

Tesis Doctoral

Iniciación de la biosíntesis del glucógeno en *Escherichia Coli*

Barengo, Renee

1980

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Barengo, Renee. (1980). Iniciación de la biosíntesis del glucógeno en *Escherichia Coli*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1753_Barengo

Cita tipo Chicago:

Barengo, Renee. "Iniciación de la biosíntesis del glucógeno en *Escherichia Coli*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n1753_Barengo

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"INICIACION DE LA BIOSINTESIS DEL GLUCOGENO
EN ESCHERICHIA COLI"

Autor: RENE BARENGO
Director: CLARA R. KRISMAN DE FISCHMAN
Lugar de Trabajo: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUIMICAS
"FUNDACION CAMPOMAR"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

Año 1980

1753
Ej. 2.

A mi madre

A Elvi

A la memoria de mi padre

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas e Instituciones que me ayudaron a lo largo de estos años, y que en suma han permitido la realización de la presente Tesis Doctoral.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Doctora Clara R. Krisman de Fischman, a quien agradezco el haberme guiado en mis primeros pasos en la investigación bioquímica y el haberme transmitido constante apoyo y afectuoso estímulo. Su calidad humana y compañerismo contribuyeron a crear un favorable ambiente de trabajo.

Los consejos y ayuda recibidos del Dr, Juan E. Itoiz posibilitaron mi iniciación en la investigación bioquímica. A él mi más profundo y sincero agradecimiento.

A los Dres. Luis F. Leloir y Carlos E. Cardini, por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar".

Al Dr. Héctor N. Torres, Consejero de estudios, por su valioso apoyo.

Al Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme concedido becas durante el período de permanencia en el IIB.

A mis amigos: Manón Angel, María José B. Majdalani, Eduardo Tábor, Nicolás Behrens y Christopher Brett, por los agradables

momentos compartidos durante estos años.

A Susana Bufano y Patricia B. de Castresana, por la valiosa colaboración bibliográfica.

A Margarita Mazzardi, Soledad Giménez y Francisco Irusta por la eficiente colaboración técnica.

Y por último, a mi esposo, quien me brindó libertad y comprensión, las que hicieron posible la redacción de esta Tesis.

ABREVIATURAS

AMP	Adenosina 5' monofosfato
ADP	Adenosina 5' difosfato
{ ADP-glucosa ADP-glu	Adenosina 5' difosfato glucosa
ATP	Adenosina 5' trifosfato
B.M.	Baño María
cpm	Cuentas por minuto
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acido etilendiamino-tetraacético
EtOH	Etanol
{ glu-1-P glucosa 1-P	Glucosa 1-fosfato
G	Glucosa
λ_{\max}	Longitud de onda de máxima absorción
M ₂	Maltosa
M ₃	Maltotriosa
M ₄	Maltotetraosa
M ₅	Maltopentaosa
M ₆	Maltohexaosa
M ₇	Maltoheptaosa
Mo	Molibdato de amonio
nmoles	Nanomoles (10^{-9} moles)
nm	Nanometros (10^{-9} metros)
NADPH	Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato, reducida

or-M ₇	Zona comprendida entre el origen y maltoheptaosa
Pi	Fosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato inorgánico
pptado	Precipitado
ppGpp	Guanosina 3'5'difosfato
pppGpp	Guanosina 5'trifosfato 3'difosfato
primer	Aceptor
RNA	Acido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
sol	Soluble
Sorb	Sorbitol
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
UMP	Uridina 5'monofosfato
UDP	Uridina 5'difosfato
{ UDP-glu	Uridina 5'difosfato glucosa
{ UDP-glucosa	
UTP	Uridina 5'trifosfato
μl	Microlitros
μmoles	Micromoles (10 ⁻⁶ moles)
μm	Micrones
V _o	Volumen muerto de una columna

INDICE

	PAG.
1. INTRODUCCION	
1.1. Generalidades	1
1.2. Glucógeno	2
1.2.1. Distribución	2
1.2.2. Estructura	2
1.2.3. Poliglucósidos bacterianos	7
1.2.4. Peso molecular. Su relación con el método de extracción	12
1.2.5. Localización celular	14
1.2.6. Función del glucógeno en bacterias	18
1.3. Metabolismo del glucógeno y del almidón	25
1.3.1. Metabolismo del glucógeno en eucariotes	26
1.3.1.1. Degradación	26
1.3.1.2. Síntesis	28
1.3.1.3. Regulación del metabolismo del glucógeno	31
1.3.2. Metabolismo del almidón	32
1.3.2.1. Degradación	32
1.3.2.2. Síntesis	35
1.3.2.3. Regulación del metabolismo del almidón	38
1.3.3. Metabolismo del glucógeno en bacterias	38
1.3.3.1. Degradación	38
1.3.3.2. Síntesis	44
1.3.3.3. Factores que influyen en la acumulación del glucógeno	47

1.4. Mecanismo de iniciación en la biosíntesis de distintos polisacáridos	55
1.5. Antecedentes sobre la síntesis "de novo" de glucógeno en bacterias. Objetivos de esta investigación	63
1.5.1. Antecedentes recientes	63
1.5.2. Objetivos de esta investigación	66
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Sustratos, enzimas auxiliares y otros compuestos	67
2.1.1. Sustratos	67
2.1.2. Preparación de sustratos radioactivos	67
2.1.3. Enzimas auxiliares	69
2.1.4. Otros compuestos	69
2.2. Cultivo de bacterias	70
2.2.1. Organismo utilizado	70
2.2.2. Almacenamiento de la cepa	70
2.2.3. Mantenimiento y repique	71
2.2.4. Condiciones de crecimiento	71
2.3. Aislamiento de glucógeno	72
2.3.1. De células	72
2.3.2. Del extracto enzimático	73
2.4. Preparación de enzima	73
2.4.1. Obtención de esferoplastos	73
2.4.2. Lisis de los esferoplastos	76
2.4.3. Obtención de enzima	77
2.4.4. Gradiente discontinuo de sacarosa	77

