

Tesis de Posgrado

Estudio de las propiedades alostéricas de la (Ca⁺⁺)- Adenosina trifosfatasa de Escherichia coli : Regulación por fluidez de la membrana

Siñeriz, Faustino

1973

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:

Siñeriz, Faustino. (1973). Estudio de las propiedades alostéricas de la (Ca⁺⁺)- Adenosina trifosfatasa de Escherichia coli : Regulación por fluidez de la membrana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1422_Sineriz.pdf

Cita tipo Chicago:

Siñeriz, Faustino. "Estudio de las propiedades alostéricas de la (Ca⁺⁺)- Adenosina trifosfatasa de Escherichia coli : Regulación por fluidez de la membrana". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1973.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1422_Sineriz.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ALOSTERICAS
DE LA (Ca⁺⁺)-ADENOSINA TRIFOSFATASA DE ESCHERICHIA COLI -
REGULACION POR FLUIDEZ DE LA MEMBRANA.

AUTOR: FAUSTINO SIÑERIZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAUL E. TRUCCO

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

1 9 7 3

1 4 2 3 →

A mi padre

A Martine

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Raúl E. Trucco por sus consejos y críticas y su ejemplo tanto en el aspecto científico como en el plano humano.

Al Dr. Ricardo N. Farías por el aporte de su experiencia y sin cuya constante guía y apoyo este trabajo no se hubiera realizado.

Al Dr. Ranwel Caputto por haberme permitido el uso de las instalaciones de su laboratorio de abril a julio de 1971, después de la terminación de mi contrato.

A la Fundación Bariloche por la oportuna ayuda que nos brindó en momentos críticos.

A la Dra. Rosa Nagel de Zwaig del Departamento de Biología de la Universidad Central de Caracas por habernos facilitado la cepa de Escherichia coli L010.

Al Dr. César Vázquez del Instituto de Anatomía General y Embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires por haber realizado las microfotografías electrónicas y por su valiosa ayuda en la interpretación de las mismas.

Al Dr. Erwin Baumgartner del Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires por las fructíferas discusiones sobre la parte termodinámica.

A mis compañeros del Instituto de Química Biológica de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán, especialmente a Hortensia Moreno de Zarbá, por el apoyo brindado.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba y en el Instituto de Química Biológica de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

INDICE

Introducción	1
Materiales y Métodos	11
Resultados	27
Discusión	62
Apéndice	74
Bibliografía	80

INTRODUCCION

Existe bastante coincidencia en cuanto a la estructura fundamental de las membranas biológicas: los lípidos estarían formando una doble capa y las moléculas proteicas se encontrarían distribuidas en esta doble capa (Glaser, Simpkins, Singer, Scheetz & Chan, 1970; Green, 1970; Green, 1971; Singer & Nicolson, 1972; Capaldi & Green, 1972).

Singularmente útil por las posibilidades que brinda a la imaginación y sólidamente apoyado por evidencias experimentales resulta el modelo del mosaico fluido de Singer y col. (1972).

En este modelo se postula que la matriz fundamental estaría constituida por una doble capa lipídica, con las cabezas polares (hidrofílicas) de los fosfolípidos orientadas hacia el exterior de la bicapa y las proteínas más o menos sumergidas en ella de acuerdo con las características propias de afinidad por las zonas hidrofóbicas o hidrofílicas de la doble capa. Existirían así dos grandes clases de proteínas: estructurales y periféricas. Operacionalmente serían distinguibles por el procedimiento requerido para su solubilización: las proteínas periféricas estarían débilmente unidas a la bicapa y se desprenderían por procedimientos suaves que dejarían intacta la membrana y además serían estables en buffers neutros; por otro lado, las proteínas estructurales no podrían obtenerse sin la utilización de detergentes o solventes orgánicos; permanecen asociadas con lípidos o

forman agregados insolubles si estos se eliminan totalmente.

Este esquema de la organización de la membrana se basa fundamentalmente en datos obtenidos empleando métodos físicoquímicos. Así fueron de fundamental importancia la aplicación entre otros de métodos de calorimetría diferencial, difracción de rayos X, microscopía electrónica (singularmente las técnicas de congelamiento y sublimación (freeze-etching)), de dicroísmo circular y dispersión óptica rotatoria, tal como lo discuten los propios autores del modelo.

Si se considera como lipídica la matriz de la membrana, es fácil deducir que las propiedades de esta matriz afectarán las propiedades generales de la membrana. El estudio de las transiciones térmicas de fosfolípidos aislados indicaban que las temperaturas de transición (cristal \rightarrow líquido) dependían de la longitud de la cadena hidrocarbonada, del grado de insaturación y del grupo polar. La temperatura de transición disminuía al aumentar la insaturación (Ladbrooke, Williams & Chapman, 1968; Oldfield & Chapman, 1972); en los sistemas biológicos en los cuales coexisten varios fosfolípidos con distintos sustituyentes, aparecen endotermos muy amplios que indicarían la existencia simultánea de los dos tipos de estructura (gel y cristal-líquido) (Oldfield & Chapman, 1972).

Steim y col. demostraron por calorimetría diferencial (differential scanning calorimetry) que las membranas de Acholeplasma laidlawii sufrían una transición térmica amplia (Steim, Tourtellotte, Reinert, McElhaney & Rader, 1969). En estas mismas membranas, Engelman

(1970, 1971) demostró por difracción de rayos X que esta transición se correspondía con un pasaje de una disposición hexagonal ordenada de la cadena hidrocarbonada a una estructura más fluida, líquida, que existiría por encima del punto de transición. Este tipo de transiciones también fue observado por difracción de rayos X en fosfolípidos aislados y en membranas intactas de Escherichia coli (Esfahani, Limbrick, Knutton, Oka & Wakil, 1971). Los estudios en monocapa habían indicado que el área por molécula de fosfolípido aumentaba al aumentar la insaturación (Demel, van Deenen & Pethica, 1967; Demel, Geurts van Kessel & van Deenen, 1972). La tendencia al desorden de los ácidos insaturados puede visualizarse en base a su estructura: de una cadena hidrocarbonada lineal se pasa a cadenas más y más deformadas por la presencia de dobles ligaduras cis, a consecuencia de lo cual el empaquetamiento se haría más laxo.

Waggoner & Stryer (1970) propusieron el uso de compuestos fluorescentes análogos de lípidos de membrana que podrían dar indicaciones de proximidad, movilidad rotacional y polaridad del medio ambiente en que se encuentren los cromóforos. Utilizando vesículas artificiales de fosfatidilcolina demostraron que los cromóforos del ONS (ácido N-octadecil naftil-2-amino-6-sulfónico) se situaría en la zona polar del fosfolípido; los de la DPE (N-dansil-fosfatidiletanolamina) se situarían en la zona intermedia (glicerol) y la parte fluorescente del AS (ácido 12-(9-antróil)-esteárico) se situaría en la parte hidrocarbonada de la bicapa.

El ANS (1-anilino-naftalén-8-sulfonato) y el bromuro de etidium también han sido utilizados para determinar cambios en la estructura de la membrana cuando ocurren energizaciones de la misma (Chance, 1970; Azzi & Santato, 1971).

Con fines similares se han utilizado compuestos conteniendo grupos nitrógeno como marcadores (spin labelling). Hsia, Wong & MacLennan (1971) han utilizado estos compuestos para detectar cambios en los medios ambiente lipídico y proteico durante el transcurso de la disolución de la membrana celular del Halobacterium salinarium que ocurre cuando la concentración salina disminuye. Este método también ha sido utilizado para registrar cambios en la fase lipídica de la membrana de eritrocito (Kroes, Ostwald & Keith, 1972).

Sin embargo, de todos los trabajos que utilizan métodos físico-químicos para poner en evidencia interacciones lípido-proteína en membranas intactas, se desprende el hecho de que estos métodos no serían bastante sensibles para casos específicos puesto que los resultados son estadísticos, es decir, las medidas reflejan las contribuciones de todas las especies moleculares de proteína y/o de la doble capa lipídica en su totalidad.

El estudio de las actividades enzimáticas asociadas a membrana sería un método más específico puesto que revela interacciones a un nivel más restringido entre los lípidos y una especie proteica en particular.

En membranas bacterianas, la determinación de interacciones

Lípido-proteína se ha encarado por varios métodos:

- a) Determinación de una dependencia entre la actividad enzimática y fosfolípidos.

Un ejemplo de este tipo sería el bien estudiado sistema de galactosiltransferasa (UDP-galactosa-lipopolisacárido- α , 3-galactosiltransferasa) en Salmonella typhimurium (Rothfield & Finkelstein, 1968; Romeo, Hinckley & Rothfield, 1970).

Es un sistema unido a membrana que puede ser separado en sus componentes: el lipopolisacárido, la fosfatidiletanolamina y la proteína enzimática. El sistema puede reconstituirse in vitro a partir de las partes purificadas y requiere la presencia de los tres componentes para la actividad: primero se forma un sistema lipopolisacárido-fosfatidiletanolamina (Romeo, Girard & Rothfield, 1970) y luego se agrega el tercer componente, la proteína enzimática (Romeo y col., 1970b).

Otros ejemplos de dependencia de actividad en fosfolípidos serían la reactivación por fosfolípidos (lecitinas) de la C_{55} -isoprenoide alcohol fosfoquinasa de Escherichia coli (Sandermann, Jr., 1972) y la activación por fosfolípidos del sistema de piruvato oxidasa en Escherichia coli (Cunningham & Hager, 1971a,b). Aún cuando esta última enzima se puede tener en forma soluble, su actividad aumenta varias veces en presencia de fosfolípidos.

Como la mayoría de las veces no es posible purificar los sistemas enzimáticos unidos a membrana, se utilizaron técnicas in-

directas para determinar si los fosfolípidos son esenciales o no para la actividad; un método es estudiar el comportamiento frente a fosfolipasas. Si existe dependencia entre actividad enzimática y fosfolípidos, se observará una pérdida de actividad en el transcurso del ataque por la fosfolipasa. Este enfoque ha sido utilizado por Mavis, Bell y Vagelos (1972) para determinar requerimientos de fosfolípidos de algunas enzimas de membrana de E. coli. En el caso de la Acil-CoA:glicerol-3-fosfato aciltransferasa y de la NADH oxidasa, los autores observaron que a medida que progresaba la acción de la fosfolipasa (fosfolipasa C), la actividad disminuía, mientras que la glicerol-3-fosfato dehidrogenasa y la succínico dehidrogenasa permanecían completamente activas; de aquí concluyeron que las dos primeras requerían fosfolípidos para la actividad, mientras que las otras dos no.

- b) Variaciones de las propiedades cinéticas de procesos unidos a membrana al variar la composición lipídica de la misma.

Cuando se tuvo la posibilidad de utilizar auxótrofos de ácidos grasos insaturados de Escherichia coli para investigar la influencia de las distintas composiciones lipídicas sobre las actividades unidas a membrana, se observó (Schairer & Overath, 1969) que la incorporación de tiometil- β -galactósido, que es una medida del funcionamiento de la permeasa de la lactosa presentaba distintos perfiles de dependencia con la temperatura según el ácido incorporado a la membrana. La inflexión en el gráfico se interpretó

como que la cadena hidrocarbonada sufría un cambio de fase de una forma más expandida a una forma más condensada.

La misma observación aparece en los trabajos de Wilson, Rose & Fox (1970) en cuanto al transporte de o-nitrofenil- β -galactósido y p-nitrofenil- β -glucósido, incluso utilizando ácido bromoesteárico, que puede reemplazar a un ácido insaturado (Fox, Law, Tsukagoshi & Wilson, 1970).

El primer intento de correlacionar estas observaciones con transiciones de fase medidas sobre fosfolípidos de las mismas células fue hecho por Overath, Schairer & Stoffel (1970). Así, había correspondencia en las transiciones entre los estados líquido y condensado medidos en la balanza de Langmuir de películas monomoleculares de fosfatidiletanolaminas extraídas de las mismas células y las transiciones de Arrhenius en el eflujo de tiometil- β -galactósido. Los mismos autores observaron que se presentaban discontinuidades en los gráficos de Arrhenius de las velocidades relativas de respiración y crecimiento.

La misma conclusión general, de que la distinta composición lipídica influía sobre las funciones asociadas a membrana, se desprende de los trabajos de otros autores que han utilizado auxótrofos similares (Esfahani y col., 1971; Wilson & Fox, 1971; Overath, Hill & Lamnek-Hirsch, 1971).

Dentro de esta última línea de pensamiento, nuestro grupo ha trabajado extensamente en el estudio de las interacciones lípido-

proteína en las membranas biológicas estableciendo y midiendo las variaciones que sufren las propiedades alostéricas de las enzimas asociadas a membrana cuando se modifica la composición lipídica "in vivo". Así se han estudiado los cambios que sufren las propiedades alostéricas de distintas enzimas de membrana de glóbulo rojo y de microsomas de corazón, riñón y cerebro de ratas cuando los animales se someten a distintas dietas (Farías, Goldemberg & Trucco, 1968, 1970; Goldemberg, Farías & Trucco, 1972; Morero, Bloj, Farías & Trucco, 1972; Goldemberg, Farías & Trucco, 1973; Bloj, Morero, Farías & Trucco, 1973).

La utilización de membranas de Escherichia coli para estudiar relaciones entre lípidos y proteínas reduce considerablemente las variables del sistema puesto que prácticamente todos los lípidos presentes son fosfolípidos (Law, 1961) y de las especies de fosfolípidos, fosfatidiletanolamina constituye aproximadamente un 70-80%, fosfatidilglicerol y cardiolipina el resto, con cantidades traza de ácido fosfatídico y fosfatidilserina (Cronan & Vagelos, 1972). El aislamiento de una mutante de Escherichia coli incapaz de sintetizar ácidos grasos insaturados (Silbert & Vagelos, 1967) proveyó de un arma muy valiosa para estudiar las interrelaciones lípido-proteína; este sistema permitía cambiar dentro de límites muy amplios, la composición lipídica de la membrana variando el suplemento de ácido graso insaturado del medio de cultivo. La mutante L010 tiene una lesión en la síntesis de la β -hidroxidecanoil tioéster dehidrasa, que es la enzima responsable de la introducción de una doble ligadura cis en la cadena hidrocarbo-

nada de los ácidos grasos (Kass, 1968). La biosíntesis de los ácidos grasos y el lugar de la lesión de la bacteria se esquematizan en la figura 1. El ácido graso insaturado que se da como suplemento se incorpora como tal o como sus derivados metabólicos.

Ya ha sido demostrado que la (Ca^{++}) -ATPasa de membrana de E. coli era inhibida alostéricamente por sodio, y que estos efectos eran distintos, utilizando como parámetro el coeficiente de Hill, si la bacteria había crecido en un medio suplementado con ácido oleico o linolénico (Farías, Londero & Trucco, 1972).

El término "alosterismo", enzima alostérica, presenta ciertas dificultades, ya que desde su introducción por Monod, Changeux & Jacob en 1963 ha sido utilizado para designar, según lo discuten ampliamente Koshland & Neet (1968), una proteína:

- a) que contiene un sitio topológicamente distinto del sitio activo;
- b) que muestra cinética sigmoidea;
- c) que aparece en puntos de bifurcación de caminos metabólicos;
- d) que obedece al modelo concertado o de simetría.

En este estudio el término será utilizado en las dos primeras acepciones.

Esta tesis es un intento de esclarecer el papel regulatorio de la membrana bacteriana en lo que respecta al comportamiento alostérico de una enzima unida a ella y de determinar las posibles implicancias de esta regulación.

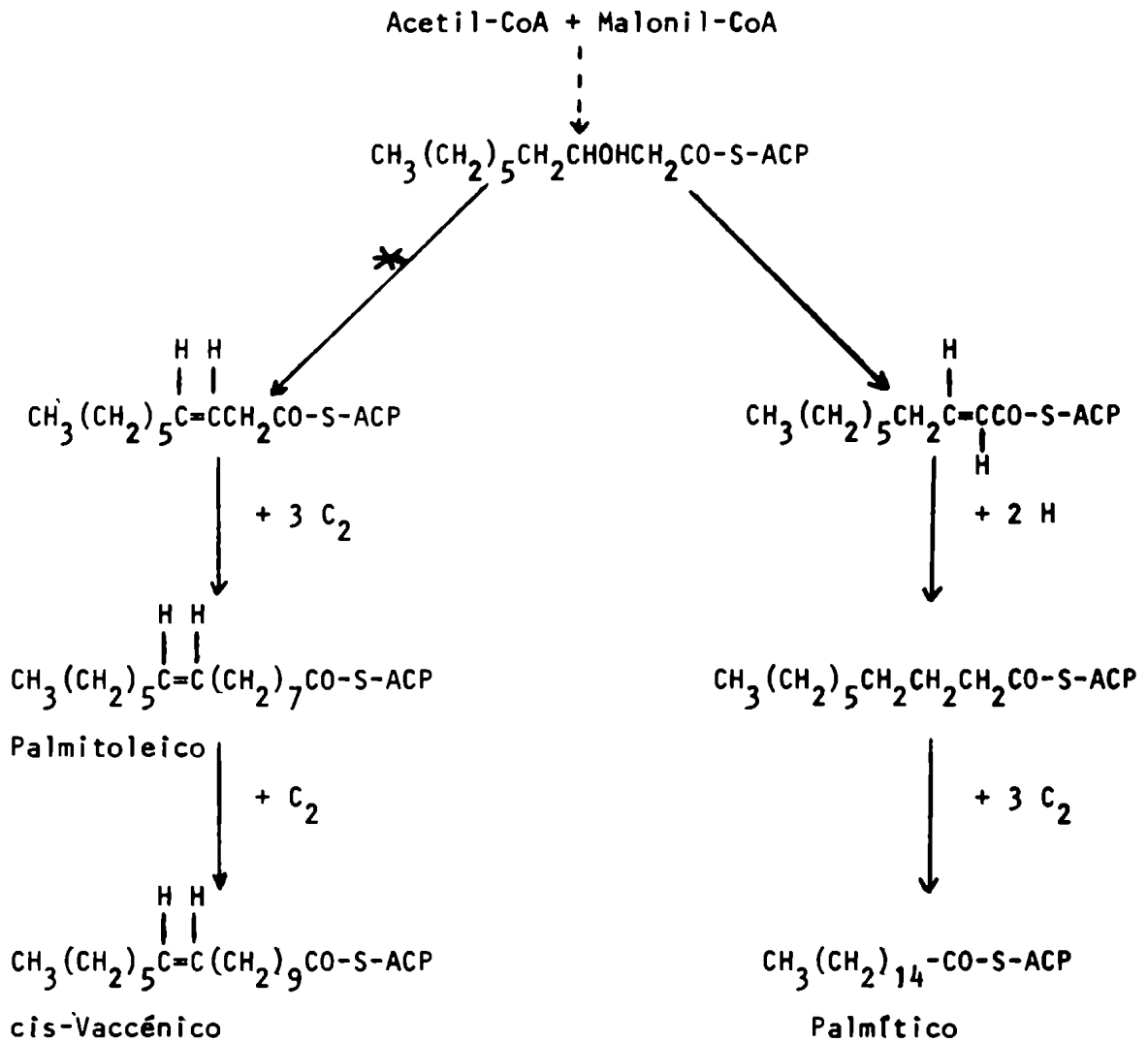


Fig. 1 : Esquema de la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias :

* Defecto de la mutante L010.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Escherichia coli K₁₂, cepa L010. Auxótrofo para ácidos grasos insaturados, aislado por Silbert y Vagelos (1967) y cedido gentilmente por la Dra. Rosa Nagel de Zwaig.

Medio de cultivo

En todos los experimentos, las bacterias se cultivaron en un medio L (Lennox, 1955), salvo en algunos casos, que serán indicados, en los cuales se omitió la glucosa:

Bacto-triptona 1%

Extracto de levadura 0,5%

Cloruro de sodio 0,5%

Glucosa 0,1%

Para eliminar cualquier ácido graso, el medio básico se extrajo con cloroformo de acuerdo al procedimiento de MacElhaney y Tourtellotte (1970).

