

## Tesis de Posgrado

# Estudio de la actividad de alfa-glucan fosforilasa de tubérculo de papa independiente de aceptor agregado

Sivak, Mirta Noemí

1980

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Sivak, Mirta Noemí. (1980). Estudio de la actividad de alfa-glucan fosforilasa de tubérculo de papa independiente de aceptor agregado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1640\\_Sivak.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1640_Sivak.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Sivak, Mirta Noemí. "Estudio de la actividad de alfa-glucan fosforilasa de tubérculo de papa independiente de aceptor agregado". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1640\\_Sivak.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1640_Sivak.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE  
 $\alpha$ -GLUCAN FOSFORILASA DE TUBERCULO DE PAPA  
INDEPENDIENTE DE ACEPTOR AGREGADO

AUTOR: MIRTA NOEMI SIVAK

DIRECTOR: DRA. JUANA SARA TANDECARZ

LUGAR DE TRABAJO: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS  
"FUNDACION CAMPOMAR"

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1980

1640  
Ej-2

A Silyo

A Jonatan y Luciana

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Juana S. Tandecarz, por su inteligente dirección de esta investigación, interés crítico en mi trabajo y, muy especialmente, por su afectuoso apoyo.

Al Dr. Carlos E. Cardini, por sus invaluable consejos y sugerencias. El posibilitó mi ingreso al Instituto de Investigaciones Bioquímicas y en el seno de su equipo de trabajo descubrí el placer de la investigación científica.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme brindado apoyo material durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Luis F. Leloir y a mis compañeros y amigos del Instituto de Investigaciones Bioquímicas, por su colaboración y críticas.

A la Sra. Renata D. de Lobpreis, por la transcripción de este trabajo.

A la Sra. Soledad de Giménez, por su abnegada colaboración.

INDICE	página
ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCION.....	2
El almidón.....	2
Los plástidos.....	2
Estructura del grano de almidón.....	6
Formación del grano de almidón.....	7
Enzimas que intervienen en la biosíntesis del almidón.....	7
Fosforilasa.....	9
Papel de la fosforilasa en la formación de aceptores glucosídicos.....	12
Papel de otras enzimas en la formación de aceptores glucosídicos.....	14
Objetivos de esta investigación.....	14
MATERIALES Y METODOS.....	17
Reactivos y enzimas.....	17
Preparación de fosforilasa de tubérculo de papa.....	17
Sobrenadante de 140.000 x g.....	17
Aislamiento de isoenzimas de fosforilasa por cromatografía en columna de DEAE-celulosa.....	18
Preparación de fosforilasa de amiloplastos aislados de tubérculo de papa.....	19
Ensayo de actividad de fosforilasa y otras enzimas.....	20
Actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno.....	20
Actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno.....	20
Otras actividades enzimáticas.....	22
Filtración en gel.....	23
Cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A- Sepharaosa.....	23
Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.....	24
Localización de actividad enzimática.....	24
Coloración directa con reactivo de iodo.....	25
Coloración de proteínas.....	25
Extracción de la enzima del gel.....	26
Determinación de los pesos moleculares.....	26
Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea.....	27
Ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa.....	28
Tratamiento de la enzima con amiloglucosidasa.....	29

Caracterización del producto de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno.....	30
Obtención del producto.....	30
Tratamiento del producto con enzimas amilolíticas.....	30
Degradación de Smith del producto.....	31
Tratamiento del producto con pronasa.....	32
Contaje de radioactividad.....	32
Otras técnicas.....	33
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
Actividades de fosforilasa dependiente e independiente de aceptor exógeno en la fracción S <sub>140</sub> .....	34
Purificación parcial de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno.....	36
Activación por albúmina.....	39
Algunas propiedades de la fosforilasa pico II independiente de aceptor exógeno.....	42
Efecto de pH.....	54
Efecto de cationes divalentes.....	54
Efecto de 1,5-D-gluconolactona.....	57
Inactivación térmica.....	58
Presencia de compuestos glucosilados en la preparación enzimática.....	61
Posible relación entre glicoproteínas endógenas y la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno..	65
Identificación de la subunidad de fosforilasa.....	68
Fosforilasas pico I y pico II (DEAE): Comparación de algunos parámetros moleculares.....	71
Requerimientos de las fosforilasas dependiente e independiente de aceptor exógeno.....	83
Caracterización del producto sintetizado por la fosforilasa independiente de aceptor exógeno.....	84
Obtención del producto radioactivo.....	84
Análisis estructural de la porción glucosídica del producto.....	87
Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea.....	89
Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes.....	94
Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa.....	98
Cromatografía de afinidad.....	99
Presencia de la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno en amiloplastos aislados de tubérculo de papa.....	104
Presencia de proteínas en la amilosa purificada.....	108
<b>DISCUSION Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>112</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>120</b>

## ABREVIATURAS

ADP-glucosa: 5'-adenosina difosfato glucosa

cpm: cuentas por minuto

DEAE-celulosa: dietil-aminoetil-celulosa

glucosa-1-P:  $\alpha$  -D-glucosa-1-fosfato

MES: ácido 2-(N-morfolino) etansulfónico

$\mu$ g: microgramos =  $10^{-6}$  gramos

$\mu$ l: microlitros =  $10^{-6}$  litros

$\mu$ mol: micromoles =  $10^{-6}$  moles

nm: nanometros =  $10^{-9}$  metros

nmol: nanomoles =  $10^{-9}$  moles

$P_i$ : fosfato inorgánico

PM: peso molecular

Tris: tris-(hidroximetil) aminometano

UDP-glucosa: 5'-uridina difosfato glucosa

## INTRODUCCION

### EL ALMIDON

El almidón está presente en la mayor parte de las plantas verdes y en prácticamente todos sus órganos y tejidos: hojas, frutos, granos de polen, raíces y tallos. Los experimentos realizados por Sachs en 1887 habían demostrado la desaparición del almidón en las hojas cuando las plantas crecían en condiciones de baja irradiancia o si éstas permanecían en la oscuridad durante 24 a 48 horas. Si la hoja es iluminada por una hora o más en condiciones de alta irradiancia, puede demostrarse la reaparición de los gránulos de almidón. El almidón formado por fotosíntesis durante el período de luz es degradado por respiración en la hoja o transformado en sacarosa y transportado al resto de la planta durante el período de oscuridad. En los tejidos de reserva, semilla o tubérculos, por ejemplo, los procesos biosintéticos y degradativos del almidón son menos dinámicos que en la hoja. Los gránulos de almidón depositados en los tejidos de reserva no están sujetos a los aumentos y disminuciones diarios que sufren en la hoja, sino que los procesos biosintéticos predominan durante el desarrollo y los degradativos durante la germinación.

### LOS PLASTIDOS

Schimper, en 1883, usó por primera vez el nombre "plástido" para



distinguir a organelas presentes en el citoplasma de las células vegetales, con excepción de las algas azul-verdosas. Los plástidos existen en una variedad de formas y cubren un amplio espectro de estructuras y funciones; intervienen en el metabolismo energético, almacenamiento y reproducción de las plantas. Consisten en una matriz o estroma limitado por dos membranas concéntricas; contienen ácido desoxirribonucleico que codifica para gran parte de sus polipéptidos, los que son sintetizados por los ribosomas del mismo plástido.

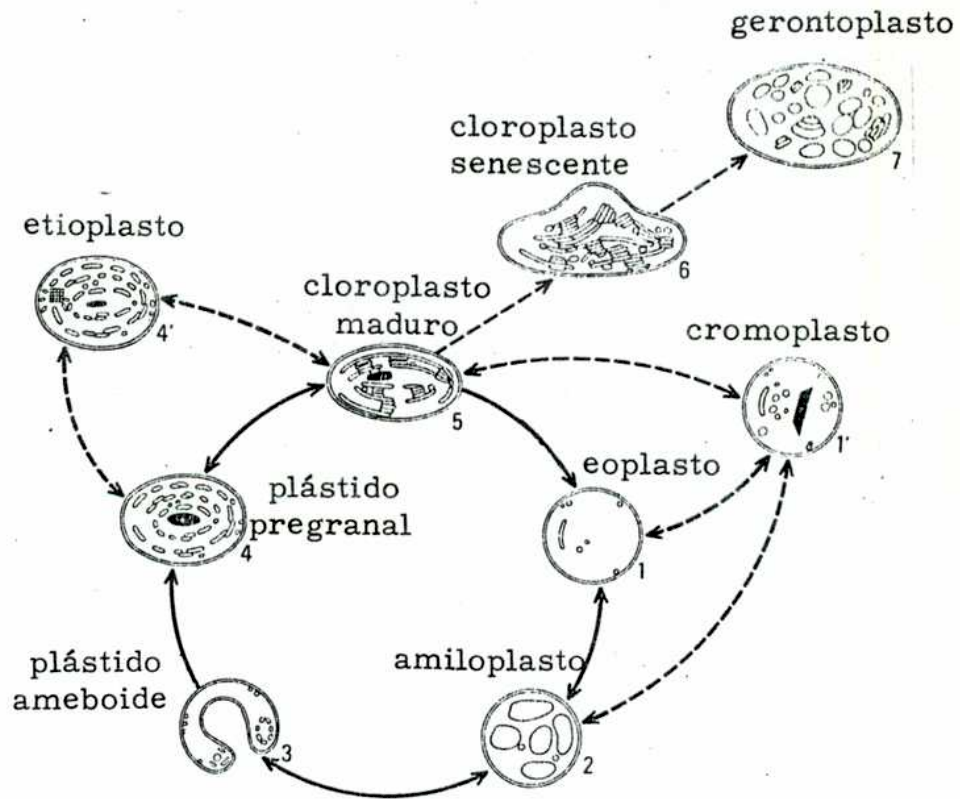
Los cloroplastos de las hojas y otros tejidos verdes contienen clorofila y son una forma especializada para la utilización de energía solar en la fijación del dióxido de carbono y la síntesis de moléculas de alto contenido energético. Probablemente sean las organelas más importantes ya que son, en última instancia, la fuente de la mayor parte de los combustibles fósiles y actuales, y de nuestros alimentos.

Los amiloplastos de los tejidos de reserva son plástidos en los que la mayor parte de su volumen interno está ocupado por almidón; su función en tejidos tales como cotiledones, endosperma y tubérculo es sintetizar almidón como material de reserva a partir de los azúcares provenientes de los tejidos fotosintetizantes.

Cromoplastos es el término usado para los plástidos que contienen carotenoides, responsables del color amarillo, naranja o rojo de los frutos, pétalos y algunas raíces.

Los proplástidos son los pequeños plástidos incoloros o verde pálido de las células meristemáticas del tallo y raíz.

Los plástidos aparecen por división de plástidos preexistentes y las distintas formas, especializadas para distintas funciones, estarían interrelacionadas en su desarrollo según el esquema propuesto recientemente por Whatley (1978) y modificado por Thomson y Whatley (1980). En este modelo se identifican siete estados en el desarrollo del plástido que difieren en el contenido de pigmentos, sustancias de reserva y desarrollo de las membranas internas o tilacoides (Esquema 1).



Esquema 1. Ciclo de desarrollo de los plástidos (Thomson y Whatley, 1980)

Los sucesivos estados son: (1) eoplasto (eo: temprano), (2) amiloplasto, y (3) plástido ameboide, tres formas que pueden ser agrupadas como plástidos preliminares incoloros; (4) plástido pregranal (que puede ser verde o incoloro y del cual el etioplasto sería una variante); (5) cloroplasto ma-

duro y (6) senescente (ambas formas fotosintéticamente activas) y (7) gerontoplasto (el cromoplasto de las hojas senescentes). A partir de este esquema básico, se reconocen vías alternativas que llevan a la formación de otros plástidos, frecuentemente no verdes, que resultan de condiciones ambientales especiales asociadas a un tipo particular de célula.

Desde el punto de vista de la síntesis del almidón, nos interesan principalmente dos tipos de plástidos: los cloroplastos y los amiloplastos. Los pequeños gránulos de almidón desarrollados en los cloroplastos se forman como producto primario de la fotosíntesis, son depositados sólo temporariamente y su forma no está determinada genéticamente sino por el espacio disponible entre los tilacoides (Salema y Badenhuizen, 1967). En los amiloplastos el almidón puede estar como un único gran grano o como varios pequeños. La cantidad de almidón presente puede ser suficiente para distender el plástido y cuando esto sucede, frecuentemente es difícil distinguir las membranas que lo limitan. Esto se debería a una dificultad técnica y no a la verdadera ausencia de esas envolturas (Thomson y Whatley, 1980). La forma de estos gránulos está determinada genéticamente, lo mismo que su tamaño, composición química y fuerzas de unión intermoleculares. Estas características parecen estar dictadas por el núcleo y no por el amiloplasto (Salema y Badenhuizen, 1967).

## ESTRUCTURA DEL GRANO DE ALMIDON

Antes de 1940 el almidón era considerado como un único polisacárido de compleja arquitectura molecular pero los trabajos llevados a cabo independientemente en E.E.U.U. por T. J. Shoch y en Suiza por K. H. Meyer mostraron que está constituido principalmente por dos polisacáridos, ambos polímeros de  $\alpha$ -D-glucopiranososa. El componente más abundante, la amilopectina, tiene una estructura ramificada mientras que el componente que se encuentra en menor proporción, la amilosa, es esencialmente una molécula lineal. Ambos polisacáridos difieren significativamente en muchas propiedades físicas, especialmente solubilidad en agua, tamaño molecular, capacidad de colorearse con el reactivo de iodo y en susceptibilidad a la degradación por enzimas amilolíticas. Estas diferencias surgen de la estructura ramificada de la amilopectina en la que cadenas lineales de D-glucosa en unión  $\alpha$ -1,4 están unidas entre sí por enlaces D-glucosídicos  $\alpha$ -1,6. La amilopectina puede estar esterificada en una pequeña proporción con fosfato (0,04 - 0,1% en el almidón de papa). Además de estos componentes, el grano de almidón puede contener hasta un 0,6% de lípidos complejos y pequeñas cantidades de proteínas, nucleótidos y varias sustancias inorgánicas consideradas generalmente, aunque impropriamente, como impurezas (French, 1975). Los polisacáridos que constituyen el grano de almidón se mantienen unidos entre sí por uniones de puente hidrógeno formando una estructura que en algunas regiones del gránulo es cristalina y en otras amorfa.

## FORMACION DEL GRANO DE ALMIDON

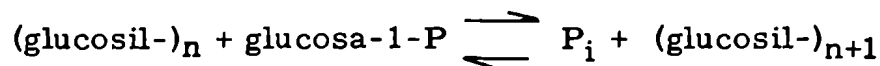
El desarrollo del grano de almidón de reserva dentro del amiloplasto comienza por la acumulación en el estroma, la sustancia fundamental del plástido, de material amorfo de composición química desconocida. En un momento dado se deposita una pequeña cantidad de polisacárido insoluble que actúa como núcleo para la posterior deposición de almidón. El crecimiento inicial produce gránulos casi esféricos que a medida que crecen toman una forma elongada o aplanada. Los granos grandes pueden presentar, vistos al microscopio óptico, una mancha excéntrica, el hilum, que es el punto donde se inició el crecimiento y dispuestas a su alrededor una serie de capas concéntricas. Los estudios de difracción de rayos X realizados sobre gránulos de almidón grandes muestran que el eje de las moléculas que lo constituyen está dispuesto perpendicularmente a esas capas concéntricas y a la superficie del gránulo. Estos y otros estudios sugieren que las cadenas de polisacáridos crecen en una orientación perpendicular a la superficie del gránulo en un proceso en el que la polimerización y la cristalización ocurrirían simultáneamente (French, 1975).

## ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA BIOSINTESIS DEL ALMIDON

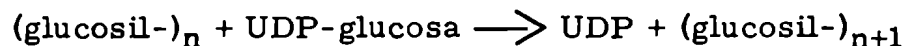
Los mecanismos enzimáticos de síntesis de los componentes polisacáridos del almidón están bastante bien conocidos, pero no ocurre lo

mismo con el proceso de ensamblaje de los diversos componentes del grano para obtener una estructura que es típica de cada planta. En condiciones apropiadas, es posible sintetizar polisacáridos semejantes a la amilosa y a la amilopectina en muchas de sus propiedades a partir de derivados simples de D-glucosa. Sin embargo, hasta el presente no ha sido posible producir un grano de almidón in vitro o describir detalladamente el proceso que ocurre in vivo.

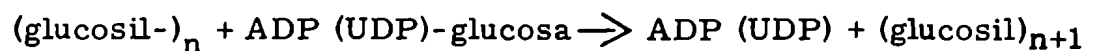
Antes de 1960 se conocía una sólo enzima capaz de catalizar la síntesis de uniones glicosídicas  $\alpha$ -1,4 en plantas, la fosforilasa (E.C. 2.4.1.1), que lo hace por la siguiente reacción:



En 1961, Leloir y col. demostraron la presencia en gránulos de almidón de arveja de una enzima, la almidón sintetasa (E.C. 2.4.1.11), capaz de alargar las cadenas de amilosa y amilopectina a través de la siguiente reacción:



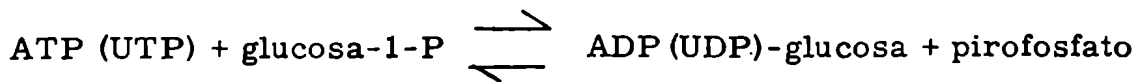
Posteriormente se demostró que el ADP-glucosa era un sustrato mejor para la enzima, tanto por la afinidad de la enzima por el mismo como por la velocidad máxima (Recondo y Leloir, 1961), de modo que la almidón sintetasa catalizaría la reacción:



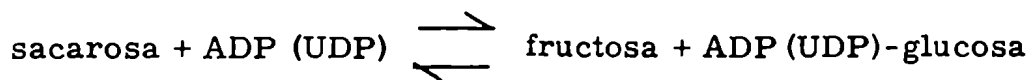
La almidón sintetasa al estado soluble, es decir, no asociada al grano de almidón fue hallada posteriormente en endosperma de granos de maíz dulce (Frydman y Cardini, 1964). Desde entonces la presencia de la al-

midón sintetasa en forma soluble fue descrita en una variedad de tejidos vegetales (Murata y col., 1964; Ghosh y Preiss, 1965; Frydman y Cardini, 1966; Frydman y col., 1966; Doi y col., 1966). Estas enzimas solubles transfieren glucosa específicamente de ADP-glucosa.

Tanto el ADP-glucosa como el UDP-glucosa son sintetizados en tejidos vegetales mediante la reacción de la pirofosforilasa (E.C. 2.7.7.9) (Espada, 1962) según:



o por la sacarosa sintetasa (E.C. 2.4.1.13) (Cardini y col., 1955; Fekete y Cardini, 1964) según:



La síntesis de las uniones  $\alpha$ -1,6 presentes en la amilopectina es catalizada por una enzima llamada enzima ramificante o enzima Q (Bourne y Peat, 1945; Hobson y col., 1950). Generalmente se hace una distinción entre la enzima Q, capaz de utilizar amilosa para la formación de un producto ramificado del tipo de la amilopectina, y la enzima ramificante que a partir de  $\alpha$ -glucanos forma un producto más ramificado, del tipo del glucógeno.

## FOSFORILASA

Como hemos visto, la reacción catalizada por la fosforilasa es una de las vías posibles para la formación de las uniones glicosídicas  $\alpha$ -1,4 presentes en el almidón.

El efecto de la fosforilasa fue detectado por primera vez por Bodnar en 1925 que observó que incubando arvejas pulverizadas con buffer fosfato, el contenido de fosfato de la mezcla de incubación disminuía lentamente. En 1937 Cori y col. aislaron por primera vez la fosforilasa a partir de tejidos animales diversos. En 1940 Hanes demostró la presencia de fosforilasa en tubérculos de papa y remolacha azucarera. Desde entonces, la actividad de fosforilasa fue demostrada en tubérculos, semillas, hojas, granos de polen, frutos de diversas plantas superiores, en varios tipos de algas, bacterias, levaduras, protozoos y diversos tejidos animales.

Aunque la fosforilasa tiene una distribución tan amplia, el tubérculo de papa fue preferido por numerosos autores como fuente de la enzima. Una de las razones para esta elección es que la fosforilasa de papa se encuentra soluble (no adsorbida al gránulo de almidón) de modo que con métodos relativamente suaves y sencillos es posible romper las células y obtener un jugo con alta actividad enzimática.

La fosforilasa de papa es un dímero de PM 207.000 y tiene un número de recambio de 9400 moles de glucosa-1-P por mol de proteína por min a 30°C y a pH 6,3 (Lee, 1960a); contiene 4 moles de piridoxal-P por mol de enzima (Lee, 1960b).

En contraste con lo que sucede con la enzima de mamíferos, la fosforilasa de papa no parece ser regulada por fosforilación y defosforilación. La enzima vegetal no contiene serina-P y no es afectada por incubación con proteína quinasa, fosfatasa o AMP (Lee, 1960a y b). ATP, ditiotrei-



tol (Gold y col., 1971), glucosa-6-P, fructosa-6-P, fructosa-1,6-P<sub>2</sub>, ribosa-5-P y fructosa-1-P (Kamogawa y col., 1968) no tienen efecto sobre la enzima. Fekete y Cardini (1964) encontraron que el UDP-glucosa, pero no el ADP-glucosa, inhibe la fosforilasa de papa. La fosforilasa de papa degrada la amilopectina con una conversión del 45% de la misma a glucosa-1-P y el glucógeno es degradado muy lentamente, siendo convertido en un 3 al 21% a glucosa-1-P (Liddle y col., 1961). Los  $K_m$  para la glucosa-1-P y la glucosa son 2-3,5 mM y 5,9-7,5 mM, respectivamente (Lee, 1960a; Fekete y Cardini, 1964; Gold y col., 1971). La curva de actividad en función del pH muestra un óptimo de 6,5 (Lee, 1960a).

-El rol de la fosforilasa en el metabolismo del almidón es aún incierto. Algunas observaciones sugieren que la fosforilasa podría no ser operativa en la vía biosintética y que la vía predominante sería la de la almidón sintetasa. Se ha calculado una relación entre  $P_i$  y glucosa-1-P de 3 a 300 en algas y hojas y dado que la reacción de la fosforilasa in vitro tiene una constante de equilibrio de 2,4 a pH 7,3, la formación de uniones glicosídicas no ocurriría (Preiss y Levi, 1979) y la fosforilasa actuaría en forma degradativa. No se sabe si in vivo la situación pudiera ser distinta dada la posibilidad de compartimentalización. La fosforilasa se encuentra soluble, es decir, no asociada al grano de almidón, y en muchos tejidos, en muy altas concentraciones. Sin embargo, es notable que, salvo en las semillas de maíz dulce que contienen fitoglucógeno, no existen en el citoplasma sustratos solubles para la enzima. En efecto, el grano de almidón entero no sólo no es atacado sino que su degradación in vivo parece hacerse a través de las  $\alpha$ -amilasas (Manners, 1974).

Es posible que la biosíntesis de las uniones glicosídicas  $\alpha$ -1,4 presentes en el almidón se deba tanto a la acción de la almidón sintetasa como de la fosforilasa y que la importancia relativa de las distintas vías varíe según el tejido de que se trate y a través de la ontogenia del mismo.

#### PAPEL DE LA FOSFORILASA EN LA FORMACION DE ACEPTORES GLUCOSIDICOS

Uno de los problemas aún no resueltos en la biosíntesis del almidón es el mecanismo de iniciación de la misma. Aunque tanto la almidón sintetasa como la fosforilasa pueden alargar glucanos preexistentes, el requerimiento de estos aceptores parecía ser absoluto (Cardini y Frydman, 1966; Lee, 1960a). El problema planteado era, entonces, el origen in vivo de este aceptor glicosídico. Estudios realizados por Illingworth y col. (1961) mostraron que la fosforilasa de papa podía catalizar la síntesis de amilosa en ausencia de aceptor agregado. Se sugirió entonces que la enzima catalizaba una reacción en la que se agregaban las primeras glucosas a la enzima misma, formando una glucoproteína que actuaría a su vez como aceptor (Illingworth y col., 1961).

Tsai y Nelson (1968 y 1969) describieron cuatro isoenzimas de fosforilasa en maíz, que difieren en la proporción en que aparecen durante el proceso de germinación y en sus propiedades regulatorias. Dos de ellas, la II y la III, que aparecen y aumentan rápidamente su concentración luego de 12 días de desarrollo presentan actividad en ausencia de aceptor agregado.

Estudios realizados en endosperma de granos de cebada en desarrollo (Baxter y Duffus, 1973) mostraron la presencia de dos isoenzimas de fosforilasa; la actividad independiente de aceptor agregado está asociada a la fosforilasa (1) en endosperma muy inmaduro, pero a medida que el proceso de desarrollo de la plántula avanza, también la fosforilasa (2) adquiere esa característica. Posteriormente se observa que persiste únicamente la isoenzima (2) pero con actividad únicamente en presencia de aceptor agregado. Matheson y Richardson (1975) encontraron la presencia de dos isoenzimas de fosforilasa en semilla de arveja, ambas capaces de sintetizar un glucano en ausencia de aceptor exógeno después de un período de latencia. Fredrick (1968) encontró que una de las dos isoenzimas de fosforilasa presentes en el alga azul-verdosa Oscillatoria princeps tenía actividad en ausencia de polisacárido agregado. El mismo autor (Fredrick, 1971) encontró luego esta actividad en algas verdes y en algas rojas. Slabnik y Frydman (1970) describieron la presencia en tubérculo de papa de una fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Esta actividad no presentaba un período de latencia (Frydman y Slabnik, 1973).

Distintos autores sugirieron que la actividad de fosforilasa en ausencia de polisacárido aceptor agregado se debía a la presencia de polímeros de glucosa en la preparación enzimática, ya sea unidos covalentemente a la enzima (Fredrick, 1971; Frydman y Slabnik, 1973; Baxter y Duffus, 1973) o como contaminantes (Kamogawa y col., 1968).

## PAPEL DE OTRAS ENZIMAS EN LA FORMACION DE ACEPTORES GLUCOSIDICOS

Se han descrito formas solubles de almidón sintetasa en hojas de espinaca (Ozbun y col., 1971 y 1972) y en tubérculo de papa (Hawker y col., 1972) que actúan en ausencia de aceptor exógeno. Otros trabajos (Lavintman y Cardini, 1972 y 1973; Lavintman y col., 1974; Tandecarz y Cardini, 1978 y 1979) demostraron que una fracción sedimentable de tubérculo de papa que consistía principalmente de proplástidos libres de almidón era capaz de transferir glucosa de UDP-glucosa a una proteína aceptora endógena para formar una glucoproteína. Esta glucoproteína puede, a su vez, servir de aceptor para la síntesis de cadenas glicosídicas  $\alpha$ -1,4 por el mismo sistema enzimático sedimentable usando ADP-glucosa, UDP-glucosa o glucosa-1-P como dadores del monosacárido.

Con respecto a la síntesis de otros polisacáridos, los datos aportados por Krisman y Barengo (1975), Barengo y col. (1975), Tomos y Northcote (1978) y Green y Northcote (1978) apoyan la idea de que la formación de un intermediario de naturaleza glucoproteica sería un mecanismo general para la síntesis de  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucanos.

## OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION

Se ha descrito la presencia de isoenzimas de fosforilasa tanto en tubérculo de papa (Aimi y Murakami, 1954; Slabnik y Frydman, 1970;

Gerbrandy y Verleur, 1971 y 1972; Frydman y Slabnik, 1973) como en otros tejidos vegetales (Fekete, 1968; Steup y col., 1980; Tsai y Nelson, 1968; Baxter y Duffus, 1973; Matheson y Richardson, 1975) y en algas (Fredrick, 1963). Algunas de las isoenzimas de fosforilasa descritas presentan actividad en ausencia de polisacárido agregado (Tsai y Nelson, 1968; Slabnik y Frydman, 1970; Fredrick, 1971; Frydman y Slabnik, 1973; Baxter y Duffus, 1973; Matheson y Richardson, 1975).

Tandecarz y col. (1975) encontraron que una fracción no sedimentable obtenida de tubérculo de papa incorporaba [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa a material insoluble en ácido tricloroacético cuando era incubada, en ausencia de aceptor exógeno, con [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P en concentraciones adecuadas. El producto formado podía, a su vez, servir de aceptor de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa por la acción de enzimas presentes en la misma preparación que utilizaban como dadores al UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa, ADP-[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa o [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P. En base a estos resultados emprendimos el estudio de la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno, por su posible relación con la iniciación de la biosíntesis del almidón.

Se investigó la presencia de isoenzimas de fosforilasa en la preparación de tubérculo de papa no sedimentable a alta velocidad y se purificó parcialmente una de ellas, la que presenta actividad tanto en presencia como en ausencia de aceptor agregado. Se estudió en detalle la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno y se investigó el papel de la posible presencia de polímeros de glucosa y de glicoproteínas endógenas en esta actividad. Se trató de establecer si en esta fracción parcialmente purificada coexisten dos enzimas distintas o si se trata de una única

proteína que tiene ambas actividades. Se estudió el producto formado in vitro por transferencia de glucosa de la glucosa-1-P a un aceptor endógeno con el objeto de establecer si se trata de una glucoproteína y de conocer la estructura de su porción glucosídica. Si suponemos que la enzima que forma este producto interviene en la biosíntesis del almidón, debería estar presente en los amiloplastos en los cuales tiene lugar este proceso en los tejidos de reserva. Como hasta el presente no se había descrito esta actividad de fosforilasa en amiloplastos, se investigó su presencia en los mismos. Confirmada su existencia se vio que sintetizaba el mismo tipo de producto que la fracción purificada a partir de homogenato total de tubérculo de papa. Si el producto sintetizado in vitro fuera un precursor del polisacárido lineal del almidón, ambos deberían tener propiedades comunes. Por esta razón se estudiaron también algunas propiedades estructurales de la amilosa.

## MATERIALES Y METODOS

### REACTIVOS Y ENZIMAS

Los distintos materiales usados durante la realización de este trabajo se obtuvieron de:  $\beta$ -amilasa (batata);  $\alpha$ -D-glucosa-1-P (sal dipotásica, grado I); pronasa P (tipo VI, de Streptomyces griseus); amiloglucosidasa (Aspergillus niger);  $\alpha$ -amilasa (páncreas porcino); glucógeno (músculo de conejo); buffer MES;  $\alpha$ -metil-D-glucósido y concanavalina A-Sepharosa de Sigma; DEAE-celulosa de Serva; Bio-Gel A 0,5m, acrilamida, urea, persulfato de amonio, N,N'-metilen-bis-acrilamida y N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina de Bio-Rad; Sephadex G-25 de Pharmacia.

ADP-[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa (228 Ci/mol) y UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa (309 Ci/mol) uniformemente marcados en la glucosa fueron obtenidos por el método descrito por Thomas y col. (1968); [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P (261 Ci/mol) de Amersham/Searle; 1,5-D-gluconolactona fue cedida gentilmente por la Dra. Clara R. Krisman. Amilosa (tubérculo de papa, Sigma) purificada según el método de Schoch modificado (Holló y Szejtli, 1962), fue gentilmente cedida por el Dr. Carlos E. Cardini.

### PREPARACION DE FOSFORILASA DE TUBERCULO DE PAPA

#### Sobrenadante de 140.000 x g

Se preparó por el método descrito por Tandecarz y col. (1975).

Todas las operaciones son realizadas a 40°C. Como fuente de enzima se usan tubérculos de papa obtenidos en el mercado. Se pelan 200 g de tubérculos, se lavan, se secan y se rallan en rallador de vidrio en presencia de 0,8 ml de 2-mercaptoetanol (la concentración final en el jugo es de aproximadamente 5 mM). Este homogenato se filtra a través de dos capas de muselina y el filtrado se centrifuga durante 10 min a 2000 x g para separar el almidón. El sobrenadante se vuelve a centrifugar durante 20 min a 25.000 x g. Se descarta el precipitado y el sobrenadante se somete a ultracentrifugación a 140.000 x g durante 2 h. La fracción soluble obtenida por centrifugación se lleva a 50% de saturación con solución saturada de sulfato de amonio a pH 7,0. El precipitado obtenido se centrifuga a 25.000 x g durante 20 min, se resuspende en 4-5 ml de 0,05 M buffer Tris-ClH, pH 7,4, 0,05% 2-mercaptoetanol (buffer A) y se dializa contra 1 litro del mismo buffer durante 16 h. Este precipitado dializado constituye la fracción S<sub>140</sub>.