2.5. Sistemas de incubación	79
2.5.1. Incubación standard	79
2.5.2. Incubación en dos etapas	80
2.6. Procesamiento de los incubados	80
2.6.1. Método de la precipitación con TCA (método A)	80
2.6.2. Método de los papeles de filtro tratados con TCA (método B)	82
2.6.2.1. Preparación de los "papeles-TCA"	82
2.6.2.2. Adsorción de la muestra	83
2.6.2.3. Lavado para eliminar la radioactividad soluble en ácido	85
2.6.2.4. Recuperación de la muestra	87
2.6.3. Método del KOH (método C)	87
2.7. Tratamientos químicos	88
2.7.1. Hidrólisis ácida	88
2.7.2. Reducción con borohidruro	89
2.7.3. Otros tratamientos	90
2.8. Tratamiento con enzimas degradantes	90
2.8.1. Proteasa	90
2.8.2. Tripsina	91
2.8.3. α -amilasa	91
2.8.4. β -amilasa	91
2.8.5. α -amiloglucosidasa	91
2.9. Cromatografía y electroforesis	92
2.9.1. Cromatografía en Sephadex	92
2.9.2. Cromatografía en papel	93

2.9.3. Electroforesis en papel	93
2.9.4. Medida de la radioactividad	94
2.10. Métodos colorimétricos.	94
2.10.1. Determinación de glucógeno	94
2.10.2. Determinación de proteína	95
3. RESULTADOS	
3.1. Especificidad del nucleótido-azúcar en la transferencia de (¹⁴ C)glucosas a una fracción precipitable por TCA	96
3.2. Estudio estructural de los productos radioactivos sintetizados	98
3.2.1. Tratamiento con enzimas proteolíticas y glucolíticas	98
3.2.2. Tratamientos químicos	102
3.2.2.1. Tratamiento alcalino	102
3.2.2.2. Tratamiento con urea	103
3.2.2.3. Tratamiento con fenol al 80%	105
3.2.2.4. Hidrólisis ácida	105
3.2.3. Estructura macromolecular del proteoglicano sintetizado. Tamaño aproximado del glucano	107
3.3. Preparación del extracto enzimático	109
3.3.1. Acumulación de glucógeno	109
3.3.2. Actividad del complejo enzimático en distintas etapas del desarrollo bacteriano	110
3.3.3. Localización	112
3.4. Propiedades del sistema enzimático	114
3.4.1. Efecto del tiempo y de la concentración de proteína sobre el curso de la reacción	114

3.4.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática	117
3.4.3. Estabilidad del complejo enzimático al calentamiento	118
3.4.4. Efecto del pH	120
3.4.5. Presencia de una actividad degradante en el extracto enzimático	120
3.5. Envejecimiento del sistema enzimático. Propiedades	127
3.5.1. Preparaciones "envejecidas". Sus características	127
3.5.2. Degradación del glucógeno endógeno	129
3.5.3. Estabilidad del complejo enzimático	131
3.5.4. Efecto salino	132
3.5.5. Estudio comparativo del efecto del molibdato	135
3.5.6. Efecto de detergentes	138
3.5.7. Solubilización del complejo enzimático	145
3.6. Obtención de sorbitol radioactivo	146
3.7. Es el proteoglucano α -1,4 sintetizado, un precursor en la biosíntesis del glucógeno	152
4. DISCUSION Y CONCLUSIONES	159
5. BIBLIOGRAFIA	184

I. INTRODUCCION

1.1. Generalidades.

Los hidratos de carbono forman un grupo de sustancias ampliamente distribuidas en la naturaleza y constituyen un extenso y siempre creciente campo de investigación.

El contenido en carbohidratos de los tejidos vivientes se encuentra principalmente bajo la forma de polisacáridos, polímeros de azúcares simples de alto peso molecular. Estos son sintetizados por animales, plantas y microorganismos, quienes los utilizan ya sea como material de reserva o como constituyentes de membranas o paredes celulares.

Desde el punto de vista de su estructura química, los polisacáridos pueden clasificarse en: a) homoglicanos (glucógeno, almidón, quitina, celulosa, etc.), que contienen como unidad repetitiva sólo un tipo de monosacárido, subdividiéndose a su vez en lineales y ramificados; b) heteroglicanos o complejos (ácido hialurónico, mureína, etc.), que poseen dos o más tipos diferentes de monosacáridos como constituyentes de la molécula (Horton y Wolfrom, 1965).

1.2. Glucógeno.

1.2.1. Distribución.

Se lo encuentra en vertebrados (Ryman y Whelan, 1971), invertebrados (Ryman y Whelan, 1971; Hunt, 1970), protozoarios (Weisman, 1976; Takeuchi y col., 1977; Killick y Wright, 1974), hongos (Kirjis y Moore, 1976; Takahara y Matsuda, 1976; How y col. 1973; Norrman y col., 1975), levaduras (Dawes y Senior, 1973) y en una amplia variedad de bacterias (Tabla I).

Si bien el almidón (constituído por amilosa y amilopectina) es el principal polisacárido de las plantas, algunos vegetales contienen almidón y glucógeno. En estos casos, este último constituye el fitoglucógeno en el maíz dulce (Peat y col., 1956) y en los cuerpos "Mullerian" de la *Cecropia peltata* (Rickson, 1973)

1.2.2. Estructura.

Es un homopolisacárido altamente ramificado, que contiene unidades de D-glucosas conectadas entre sí por uniones α -1,4. Los puntos de ramificación están constituídos por uniones α -1,6 (Manners, 1957). Aproximadamente el 93% de las uniones glucosídicas son α -1,4, correspondiendo a las α -1,6 un 7%.

La amilosa y la amilopectina también son homopolímeros de glucosa. Mientras que la amilosa posee una estructura lineal la molécula de amilopectina es ramificada, conteniendo una proporción de 4% de uniones α -1,6 (Manners, 1962).

En 1937, dos estructuras moleculares diferentes fueron

Tabla 1. Presencia de glucógeno en bacterias.