Los ácidos grasos insaturados utilizados como suplemento se agregaron como sales de potasio; la concentración final en el medio de cultivo era del 0,02%; para evitar la aparición de turbidez por insolubilidad de los mismos se agregó Tritón X-100 al 0,005%. Se emplearon los siguientes ácidos grasos insaturados como suplemento:

Palmitoleico-(cis-9-hexadecenoico)

cis-Vaccénico-(cis-11-octadecenoico)

Oleico-(cis-9-octadecenoico)

Linoleico-(cis, cis, 9-12-octadecadienoico)

Linolénico-(cis,cis,cis, 9-12-15-octadecatrienoico).

Condiciones de cultivo

Se utilizaron erlenmeyers de 1000 ml con 200 ml de medio, aireando por agitación. Se inocularon con un cultivo de 12 horas (fase estacionaria) en el mismo medio. Simultáneamente se hicieron blancos sin el agregado del suplemento de ácido graso insaturado en los cuales, de acuerdo a lo observado por Henning, Dennert, Rehn y Deppe (1969), sobreviene lisis (Fig. 2).

Obtención de las membranas

Las membranas se prepararon según el método empleado por Evans Jr. (1969). Las bacterias se cosecharon en fase logarítmica (Fig. 2); se lavaron 3 veces con buffer Tris-ClH 0,02 M, pH 7,4, sedimentando por 10 minutos a 6000 rpm en el rotor SS34 de la centrífuga Sorvall. Las células lavadas se suspendieron en un cuarto del volumen original de un buffer Tris-ClH 0,15 M, pH 6,4, que contenía sacarosa 0,6 M y EDTA 0,001 M. Se agregó lisozima (20 µg/ml). Se incubó durante 75 minutos a 37°C. Los esferoplastos se centrifugaron a 12.000 x g por 20 minutos. La formación de esferoplastos se controló por microscopía de contraste de fase. La lisis se llevó a cabo suspendiendo los esferoplastos en 2/3 del volumen original de buffer Tris-ClH 0,02 M, pH 7,4. Las membranas se separaron por centrifugación a 35.000 x g durante 20 minutos. Se lavaron 3 veces con el mismo buffer con el agregado de

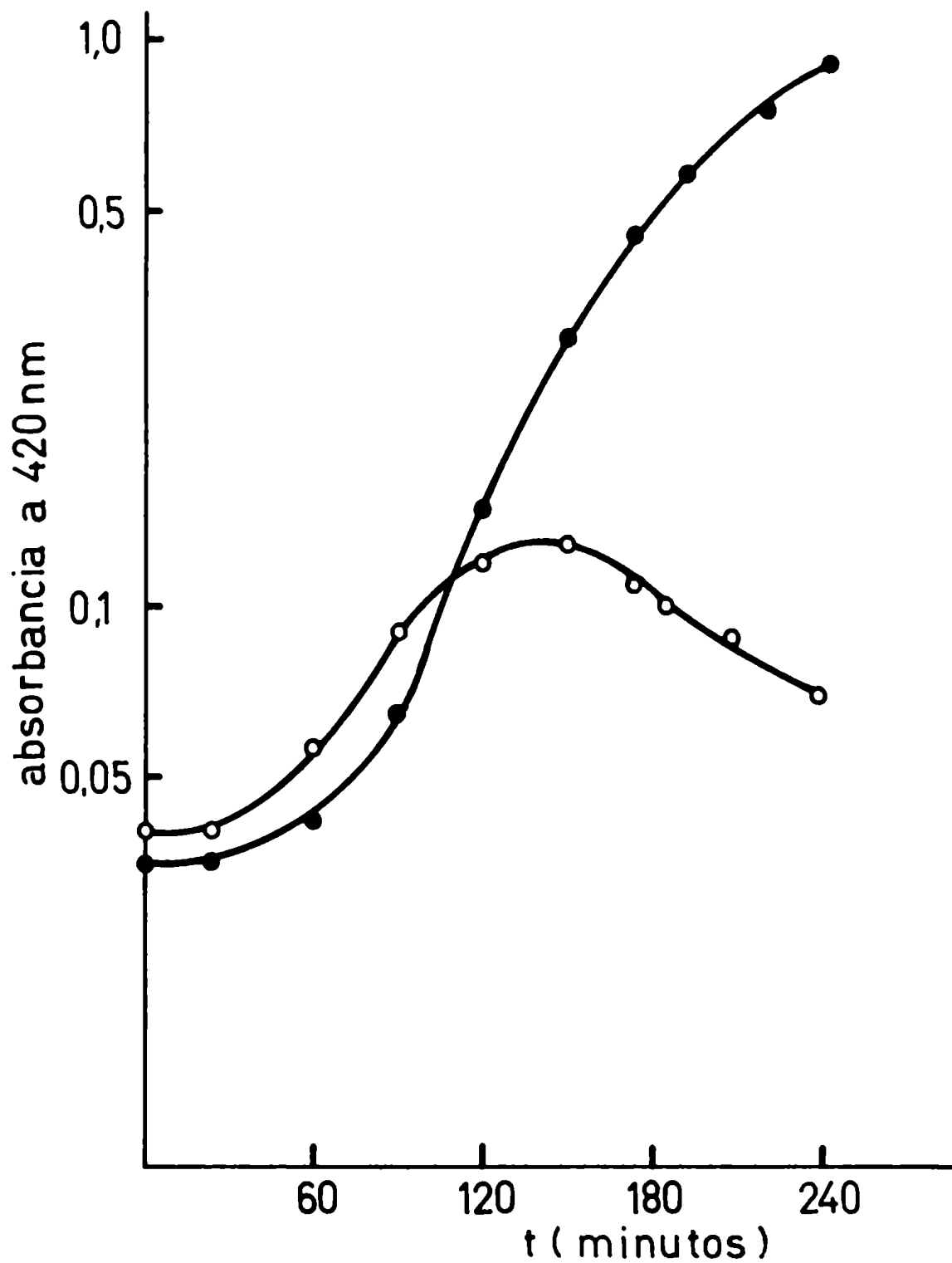


Fig. 2 : Curvas de crecimiento de la cepa L010 en medio L con ácido cis-vaccénico (●--●) y sin ácido insaturado (o--o).

Cl_2Mg 0,001 M. El material obtenido se suspendió en el mismo buffer de modo de obtener una concentración de aproximadamente 1 mg de proteína/ml de suspensión y se guardó en nitrógeno líquido distribuido en varios tubos. La actividad se mantiene al menos dos semanas. Este preparado se denomina enzima particulada ó unida a membrana.

Solubilización de la enzima

Se utilizaron los siguientes métodos:

- a) Solubilización por dodecilsulfato de sodio (SDS): Se hizo fundamentalmente siguiendo el procedimiento de Evans Jr. (1970). La enzima se descongelaba y se lavaba agregando un volumen del buffer Tris-ClH 0,02 M, pH 7,4, centrifugando luego a 35.000 x g por 20 minutos. El sedimento se suspendía en un volumen original de buffer 0,01 M Tris-ClH pH 9, 0,0002 M de Cl_2Mg y 0,04% de SDS. La suspensión se incubaba durante 10 minutos a 37°C y se centrifugaba a 35.000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante corresponde a la enzima "solubilizada". Se observó que el contacto con el detergente tenía efectos deletéreos sobre la enzima; en 30 minutos se perdía el 60% de la actividad inicial (Fig. 3). Diluyendo la mezcla después de solubilizar se evitaba la inactivación (Fig. 3), por lo cual las solubilizaciones se llevaron a cabo con ligeras modificaciones. Después de tratar con el SDS (10 minutos a 36°C), la mezcla se diluyó con el medio de ensayo de la actividad enzimática omitiendo ATP. De este modo la actividad se mantenía prácticamente sin modificaciones a tempera-

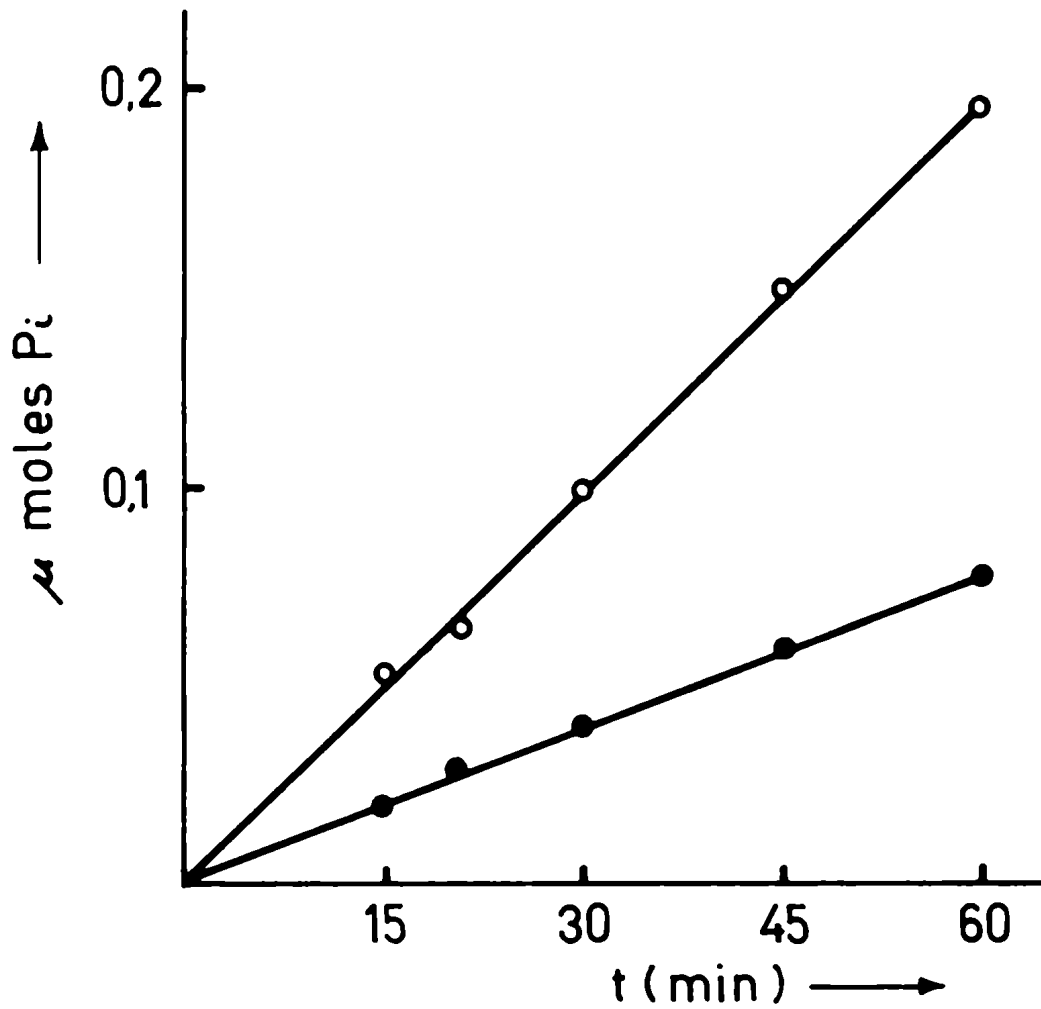


Fig. 3 : Efecto del SDS. Se trató la enzima particulada con SDS por 10 minutos. Se centrifugó después del tratamiento y se dividió en dos partes. Una parte se diluyó 10 veces con buffer (o--o). 30 minutos después se diluyó 10 veces la segunda parte (●--●) y se midieron las actividades de las dos fracciones.

tura ambiente (Fig. 4). La concentración del detergente disminuía a valores por debajo del 0,002%.

b) Solubilización por Tritón X-100: Las membranas se lavaron con un volumen de buffer Tris-ClH 0,02 M y se centrifugaron a 35.000 x g por 20 minutos como en el primer paso del método anterior. El sedimento se suspendió en buffer que contenía Tritón X-100 en concentraciones de 2-4 mg por mg de proteína. Después de 15 minutos a 36°C, la mezcla se centrifugó por 20 minutos a 35.000 x g. El sobrenadante contenía el 80% de la actividad primitiva.

c) Solubilización mediante sucesivos lavados con buffers: Se utilizó una variante del método de Abrams (1965). Las membranas se lavaron dos veces con buffer Tris-ClH 0,02 M, pH 7,5, y una tercera vez con el mismo buffer diluido 10 veces (0,002 M). Aunque la actividad específica del sobrenadante del tercer lavado era mayor, se empleó la mezcla de los tres sobrenadantes con una recuperación total de alrededor del 36% de la actividad inicial. La solubilización no es selectiva puesto que la actividad específica es igual aproximadamente a la de la enzima particulada (10-12 μ moles P_i /hora/mg de prot.]. Después de cada lavado se centrifugó a 35.000 x g por 20 minutos.

Centrifugando la enzima "solubilizada" a 100.000 x g durante una hora la actividad permanece en el sobrenadante.

Todos los procedimientos de solubilización se efectuaron a temperatura ambiente debido a la inestabilidad de la enzima soluble a

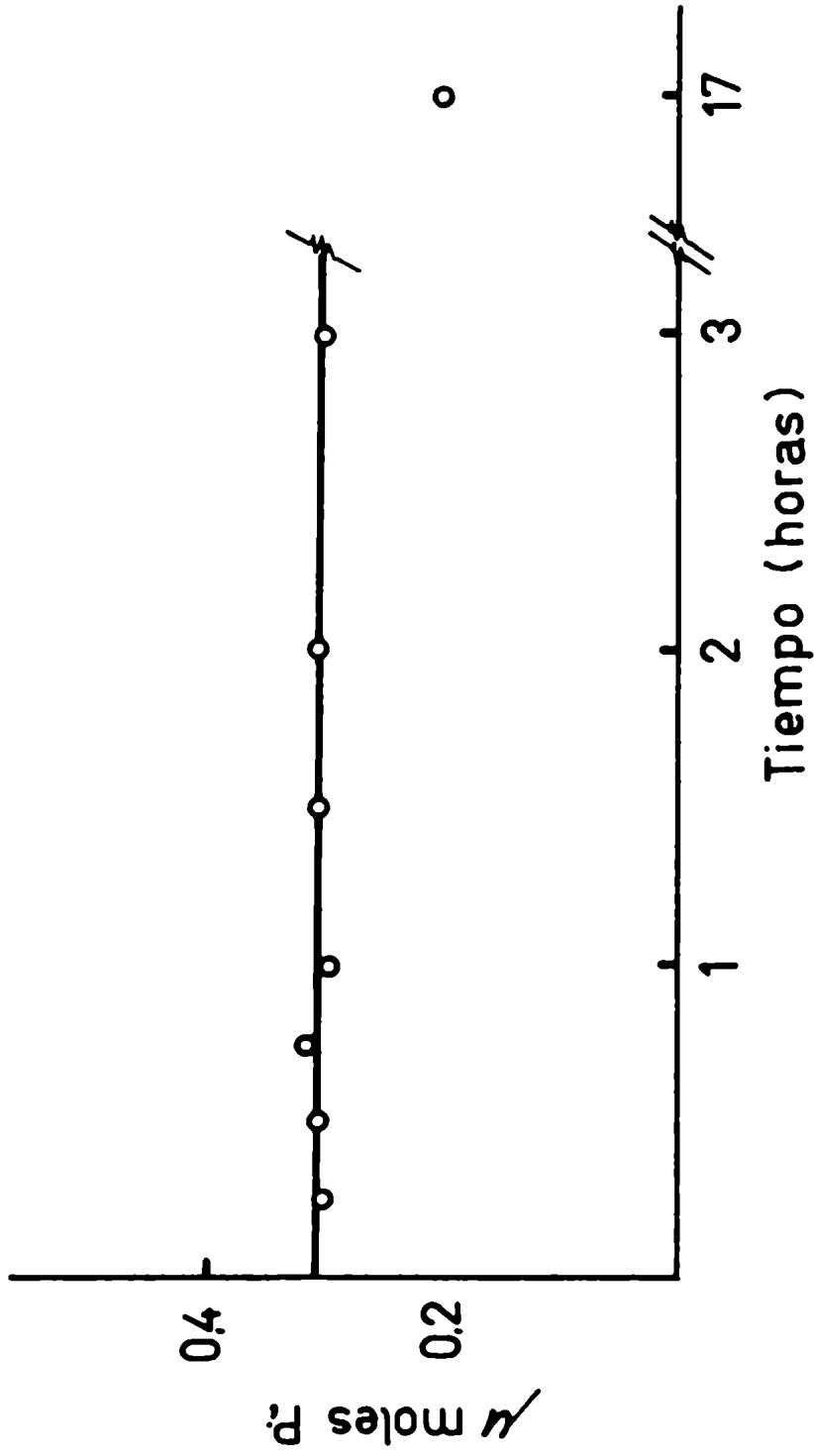


Fig. 4 : Estabilidad de la enzima soluble a temperatura ambiente diluida en el medio de incubación sin ATP después de tratar con SDS. Se mide a los distintos tiempos la actividad de alfcuotas.

bajas temperaturas (Evans Jr., 1970).

Ensayo de la actividad enzimática

El ensayo de la actividad ATPásica en todos los preparados (unida a membrana, soluble, reagregada) se llevó a cabo en el siguiente medio de incubación:

Tris-ClH	0,1 M	pH 9,0
ATP-Tris	0,0025 M	
Cl ₂ Ca	0,001 M	
Cisteína	0,001 M	
Proteína enzimática	10-30 µg	

El volumen final era de 1 ml. La inhibición por Na⁺ se midió en el rango 0-100 mM utilizando cloruro. Este medio es similar al empleado por Farfas, Londero y Trucco (1972).

La reacción se detenía por el agregado de 1 ml de ácido perclórico. El fósforo liberado se determinó por el método de Fiske y SubbaRow (1925). En los casos en los cuales se empleó Tritón X-100 para efectuar la solubilización, el detergente se extrajo con 1-butanol después del agregado del ácido perclórico. La fase butanólica se separó y a la fase acuosa se agregaron los reactivos de fósforo. Este tratamiento previo fue necesario debido a la turbidez que se presentaba cuando el Tritón X-100 se ponía en contacto con el molibdato de amonio (Ueda y Wada, 1970). No era necesario extraer el dodecilsulfato de sodio puesto que no interfiere con los reactivos de fósforo.

Ecuación de Hill

Como método para describir la cinética sigmoidea obtenida para la inhibición por Na⁺, se utilizó la ecuación

$$\log v/(V_0-v) = \log K - n \log (Na^+)$$

en la cual v = velocidad de la reacción a una determinada concentración de Na⁺;

V_0 = velocidad en ausencia de inhibidor;

n = "coeficiente de Hill".

Representando $\log v/(V_0-v)$ en función de $\log (Na^+)$ se obtiene una recta de pendiente "n" (Monod, Changeux & Jacob, 1963; Atkinson, Hathaway & Smith, 1965).

$K_{0,5}$ es la concentración de Na⁺ que da el 50% de inhibición con respecto a la actividad en ausencia de inhibidor.

Determinación de proteínas

Se utilizó el procedimiento de Lowry, Rosebrough, Farr & Randall (1951), usando como testigo albumina bovina.

Reconstitución de la enzima particulada

Debido a que la enzima se inactivaba en solución (no se recobraba actividad después de 48 horas de diálisis), no era posible utilizar los clásicos métodos de reconstrucción por diálisis prolongada (Razin, Morowitz & Terry, 1965; Butler, Smith & Gula, 1967). Para reconstituir estructuras de membrana, Green y col. (Green, Allmann, Bachmann, Baum, Kopaczyk, Korman, Lipton, MacLennan, McConnell, Perdue,

Rieske & Tzagoloff, 1967) ponían en íntimo contacto las proteínas y los lípidos aislados mediante sales biliares; esta mezcla se pasaba por una columna de Sephadex G-25 que eliminaba el detergente y se provocaba así la reconstrucción. Rottem y col. (Rottem, Stein & Razin, 1968) utilizaron una columna similar para eliminar el SDS. El reagregado lo hacían por posterior diálisis contra Mg^{++} . Se pensó que un método para acelerar el procedimiento en nuestro caso era utilizar una columna similar, que nos ahorraría al menos una etapa de diálisis (la correspondiente a la eliminación del detergente). Se utilizó una columna de 1 cm de diámetro y 33 cm de altura equilibrada con buffer Tris-ClH 0,02 M, pH 7,5, cisteína 0,001 M y Cl_2Ca 0,001 M. El pH se fijó en 7,5 puesto que los pH neutros serían los más apropiados para provocar la reagregación (Butler y col., 1967); la cisteína y el Ca^{++} se agregaron por el efecto estabilizante que tenían sobre la enzima en solución (Fig. 3 y 4).