Aislamiento de Isoenzimas de Fosforilasa por  
Cromatografía en Columna de DEAE-Celulosa

Se utilizó DEAE-celulosa de capacidad 0,71 mEq/mg, tratada con ClH y NaOH, como lo indican Peterson y Sorber (1962).

Una alícuota del S<sub>140</sub> (50 a 120 mg de proteína) en 1,5 ml de buffer A, se aplica a una columna (1,8 x 15 cm) equilibrada con el mismo buffer. Después del lavado, con 15 ml de buffer A, se eluye con un gradiente lineal de 0 a 0,5 M ClK (300 ml de volumen total) en la misma solu-



ción buffer. Se recogen fracciones de 4,5 ml aproximadamente, a una velocidad de 30 ml/h. Las fracciones que constituyen cada pico de actividad de fosforilasa se juntan separadamente, se concentran por ultrafiltración por membrana XM-50 (Amicon Corp.) a 4°C. Las fracciones concentradas se dializan contra 250 ml de buffer A durante 16 h a la misma temperatura.

#### PREPARACION DE FOSFORILASA DE AMILOPLASTOS AISLADOS

Se aislaron amiloplastos según el método descrito por Fishwick y Wright (1980) que permite la obtención de hasta un 16% de amiloplastos intactos. Esta técnica aprovecha la alta densidad del grano de almidón para separar los amiloplastos que lo contienen usando un gradiente de densidad de sacarosa y no incluye centrifugación en ninguna de sus etapas. Debido a la fragilidad de las membranas que rodean el grano de almidón, la centrifugación, aún a muy baja velocidad, da como resultado la ruptura de la membrana de los amiloplastos. Este material, obtenido a partir de 500 g de tubérculo de papa se resuspende en 20 ml de 0,3 M de buffer fosfato, pH 7,2, 10 mM  $Cl_2Mg$ , agitando suavemente durante 30 seg. Se elimina el almidón centrifugando a 500 x g durante 10 min y el sobrenadante obtenido se centrifuga nuevamente a 14.500 x g durante 20 min. Este último sobrenadante se centrifuga a 100.000 x g durante 1 h y la fracción soluble obtenida se lleva a 50% de saturación con solución saturada de sulfato de amonio a pH 7,0. El precipitado se colecta

por centrifugación a 25.000 x g durante 20 min, se resuspende en 0,5 ml de buffer A y se dializa durante 16 h contra 1 litro del mismo buffer. La fracción dializada constituye el S<sub>100</sub>.

## ENSAYO DE ACTIVIDAD DE FOSFORILASA Y OTRAS ENZIMAS

### Actividad de Fosforilasa Dependiente de Aceptor Exógeno

Se determina agregando 5-30 µl de la fracción enzimática a una mezcla de incubación que contiene, salvo agregados específicos, 0,24 nmol de [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P (40.000 cpm) y 0,3 mg de glucógeno de músculo de conejo en un volumen final de 50 µl. Cuando se usaron en lugar de glucógeno otros polisacáridos como amilopectina o fitoglucógeno, se obtuvieron resultados similares. Al término del período de incubación, que se realiza a 37°C durante tiempos variables, se para la reacción por el agregado de 1 ml de metanol 70% que contiene ClK 1%. Se colecta el precipitado mediante centrifugación, se redisuelve el mismo en 50 µl de agua y se precipita nuevamente. Este proceso se repite dos veces más. Finalmente, se mide la incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa en el precipitado, luego de disolver el mismo en 0,4 ml de agua (ver "Contaje de Radioactividad").

### Actividad de Fosforilasa Independiente de Aceptor Exógeno

Ensayo a . Se determina agregando 5-30 µl de la fracción enzimática

a una mezcla de reacción que contiene, salvo agregados específicos, 0,24 nmol de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P (40.000 cpm), 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa-1-P y en volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Al término del período de incubación, que se realiza a 37°C y por tiempos variables, se agrega 1 ml de ácido tricloroacético 5% frío y se mide incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa a material insoluble en ácido tricloroacético. Se centrifuga para coleccionar el precipitado y se lava dos veces con ácido tricloroacético frío seguido cada vez de centrifugación. Finalmente se disuelve el precipitado con 0,5 ml de NaOH 0,01 N y se determina la radioactividad (ver "Contaje de Radioactividad"). En otros casos la mezcla de reacción a la que se agrega el ácido tricloroacético frío se filtra a través de filtros de nitrocelulosa (Millipore). Se lavan los filtros con 15 ml de ácido tricloroacético 5% frío, se secan las membranas y se cuenta su radioactividad (ver "Contaje de Radioactividad").

Cuando se mide también la radioactividad incorporada a material soluble en ácido tricloroacético 5% e insoluble en metanol, se agrega 1 mg de glucógeno de músculo de conejo a la fracción sobrenadante (1 ml) de la precipitación por ácido tricloroacético 5%, se disuelve con 50  $\mu\text{l}$  de agua y se reprecipita con 1 ml de metanol 70% conteniendo CLK 1%. Se repite esta última operación una vez más y finalmente se mide la incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa luego de disolver el precipitado con 0,4 ml de agua (ver "Contaje de radioactividad").

Ensayo b . Se determina agregando 5-30  $\mu$ l de la fracción enzimática a una mezcla de reacción que contiene 1  $\mu$ mol de glucosa-1-P, 5  $\mu$ moles de buffer MES, pH 5,7 y 250  $\mu$ g de albúmina en un volumen final de 50  $\mu$ l. Al término del período de incubación, que se realiza a 37°C y por tiempos variables, se agrega 1 ml de ácido tricloroacético 5%. El precipitado colectado por centrifugación se disuelve mediante el agregado de 25  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (Holmes y Preiss, 1979). Se agregan al precipitado así disuelto 25  $\mu$ l de una solución de 0,2% de I<sub>2</sub> en 2% de IK, se lleva a un volumen final de 1,25 ml con agua (Bailey y Whelan, 1961) y se mide la absorbancia a 590 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU.

Ensayo c. Se determina agregando 5-30  $\mu$ l de la fracción enzimática a una mezcla de reacción que contiene 1  $\mu$ mol de glucosa-1-P, 5  $\mu$ moles de buffer MES, pH 5,7, y 250  $\mu$ g de albúmina en un volumen final de 50  $\mu$ l. Al término del período de incubación, que se realiza a 37°C se detiene la reacción por el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético 5% y se mide el P<sub>i</sub> liberado en el sobrenadante.

### Otras Actividades Enzimáticas

Malato deshidrogenasa. Se midió su actividad por el consumo de NADH, en presencia de oxalacetato, siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm, según lo descrito en el Worthington Enzyme Manual (1972).

Lactato deshidrogenasa. Se midió su actividad por el consumo de NADH, en presencia de piruvato, como para la malato deshidrogenasa.

#### FILTRACION EN GEL

Se usaron filtraciones en gel de Sephadex G-25 y de Bio-Gel A 0,5m a 4°C. El volumen de exclusión de las columnas se determinó usando azul dextrano. Para la filtración en columna de Bio-Gel A 0,5m se aplicó 0,5 ml de muestra (0,8-2,5 mg de proteína) en 10% de sacarosa (p/v) en buffer A a la columna de 1,5 cm x 90 cm previamente equilibrada con el mismo buffer. La columna se eluyó con el buffer A a una velocidad de 7 ml/h y se recogieron fracciones de 2 ml. Para la calibración de la columna se utilizaron como marcadores de radios de Stokes ( $a$ ) catalasa de hígado bovino ( $a = 52,2 \text{ A}$ ), hemoglobina ( $a = 31 \text{ A}$ ), citocromo c de corazón de caballo ( $a = 18,7 \text{ A}$ ). Se valoraron la hemoglobina y el citocromo c por su absorbancia a 420 nm y la catalasa por su absorbancia a 280 nm. Se representan los log de los radios de Stokes de los marcadores en función de  $V_e/V_o$  donde  $V_e$  es el volumen de elución y  $V_o$  es el volumen de exclusión. Se determinan los radios de Stokes de las proteínas en estudio por interpolación en la curva de calibración obtenida.

#### CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN COLUMNA DE CONCAVALINA A-SEPHAROSA

La columna (0,6 x 8 cm) de concanavalina A-Sepharosa se lava con

20 ml de 0,2 M ClNa, 0,001 M Cl<sub>2</sub>Mn, 0,001 M Cl<sub>2</sub>Ca, 0,001 M Cl<sub>2</sub>Mg en buffer A (buffer B). La muestra proteica, en 0,6 a 0,8 ml de buffer B se aplica a la columna, la que luego se lava con 10 ml del mismo buffer. Luego del lavado, se eluye con 5 ml de 0,2 M de  $\alpha$ -metil-D-glucósido en buffer B. A partir de la aplicación de la muestra, se recogen fracciones de 1 ml.

## ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES

Se llevó a cabo en geles cilíndricos (0,5 x 12 cm) siguiendo el procedimiento de Ornstein (1964) y Davis (1964) ligeramente modificado (Tandecarz y col., 1973). El tamaño de poro corresponde, a menos que se indique especialmente, a geles preparados con una concentración de 7% de acrilamida. El buffer de los compartimientos anódico y catódico es 0,042 M de Tris, 0,0017 M de ácido etilendiamintetraacético (EDTA) y 0,05 M de ácido bórico, pH 8,2. La electroforesis se desarrolla a 40°C con una corriente constante de 3 miliamperios por gel durante 3 h. Se usa azul de bromofenol como indicador interno. Después de la separación electroforética, se sacan los geles de los tubos de vidrio y se colocan en una solución adecuada para localización de actividad enzimática, coloración directa con reactivo de iodo o coloración de proteínas.

### Localización de Actividad Enzimática

Después de la electroforesis se incuba cada gel durante 12 h

en una mezcla cuya composición se varía de acuerdo con la actividad enzimática que se quiere evidenciar. Para actividad de fosforilasa se usa una solución que contiene 0,05 M de buffer citrato, pH 5,0, 0,02 M de glucosa-1-P y, en las determinaciones en presencia de aceptor agregado, 0,8% de glucógeno. Para actividad de amilasa se usa 0,2% de almidón soluble en 0,05 M de buffer citrato, pH 5,0. Después de la incubación, los geles se lavan con agua destilada y se colorean con una solución de 0,2% IK, 0,02% I<sub>2</sub> en 0,2 M de buffer acetato, pH 4,8 durante unos minutos, se lavan luego con una solución 10% de ácido acético.

La actividad de fosforilasa se evidencia por la aparición de una banda azul con el reactivo de iodo. Cuando el gel es incubado con la mezcla para localizar amilasas, una banda clara indica la desaparición del almidón presente en la mezcla de incubación. En todos los casos se corrieron controles en los cuales los geles fueron coloreados con reactivo de iodo inmediatamente después de la electroforesis.

#### Coloración Directa con Reactivo de Iodo

Inmediatamente después de la electroforesis se sumergen los geles en 0,2% IK, 0,02% I<sub>2</sub> en 0,2 M buffer acetato, pH 4,8.

#### Coloración de Proteínas

Los geles son fijados y teñidos por una solución acuosa que contiene 5% de metanol, 10% de ácido acético y 0,2% de Coomassie brilliant blue R

y decolorados con la misma solución sin colorantes.

### Extracción de la Enzima del Gel

Luego de la electroforesis se corta el trozo del gel en el que se encuentra la fosforilasa, cuya migración se determina coloreando para proteínas o incubando para evidenciar actividad enzimática un gel corrido en paralelo. El trozo de gel obtenido se homogeneiza con 2 ó 3 volúmenes de buffer A, se deja durante 16 h a 0°C y luego se centrifuga durante 10 min a 2000 x g para eliminar la acrilamida. Cuando se usa la preparación para determinación de actividad enzimática, se concentra y dializa el sobrenadante obtenido como se describe para las fracciones obtenidas por cromatografía en DEAE-celulosa.

### Determinación de los Pesos Moleculares

Para la determinación de los pesos moleculares de las proteínas en estudio se utilizó el método descrito por Hedrick y Smith (1968). Se someten muestras iguales a electroforesis en paralelo en geles de 5, 6, 7 y 8% de acrilamida. Las demás condiciones experimentales son las descritas. Luego de la electroforesis se colorean los geles con reactivo de iodo o se localiza actividad enzimática según se indica en cada caso, y se determina la movilidad de las bandas localizadas en cada gel respecto del azul de bromofenol que se usa como marcador interno. Se representa en escala semilogarítmica la movilidad relativa en función de



la concentración de acrilamida en el gel, se mide la pendiente de la recta obtenida y el peso molecular de la proteína se determina por interpolación del valor de la pendiente en una curva de calibración obtenida con proteínas standard. En nuestro caso usamos para la calibración los oligómeros de la seroalbúmina bovina: monómero (PM = 67.000), dímero (PM = 134.000) y trímero (PM = 201.000).

#### ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECILSULFATO DE SODIO Y UREA

La electroforesis en geles de poliacrilamida planos (1,5 mm de espesor, 9,5 cm de alto; 12,8 cm de ancho) se lleva a cabo en presencia de 0,1% de dodecilsulfato de sodio y 3 M urea a pH 8,3 según el método descrito por Ziegler y col. (1974). Se usaron geles de 5, 7 ó 10% de acrilamida según se indica en cada caso. Las muestras se preparan de la siguiente manera: se agrega ácido tricloroacético (concentración final, 10%) a la muestra (5-60 µg de proteína), se colecta el precipitado por centrifugación y se lo lava con 0,5 ml de acetona fría, se agregan 50 µl de una mezcla que contiene: 5 M urea, 10% (V/V) 2-mercaptoetanol, 50 mM buffer Tris-(N,N-bis[2-hidroximetil]glicina), pH 8,3, 0,05% dodecilsulfato de sodio, 10% (P/V) sacarosa y 0,05% azul de bromofenol y finalmente se calienta a 100°C durante 1 min. Luego de aplicar las muestras, se desarrolla la electroforesis a una intensidad constante de 50 miliamperios por gel durante 4 h aproximadamente. La coloración de proteínas o con re-

activo de iodo se realiza como para la electroforesis en condiciones no desnaturizantes. La radioactividad se localiza mediante la fluorografía de los geles, siguiendo el método de Bonner y Laskey (1974). Las glicoproteínas se localizan mediante el reactivo de PAS (ácido periódico - reactivo de Schiff) según el método descrito por Fairbanks y col. (1971). Los pesos moleculares se determinan por interpolación en la gráfica de calibración obtenida representando la migración de las proteínas marcadoras sometidas a electroforesis en idénticas condiciones, en función de sus pesos moleculares (escala semilogarítmica). Los marcadores de peso molecular usados fueron: fosforilasa b (músculo de conejo, PM = 94.000), seroalbúmina bovina (PM = 67.000), ovoalbúmina (PM = 43.000), anhidrasa carbónica (eritrocitos bovinos, PM = 30.000), inhibidor de tripsina (soja, PM = 20.100) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (PM = 14.400).

#### ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE DENSIDAD DE SACAROSA

Los gradientes lineales de 5-20% de sacarosa (P/V) se preparan en buffer A (3,1 ml), en tubos de acetato de celulosa. Las muestras, en un volumen de 150  $\mu$ l que incluye, cuando se indica, una mezcla de marcadores de coeficientes de sedimentación ( $S_{20,w}$ ), se siembran en el gradiente. Los marcadores usados fueron malato deshidrogenasa de corazón de porcino (MDH, 4,3S), lactato deshidrogenasa de músculo de conejo (LDH,

7, 3S) y citocromo c de corazón de caballo (cit c, 1, 7S). La centrifugación de los gradientes se realiza a 20°C en un rotor Beckman SW 65 a 100.000 x g durante 18 h. Se recogen fracciones de 0,2 ml succionando desde el fondo del tubo con una cánula conectada a una bomba peristáltica. Cuando se incluyeron marcadores, se determinaron sus migraciones por ensayo de actividad enzimática y en el caso del citocromo c por absorbancia a 420 nm. Se determina el coeficiente de sedimentación de la proteína en estudio por interpolación en la curva de calibración obtenida representando la migración de los marcadores en función de sus  $S_{20, w}$ .

#### TRATAMIENTO DE LA ENZIMA CON AMILOGLUCOSIDASA

La preparación enzimática pico II (DEAE) se incubó con amiloglucosidasa durante 45 min a 37°C en buffer A. Se agregó amiloglucosidasa en una relación de 20 µg por cada 10 µg de fosforilasa, en un volumen final de 50 µl. Esta cantidad de amiloglucosidasa es suficiente para hidrolizar, en esas condiciones de incubación, 100 µg de glucógeno usado como control. Como controles adicionales se incubaron sendas mezclas en las que se omitió una de las enzimas. Luego de la incubación se sometieron alícuotas de estas mezclas, por triplicado, a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Se incubaron los geles en condiciones adecuadas para localizar las actividades de fosforilasa (independiente y dependiente de aceptor exógeno).

## CARACTERIZACION DEL PRODUCTO DE LA FOSFORILASA INDEPENDIENTE DE ACEPTOR EXOGENO

### Obtención del Producto

Se usó como fuente de enzima el pico II (DEAE), salvo indicación específica. El producto radioactivo fue aislado de dos maneras. a) Precipitación con ácido tricloroacético 5% (ver "Actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno - ensayo a"). b) Filtración por gel de Sephadex G-25. Una mezcla de reacción conteniendo la preparación enzimática (150-500  $\mu$ g de proteína), 1 nmol de [ $^{14}$ C]glucosa-1-P (160.000 cpm) y 4  $\mu$ moles de glucosa-1-P, en un volumen total de 200  $\mu$ l, se incubaba durante 10 min a 37°C y se filtra por una pequeña columna de Sephadex G-25. En el volumen de exclusión se obtiene el producto y también la enzima. Para el fraccionamiento por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, se deja el volumen de exclusión durante 4 h a 0°C. Se centrifuga a 2000 x g durante 10 min y se aplican al gradiente 200  $\mu$ l (160  $\mu$ g de proteína) del sobrenadante límpido.

### Tratamiento del Producto con Enzimas Amilolíticas

El producto radioactivo obtenido por precipitación con ácido tricloroacético 5% se resuspende en agua destilada, se lleva a pH mayor que 11 con NaOH 0,5N y se neutraliza esta solución con el volumen necesario de HCl 0,5N. Se completa hasta un volumen de 200  $\mu$ l con 10 mM de buf-

fer acetato, pH 5,0. Los tratamientos se llevan a cabo con 0,5 mg de amilasa (1 h a 30°C) o con 0,5 mg de amiloglucosidasa (2 h a 50°C). En un ensayo control se incuba el producto en condiciones similares pero en ausencia de enzimas amilolíticas. Se termina la reacción enzimática agregando un volumen igual de ácido tricloroacético 10% (4°C). Se lava el precipitado y se determina la radioactividad insoluble remanente. Se extrae con éter el sobrenadante, para eliminar el ácido tricloroacético, se lo deioniza mediante filtración por una pequeña columna de Amberlita MB-3 (forma acetato) y se lo somete a cromatografía en papel para la identificación de los productos de hidrólisis.

#### Degradación de Smith del Producto

Se siguió el método descrito por Panayotatos y Villemez (1973). El producto radioactivo obtenido por precipitación con ácido tricloroacético 5% se disuelve en 0,1 ml de metaperiodato de sodio 0,05 M. La solución se conserva en un tubo tapado en la oscuridad durante 90 h a 3°C. Se agrega entonces 1 ml de borohidruro de sodio 0,1 M y luego de 30 min se hace un segundo agregado de 1 ml más, luego de lo cual se deja la mezcla durante 2 h a temperatura ambiente. Se elimina entonces el exceso de borohidruro por pasaje de la mezcla a través de una pequeña columna de la resina intercambiadora de cationes Dowex 50-W, forma H<sup>+</sup>. Se lava la columna con 7 ml aproximadamente de agua y el eluido se evapora a sequedad, eliminándose todo posible resto de ácido bórico por agregado de varias porciones de metanol seguidas de evaporación a sequedad

de la muestra. El residuo se disuelve con 0,5 ml de ClH 2N y se calienta en un tubo sellado a 100°C durante 2 h. Se deioniza la mezcla y se la somete a cromatografía en papel para identificar los productos.

#### Tratamiento del Producto con Pronasa

El producto obtenido por precipitación con ácido tricloroacético 5% solubilizado a pH alcalino y neutralizado, se incuba durante 2 h a 37°C en una mezcla que contiene 2  $\mu$ moles de buffer Tris-ClH, pH 8, 2  $\mu$ moles de ClK, 2 nmoles de Cl<sub>2</sub>Ca y 1  $\mu$ g de pronasa, en un volumen total de 20  $\mu$ l. Como control se incuba un producto en las mismas condiciones, pero en ausencia de pronasa. Al término de la incubación se agrega a las muestras 40  $\mu$ l de la mezcla para electroforesis (ver "Electroforesis en gel de poliacrilamida"), se calientan durante 1 min a 100°C y se someten a electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea en las condiciones descriptas.

#### CONTAJE DE RADIOACTIVIDAD

Las muestras resultantes de los ensayos de fosforilasa se transfirieron a cazoletas de aluminio, se secaron bajo lámpara infrarroja y se contaron en un contador de flujo gaseoso. En otros casos, se transfirieron a viales de plástico chicos, se agregaron 3,5 ml de la mezcla de centelleo descripta por Bray (1960) y se contó en un contador de centelleo líquido Packard Tri-Carb modelos 2202 y 2203. Este último fue el procedimien-

to seguido cuando se midieron alícuotas de fracciones provenientes de cromatografía o sedimentación en gradiente de sacarosa del producto radioactivo. Cuando se usaron filtros de nitrocelulosa (Millipore) para el ensayo de actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno, éstos fueron secados bajo lámpara infrarroja y se transfirieron a viales de plástico chicos. Se agregaron 4 ml de líquido de centelleo que contenía 4 g de Omnifluor (New England Nuclear) en 1 litro de tolueno, y se contó en contador de centelleo líquido Packard. La radioactividad de  $^{14}\text{C}$  se midió a 25% de ganancia y una ventana de 50 -  $\infty$  durante 1 min.

#### OTRAS TECNICAS

La proteína fue valorada por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina bovina como patrón. En todos los casos la proteína de la muestra fue precipitada con ácido tricloroacético en una concentración final de 10% y luego disuelta en NaOH 1N.

El fosfato inorgánico se dosó por el método de Fiske y SubbaRow (1925).

Para la separación de azúcares se utilizó el papel Whatman Nº 1 en cromatografía descendente utilizando la mezcla butanol:piridina:agua (4:3:4) (Leloir y col., 1971) para el análisis de los productos de tratamiento amilolíticos, o en una proporción (6:4:3) para el análisis de los productos de la degradación de Smith (Panayotatos y Villemez, 1973). Los azúcares se visualizaron con nitrato de plata alcalino (Trevelyan y col., 1950). Las sustancias radioactivas se localizaron mediante un radiocromatógrafo Packard modelo 7201. Los residuos de glucosa presentes en sustancias no dializables fueron valorados por el método descrito por Fox y col. (1976).

## RESULTADOS

### ACTIVIDADES DE FOSFORILASA DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE ACEPTOR EXOGENO EN LA FRACCION S<sub>140</sub>

Trabajos anteriores de este laboratorio (Tandecarz y col., 1975) mostraron la presencia de una actividad enzimática en una preparación no sedimentable a alta velocidad de tubérculo de papa (S<sub>140</sub>) capaz de transferir [<sup>14</sup>C]glucosa del [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P a un aceptor endógeno. El producto de la reacción así formado se recuperaba en la fracción insoluble después de precipitar con ácido tricloroacético 5%.

Se sometieron alícuotas de esta preparación enzimática a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes con el objeto de investigar la presencia de distintas formas moleculares de fosforilasa (Fig. 1).

El zimograma correspondiente a la figura 1a presenta tres bandas con actividad de fosforilasa cuando se la ensaya en presencia de glucógeno en la mezcla de incubación. Sin embargo, cuando se omite el glucógeno de la mezcla de incubación, aparece sólo una banda (Fig. 1b), cuya movilidad coincide con la de la banda de movilidad intermedia en la figura 1a.

El zimograma que se observa en la figura 1a es representativo de la mayoría de las preparaciones enzimática ensayadas. En algunos casos se observan hasta seis bandas de actividad fosforilásica en geles incubados



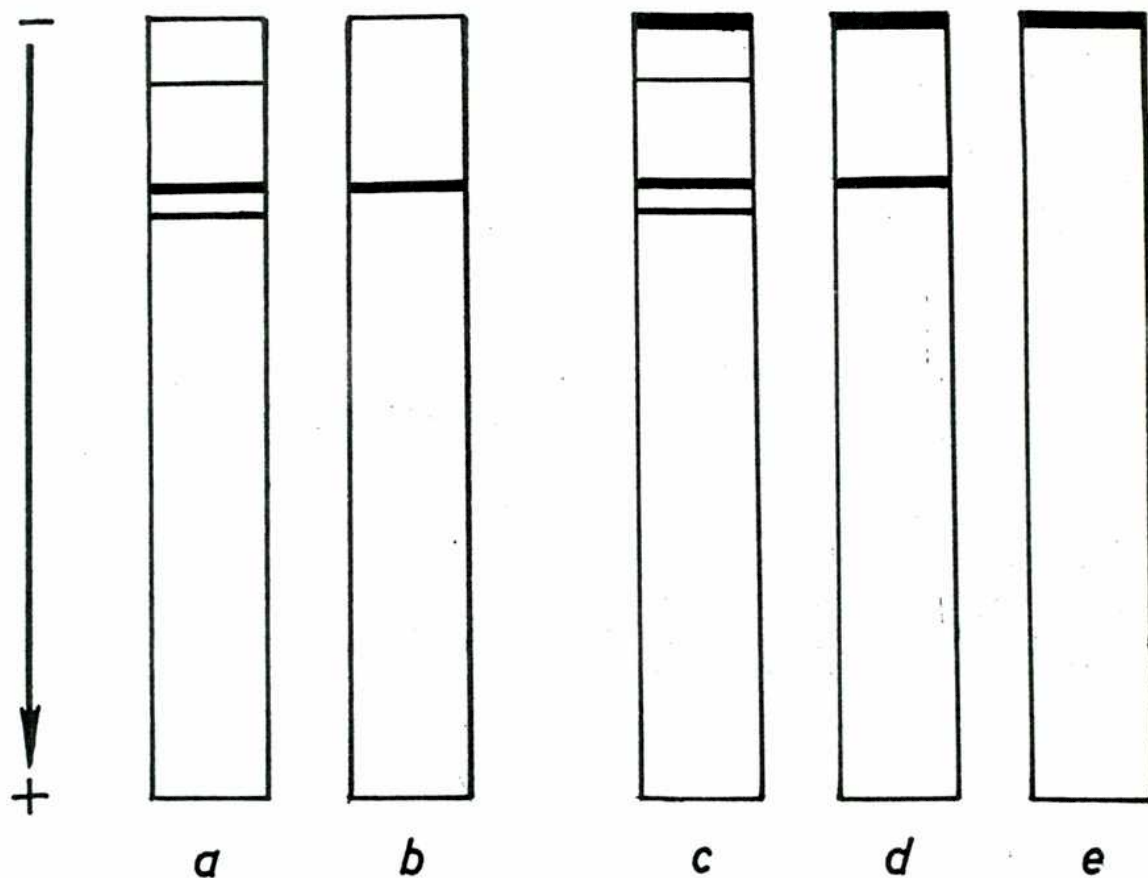


FIG. 1. Electroforesis del  $S_{140}$  en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. La preparación enzimática (110  $\mu$ g de proteína) no incubada (geles a y b) o incubada (geles c, d y e) en presencia de 20 mM glucosa-1-P durante 20 min, fue sometida a electroforesis en gel de 7% de acrilamida, como se indica en Materiales y Métodos. Geles a y c: se localizó actividad dependiente de aceptor exógeno. Geles b y d: se localizó actividad independiente de aceptor exógeno. Gel e: control coloreado con el reactivo de yodo.

en presencia de aceptor agregado (Tandecarz y col., 1978). Esto depende de la sensibilidad del método de detección, la que puede aumentarse incluyendo el glucógeno durante la polimerización de los geles (Stegeman, 1968).

Cuando la preparación enzimática es incubada con 20 mM glucosa-1-P antes de la electroforesis, aparece una nueva banda de baja movilidad en los zimogramas obtenidos en presencia (Fig. 1c) o en ausencia de glucógeno (Fig. 1d). Esta banda también puede ser detectada sumergiendo el gel en el reactivo de iodo inmediatamente después de la electroforesis (Fig. 1e). Se forma como resultado de la incubación con el éster fosfórico, ya que no aparece en un gel control en el que el S<sub>140</sub> se incubó en ausencia de glucosa-1-P antes de la electroforesis.

#### PURIFICACION PARCIAL DE LA FOSFORILASA INDEPENDIENTE DE ACEPTOR EXOGENO

Para estudiar la actividad fosforilásica independiente de aceptor exógeno se intentó su purificación a partir de la preparación enzimática S<sub>140</sub> obtenida según el método descrito por Tandecarz y col. (1975). Los tubérculos de papa pelados se rallan en rallador de vidrio, en presencia de 2-mercaptoetanol, y este homogenato se filtra a través de muselina. El extracto crudo así obtenido, luego de ser sometido a centrifugaciones sucesivas a 2000 y 25.000 x g para eliminar almidón y restos celulares, es ultracentrifugado a 140.000 x g, como se describe en Materiales y Méto-

dos. Se obtienen una fracción particulada y una no sedimentable. La fracción no sedimentable se lleva a 50% de saturación con solución saturada de sulfato de amonio y el precipitado obtenido, que tiene actividad de fosforilasa, se dializa contra buffer A. Este precipitado dializado constituye la fracción S<sub>140</sub>.

En la figura 2 se muestra el perfil de fosforilasas obtenido al cromatografiar una alícuota de la fracción S<sub>140</sub> (80-120 mg de proteína) por una columna de DEAE-celulosa y eluir la proteína con un gradiente continuo de cloruro de potasio de 0 - 0,5 M. Se obtuvieron tres picos con actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno, el primero de los cuales eluye a 0,17 M de ClK (pico I), el segundo a 0,28 M de ClK (pico II) y el tercero a 0,31 M de ClK (pico III) (Tandecarz y col., 1978). Cuando se ensayó actividad en ausencia de aceptor agregado en alícuotas de cada una de las fracciones de la columna, sólo se la pudo detectar en la zona del gradiente donde eluye el pico II, mientras que en las zonas correspondientes a los picos I y III no fue posible hacerlo, ni aún aumentando el tiempo de incubación o la concentración de proteína enzimática. La actividad relativa de cada una de estas fosforilasas es variable y depende de la preparación. Las fracciones que contienen cada pico de actividad de fosforilasa se juntaron separadamente y se concentraron por ultrafiltración a través de una membrana XM-50 (Amicon Corp.) que retiene proteínas de peso molecular mayor de 50.000.

La cromatografía en columna de DEAE-celulosa resulta en una purificación de la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno de unas 14 veces respecto del S<sub>140</sub>.