<u>Microorganismo.</u>	<u>Referencia.</u>
Aerobacter aerógenes	Strange y col., 1961.
Agrobacterium tumefaciens	Madsen, 1961.
Anacystis nidulans	Weber y Wober, 1975.
Arthrobacter crystallopoietes	Boylen y Pate, 1973.
Arthrobacter viscosus	Ghosh y Preiss, 1965.
Bacillus cereus	Slock y Stalhy, 1974.
Bacillus megaterium	Barry y col., 1953.
Bacillus stearothermophilus	Goldemberg, 1972.
Chromatium	Hara y col., 1973.
Eadie's Oval	Orpin, 1973.
Escherichia coli	Palmstierna, 1956.
Lactobacillus casei	Hammond, 1971.
Megasphaera elsdenii	Cheng y col., 1973.
Mycobacterium phlei	Antoine y Tepper, 1969.
Mycobacterium smegmatis	Ídem; Elbein y Mitchell, 1973.
Mycobacterium tuberculosis	Antoine y Tepper, 1969.
Nostoc muscorum	Chao y Bowen, 1971.
Pasteurella pseudotuberculosis	Dietzler y Strominger, 1973.
Rhodopseudomonas capsulata	Eidels y Preiss, 1970.
Rhodospirillum rubrum	Cohen-Bazire y Kunisawa, 1963.
Salmonella montevideo	Levine y col., 1953.
Salmonella typhimurium	Steiner y Preiss, 1977.
Streptococcus mitis	Gibbons y Kapsimalis, 1963.
Streptococcus mutans	DiPersio y col., 1974.
Streptococcus salivarius	Van Houte y Jansen, 1968.
Streptococcus sanguis	Eisenberg y col., 1974.

postuladas por Haworth y col. (1937) y por Staudinger y Husemann (1937) para el glucógeno y la amilopectina. Los primeros describieron la estructura llamada "laminar" (figura 1-a), en la cual la molécula era ramificada, pero sencilla. La estructura propuesta por Staudinger y Husemann (1937) en forma de "peine" (figura 1-b), se originó en la creencia de que la molécula de glucógeno era esférica. Las evidencias experimentales de esta hipótesis fueron principalmente determinaciones de viscosidad. Una tercer estructura, llamada "arbórea" o multiramificada, fue propuesta posteriormente por Meyer y Fuld (1941).

Peat y col. (1952) observando estas tres posibles estructuras diferentes de la molécula de amilopectina, sugirieron que podían existir tres tipos diferentes de cadenas: A, B y C.

Cadenas A: son aquellas que no poseen puntos de ramificación. Son cadenas laterales.

Cadenas B: son aquellas que poseen puntos de ramificación en C_6 . Son cadenas principales.

Cadena C: la única cadena que posee el grupo reductor libre.

El estudio de estas tres estructuras propuestas mostró que la diferencia esencial entre ellas residía en la diferente proporción de cadenas A y B (figura 1). Si bien no se pudo determinar la proporción exacta de ambas, de los ensayos enzimáticos realizados se dedujo que el modelo de Meyer era el que más se adecuaba a la estructura de la amilopectina (Peat y col., 1952).

Otros investigadores (Roberts y Whelan, 1960; French, 1966).

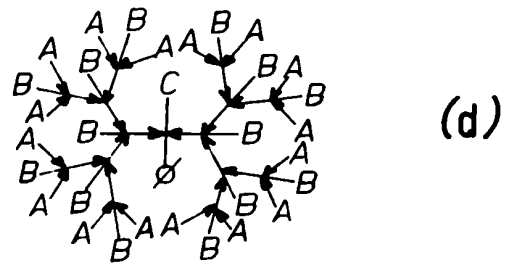
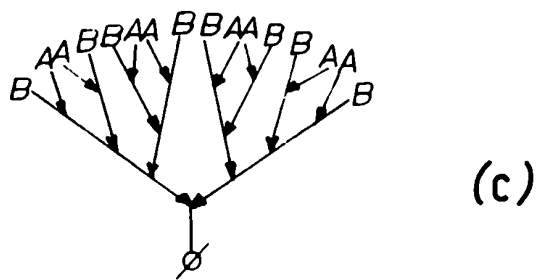
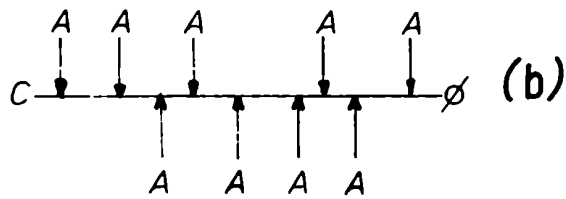
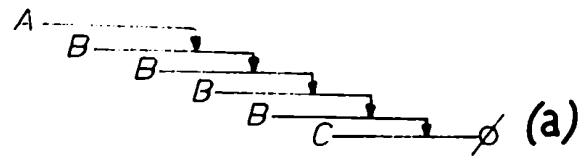


Figura 1. Representación esquemática de las estructuras propuestas para el glucógeno. a) por Haworth y col. (1937); b) Staudinger y Husemann (1937); c) Meyer y Fuld (1941); d) Gunja-Smith y col. (1970a).
 \emptyset : extremo reductor de la cadena.

demonstraron que el glucógeno, al igual que la amilopectina, también se adaptaba al modelo "arbóreo". La característica esencial de la estructura de Meyer y Fuld (1941) es una ramificación regular, de manera que cada cadena B en la molécula transporta por lo menos una cadena A (figura 1-c); además todas las cadenas se extienden hasta la periferia de la molécula. Sin embargo, en una estructura tal, el tamaño de la misma estaría limitado por la densidad de las cadenas terminales en la superficie, llegando a ser ésta tan alta, como para evitar todo crecimiento ulterior (French, 1964).

Varios investigadores habían observado que en el glucógeno quedan ramas externas ocultas en el interior de la molécula (Parodi y col., 1970). Posteriormente, Gunja-Smith y col. (1970) propusieron otra estructura del glucógeno, sobre la base de los datos obtenidos usando una enzima desramificante (Gunja-Smith y col., 1970a). Las características fundamentales de dicha estructura son (figura 1-d): a) todas las cadenas B llevan, en promedio, dos cadenas más (dos cadenas A o dos cadenas B); b) algunas cadenas no llegan hasta la superficie de la molécula. Esto trae como consecuencia que el tamaño de la misma no esté limitado por la concentración de las cadenas terminales en la superficie, sino que algún otro factor debe ser el que determine cuándo debe cesar el crecimiento de la molécula (Gunja-Smith y col., 1970; Marshall, 1974).