Para la reconstitución, la membrana se trató con SDS como se describe para la solubilización pero se utilizó una concentración de detergente del 0,08%. Esta concentración de detergente, doble de la usada para los estudios cinéticos de la enzima solubilizada, se eligió teniendo en cuenta que la eficacia del proceso de reagregación dependía de la concentración de proteínas y lípidos solubilizados y se observó que esta cantidad aumentaba al aumentar la concentración de detergente empleado en el proceso de solubilización. La enzima solubilizada (1-2 mg de proteína/ml) en un volumen pequeño, 2-3 ml, se introducía

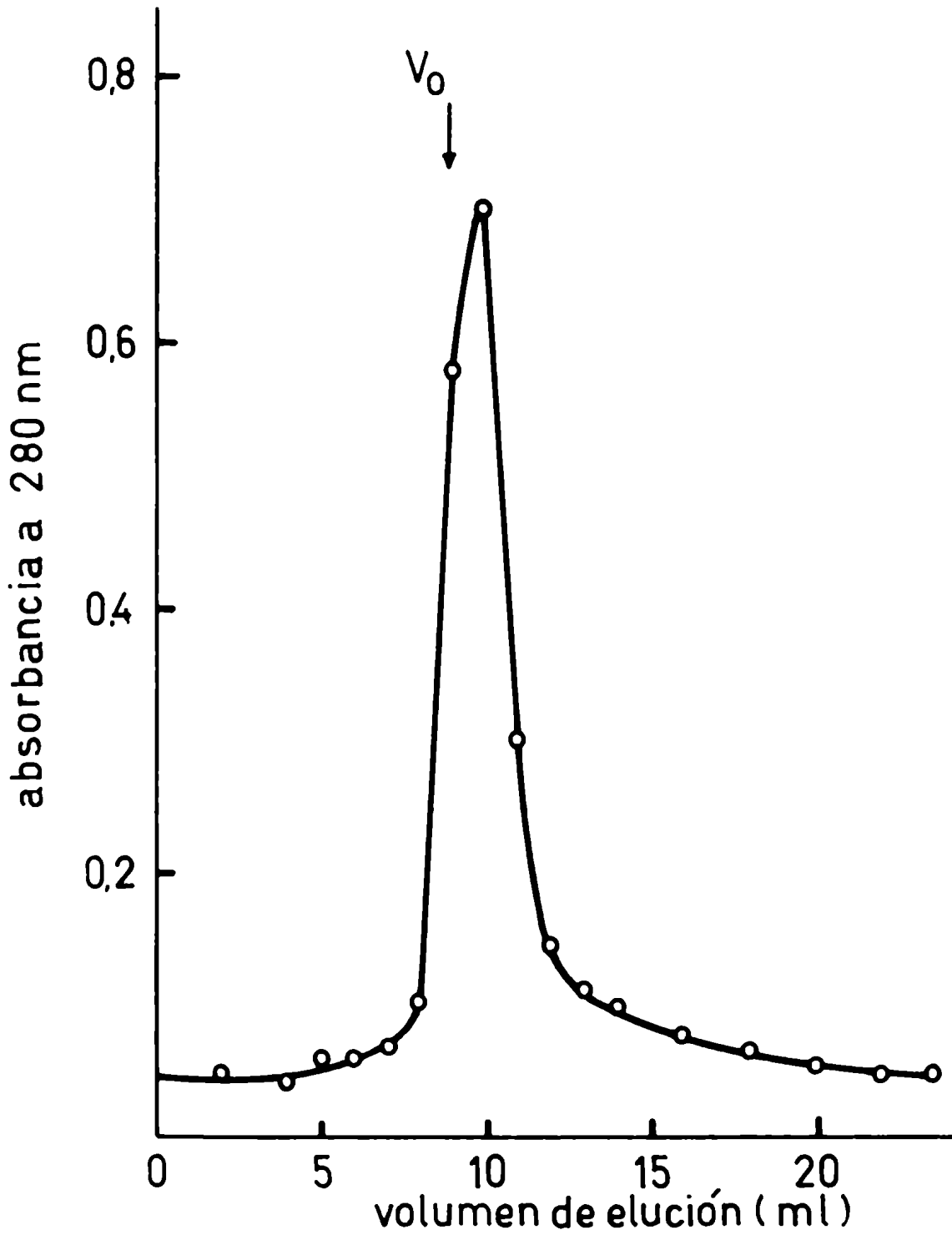


Fig. 5 : Perfil de elución de la columna de reconstrucción. V_0 indica el volumen muerto determinado con Azul de dextrano.

en la columna. Se utilizó el mismo buffer para la elución. Junto con el volumen muerto aparece una turbidez, correspondiente a las partículas reagregadas, y la totalidad de la actividad enzimática (Fig. 5). Para separar la enzima reagregada de la actividad soluble que no se ha reconstituido en partículas se centrifugó el pool de las fracciones del pico de absorbancia (fracciones 9, 10 y 11 de la Fig. 5) a $35.000 \times g$ por 20 minutos. El rendimiento de la actividad reagregada llegó en algunos casos al 50%. La columna equilibrada con Ca^{++} cumple entonces la función de las dos diálisis sucesivas: eliminar el detergente y proporcionar el catión divalente (Ca^{++}). Todo el procedimiento toma aproximadamente una hora.

En la Tabla I están los resultados de algunas experiencias hechas para determinar el comportamiento de la columna para la reconstrucción. Bajo el título Preparación N°1 están los resultados de una experiencia típica de reconstrucción. Las actividades específicas permanecen aproximadamente constantes, lo cual indica por un lado que el método de solubilización es inespecífico (cuando se emplea 0,04% de SDS en ese paso Evans Jr. (1970) obtiene un incremento notable en la actividad específica) y que la reconstitución también sería inespecífica (columna 3). Las recuperaciones totales son buenas (alrededor del 90%) dado que el pico es bien agudo (Fig. 5).

Se probó la influencia de las distintas concentraciones de Ca^{++} en el buffer de equilibrio sobre la reconstitución de estructura; los resultados se agrupan bajo el título Preparación N°2. En todos los

TABLA I

	Activ. total ($\mu\text{m}/\text{hora}$)	mg de proteína total	Activ. espec. $\mu\text{m}/\text{mg}/\text{hora}$	Relación Pdo/Sol. (prot.)	Relación Pdo/Sol. (activ.)
Preparación N°1					
(Ca++) 1 mM Enzima soluble en SLS	21,93	1,875	11,7		
Sobrenadante del eluido de columna	13,50	1,125	12,0		
Precipitado del eluido de columna	5,41	0,440	12,3	0,39	0,40
Preparación N°2					
(Ca++) 0 mM Enzima soluble en SLS	30,81	0,710	43,4		
Sobrenadante del eluido de columna	9,59	0,350	27,4		
Precipitado del eluido de columna	0,75	0,140	5,4	0,40	0,078
(Ca++) 2 mM Sobrenadante del eluido de columna	9,71	0,378	25,7		
Precipitado del eluido de columna	2,30	0,072	32,0	0,19	0,24
(Ca++) 10 mM Sobrenadante del eluido de columna	5,0	0,217	23,0		
Precipitado del eluido de columna	1,71	0,095	18,0	0,43	0,34

casos el rendimiento fue menor que cuando se equilibraba la columna con 1 mM de Ca^{++} . Esto, unido a la simplicidad que implica tener la misma concentración de catión que luego se usa para la medición, nos llevó a adoptar la columna equilibrada con 1 mM de Ca^{++} .

Determinación de la composición lipídica de los fosfolípidos de Escherichia coli

a) Separación de los fosfolípidos.

Las bacterias se obtuvieron de la misma manera que para la preparación de la enzima. Se lavaban tres veces con buffer Tris-ClH 0,02 M, pH 7,4, y luego se extraían por el procedimiento de Folch y col. con cloroformo-metanol 2:1 (Folch, Lees & Sloane-Stanley, 1957). Se filtraba por papel para eliminar los restos de bacterias, se particionaba con 0,2 volúmenes de ClK 0,1 M, se dejaba por una noche en la heladera. La fase superior se separó y la fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro, se evaporó bajo corriente de nitrógeno para evitar oxidaciones y se sembró sobre placas de Silica Gel G (Merck, Darmstadt) de 2 mm de espesor, desarrollando con éter de petróleo, éter etílico, ácido acético 70:40:3 para separar los otros lípidos de los fosfolípidos que permanecen en el origen. Se raspó la sílica del origen y se prepararon los ésteres metílicos de los ácidos grasos por metanólisis de los fosfolípidos utilizando metóxido de sodio 0,5 M en metanol (Oette & Doss, 1968). Luego de reaccionar se neutralizaba con ácido clorhídrico en metanol y los ésteres metí-

licos se extraían con éter de petróleo. Se secó con sulfato de sodio, se evaporó el solvente y diluidos convenientemente en benceno se inyectaron en un cromatógrafo de gases.

- b) Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

Se usó un aparato F & M modelo 700 equipado con doble columna y detector de llama de hidrógeno. Las columnas de EGSS-X al 10% sobre un soporte de ChromW A/W DMCS, 80-100 mesh median 1,80 m (6 pies) con un diámetro interno de 6 mm. Se trabajó isotérmicamente con una temperatura de columna de 180°C y un flujo de 40 ml/min de gas carrier (nitrógeno). Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 240°C y 285°C respectivamente. Se inyectó de 0,3 a 0,6 µl de la solución bencénica de los ésteres metílicos. Para la identificación de los distintos picos se computaron los tiempos de retención relativos a ácido palmítico comparando con los correspondientes tiempos de retención relativos de una mezcla de ésteres metílicos standard. La cuantificación se llevó a cabo calculando el area de cada pico mediante el producto de la altura del pico por el ancho del mismo en su parte media. La figura 6 muestra la separación de los distintos picos cuando se usó ácido cis-vaccénico como suplemento.

Estadística

Para todos los cálculos estadísticos y para optimizar las recetas, se utilizó la computadora Olivetti Programma 101. Las fórmulas empleadas y los programas utilizados para efectuarlas están en el apéndice

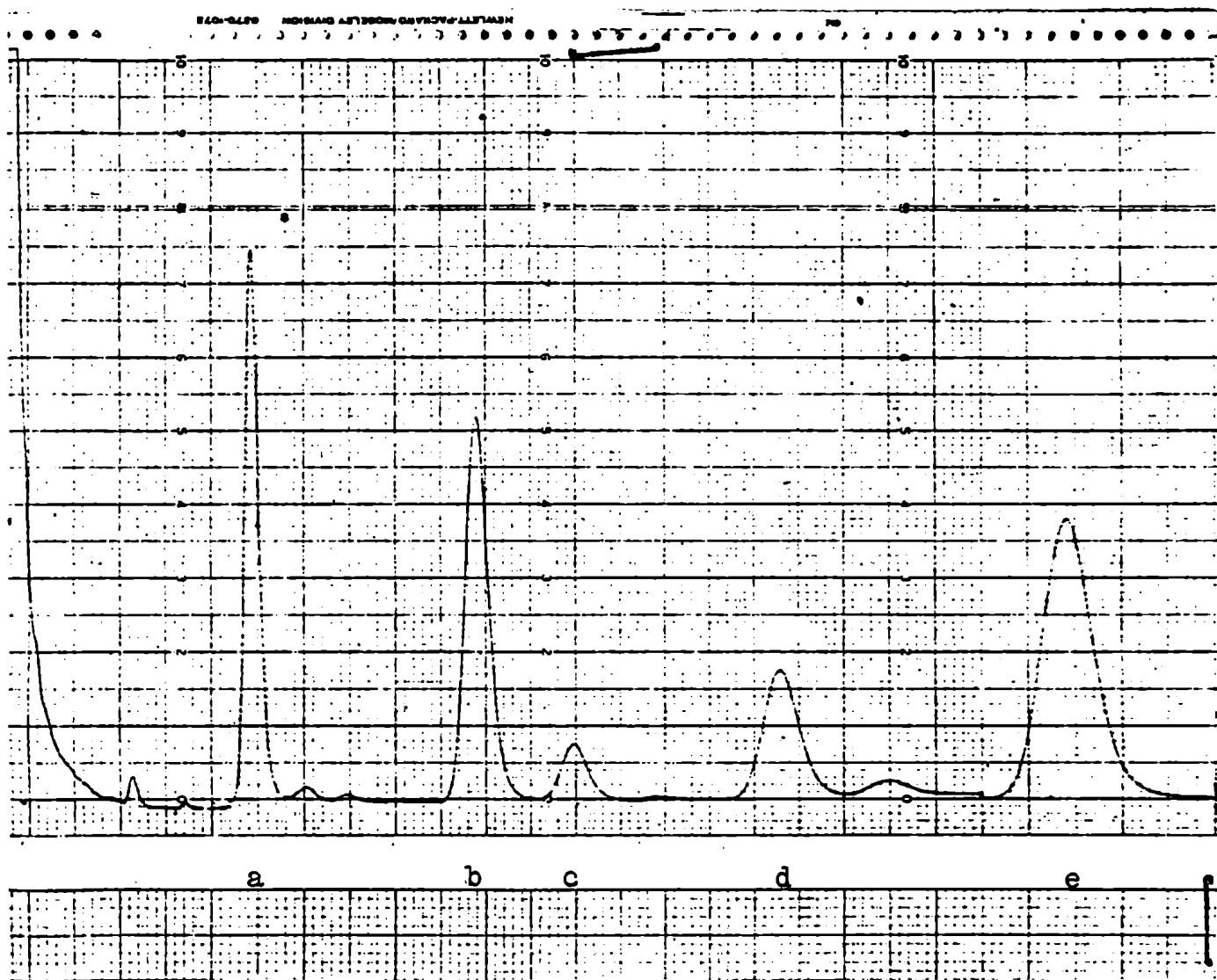


Fig. 6 : Separación por cromatografía gaseosa de los ésteres metílicos de los ácidos: a) mirístico, b) palmítico, c) palmitoleico, d) derivado ciclopropánico del palmitoleico, e) *cis*-vaccénico. Corresponden a un cultivo suplementado con ácido *cis*-vaccénico.

RESULTADOS

Efecto de los distintos ácidos grasos insaturados exógenos sobre el comportamiento alostérico de la (Ca⁺⁺)-ATPasa unida a membrana en E. coli L010.

a) Determinaciones a 36°C

Ya había sido demostrado que el comportamiento alostérico de la (Ca⁺⁺)-ATPasa unida a membrana en el auxótrofo de Escherichia coli era distinto según las bacterias hubieran crecido en medio suplementado con ácido oleico o linoleico (Farfas y col., 1972). Tomando como punto de partida esos resultados, se investigó el mismo hecho utilizando otros ácidos insaturados; así se probaron, además de los antedichos, los ácidos palmitoleico, cis-vaccénico y linolénico; los isómeros trans no son suplemento para la cepa L010 en un medio complejo (Schalrer y col., 1969). En la figura 7 se graficó la inhibición por Na⁺ de la (Ca⁺⁺)-ATPasa unida a membrana; en ella se observan las curvas para la enzima proveniente de cultivos suplementados con ácidos oleico y linolénico. Las pendientes de la representación logarítmica son -1,6 y -2,35 respectivamente.

Los resultados de una serie de determinaciones utilizando los cinco ácidos como suplementos puede observarse en la Tabla II. Al cambiar el ácido graso suplementado al medio, se pusieron de manifiesto distintos grados de cooperatividad con respecto al efector Na⁺; el grado menor corresponde a la enzima proveniente de bacterias que se han

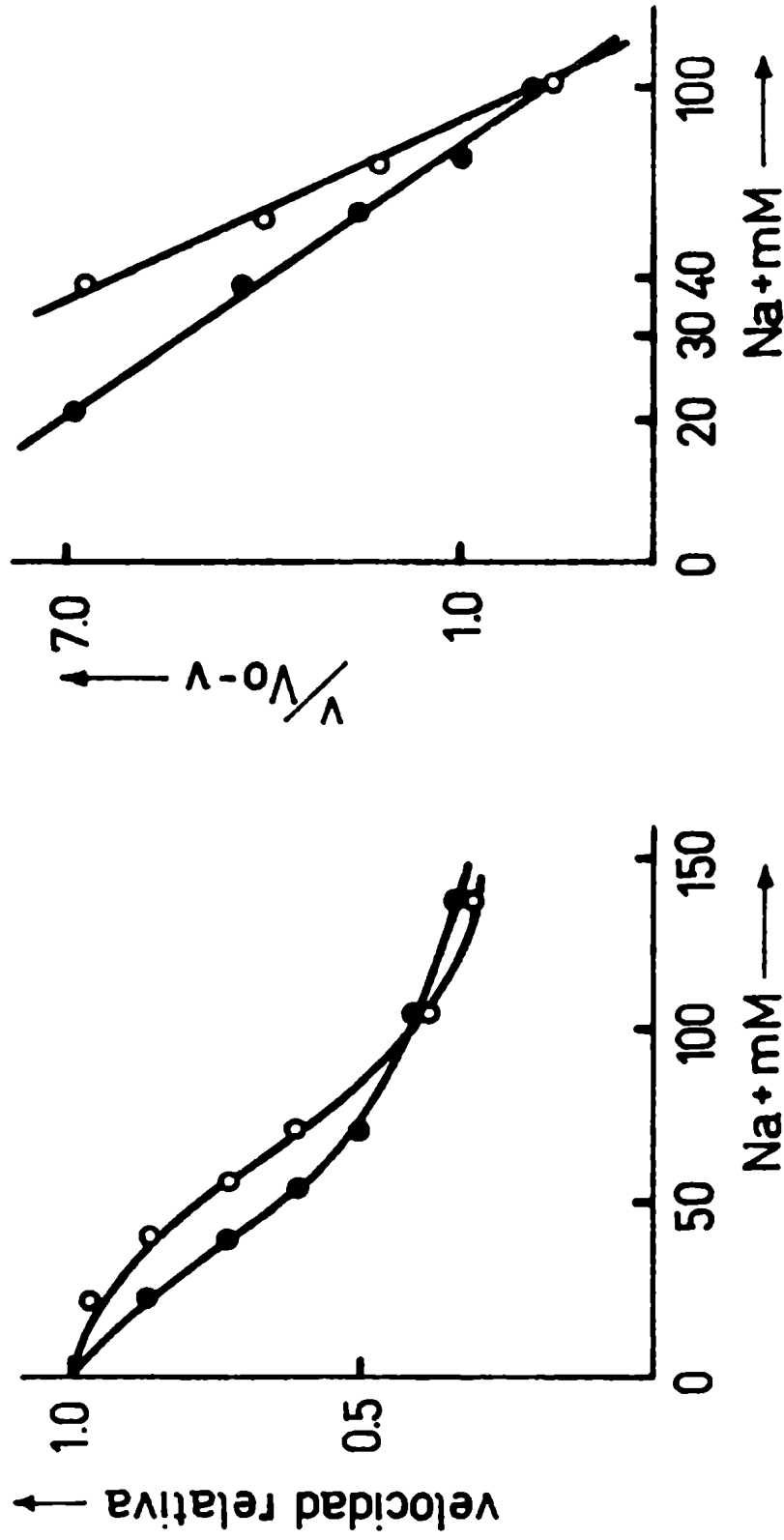


Fig. 7 : Inhibición alostérica de la (Ca⁺⁺)-ATPasa. Membranas de cultivos suplementados con ácido oleico (●-●) y linolénico (○-○)

TABLA II

Inhibición por Na⁺ de la (Ca⁺⁺)-ATPasa asociada a membrana del auxótrofo de E.coli. Influencia de los distintos ácidos grasos insaturados que se suplementan al medio de cultivo sobre los valores de "n" y K_{0,5}.
Temperatura de ensayo: 36°C

Suplemento de ácido graso insaturado	n ± E.S.	K _{0,5} ± E.S.
Linolénico (8)	2,22 ± 0,04*	74 ± 7
Linoleico (6)	2,08 ± 0,07#	100 ± 5
Palmitoleico (15)	1,91 ± 0,04*	70 ± 5
Oleico (12)	1,60 ± 0,06*#	98 ± 17
cis-Vaccénico (6)	1,33 ± 0,03*#	116 ± 16

p < 0,001 entre pares de valores marcados con el mismo signo (* ó #).