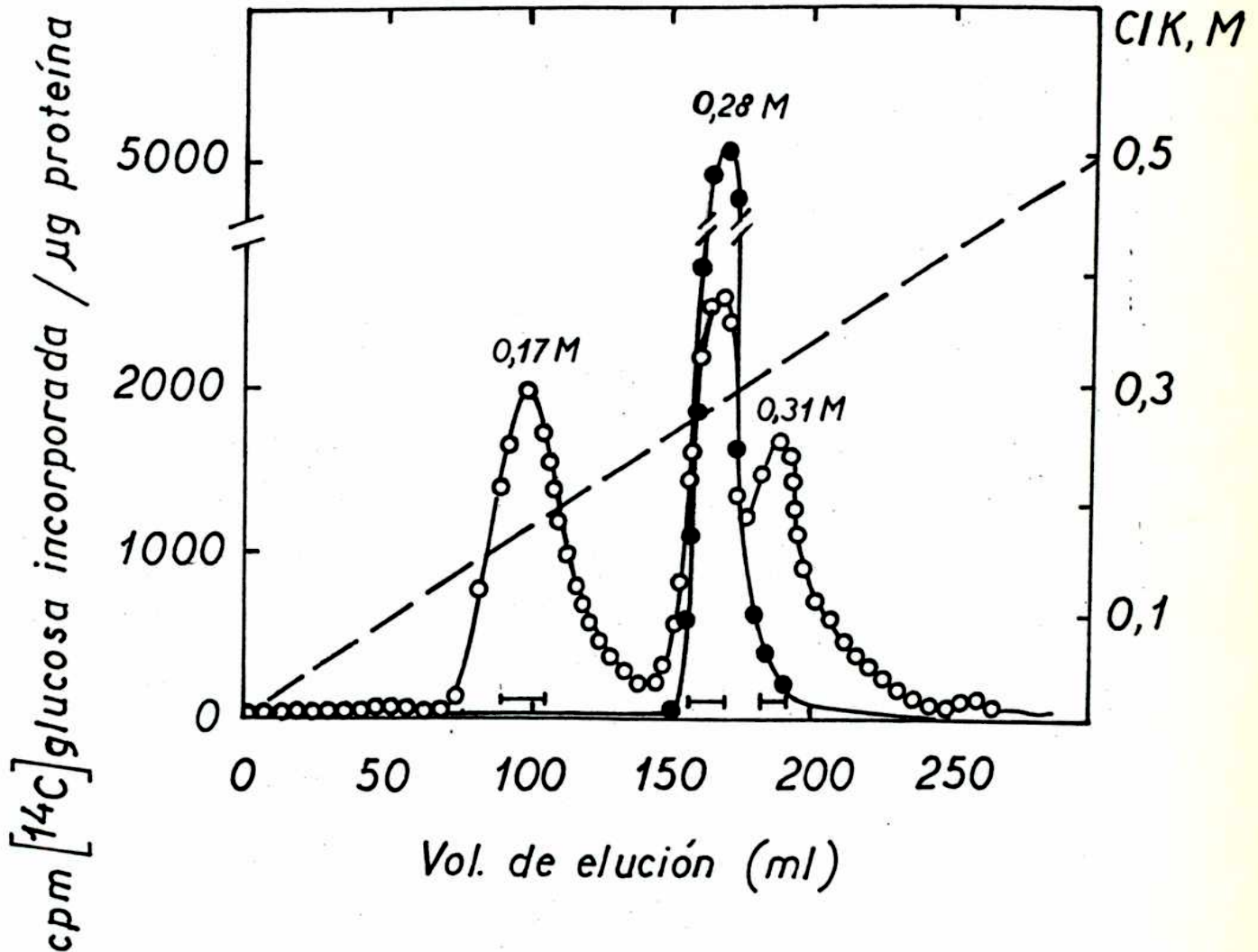


FIG. 2. Cromatografía en columna de DEAE-celulosa del S<sub>140</sub>. La cromatografía se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. En este caso, 50 mg de proteína en 1 ml fueron aplicados a una columna (1,8 x 15 cm) de DEAE-celulosa. Se recogieron fracciones de 4,5 ml y se midió actividad de fosforilasa dependiente (O) o independiente (●) de aceptor exógeno en alícuotas de 30 µl. Los tiempos de incubación fueron de 60 min para el ensayo de la actividad dependiente y de 180 min para la independiente de aceptor exógeno. Las demás condiciones de incubación fueron las del ensayo standard. Se juntaron las fracciones como se indica por las barras (—).

La figura 3 muestra los zimogramas en presencia de aceptor agregado que se obtienen con el pico II (DEAE) y con el S<sub>140</sub>. El zimograma correspondiente al pico II (DEAE) muestra una sola banda de actividad dependiente de aceptor agregado (Fig. 3b) coincidente con la banda de movilidad intermedia en el zimograma correspondiente al S<sub>140</sub>, en el cual se observan 3 bandas (Fig. 3a). En cambio, los zimogramas obtenidos al ensayar la actividad en ausencia de aceptor exógeno son similares para ambas preparaciones enzimáticas (Fig. 3c y 3d). Se observa una sola banda en ambos zimogramas, de movilidad similar a la de la única banda de actividad dependiente de aceptor presente en el pico II (DEAE) (Fig. 3b).

Para examinar la composición proteica del pico II (DEAE) y del S<sub>140</sub> se sometieron alícuotas de ambas preparaciones a electroforesis en gel de 10% de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea. Como se observa en la figura 4, los perfiles proteicos de ambas fracciones son marcadamente diferentes y varias bandas de proteína presentes en el S<sub>140</sub> no aparecen en el pico II (DEAE).

#### Activación por Albúmina

En los primeros ensayos de actividad independiente de aceptor agregado, realizados con las fracciones eluidas de DEAE-celulosa correspondientes al pico II (DEAE), los tiempos de incubación necesarios para detectar esa actividad eran muy largos, probablemente debido a la dilución.

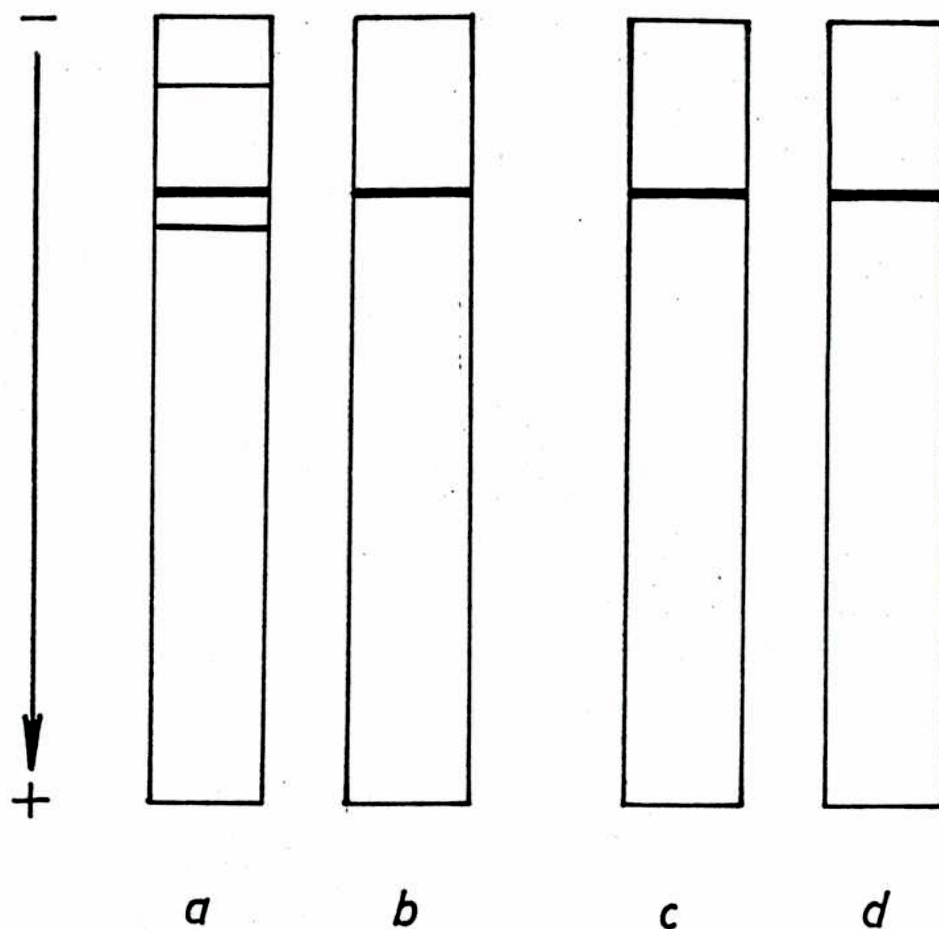


FIG. 3. Electroforesis en gel de 7% de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Muestras conteniendo 110  $\mu\text{g}$  de proteína de S<sub>140</sub> (geles a y b) y 5  $\mu\text{g}$  de proteína de pico II (DEAE) (geles c y d) se sometieron a electroforesis, como se indica en Materiales y Métodos. Se localizó la actividad de fosforilasa dependiente (a y c) e independiente (b y d) de aceptor exógeno.

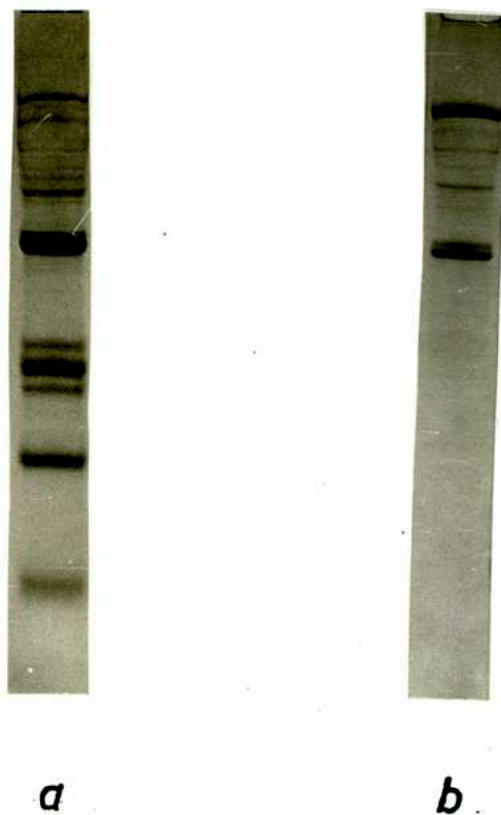


FIG. 4. Electroforesis en gel de 10% de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea. Muestras conteniendo 20  $\mu$ g de proteína de S140 (a) y de pico II (DEAE) (b) se sometieron a electroforesis como se describe en Materiales y Métodos. Se colorearon los geles con Coomassie brilliant blue.

Se encontró que el agregado de albúmina estimulaba notablemente la actividad en estudio (Tabla I).

TABLA I

Efecto de la concentración de albúmina sobre la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno del pico II (DEAE)

Albúmina (mg / ml)	[ <sup>14</sup> C]Glucosa incorporada (cpm)
-	3.951
0,4	6.593
1	9.940
2	9.312
3	11.791
5	11.647

Las condiciones se describen en Materiales y Métodos, excepto la concentración de albúmina que se varió como se indica. Proteína enzimática en la mezcla de incubación: 5 µg. Tiempo de incubación: 180 min.

#### ALGUNAS PROPIEDADES DE LA FOSFORILASA PICO II

#### INDEPENDIENTE DE ACEPTOR EXOGENO

Se midió la incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa a partir de [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P a material insoluble en ácido tricloroacético, catalizada por el pico II (DEAE), en presencia y ausencia de aceptor exógeno. En la figura 5 se muestra que la reacción en ausencia de aceptor agregado presenta un período de latencia inicial, a diferencia de lo que sucede cuando se ensa-



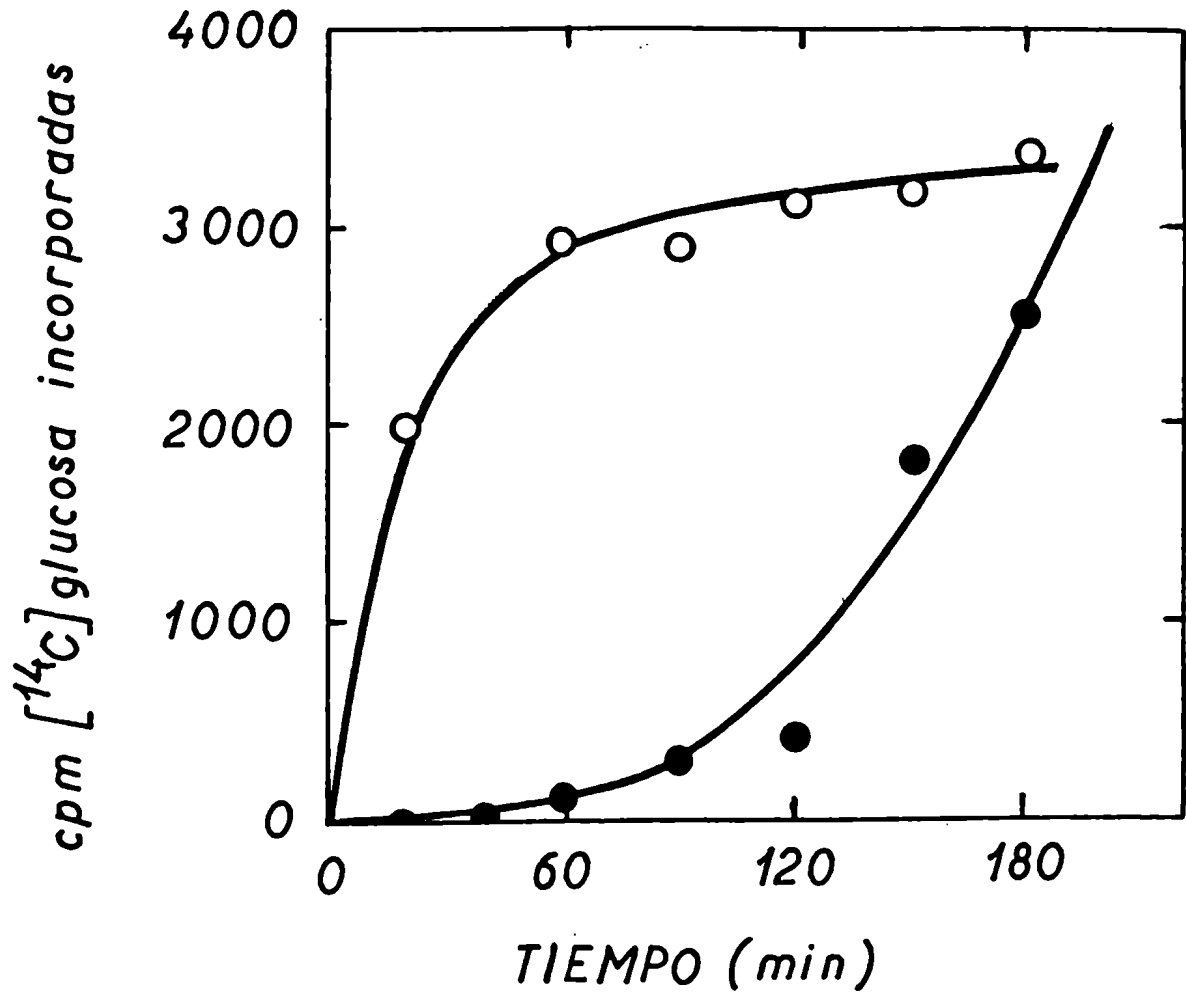


FIG. 5. Curva de tiempo de fosforilasa pico II (DEAE). (●) Actividad de fosforilasa independiente de aceptor agregado. (○) Actividad de fosforilasa dependiente de aceptor agregado. Las condiciones de incubación se describen en Materiales y Métodos. Se utilizaron 6  $\mu$ g de proteína enzimática para cada ensayo.

ya actividad en presencia de polisacárido exógeno donde se observa una relación lineal durante los primeros minutos de incubación. Para este ensayo se usó glucógeno, pero otros polisacáridos ensayados, como amilopectina o fitoglucógeno, permiten obtener resultados similares.

El efecto de la concentración de proteína sobre la cinética de la actividad independiente de aceptor exógeno se ilustra en la figura 6. Se observa que el aumento de proteína enzimática en la mezcla de reacción resulta en una reducción de la duración del período de latencia. Un efecto similar se logra por agregado de albúmina durante la incubación. Estos resultados explicarían en parte el efecto activador de la albúmina sobre la actividad de fosforilasa independiente de aceptor agregado en fracciones muy diluidas de la columna de DEAE-celulosa (Tabla I).

Con el objeto de investigar si este tipo de cinética era debida al método de medición de actividad utilizado, se siguió el curso de la reacción en ausencia de aceptor exógeno por medición del fósforo inorgánico liberado según el método descrito por Fiske y SubbaRow (1925), observándose una cinética similar (Fig. 7). En este caso se usó como fuente de enzima el S<sub>140</sub>.

El producto sintetizado por la enzima forma un complejo de color azul con el reactivo de iodo. La figura 8 muestra el espectro de absorción de este complejo, que tiene un máximo a 590 nm. La actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno, medida por la formación del complejo azul con el reactivo de iodo, se ilustra en la figura 9. La cinética que se observa es similar a la obtenida por los otros métodos utilizados (Figs. 5 y 7).

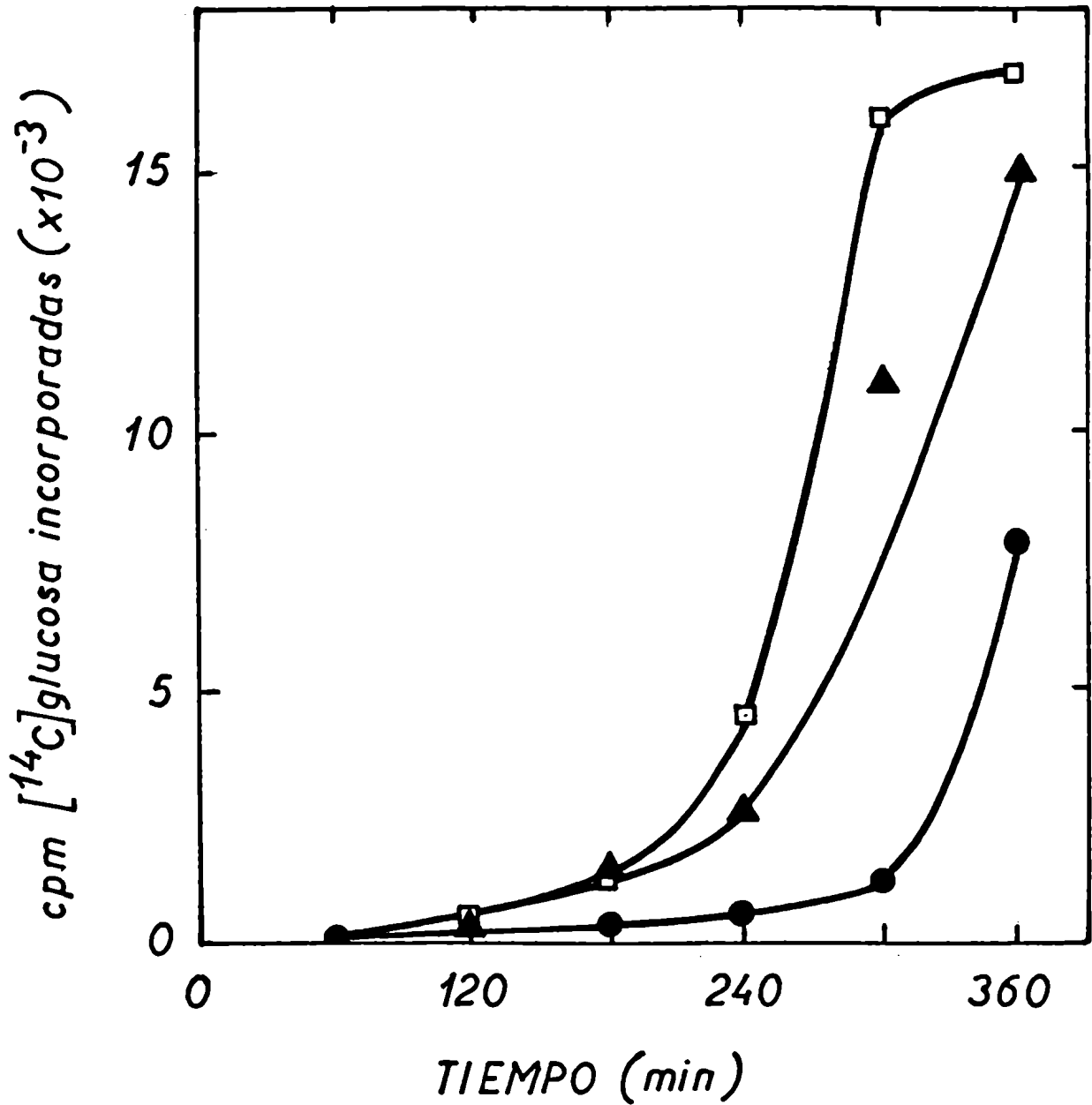


FIG. 6. Efecto de la concentración de proteína sobre la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Las incubaciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, excepto la cantidad de proteína, que fue como se indica: (●) 2,4  $\mu$ g de proteína de pico II (DEAE); (▲) 2,4  $\mu$ g de proteína de pico II (DEAE) + 250  $\mu$ g de seroalbumina bovina; (□) 3,6  $\mu$ g de proteína de pico II (DEAE).

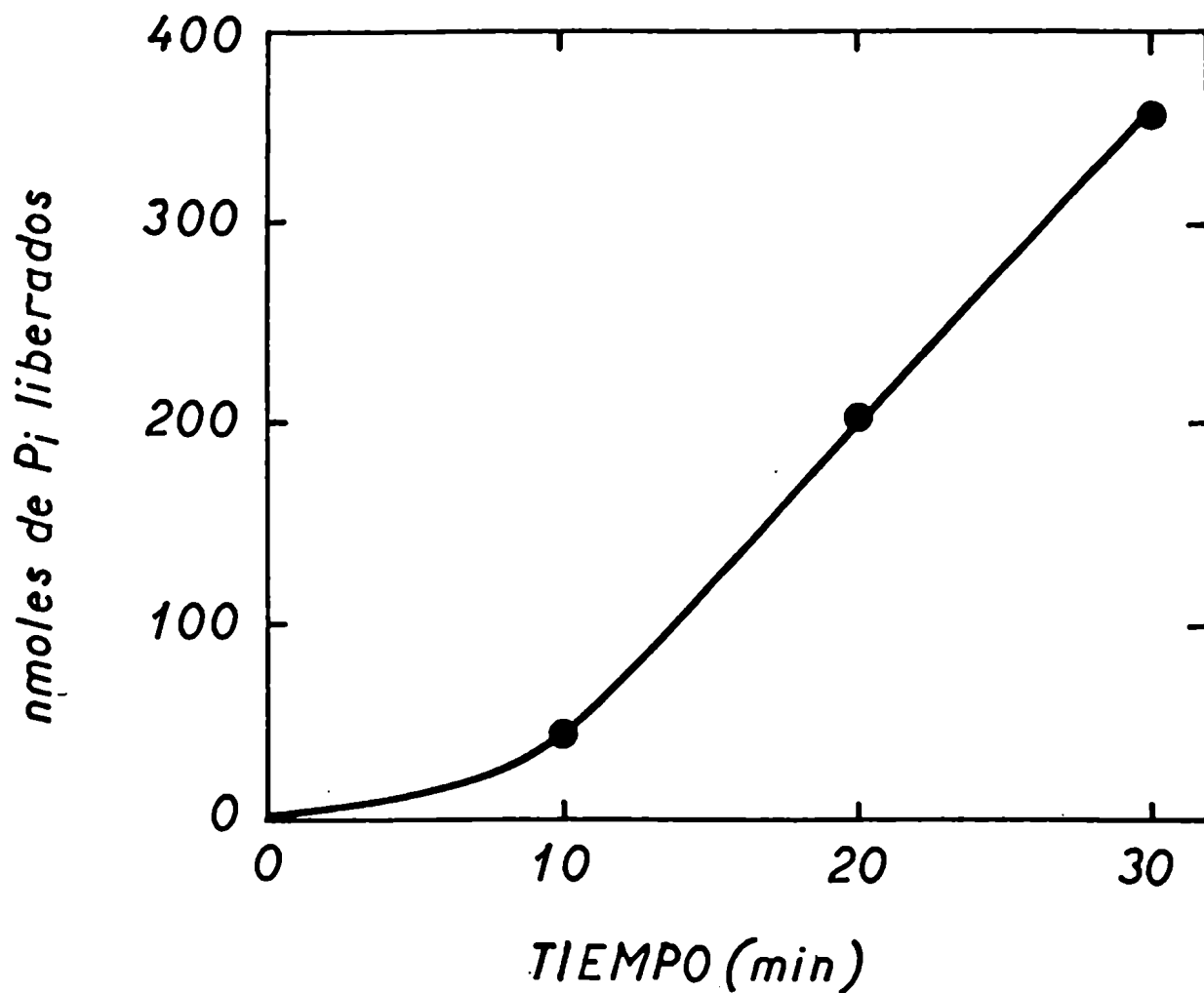


FIG. 7. Curva de tiempo de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Se usó como fuente de enzima el S<sub>140</sub> (275  $\mu$ g de proteína). A los tiempos indicados se midió el  $P_i$  liberado, como se describe en Materiales y Métodos.

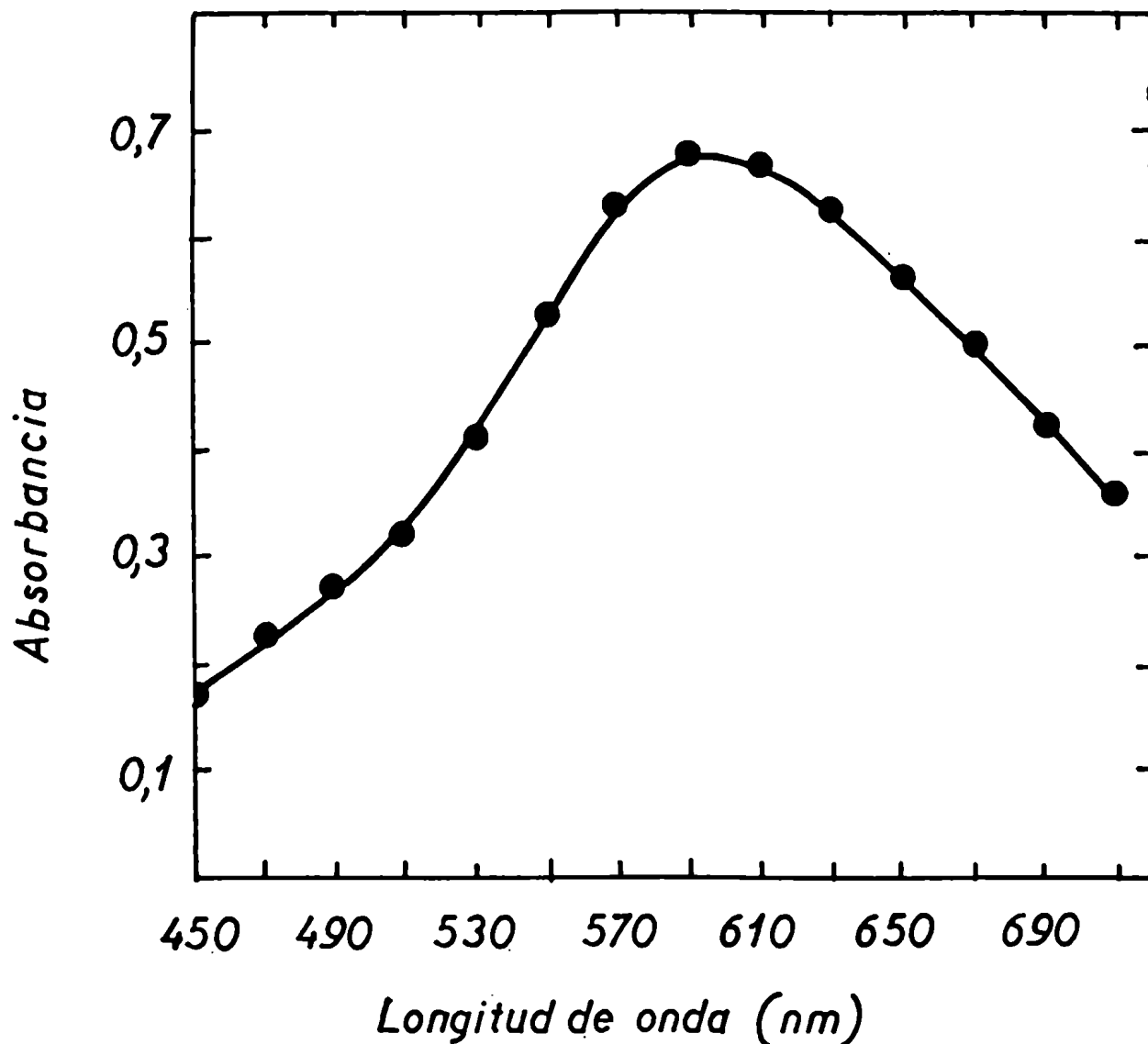


FIG. 8. Espectro de absorción del complejo formado por el producto de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno con el reactivo de iodo. La formación del complejo con el reactivo de iodo se midió a los 20 min de incubación. Se usó como fuente de enzima el pico II (DEAE) (10  $\mu$ g de proteína). Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

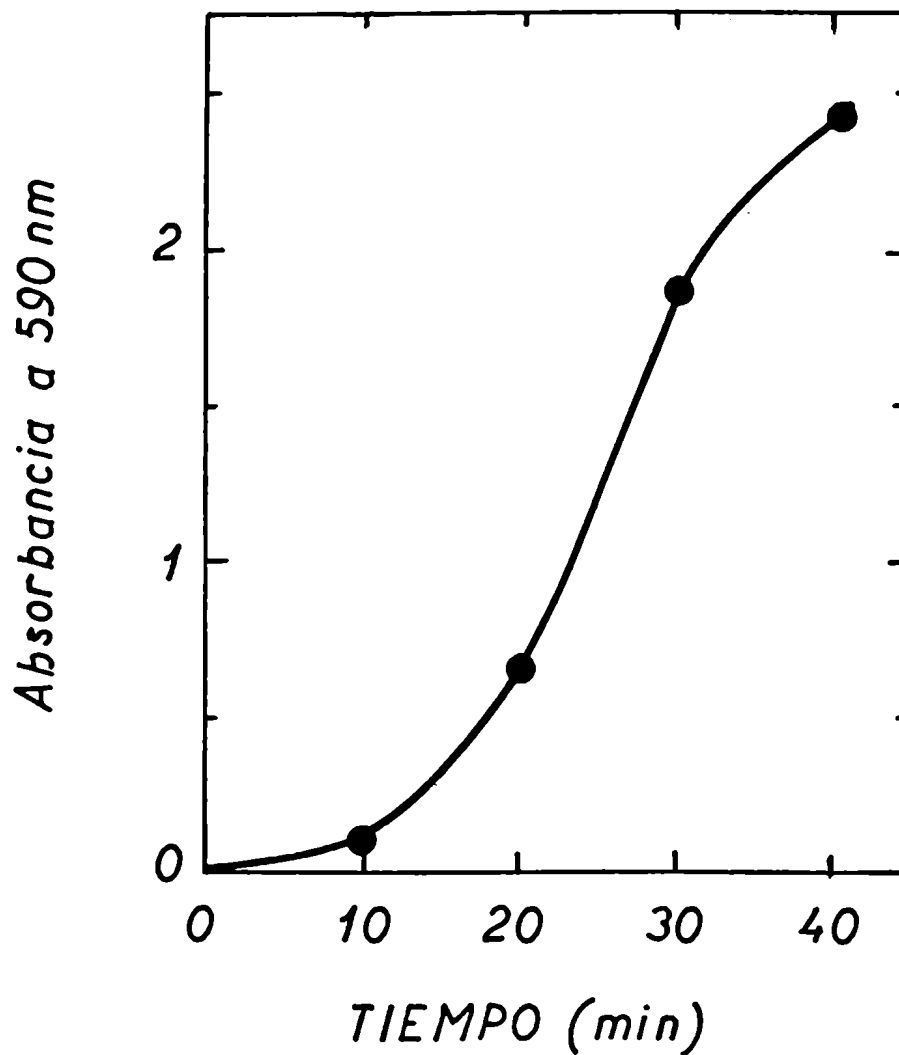


FIG. 9. Curva de tiempo de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Se usó como fuente de enzima el pico II (DEAE) (10  $\mu$ g de proteína). A los tiempos que se indican en la figura se agregó el reactivo de iodo y se midió la absorbancia a 590 nm. Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

El efecto de la concentración de glucosa-1-P sobre la incorporación del sustrato radioactivo a material insoluble en ácido tricloroacético 5% en función del tiempo, puede verse en la figura 10A. El aumento de la concentración de sustrato reduce la duración del período de latencia, pero no lo elimina. Luego de este período, hay un intervalo de tiempo en el cual la velocidad de la reacción es constante. En la figura 10B se representa la velocidad, calculada de las pendientes de las curvas de la figura 10A, en función de las concentraciones de glucosa-1-P.