Se denomina rama o cadena interior a la porción comprendida entre dos puntos de ramificación, y su longitud promedio es

de 3-4 residuos de D-glucosa (\overline{TCCL}). Las ramas externas están representadas por la porción de la molécula comprendida entre el último punto de ramificación y el extremo no reductor. La longitud promedio de cadena externa (\overline{OCL}) es de 6-9 residuos de D-glucosa. La longitud promedio de cadena (\overline{CL}) está dada por el número de D-glucosas por grupo terminal y es igual a 10-14 residuos.

La determinación de estos parámetros es fundamental para el análisis estructural de polisacáridos. Si bien inicialmente se utilizaron métodos químicos (metilación, oxidación con periodato) (Manners, 1957), actualmente el uso de enzimas específicas ha hecho posible que el análisis estructural de estos polisacáridos sea un ensayo de rutina, rápido y seguro (Marshall, 1974).

1.2.3. Poliglucósidos bacterianos.

En esta introducción vamos a circunscribirnos únicamente a los poliglucósidos descritos en bacterias. En la Tabla II, se pueden observar las propiedades estructurales de algunos glucógenos extraídos de bacterias y su comparación con las estructuras del glucógeno de hígado de conejo, del glucógeno de molusco y de la amilopectina. Es necesario tener en cuenta que si bien existe una neta diferencia entre glucógeno y amilopectina, se observa también una amplia variación dentro de un mismo polisacárido, dependiendo de su origen.

Los glucógenos aislados de *Escherichia coli* (Sigal y col., 1964; Preiss y col., 1975), *Aerobacter aerógenes* (Sigal y col., 1964)

Tabla 11: Propiedades de distintos poliglucósidos.

Fuente del polisacárido	Límite de α -amilólisis %	Límite de β -amilólisis %	$\bar{C}L$	$\bar{E}C\bar{L}$	$\bar{T}C\bar{L}$	λ_{max}	Referencias
E. coli	59-71	47-56	10-13	8-9	1-4	420-480	Sigal y col., 1964.
A. aerogenes	72	46-64	12-13	8-10	1-3	470-485	Kindt y Conrad, 1967.
B. megaterium	---	43-46	9-11	6-8	1-2	520	Barry y col., 1953.
B. stearothermophilus	---	59	21	15	5	475	Goldemberg, 1972.
S. salivarius	72	47	12-13	8	3	480-490	Khandelwal y col., 1972.
A. viscosus	54	23-37	7-9	4-6	2-3	420-440	Ghosh y Preiss, 1965.
Chromatium D	66	44	11	7	3	485	Hara y col., 1973.
Molusco	60-64	32-39	12	6-8	3-5	420	{ Sigal y col., 1964 Takahara y Matsuda, 1976.
Hígado de conejo	70-85	40-55	10-15	8-10	3-4	440-490	Kjølberg y Manners, 1962.
Amilopectina	85-95	50-60	18-24	9-16	6-8	530-550	Kjølberg y Manners, 1962.
Maiz dulce (fitogno)	81-85	46-52	10-14	---	---	430-450	Peat y col., 1956.

Kindt y Conrad, 1967), *Streptococcus salivarius* (Van Houte y Jansen, 1968; Khandelwal y col., 1972) y Eadie's Oval (Orpin, 1973) son semejantes al de hígado de conejo (Kjølberg y Manners, 1962; Marshall, 1974). En otras bacterias se aprecian diferencias. Así por ejemplo, el polisacárido de *Bacillus stearothermophilus* (Goldenberg, 1972) por sus valores de \overline{CL} , \overline{OCL} y % de β -amilolisis, se asemeja a la amilopectina; sin embargo, por el espectro de absorción del complejo glucógeno-iodo, se parece al glucógeno hepático (Tabla II).

El estudio de los perfiles de elución obtenidos al pasar por Sephadex G-50 o Biogel P-10 glucógenos provenientes de diferentes bacterias, previamente desramificados por acción de la isoamilasa, permitió diferenciarlos, en base a la longitud de cadena \overline{CL} . (Weber y Wober, 1975). Así los glucógenos de *Escherichia coli* y *Arthrobacter* sp (figura 2), dieron una distribución aproximadamente simétrica, con variaciones en el ancho del pico y la posición de elución, dando valores de \overline{CL} para ambos de 14 y 8, respectivamente. Si bien el poliglucósido aislado de *Anacystis nidulans* se considera del tipo del glucógeno, por los resultados observados en la figura 2, se asemeja más al fitoglucógeno. Por otra parte, si bien inicialmente tanto el fitoglucógeno como el glucógeno aislado de mamíferos fueron considerados idénticos (Peat y col., 1956), el perfil de elución del fitoglucógeno desramificado indicaría que existe una clara diferencia. En el caso del fitoglucógeno se observa una distribución asimétrica, con una cierta preponderancia

de cadenas largas lo que podría indicar que esta molécula se originaría de un precursor de la amilopectina (Gunja-Smith y col., 1970; Marshall, 1974).