Entre paréntesis está el número de preparaciones.

cultivado con un suplemento de ácido cis-vaccénico y el mayor para la enzima de bacterias que crecieron en un medio suplementado con ácido linolénico. Los valores de $K_{0,5}$ muestran en general una gran dispersión.

Esta gradación de la cooperatividad lleva a pensar que en la asociación membrana-enzima, las interacciones entre los sitios del Na^+ se harían más difíciles al disminuir la libertad de movimiento de las especies moleculares a causa de la mayor rigidez de los lípidos.

b) Determinaciones a 19°C

Los experimentos realizados a 19°C (Tabla III) parecerían confirmar esta última interpretación, pues cuando se mide el comportamiento alostérico a esta temperatura, también se observa un distinto grado de cooperatividad aunque en un intervalo más restringido. Prácticamente el único suplemento que confiere posibilidades de interacción a los iones sodio es el ácido linolénico, lo cual es bastante coherente con lo señalado anteriormente pues el ácido linolénico, teniendo tres dobles ligaduras, es el ácido más "fluido" empleado por nosotros (Ladbrooke y col., 1968). A 19°C nos encontraríamos frente a una estructura más rígida debido al empaquetamiento de los restos hidrocarbonados de los ácidos grasos, los cuales se hallarían en estado "cristalino", salvo en el caso del ácido linolénico para el cual las transiciones ocurrirían a menor temperatura (Overath y col., 1970).

Los valores de $K_{0,5}$ a 19°C aparecen más bajos que los correspondientes a 36°C (Tabla III), siendo esta diferencia significa-

TABLA III

Inhibición por Na⁺ de la (Ca⁺⁺)-ATPasa asociada a membrana del auxótrofo de E. coli. Influencia de los distintos ácidos grasos insaturados que se suplementan al medio de cultivo sobre los valores de "n" y K_{0,5}.

Temperatura de ensayo: 19°C

Suplemento de ácido graso insaturado	n ± E.S.	K _{0,5} ± E.S.
Linolénico (4)	1,6 ± 0,04*°	37 ± 3,5
Linoleico (3)	1,3 ± 0,07#°	32,5 ± 7,5
Palmitoleico (5)	1,16 ± 0,05*	68 ± 5,5
Oleico (4)	1,05 ± 0,03#°	46 ± 7,5

p < 0,01 entre los pares marcados con el mismo signo (*, ° ó #).

Entre paréntesis está el número de preparaciones.

tiva ($p < 0,01$) en el caso de las membranas provenientes de cultivos suplementados con ácido linolénico.

Solubilización de la actividad enzimática mediante SDS. Efecto sobre el comportamiento alostérico.

Para descartar cualquier posible diferencia desde el punto de vista de las propiedades alostéricas, propia de la proteína, en las enzimas provenientes de las bacterias cultivadas en presencia de los distintos suplementos y para probar fehacientemente la influencia de la estructura sobre el comportamiento alostérico, se procedió a la solubilización de la enzima. Se empleó el método descrito por Evans Jr. (1970) que emplea dodecilsulfato de sodio.

a) Determinaciones a 36°C

Se utilizaron para comparación, sólo dos suplementos extremos que daban enzimas particuladas con valores del coeficiente de Hill para la inhibición por Na^+ bien alejados entre sí: oleico y linolénico. Los resultados de varias determinaciones pueden verse en la Tabla IV. No hay diferencias significativas en la cooperatividad de la inhibición por Na^+ de la actividad de las enzimas solubilizadas provenientes de los distintos cultivos. Desde el punto de vista alostérico son iguales. La separación de la membrana tiene, sin embargo, efectos pronunciados: aumenta los valores de $K_{0,5}$ y disminuye los valores de "n" (Fig. 8). Este aumento de los valores de $K_{0,5}$ al solubilizar la enzima es significativo tanto para la enzima proveniente de cultivos suplementados con ácido oleico ($p < 0,02$) como con linolénico ($p < 0,005$). Como es-

TABLA IV

Efecto de la solubilización por SDS
sobre el comportamiento alostérico de la (Ca⁺⁺)-ATPasa.
Temperatura de ensayo: 36°C

	Suplemento	Membrana	Soluble
"n"	Oleico	1,60 ± 0,06* (12)	1,21 ± 0,05 (6)
	Linolénico	2,22 ± 0,04 (8)	1,18 ± 0,05 (5)
K _{0,5}	Oleico	98 ± 17 (12)	160 ± 9 (6)
	Linolénico	74 ± 7 (8)	135 ± 14 (5)

* Promedio ± E.S.

Entre paréntesis está el número de preparaciones.

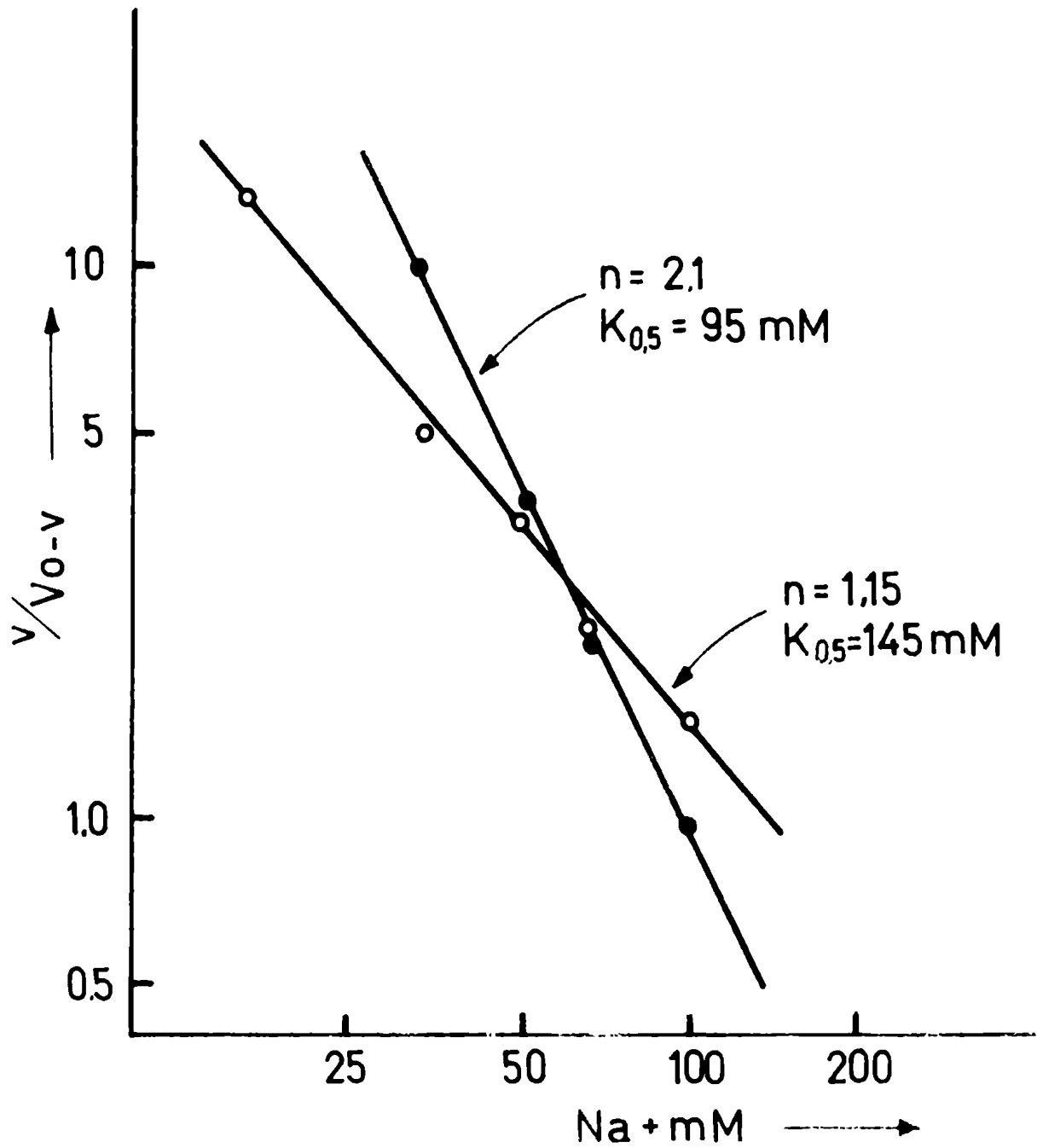


Fig. 8: Representación de Hill de la inhibición por Na⁺ de la enzima particulada (●--●) y soluble (○--○). Bacterias cultivadas con ácido linolénico como suplemento.

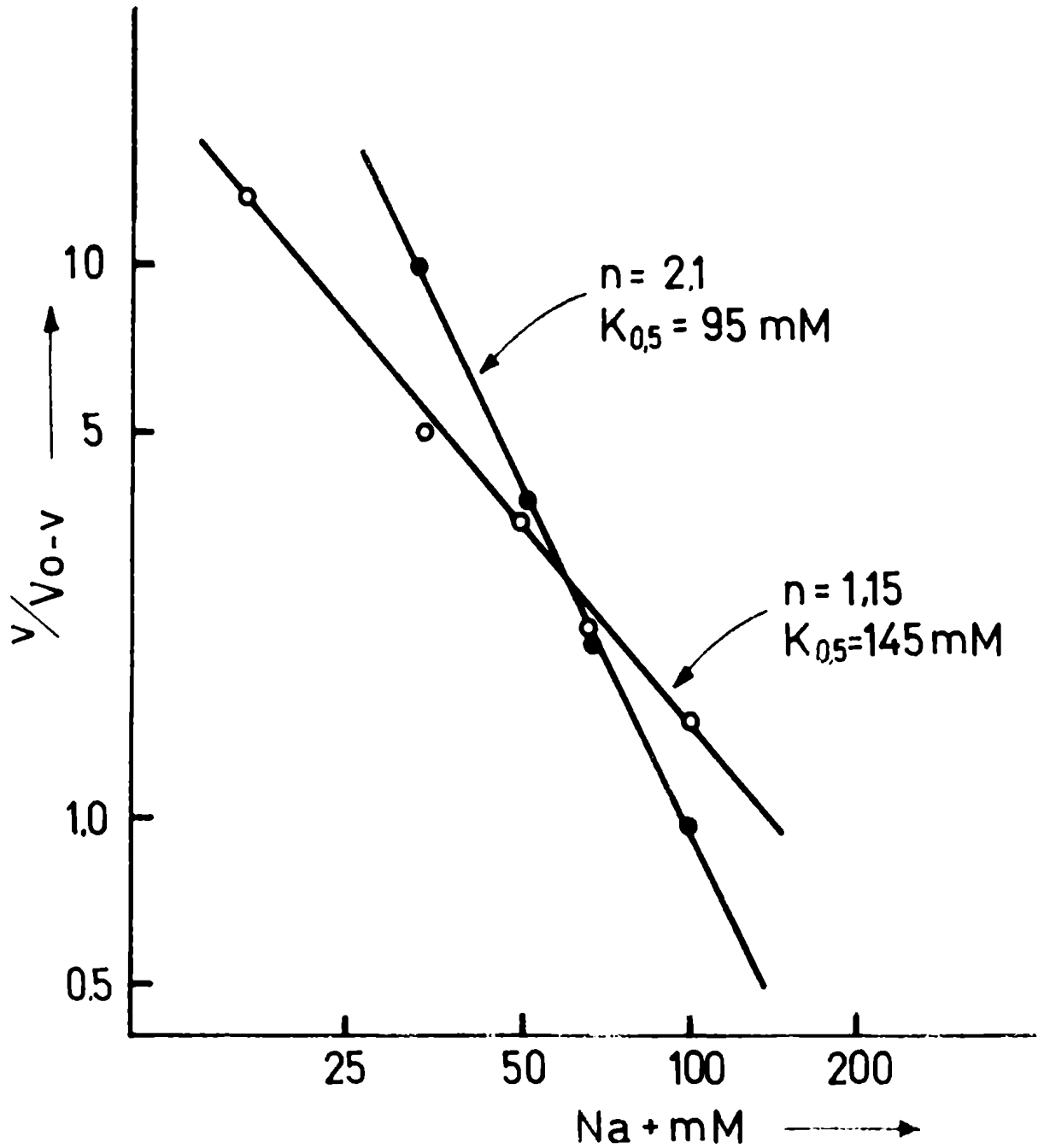


Fig. 8: Representación de Hill de la inhibición por Na⁺ de la enzima particulada (●--●) y soluble (○--○). Bacterias cultivadas con ácido linolénico como suplemento.

tos valores eran bajos, lo cual indicaría una interacción pequeña entre los sitios del inhibidor, se podría pensar que la presencia de SDS desensibilizaba la enzima; sin embargo, las mediciones a 19°C permitieron descartar esta posibilidad.

b) Determinaciones a 19°C

Realizando los experimentos a 19°C (Tabla V) se observó que los valores de "n" se incrementaban a 1,6 en ambos casos (oleico y linolénico), mostrando un buen grado de cooperatividad ya similar al encontrado con la enzima "intacta", unida a membrana, proveniente de células cultivadas con ácido linolénico como suplemento (Ver Tabla III).

Los valores de $K_{0,5}$ también se incrementan al solubilizar, al igual que lo observado en las experiencias a 36°C. Las diferencias entre los valores de $K_{0,5}$ correspondientes a las enzimas soluble y unida a membrana, son significativas, siendo $p < 0,02$ cuando el suplemento fue ácido oleico y $p < 0,005$ cuando el suplemento fue el ácido linolénico.

Es importante señalar que esta circunstancia permite utilizar los valores de $K_{0,5}$ para caracterizar la enzima cuando está soluble o cuando está unida a membrana. La que está unida a membrana presenta $K_{0,5}$ más bajos que la soluble.

Influencia de los distintos procedimientos de solubilización sobre los parámetros alostéricos.

Para descartar una acción directa del SDS se utilizó un

TABLA V

Efecto de la solubilización por SDS
sobre el comportamiento alostérico de la (Ca⁺⁺)-ATPasa.
Temperatura de ensayo: 19°C

	Suplemento	Membrana	Soluble
"n"	Oleico	1,05 ± 0,03* (4)	1,61 ± 0,07 (3)
	Linolénico	1,60 ± 0,06 (4)	1,64 ± 0,04 (5)
K _{0,5}	Oleico	46 ± 7,5 (4)	121 ± 25 (3)
	Linolénico	37 ± 3,5 (4)	134 ± 18,5 (5)

* Promedio ± E.S.

Entre paréntesis está el número de preparaciones

detergente no iónico, el Tritón X-100 a concentraciones de 2-4 mg/mg de proteína para solubilizar la enzima. Se obtienen los mismos valores que con SDS (Tabla VI). Finalmente, se confirma que las propiedades alostéricas de la enzima soluble son inherentes a ella y no artificios provocados por los detergentes utilizando buffers de baja fuerza iónica, en ausencia de cationes bivalentes para "despegar" la enzima de la membrana. Los distintos tratamientos de solubilización llevan a los mismos resultados del coeficiente de Hill tanto a 19°C como a 36°C (Tabla VI).

Reagregación de la enzima.

Un elemento más para poner de manifiesto el papel de la estructura en sí, era el estudio del comportamiento alostérico del material reagregado. Como el concepto de solubilidad en este caso es operativo, Kahane & Razin (1971) propusieron el uso de más de un criterio de solubilización:

- a) No sedimentar a 100.000 x g en una hora.
- b) No ser excluido de una columna de Sepharose 4B
- c) Ser vacío al microscopio electrónico.

Aparte del criterio clásico de permanecer sobrenadante después de centrifugar a 100.000 x g por una hora, se hizo un control al microscopio electrónico del material solubilizado que se introducía en la columna con resultado negativo; no quedaban "elementos" o "semillas" de membrana. Además, Auburn y col. (Auborn, Eyring & Lew Choules 1971) demostraron que con concentraciones de SDS de aproximadamente

TABLA VI

Efecto de distintos procedimientos de solubilización
sobre el valor de 'n' #

Enzima	Temperatura de ensayo	
	36°C	19°C
Unida a membrana	1,6	1,1
Solubilizada por:		
SDS	1,1	1,6
Tritón X-100	1,05	-
Buffers	1,15	1,7

Los cultivos fueron suplementados con ácido oleico.

0,9% (menor que la concentración micelar crítica), las membranas de Acholeplasma laidlawii se disgregaban en partículas de aproximadamente 75.000 de peso molecular medio, y que no había agregados de detergente. La reagregación se llevó a cabo como se ha descrito en Materiales y Métodos.

El aspecto del material reagregado puede verse en la Fig. 9. Son láminas de material muy similares, de dimensiones más pequeñas, a las observadas por Butler y col. (1967) en Micrococcus lysodeikticus, cuando reagregaban por diálisis. Pueden observarse también algunas vesículas aunque son muy escasas. En general, para obtener material altamente ordenado, vesicular, el procedimiento debe ser lento (Razin, 1972).

La Tabla VII muestra los resultados de una experiencia hecha con ácido linolénico como suplemento. La reagregación lleva prácticamente al valor inicial del "n"; la cooperatividad aumenta con respecto a la enzima solubilizada. Por otra parte, el $K_{0,5}$ corresponde al de la enzima particulada. Esta pequeña discrepancia entre los valores de "n" del material de partida y del reagregado, podría deberse a que el procedimiento de reconstrucción no da elementos totalmente ordenados.

Influencia de la fluidez de la membrana sobre el comportamiento alostérico de la (Ca⁺⁺)-ATPasa.

Los lípidos in vivo parecerían estar en un estado fluido (Engelman, 1970) en contraposición con el estado sólido que corresponde al empaquetamiento hexagonal de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos.

