exton, J.H. and Park, C.R. J. Biol. Chem. 243, 4189 (1968).
- 152) Exton, J.H. and Park, C.R. Advan. Enzyme Regulation $\underline{6}$, 391 (1968).
- 153) Ross, B.D., Hems, R. and Krebs, H.A. Biochem. J. 102, 942 (1967).
- 154) Herrera, M.G., kamm, D., Ruderman, M. and Cahill, G.F. Advan.
 Enzyme Regulation 4, 225 (1967).
- 155) Mallette, L.E., Exton, J.H. and Park, C.R. J. Biol. Chom. <u>244</u>, 5713 (1969).
- 156) Mallette, L.E., Exton, J. II. and Park, C.R. J. Biol. Chem. 244, 5724 (1969).
- 157) Llorente, P., Marcó, R. and Sols, A. European J. Biochem. <u>13</u>, 45 (1970).
- 158) Drury, D.R., mick, A.H. and Wackay, E.H. Amer. J. Physiol. <u>163</u>, 655 (1950).
- 159) Nagata, N. and Rasmussen, N. Biochim. Biophys. Acta 215, 1 (1970).
- 160) Bowman, R.H. J. Biol. Chem. 245, 1604 (1970).
- 161) Changeux, J.P. and Podleski, T.A. Proc. Hatl. Acad. Sci. 59, 944 (1968).
- 162) Gerhart, J.C. and Pardee, A.B. J. Biol. Chem. 237, 891 (1962).

- 163) Changeux, J.P. J. Hol. Biol. 4, 220 (1962).
- 164) Changoux, J.P. Bull. Soc. Chim. Biol. 46, 1151 (1964).
- 165) Gerhart, J.C. and Schachman, H.K. Biochemistry 4, 1054 (1965).
- 166) Monod, J., Myman, J. and Changeux, J.P. J.Mol. Liol. 12, 88 (1965).
- 167) Kirtley, M.E. and Koshland, D.E. J. Biol. Chem. 242, 4192 (1967).
- 168) Koshland, D.E. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 473 (1963).
- 169) Koshland, D.E. Advan. Enzyme Regulation 6, 291 (1968).
- 170) Atkinson, D.E., Hataway, J.A. and Smith, E.C. J. Biol. Chem. 240, 2682 (1965).
- 171) Atkinson, D.E. and Walton, G.M. J. Biol. Chem. 240, 757 (1965).
- 172) Robichon-Szulmajster, H. de and Magee, P.T. European J. Biochem. 3, 492 (1963).
- 173) Sanwal, B.D., Zink, H. a. and Stachow, C.S. J. Biol. Chem. 239, 1597 (1964).
- 174) Cox, G.F. and Davies, D.D. Biochem. J. 113, 813 (1969).
- 175) Scarano, E., Geraci, G. and Rossi, M. Biochemistry 6, 192 (1967).
- 176) Léjohn, H.B. and Jackson, S. J. Biol. Chem. 243, 3447 (1968).
- 177) Gerhart, J.C. and Pardee, A.B. Fed. Proc. 23, 727 (1964).
- 178) Wyman, J. Advan. Protein Chem. 4, 407 (1948).
- 179) Wyman, J. Cold Spring Harbor Quant. Biol. 28, 483 (1963).
- 180) Dalziel, k. Febs Letters <u>1</u>, 346 (1968).
- 181) Williamson, J.R. Advan. Enzyme Regulation 5, 229 (1967).
- 182) Burch, H.B. Advan. Enzyme Regulation 3, 185 (1965).
- 183) Williamson, D.H., Lopez Vieira, O. and Halker, B. Biochem. J. <u>104</u>, 497 (1967).
- 184) Kirsten, E., Kirsten, R., Hohorst, H.J. and Bücher, Th. Biochem. Biophys. Res. Comm. 4, 169 (1961).