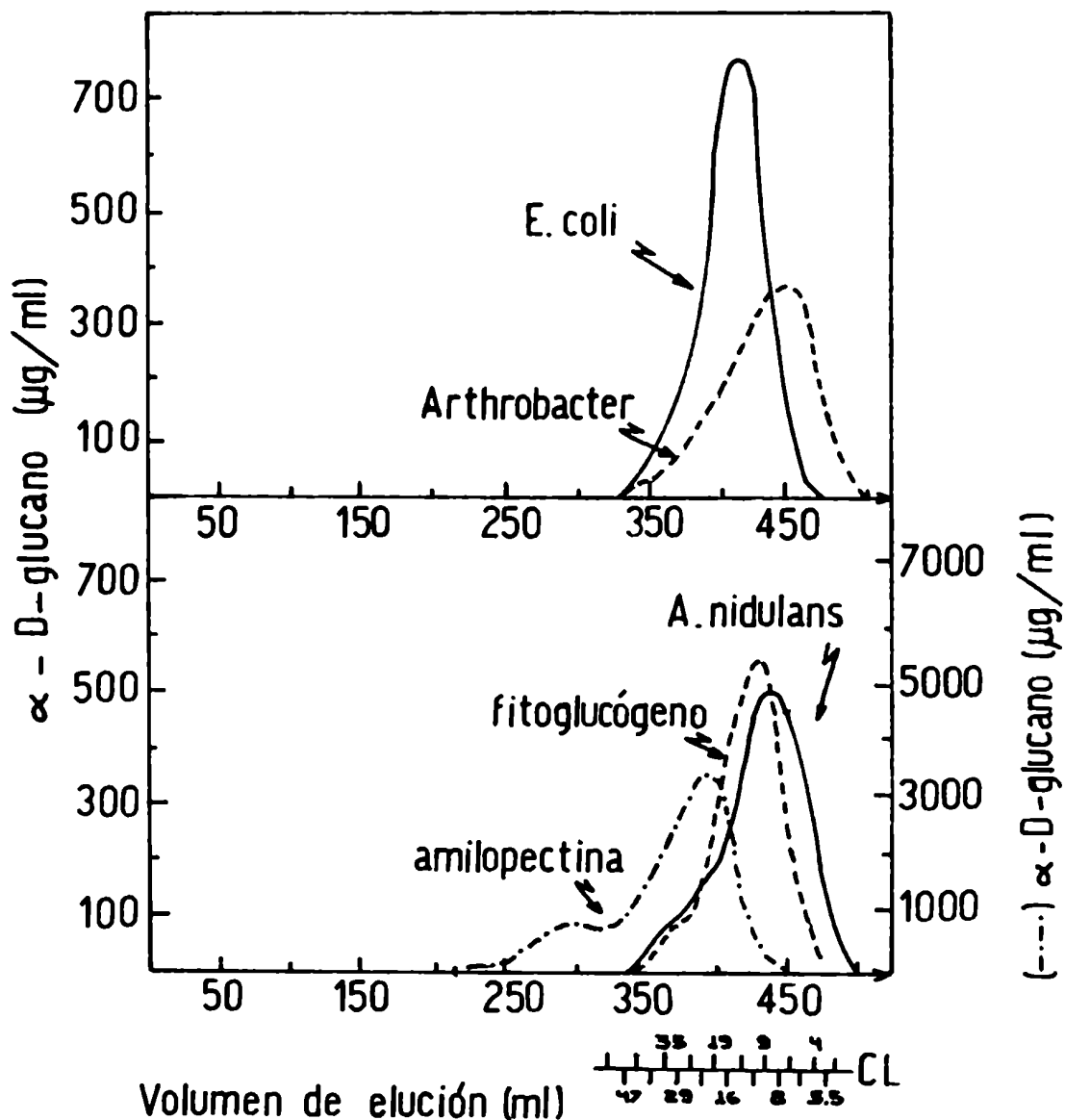


Figura 2. Cromatografía en Biogel P-10. Perfil de elución de diferentes glucógenos bacterianos, fitoglucógeno y amilopectina desramificados (Weber y Wober, 1975).

Zevenhuizen y Ebbink (1974) sugirieron que existiría una relación entre la velocidad de degradación del glucógeno y la estructura del mismo. Células que degradan rápidamente el polisacárido acumulado, como *Escherichia coli* (Ribbons y Dawes, 1963) y *Aerobacter aerógenes* (Strange y col., 1961), poseen glucógenos estructuralmente semejantes al encontrado en hígado de animales, con un valor de \overline{CL} igual a 10-13. En cambio, *Arthrobacter viscosus* (Ghosh y Preiss, 1965), *Mycobacterium phlei* (Antoine y Tepper, 1969), *Mycobacterium smegmatis* (Antoine y Tepper, 1969) y *Pseudomonas V-19* (Zevenhuizen y Ebbink, 1974) poseen glucógenos muy ramificados con ramas externas cortas, y por lo tanto más comparables con una ϕ -dextrina límite (dextrina límite de fosforilasa). Estas dextrinas, sólo son susceptibles a una nueva acción por fosforilasa luego de ser desramificadas. Por lo tanto, Zevenhuizen y Ebbink (1974) deducen que en estas bacterias la degradación del glucógeno estaría limitada por la baja actividad de las enzimas desramificantes.

Pese a que el estudio de las características del polisacárido aislado de *Neisseria perflava* (Barker y col., 1950; Hehre, 1949) no es completo, los datos que se poseen parecen indicar su semejanza con glucógeno. Si bien el % de degradación con β -amilasa es algo elevado (55-59%), la longitud promedio de cadena es 11-12 y la de cadenas externas 8-10.

Un dato útil que permite determinar de qué polisacárido se trata es el "blue value". Es el valor de absorción obtenido

a 680 nm cuando a una solución del polisacárido al 1% se le agrega iodo, según las condiciones indicadas por McCreedy y Hassid (1943).

En el caso del polisacárido aislado de *Neisseria perflava*, su β -dextrina límite da color marrón rojizo con iodo y un "blue value" de 0.01, lo mismo que la β -dextrina límite de glucógeno. En cambio, la de amilopectina da un "blue value" de 0.15-0.20 y color púrpura con iodo (Bourne y col., 1949; Barker y col., 1950). Todas estas medidas analíticas no constituyen una caracterización inequívoca. Actualmente con el conocimiento que se posee de las enzimas desramificantes y su acción específica (Marshall, 1974), se podría confirmar la estructura del polisacárido acumulado por esta bacteria.

Las bacterias del género *Clostridium* acumulan un polisacárido semejante a la amilopectina, conocido como granulosa (Garvard y Milhaud, 1952; White y Strasdine, 1972; Robson y col., 1974).

En cambio, otros microorganismos tales como *Corynebacterium diphtheriae* (Carlson y Hehre, 1949), *Streptococcus pyogenes* (Crowley y Jevons, 1955), *Bacterioides amylogenes* (Doetsh y col., 1957), *Acetobacter acidum-mucosum* (Tosic y Walker, 1957) y otras bacterias del rumen (Hobson y Mann, 1955) acumulan almidón.

1.2.4. Peso molecular. Su relación con el método de extracción.

El glucógeno tiene un peso molecular que varía entre 10^6 y 10^9 daltones (Mordoh y col., 1966), dependiendo éste del origen y del método utilizado para extraerlo (Manners, 1957; Orrell y col.

1964). Además, ese valor es el peso molecular promedio, ya que las preparaciones de glucógeno son en general polidispersas (Manners, 1957).