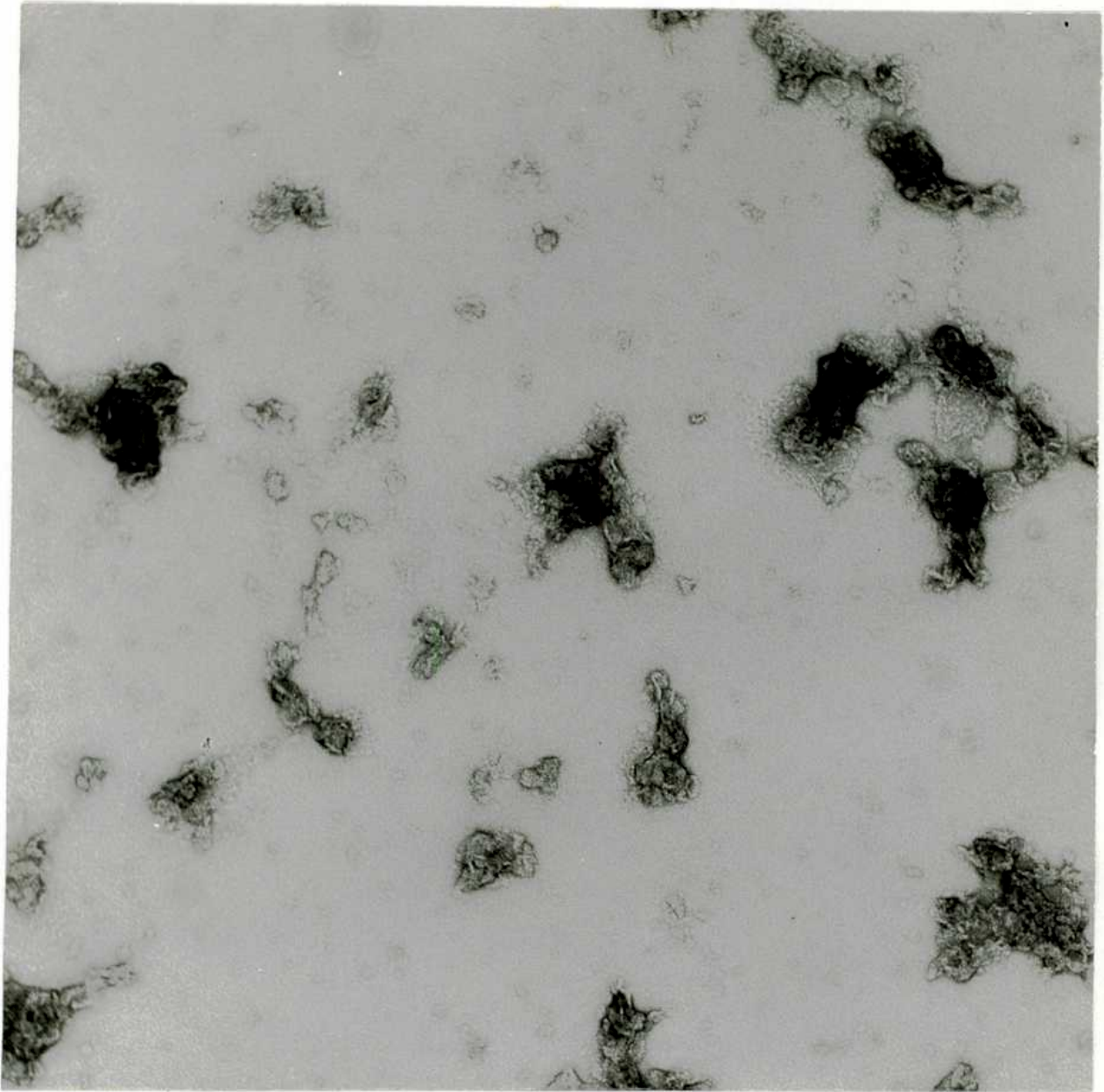


Fig. 9 : Microfotografía electrónica del material reagregado.
Tinción: acetato de uranilo al 2%. (80.000 x).

TABLA VII

Efecto de la reconstitución de la estructura
sobre las propiedades alostéricas de la (Ca⁺⁺)-ATPasa.
Temperatura de ensayo: 36°C#

Estado de la enzima	n	K _{0,5}
Unida a membrana	2,0	80
Solubilizada	1,1	130
Reagregada	1,8	55

Los cultivos fueron suplementados con ácido linolénico.

La importancia de este fenómeno empezó a considerarse cuando se vió que la composición lipídica de las membranas de la bacteria (E. coli) dependían de la temperatura de crecimiento, aumentando la proporción de ácidos insaturados a medida que decrecía la temperatura (Marr & Ingraham, 1962).

La composición lipídica de los fosfolípidos del mismo auxótrofo y de otros similares ya ha sido estudiada (Silbert, Ruch & Vagelos, 1968; Schairer y col., 1969). Sin embargo, dado que las condiciones de cultivo no eran las mismas (medio empleado y fase en la cual se detiene el cultivo), se determinó la composición en ácidos grasos de las bacterias enteras como se describe en Métodos. No se aislaron membranas para estudiar la composición puesto que ha sido demostrado por White, Lennarz & Schnaitman (1972) que la distribución de los fosfolípidos y la composición en ácidos grasos son similares, salvo para ácido palmítico, en pared y en membrana citoplásmica. El error cometido para el caso del ácido palmítico no alcanzaría al 1,5%.

En la Tabla VIII se presenta la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos de las bacterias cultivadas con los mismos suplementos ya utilizados para la determinación del coeficiente de Hill.

En los trabajos en que se estudiaba transporte en función de la composición lipídica, se observaba que las temperaturas de transición seguían el orden de fluidez de los ácidos grasos utilizados (Wilson y col., 1970; Overath y col., 1970; Esfahani y col., 1971b).

TABLA VIII

Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos totales de E. coli L010 cultivado en medio L con distintos suplementos de ácido graso insaturado

Acidos grasos en los fosfolípidos Moles %	Suplemento				
	Palmito- leico	cis- Vaccé- nico	Oleico	Lino- leico	Lino- lénico
14:0 *	12,0	26,4	17,2	15,7	24,7
16:0	50,5	50,0	46,0	49,2	45,9
Sat. Totales	62,5	76,4	63,2	64,9	70,6
14:1		1,4			
16:1	33,8	5,7	4,5		
16:2				1,0	
16:3					0,5
17:0	2,1	1,0	1,3		
18:1		15,0	29,2		
18:2				28,3	
18:3					22,7
Insat. Totales	35,9	23,1	35,1	29,3	23,2
No Identif.	1,6	1,9	1,7	5,8	6,2
Insat./Sat.	0,57	0,30	0,55	0,45	0,33

* Las dos primeras cifras indican la longitud de la cadena hidrocarbónica y la última el número de dobles ligaduras, 17:0 es el derivado ciclopropánico del 16:1

Se hizo evidente que los valores de "n" también seguían el orden de fluidez de los ácidos insaturados con los cuales se suplementó el medio (serie oleico, linoleico, linolénico).

Bloj, Morero, Farfás & Trucco (1973) han encontrado una correlación entre los parámetros de fluidez de la membrana y el valor del coeficiente de Hill para la inhibición por F^- de la acetilcolinesterasa y de la $(Na^+ + K^+)$ -ATPasa de eritrocitos de ratas sometidas a distintas dietas. Han utilizado como parámetro de fluidez de la membrana, la relación insaturados/saturados y la relación IDL/saturados.

En base a estos resultados se calculó el coeficiente de correlación entre los "n" y la relación insaturados/saturados (m_i/m_s), donde m_i y m_s son las fracciones molares de los ácidos insaturados y saturados respectivamente presentes en los fosfolípidos del auxótrofo en los distintos cultivos. No se observó correlación.

Se probó entonces con otros parámetros de fluidez. Utilizando para el cálculo el IDL definido como la sumatoria de las fracciones molares de los ácidos insaturados por el número de dobles ligaduras del ácido ($\sum n_i m_i$), se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,93$ ($p < 0,01$) siendo la ecuación de la recta de regresión $y = 1,72x + 1,06$. Empleando como parámetro de fluidez la relación $\sum m_i n_i / m_s$ donde m_i y m_s son las respectivas fracciones molares de los ácidos insaturados y saturados respectivamente y n_i es el número de dobles ligaduras del ácido insaturado, se obtuvo un coeficiente de correlación de $r = 0,95$ ($p < 0,005$). La ecuación de la recta de regresión fue $y = 1,24x + 1,02$.

Es necesario destacar que la relación empleada en último término deriva de la usual m_i/m_s (insaturados/saturados) con la diferencia de que se le da peso al número de dobles ligaduras de cada ácido. Es idéntica a la expresión IDL/saturados empleada por Bloj y col. (1973).

A diferencia de lo obtenido para la inhibición por F^- de la acetilcolinesterasa en glóbulo de rata, sistema en el cual Bloj y col. (1973) obtenían correlaciones entre los valores de "n" y el % de ácido oleico y entre los mismos valores y el % de ácido linolénico, no se obtuvo correlación entre el coeficiente de Hill y la fracción molar de ningún ácido en particular; además, en el caso de E. coli fue posible obtener membranas con ácidos grasos presentes en unas membranas y ausentes en otras y la correlación con la fluidez general de la membrana se mantenía. Esto último permitió descartar completamente la posibilidad de que fuese algún ácido en particular el causal del fenómeno.

La posibilidad de cambiar cuantitativamente la composición lipídica sin variarla cualitativamente, permitió, además, obtener un control interno de la correlación.

Comparando los trabajos de Overath y colaboradores (Schairer y col., 1969; Overath y col., 1970) en los cuales utilizaban en un caso la mutante K 1001 similar a la usada aquí y en el otro caso la mutante K 1059 derivada de la anterior pero que tiene un bloqueo en el camino de β -oxidación, se vió que la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos para el mismo suplemento cambiaba. Aumentaba el por-

centaje de ácido insaturado incorporado con respecto a la que tiene la mutación simple; en el caso de la suplementación con ácido linolénico, la doble mutante incorporaba un 46% del ácido mientras que la mutante simple acumulaba sólo un 25% entre palmitolénico (derivado por β -oxidación del linolénico) y el linolénico. Estos autores utilizaban un medio que contenía glicerol. Como la glucosa reprime el sistema de la β -oxidación (Weeks, Shapiro, Burns & Wakil, 1969), y se había utilizado un medio con 0,1% de glucosa, se pensó que eliminando la glucosa habría una derrepresión del sistema de β -oxidación y se obtendrían, por lo tanto, incorporaciones menores de los ácidos insaturados. De esta manera se podrían variar los porcentajes relativos de ácidos grasos insaturados, sin cambiar el suplemento; se hicieron cultivos en el medio L sin glucosa suplementados con ácidos cis-vaccénico y linolénico.

Los resultados del análisis de los ácidos grasos de los fosfolípidos se muestran en la Tabla IX. Se obtuvieron valores inversos a los esperados; la ausencia de glucosa provocaba un aumento del porcentaje de insaturado incorporado, pero a los efectos de confirmar la correlación la dirección de la variación no tenía importancia.

Los valores de "n" obtenidos para los mismos cultivos están en la Tabla X, parte inferior, junto con los valores del índice de dobles ligaduras y de la relación $\sum m_i n_i / m_s$. Se observó que al aumentar los parámetros de fluidez con respecto a los mismos cultivos con glucosa, aumentaron simultáneamente los valores de "n".

TABLA IX

Composición en ácidos grasos de los fosfolípidos totales de E. coli L010 cultivado en medio L en ausencia de glucosa con ácidos cis-vaccénico y linolénico como suplementos

Acidos grasos en fosfolípidos Moles %	cis-Vaccénico	Linolénico
14:0	18,4	7,3
16:0	41,1	50,5
Sat. Totales	59,5	57,8
16:1	7,0	
16:3		2,1
17:0	2,1	
18:1	28,5	
18:3		31,7
Insat. Totales	37,6	33,8
No Ident.	2,9	8,4
Insat./Sat.	0,63	0,59

TABLA X

Valores de "n" y de los parámetros de fluidez utilizados para los diagramas de dispersión

Suplemento al medio	"n"	IDL	$\Sigma n_i m_i / m_s$
Palmitoleico	1,91	0,36	0,57
cis-Vaccénico	1,34	0,23	0,30
Oleico	1,60	0,35	0,55
Linoleico	2,08	0,59	0,87
Linoléxico	2,22	0,70	0,99
cis-Vaccénico*	2,1	0,38	0,63
Linoléxico*	2,9	1,02	1,75

* Se omitió glucosa en el medio.

Con todos los datos reunidos (Tabla X) se hicieron los diagramas de dispersión y se calcularon los coeficientes de correlación entre los valores de "n" y el índice de dobles ligaduras (Fig. 10), y entre los valores de "n" y la relación $m_i n_i / m_s$ (Fig. 11). Los parámetros de las rectas de regresión y los coeficientes de correlación coinciden con los que se habían calculado previamente, tomando sólo los cultivos en medio L con glucosa; la significancia aumentó puesto que el número de casos es mayor.

Esta estrecha relación que hay entre la fluidez de la membrana y los valores del coeficiente de Hill confirma el papel regulatorio de la membrana sobre la expresión del comportamiento alostérico de la (Ca⁺⁺)-ATPasa unida a membrana.

Dependencia de la actividad enzimática con la temperatura: Gráficos de Arrhenius.

Observaciones previas de nuestro grupo (Goldemberg, 1971; Goldemberg y col., 1972) indicaron que cambios conformacionales puestos de manifiesto por el estudio de los parámetros alostéricos podían ser también observados por discontinuidades en los gráficos de Arrhenius. Siguiendo con esta idea, se estudió la dependencia con la temperatura de la actividad de la (Ca⁺⁺)-ATPasa en membranas del auxótrofo.

Los resultados con ácidos oleico y linolénico pueden observarse en la figura 12. Se obtienen curvas bifásicas. En todas las enzimas unidas a membrana probadas (oleico, linoleico, linolénico y palmitoleico) no había diferencias ni en la posición de la discontinuidad

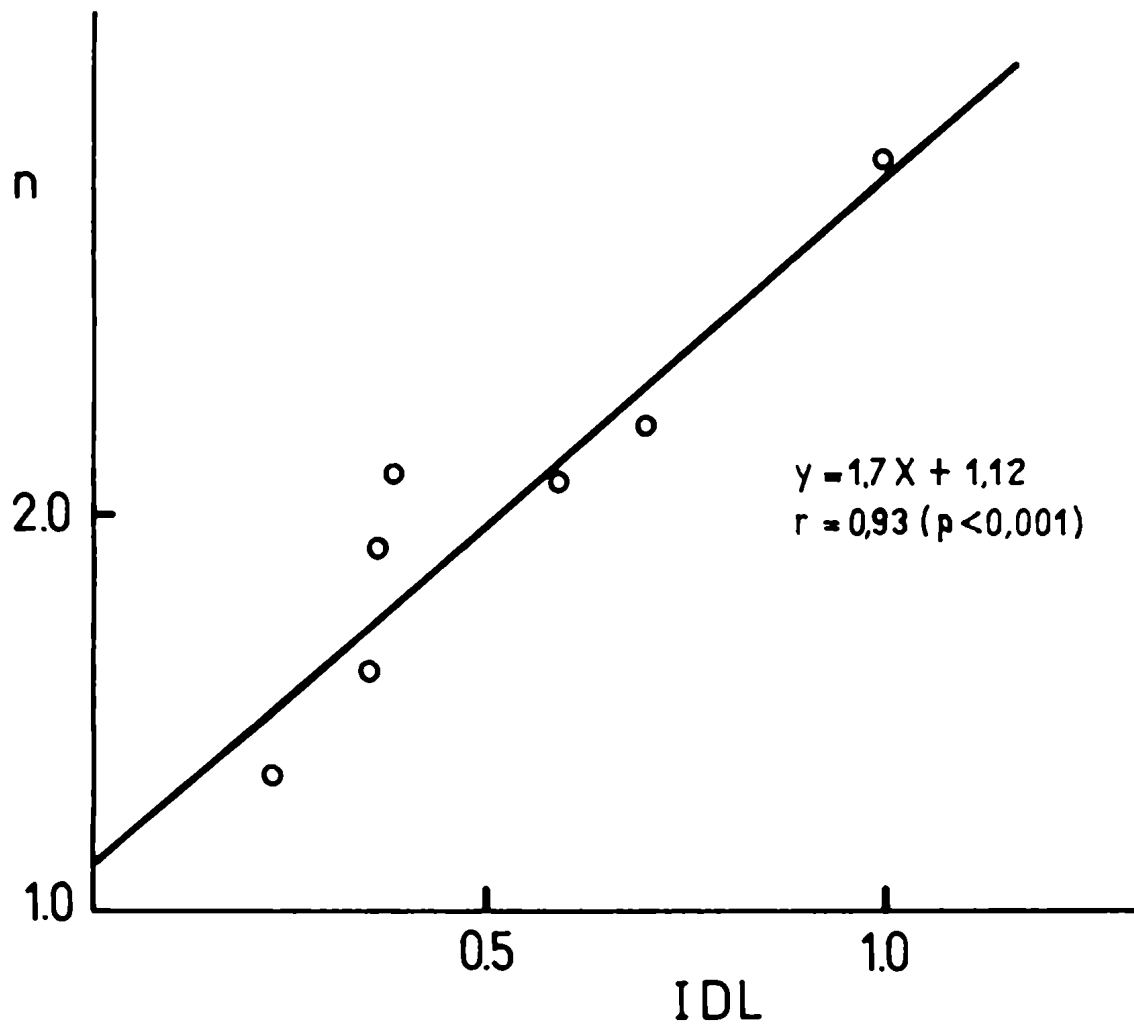


Fig. 10: Diagrama de dispersión y recta de regresión de la correlación entre los valores del coeficiente de Hill, 'n', y el índice de dobles ligaduras. La ecuación de la recta y el valor del coeficiente de correlación están en la figura.

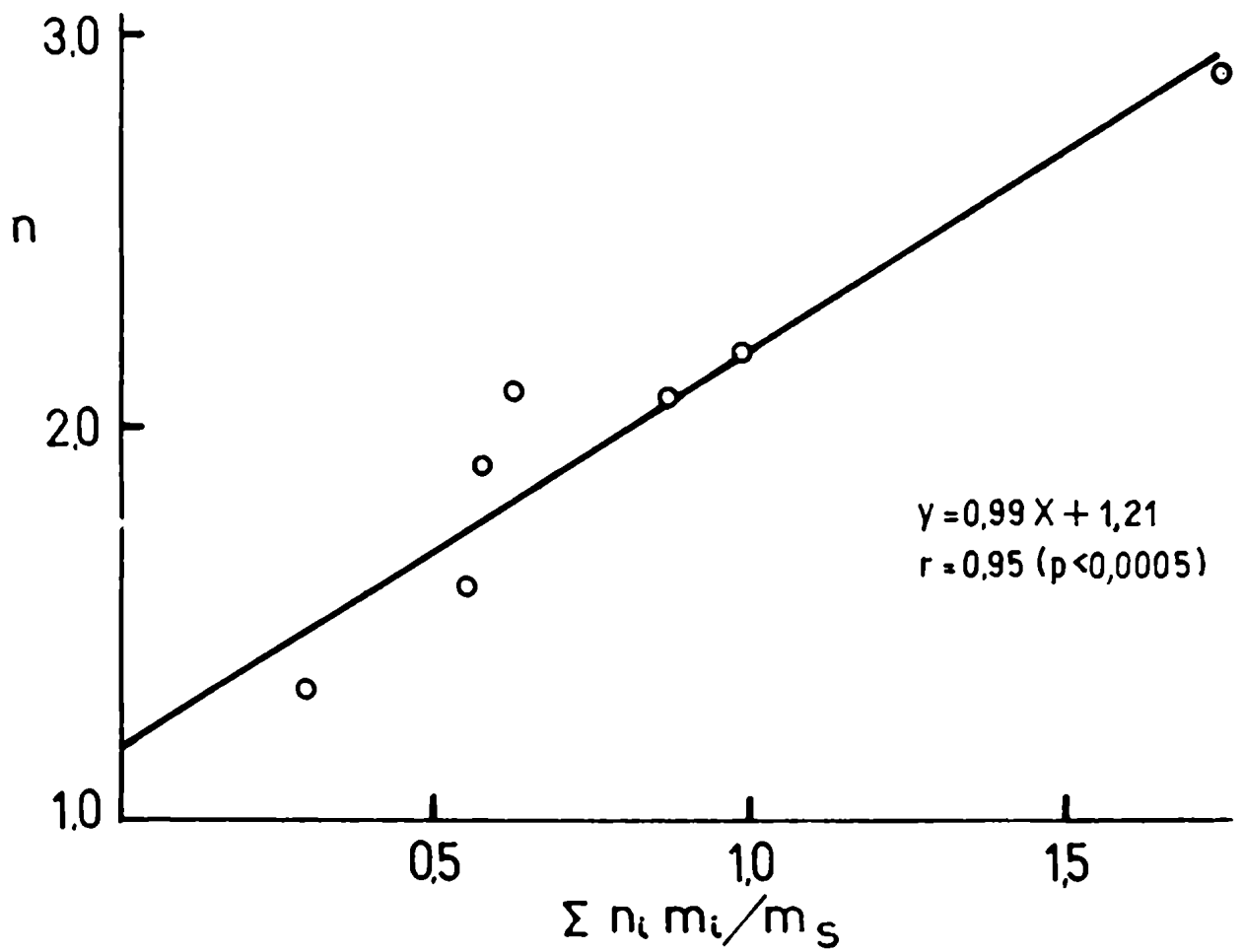


Fig. 11: Diagrama de dispersión y recta de regresión de la correlación entre el coeficiente de Hill y la relación $\Sigma n_i m_i / m_s$. La ecuación de la recta y el valor del coeficiente de correlación están en la figura.

ni en los valores de las energías de activación debajo o por encima de las temperaturas de transición. Aunque era muy improbable que todos los suplementos produjeran el mismo tipo de interacción, se determinó la dependencia con la temperatura de la actividad de la enzima solubilizada.