Con el objeto de investigar las razones de este período de latencia, se llevó a cabo el siguiente experimento en 2 etapas: durante la 1<sup>o</sup> etapa se incubó una alícuota del pico II (DEAE) con 30 mM glucosa-1-P durante 60 min. En la 2<sup>o</sup> etapa se agregó [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P y se incubó durante diferentes tiempos. Se hizo un control en el que se omitió la incubación de la 1<sup>o</sup> etapa. En ambos casos, se mide la incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa a material insoluble en ácido tricloroacético en función del tiempo al que se agrega el dador de glucosa radioactiva. La figura 11 muestra la desaparición del período de latencia en la incorporación de glucosa marcada cuando hay una 1<sup>o</sup> etapa de incubación con 30 mM de glucosa-1-P. En este caso, al cabo de la 1<sup>o</sup> etapa, es posible detectar en una alícuota de la mezcla de incubación, la formación de un producto que, ensayado con el reactivo de iodo, da color azul.

Se llevó a cabo el siguiente experimento para determinar si el producto de la reacción podía servir como aceptor de la enzima en condiciones de baja concentración de glucosa-1-P, en las que no se detecta acti-

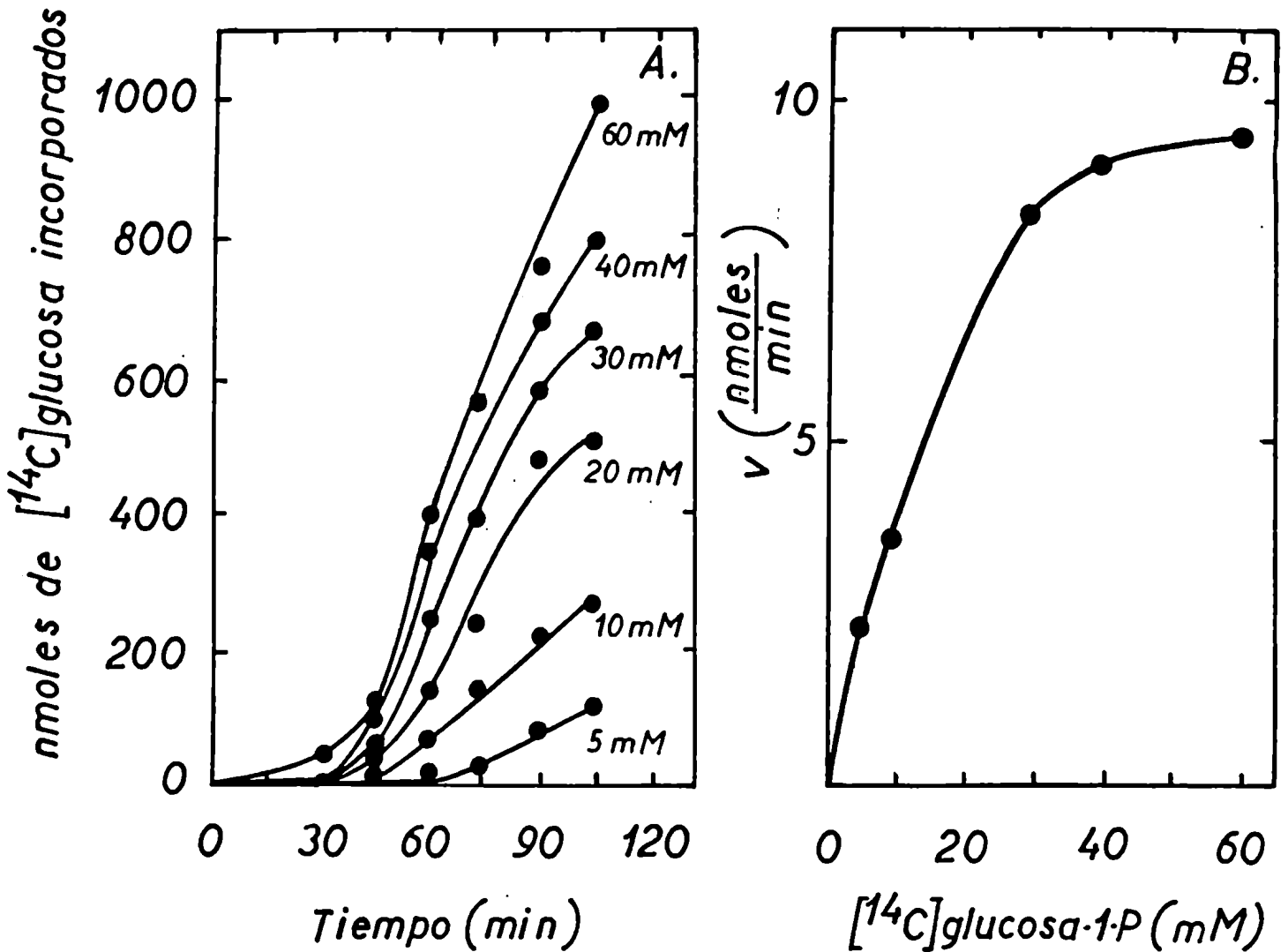
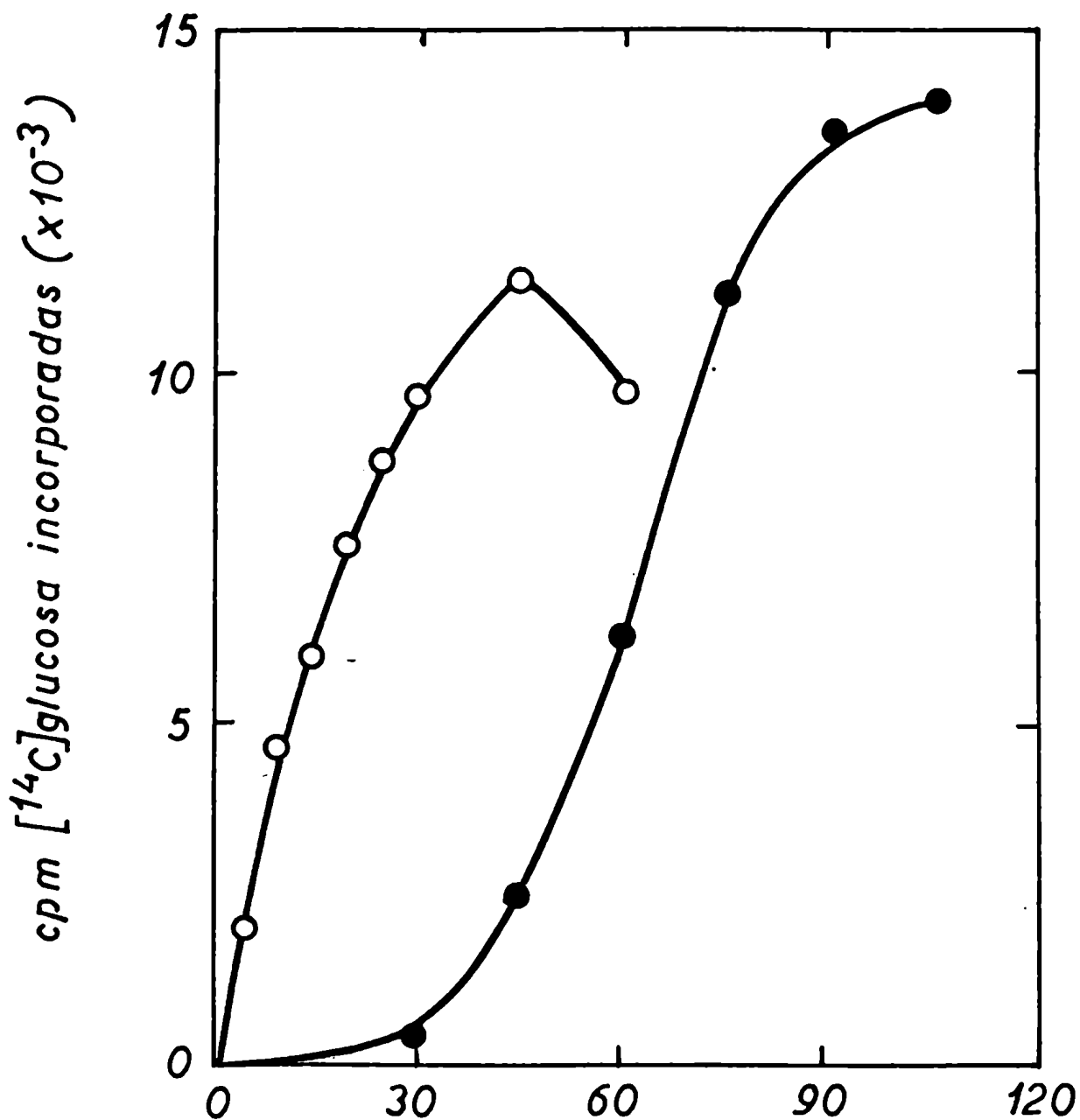


FIG. 10. Efecto de la concentración de  $[^{14}\text{C}]$ glucosa-1-P sobre la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Las condiciones experimentales fueron las que se indican en Materiales y Métodos excepto por las diferentes concentraciones de glucosa-1-P utilizadas y por la presencia de 0,1 M buffer MES, pH 5,7, en la mezcla de reacción. Se usó como fuente de enzima el pico II (DEAE) (4  $\mu\text{g}$  de proteína). A. Curva de tiempo. B. Velocidades en función de la concentración de  $[^{14}\text{C}]$ glucosa-1-P. Las mismas se calcularon de las pendientes de las curvas de producto en función del tiempo después del período de latencia.





*Tiempo a partir del agregado de  $[^{14}\text{C}]$ glucosa-1-P (min)*

FIG. 11. Actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Se usó como fuente de enzima el pico II (DEAE) (5  $\mu\text{g}$  de proteína) y las incubaciones se hicieron en presencia de 0,1 M de buffer MES, pH 5,7 y de 5 mg/ml de albúmina. ( $\circ$ ) Se agregó  $[^{14}\text{C}]$  glucosa-1-P después de incubar la enzima con 30 mM glucosa-1-P durante 60 min. ( $\bullet$ ) Se incubó la enzima con 30 mM  $[^{14}\text{C}]$  glucosa-1-P.

vidad en ausencia de aceptor agregado: se incubó durante 30 min el pico II (DEAE) (250 µg de proteína) con glucosa-1-P en concentración 20 mM y se pasó la mezcla de incubación por una pequeña columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer A para eliminar el exceso del éster fosfórico. En el volumen de exclusión está la enzima y también el producto sintetizado por la misma, cuya presencia se controla en una alícuota por el color azul que da con el reactivo de iodo.

Se somete al mismo tratamiento una alícuota de pico II (DEAE) incubado en ausencia de glucosa-1-P, como control. En este caso, se obtiene sólo la enzima en el volumen de exclusión. Se incuban alícuotas de 30 µl de los respectivos volúmenes de exclusión con [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P en concentración µM, durante 20 min. Se mide la radioactividad incorporada y los resultados se muestran en la Tabla II.

TABLA II

Incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa a partir de [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P 4 µM en ausencia de aceptor exógeno

---

	[ <sup>14</sup> C]Glucosa incorporada a material insoluble en ácido tricloroacético 5% (cpm)
Enzima incubada con glucosa-1-P 20 mM	527
Control	43

---

Alícuotas de 30 µl de los volúmenes de exclusión de Sephadex G-25 (5 µg de proteína enzimática), fueron incubadas durante 20 min con 4 µM de [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P (17.000 cpm) en presencia de 0,1 M de buffer MES, pH 5,7, y 5 mg/ml de albúmina.

Como se observa el pico II (DEAE) incorpora [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P 4  $\mu\text{M}$ , en ausencia de aceptor exógeno, sólo cuando fue incubado previamente con glucosa-1-P 20 mM.

Con el objeto de investigar la capacidad del producto para aceptar glucosa de otros dadores, se llevó a cabo el siguiente experimento: se incubaron alícuotas de pico II (DEAE) con glucosa-1-P 20 mM, albúmina y el dador de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa correspondiente. Se incluyeron controles en los que se omitió el éster fosfórico. Al término de la incubación se midió la radioactividad incorporada en el material insoluble en ácido tricloroacético 5% y los resultados se muestran en la Tabla III.

TABLA III

Capacidad aceptora del producto de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno

Dador de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa	[ $^{14}\text{C}$ ]Glucosa incorporada a material insoluble en ácido tricloroacético 5%	
	+ glucosa-1-P 20 mM (cpm)	- glucosa-1-P 20 mM (cpm)
ADP[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa	2281	56
UDP[ $^{14}\text{C}$ ]glucosa	638	108

Las mezclas de reacción conteniendo pico II (DEAE) (2  $\mu\text{g}$  de proteína), 250  $\mu\text{g}$  de albúmina y 0,088 nmol de ADP [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa (32.000 cpm) o 0,075 nmol de UDP [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa (26.000 cpm), en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ , se incubaron durante 60 min a 37°C y se midió incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa como se describe en Materiales y Métodos.

Se observa que hay incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa a material insoluble en ácido tricloroacético 5% a partir de ambos nucleótido-azúcares, sólo cuando también está presente la glucosa-1-P en la mezcla de reacción, condiciones bajo las cuales se forma el producto con capacidad aceptora.

### Efecto de pH

La figura 12 muestra la actividad de fosforilasa medida en ausencia de aceptor en función de distintos valores de pH en la mezcla de incubación. La actividad máxima se observa alrededor de pH 6,1 con buffer citrato y de pH 5,7 con buffer MES. Por debajo de pH 5 (buffer citrato) o a pH mayores de 8,2 no se observa incorporación de radioactividad a material insoluble en ácido tricloroacético 5%. En la misma figura se grafica el efecto del pH sobre la actividad medida en presencia de glucógeno. Puede observarse que, aunque el pH óptimo es similar al encontrado para la actividad de fosforilasa independiente de aceptor agregado, el rango de pH útil es más amplio y a pH 8,2 todavía hay un 40% de actividad en presencia de aceptor exógeno.

### Efecto de Cationes Divalentes

Tandecarz y col. (1975) describen un efecto activador del  $\text{Mn}^{2+}$  de hasta 10 veces sobre la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno del  $\text{S}_{140}$ . Aunque se describió un efecto similar en fosforilasa de algas (Fredrick, 1959), no hemos encontrado otros datos en la

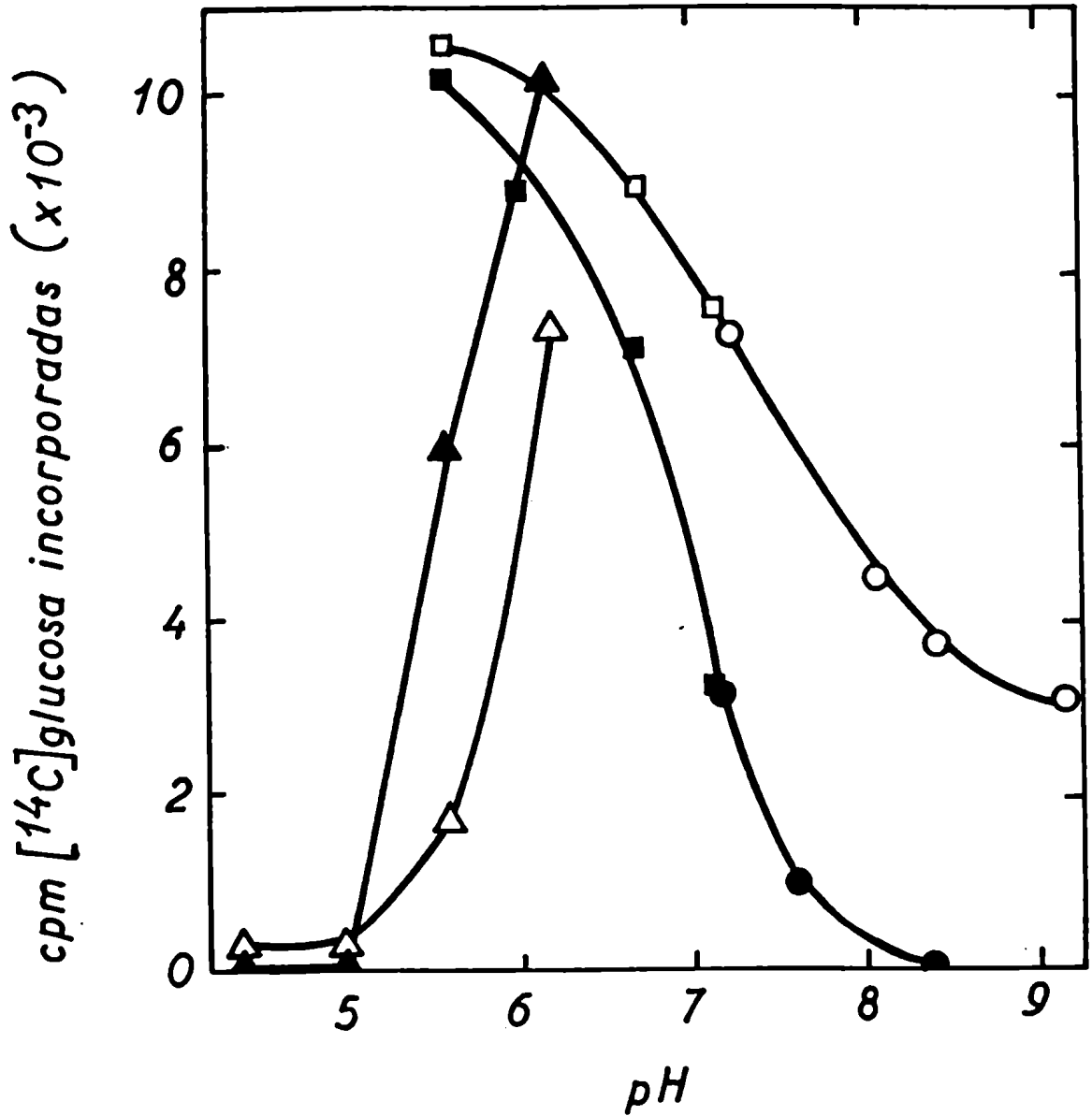


FIG. 12. Efecto del pH sobre la actividad de fosforilasa del pico II (DEAE). La actividad de fosforilasa independiente ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) o dependiente ( $\triangle$ ,  $\circ$ ,  $\square$ ) de aceptor exógeno se ensayó en presencia de 0,1 M buffer MES ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ) o 0,1 M buffer citrato ( $\triangle$ ,  $\blacktriangle$ ) o 0,1 M buffer Tris-ClH ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) a los valores de pH indicados en la figura. Proteína enzimática en la mezcla de incubación: 4  $\mu$ g. La actividad de fosforilasa independiente de aceptor se midió en presencia de 250  $\mu$ g de albúmina y el tiempo de incubación fue de 120 min. El tiempo de incubación para la actividad dependiente de aceptor exógeno fue de 60 min. Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

literatura acerca de un efecto de este tipo sobre fosforilasas de plantas superiores. Por esta razón, se volvió a investigar el fenómeno con el pico II (DEAE) y los resultados se resumen en la Tabla IV.

TABLA IV

Efecto de cationes  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  en presencia y en ausencia de 5 mg/ml de albúmina sobre la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno

Agregados	Incorporación de radioactividad	
	- Albúmina (cpm)	+ Albúmina (cpm)
Ninguno	2.440	12.388
$Cl_2Mg$ , 20 mM	2.019	14.217
$Cl_2Mn$ , 20 mM	325	2.244

Proteína enzimática de pico II (DEAE) en el ensayo: 1,2  $\mu$ g.  
Tiempo de incubación: 165 min.  
Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

Se ve que el  $Mn^{2+}$  inhibe la actividad ensayada en presencia o en ausencia de albúmina, mientras que el  $Mg^{2+}$ , cuyo efecto se estudió con fines comparativos, no afecta significativamente la reacción.

La estimulación encontrada con la enzima del  $S_{140}$  poco purificada (Tandecarz y col., 1975) podría explicarse por competición del  $Mn^{2+}$  con algún metal que inhibiría a la enzima. Sobre preparaciones más purificadas, como el pico II (DEAE), este efecto no se observa.

Efecto de 1,5-D-Gluconolactona

Un efecto inhibitorio de la 1,5-D-gluconolactona sobre la fosforilasa fue descrito por Tu y col. (1971) y Gold. y col. (1971). La existencia de dos etapas en la formación de una glucoproteína por una fracción particulada de tubérculo de papa fue confirmada por el diferente comportamiento frente a esta lactona de las actividades enzimáticas involucradas (Tandecarz y Cardini, 1979).

Se consideró de interés estudiar el efecto de la 1,5-D-gluconolactona sobre la actividad independiente de aceptor exógeno. En la Tabla V puede observarse que la lactona, en las distintas concentraciones usadas, inhibe la actividad de fosforilasa cuando se la ensaya en ausencia de polisacárido exógeno.

TABLA V

Efecto de la 1,5-D-gluconolactona sobre la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno

Agregados	Radioactividad incorporada (cpm)	Inhibición (%)
Ninguno	6024	-
1,5-D-Gluconolactona		
4 mM	3158	48
8 mM	2177	64
12 mM	1411	77

### Inactivación térmica

En el tubérculo de papa hay amilasas que deben ser inactivadas durante la preparación de fosforilasa, ya que interfieren con la medición de la actividad de esta última. Los métodos usados por distintos autores para inactivar las amilasas incluyen el calentamiento del extracto crudo a temperaturas de 54°C a 56°C, a pH 7 ó 7,2, por períodos que oscilan entre 10 y 40 min (Holló y col., 1964; Kamogawa y col., 1968). Según estos autores, este tratamiento inactiva las amilasas sin afectar significativamente a la fosforilasa. Se consideró de interés estudiar el efecto del calentamiento sobre la fosforilasa independiente de polisacárido agregado. Se preincubaron durante 10 min a distintas temperaturas alícuotas del pico II (DEAE), en presencia de albúmina y buffer MES a pH 5,7. Se midió luego la actividad remanente de fosforilasa independiente de aceptor exógeno a 37°C, agregando el dador de glucosa. Se observa que hasta 40°C la actividad se mantiene constante y que a los 55°C se pierde el 100% de la misma (Fig. 13).

Sin embargo la presencia de albúmina y del buffer MES a pH 5,7 podrían tener alguna influencia sobre la enzima durante la preincubación. Por este motivo se estudiaron los efectos de la presencia de ambos activadores sobre la inactivación térmica y los resultados se exhiben en la Tabla VI.

Si se incuba directamente la enzima sin preincubación, se observan claramente los efectos activadores de la albúmina y del buffer MES a pH 5,7. La preincubación a 37°C no afecta mayormente la actividad de la



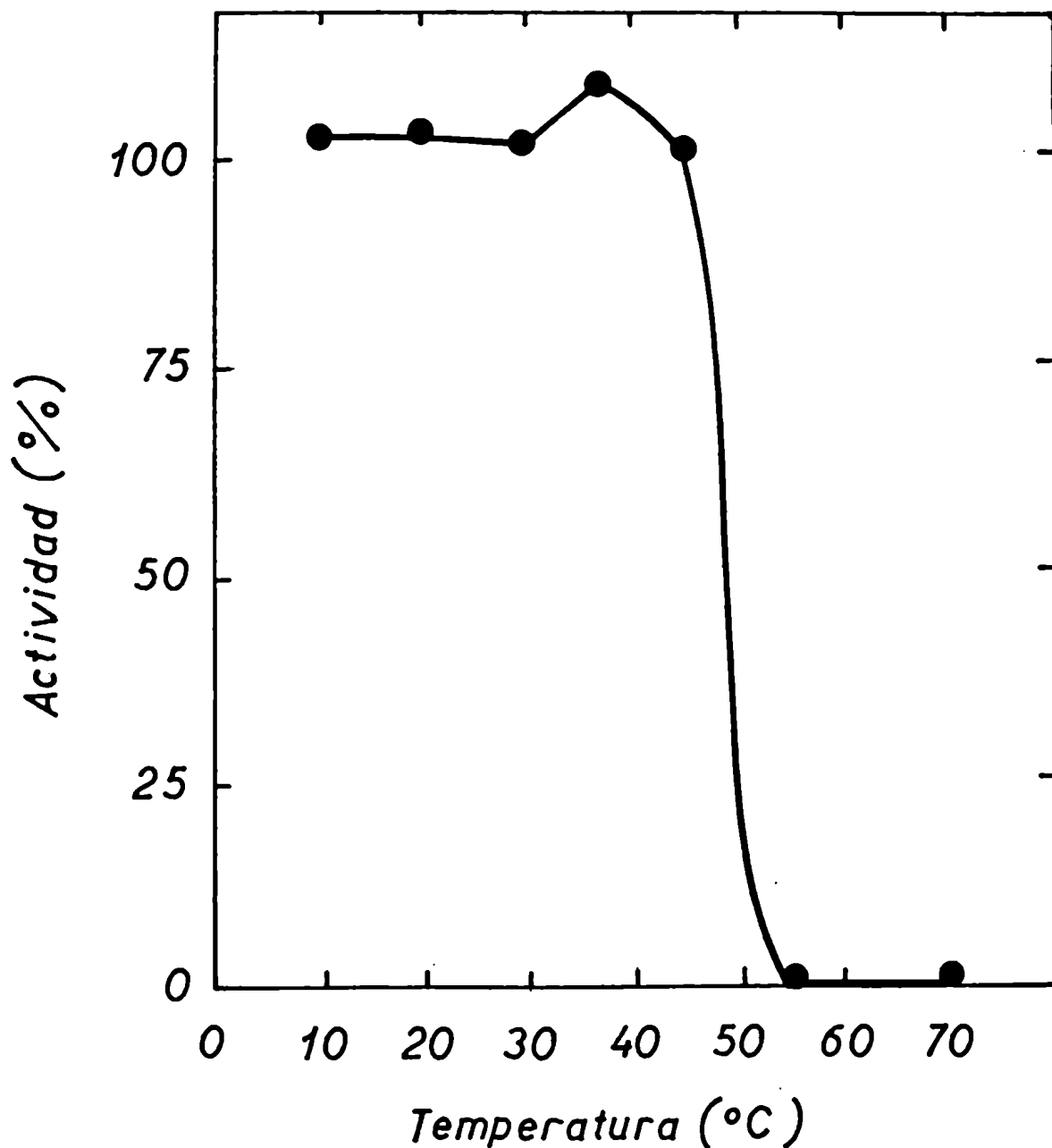


FIG. 13. Estabilidad térmica de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Alícuotas del pico II (DEAE) conteniendo 4  $\mu$ g de proteína fueron preincubadas en presencia de 0,1 M de buffer MES, pH 5,7 y 5 mg/ml de albúmina durante 10 min a las temperaturas indicadas e inmediatamente enfriadas a 0°C. El ensayo de actividad enzimática se hizo después del agregado de [ $^{14}$ C] glucosa-1-P (20 mM) y se incubó a 37°C durante 120 min. El experimento sin preincubación se toma como 100% de actividad.

TABLA VI

Efecto de temperatura de preincubación sobre la activación por albúmina (5 mg/ml) y buffer MES 0,1 M, pH 5,7 de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno

Agregados durante la preincubación	Agregados durante la incubación	Incorporación de radioactividad	
		sin preincubación (cpm)	con preincubación a 37°C (cpm) 55°C (cpm)
Nada	Nada	170	93
Nada	Albúmina	1226	1051
Nada	Buffer MES	7268	7013
Nada	Albúmina + buffer MES	8334	6659
Albúmina	Nada	-	3115
Albúmina	Buffer MES	-	6800
Buffer MES	Nada	-	6819
Buffer MES	Albúmina	-	7401
Albúmina + buffer MES	Nada	-	7915

La mezcla de reacción conteniendo 30 µl (7,5 µg de proteína) de pico II (DEAE) fue preincubada durante 10 min a las temperaturas y con los agregados indicados en la tabla. Al final de la preincubación, se agrega [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P 20 mM y se incuba durante 180 min a 37°C con los agregados que se indican en cada caso. Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

enzima medida en presencia o en ausencia de estos activadores. Cuando se preincuba a 55°C no se detecta actividad enzimática ni aún agregando albúmina a la mezcla de incubación. Sin embargo, hay cierta actividad remanente, la que puede evidenciarse agregando buffer a la mezcla de incubación. Este efecto activador del buffer se incrementa por el agregado de albúmina (Tabla VI).

En la misma tabla se observa la diferencia entre ambos activadores, en cuanto a sus efectos sobre la enzima durante la preincubación a 55°C. La albúmina tiene un efecto protector sobre la actividad enzimática mientras que el buffer favorece la inactivación de la misma. La albúmina no tiene efecto en presencia del buffer durante la preincubación.

Estudios similares realizados para estudiar el efecto de la preincubación sobre la actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno del pico II (DEAE) mostraron que esta actividad es más resistente a la inactivación térmica que la actividad independiente de aceptor agregado (datos que no se muestran).

#### PRESENCIA DE COMPUESTOS GLUCOSILADOS EN LA PREPARACION ENZIMATICA

La actividad enzimática independiente de aceptor exógeno de fosforilasas y sintetasas de almidón de diversas fuentes ha sido atribuida por distintos autores a la presencia de pequeñas cantidades de polímeros de glucosa que contaminaban las preparaciones enzimáticas en estudio (Ka-

waguchi y col. , 1978; Kamogawa y col. , 1968). Se investigó la presencia de estos polímeros de glucosa en el pico II (DEAE) mediante el método descrito por Fox y col. (1976). Este método permite valorar residuos de glucosa presentes en compuestos no dializables, ya sea como polímeros de glucosa o glucosa unida a proteína. Se encontró para distintas preparaciones de pico II (DEAE) ensayadas, valores que oscilaban entre 6-25  $\mu\text{g}$  de anhidroglucosa por mg de proteína. Con el objeto de investigar si estos residuos de glucosa están unidos entre sí por uniones  $\alpha$ -1,4, se incubó el pico II (DEAE) en condiciones que favorecen la fosforólisis. Una alícuota de la preparación enzimática (100  $\mu\text{g}$  de proteína) fue incubada durante 60 min a 37°C en buffer fosfato 0,125 M en un volumen final de 0,1 ml, luego de lo cual fue dializada contra 250 ml de buffer A durante 16 h. Un control fue incubado en condiciones similares, pero con buffer A. Se midieron las actividades de fosforilasa independiente y dependiente de aceptor exógeno y los resultados se muestran en la Tabla VII.

Puede observarse que ninguna de las dos actividades es afectada por este tratamiento.

Schieffer y col. (1978) y Kawaguchi y col. (1978) describieron la desaparición de las actividades independientes de aceptor exógeno en sintetasa de maíz dulce y en glucógeno sintetasa de Escherichia coli, respectivamente, por tratamiento de las preparaciones enzimáticas con amiloglucosidasa. Kamogawa y col. (1968) encontraron resultados similares para la fosforilasa de papa.

TABLA VII

Efecto de la incubación del pico II (DEAE) en buffer de fosfato sobre la actividad de fosforilasa dependiente e independiente de aceptor exógeno

Tratamiento	Actividad de fosforilasa*	
	- aceptor exógeno	+ aceptor exógeno
Incubación en buffer fosfato 0,125 M	2735	3056
Incubación en buffer A	2732	2622

\*Se expresa como cpm de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa incorporadas, como se describe en Materiales y Métodos.

Proteína enzimática en cada ensayo: 15  $\mu\text{g}$ . La actividad independiente de aceptor exógeno se ensayó en presencia de 0,1 M buffer MES, pH 5,7 y de 5 mg/ml de albúmina, el tiempo de incubación fue de 30 min. La actividad dependiente de aceptor exógeno se ensayó en presencia de 0,1 M buffer MES, pH 5,7, y el tiempo de incubación fue de 10 min.