El glucógeno puede ser extraído de los tejidos por distintos métodos. El más utilizado es el desarrollado por Bernard-Pluger (Manners, 1957). Consiste en digerir el tejido con solución concentrada de KOH 33% a 100°C, de esta manera se destruyen proteínas y ácidos nucleicos. Posteriormente, el glucógeno se precipita por agregado de alcohol. Varios investigadores sugirieron que el glucógeno aislado por este método clásico no era representativo del glucógeno nativo, debido a la degradación causada por la solución alcalina. El tratamiento del glucógeno con álcali fuerte produce una reducción de 10 a 50 veces en su peso molecular (Stetten y col., 1956). Debido a ello, se buscaron otros métodos más simples y menos drásticos tales como: extracción con TCA en frío (Stetten y col., 1956), agua caliente e hidrato de cloral (Méyer y JeanLoz, 1943), etc. Sin embargo, se ha observado que la extracción del polisacárido con TCA o agua caliente también disminuye el peso molecular en un factor de 10-50. El tamaño de las moléculas de glucógeno es diferente según los distintos métodos, pero todos ellos dan pesos moleculares menores de los que existen "in vivo" en los tejidos (Orrell y Bueding, 1964). Lazarow (1942) usando extracción con agua fría y centrifugación diferencial obtuvo glucógeno, de hígado de cobayo, de un peso molecular mucho mayor que el obtenido por los procedimientos anteriores más

drásticos. A ese glucógeno de alto peso molecular (3×10^9) se lo denominó particulado, ya que en centrifugaciones diferenciales sedimentó con las partículas celulares. Otros métodos de extracción más suaves como HgCl_2 3% (Mordoh y col., 1966) en frío, fenol 80% en frío (Laskov y Margoliash, 1963), dimetilsulfóxido (Whistler y BeMiller, 1962) o soluciones buffer (Bueding y Orrell, 1964) permiten extraer el glucógeno al estado nativo.

El glucógeno extraído de *Escherichia coli*, por el método alcalino de Pluger, posee un peso molecular de 82×10^6 (Holme y col., 1958); el de *Aerobacter aerógenes* extraído con agua caliente un peso molecular de 9.2×10^6 (Levine y col., 1953) y el polisacárido obtenido de *Mycobacterium tuberculosis*, por tratamiento con TCA frío, un valor de 12.1×10^6 (Chargaff y Moore, 1944). Antoine y Tepper (1969), aislaron glucógeno de *Mycobacterium phlei*, utilizando la extracción suave con agua fría de Orrell y Bueding (1964). Su peso molecular fue de 100×10^6 . Además, observaron que el glucógeno aislado exhibía un coeficiente de sedimentación variable dependiendo del estado nutricional del microorganismo, semejante a lo que ocurre en otros organismos (Stetten y col., 1956; Holme y col., 1957; Geddes y Stratton, 1977).

1.2.5. Localización celular.

La solubilidad del glucógeno es mucho mayor que la de la amilopectina. En las células se encuentra en forma de partículas llamadas β , de aproximadamente 20-40 nm. En algunos tejidos,

especialmente hígado, estas partículas forman agregados en forma de rosetas o partículas α , de 60-200 nm (Drochmans, 1962).

El polisacárido almacenado en los microorganismos procaríotes puede encontrarse disperso en el citoplasma o depositado en forma de gránulos, rodeados o no por una membrana (Shively, 1974).

Los primeros estudios que se realizaron por microscopía electrónica en células de *Escherichia coli* (Cedergren y Holme, 1959) que contenían un alto porcentaje de glucógeno, permitieron la observación de un gran número de "agujeros" en el citoplasma bacteriano. Estos se encontraban en número mucho menor en células con bajo contenido en glucógeno.

Berman y col. (1967) obtuvieron resultados similares con una cepa de *Streptococcus mitis* que sintetizaba grandes cantidades de glucógeno. El incremento en el almacenamiento del polímero se reflejaba por un aumento en el número y no en el tamaño de los gránulos. Es importante destacar, que por microscopía electrónica se pudo detectar que, en los primeros estadios del almacenamiento, los primeros gránulos se formaban cerca o en la perifería de las células y aparentemente eran empujados hacia el interior cuando se sintetizaban nuevos gránulos. Esto sugiere que el lugar de la síntesis del polisacárido está en o cerca de la membrana. Dichos gránulos no se observaron en una mutante del mismo microorganismo, incapaz de sintetizar glucógeno.

Streptococcus mutans (DiPersio y col., 1974), *Streptococcus sanguis* (Eisenberg y col., 1974), *Pseudomonas V-19* (Zeven-

huizen y Ebbink, 1974), *Methanococcus vannielii* (Jones y col., 1977), ciertas bacterias del rumen de distintos animales: Eddie's Oval (Orpin, 1973) y *Megasphaera elsdenii* (Cheng y col., 1973), bacterias rojas sulfurosas (Hara y col., 1973) también acumulan glucógeno en forma de gránulos intracelulares.

Utilizando distintas técnicas citoquímicas, para el estudio por microscopía electrónica de polisacáridos bacterianos, diferentes investigadores (Holme y Cedergren, 1961; Petitprez y Darieux, 1970) observaron en células de *Escherichia coli* obtenidas en distintas fases del crecimiento, numerosos gránulos en el citoplasma. Estos miden aproximadamente 50-100 nm y están dispuestos en forma de roseta, semejantes a las partículas α de glucógeno, descritas por Drochmans (1962). A su vez dichas rosetas están constituidas por gránulos más pequeños (Petitprez y Darieux, 1970). En mutantes donde falta la enzima ramificante, se acumula un polisacárido del tipo de la amilosa (Thomas y Cattaneo, 1971) en forma de una gran inclusión en cuyo interior se ubican pequeños gránulos de 7.5 nm.

En distintas especies de *Mycobacterium* (Petitprez y Darieux, 1970); Antoine y Tepper, 1969) también se observaron rosetas de 100 nm de diámetro que se acumulan en gran número en las extremidades de la célula.