Los gráficos de Arrhenius que se obtienen son exactamente iguales a los de la enzima unida a membrana (Fig. 12). Para control se emplearon todos los métodos de solubilización con el mismo resultado. Estos hechos indicarían que las discontinuidades y las distintas energías de activación en las dos fases de la curva son inherentes a cambios conformacionales de la proteína misma y que este cambio conformacional no se encontraría influenciado por la composición de ácidos grasos de la membrana.

Los resultados de varias determinaciones de energías de activación y de puntos de inflexión aparecen en la Tabla XI. No hay diferencias significativas entre los valores correspondientes a las distintas enzimas particuladas y los de la enzima soluble.

Por otra parte, había una serie de sistemas asociados a membrana de E. coli cuya dependencia con la temperatura se encontraba influenciada por las distintas transiciones de fase de los lípidos presentes en la membrana (Schairer y col., 1969; Overath y col., 1970; Wilson y col., 1970; Esfahani y col., 1971b).

Hubo que pensar entonces que estaríamos frente a un caso en el cual la interacción con la parte lipídica se ponía de manifiesto

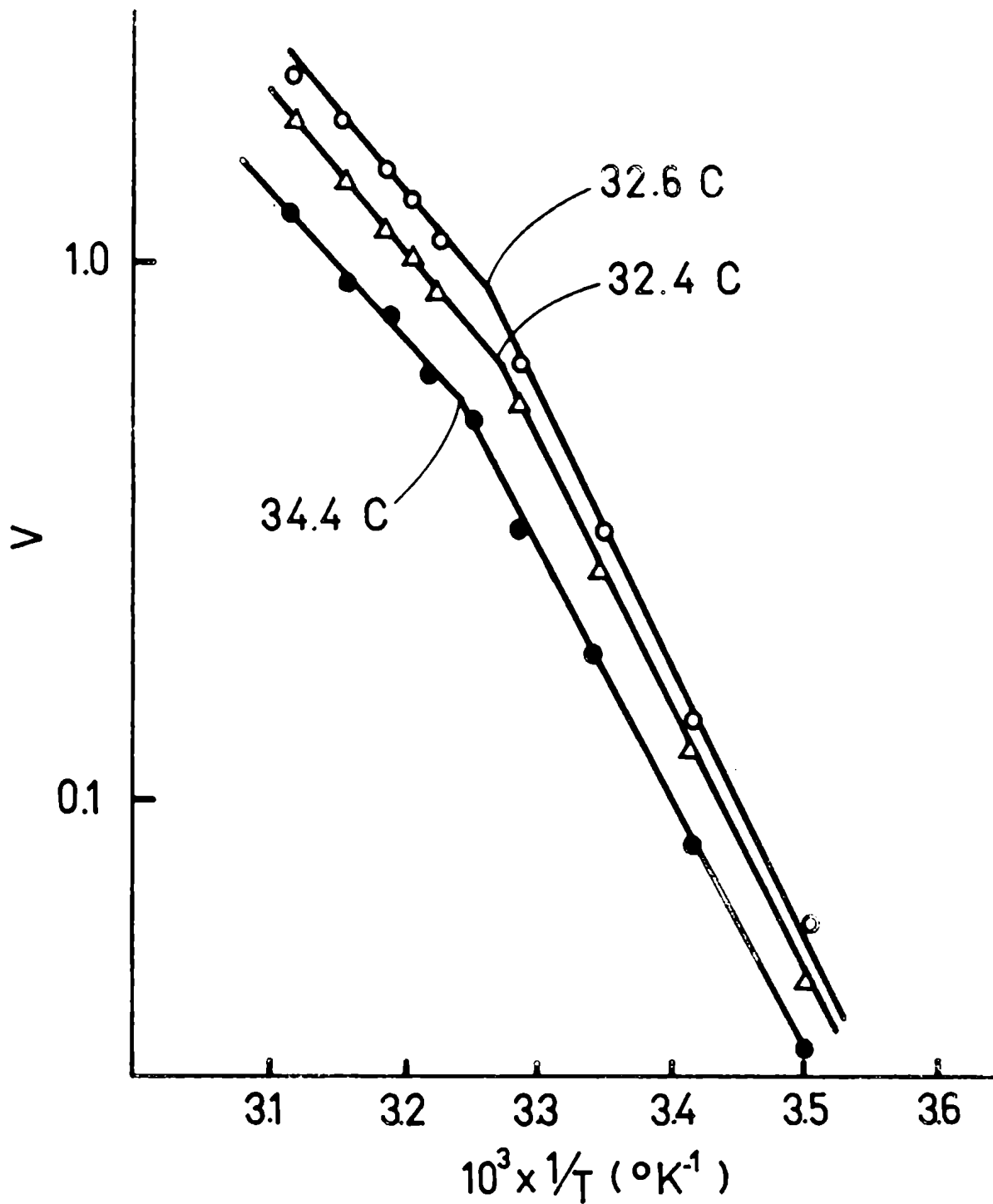


Fig. 12: Gráfico de Arrhenius de la (Ca++)-ATPasa. Enzima particulada: medio suplementado con ácido oleico (●--●), y linolénico (o--o). Enzima soluble: medio suplementado con ácido linolénico (Δ--Δ). v es velocidad inicial expresada como μmoles Pi/hora.

TABLA XI

Energías de activación y temperaturas de inflexión tomadas de los gráficos de Arrhenius de distintas preparaciones de la (Ca⁺⁺)-ATPasa unida a membrana y soluble

Suplemento al medio	Ea I Kcal/mol	Ea II Kcal/mol	T _i
Oleico (4)	11,7 ± 1,5*	23,4 ± 2,5	31,2 ± 1,2
Linoleico (3)	11,9 ± 2,4	22,4 ± 3,0	33,9 ± 1,4
Linolénico (4)	10,8 ± 1,0	21,4 ± 0,9	31,7 ± 1,1

Soluble (3)#	11,2 ± 2,0	20,1 ± 2,8	32,9 ± 1,4

* Promedio ± E.S.

Provenientes de cultivos con distintos suplementos.

Entre paréntesis se indica la cantidad de preparaciones.

Ea I y Ea II son las energías de activación por arriba y por debajo del punto de transición, T_i, respectivamente.

por el estudio de la cinética alostérica y no se ponía de manifiesto por el estudio de la dependencia con la temperatura de las velocidades de reacción (este hecho será discutido con mayor detalle más adelante en conexión con la localización de la enzima en la membrana).

La razón de este comportamiento estaría apoyado por una serie de consideraciones termodinámicas que se examinarán a continuación.

Tomemos el caso de una enzima en una membrana. Esta enzima-proteína es capaz de sufrir un cambio conformacional dado de $A \rightleftharpoons B$ con un valor asociado de ΔG bien determinado. Si la estructura (membrana) actúa de alguna manera sobre la proteína, variará el ΔG total, y esto tendrá por efecto desplazar el equilibrio entre las dos formas conformacionales postuladas de la enzima por la relación que existe entre la energía libre y la constante de equilibrio $\Delta G = - RT \ln K$ donde K sería $\frac{(B)}{(A)}$ o considerando que no hay cambio en el número de moléculas $\frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1}$.

¿ Como se manifestaría la influencia de la estructura en los gráficos de Arrhenius ? Massey, Curti & Ganther (1966) demostraron que un punto de inflexión en los gráficos de Arrhenius podía correlacionarse con un cambio conformacional de la proteína. Midiendo la fluorescencia de los grupos triptofano, pudieron seguir el cambio conformacional paso a paso. Este cambio se completaba en aproximadamente 10°C y el punto de equilibrio, o sea cuando las dos formas están en la misma concentración, se correspondía con la temperatura de transición que se observaba al representar $\log v$ en función de $1/T$. Otros ejemplos de

cambios conformacionales en proteínas inducidos por la temperatura fueron descritos (Martínez & Rosenberg, 1964; Tanford, 1968; Tsong, Hearn, Wrathall & Sturtevant, 1970); todos estos cambios ocurrían en un rango de aproximadamente 10°C.

En la figura 13A está representado un cambio conformacional de una enzima medido por un método físico (el aspecto de la curva está tomado del trabajo de Massey y col., 1966). El valor de la constante de equilibrio podría calcularse en cada punto trazando una vertical que queda dividida por la curva en dos segmentos proporcionales a la concentración de los estados A y B postulados (Tsong y col., 1970).

Si se tienen dos tipos de membrana, o sea con distinta composición lipídica que dan gráficos de Arrhenius distintos entre sí, se tendrían curvas similares a la representada en la figura 13A pero desplazada tantos grados como se encuentre desplazado el T_i del gráfico de Arrhenius (Fig. 13B). Se podría entonces calcular en cuanto varió la energía de interacción de la membrana al cambiar la composición, como la diferencia de los ΔG calculados gráficamente, y sería, suponiendo los mismos estados standard,:

$$\Delta G_1 = - 2,3 RT \log \frac{1 - \alpha_1}{\alpha_1} = - 2,3 RT \log K_1$$

$$\Delta G_2 = - 2,3 RT \log \frac{1 - \alpha_2}{\alpha_2} = - 2,3 RT \log K_2$$

$$\Delta G_i \text{ (variación de la energía de interacción)} = \Delta G_1 - \Delta G_2 = 2,3 RT \log \frac{K_2}{K_1}$$

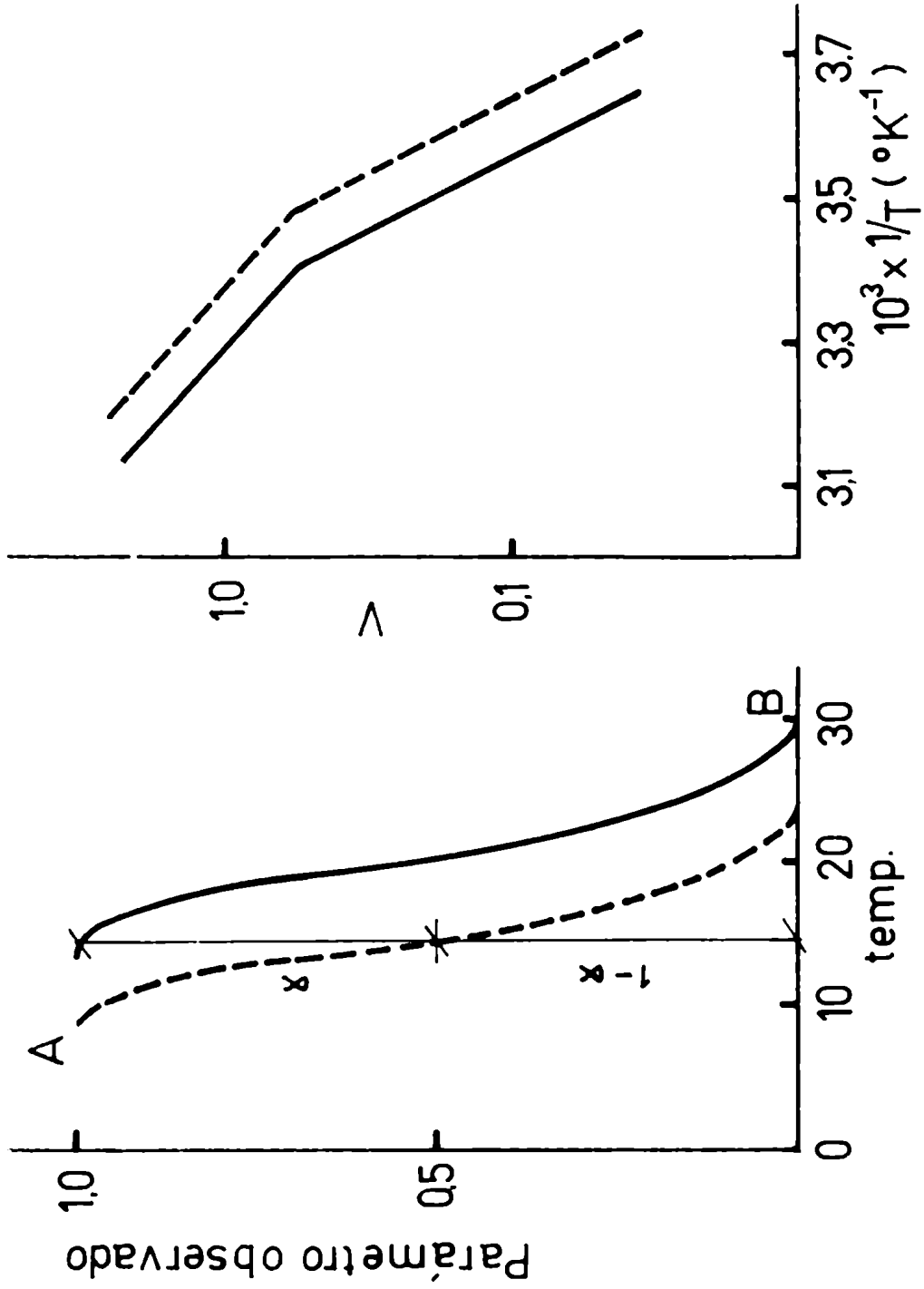


Fig. 13A : Cambio conformacional entre los estados A y B observado mediante un método físico.

Fig. 13B : El mismo cambio conformacional observado midiendo la actividad de la enzima a distintas temperaturas.

Si tomamos, para simplificar, el punto medio en el primer caso será $K_1 = 1$ y $\Delta G_i = 2,3 RT \log \frac{1 - \alpha_2}{\alpha_2}$

Con los datos obtenidos de las curvas de Arrhenius en la (Ca⁺⁺)-ATPasa de E. coli, se puede calcular, en base a los errores standard, que se necesitan promedios de T_i cuya diferencia sea mayor de 6°C para que sean estadísticamente significativos ($p < 0,02$ para la diferencia); 6°C de diferencia nos llevarían, si el cambio conformacional se completa en un intervalo de 10°C, a tener menos de 1% en forma B y más de 99% en forma A; ΔG_i sería aproximadamente = $= 2,3 \times 2 \times 310 \times \log 99 = 2800$ cal/mol.

Si fuera más brusco el cambio conformacional como parecen señalarlo algunos trabajos (Radda, 1971), tendríamos valores aún más elevados, puesto que la concentración de forma B sería prácticamente nula a una temperatura menor de T_i . De este cálculo podría deducirse que sólo cuando la diferencia entre las energías de interacción de la membrana fuese mayor de ≈ 3 Kcal/mol serían visibles cambios en los puntos de inflexión de los gráficos de Arrhenius en nuestro caso.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la variación de energía libre involucrada en una transición alostérica es pequeña, del orden de 1-3 Kcal/mol (Wyman, 1963; Changeux & Rubin, 1968), es evidente que ΔG_i pequeños harán variar significativamente las propiedades alostéricas de un sistema sobre el cual la interacción se ejerce.

En base al trabajo de Rubin & Changeux (1966), es posible computar el cambio de l. constante L del equilibrio $\frac{T}{R}$ conociendo los

cambios del coeficiente de Hill. Si $\Delta G = - RT \ln L'$ sería:

$$\Delta G_i = 2,3 RT \log \frac{L'_2}{L'_1}$$

Considerando "n" máximo = 3, se construyó la curva "n" en función de L' para el caso de 3 subunidades (Fig. 14). El programa de computación está en el apéndice. De este gráfico de "n" de Hill en función de L' se pueden obtener los valores correspondientes:

siendo para n = 1,34 (cis-vaccénico) $\log L'_1 = 0,3$

y para n = 1,6 (oleico) $\log L'_2 = 0,8$

resultaría $\Delta G_i = 2,3 RT 0,5 \approx 700 \text{ cal/mol}$

o sea que con todas las salvedades que surgen de utilizar directamente el modelo de Monod, Wyman & Changeux (1965), se vé que variaciones significativas del coeficiente de Hill se obtendrían por variaciones relativamente débiles (700 cal/mol) de la interacción de la membrana con la enzima.

Variaciones de energía de interacción similares podrían obtenerse en base al trabajo de Weber (1972) (comunicación personal del Dr. Weber), prescindiendo del modelo de Monod.

Aunque este procedimiento de cálculo tiene una serie de simplificaciones, serviría para ilustrar la extrema sensibilidad a los cambios de interacción con la membrana que tendría una proteína alostérica. En el caso de la (Ca⁺⁺)-ATPasa de E. coli, la membrana interactuaría con baja energía de tal modo que no alcanzaría a modificar el equilibrio del cambio conformacional producido por la temperatura. Sin embargo, sí es suficiente la energía de interacción para provocar

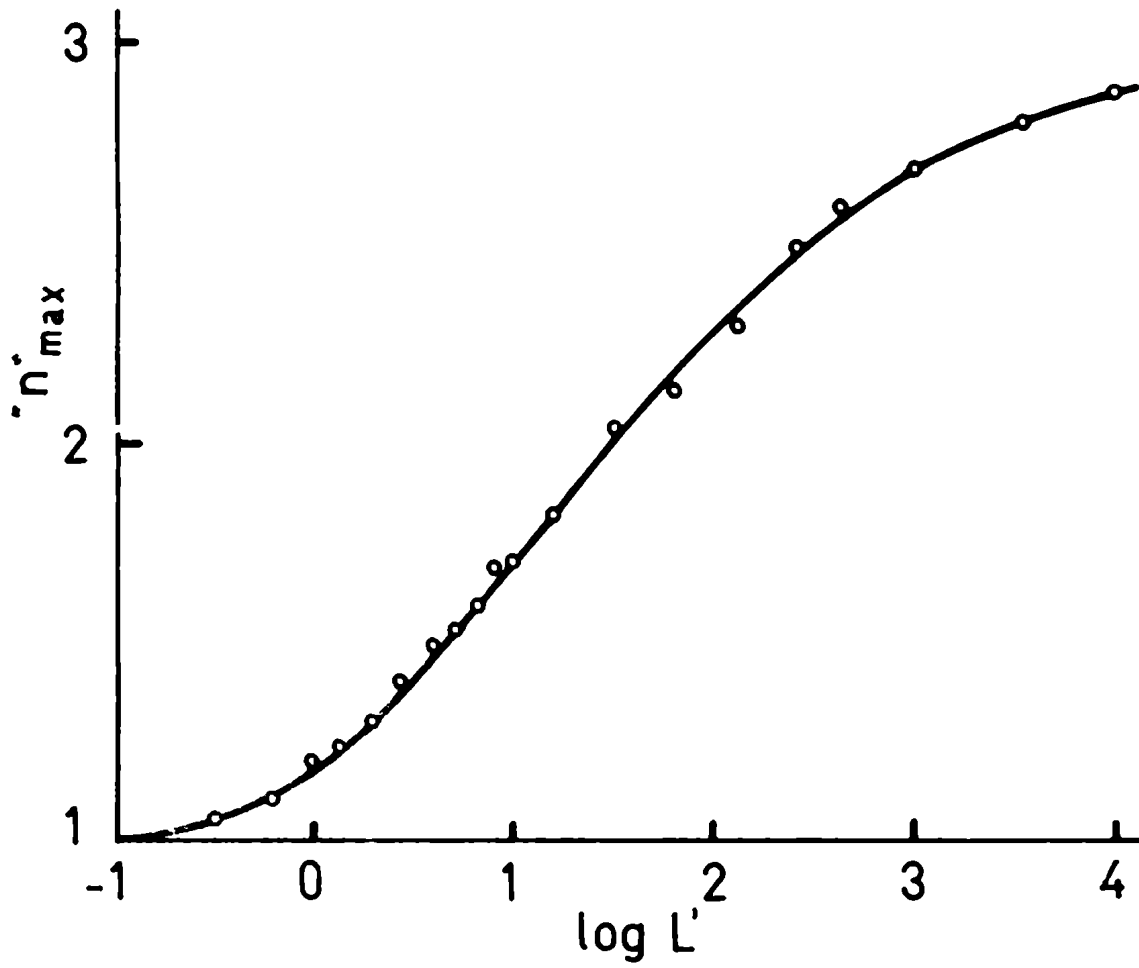


Fig. 14 : "n" de Hill en función de $\log L'$ para 3 subunidades según Rubin & Changeux (1966).

cambios en el coeficiente de Hill. Queda así de manifiesto que medir modificaciones de los parámetros alostéricos sería una manera muy sensible de detectar cambios conformacionales en la membrana.