Para estudiar el efecto que un tratamiento de este tipo podía tener sobre el pico II (DEAE) se trataron alícuotas del mismo con amiloglucosidasa. Luego de someter las muestras así tratadas a electroforesis en geles de 7% de acrilamida en condiciones no desnaturizantes, se ensayó actividad de fosforilasa dependiente e independiente de aceptor exógeno (Fig. 14). Puede observarse que este tratamiento no afectó la intensidad ni la movilidad de las bandas de actividad de fosforilasa ensayadas en presencia o en ausencia de glucógeno respecto a la de controles en los

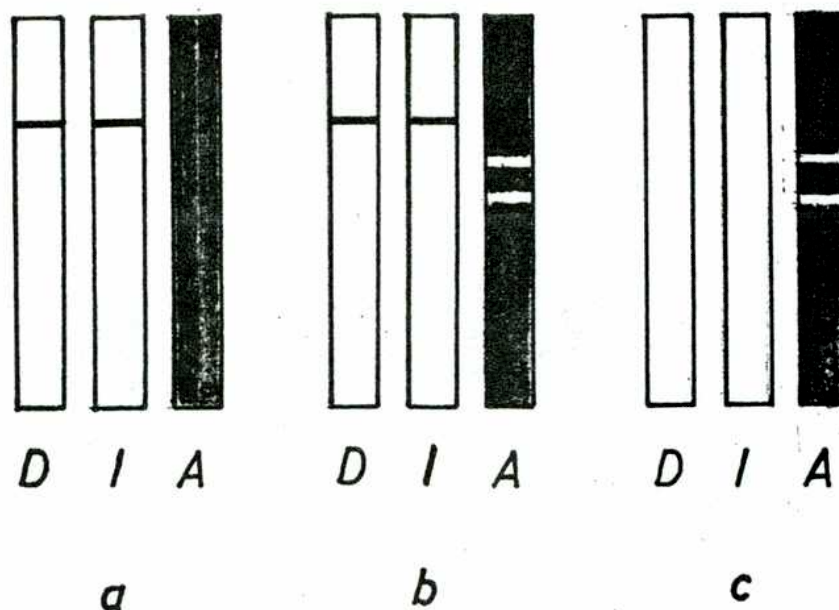


FIG. 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida demostrando el efecto de la amiloglucosidasa sobre la fosforilasa de pico II (DEAE). (a) Pico II (DEAE) (4  $\mu$ g de proteína); (b) Pico II (DEAE) (4  $\mu$ g de proteína) +amiloglucosidasa (8  $\mu$ g de proteína); (c) amiloglucosidasa (8  $\mu$ g de proteína). Después de preincubar a 37°C durante 45 min, las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de 7% de acrilamida en condiciones no desnaturizantes. Se localizó la actividad de amiloglucosidasa (A) y de fosforilasa dependiente (D) e independiente (I) de aceptor exógeno. Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

que se omitió el tratamiento con amiloglucosidasa. Las diferentes movilidads electroforéticas de amiloglucosidasa y fosforilasa hacen posible el uso de este método para el análisis de los efectos de este tratamiento.

#### POSIBLE RELACION ENTRE GLICOPROTEINAS ENDOGENAS Y ACTIVIDAD DE FOSFORILASA INDEPENDIENTE DE ACEPTOR EXOGENO

Como se señaló en la Introducción, cuando Slabnik y Frydman (1970) encontraron que una fosforilasa de tubérculo de papa podía catalizar la síntesis de uniones glucosídicas en ausencia de aceptor exógeno, sugirieron que la enzima podría ser una glicoproteína en la que el componente glucosídico actuaba como aceptor. Trabajos anteriores mostraron la presencia de glicoproteínas en el S<sub>140</sub> (Tandecarz y col., 1975). La coloración de PAS permitió detectar la presencia de glicoproteínas (Fig. 15) en el

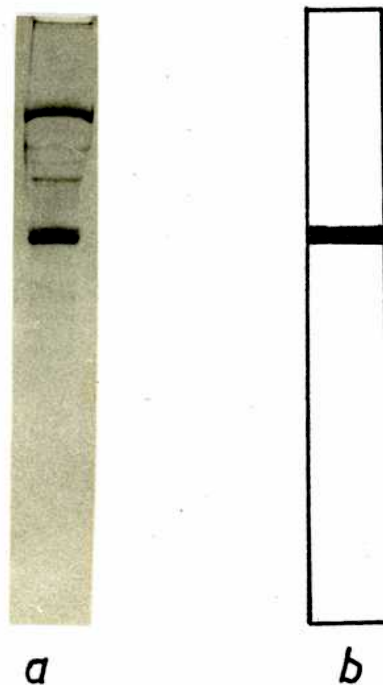


FIG. 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea del pico II (DEAE). Muestras conteniendo 20  $\mu$ g de proteína (a) o 60  $\mu$ g de proteína (b) fueron sometidas a electroforesis en gel de 10% de acrilamida. Los gels fueron coloreados con Coomassie brilliant blue (a) o con el reactivo de PAS (b).

pico II (DEAE) cuando alícuotas del mismo fueron sometidas a electroforesis en gel de 10% de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea.

Para investigar la relación entre las glicoproteínas presentes en el pico II (DEAE) y la actividad fosforilásica independiente de aceptor agregado, se sometió una alícuota del pico II (DEAE) a cromatografía en columna de concanavalina A-Sepharosa, que se sabe que tiene afinidad por los grupos  $\alpha$ -glucosilo y  $\alpha$ -manosilo (Goldstein y Hayes, 1978). En la figura 16 pueden verse los resultados de esta cromatografía, de la que se obtienen dos fracciones: (a) que no presenta afinidad por la lectina inmovilizada y que retiene la actividad de fosforilasa medida en presencia o en ausencia de aceptor agregado, y (b) que queda retenida en la columna y es eluída con 0,2 M  $\alpha$ -metil-D-glucósido y sin actividad de fosforilasa detectable.

Cuando se someten alícuotas de las fracciones que no se unen a la concanavalina A-Sepharosa a electroforesis en geles de 7% de acrilamida en condiciones no desnaturizantes se observa que la movilidad de la banda con actividad de fosforilasa medida en presencia o en ausencia de aceptor agregado coincide con la de la enzima antes del tratamiento (Fig. 16).

Se analizaron alícuotas de las fracciones unidas y no unidas por la lectina inmovilizada mediante electroforesis en gel de 10% de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea y los resultados



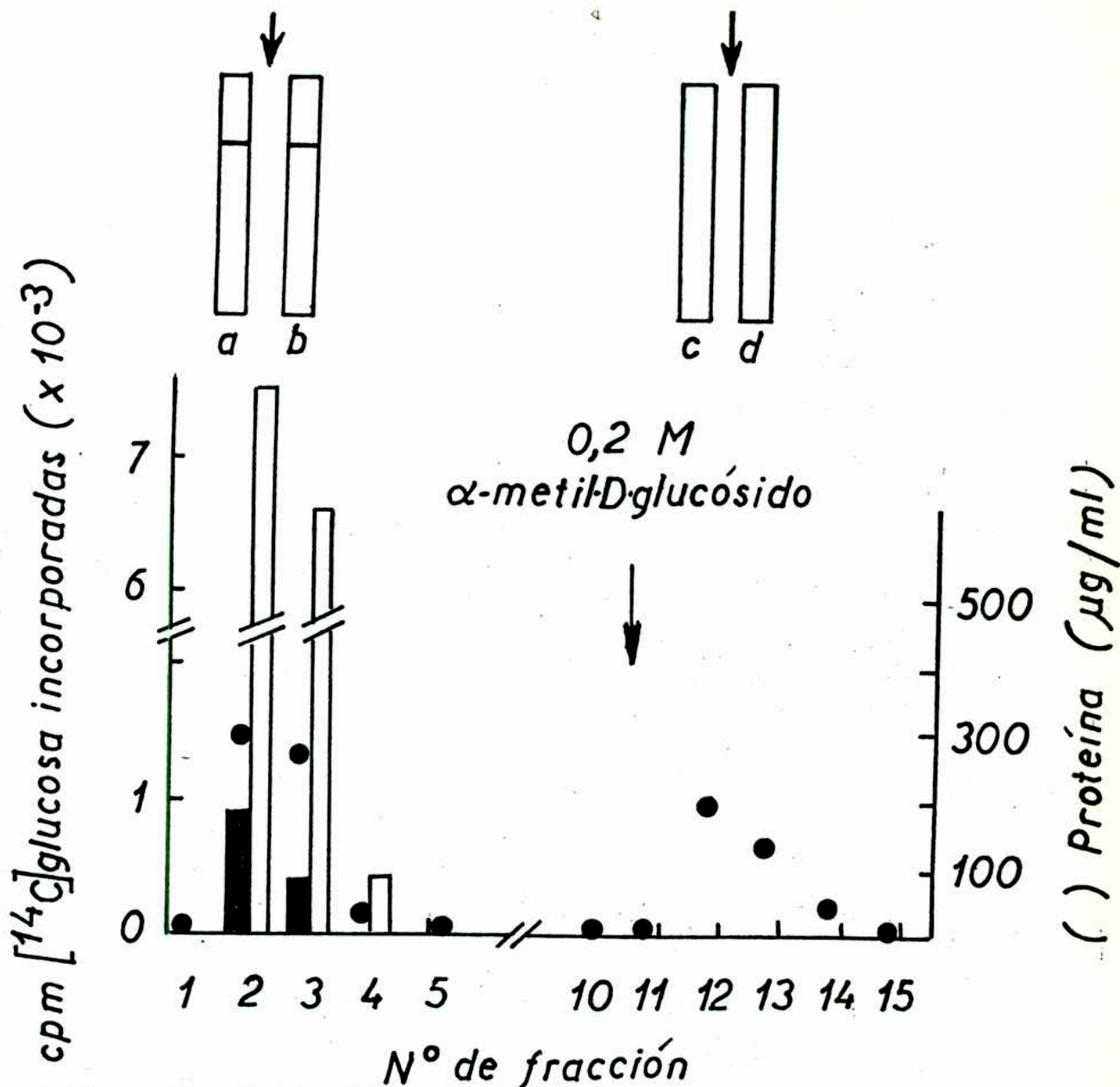


FIG. 16. Cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A-Sepharosa del pico II (DEAE). La cromatografía se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. En este caso se aplicaron 1,2 mg de proteína. Se midió actividad de fosforilasa independiente (■) y dependiente (□) de aceptor exógeno en alícuotas de 10 µl de cada una de las fracciones de la columna. La actividad de fosforilasa dependiente de aceptor se midió en presencia de 0,1 M buffer MES, pH 5,7, y el tiempo de incubación fue de 30 min. La actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno se midió en presencia de 0,1 M buffer MES, pH 5,7, y 5 mg/ml de albúmina, y el tiempo de incubación fue de 45 min. Las demás condiciones experimentales fueron las del ensayo standard. Fracciones 1-10: lavado de la columna con buffer B. Fracciones 11-15: eluidas por agregado de 0,2 M de α-metil-D-glucósido al mismo buffer. Las fracciones marcadas con una flecha fueron analizadas por electroforesis en gel de 7% de acrilamida en condiciones no desnaturizantes para localizar actividad de fosforilasa dependiente (a, c) e independiente (b, d) de aceptor exógeno.

se muestran en la figura 17. Se puede observar que todas las bandas PAS positivas presentes en el pico II (DEAE) (ver Fig. 15) son retenidas por la lectina; además, el perfil de proteínas obtenido por la fracción retenida por la concanavalina A contiene precisamente aquellas bandas que están ausentes del perfil correspondiente a las fracciones que no se unen a la concanavalina A-Sepharosa. La lectina inmovilizada no retiene, por lo tanto, a la/las proteína/s activa/s, lo que sugiere que la enzima no es una glicoproteína con grupos  $\alpha$ -glucosilo o  $\alpha$ -manosilo o que los oligosacáridos - si los tuviera - no están accesibles a la unión con la lectina.

Como resultado del pasaje del pico II (DEAE) por columna de concanavalina A-Sepharosa se obtiene una enzima completamente activa y libre de glicoproteínas contaminantes.

#### IDENTIFICACION DE LA SUBUNIDAD DE FOSFORILASA

El pico II (DEAE) no es una preparación purificada a homogeneidad. En los proteínogramas de las electroforesis realizadas en condiciones no desnaturalizantes o en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea aparecen varias bandas de proteínas.

Se consideró necesaria la identificación inequívoca de la subunidad de proteína correspondiente a la fosforilasa, para descartar definitivamente la participación de glicoproteínas en la actividad independiente de aceptor exógeno.

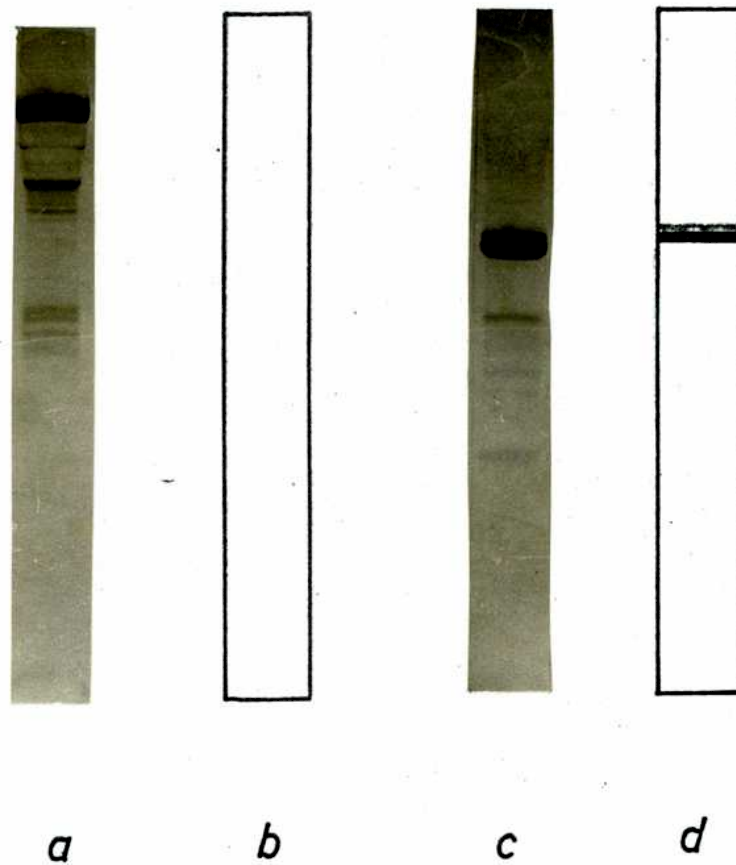


FIG. 17. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna de concanavalina A-Sepharosa del pico II (DEAE). (a y b): fracción no retenida por la concanavalina A-Sepharosa. (c y d): fracción retenida por la concanavalina A-Sepharosa. Los geles a y c (20  $\mu$ g de proteína) fueron coloreados con Coomassie brilliant blue y los geles b y d (60  $\mu$ g de proteína) fueron coloreados con el reactivo de PAS, como se describe en Materiales y Métodos.

En efecto, además de la coloración de PAS como método para detección de glicoproteínas separadas por electroforesis, la electroforesis en geles de distintas concentraciones de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio, constituye por sí misma una técnica para determinar si una proteína tiene carbohidratos en su composición. Segrest y col. (1971) mostraron que las glicoproteínas unen menos dodecilsulfato de sodio que las proteínas no glicosiladas. Esto resulta en una menor movilidad electroforética respecto a la de proteínas libres de carbohidratos de tamaño similar. La sobreestimación del peso molecular de las glicoproteínas por electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio puede llegar hasta un 100% y depende en forma impredecible del tamaño de la cadena de carbohidrato. Esta sobreestimación varía con el tamaño de poro del gel y se observa que el peso molecular aparente de la glicoproteína disminuye al aumentar la concentración de acrilamida, acercándose asintóticamente al peso molecular real (Segrest y col., 1971).

Para obtener una fosforilasa con el grado de purificación necesario para realizar estos estudios, se utilizó la electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Se llevó a cabo la separación analítica en mayor escala, extrayendo la enzima del gel luego de la separación electroforética. Se obtuvo así una fosforilasa que retenía ambas actividades, la dependiente y la independiente de aceptor exógeno, medidas por incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa de glucosa-1-P radioactivo a glucógeno, o por incorporación de glucosa marcada de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P a material insoluble en ácido tricloroacético en ausencia de

aceptor agregado, respectivamente, como se describe en Materiales y Métodos. Se sometió una alícuota de esta preparación enzimática a electroforesis en gel de 10% de acrilamida, en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea. En la figura 18 se observa que aparece una banda principal de proteína; en la misma figura se indican las movilidades de las proteínas de peso molecular conocido usadas como standards. Graficando sus pesos moleculares (en escala logarítmica) en función de sus movilidades electroforéticas relativas, se obtiene una curva de calibración que se ilustra en la figura 18B. Al interpolar en la curva de calibración la movilidad relativa de la banda en estudio se obtiene un valor de 96.000 de peso molecular.

Se sometió la misma preparación enzimática a electroforesis en geles de 5 y 7% de acrilamida y el peso molecular aparente de la banda principal fue similar al obtenido con 10% de acrilamida en el gel.

La constancia en el dato del peso molecular hallado para esta banda principal en las distintas concentraciones de acrilamida usadas, refuerza la hipótesis de que no hay azúcares, accesibles o no a la conca-  
navalina A (Fig. 16) y concuerda con el hallazgo de reacción PAS negativa para esta banda (Fig. 15).

FOSFORILASAS PICO I Y PICO II (DEAE):

COMPARACION DE ALGUNOS PARAMETROS MOLECULARES

La cromatografía de afinidad en columna de conca-  
navalina A-Sepha-  
rosa (Fig. 16), la incubación en buffer fosfato (Tabla VII) y el tratamien-

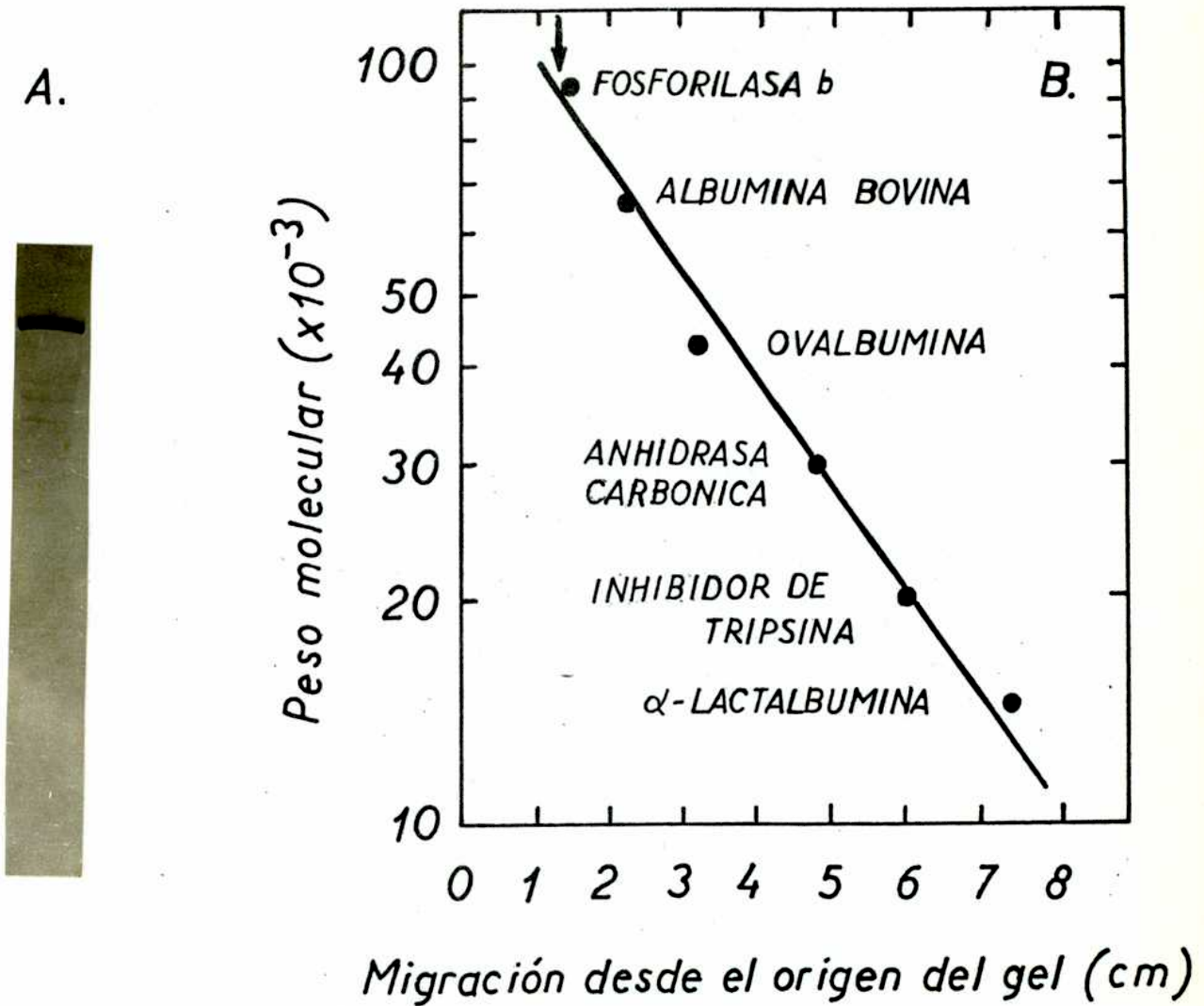


FIG. 18. Electroforesis en gel de 10% de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea. A. Fosforilasa (4  $\mu$ g de proteína) purificada por electroforesis del pico II (DEAE) en gel de poliacrilamida en escala preparativa, como se describe en Materiales y Métodos. B. Estimación del peso molecular de la subunidad de fosforilasa. La curva de calibración se obtuvo como se indica en Materiales y Métodos. La flecha indica la migración de la fosforilasa purificada.

to con amiloglucosidasa (Fig. 14) del pico II (DEAE) no alteran ninguna de las dos actividades de fosforilasa que coexisten en esta fracción.

Ambas actividades presentan la misma movilidad electroforética en gels de 7% de acrilamida en condiciones no desnaturizantes (Fig. 3), pero sus cinéticas (Fig. 5) y respuestas a variaciones de pH (Fig. 12) son distintas.

Se consideró de interés el estudio del pico II (DEAE) mediante métodos basados en distintas propiedades físicoquímicas de las proteínas para intentar separar ambas actividades fosforilásicas. Con fines comparativos se estudió paralelamente el pico I (DEAE), que como ya se mencionó (Fig. 2) tiene actividad de fosforilasa sólo cuando se la ensaya en presencia de aceptor agregado. Se eligió el pico I porque de las dos fosforilasas eluidas de la columna de DEAE-celulosa que presentan actividad sólo en presencia de aceptor agregado (pico I y pico III) es la que se encuentra en mayor proporción y la que más se separa del pico II (DEAE) (Fig. 2).

Se ultracentrifugaron alícuotas del pico I (DEAE) y pico II (DEAE) en gradientes de 5-20% de sacarosa y en la Fig. 19 se presentan los perfiles de sedimentación correspondientes.

Se observa que ambas actividades del pico II (DEAE) determinadas en presencia o en ausencia de aceptor exógeno cosedimentan en el gradiente (Fig. 19A). En la misma figura se incluye la curva de calibración obtenida con marcadores de coeficiente de sedimentación conocidos. La figura 19B ilustra el perfil de sedimentación en el gradiente obtenido

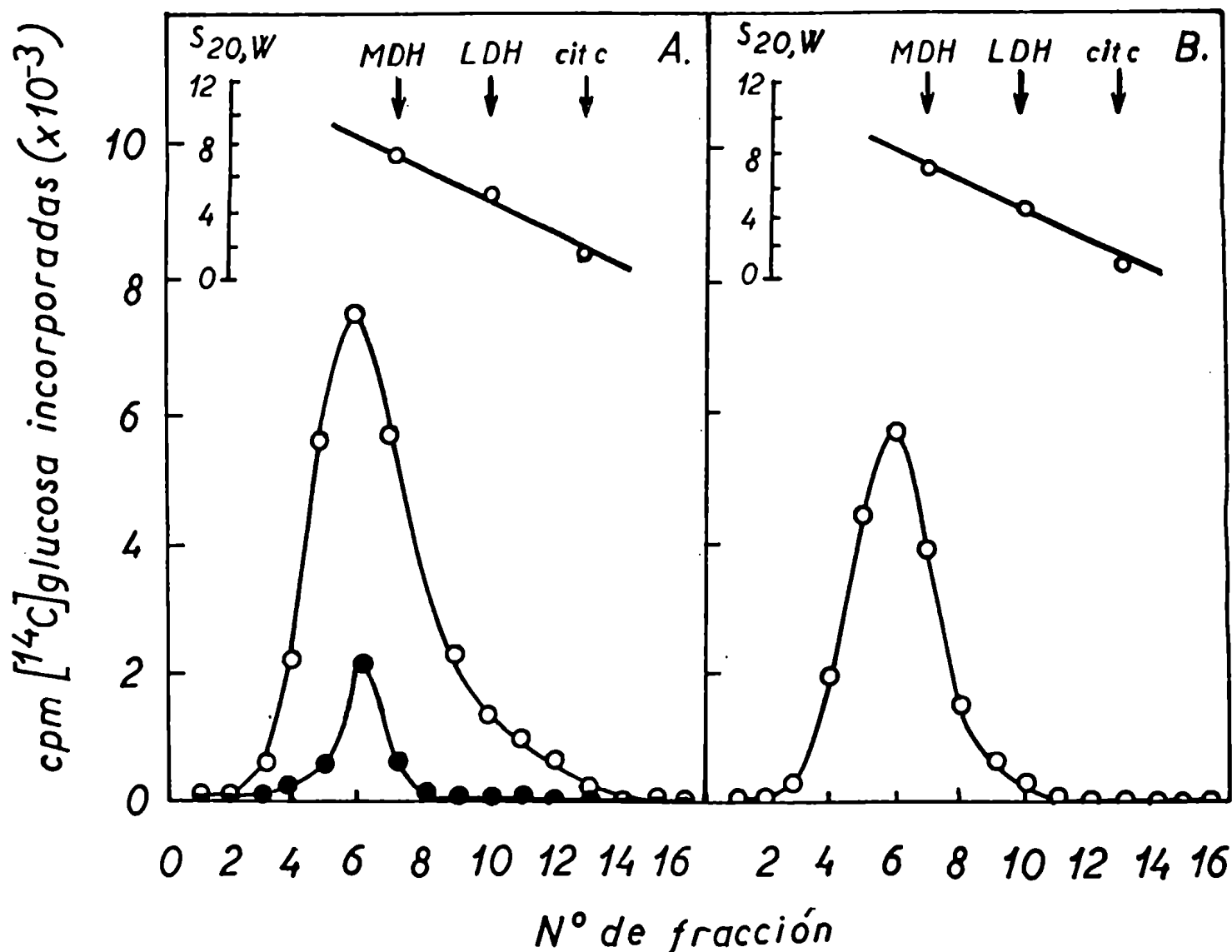


FIG. 19. Sedimentación en gradiente de densidad de sacarosa de las fosforilasas pico I (DEAE) y pico II (DEAE). Las muestras conteniendo 300  $\mu\text{g}$  de proteína de pico II (DEAE) (A) y 600  $\mu\text{g}$  de proteína de pico I (DEAE) (B) se sometieron a ultracentrifugación a 100.000  $\times g$  durante 18 h en gradientes de 5-20% de sacarosa, como se describe en Materiales y Métodos. En alícuotas de 30  $\mu\text{l}$  de cada una de las fracciones se midió actividad de fosforilasa dependiente (O) e independiente (●) de aceptor exógeno en presencia de 0,1 M buffer MES, pH 5,7. Los tiempos de incubación fueron de 60 min y en el caso de la actividad independiente de aceptor exógeno se incluyó albúmina (5 mg/ml) en la mezcla de reacción. Se insertan las curvas de calibración obtenidas representando la migración de los marcadores en función de sus coeficientes de sedimentación conocidos.



para el pico I. Por interpolación se obtuvieron para el pico I y el pico II coeficientes de sedimentación similares,  $S_{20,w} = 8,2$  S. Esta constante de sedimentación corresponde a un peso molecular de aproximadamente 190.000 para proteínas globulares. La fosforilasa pico II (DEAE) sería, entonces, un dímero formado por dos subunidades de peso molecular 96.000 (ver Fig. 18).

Como no pudieron separarse ambas actividades del pico II (DEAE) por ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, se sometió una alícuota de esta preparación enzimática a filtración por gel. Para ello se utilizó una columna de Bio-Gel A 0,5m, calibrada con proteínas de dimensiones conocidas. Se sometió una alícuota del pico I a cromatografía en condiciones similares y en la figura 20A se presenta el perfil de elución correspondiente. En la figura 20B se ilustran los perfiles de elución del pico II (DEAE) para las actividades de fosforilasa dependiente e independiente de aceptor exógeno, donde puede observarse que ambas actividades cocromatografían. Tanto el pico I como el pico II (DEAE) aparecen inmediatamente después del azul dextrano, casi en el límite de exclusión de la columna, comportamiento que corresponde a proteínas de peso molecular cercano a 400.000.

Este comportamiento, que no coincide con los resultados obtenidos por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, podría deberse a asociaciones intermoleculares en las condiciones de la cromatografía. Esta asociación sería reversible ya que tanto el pico I como el pico II (DEAE) eluidos de la columna de Bio-Gel A 0,5m presentan, cuando son ultracen-

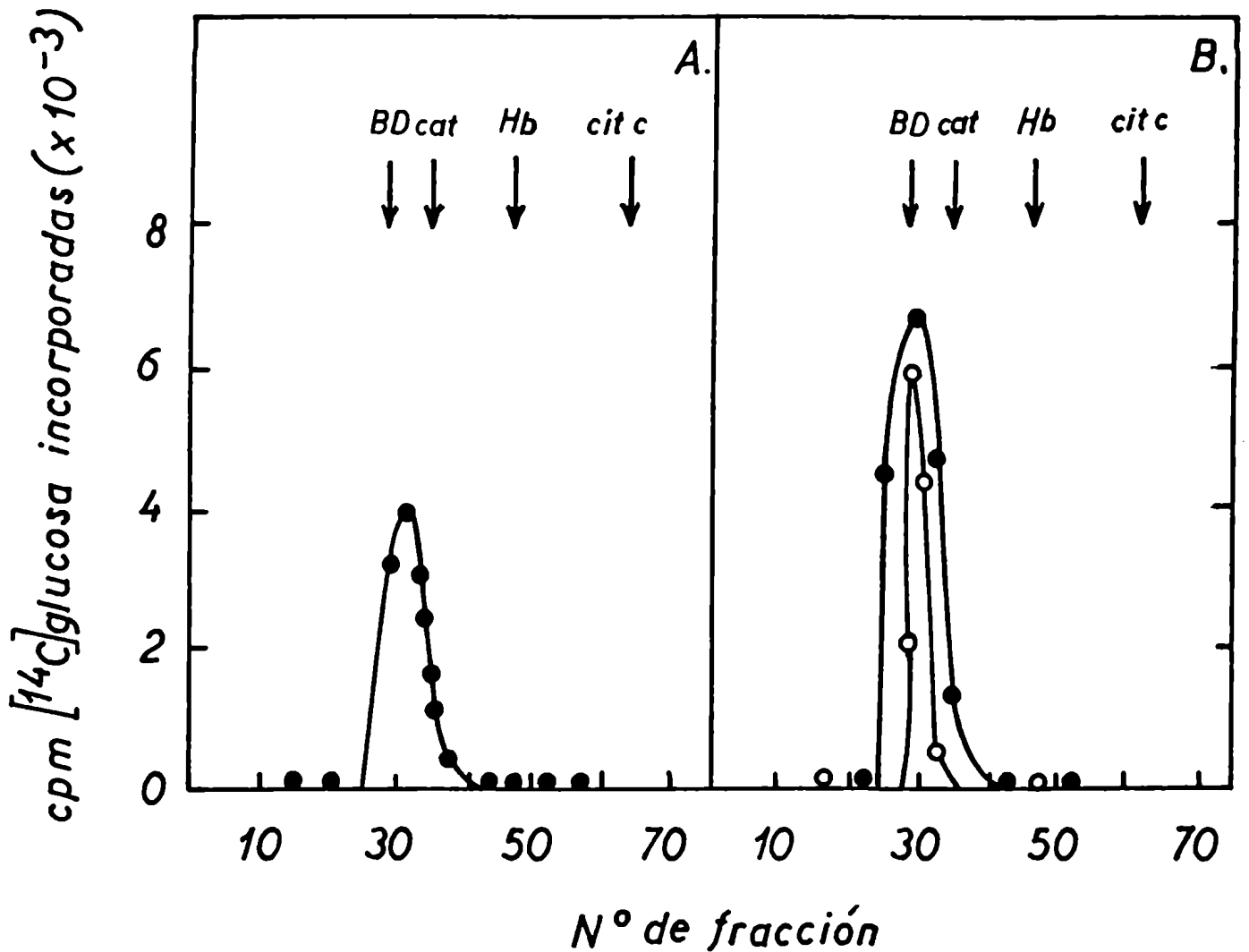


FIG. 20. Cromatografía en columna de Bio-Gel A 0,5m de las fosforilasas pico I (DEAE) y pico II (DEAE). Las muestras conteniendo 5 mg de proteína de pico I (DEAE) (A) o 3 mg de proteína de pico II (DEAE) (B) se sometieron a cromatografía en columna de Bio-Gel A 0,5m (0,9 x 90 cm) como se describe en Materiales y Métodos. La actividad de fosforilasa independiente de aceptor (O) se midió en presencia de 0,1 M de buffer MES, pH 5,7, y de 0,5 mg/ml de albúmina en alícuotas de 30  $\mu$ l de cada fracción incubadas durante 60 min. La actividad de fosforilasa dependiente de aceptor (●) se midió en presencia de 0,1 M de buffer MES, pH 5,7, en alícuotas de 30  $\mu$ l de cada fracción incubadas durante 30 min. Las flechas indican las posiciones de los marcadores usados que fueron: azul dextrano (BD), citocromo c (cit c), hemoglobina (Hb) y catalasa (cat).

trifugados en gradiente de sacarosa, velocidades de sedimentación similares a las exhibidas por las fracciones enzimáticas de las que provienen.