Las bacterias del suelo del tipo *Arthrobacter* cambian su morfología durante el crecimiento. Los bastoncitos predominan en cultivos jóvenes, en cambio los cocos son característicos de los

últimos estadios del cultivo (Duxburi y col.,1977). Gránulos de glucógeno se han visto en bastoncitos, pero nunca en cocos (Duxburi y col.,1977). Estos acúmulos desaparecen luego de un largo período de ayuno (Boyle y Pate, 1973). En determinadas condiciones de crecimiento, es decir, en cultivos donde la proporción carbono/nitrógeno es muy grande, los *Arthrobacter* pueden transformarse en células alargadas de forma semejante al limón, llamadas "cistitos", en las cuales se observa que los gránulos de reserva son más abundantes, produciendo un incremento en el tamaño de dichos microorganismos (Duxburi y col.,1977). Ciertos autores (Mulder y Zevenhuizen, 1967) definen a los "cistitos" como células en las cuales se ha producido una acumulación anormal de material de reserva.

En el *Rhodospirillum rubrum* (Cohen-Bazire y Kunisawa,1963) los depósitos de glucógeno están representados por numerosas áreas claras, distribuidas irregularmente por todo el citoplasma. Los gránulos más pequeños poseen 50 nm de diámetro y presentan una periferia difusa, lo que refleja ausencia de membrana. Los gránulos grandes llegan a tener 0.15 μm .

Las cianobacterias (Stanier y Cohen-Bazire,1977), también conocidas como cianofitas o algas verde-azules (Wolk,1973), son bacterias gram-negativas, que poseen un aparato fotosintético similar al que se encuentra en los cloroplastos de eucariotes. El aparato fotosintético está localizado en una serie de estructuras laminares membranosas, en forma de sacos cerrados, llamadas thylakoides. En diferentes especies de cianobacterias (Lang, 1968;

Chao y Bowen, 1971), se ha observado que el glucógeno se acumula en forma de gránulos entre dichas membranas. No se observan en heterocistos, pero sí en las esporas germinantes (Lang, 1968; Wolk, 1973) mostrando así una correlación con la fotosíntesis activa.

Si bien en todos los casos anteriormente mencionados, el poliglucósido se acumula como simples gránulos, en *Clostridium* (Mackey y Morris, 1971; Lashley y col., 1973; Shively, 1974) están rodeados por una cubierta o estructura membranosa, la cual aparentemente falta en el *Clostridium botulinum* tipo A.

1.2.6. Función del glucógeno en bacterias.

Desde hace tiempo, se conoce la función que cumplen en animales y plantas superiores ciertos compuestos almacenados como: glucógeno, almidón y lípidos, y es la de proveer carbono y energía o bien sólo energía como la creatina-fosfato.

El glucógeno se acumula en condiciones en que el suplemento de energía y glucosa exógenos son abundantes, y es utilizado cuando éstos disminuyen. En distintos microorganismos se ha observado que la síntesis de quitina (Tu y Malotra, 1977), trehalosa y celulosa (Killick y Wright, 1974) se realiza a expensas del glucógeno almacenado.

Por otra parte, se sabe el papel potencial del glucógeno como regulador del metabolismo, interaccionando e inhibiendo determinadas enzimas que intervienen en su propio metabolismo (Krebs y Preiss, 1975). Otra función del glucógeno es mantener la presión

osmótica celular. Suponiendo que el peso molecular del glucógeno sea de 10^7 conteniendo 60.000 residuos de glucosa, la concentración de glucosas que una molécula almacena es alrededor de 3M. Una solución de glucosa 3M produce una presión osmótica de más de 50 mmHg. Por lo tanto, la estructura ramificada de la molécula del glucógeno provee a la célula con alta concentración de glucosas polimerizadas, que pueden ser rápidamente movilizadas, evitando así una presión osmótica letal (Phelps, 1972).

Si bien en microorganismos se hallaron polisacáridos semejantes al glucógeno y al almidón, no se los consideró en un primer momento como compuestos de reserva energética y carbonada, ya que era evidente que un organismo celular indiferenciado no requiere tanta energía como la que demanda, en organismos superiores la homeostasis, la secreción y la contracción muscular. Actualmente está bien demostrado que los microorganismos, además de la energía para el crecimiento, necesitan energía llamada "de mantenimiento" (Pirt, 1965; McGrew y Mallette, 1965; Dawes y Senior, 1973). Es decir, en ausencia de crecimiento, requieren energía para la regulación osmótica, el mantenimiento del pH intracelular, la movilidad, el recambio de proteínas y ácidos nucleicos y para funciones especializadas como esporulación, luminiscencia, etc. En ausencia de una fuente de energía exógena, estos requerimientos deben llevarse a cabo a partir de una fuente endógena.

En los microorganismos, tres son los compuestos principales que se consideran como posibles fuentes de reserva: polisacári-

dos, lípidos (incluyendo el poli-hidroxi-butirato) y polifosfatos (Dawes y Senior, 1973). El contenido celular de cada uno de ellos puede variar ampliamente, dependiendo de las condiciones ambientales. Ciertos organismos son capaces de acumular más de un tipo de material de reserva, y en ese caso, la reserva principal estará determinada no sólo por las condiciones del medio de cultivo, sino también por los mecanismos de regulación involucrados. Así, *Mycobacterium phlei* y *Mycobacterium tuberculosis* (Antoine y Tepper, 1969a, 1969b) acumulan glucógeno y lípido; las bacterias acuáticas del género *Sphaerotilus-Leptothrix* (Van Veem y col., 1978) almacenan glucógeno y poli-hidroxi-butirato; glucógeno y polifosfato se acumulan en *Aerobacter aerógenes* (Dawes y Senior, 1973). El *Bacillus megaterium* almacena glucógeno, poli-hidroxi-butirato y en ciertas condiciones polifosfato (Dawes y Senior, 1973) y *Pseudomonas V-19* acumula glucógeno y lípido y en determinadas condiciones poli-hidroxi-butirato (Zevenhuizen y Ebbink, 1974). En *Rhodospirillum rubrum*, la naturaleza química de la fuente exógena de carbono determina la naturaleza del material orgánico de reserva que se forma intracelularmente. Así los ácidos dicarboxílicos de C_4 y propionato conducen a la deposición de glucógeno, mientras que en presencia de acetato, se acumula poli-hidroxi-butírico (Stanier y col., 1959).