DISCUSION

La membrana como "efector"

Racker acuñó el término "alotopía" para indicar las diferencias entre las propiedades de la ATPasa unida a membrana y soluble de mitocondrias (Racker, 1967). Este fenómeno parece ser común a todas las ATPasas bacterianas estudiadas hasta el presente: las propiedades en la membrana son distintas a las propiedades de la enzima soluble (Harold, Baarda, Baron & Abrams, 1969; Ishida & Mizushima, 1969; Muñoz, Salton, Ng & Schor, 1969; Evans Jr., 1970; Hachimori, Muramatsu & Nosoh, 1970; Mirsky & Barlow, 1971). El término se interpretó en esta tesis como modificaciones de la enzima mediadas por la matriz lipídica en la cual está inmersa. La influencia se manifiesta aquí sobre la propiedad que se ha registrado, la inhibición alostérica por Na^+ y, a diferencia de los otros casos, no implica un mero cambio de la propiedad entre la enzima soluble y la particulada sino que, a su vez, se demuestra que la propiedad es modulada de acuerdo a la conformación de la membrana que rodea a la enzima. Esta distinta influencia se manifiesta en forma análoga a la de un efector heterótopico: modifica la respuesta a otro efector, en este caso el Na^+ .

En un caso (36°C) estos efectos homotrópicos exhibidos por el sodio son aumentados por el "efector" membrana, llegando a valores de 2,3 en el caso de ácido linolénico. En cambio, a 19°C la estructura tiene un efecto inverso, su influencia hace disminuir la cooperatividad

que exhibe la enzima soluble (de 1,6 baja a 1,05 en el caso de una enzima proveniente de bacterias que crecieron con ácido oleico).

Una propiedad característica de las enzimas alostéricas es que su regulación es influenciada por una serie de factores: temperatura, pH, concentración, tratamientos con mercuriales, tratamiento con enzimas proteolíticas, diálisis, etc. (Gerhart & Pardee, 1963; Monod y col., 1965; Stadtman, 1966; Rozengurt, Jiménez de Asúa & Carminatti, 1969).

Cuando se mide el coeficiente de Hill de la (Ca^{++}) -ATPasa soluble de E. coli a $36^{\circ}C$, se obtienen valores de 1,2 y estos valores se incrementan a 1,6 cuando la temperatura se baja a $19^{\circ}C$. Comportamiento similar se ha observado en el caso de la fructosa-1-6-difosfatasa de hígado de trucha arco iris; el coeficiente de Hill para el sustrato aumentó de 1,72 a 4,6 en el pasaje de $25^{\circ}C$ a $0^{\circ}C$ (Behrisch y Hochachka, 1969).

Se sabe que en algunos casos, la temperatura provoca asociación o disociación de la enzima (Stadtman, 1966); la pérdida de interacciones traería como consecuencia la desaparición de los efectos homotrópicos y heterotrópicos (Monod y col., 1965). Así por ejemplo, la aspartato transcarbamilasa nativa presenta interacciones homotrópicas en la unión del sustrato (succinato) (Changeux & Gerhart, 1968); representando los datos de acuerdo a Hill, se obtiene una pendiente de 1,6 (Changeux & Rubin, 1968); en cambio cuando se tiene la unidad catalítica aislada se obtienen pendientes de valor 1 (Changeux & Gerhart

1969). En el caso de la glutamato dehidrogenasa de hígado bovino, Frieden & Colman (1967) demostraron que la enzima se asociaba para dar formas de peso molecular más elevado y eran éstas las responsables del efecto cooperativo (en este caso frente a GTP, un inhibidor). Una explicación plausible de nuestros resultados sería que la enzima se disocia a 36°C y se reasocia (con la correspondiente reaparición de los efectos cooperativos) a 19°C. La membrana (estructura) actuaría como factor asociante y se comportaría como un efector heterotrópico pues aumenta el efecto homotrópico del Na⁺.

Existiría la posibilidad de que fuese un componente específico lipídico de la membrana el responsable de la distinta respuesta al efector alostérico Na⁺; sin embargo, hay dos hechos que parecerían indicar lo contrario: las propiedades de la enzima solubilizada con detergentes, que podría contener fosfolípidos, son similares a las propiedades de la enzima solubilizada con bufferes, tratamiento que no solubilizaría lipoproteínas (Razin, 1972), y no son similares a las propiedades de la enzima en la membrana; además, la correlación encontrada entre la fluidez, que es una propiedad promedio de la membrana, y el comportamiento alostérico tendería a descartar la responsabilidad de un determinado fosfolípido.

Cunningham & Hager (1971a,b) encontraron que la activación de la piruvato oxidasa de E. coli era mayor con ácidos grasos insaturados de cadena larga y que la activación disminuía al disminuir la saturación o la longitud de la cadena y, utilizando distintos fosfolí-

pidos, que esta activación estaba asociada a la parte hidrocarbonada de la molécula. Por otra parte, el valor de "n" con respecto al cofactor TPP (Pirofosfato de tiamina), es de 2 cuando el fosfolípido está presente, contra un valor de 1 en ausencia del mismo. Los autores sugieren que los fosfolípidos de cadena larga tendrían un papel regulatorio: actuarían como efectores alostéricos.

Estos resultados corren paralelos a los presentados en esta tesis, en los cuales, evidentemente, la cadena hidrocarbonada es la responsable del distinto efecto heterotrópico de la membrana.

Una explicación posible del efecto de la membrana podría basarse en la localización de la enzima. Si la (Ca^{++}) -ATPasa estuviera parcialmente sumergida en la bicapa de fosfolípidos, "anclada" por cationes divalentes, implicaría que una parte de la molécula podría interactuar con los fosfolípidos (con las cadenas hidrocarbonadas de los mismos) y esta interacción sería distinta según éstos se encuentren más o menos empaquetados. Cuando aumenta la insaturación, el empaquetamiento sería más laxo y permitiría que la interacción entre los protómeros aumentara, dando como resultado un aumento de la cooperatividad del efector Na^{+} ; por el contrario, si la estructura se hace más rígida (aumentando la saturación, disminuyendo la temperatura), la interacción se hace menor, puesto que ciertos reordenamientos estarían impedidos. Cuando se solubiliza mediante el uso de detergentes la acetilcolinesterasa de eritrocito de rata, una lipoproteína (Morero, 1973), da valores del coeficiente de Hill correspon-

dientes a la máxima cooperatividad, similares a los encontrados en membrana más fluida (Morero y col., 1972). Este comportamiento no aparece con la (Ca⁺⁺)-ATPasa de E. coli; la solubilización, que permitiría la mayor interacción entre los protómeros, lleva a valores relativamente bajos (1,1 a 36°C y 1,7 a 19°C).

Este fenómeno podría racionalizarse pensando que al eliminar los cationes divalentes, la enzima pasa a solución; este paso podría llevar a una reordenación de la cadena peptídica, que antes estaba en un medio hidrofóbico, a la conformación de menor energía en solución, con la mayor cantidad posible de residuos de aminoácidos hidrofílicos hacia el exterior. Así se haría más estable energéticamente en solución pero se restringiría, en la nueva conformación, la capacidad de interacción del Na⁺. Para la máxima interacción se necesitaría la "coerción" de la membrana. En el caso de la acetilcolinesterasa no ocurriría esto pues al ser lipoproteica por naturaleza, los agregados en "solución" serían más similares a los que se podrían encontrar en la membrana intacta.

Mediante microscopía electrónica de los planos de clivaje de membranas de Acholeplasma laidlawii enriquecidas en distintos ácidos, se observó que aparecían agregados de partículas al aumentar la insaturación del ácido; de superficies suaves visibles en células enriquecidas con estearato se pasaban a superficies que mostraban una fuerte agregación en células enriquecidas con linoleato (James & Branton, 1971). Se ampliaron luego estos resultados utilizando otros

ácidos: mirístico, estearólico, eláidico y eicosenoico (20:1 cis) y se observó que los tres primeros suplementos provocan la aparición de agregados en las superficies de fractura, mientras que las membranas enriquecidas con eicosenoico presentan superficies lisas. La interpretación dada es que alteraciones locales de la fluidez y la naturaleza del grupo alquilo producirían alteraciones en la organización total de la membrana (James, Keith & Branton, 1972). Los resultados presentados en esta tesis convalidarían una hipótesis semejante.

Efecto de la eliminación de glucosa del medio de cultivo

El aumento de la cantidad de insaturado incorporado cuando se suprime la glucosa del medio es difícil de explicar. Marr & Ingraham (1962) habían notado que cuando E. coli crecía en un quemios-tato con 0,05% de glucosa, el contenido de ácidos grasos insaturados era ligeramente mayor que cuando se cultivaba en lotes con 0,2% de glucosa en el medio; como hay tantas diferencias entre un tipo de cultivo y otro es difícil darle significación. Wisnieski & Kiyomoto (1972), trabajando con mutantes similares de levadura, observaron que cultivando a 30°C, la incorporación de ácido estearólico aumentaba de un 8,7% en un medio complejo con glucosa a 55,9% en un medio con lactato.

Una explicación posible para este hecho podría ser que la glucosa actuara directamente sobre las enzimas de acilación, cuya regulación está poco estudiada.

Otra posibilidad, quizás la más probable, podría basarse en el hecho de que la presencia de glucosa reprime no sólo las enzimas de β -oxidación sino también el transporte de ácidos grasos a través

de la membrana (Klein, Steinberg, Fiethen & Overath, 1971). Esta disminución de la captación influiría sobre la acilación de los fosfolípidos pues no habría bastante sustrato "insaturado" acumulado. Hay que considerar que las concentraciones usadas como suplemento son de $\approx 10 \mu\text{M}$ y que el valor de K_m para el transporte de oleato es de $15 \mu\text{M}$ (Klein y col., 1971), mientras que el K_m de la enzima activante (acil-CoA sintetasa) es un orden de magnitud mayor, de $\approx 0,5 \text{ mM}$, razón por la cual el transporte pasivo no sería suficiente.

Otro hecho muy importante de recalcar surge de comparar las dos composiciones lipídicas con y sin glucosa: cuando aparece mayor cantidad del ácido insaturado, aparece una proporcional disminución de ácido mirístico; este ácido se comporta en monocapa como si fuera monoinsaturado (Demel, van Deenen & Pethica, 1967). Esfahani y col. (Esfahani, Barnes Jr. & Wakil, 1969; Esfahani, Ioneda & Wakil, 1971) sugirieron que hay un sistema de regulación tal que mantiene las propiedades fisicoquímicas dentro de límites estrechos. Es evidente, observando la correlación y específicamente los dos casos en los cuales se suprimió la glucosa, que esta compensación no lleva a los mismos valores del coeficiente de Hill, por lo que se puede pensar o que la compensación no alcanza a todas las funciones o que esta compensación mirístico \rightleftharpoons insaturado es sólo una consecuencia de algún otro tipo de control.

Dependencia de la actividad enzimática con la temperatura

Existe bastante confusión en la literatura en cuanto a la

interpretación de los gráficos de Arrhenius cuando presentan formas distintas a la lineal. La presencia de puntos de inflexión se interpretó (Dixon & Webb, 1964) como:

- a) reacciones en dos pasos, con distintos coeficientes térmicos;
- b) inactivación reversible de la enzima;
- c) cambios conformacionales de la proteína que modifican el centro activo o sus alrededores, resultando distintas energías de activación antes y después de la inflexión.

La tercera hipótesis resultó ser aparentemente la más correcta o por lo menos la de más amplia aplicación, puesto que si bien en un principio no era fácil medir "cambios conformacionales", a partir de los trabajos de Massey y col. (1966), hay más y más evidencia fisicoquímica de que estos cambios conformacionales ocurren. Más recientemente, el grupo de Radda (1971) demostró para la fosforilasa b, que el cambio conformacional que se había postulado en base a una discontinuidad en la dependencia de la velocidad de reacción con la temperatura (Graves, Sealock & Wang, 1965) se correspondía perfectamente con cambios de reactividad de tres grupos tioles y con datos de relajación protónica, lo cual confirmó la existencia de un equilibrio conformacional dependiente de temperatura.

La influencia de las transiciones de fase de los lípidos sobre actividades asociadas a membrana de auxótrofos de E. coli ya ha sido tratada en la Introducción. Se habían descrito curvas de Arrhenius bifásicas con puntos de inflexión característicos de acuerdo al

suplemento utilizado para la toma de tiometil- β -galactósido (Schairer y col., 1969); el transporte de o-nitrofenil- β -galactósido y p-nitrofenil- β -glucósido (Wilson y col., 1970); el eflujo de tiometil- β -galactósido, las velocidades relativas de respiración y de crecimiento (Overath y col., 1970); la toma de prolina y la actividad de succínico dehidrogenasa (Esfahani y col., 1971b). Así se generalizó la idea de que quebraduras en los gráficos de Arrhenius indicaban influencia de los lípidos sobre la función. Este concepto fue incluso arriesgadamente extrapolado al punto de inferir (Davies & Bragg, 1972) que la linealidad perfecta indicaba falta de influencia de los lípidos como si la presencia de una quebradura no pudiera deberse a la proteína misma (Zeylemaker, Jansen, Veeger & Slater, 1971).

Los gráficos de Arrhenius de la succínico dehidrogenasa de mitocondrias de hígado de rata y de batata presentaban discontinuidades que coincidían con cambios de fase de los lípidos de la membrana determinados por experimentos de "spin label" (Raison, Lyons & Thompson, 1971; Raison, Lyons, Mehlhorn & Keith, 1971). Cuando las membranas se trataban con detergente, desintegrando la estructura, las discontinuidades en los gráficos de Arrhenius desaparecían. Un efecto similar ha sido descrito por Esfahani, Crowfoot & Wakil (1972) para la actividad de succínico dehidrogenasa asociada a membrana (medida por reducción del diclorindofenol). Al deslipidizar la membrana con acetona acuosa, la actividad remanente no presentaba ninguna discontinuidad en los gráficos de Arrhenius; las discontinuidades aparecían en la enzima

unida a membrana nativa y en la enzima a la cual se volvían a agregar los lípidos; esto indicaría que la enzima (proteína) de por sí no presentaba ninguna alteración con la temperatura y que la quebradura en estado particulado sería reflejo del cambio de fase de los lípidos. En nuestro caso ocurre un fenómeno inverso: la discontinuidad ocurre también en el caso de la enzima soluble y sin embargo los cambios de fase de los lípidos no son detectados. Esto podría interpretarse como que los lípidos no tendrían influencia sobre la enzima; sin embargo, el comportamiento alostérico sí estaba alterado y, como vimos, aumentaba la interacción a medida que aumentaba la insaturación.

El hecho de que los gráficos de Arrhenius no reflejaran la influencia por parte del medio ambiente lipídico y que esta influencia sí se pusiera de manifiesto estudiando el comportamiento alostérico, podría interpretarse a la luz del modelo de Singer y col. (1972), teniendo en cuenta la posible ubicación de la proteína en la membrana. Aquí, nos encontraríamos frente a una proteína "periférica", en cuyo caso las interacciones con la capa lipídica serían relativamente débiles, aunque suficientes para provocar cambios en las transiciones alostéricas, pero no lo bastante fuertes como para producir cambios apreciables que actuaran a nivel del centro activo. La hipótesis de que se trataría de una proteína periférica se basa en el hecho de que la enzima es fácilmente separable de la membrana por buffers de baja fuerza iónica, libres de metales divalentes.

Una circunstancia más en apoyo de nuestra teoría sería que

prácticamente todas las funciones que reflejaban en los gráficos de Arrhenius modificaciones de la fase lipídica eran funciones que están asociadas fuertemente a la membrana, como son las funciones de transporte (Schairer y col., 1969; Wilson y col., 1970; Overath y col., 1970; Esfahani y col., 1971b).

Cuando se trabajó con p-nitrofenil fosfatasa de eritrocitos de rata (Goldemberg, 1971; Goldemberg, Farías & Trucco, 1972), que se comporta como una proteína "integral", la influencia de la composición lipídica se puso de manifiesto con los dos métodos, ya sea estudiando el comportamiento alostérico como la dependencia de la velocidad de reacción con la temperatura. De los cálculos de energía libre de interacción se puede deducir que cuando el valor de esta energía de interacción sobrepasa de un cierto nivel, provocaría cambios tanto en las transiciones alostéricas como en la dependencia con la temperatura.

Estudios realizados con glucosa-6-fosfatasa microsomal coinciden en sugerir que diferencias en la actividad de la enzima podrían deberse a distintas conformaciones de la misma mediadas por la membrana (Zakim, 1970; Stetten & Ghosh, 1971; Grinna & Barber, 1972). En ATPasa de Micrococcus lysodeikticus se encontraron distintos "estados" de la ATPasa unida a membrana según el método utilizado para la preparación de la misma, especialmente en cuanto a las concentraciones de Mg⁺⁺ usadas en los lavados, y se sugirió que se corresponderían con distintos estados conformacionales de la membrana (Lastras & Muñoz,

1972). Un efecto relacionado del Mg^{++} ha sido descrito en la reconstrucción del sistema galactosiltransferasa en Salmonella (Romeo y col., 1970b), en el cual el catión divalente era esencial para la interacción del lipopolisacárido con la fosfatidiletanolamina. Los autores explicaron este fenómeno sugiriendo que el catión divalente induciría cambios conformacionales sobre los componentes de la película monomolecular (fosfolípido).

El hecho de que la enzima sufra modificaciones conformacionales que se traducen en el distinto comportamiento alostérico como consecuencia de cambios en el medio ambiente lipídico, lleva a pensar que esta propiedad podría ser utilizada para detectar cambios conformacionales concertados de la membrana inmediatamente en contacto. A este fin se plantea la posibilidad de utilizar una serie de enzimas alostéricas adecuadas a cada caso en particular, que podrían detectar cambios conformacionales de la membrana asociada como respuesta a diversos estímulos: colicinas, ciertos antibióticos, iones, etc.

APENDICE

a) Cálculo de promedios y errores standard de los promedios.

La fórmula utilizada para la computación es:

$$ES = \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N(N-1)} - \frac{\bar{x}^2}{N-1}}$$

derivada de la fórmula $ES = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$ (1)

Se utilizó un programa básico confeccionado por V. Eterovic (1971) con ligeras modificaciones.

b) Cálculo del t de Student entre dos series de valores independientes a partir de los promedios y los errores standard de las series que se comparan.

Se utilizó la fórmula:

$$t = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 / \sigma \sqrt{1/N_1 + 1/N_2} \quad (2)$$

donde $\sigma = \sqrt{\frac{N_1 (N_1 - 1) (ES_1)^2 + N_2 (N_2 - 1) (ES_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}}$

\bar{x}_i = promedios de cada serie.

N_i = número de valores de cada serie.

ES_i = errores standard de cada serie.

c) Cálculo del coeficiente de correlación r y de los parámetros de la recta de regresión $y = \underline{a} + \underline{b}x$.