Aunque los pesos moleculares aparentes de las fosforilasas pico I y pico II (DEAE) obtenidos por ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa son similares, las movilidades electroforéticas en condiciones no desnaturalizantes (7% de acrilamida) de estas enzimas son diferentes (Fig. 21a y b). Este hallazgo se confirma sometiendo una mezcla de ambas fracciones al mismo tratamiento (Fig. 21c). Por otra parte, en las mismas condiciones de electroforesis, las actividades de fosforilasa dependiente e independiente de aceptor exógeno que coexisten en el pico II (DEAE) presentan la misma movilidad (Fig. 3c y d). Como la movilidad de una proteína en estas condiciones de electroforesis depende no sólo de sus dimensiones sino también de su carga neta al pH de electroforesis, las diferentes movilidades obtenidas podrían ser atribuidas a diferencias en cualquiera de los dos parámetros o en ambos a la vez. Además proteínas de diferente peso molecular podrían exhibir movilidades similares por compensación de carga neta y tamaño.

Se recurrió entonces al método descrito por Hedrick y Smith (1968) que permite determinar con precisión el peso molecular de una proteína presente en una mezcla heterogénea, si existe una reacción específica para detectarla. Cuando se aumenta la concentración de acrilamida en el gel, la consiguiente disminución del tamaño del poro provoca un retardo en la migración electroforética que es mayor para proteínas de mayor pe-

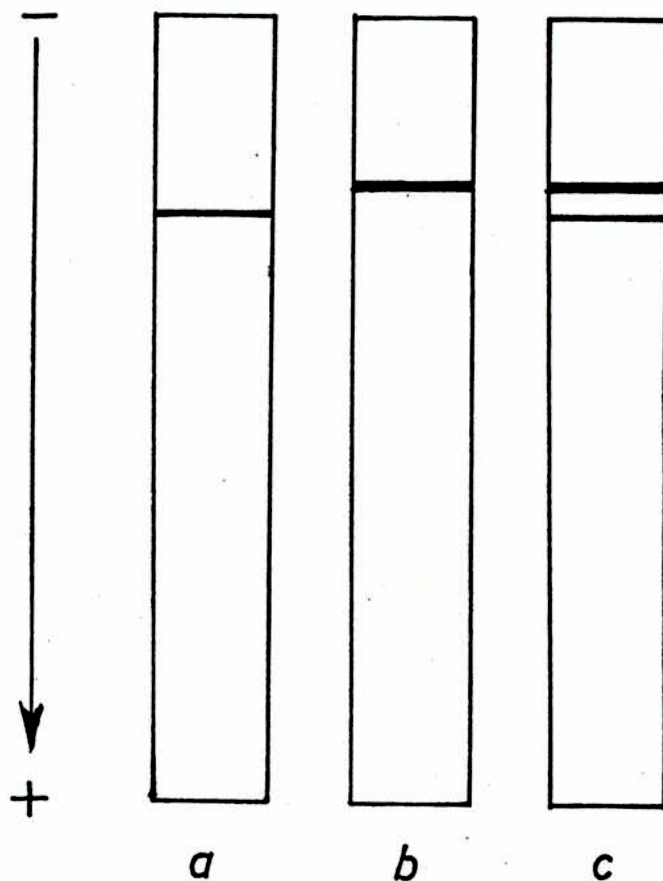


FIG. 21. Electroforesis en gel de 7% de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes. (a) Pico I (DEAE) (25  $\mu$ g de proteína); (b) pico II (DEAE) (5  $\mu$ g de proteína); (c) co-electroforesis de pico I (DEAE) y pico II (DEAE). Se mezclaron 25  $\mu$ g de proteína del pico I (DEAE) y 5  $\mu$ g de proteína del pico II (DEAE). Se localizó actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno como se describe en Materiales y Métodos.

so molecular. Cuando se grafica el logaritmo de la movilidad de la proteína respecto a la distancia recorrida por el azul de bromofenol que se usa como marcador, en función de la concentración de acrilamida en el gel, se obtiene una recta cuya pendiente depende del peso molecular. Este se calcula por interpolación del valor de esa pendiente en una curva de calibración obtenida, en nuestro caso, por electroforesis de los oligómeros de seroalbúmina bovina, de peso molecular conocido.

En la figura 22a se muestran los proteínogramas correspondientes a la electroforesis de la seroalbúmina bovina, y en las figuras 22b y 22 c, los zimogramas obtenidos para el pico I y el pico II (DEAE) respectivamente. Cuando se incubaron los geles en ausencia de aceptor agregado no se detectaron bandas en el caso del pico I, mientras que para el pico II (DEAE) las posiciones de las bandas coinciden con las que se detectaron cuando se incluyó el polisacárido en la mezcla de incubación.

En la figura 23A y B se representan en escala semilogarítmica, las movilidades relativas de los oligómeros de albúmina y de las fosforilasas pico I y pico II (DEAE) en función de las concentraciones de poli(acrilamida) en el gel, respectivamente.

En la figura 24 se muestra la curva de calibración obtenida graficando los valores absolutos de las pendientes calculadas para cada uno de los oligómeros de albúmina, obtenidos de la figura 23A en función de sus respectivos pesos moleculares. Al interpolar en esa curva los va-

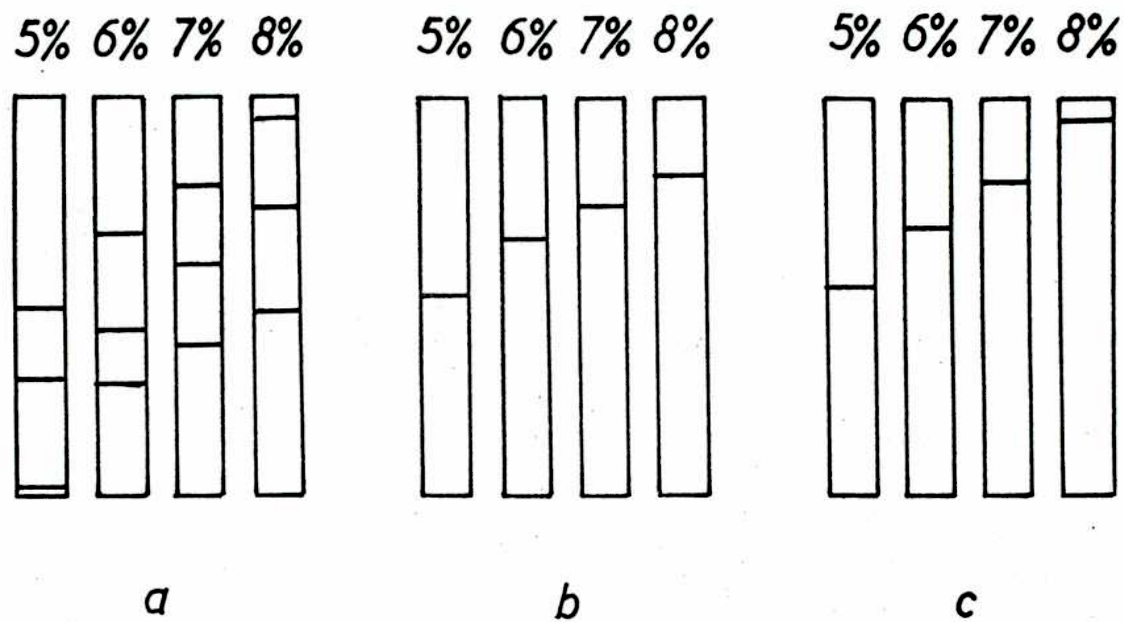


FIG. 22. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no des-naturalizantes. Muestras conteniendo 20  $\mu\text{g}$  de seroalbumina bovina (a); 25  $\mu\text{g}$  de proteína de pico II (DEAE) (b) o 5  $\mu\text{g}$  de proteína de pico II (DEAE) (c) se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida de concentración variable como se indica en la figura. En (a) se colorearon los geles con Coomassie brilliant blue y el orden de migración, comenzando por la banda de mayor movilidad es: monómero, dímero, trímero. En (b) y (c) se localizó actividad de fosforilasa dependiente de aceptor exógeno. En (c) se obtuvieron los mismos resultados cuando se localizó actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno.

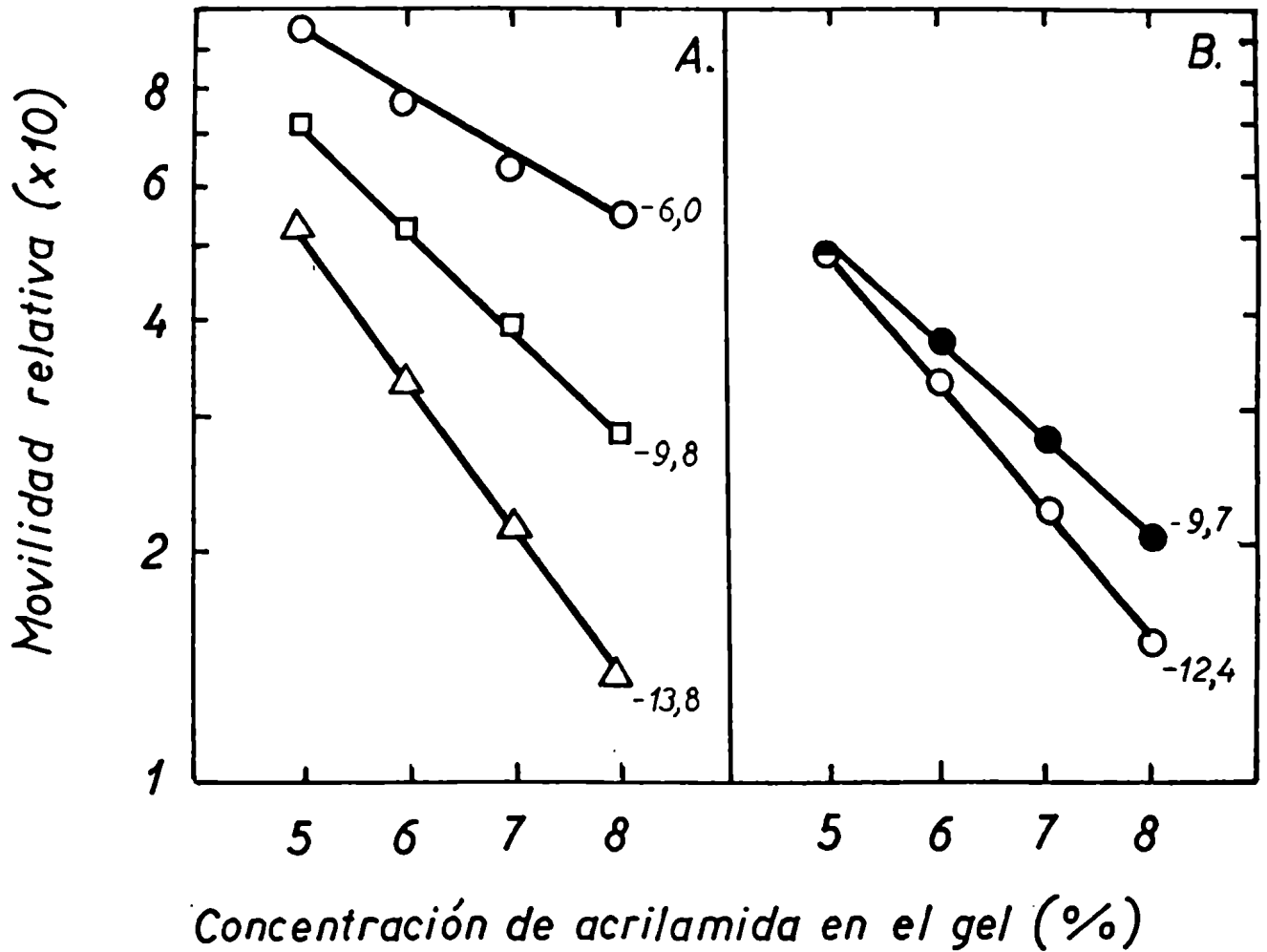


FIG. 23. Efecto de la concentración de acrilamida sobre la movilidad electroforética en condiciones no desnaturizantes. Los datos se obtuvieron de la fig. 22. Al lado de cada recta se indica el valor calculado para la pendiente. A. Oligómeros de seroalbumina bovina: (○) monómero; (□) dímero; (△) trímero. B. (●) Pico I (DEAE); (○) pico II (DEAE).

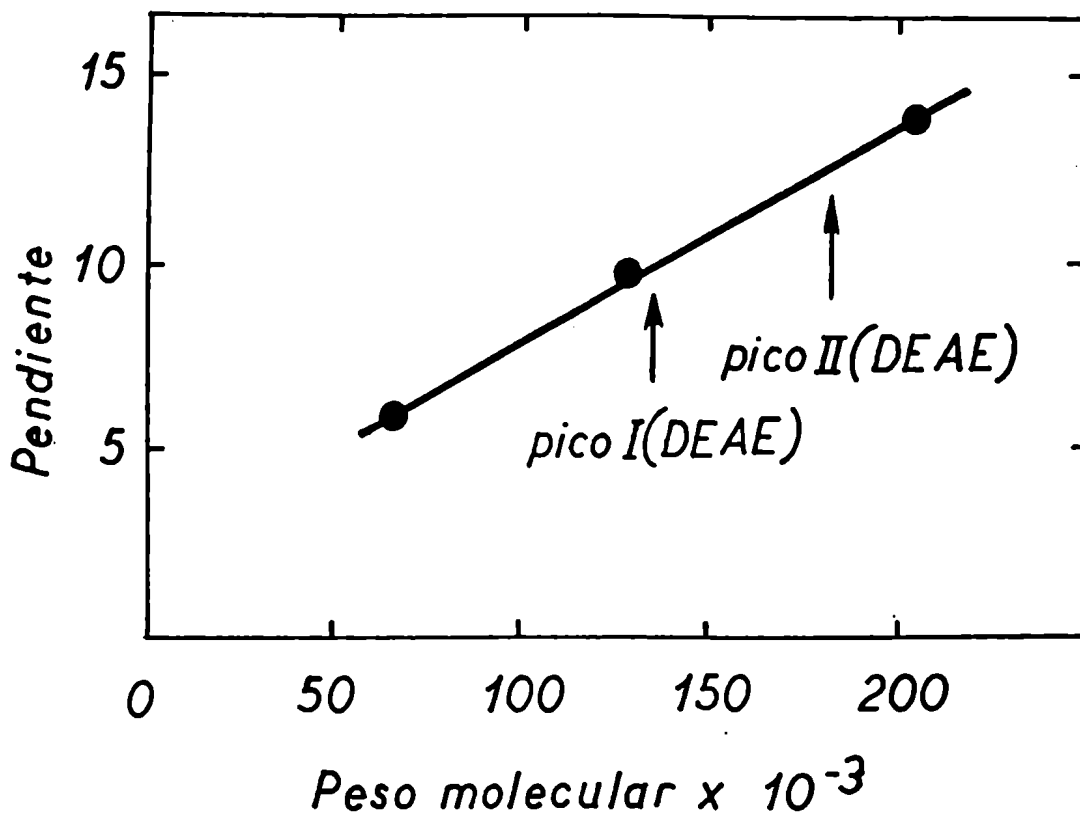


FIG. 24. Determinación del PM de las fosforilasas pico I (DEAE) y pico II (DEAE) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Curva de calibración obtenida por representación de los valores absolutos de las pendientes indicados en la Fig. 23 A en función de los PM del monómero (67.000), dímero (134.000) y trímero (201.000) de seroalbúmina bovina. Se indican los PM aparentes obtenidos para las fosforilasas pico I(DEAE) y pico II (DEAE) por interpolación en esta curva de calibración.



lores absolutos de las pendientes halladas para el pico I y pico II (DEAE) en la figura 23B, se obtienen pesos moleculares aparentes de 135.000 y 183.000, respectivamente. La mayor movilidad electroforética de la fosforilasa pico I respecto de la observada para el pico II (DEAE) en gel de 7% de acrilamida (Fig. 21) se debería, entonces, a su menor peso molecular y no a la presencia de una carga neta mayor al pH de la electroforesis. Este resultado concuerda con el comportamiento de ambas fosforilasas en DEAE-celulosa (Fig. 2) en la que el pico I eluye a menor fuerza iónica que el pico II. Este procedimiento tampoco permitió separar ambas actividades de la fosforilasa pico II (DEAE), la dependiente y la independiente de aceptor exógeno.

Resumiendo, ambas actividades cosedimentan en gradiente de 5-20% de sacarosa (Fig. 19), cocromatografían en Bio-Gel A 0,5m (Fig. 20) y muestran la misma movilidad electroforética en geles de 5-8% de acrilamida en condiciones no desnaturizantes (Fig. 22).

#### REQUERIMIENTOS DE LAS FOSFORILASAS DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE ACEPTOR EXÓGENO

Como se ha visto, no se pudo separar las actividades de fosforilasa dependiente e independiente de aceptor exógeno que coexisten en el pico II (DEAE). Se consideró conveniente investigar los requerimientos de ambas actividades con el objeto de medir sólo una de ellas sin interferencias de la otra.

Teniendo en cuenta el distinto comportamiento a pH alto (Fig. 12), se midió la actividad de fosforilasa dependiente e independiente de aceptor agregado, en distintas condiciones de pH y concentración de glucosa-1-P. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VIII. Se observa que a pH 8,2, hay incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P, sólo en presencia de glucógeno a un producto soluble en ácido tricloroacético 5%, pero que precipita con metanol, en las dos concentraciones de glucosa-1-P usadas. A pH 5,7 hay incorporación de radioactividad a material precipitable por ácido tricloroacético, sólo en concentración de glucosa-1-P alta (20 mM). En estas condiciones de pH y concentración de glucosa-1-P, pero en presencia de glucógeno, se incorpora radioactividad también en la fracción soluble en ácido tricloroacético 5%, pero que precipita con metanol. A este pH, pero con concentración de glucosa-1-P baja, del orden de  $\mu\text{M}$  y en presencia de glucógeno, hay incorporación sólo a la fracción insoluble en metanol y soluble en ácido tricloroacético.

## CARACTERIZACION DEL PRODUCTO SINTETIZADO POR LA FOSFORILASA INDEPENDIENTE DE ACEPTOR EXOGENO

### Obtención del Producto Radioactivo

Los productos utilizados en los experimentos siguientes fueron obtenidos por incubación de fosforilasa piko II (5-10  $\mu\text{g}$  de proteína) con [ $^{14}\text{C}$ ]

TABLA VIII

Efectos de pH, concentración de sustrato y presencia de aceptor exógeno sobre las actividades de fosforilasa dependiente e independiente de aceptor exógeno

Condiciones del ensayo	Incorporación de radioactividad			
	pH 5, 7		pH 8, 2	
	Insoluble en ácido tricloroacético (cpm)	Insoluble en meta-nol - soluble en ácido tricloroacético (cpm)	Insoluble en ácido tricloroacético (cpm)	Insoluble en meta-nol - soluble en ácido tricloroacético (cpm)
[ <sup>14</sup> C]glucosa-1-P, 20 mM	2624	50	82	41
[ <sup>14</sup> C]glucosa-1-P, 20 mM + glucógeno, 4, 2 mg/ml	1859	1298	86	993
[ <sup>14</sup> C]glucosa-1-P, 4 μM + glucógeno, 4, 2 mg/ml	106	1630	93	1001
[ <sup>14</sup> C]glucosa-1-P, 4 μM	45	62	65	38

Se utilizó como fuente de enzima el pico II (DEAE) (6 μg de proteína).  
Tiempo de incubación: 20 min.

glucosa-1-P 20 mM en ausencia de aceptor exógeno durante 10 a 30 min a 37°C. El producto radioactivo sintetizado fue aislado de dos maneras:

a) Precipitación por ácido tricloroacético 5%. Se paró la reacción mediante el agregado de ácido tricloroacético 5% y se colectó por centrifugación el precipitado obtenido, se lavó el mismo varias veces con ácido tricloroacético 5%, luego se lo resuspendió con agua destilada y se llevó a pH mayor que 11 con NaOH 0,5N. En estas condiciones se observó la solubilización del producto. Esta solución alcalina se neutralizó con el volumen necesario de ClH 0,5N. En algunas ocasiones, el precipitado lavado se disolvió en 25 µl de dimetilsulfóxido (Holmes y Preiss, 1979).

b) Filtración en gel de Sephadex G-25. Se pasó la mezcla de reacción por una pequeña columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer A. En el volumen de exclusión se obtuvieron el producto y también la enzima.

Si se conserva el producto radioactivo, obtenido por cualquiera de los dos procedimientos, en solución a pH neutro y a 4°C se observa la formación de agregados con una lenta disminución de la radioactividad soluble y una aparición concomitante de radioactividad en el precipitado. Este precipitado puede separarse por centrifugación y redisolverse en solución alcalina o por agregado de dimetilsulfóxido.

Tandecarz y col. (1975) encontraron que el producto de la fosforilasa del S<sub>140</sub> de tubérculo de papa independiente de aceptor exógeno era de naturaleza glucoproteica. Como el pico II (DEAE) proviene del S<sub>140</sub>, el producto de la fosforilasa del pico II (DEAE) independiente de aceptor exógeno debería tener propiedades similares al descrito en el S<sub>140</sub> de tubérculo de papa (Tandecarz y col., 1975).

Análisis estructural de la porción glucosídica del producto

Por tratamiento del producto radioactivo obtenido según (a) con  $\beta$ -amilasa,  $\alpha$ -amilasa o amiloglucosidasa se produce la liberación del 95-100% de la radioactividad al sobrenadante de ácido tricloroacético. La cromatografía en papel del producto de la digestión con  $\beta$ -amilasa muestra toda la radioactividad asociada con maltosa, mientras que se encontró [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa y trazas de [ $^{14}\text{C}$ ]maltosa en el cromatograma de los productos de digestión con  $\alpha$ -amilasa y sólo [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa en el correspondiente a amiloglucosidasa. Estos datos indican la presencia de uniones glucosídicas del tipo  $\alpha$ -1,4, en una estructura lineal semejante a la de la amilosa.

Tanto el producto obtenido por precipitación con ácido tricloroacético y solubilizado con dimetilsulfóxido como el obtenido por filtración en gel de Sephadex G-25, forman un complejo azul con el reactivo de iodo; el espectro de absorción de este complejo, con un máximo a 590 nm (ver figura 13), es típico de glucanos lineales de más de 60 unidades de glucosa (Bailey y Whelan, 1961). Para confirmar los datos obtenidos respecto al largo y tipo de unión glucosídica de la cadena de hidratos de carbono, se sometió el producto obtenido a degradación de Smith, siguiendo el método descrito por Panayotatos y Villemez (1973). El análisis cromatográfico de los productos no volátiles de este tratamiento muestra un componente radioactivo principal que migra como eritritol

por cromatografía en butanol:piridina:agua (6:4:3), Esto corrobora los resultados obtenidos respecto a la presencia de cadenas glucosídicas largas, en unión  $\alpha$ -1,4. El [ $^{14}\text{C}$ ]glicerol formado a partir de los extremos no reductores relativamente escasos, no se detecta debido probablemente a la baja radioactividad específica de la [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P utilizada en la obtención del producto.

El tratamiento necesario para obtener la disolución del producto radioactivo insoluble en ácido tricloroacético y la lenta reprecipitación del mismo de soluciones neutras y a baja temperatura recuerdan el comportamiento de la amilosa. Este polisacárido, que consiste esencialmente de cadenas largas y lineales de residuos de glucosa en unión  $\alpha$ -1,4, es inestable en solución acuosa y precipita espontáneamente, en un proceso llamado retrogradación, debido a la tendencia de las moléculas lineales a alinearse por formación de puentes de hidrógeno y formar agregados. Este cambio físico es irreversible y la amilosa retrogradada sólo puede redisolverse en solución alcalina, o por agregado de dimetilsulfóxido, o en urea. Cuando se disolvió amilosa comercial en medio alcalino y se neutralizó de modo similar al descrito para el producto radioactivo en estudio, se observó su precipitación por el agregado de 5% ácido tricloroacético o por la adición de  $\text{ClH}$  a pH 1.

La propiedad de los glucanos largos y lineales de ser insolubles en ácido tricloroacético (Holmes y Preiss, 1979) impide la utilización de la precipitación con ácido tricloroacético como criterio para determinar si

el producto radioactivo sintetizado por el pico II en ausencia de aceptor exógeno tiene proteína en su composición. Esa misma propiedad impide el uso de la precipitación con ácido tricloroacético para evaluar los resultados de tratamientos proteolíticos del producto. En efecto, cadenas largas de glucanos  $\alpha$ -1,4 precipitarían con ácido tricloroacético estén o no unidas a proteína. Por otro lado, la formación de agregados a pH neutro y a baja temperatura dificulta la filtración en geles del tipo de Sephadex, que es otro de los métodos utilizados frecuentemente para separar glicopéptidos formados por acción de proteasas sobre glicoproteínas.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea

Se sometió el producto sintetizado a electroforesis en gel de 7% de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea. Estos reactivos permiten la ruptura de puentes de hidrógeno cuya importancia en el caso de los  $\alpha$ -1,4 glucanos ya se ha comentado. La urea y el dodecilsulfato de sodio, junto con el 2-mercaptoetanol, están presentes también durante el calentamiento de la muestra a 100°C, previo a la electroforesis, y se los incluye con el objeto de asegurar la ruptura de uniones no covalentes. De este modo, la electroforesis podría constituir una evidencia indirecta de que la porción glucosídica del producto está unida a proteína por uniones covalentes. La migración del producto radioactivo en el gel se determina por fluorografía, como se describe en Materia-

les y Métodos. El peso molecular aparente se calcula por interpolación de la movilidad de la banda radioactiva en una curva de calibración obtenida por electroforesis de una mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos, en condiciones similares.

La figura 25 muestra el proteínograma correspondiente al producto radioactivo insoluble en ácido tricloroacético. El perfil de proteínas es similar al que se obtiene por electroforesis de una alícuota del pico II (DEAE) control, sometida al mismo tratamiento pero incubada en ausencia de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P. La separación electroforética en gel de 7% de acrilamida muestra una coincidencia llamativa en la posición de la banda radioactiva determinada por fluorografía (PM 96.000) (Fig. 25) con la de la banda de proteína de PM 96.000 identificada en experimentos previos (Fig. 18) como subunidad de fosforilasa.

Si se supone que estamos en presencia de una proteína glucosilada, podría esperarse una modificación de su peso molecular aparente al variar la concentración de acrilamida en el gel (Segrest y col., 1971). Para investigar esta posibilidad se sometió el producto radioactivo a electroforesis en gel de acrilamida de distintas concentraciones y los resultados se muestran en la Tabla IX. Se observa una disminución en el peso molecular aparente del producto radioactivo a medida que aumenta la concentración de acrilamida en el gel.

Este comportamiento no es inesperado ya que proteínas con un alto contenido de hidratos de carbono exhiben un comportamiento anómalo cuando se las somete a electroforesis en presencia de dodecilsulfato de



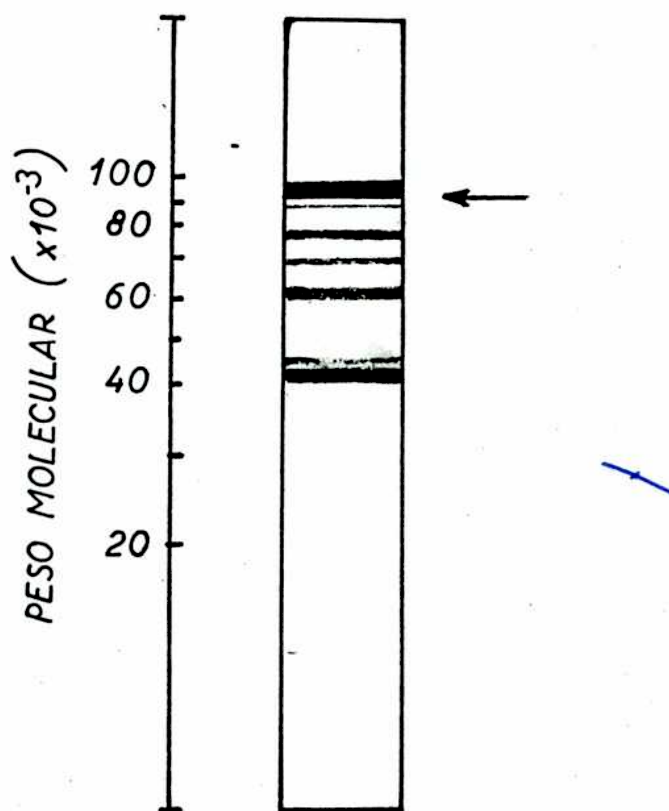


FIG. 25. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea. El producto de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno (20  $\mu$ g de proteína, 3000 cpm) obtenido por precipitación con ácido tricloroacético (5%), fue sometido a electroforesis en gel de 7% de acrilamida. El gel fue coloreado con Coomassie brilliant blue y la flecha indica la posición de la banda radioactiva determinada por fluorografía. La escala a la izquierda indica los pesos moleculares estimados determinados por calibración de gels idénticos con proteínas marcadoras. Los demás detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

sodio. El grado de sobreestimación del peso molecular de la glicoproteína varía con el tamaño del poro del gel y al aumentar la concentración de acrilamida el peso molecular aparente se acerca asintóticamente al real (Segrest y col., 1971).

TABLA IX

Efecto de la concentración de acrilamida sobre el peso molecular aparente del producto radioactivo sintetizado por la fosforilasa independiente de aceptor exógeno

Concentración de acrilamida (%)	Peso molecular aparente
5	203.000
7	96.000
10	74.000

Por este motivo, la utilidad de este método para la determinación del peso molecular real del producto es limitada. Sin embargo, podría utilizarse para analizar los resultados de la acción de enzimas proteolíticas.