Se utilizarán las siguientes fórmulas:

$$r = \frac{N\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{\sqrt{N\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 \{N\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2\}}} \quad (3)$$

$$b = \frac{N\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{N\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} \quad (4)$$

$$a = \frac{\Sigma y - b\Sigma x}{N} \quad (5)$$

d) Cálculo del t de Student para la recta de regresión a partir de r .

$$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (6)$$

Los programas para b) y d) están combinados en uno solo.

e) Cálculo de la intersección de los gráficos de Arrhenius.

$$x_i = \frac{a_2 - a_1}{b_1 - b_2}$$

a_i = ordenada al origen de cada recta.

b_i = pendiente de las rectas.

f) Cálculo de "n" de Hill en función de L'.

Se utilizó la fórmula:

$$\frac{y_s}{1-y_s}$$

$$\text{donde } y_s = \frac{\alpha (1 + \alpha)^2}{(1 + \alpha)^3 + L'} \quad (\text{Monod y col., 1965})$$

El programa nos da automáticamente los valores de $y_s/1-y_s$ en función de α donde $\alpha = 0,5, 1, 2, \dots, 512$ para cada valor de L' ; $L' = 1, 2, \dots, 1024$.

Modificando la primera entrada (al registro C) se pueden variar en otros rangos los valores de α y L' . De las curvas obtenidas al representar se toman las pendientes máximas que corresponden a $"n"_{\max}$ y se representan estos valores en función de L' (Fig. 14).

NOTA: Las fórmulas (1), (2), (3), (4) y (5) se obtuvieron de Bancroft (1960). La fórmula (6) se obtuvo de Mather (1947).



Servicio		Fecha		Código		Cant. Instrucciones		Tarjetas	
T DE STUDENT		mes	año					7	1
INSTRUCCIONES DE PROGRAMA									
CONTENIDO REGISTROS									
REG. 1	REG. 2	REG. 3	REG. 4	REG. 5	REG. 6	REG. 7	REG. 8	REG. 9	REG. 10
1	A V	28 B ↓	49	V	73			97	
2	S	29 C +	50	A W	74			98	
3	↓	27 E -	51	S	75			99	
4	B ↑	28	-	↓	76			100	
5	E -	29 B / ↓	53	E -	77			101	
6	B X	30 B / %	54	-	78			102	
7	B / ↓	31 A √	55	A √	79			103	
8	S	32 B / ↓	56	C ↓	80			104	
9	↓	33 B ↓	57	S	81			105	
10	X	34 C X	58	C / ↑	82			106	
11	B / X	35 C / ↓	59	↓	83			107	
12	B / ↓	36 B ↓	60	X	84			108	
13	S	37 C +	61	D ↓	85			109	
14	C ↑	38 C / %	62	E ↓	86			110	
15	↓	39 A √	63	D -	87			111	
16	E -	40 B / X	64	A √	88			112	
17	C X	41 B / ↓	65	B ↓	89			113	
18	C / ↓	42 S	66	C / ↓	90			114	
19	S	43 ↓	67	C X	91			115	
20	↓	44 S	68	B %	92			116	
21	X	45 -	69	A ∅	93			117	
22	C / X	46 B / %	70	/ ∅	94			118	
23	B / +	47 A ∅	71	W	95			119	
24	B / ↓	48 / ∅	72		96			120	
REG. 1	REG. 2	REG. 3/	REG. 4/	REG. 5/	REG. 6/	F			
CONSTANTES EN LA TARJETA					CONSTANTES EN LA TARJETA				
			1	E	↑				↑
					↑				↑
					↑				↑



Servicio		COEFICIENTE DE CORRLLACION				Fecha		Código		Cont. Instrucciones		Tarjetas				
						mes	año			7 2		Cont.	Nº			
INSTRUCCIONES DE PROGRAMA												CONTENIDO REGISTROS				
REG. 1			REG. 2			REG. 3			REG. 4			REG. 5				
1	A	V	25	D	↓	48	E	-	73			87			M	
2	B	*	26	C	↓	49	E	↓	74			88				
3	B	/	27		X	51	D	↓	75			89			A	
4	C	/	28	C	↑	52	D	X	76			100				
5	D	*	29		↓	53	B	/	↓	77		101			R	
6	D	/	30		X	54	C	/	↓	78		102				
7	E	*	31	D	/	+	55	D	/	X	79		103		b/	$\sum x^2$
8	A	W	32	D	/	↓	56	B	/	-	80		104		B	$\sum x$
9		S	33	E		↓	57	E	/	X	81		105			
10	C	↑	34	C		+	58	A		∩	82		106			
11		↓	35	E		↓	59	B	/	↓	83		107		c/	
12	A	%	36			W	60	E		↓	84		108			
13	C	/	37	A		Z	61	B	/	%	85		109		C	
14	C	/	38	B		↓	62	A		0	86		110			
15	B		39	B		X	63	E		↓	87		111		d/	$\sum y^2$
16	C		40	E	/	↓	64	E	/	%	88		112			
17	B		41	B	/	↓	65	A	/	0	89		113		D	$\sum y$
18			42	C	/	X	66	B		X	90		114			
19		X	43	E	/	-	67	B		↓	91		115		e/	
20	B	/	44	E	/	↓	68	D		↓	92		116			
21	B	/	45	B		↓	69	B		-	93		117		E	$\sum xy$
22		S	46	D		X	70	C	/	%	94		118			
23	D		47	E		↓	71	A		0	95		119		f/	
24			48	C	/	X	72			V	96		120			
REG. 1			REG. 2			REG. 3			REG. 4			REG. 5			F	
CONSTANTES EN LA TARJETA						CONSTANTES EN LA TARJETA										



Servicio		Fecha		Código	Cont. Instrucciones	Tarjetas						
Y _c / 1-Y _c		mes	año			Cont.	Nº					
		11	77			17						
INSTRUCCIONES DE PROGRAMA							CONTENIDO REGISTROS					
REG. 1		REG. 2		REG. 7		REG. 8		REG. 9				
1	A	V	25	C / +	49	C / ↓	73		97		M	
2		S	26	D / ↓	50	A / %	74		98			
3	C	↑	27	D / ↓	51		↓	75		99	A	
4		↓	28	A / X	52	E / ↓	76		100			
5	A	%	29	C / X	53		-	77		101	R	
6	D	↑	30	B / ↓	54	E / ↓	↓	78		102		
7	A /	↑	31	D / ↓	55	E / ↓	↓	79		103	b/	
8	R /	↓	32	A / X	56		/ W	80		104		
9	D	↓	33	D / X	57	D / ↓	↓	81		105	B	
10	E	↑	34	D / +	58	D / +	+	82		106		
11		S	35		↓	59	D / ↓	↓	83		107	c/
12	A /	V	36	B / ↓	60	A / %	%	84		108	α	
13	A /	↑	37		%	61		↓	85		109	c
14	D /	X	38	B / ↓	↓	62	E / ↓	↓	86		110	0,5
15	E /	↑	39		↓	63		-	87		111	d/
16	C /	↓	40	A / %	64	E / ↓	↓	88		112	1+α	
17	C /	↓	41	B / -	65	E / ↓	↓	89		113	D	
18		/ O	42		↓	66		/ V	90		114	L
19	D /	O	43	B / ↓	67	A / V	V	91		115	e/	
20		/ O	44		%	68			92		116	
21	A /	W	45	A / O	69				93		117	E
22	C /	O	46		/ O	70			94		118	
23	C /	↓	47	C / ↓	71				95		119	f/
24	A /	%	48	C / +	72				96		120	
REG. 1		REG. 2		REG. 7/		REG. 8/		REG. 9/		F		
CONSTANTES EN LA TARJETA				CONSTANTES EN LA TARJETA								
								↑				
								↑				
								↑				

BIBLIOGRAFIA

- ABRAMS, A., J. Biol. Chem. 240, 3675 (1965).
- ATKINSON, D.E., HATHAWAY, J.A. & SMITH, E.C., J. Biol. Chem. 240, 2682 (1965).
- AUBORN, J.J., EYRING, E.M. & LEW CHOULES, G., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1996 (1971).
- AZZI, A. & SANTATO, M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 211 (1971).
- BANCROFT, H., Introducción a la Bioestadística, Ed. EUDEBA, Buenos Aires (1960).
- BEHRISCH, H.W. & HOCHACHKA, P.W., Biochem. J. 111, 287 (1969).
- BLOJ, B., MORERO, R.D., FARIAS, R.N. & TRUCCO, R.E., Biochim. Biophys. Acta, En prensa (1973).
- BUTLER, T.F., SMITH, G.L. & GRULA, E.A., Can. J. Microbiol. 13, 1471 (1967).
- CAPALDI, R.A. & GREEN, D.E., FEBS Letters 25, 205 (1972).
- CHANCE, B., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 560 (1970).
- CHANGEUX, J.-P. & GERHART, J.C., The Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interactions, p. 13. Universitetsforlaget, Oslo (1968).
- CHANGEUX, J.-P. & RUBIN, M.M., Biochemistry 7, 553 (1968).
- CRONAN Jr., J.E. & VAGELOS, P.R., Biochim. Biophys. Acta 265, 25 (1972).
- CUNNINGHAM, C.C. & HAGER, L.P., J. Biol. Chem. 246, 1575 y 246, 1583 (1971a,b).
- DAVIES, P.L. & BRAGG, P.D., Biochim. Biophys. Acta 266, 273 (1972).
- DEMEL, R.A., VAN DEENEN, L.L.M. & PETHICA, B.A., Biochim. Biophys. Acta 135, 11 (1967).

- DEMEL, R.A., GEURTS VAN KESSEL, W.S.M. & VAN DEENEN, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta* 266, 26 (1972).
- DIXON, M. & WEBB, E.C., *Enzymes*, 2nd ed. p. 157. Longmans Green, London. (1964).
- ENGELMAN, D.H., *J. Mol. Biol.* 47, 115 (1970).
- ENGELMAN, D.M., *J. Mol. Biol.* 58, 153 (1971).
- ESFAHANI, M., BARNES Jr., E.M. & WAKIL, S.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 64, 1057 (1969).
- ESFAHANI, M., IONEDA, T. & WAKIL, S.J., *J. Biol. Chem.* 246, 50 (1971a).
- ESFAHANI, M., LIMBRICK, A.R., KNUTTON, S., OKA, T. & WAKIL, S.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 3180 (1971b).
- ESFAHANI, M., CROWFOOT, P.D. & WAKIL, S.J., *J. Biol. Chem.* 247, 7251 (1972).
- ETEROVIC, V., Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (1971).
- EVANS Jr., D.J., *J. Bacteriol.* 100, 914 (1969).
- EVANS Jr., D.J., *J. Bacteriol.* 104, 1203 (1970).
- FARIAS, R., GOLDEMBERG, A.L. & TRUCCO, R.E., *Life Sci.* 7, 1177 (1968).
- FARIAS, R., GOLDEMBERG, A.L. & TRUCCO, R.E., *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 38 (1970).
- FARIAS, R., LONDERO, L. & TRUCCO, R.E., *J. Bacteriol.* 109, 471 (1972).
- FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y., *J. Biol. Chem.* 66, 375 (1925).
- FOLCH, V., LEES, M. & SLOANE-STANLEY, G.H., *J. Biol. Chem.* 226, 497 (1957).
- FOX, F.C., LAW, J.H., TSUKAGOSHI, N & WILSON, G., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 67, 598 (1970).

- FRIEDEN, C. & COLMAN, R., J. Biol. Chem. 242, 1705 (1967).
- GERHART, J.C. & PARDEE, A.B., Cold Spri. Harb. Symp. Quant. Biol. 28, 491 (1963).
- GLASER, M., SIMPKINS, H. SINGER, S.J., SCHEETZ, M. & CHAN, S.I., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 65, 721 (1970).
- GOLDEMBERG, A.L., Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (1971).
- GOLDEMBERG, A.L., FARIAS, R. & TRUCCO, R.E., J. Biol. Chem. 247, 4299 (1972).
- GOLDEMBERG, A.L., FARIAS, R. & TRUCCO, R.E., Biochim. Biophys. Acta 291, 489 (1973).
- GRAVES, D.J., SEALOCK, R.W. & WANG, J.H., Biochemistry 4, 290 (1965).
- GREEN, D.E., ALLMAN, D.W., BACHMANN, E., BAUM, H., KOPACZYK, K., KORMAN, E.F., LIPTON, S., MACLENNAN, D.H., McCONNELL, D.G., PERDUE, J.F., RIESKE, J.S. & TZAGOLOFF, A., Arch. Biochem. Biophys, 119, 312 (1967).
- GREEN, D.E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 615 (1970).
- GREEN, N.M., Biochem. J. 122, 37 (1971).
- GRINNA, L.S. & BARBER, A.A., Biochim. Biophys. Acta 288, 347 (1972).
- HACHIMORI, A., MURAMATSU, N. & NOSOH, Y., Biochim. Biophys. Acta 206, 426 (1970).
- HAROLD, F.M., BAARDA, J.R., BARON, C. & ABRAMS, A., J. Biol. Chem. 244, 2261 (1969).
- HENNING, U., DENNERT, G., REHN, K. & DEPPE, G., J. Bacteriol. 98, 784 (1969).
- HSIA, J.C., WONG, P.T.S. & MACLENNAN, D.H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 88 (1971).

- ISHIDA, M. & MIZUSHIMA, S., *J. Biochem.* 66, 33 (1969).
- JAMES, R. & BRANTON, D., *Biochim. Biophys. Acta* 233, 504 (1971)
- JAMES, R., KEITH, A. & BRANTON, D., Abstracts of the 12th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 246 (1972)
- KAHANE, I. & RAZIN, S., *Biochim. Biophys. Acta* 249, 159 (1971).
- KASS, L.R., *J. Biol. Chem.* 243, 3223 (1968).
- KLEIN, K., STEINBERG, R., FIETHEN, B. & OVERATH, P., *Eur. J. Biochem.* 19, 442 (1971).
- KOSHLAND, D.E., Jr. & NEET, K.E., *Ann. Rev. Biochem.* 37, 359 (1968).
- KROES, J., OSTWALD, R. & KEITH, A., *Biochim. Biophys. Acta* 274, 71 (1972).
- LADBROOKE, B.D., WILLIAMS, R.M. & CHAPMAN, D., *Biochim. Biophys. Acta* 150, 333 (1968).
- LASTRAS, M. & MUÑOZ, E., *FEBS Letters* 21, 109 (1972).
- LAW, J.H., *Bacteriol. Proc.* 129 (1961).
- LENNOX, E.S., *Virology* 1, 190 (1955).
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J., *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- MACELHANEY, R.N. & TOURTELLOTTE, M.E., *Biochim. Biophys. Acta* 202, 120 (1970).
- MARR, A.G. & INGRAHAM, J.L., *J. Bacteriol.* 84, 1260 (1962).
- MARTINEZ, R.J. & ROSENBERG, E., *J. Mol. Biol.* 8, 702 (1964).
- MASSEY, V., CURTI, B. & GANTHER, H., *J. Biol. Chem.* 241, 2347 (1966).
- MATHER, K., *Statistical Analysis in Biology*, p. 164. Interscience Publishers Inc., New York (1947).

- MAVIS, R.D., BELL, R.M. & VAGELOS, P.R., J. Biol. Chem. 247, 2835 (1972).
- MIRSKY, R. & BARLOW, V., Biochim. Biophys. Acta 241, 835 (1971).
- MONOD, J., CHANGEUX, J.-P. & JACOB, F., J. Mol. Biol. 6, 306 (1963).
- MONOD, J., WYMAN, J. & CHANGEUX, J.-P., J. Mol. Biol. 12, 88 (1965).
- MORERO, R.D., BLOJ, B., FARIAS, R.N. & TRUCCO, R.E., Biochim. Biophys. Acta 282, 157 (1972).
- MORERO, R.D., Tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucumán (1973).
- MUÑOZ, E., SALTON, M.R.J., NG, M.H. & SCHOR, M.T., Eur. J. Biochem. 7, 490 (1969).
- OETTE, K. & DOSS, M., J. of Chrom. 32, 439 (1968).
- OLDFIELD, E. & CHAPMAN, D., FEBS Letters 23, 285 (1972).
- OVERATH, P., SCHAIRER, H.U. & STOFFEL, W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 606 (1970).
- OVERATH, P., HILL, F.F. & LAMNEK-HIRSCH, I., Nat. New Biolog. 23, 264 (1971).
- RADDA, G.K., Biochem. J. 122, 385 (1971).
- RAISON, J.K., LYONS, J.M., Mehlhorn, R.S. & KEITH, A.D., J. Biol. Chem. 246, 4036 (1971).
- RAISON, J.K., LYONS, J.M. & THOMPSON, W.W., Arch. Biochem. Biophys. 142 83 (1971).
- RAKER, E., Fed. Proc. 26, 1335 (1967).
- RAZIN, S., MOROWITZ, H.J. & TERRY, T.M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 219 (1965).
- RAZIN, S., Biochim. Biophys. Acta 265, 241 (1972).
- ROMEO, D., HINCKLEY, A. & ROTHFIELD, L., J. Mol. Biol. 53, 491 (1970a).

- ROMEO, D., GIRARD, A. & ROTHFIELD, L., J. Mol. Biol. 53, 475 (1970b).
- ROTHFIELD, L. & FINKELSTEIN, A., Ann. Rev. Biochem. 37, 463 (1968).
- ROTTEM, S., STEIN, O. & RAZIN, S., Arch. Biochem. Biophys. 125, 46 (1968).
- ROZENGURT, E., JIMENEZ de ASUA, L. & CARMINATTI, H., J. Biol. Chem. 244, 3142 (1969).
- RUBIN, M.M. & CHANGEUX, J.-P., J. Mol. Biol. 21, 265 (1966).
- SANDERMANN Jr., H., FEBS Letters 21, 254 (1972).
- SCHAIRER, H.U. & OVERATH, P., J. Mol. Biol. 44, 209 (1969).
- SILBERT, D.F. & VAGELOS, P.R., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58, 1579 (1967).
- SILBERT, D.F., RUCH, F. & VAGELOS, P.R., J. Bacteriol. 95, 1658 (1968).
- SINGER, S.J. & NICOLSON, G.L., Science 175, 720 (1972).
- STADTMAN, E.R., Allosteric Regulation of Enzyme Activity, en Advances in Enzymology, Vol. 28, p. 41. Interscience, F.F. Nord, Ed., New York (1966).
- STEIM, J.M., TOURTELLOTTE, M.E., REINERT, J.C., MACELHANEY, R.N. & RADER, R.L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 63, 104 (1969).
- STETTEN, M.R. & GHOSH, S.B., Biochim. Biophys. Acta 233, 163 (1971).
- TANFORD, C., Advan. Protein Chem. 23, 121 (1968).
- TSONG, T.Y., HEARN, R.P., WRATHALL, D.P. & STURTEVANT, J.M., Biochemistry 9, 2666 (1970).
- UEDA, I. & WADA, T., Anal Biochem. 37, 169 (1970).
- WAGGONER, A.S. & STRYER, L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 579 (1970).
- WEBER, G., Biochemistry 11, 864 (1972).

- WEEKS, G., SHAPIRO, M., BURNS, R.O. & WAKIL, S.J., J. Bacteriol. 97, 827 (1969).
- WHITE, D.A., LENNARZ, W.J. & SCHNAITMAN, C.A., J. Bacteriol. 109, 686 (1972).
- WILSON, G., ROSE, S.P. & FOX, C.F., Biochem Biophys. Res. Commun. 38, 617 (1970).
- WILSON, G. & FOX, C.F., J. Mol. Biol. 55, 49 (1971).
- WISNIESKI, B.J. & KIYOMOTO, R.K., J. Bacteriol. 109, 186 (1972).
- WYMAN, J., Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 28, 483 (1963).
- ZAKIM, D., J. Biol. Chem. 245, 4953 (1970).
- ZEYLEMAKER, W.P., JANSEN, H., VEEGER, C. & SLATER, E.C., Biochim. Biophys. Acta 242, 14 (1971).

Aliment

W. Bruce