En la figura 26 se muestra el proteínograma y la posición de las bandas radioactivas obtenidas al someter a electroforesis en gel de 10% de acrilamida un producto tratado con pronasa P. Se observa la desaparición de las bandas características del perfil proteico del producto y la aparición de polipéptidos de bajo peso molecular. El efecto de este tratamiento sobre la movilidad de la banda radioactiva es menos

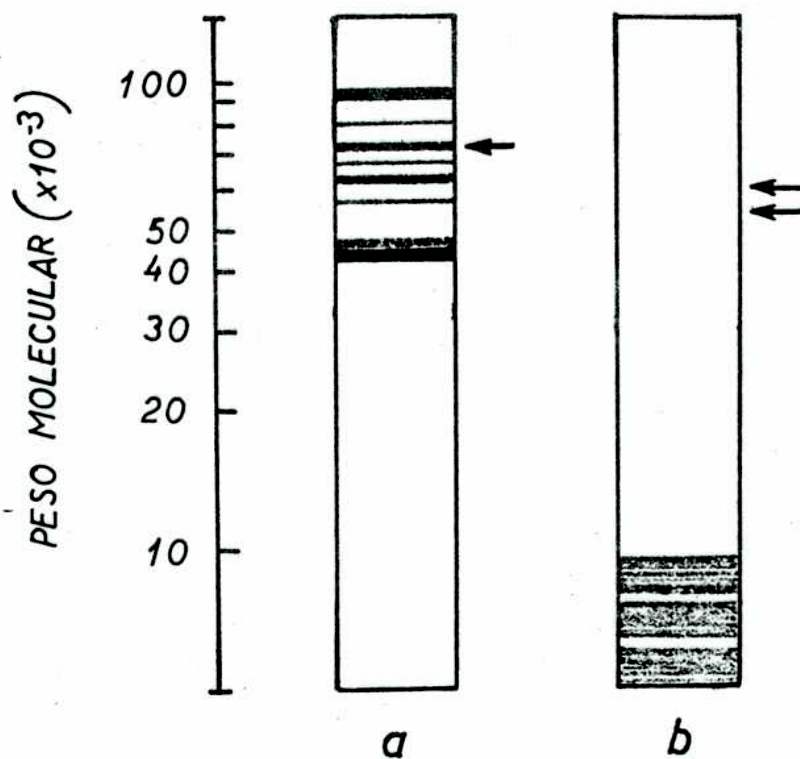


FIG. 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio y urea demostrando el efecto de pronasa sobre el producto de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Las muestras conteniendo el producto radioactivo incubado en ausencia (a) o en presencia (b) de pronasa, fueron sometidas a electroforesis en gel de 10% de acrilamida. Los gels fueron luego coloreados con Coomassie brilliant blue. Las flechas indican la posición de las bandas radioactivas determinada por fluorografía. La escala a la izquierda indica los pesos moleculares estimados determinados por calibración de gels idénticos con proteínas marcadoras. Los demás detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

notorio, observándose la desaparición de la banda de 74.000 y la aparición de dos bandas de peso molecular aparente 60.000 y 53.000.

Para interpretar los efectos del tratamiento proteolítico debe tenerse en cuenta la sobreestimación de los pesos moleculares de las glicoproteínas y glicopéptidos en el sistema de electroforesis usado, además de la resistencia al ataque por proteasas que los azúcares pueden conferir en algunos casos a las proteínas a las que están covalentemente unidos (Geisow, 1979).

Se analizó, por este mismo método, el comportamiento de productos radioactivos sintetizados a diferentes tiempos. Aunque estos productos difieren en la cantidad de radioactividad incorporada, esto no se traduce en una variación del peso molecular aparente que se obtiene en estas condiciones (resultados que no se muestran).

#### Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes

Se sometieron productos sintetizados a diferentes tiempos por la fosforilasa independiente de aceptor exógeno, a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. En la figura 27 se exhiben los resultados obtenidos con mezclas de reacción conteniendo pico II (DEAE) y glucosa-1-P 20 mM incubadas durante distintos tiempos. Controles de pico II (DEAE) incubados en las mismas condiciones, pero en ausencia del dador de glucosa, se corrieron simultáneamente. Como se observa en la figura 27, en el gel correspondiente al tiempo de incubación

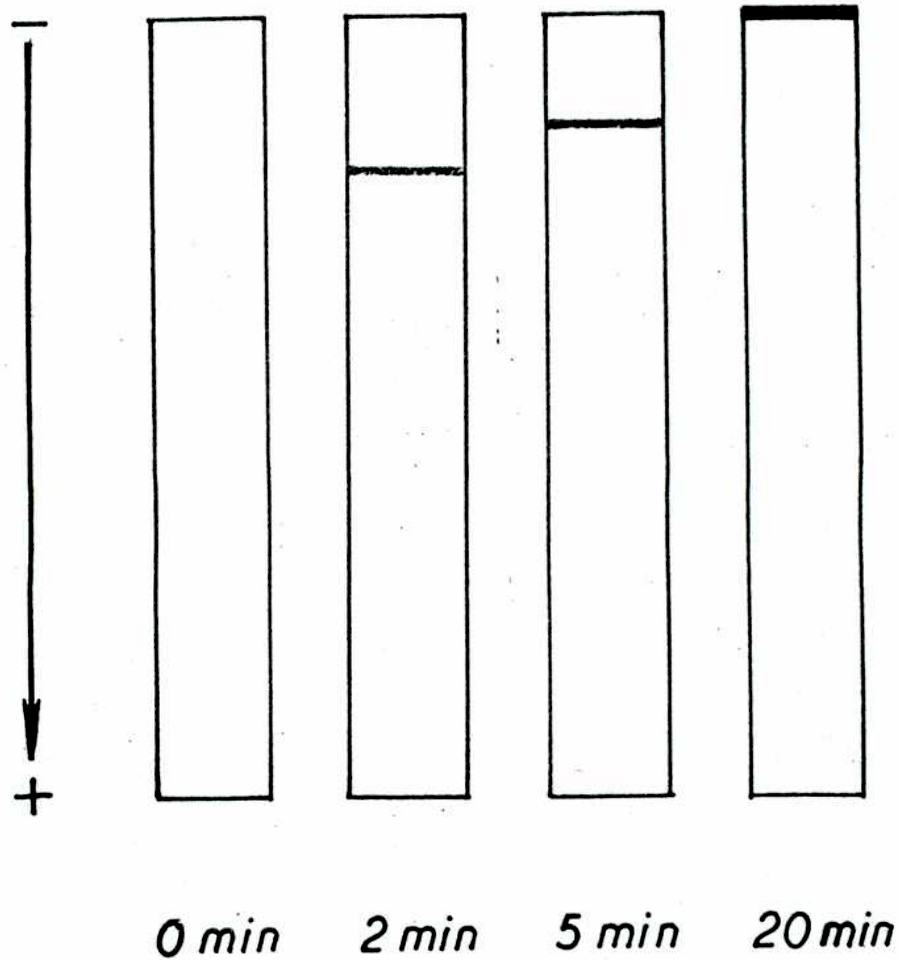


FIG. 27. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes demostrando el efecto del tiempo de incubación sobre la movilidad de los productos de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Las muestras conteniendo 20  $\mu\text{g}$  de proteína del pico II (DEAE) fueron incubadas a 37°C con 0,2  $\mu\text{moles}$  de glucosa-1-P en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$  durante los tiempos que se indican en cada caso y sometidas a electroforesis en gel de 7% de acrilamida. Los geles fueron coloreados con el reactivo de iodo inmediatamente después de la corrida. Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

más corto ensayado, aparece una banda que da color azul con iodo. Cuando se prolonga el tiempo de incubación la intensidad de la banda aumenta mientras que, paralelamente, su movilidad disminuye. Tiempos de incubación superiores a 20 min llevan a la formación de un producto que da color azul intenso con iodo, pero que queda en el origen del gel.

Si suponemos que el producto glucosilado migra dentro del gel por estar unido a una proteína, las variaciones en la movilidad de los productos formados a distintos tiempos de incubación podrían deberse a diferencias de peso molecular. Para ello, se sometieron a electroforesis mezclas de reacción incubadas durante distintos tiempos en geles de 5 a 8% de acrilamida, siguiendo el método de Hedrick y Smith (1968). La figura 28 ilustra los resultados de este experimento. Cuando se grafica en escala semilogarítmica las movilidades relativas de las bandas iodo positivas obtenidas de la figura 28, en función de la concentración de acrilamida en el gel, se observa una relación lineal (Hedrick y Smith, 1968). Las bandas correspondientes a los dos tiempos de incubación dan rectas paralelas de pendiente -2,3. Por interpolación de este valor en la curva de calibración correspondiente, se obtiene un peso molecular aparente de 23.000 para ambos productos.

No se dispone de datos específicos sobre el efecto de la conjugación de proteínas con hidratos de carbono y el efecto resultante sobre su movilidad en gel. Tampoco ha sido evaluado el efecto de la forma de las proteínas sobre la movilidad en gel (Hedrick y Smith, 1968).

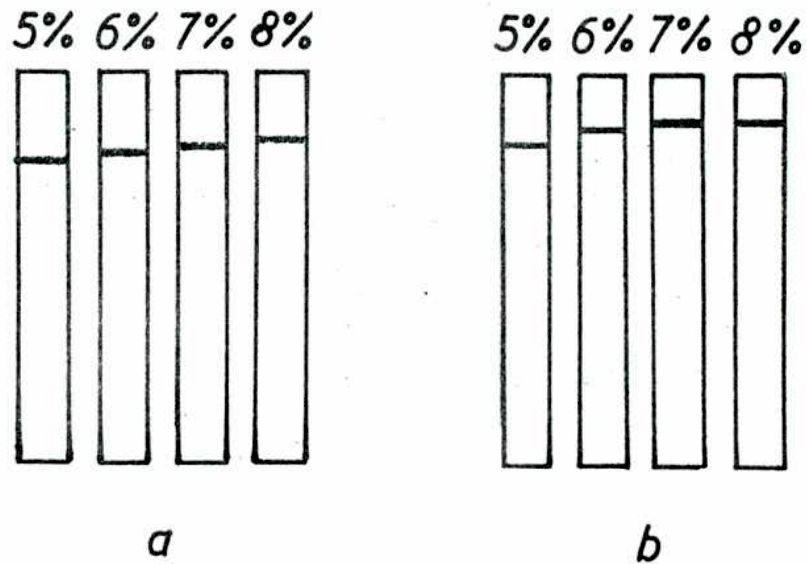


FIG. 28. Efecto de la concentración de acrilamida en el gel sobre la migración electroforética en condiciones no desnaturizantes del producto sintetizado por la fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Las mezclas de reacción fueron incubadas por 2 min (a) o por 5 min (b) (ver condiciones en la leyenda de la Fig. 27) y sometidas a electroforesis en gel de acrilamida de concentraciones variables como se indica.

El comportamiento de los productos obtenidos a distintos tiempos de incubación corresponde a proteínas del mismo peso molecular y carga diferente al pH de la electroforesis (Hedrick y Smith, 1968). La diferencia de carga entre ambos productos sería explicable si aceptamos que el agregado de glucosas modifica la carga neta del aceptor proteico. Por otra parte, si se postula que el agregado de glucosas se lleva a cabo sobre un mismo aceptor, el aumento del largo de la cadena glucosídica daría como resultado un aumento en el peso molecular. Sin embargo, este método, por las limitaciones ya señaladas, podría no discriminar estas diferencias de peso molecular.

#### Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa

Los dos métodos usados para la obtención del producto, precipitación con ácido tricloroacético y filtración por gel de Sephadex G-25 no permiten separar al producto de la enzima. Consideramos que su separación podría facilitar el estudio de la naturaleza glucoproteica del producto de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Por esta razón, se intentó su separación por ultracentrifugación en gradiente de 5 a 20% (P/V) de sacarosa. Se llevó a cabo el siguiente experimento: el producto radioactivo obtenido por filtración en gel de Sephadex G-25 se conservó durante 4 h a 0°C y luego de este tiempo se centrifugó 10 min a 2000 x g. Se obtuvieron un precipitado y un sobrenadante líquido, ambos ra-



radioactivos. Se hizo un experimento en paralelo en el que se usó glucosa-1-P no radioactivo para la obtención del producto y se lo sometió al mismo tratamiento. Alícuotas de ambos sobrenadantes se ultracentrifugaron en gradiente de 5 a 20% de sacarosa. La figura 29 muestra el perfil de sedimentación de la radioactividad (A), el perfil de sedimentación del producto que forma un complejo coloreado con el reactivo de yodo y el de la actividad de fosforilasa en ausencia de aceptor exógeno (B) en los gradientes. Se observa que las fracciones superiores del gradiente contienen el producto radioactivo (Fig. 29A) y un producto que da color marrón con el reactivo de yodo (B). Si el volumen de exclusión se ultracentrifuga directamente, sin dejar 4 h a 0°C, se obtienen dos zonas radioactivas en el gradiente: un precipitado en el fondo del tubo y otra en las fracciones superiores.

La posición del pico de actividad (Fig. 29B) coincide con el obtenido para el pico II (DEAE) incubado en ausencia del éster fosfórico que se usó como control. Puede observarse que aunque el pico de actividad de fosforilasa y el producto sedimentan en posiciones distintas, la separación obtenida es incompleta, debido a la presencia de actividad enzimática residual en las fracciones superiores del gradiente.

### Cromatografía de afinidad

Los métodos usados hasta ahora no permiten separar al producto de la enzima. Con el objeto de obtener un producto libre de la enzima, se decidió utilizar la cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A-Sepharosa.

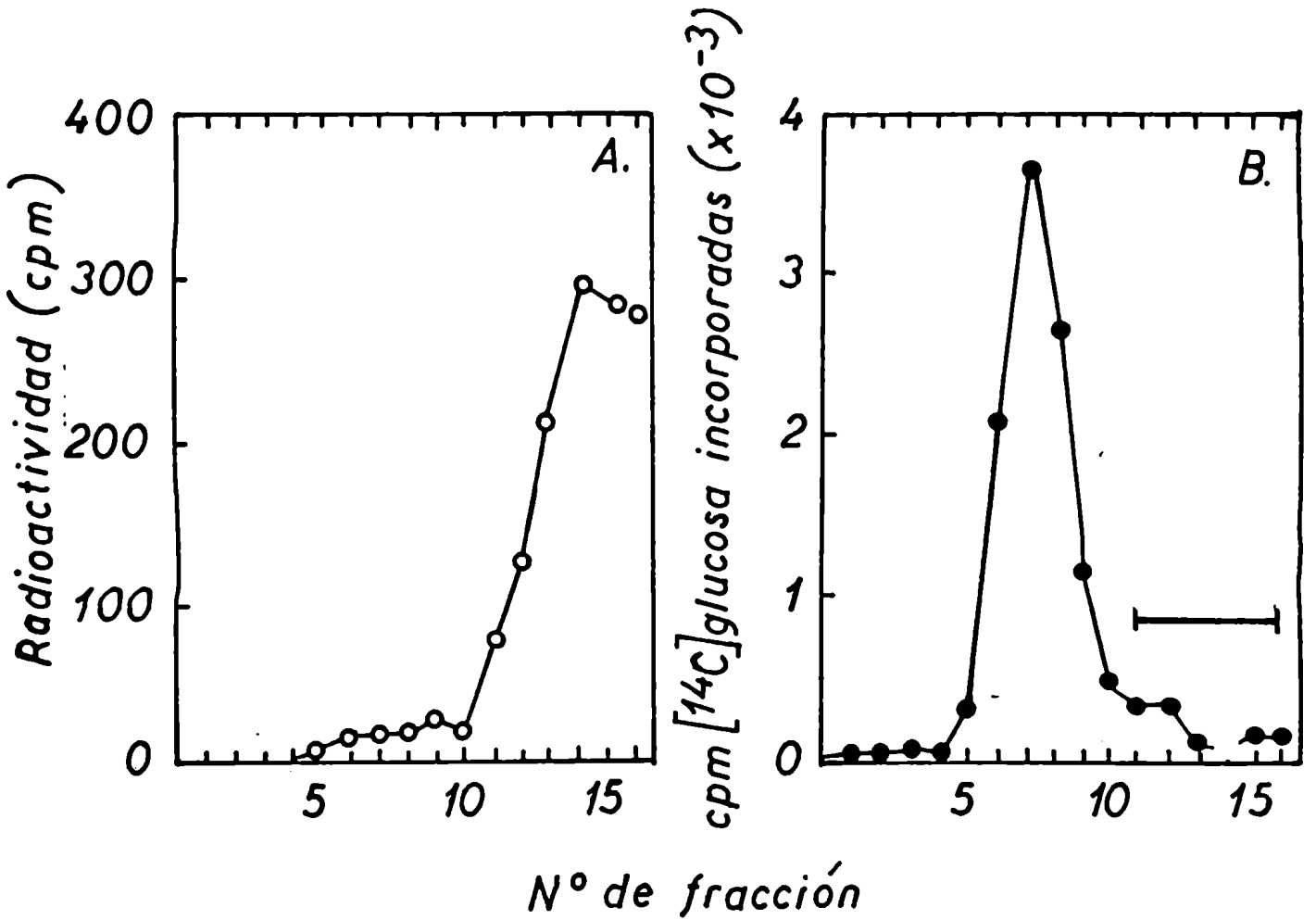


FIG. 29. Ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Producto radioactivo (A) y producto no radioactivo (B) obtenidos por incubación de fosforilasa de pisco II (DEAE) (400  $\mu$ g de proteína) en ausencia de aceptor exógeno, fueron sometidos a ultracentrifugación en gradiente de 5-20% (P/V) de sacarosa, como se describe en Materiales y Métodos. A. Perfil de sedimentación de radioactividad. B. Perfil de sedimentación del producto que forma un complejo coloreado con el reactivo de yodo (—) y de la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno (●) medida a 37°C durante 90 min en presencia de 0,1 M buffer MES, pH 5, 7, y de 5 mg/ml de albúmina.

Como se describió anteriormente, la fosforilasa de pico II (DEAE) no se une a la lectina inmovilizada (Fig. 16). El pasaje del pico II por una columna de este tipo resulta, por lo tanto, en una enzima completamente activa y libre de glicoproteínas contaminantes. Se pensó entonces en utilizar la enzima así purificada para incubarla con su sustrato y por último, separarla del producto mediante una segunda cromatografía en concanavalina A-Sepharosa. Se podría entonces estudiar el producto sin interferencia, ni de la enzima que lo sintetizó ni de las glicoproteínas que contaminaban inicialmente la preparación enzimática.

La fracción enzimática que se usó para este experimento, pico II (con A), se obtuvo por pasaje del pico II (DEAE) por una columna de concanavalina A-Sepharosa. Se incubó la enzima (100 µg) con  $^{14}\text{C}$  glucosa-1-P 20 mM, se eliminó el exceso del dador de glucosa por filtración en una pequeña columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer B y el volumen de exclusión fue sometido a cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A-Sepharosa.

La figura 30 muestra el perfil de la radioactividad eluida de la columna de concanavalina A-Sepharosa. Se observa que la lectina une específicamente un producto radioactivo. Una alícuota del mismo, ensayada con el reactivo de iodo, forma un complejo marrón. Cuando una alícuota de este producto se somete a ultracentrifugación en gradiente de 5-20% de sacarosa, la radioactividad sedimenta en las fracciones superiores. En la misma figura se observa que la concanavalina A no tiene otro producto radioactivo que da color azul cuando se ensaya con el reactivo de iodo.

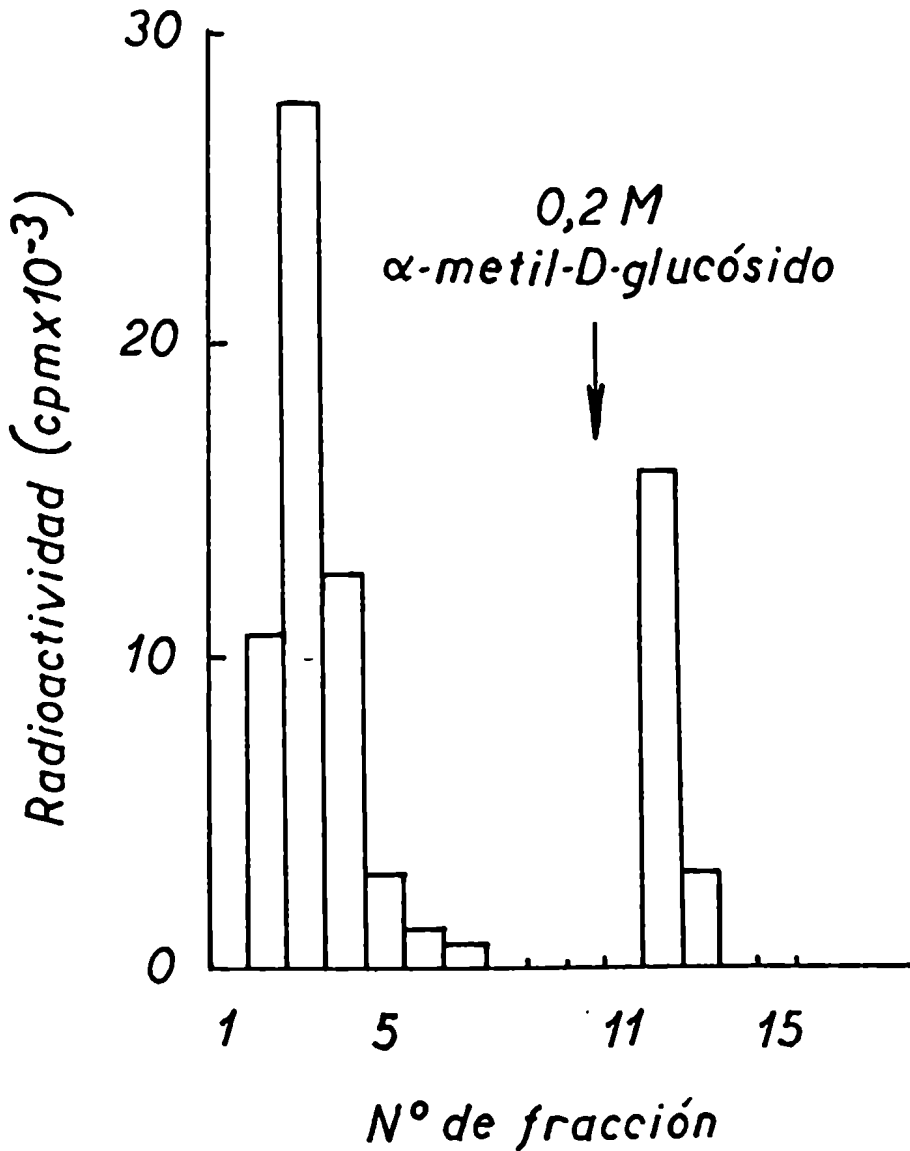


FIG. 30. Fraccionamiento por cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A-Sepharosa de los productos de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Se incubó durante 10 min una mezcla de reacción conteniendo 100  $\mu\text{g}$  de proteína de fosforilasa del pico II ( con A) y 10  $\mu\text{moles}$  de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P en un volumen total de 0,5 ml. Se filtró por una pequeña columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer B y el volumen de exclusión (0,8 ml, 80.000 cpm) fue sometido a cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A-Sepharosa como se describe en Materiales y Métodos. Se midió la radioactividad en cada una de las fracciones. Fracciones 5-10: lavado de la columna con buffer B. Fracciones 11-15: eluidas por agregado de 0,2 M  $\alpha$ -metil-D-glucósido al mismo buffer.

Ninguno de estos productos es dializable. Se ensayó actividad de fosforilasa en presencia y en ausencia de aceptor exógeno en alícuotas de ambas fracciones y sólo se la detectó en la que no es retenida por la lectina inmovilizada.

Aunque la concanavalina A tiene afinidad por los grupos  $\alpha$ -glucosilo, no une a los  $\alpha$ -1,4 glucanos de cadena larga y lineal del tipo de la amilosa (Goldstein y col., 1965). Esta lectina une, en cambio, grupos  $\alpha$ -glucosilo de glucanos más cortos o ramificados (Smith y Goldstein, 1967; Goldstein y col., 1965). Los resultados obtenidos indicarían, entonces, diferencias en la cadena glucosídica de los productos unido y no unido por la lectina, pero la parte proteica de ambos podría ser la misma.

Se sometieron alícuotas de las fracciones eluidas de la lectina inmovilizada a electroforesis en geles de 5-8% de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes. A cada una de las concentraciones de acrilamida ensayadas, se observaron movilidades electroforéticas similares para ambos productos (resultados que no se muestran). Cuando esas mismas fracciones radioactivas obtenidas por cromatografía de afinidad se someten a electroforesis en gel de 10% de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea, la banda radioactiva que se observa en ambas fluorografías tiene la misma movilidad (resultados que no se muestran) y coincide con la del producto radioactivo insoluble en ácido tricloroacético.

El proteínograma correspondiente al producto retenido por la lectina

inmovilizada mostró varias bandas de proteína, pero controles corridos en paralelo mostraron que correspondían a subunidades proteicas liberadas de la columna por el  $\alpha$ -metil-D-glucósido, probablemente subunidades de la lectina (Lloyd, 1976). La presencia, en esa fracción, de una proteína en muy baja cantidad, podría ser enmascarada por estos contaminantes.

#### PRESENCIA DE LA ACTIVIDAD DE FOSFORILASA INDEPENDIENTE DE ACEPTOR EXÓGENO EN AMILOPLASTOS AISLADOS DE TUBERCULO DE PAPA

Como ya se comentó en la "Introducción", la biosíntesis del almidón, y por ende de la amilosa, tiene lugar en los amiloplastos. Al menos un 50% de los amiloplastos de un tubérculo de papa maduro consisten en un gran gránulo de almidón (25-100  $\mu$ m) encerrado por una doble membrana (Isherwood, 1976). Sin embargo, la separación de los amiloplastos intactos es difícil dada la fácil ruptura de las membranas al centrifugar aún a baja velocidad. El método descrito por Fishwick y Wright (1980) aprovecha la alta densidad del almidón para separar los amiloplastos que lo contienen y permite la obtención de hasta un 16% de amiloplastos intactos.

Por la posible relación entre la fosforilasa independiente de aceptor exógeno y la iniciación de la biosíntesis del almidón in vivo, consideramos de interés investigar su presencia en amiloplastos y utilizamos el método de Fishwick y Wright para prepararlos. La fracción no sedimentable ob-

tenida a partir de amiloplastos aislados y rotos según esa técnica, fue precipitada con sulfato de amonio al 50% de saturación y luego dializada contra buffer A. Se utilizó esta fracción dializada ( $S_{100}$ ) como fuente de enzima. Se ensayó actividad de fosforilasa en alícuotas de esta fracción y se encontró que tiene actividad tanto en presencia como en ausencia de aceptor exógeno. Se sometieron alícuotas de esta preparación enzimática a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes y se localizaron ambas actividades (Fig. 31). Paralelamente se electroforetizaron alícuotas del  $S_{140}$  y los resultados se muestran en la misma figura. Si se comparan los zimogramas obtenidos puede observarse que la localización e intensidad de las bandas de fosforilasa en presencia de glucógeno difieren parcialmente; sólo la banda de movilidad intermedia está presente en ambas preparaciones. Cuando se omite el polisacárido de la mezcla de incubación, la posición de la fosforilasa en  $S_{100}$  y  $S_{140}$  coincide. Sin embargo, aunque ambas preparaciones presentan actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno, la actividad específica es distinta en cada caso. En la figura 32 se muestra la incorporación de  $^{14}\text{C}$  glucosa a partir de  $^{14}\text{C}$  glucosa-1-P a material insoluble en ácido tricloroacético en función del tiempo, para cada una de las preparaciones. Se observa que en ausencia de aceptor exógeno, la incorporación de  $^{14}\text{C}$  glucosa a material insoluble en ácido tricloroacético es mucho más rápida en el caso de  $S_{100}$  que en el  $S_{140}$ , cuando se utilizan concentraciones similares de proteína enzimática en la incubación. En efecto, el período

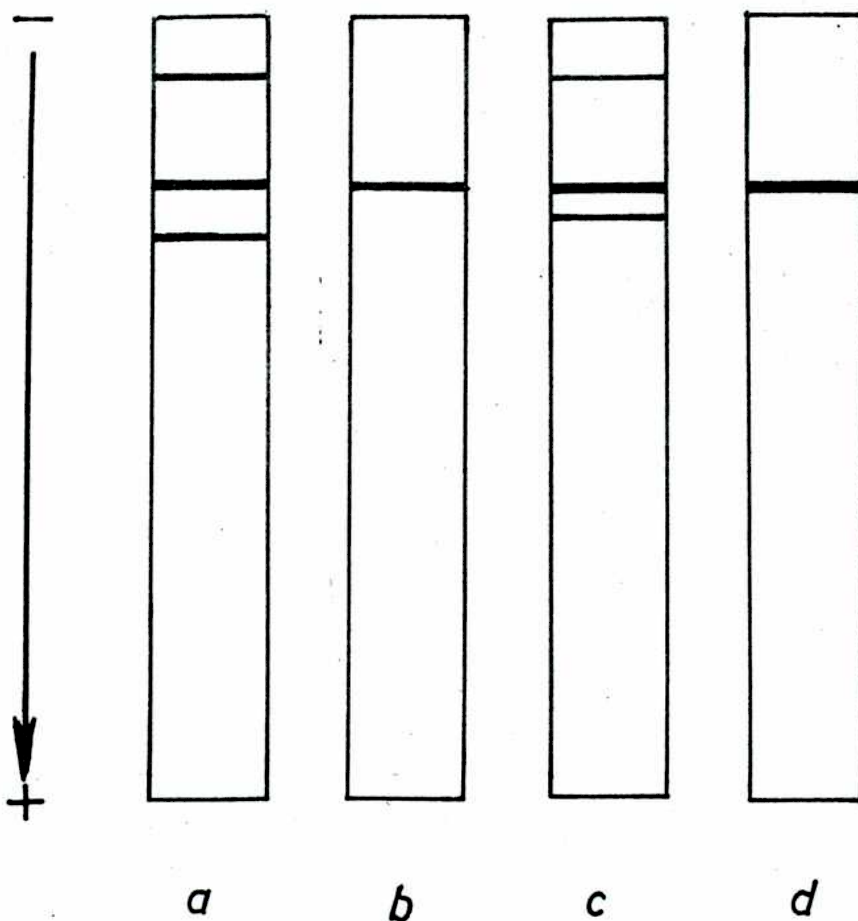


FIG. 31. Electroforesis en gel de 7% de acrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Muestras conteniendo 30  $\mu$ g de proteína del S<sub>100</sub> (a y b) y 110  $\mu$ g de proteína del S<sub>140</sub> (c y d) se sometieron a electroforesis como se describe en Materiales y Métodos. Se localizó actividad de fosforilasa dependiente (a y c) e independiente (b y d) de aceptor exógeno.



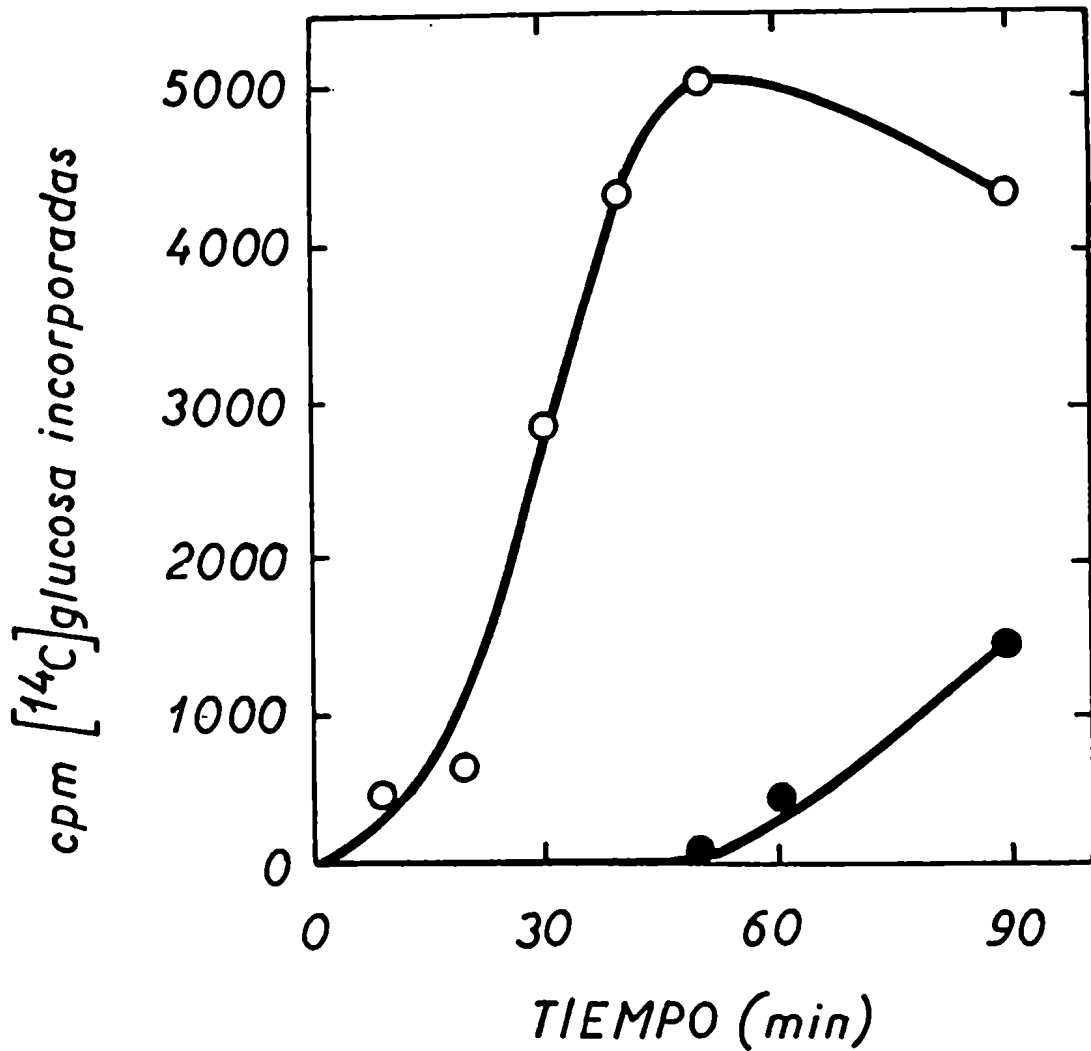


FIG. 32. Curva de tiempo de la fosforilasa del S<sub>100</sub> y de la fosforilasa del S<sub>140</sub> independientes de aceptor exógeno. Se utilizaron iguales cantidades de proteína enzimática (33  $\mu$ g) en cada ensayo. Las incubaciones se hicieron en presencia de 0,1 M buffer MES, pH 5,7, y de 5 mg/ml de albúmina. Las demás condiciones fueron las del ensayo standard. (○) S<sub>100</sub>; (●) S<sub>140</sub>.

de latencia es de unos pocos minutos en el S<sub>100</sub> y del orden de una hora en el S<sub>140</sub>, indicando así una mayor actividad específica en el caso de la fracción preparada a partir de amiloplastos.

Para examinar la composición de proteínas de ambas fracciones no sedimentables se usó la electroforesis en gel de 10% de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea (Fig. 33). El proteínograma correspondiente a la fracción no sedimentable de amiloplastos aislados (a) es marcadamente diferente del que presenta el S<sub>140</sub> (b) (Fig. 33). Sin embargo, ambos perfiles electroforéticos presentan algunas bandas comunes, entre ellas una de PM 96.000, que como ya se ha indicado, corresponde a la subunidad de fosforilasa (ver Fig. 18).

En la figura 33 se indica también la posición de una banda radioactiva que aparece por incubación de estas fracciones con [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P. La movilidad de esta banda coincide con la banda radioactiva correspondiente al producto de la fosforilasa pico II cuando es incubada con [<sup>14</sup>C]glucosa-1-P en condiciones similares.

#### PRESENCIA DE PROTEINAS EN LA AMILOSA PURIFICADA

Datos obtenidos en nuestro laboratorio indicaron la presencia de pequeñas cantidades de proteína en la amilosa comercial aún después de varios ciclos de solubilización y reprecipitación con butanol (Cardini, C. E., comunicación personal).

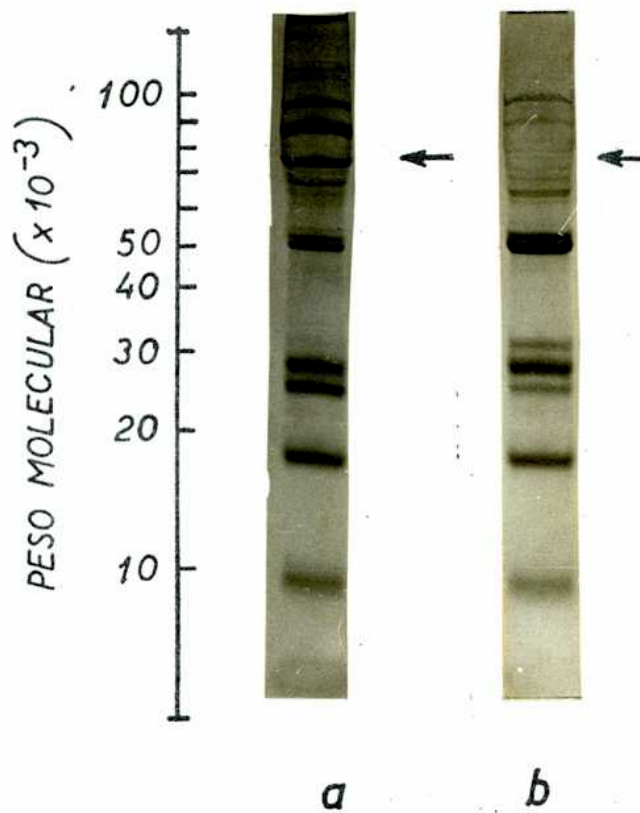


FIG. 33. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea. Productos radioactivos de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno (20  $\mu$ g de proteína, 1000 cpm) de las fracciones S100 (a) y S140 (b) obtenidos por precipitación con ácido tricloroacético (5%), fueron sometidos a electroforesis en gel de 10% de acrilamida. Los gels fueron coloreados con Coomassie brilliant blue y las flechas indican la posición de las bandas radioactivas determinada por fluorografía. Proteínogramas similares se obtuvieron por electroforesis de muestras (20  $\mu$ g de proteína) de S100 y de S140. La escala a la izquierda indica los pesos moleculares estimados determinados por calibración de gels idénticos con proteínas marcadoras. Los demás detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

Los datos obtenidos en el transcurso de este trabajo sugieren que el producto sintetizado por la fosforilasa pico II (DEAE) en ausencia de aceptor exógeno es de naturaleza glucoproteica. Además, como este producto y la amilosa tienen propiedades similares, se consideró de interés investigar, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea, el tipo de unión existente entre la amilosa purificada y la proteína presente en la misma. En un ensayo preliminar se detectó amilosa en el gel mediante el reactivo de yodo y se vio que la mayor parte quedaba en el origen del gel, pero que una pequeña fracción entraba en el mismo; por coloración con Coomassie brilliant blue se observaron bandas de proteína en la misma posición que la banda yodo positiva.

Con el fin de descartar una posible coincidencia entre la migración electroforética de proteínas contaminantes y la del glucano se modificó la concentración de acrilamida en el gel. Se sometió también a electroforesis el producto radioactivo sintetizado por la fosforilasa pico II (DEAE) con fines comparativos y en la figura 34 se muestran los resultados obtenidos. En el caso de la amilosa se observa la coincidencia en la migración del glucano, revelado mediante el reactivo de yodo, con la de las bandas de proteína. Esta coincidencia se mantiene en cada una de las tres concentraciones de acrilamida en el gel utilizadas. En cada caso, la movilidad observada es similar a la del producto radioactivo sintetizado por la enzima in vitro.

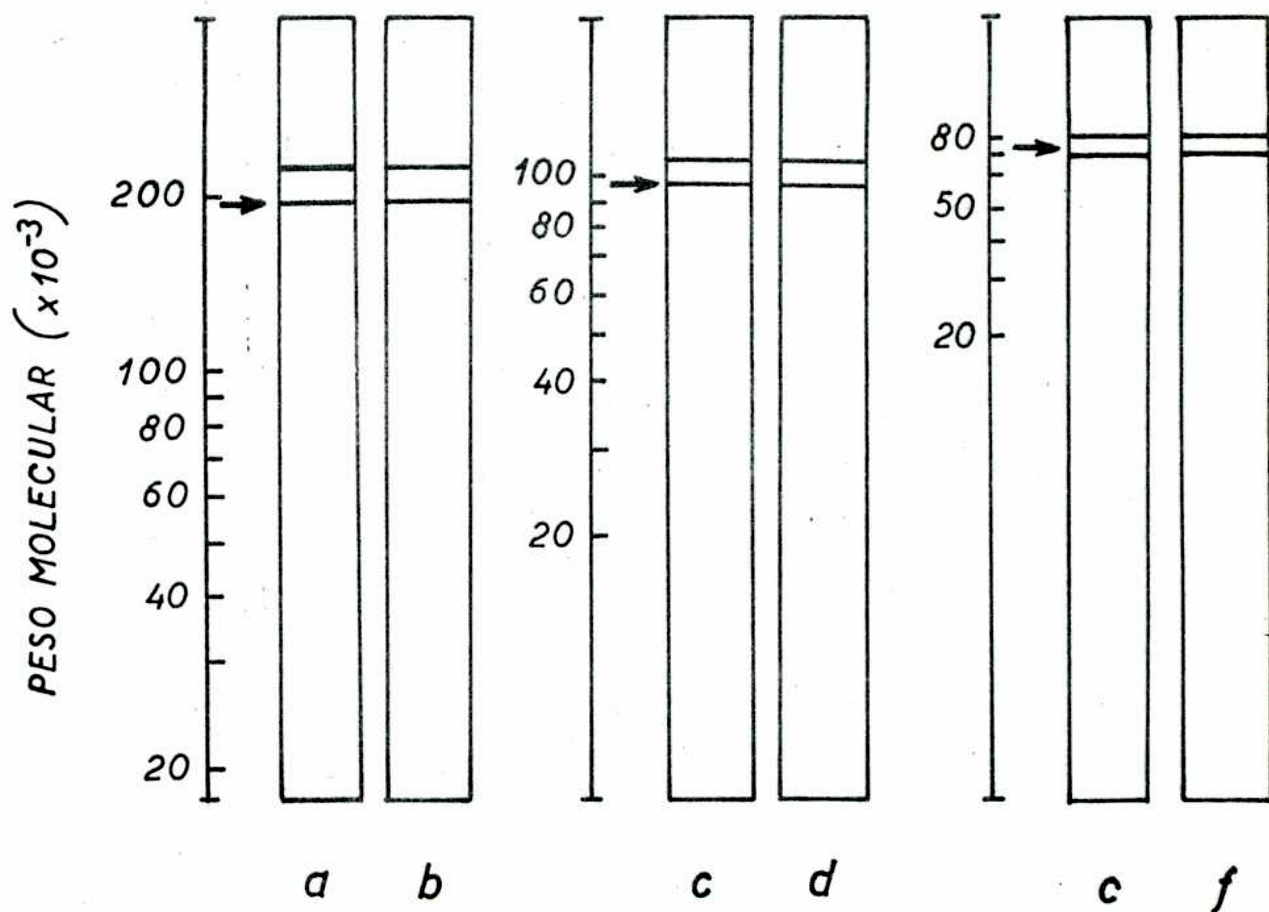


FIG. 34. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio y urea. Muestras conteniendo 1 mg de amilosa fueron sometidas a electroforesis en gel de 5% (a y b), 7% (c y d) o 10% (e y f) de acrilamida. Luego de la electroforesis, los gels fueron coloreados con Coomassie brilliant blue (a, c y e) o con reactivo de yodo (b, d y f). Las flechas indican la posición de las bandas radioactivas determinada por fluorografía cuando se sometió al producto sintetizado por la fosforilasa de pico II (DEAE) en ausencia de aceptor exógeno a electroforesis en idénticas condiciones. Las escalas a la izquierda de las figuras indican los pesos moleculares determinados por calibración de gels idénticos con proteínas marcadoras. Las demás condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los datos presentados en este trabajo señalan la presencia de dos tipos de actividad de fosforilasa en tubérculo de papa: dependiente e independiente de aceptor exógeno. Por electroforesis en gel de poli-acrilamida pueden separarse varias isoenzimas de fosforilasa de las cuales sólo una presenta actividad en ausencia de aceptor exógeno (Fig. 1). Ya otros autores habían descrito la separación por este método de isoenzimas de fosforilasa en tubérculo de papa. Gerbrandy y Verleur (1971) y Gerbrandy y Doorgeest (1972) estudiaron solamente la actividad en presencia de aceptor agregado, mientras que Slabnik y Frydman (1970) encontraron una isoenzima que presentaba actividad en ausencia de aceptor exógeno. Midieron esta actividad por la liberación de fosfato inorgánico o por la formación de un producto que se coloreaba con reactivo de iodo. En nuestro caso la preparación utilizada como fuente de enzima, el S<sub>140</sub> (Tandecarz y col., 1975) se obtuvo por un método distinto y corresponde a una fracción que no sedimenta a alta velocidad. La actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno de esta fracción enzimática y de las obtenidas a partir de ella fue medida por incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa a material insoluble en 5% ácido tricloroacético.

Por cromatografía en columna de DEAE-celulosa se logra separar la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno (pico II) (Fig. 2). Este paso resulta en una purificación de catorce veces respecto del S<sub>140</sub> y permite eliminar proteínas contaminantes (Fig. 4) sin pérdida de la actividad enzimática independiente de aceptor exógeno (Fig. 3).

Esta enzima agrega unidades de glucosa a un aceptor endógeno cuando es incubada con glucosa-1-P en concentración milimolar después de un período de latencia (Figs. 5, 7 y 9). Este período es una de las características de la reacción. Una cinética similar fue observada en otras fosforilasas que presentan actividad en ausencia de aceptor agregado, obtenidas de papa (Kamogawa y col., 1968), de semillas de arveja (Matheson y Richardson, 1976) o de endosperma de semillas de maíz (Tsai y Nelson, 1968) y de centeno (Baxter y Duffus, 1973). La isoenzima de fosforilasa descrita por Frydman y Slabnik (1973) en cambio, no presenta ese período de latencia inicial. La duración de este período puede acortarse mediante el incremento de la concentración de proteína (Fig. 6) o de la concentración de glucosa-1-P (Fig. 10) en la mezcla de reacción. Por la dependencia que este período de latencia muestra respecto de la concentración de proteína enzimática, es difícil comparar las actividades enzimáticas de dos preparaciones distintas. Se optó, entonces, por expresar las velocidades de reacción como las pendientes de las curvas de producto en función del tiempo después del período de latencia. Este período representaría el tiempo requerido para la formación, por la enzima, de un mejor aceptor para las unidades de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa provenientes de [ $^{14}\text{C}$ ]glucosa-1-P. Los resultados de los experimentos que se ilustran en la figura 11 y en la Tabla II estarían de acuerdo con esta hipótesis. El producto de la fosforilasa sintetizado en ausencia de aceptor exógeno puede también actuar como aceptor para el agregado de unidades de glucosa por la acción de enzimas presentes en el pico II (DEAE) que

utilizan ADP-glucosa y UDP-glucosa como dadores de glucosa (Tabla III). La presencia de almidón sintetasas solubles con la misma especificidad de dador de glucosa que las sintetasas unidas al grano de almidón ya había sido descripta por Tandecarz y col. (1975) en el S<sub>140</sub> de tubérculo de papa.

Se ha descripto el efecto inhibitor de la 1,5-D-gluconolactona sobre fosforilasas, sintetasas y glucosidasas de distintas fuentes (Tu y col., 1971; McVerry y Kim, 1974; Fox y col., 1976; Leaback, 1968). Se sugirió que este efecto se debe a la gran similitud existente entre el inhibidor y el grupo glucosilo durante el estado de transición de la reacción (Tu y col., 1971), que sería semejante para todas las glucosiltransferasas. La Tabla V muestra que la lactona es también un inhibidor efectivo de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno.

Como se ha comentado en la "Introducción", varios autores han sugerido que la actividad de fosforilasa encontrada en ausencia de aceptor exógeno en preparaciones enzimáticas obtenidas de distintas fuentes se debería a la presencia de hidratos de carbono endógenos que actuarían como aceptores. A este respecto se ha informado de la desaparición de dicha actividad luego del tratamiento de la fracción enzimática con amiloglucosidasa (Kamogawa y col., 1968),  $\alpha$ -amilasa (Fredrick, 1971), o  $\beta$ -amilasa (Frydman y Slabnik, 1973). Fredrick (1975) encontró que una fosforilasa independiente de aceptor exógeno presente en el alga azul-verdosa Oscillatoria princeps se une a la concanavalina A-Sepharosa y sugirió que esta actividad se debería a la presencia de un glucano ramifi-



cado unido a la enzima. Se emplearon varios métodos, basados en distintos principios, con el objeto de eliminar hidratos de carbono que pudieran estar presentes en el pico II (DEAE). La preparación enzimática utilizada conserva la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno aún después de su incubación en condiciones favorables para la fosforólisis (Tabla VII) o de su tratamiento con amiloglucosidasa (Fig. 14). Esto indica que la actividad en estudio no depende de la presencia de polímeros de glucosa hidrolizables por acción de fosforilasa o amiloglucosidasa.

Los resultados presentados descartan también la participación de glicoproteínas en la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno. Las glicoproteínas presentes en el pico II (DEAE) pueden ser evidenciadas mediante la reacción de PAS (Fig. 15) y son retenidas por la concanavalina A-Sepharosa (Figs. 16 y 17). Dado que la enzima no es retenida por la lectina inmovilizada (Fig. 16), la cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A-Sepharosa, además de resultar un paso de purificación particularmente bueno, constituye una evidencia de que la actividad de fosforilasa independiente de aceptor exógeno no requiere de la presencia de estas glicoproteínas. Por otra parte, la falta de afinidad de la fosforilasa por la lectina inmovilizada (Fig. 16), la constancia del peso molecular de la subunidad de fosforilasa determinados por electroforesis en geles de distintas concentraciones de acrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea (Fig. 18) y la reacción de PAS negativa de dicha subunidad indican que esta enzima no es una glicoproteína.

La presencia de un período de latencia (Fig. 5), el rango útil de pH más estricto (Fig. 12), el requerimiento de concentraciones de glucosa-1-P micromolar y la mayor sensibilidad a la inactivación térmica distinguen a la actividad de fosforilasa independiente de la dependiente de aceptor exógeno, con la que coexiste en el pico II (DEAE). Estos datos no descartan la posibilidad de que se trate de dos enzimas distintas o de dos formas conformacionalmente distintas de la misma enzima. La ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (Fig. 19), la filtración en columna de Bio-Gel A 0,5m (Fig. 20), la cromatografía de afinidad en columna de concanavalina A-Sepharosa (Fig. 16) y la electroforesis en geles de 5-8% de acrilamida en condiciones no desnaturizantes (Fig. 21) proporcionaron datos acerca de la estructura de la enzima y en algunos casos permitieron purificarla significativamente. Sin embargo, resultaron negativos en cuanto a la separación de ambas actividades en cuestión.

En contraste, la fosforilasa pico I, que sólo tiene actividad dependiente de aceptor exógeno y que eluye de la columna de DEAE-celulosa a menor fuerza iónica que el pico II, difiere de este último también en la movilidad electroforética en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (Fig. 21). Además, su peso molecular (135.000) determinado por el método descrito por Hedrick y Smith (1968) es algo menor que el encontrado para la fosforilasa pico II (185.000) en las mismas condiciones (Figs. 22, 23 y 24).

Puede concluirse que la fosforilasa pico II (DEAE) se trata, o bien de una única proteína que presenta ambas actividades enzimáticas o bien,

de dos enzimas que difieren apenas en su estructura en una forma tal que impide su separación por los métodos hasta aquí utilizados.

La caracterización de la parte glucosídica del producto sintetizado por la fosforilasa independiente de aceptor exógeno indica que se trata de cadenas glucosídicas largas en unión  $\alpha$ -1,4.

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea fue utilizada para investigar el efecto de proteasa sobre el producto (Fig. 26) y para el estudio comparativo de productos de la reacción obtenidos por distintos métodos.

El peso molecular aparente del producto sintetizado varía según la concentración de acrilamida en el gel (Tabla IX), y no depende del tiempo de incubación ni del método empleado para su obtención, ni de la técnica utilizada para su localización en el gel. Sin embargo, en condiciones no desnaturizantes (Figs. 27 y 28) se observan diferencias de movilidad electroforéticas para productos sintetizados a distintos tiempos. Esta diferencia podría deberse a la influencia que tiene la carga neta de la molécula en la electroforesis en condiciones no desnaturizantes, mientras que en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea no existe un efecto de este tipo.

La similitud del comportamiento electroforético en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea encontrada para productos obtenidos por los distintos procedimientos que se detallan en "Resultados" indicaría que las discrepancias entre los pesos moleculares estimados por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia o en ausencia de dode-

cilsulfato de sodio y urea podría deberse a las limitaciones ya señaladas para su aplicación a moléculas de esta naturaleza. Los pesos moleculares aparentes estimados para el producto varían entre 23.000, determinado por electroforesis en geles de distintas concentraciones de acrilamida en condiciones no desnaturizantes (Figs. 22, 23 y 24) y 74.000, determinado por electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio y urea (Tabla IX) en gel de la mayor concentración de acrilamida utilizada (10%).

Ya Green y Stumpf (1942) e Illingworth y col. (1961) habían sugerido al encontrar fosforilasas en tejidos vegetales y animales con actividad en ausencia de aceptor exógeno que en ese caso la misma enzima actuaría como aceptor. En nuestro caso, la enzima conserva esta actividad aún después de las etapas de purificación que van hasta la obtención del pico II (DEAE) y de la aplicación de los distintos métodos que utilizamos para su estudio. Supusimos entonces que, tal como había sido sugerido por esos autores, el producto se formaba por el agregado de unidades de glucosa a la misma enzima. Sin embargo, y a pesar de las discrepancias entre los pesos moleculares aparentes determinados por los métodos usados, ellos son en ambos casos menores que el determinado para la subunidad de fosforilasa, de PM 96.000 (Fig. 18). La ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa suministró datos que concuerdan con estos resultados (Fig. 29). Esto podría explicarse si se acepta que luego del agregado de unidades de glucosa sobre la misma enzima un procesamiento subsiguiente da como resultado la formación

de un producto de peso molecular menor que el de la enzima. Una posibilidad alternativa sería que el aceptor fuera un polipéptido de bajo peso molecular que acompañara a la enzima a través de los distintos pasos seguidos para su purificación y estudio y que se separa cuando se glucosila. Los datos obtenidos en el curso de esta investigación nos permiten decidir entre estas alternativas, ambas basadas en los datos de peso molecular del producto estimados como ya se indicó.

Investigamos la presencia de la actividad en estudio en una fracción enzimática, el S<sub>100</sub>, obtenida de amiloplastos aislados de tubérculo de papa. El hallazgo de esta enzima (Figs. 31 y 32) y la formación por la misma de un producto similar al sintetizado in vitro por acción de la fosforilasa pica II (DEAE) (Fig. 33) apoyan la hipótesis de la participación de la fosforilasa independiente de aceptor exógeno en la biosíntesis del almidón, la que en los tejidos de reserva tiene lugar en los amiloplastos (Salema y Badenhuizen, 1967). Una evidencia adicional en favor de esta hipótesis es el hallazgo de proteínas covalentemente unidas a amilosa de papa (Fig. 34) lo que indicaría que este componente del almidón podría formarse in vivo por polimerización sobre un aceptor proteico. La similitud entre el comportamiento electroforético de amilosa y el producto formado in vitro por la fosforilasa independiente de aceptor exógeno, sugiere que la proteína unida a amilosa sería el hipotético aceptor proteico que utiliza la enzima.

BIBLIOGRAFIA

- Aimi, R. y Murakami, T. (1954) Kagaku (Tokyo) 24, 632.
- Badenhuizen, N. P. (1973) Ann. N. Y. Acad. Sci. 210, 11.
- Bailey, J. M. y Whelan, W. J. (1961) J. Biol. Chem. 236, 969.
- Barengo, R., Flawiá, M. y Krisman, C. R. (1975) FEBS Lett. 53, 274.
- Baxter, E. D. y Duffus, C. M. (1973) Phytochem. 12, 2321.
- Bonner, W. M. y Laskey, R. A. (1974) Eur. J. Biochem. 46, 83.
- Bourne, E. J. y Peat, S. (1945) J. Chem. Soc. London, 877.
- Bray, G. (1960) Anal. Biochem. 1, 279.
- Cardini, C. E. y Frydman, R. B. (1966) Methods Enzymol. 8, 387.
- Cardini, C. E., Leloir, L. F. y Chiriboga, J. (1955) J. Biol. Chem. 214, 148.
- Davis, B. J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 104.
- Doi, A., Doi, K. y Nikuni, Z. (1966) Biochim. Biophys. Acta 113, 312.
- Espada, J. (1962) J. Biol. Chem. 237, 3577.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. y Wallanch, D. F. H. (1971) Biochemistry 10, 2606.
- Fekete, M. A. R. de (1968) Planta 79, 208.
- Fekete, M. A. R. de y Cardini, C. E. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 104, 173.
- Fishwick, M. J. y Wright, A. J. (1980) Phytochem. 19, 55.
- Fiske, C. y SubbaRow, J. (1925) J. Biol. Chem. 66, 375.
- Fox, J., Kawaguchi, K., Greenberg, E. y Preiss, J. (1976) Biochemistry 15, 849.

- Fredrick, J. F. (1963) *Phytochem.* 2, 413.
- Fredrick, J. F. (1968) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 413.
- Fredrick, J. F. (1969) *Physiol. Plantarum* 12, 868.
- Fredrick, J. F. (1971) *Physiol. Plantarum* 25, 32.
- Fredrick, J. F. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 210, 254.
- Fredrick, J. F. (1975) *Plant Sci. Lett.* 5, 131.
- French, D. (1975) en M.T.P. *Int. Rev. Sci. Biochem. Ser. One Biochemistry of Carbohydrates* (Whelan, W. J., ed.) Vol. V, Butterworths Univ. Park Press, London, p. 267.
- Frydman, R. B. y Cardini, C. E. (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 353.
- Frydman, R. B. y Cardini, C. E. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 9.
- Frydman, R. B., de Souza, B. C. y Cardini, C. E. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 113, 620.
- Frydman, R. B. y Slabnik, E. (1973) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 210, 153.
- Geisow, M. (1979) *Eur. J. Biochem.* 59, 615.
- Gerbrandy, S. J. y Doorgeest, A. (1972) *Phytochem.* 11, 2403.
- Gerbrandy, S. J. y Verleur, J. D. (1971) *Phytochem.* 10, 261.
- Ghosh, H. P. y Preiss, J. (1965) *Biochemistry* 4, 1354.
- Gold, A. M., Johnson, R. M., Sánchez, G. R. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3444.
- Gold, A. M., Legrand, E. y Sánchez, G. R. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5700.
- Goldstein, I. J. y Hayes, C. E. (1978) en *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Tipson, R. S. y Horton, D., eds.) Vol. 35 Academic Press, N.Y., p. 150.

- Goldstein, I. J., Hollerman, C. E. y Merrick, J. M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 97, 68.
- Green, D. E. y Stumpf, P. K. (1942) *J. Biol. Chem.* 142, 355.
- Green, J. R. y Northcote, D. H. (1978) *Biochem. J.* 170, 599.
- Hawker, J. S., Ozbun, J. L. y Preiss, J. (1972) *Phytochem.* 11, 1287.
- Hedrick, J. L. y Smith, A. J. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155.
- Hobson, P. N., Whelan, W. J., y Peat, S. (1950) *J. Chem. Soc. London* 3566.
- Holmes, E. y Preiss, J. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 436.
- Holló, J., Laszló, E. y Hoschke, A. (1964) *Die Stärke* 16, 243.
- Holló, J. y Szejtli, J. (1962) *Die Stärke* 14, 75.
- Illingworth, B., Brown, D. H. y Cori, C. F. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 47, 469.
- Isherwood, F. A. (1976) *Phytochem.* 15, 33.
- Kamogawa, A., Fukui, T. y Nikumi, Z. (1968) *J. Biochem.* 63, 361.
- Kawaguchi, K., Fox, J., Holmes, E., Boyer, Ch. y Preiss, J. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 385.
- Krisman, C. R. y Barengo, R. (1975) *Eur. J. Biochem.* 52, 117.
- Lavintman, N. y Cardini, C. E. (1972) en *Biochemistry of the Glycosidic Linkage* (Piras, R. y Pontis, H. G., eds.) Academic Press, N.Y., p. 503.
- Lavintman, N. y Cardini, C. E. (1973) *FEBS Lett.* 29, 43.
- Lavintman, N., Tandecarz, J. S., Carceller, M., Mendiara, S. y Cardini, C. E. (1974) *Eur. J. Biochem.* 50, 145.
- Leaback, D. H. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 1025.
- Lee, Y. P. (1960a) *Biochim. Biophys. Acta* 43, 18.
- Lee, Y. P. (1960b) *Biochim. Biophys. Acta* 43, 25.



- Leloir, L. F., Fekete, M. A. R. de y Cardini, C. E. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 636.
- Leloir, L. F., Parodi, A. J. y Behrens, N. H. (1971) *Rev. Soc. Arg. Biol.* 47, 108.
- Liddle, A. M., Manners, D. J. y Wright, A. (1961) *Biochem. J.* 80, 304.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Lloyd, K. O. (1976) en: *Concanavalin A as a Tool* (Bitigger, H. y Schnelli, H. P., eds.) John Wiley & Sons, London, p. 390.
- Manners, D. J. (1974) *Essays Biochem.* 10, 37.
- Matheson, N. K. y Richardson, R. H. (1976) *Phytochem.* 15, 887.
- McVerry, P. H. y Kim, K. H. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 1636.
- Murata, T., Sugiyama, T. y Akasawa, T. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 107, 92.
- Ornstein, L. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 321.
- Ozbun, J. L., Hawker, J. S. y Preiss, J. (1971) *Plant Physiol.* 48, 765.
- Ozbun, J. L., Hawker, J. S. y Preiss, J. (1972) *Biochem. J.* 126, 953.
- Panayotatos, N. y Villemez, C. L. (1973) *Biochem. J.* 133, 263.
- Peterson, E. A. y Sorber, H. A. (1962) en *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.) Vol. 5, Academic Press, N. Y., p. 6.
- Preiss, J. y Levi, C. (1979) en *Encyclopedia of Plant Physiology* (Cobbs, M. y Latzko, E., eds.), Vol. 6, Springer Verlag, Berlín, p. 282.
- Recondo, E. y Leloir, L. F. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, 85.
- Salema, R. y Badenhuizen, N. P. (1967) *J. Ultrastr. Res.* 20, 383.
- Schieffer, S., Lee, E. y Whelan, W. (1978) *Carbohydr. Res.* 61, 239.
- Segrest, J., Jackson, R., Andrews, E. y Marchesi, V. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 390.

- Slabnik, E. y Frydman, R. B. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 709.
- Smith, E. E. y Goldstein, I. J. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 88.
- Stegemann, H. (1968) *Z. Analyt. Chem.* 243, 573.
- Steup, M., Schächtele, C. y Latzko, E. (1980) *Planta* 148, 168.
- Tandecarz, J. S. y Cardini, C. E. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 543, 423.
- Tandecarz, J. S. y Cardini, C. E. (1979) *Plant Sci. Lett.* 15, 151.
- Tandecarz, J. S., Lavintman, N. y Cardini, C. E. (1973) *Carbohydr. Res.* 19, 385.
- Tandecarz, J. S., Lavintman, N. y Cardini, C. E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 399, 345.
- Tandecarz, J. S., Sivak, M. N. y Cardini, C. E. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 82, 157.
- Thomas, J. A., Kaith, K., Schlender, K. y Larner, J. (1968) *Anal. Biochem.* 25, 486.
- Thomson, W. W. y Whatley, J. M. (1980) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 375.
- Tomos, A. D. y Northcote, D. H. (1978) *Biochem. J.* 174, 283.
- Trevelyan, W. E., Procter, D. P. y Harrison, J. S. (1950) *Nature* 166, 444.
- Tsai, C. Y. y Nelson, O. E. (1968) *Plant Physiol.* 43, 103.
- Tsai, C. Y. y Nelson, P. E. (1969) *Plant Physiol.* 44, 159.
- Tu, J. I., Jacobson, G. R. y Graves, D. J. (1971) *Biochemistry* 10, 1229.
- Whatley, J. M. (1978) *New Phytol.* 80, 489.
- Worthington, *Enzyme Manual* (1972) Worthington Biochemical Corporation, p. 7.
- Ziegler, A., Harrison, S. C. y Leberman, R. (1974) *Virology* 59, 509.