Wilkinson (1959) postuló que para que un microorganismo utilice un compuesto como fuente de reserva y energía debe ocurrir lo siguiente: 1) acumulación del compuesto cuando la fuente de ener-

gía externa está en exceso con respecto a la requerida para el crecimiento celular; 2) dicha sustancia debe ser utilizada cuando la energía exógena comienza a ser limitante para el crecimiento y mantenimiento celulares y 3) el compuesto debe conferirle una cierta sobrevivencia al microorganismo.

Holme y Palmstierna (1956b) demostraron que en *Escherichia coli*, el glucógeno constituye un material de reserva. Ribbons y Dawes (1963) observaron en *Escherichia coli*, en condiciones de ayuno tanto de carbono como de nitrógeno, que el glucógeno ahorra las reservas nitrogenadas de la bacteria, produciéndose liberación de amoníaco al medio proveniente de RNA y proteínas, sólo cuando la utilización del poliglucósido se ha completado. Con *Aerobacter aerógenes* (Strange y col., 1961) y *Sarcina lutea* (Ribbons y Dawes, 1963) se obtuvieron resultados parecidos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en *Escherichia coli*, las células que poseen glucógeno liberan amoníaco al medio, si bien mucho más lentamente que aquéllas que no lo poseen.

En las cianobacterias (Stanier y Cohen-Bazire, 1977) el glucógeno es el principal producto obtenido por fotoasimilación del CO_2 a través del ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato. Este polisacárido es degradado en la oscuridad, siendo utilizado para la obtención de la energía "de mantenimiento". Lehmann y Wober (1975) observaron que la cianobacteria *Anacystis nidulans*, quimioheterotrófica facultativa, acumula glucógeno al final de la fase logarítmica de crecimiento, cuando se la cultiva en presencia de

luz, CO_2 como única fuente de carbono y en condiciones limitantes de nitrógeno. Este glucógeno es degradado en la oscuridad, no importando la presencia o ausencia de CO_2 . Las ficobiliproteínas, ubicadas en el aparato fotosintético de las cianobacterias, se sintetizan fotoautotróficamente. Cuando las bacterias sufren un ayuno de nitrógeno en presencia de luz, las ficobiliproteínas disminuyen a un 10% de su valor inicial y su síntesis sólo se reinicia cuando se agrega una fuente nitrogenada. En la oscuridad y en presencia de una fuente de nitrógeno, la síntesis de estas ficobiliproteínas se realiza a expensas del glucógeno acumulado en la primera etapa del ayuno (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Se ha observado que el *Mycobacterium phlei* (Antoine y Tepper, 1969a) acumula glucógeno y lípido simultáneamente en determinadas condiciones de cultivo. Sin embargo, en estado de ayuno el glucógeno es utilizado preferencialmente e incluso parcialmente degradado antes que se inicie la utilización del lípido.

En otras bacterias como *Pseudomonas V-19* (Zevenhuizen y Ebbink, 1974), *Arthrobacter* (Zevenhuizen, 1966), *Streptococcus salivarius* (Hamilton, 1968), *Lactobacillus casei* (Hammond, 1971), *Streptococcus mitis* (Gibbons y Kapsimalis, 1963; Gibbons, 1964) y *Chromatium cepa D* (Hara y col., 1973) también se ha observado la utilización del glucógeno almacenado.

El *Streptococcus mitis* (Gibbons y Kapsimalis, 1963), en ausencia de carbohidratos exógenos, degrada el glucógeno almacenado, convirtiéndolo cuantitativamente en ácido láctico. Dado que

este microorganismo, junto con *Streptococcus salivarius*, mutans y otros, forman parte de la microflora de la placa dental (Cole, 1977) la degradación del polisacárido y la producción de ácido láctico estarían relacionados con la desmineralización ácida de las matrices inorgánicas de la superficie dental durante la formación de las caries.

A diferencia de lo que ocurre en *Escherichia coli* (Sigal y col., 1964) donde la bacteria no utiliza el glucógeno acumulado hasta que la glucosa del medio no haya sido agotada, *Rhodopseudomonas capsulata* (Eidels y Preiss, 1970) utiliza el glucógeno almacenado aún cuando la concentración de la fuente de carbono es alta en el medio.

Se ha mencionado que un polisacárido semejante a la amilopectina, llamado granulosa, ha sido encontrado en distintas cepas de *Clostridium*. En todos los casos estudiados (Mackey y Morris, 1971; Strasdine, 1972) este polisacárido comienza a sintetizarse en la fase logarítmica, alcanzando una concentración máxima antes de comenzar la formación de esporas. Además se ha observado una rápida utilización del polisacárido, coincidiendo con la aparición de las mismas. Esto sugiere que la granulosa sirve como una fuente endógena de carbono y energía para la maduración de esporas. Algo semejante se produce en *Bacillus cereus* (Slock y Stahly, 1974).

En cuanto al tercer postulado de Wilkinson (1959) enunciado anteriormente, se ha observado lo siguiente: cuando se suspenden células vegetativas bacterianas en un medio no nutritivo a

temperaturas fisiológicas, las bacterias pueden sobrevivir los rigores del ayuno por distintos períodos que abarcan entre pocas horas a varios días o semanas. Se ha sugerido que la utilización del polisacárido almacenado por la bacteria puede favorecer su sobrevivencia durante el ayuno.

Experimentos realizados con *Aerobacter aerógenes* (Duguid y Wilkinson, 1953; Strange y col., 1961), *Escherichia coli* (Strange, 1968) y *Streptococcus mitis* (Van Houte y Jansen, 1970) han permitido observar una mayor viabilidad en células que poseen glucógeno acumulado, con respecto a aquéllas que lo poseen en menor cantidad o no lo almacenan (casos de mutantes).

Se ha observado la gran capacidad que poseen diferentes especies de *Arthrobacter* (Zevenhuizen, 1966; Boylen y Ensign, 1970), *Corynebacterium fascians*, *Mycobacterium rhodochrous*, *Nocardia roseum* (Boylen y Mulks, 1978) y *Pseudomonas V-19* (Zevenhuizen y Ebbink, 1974) de sobrevivir durante un considerable período de tiempo (semanas), en ausencia de un suplemento nutritivo exógeno, gracias al glucógeno acumulado. Zevenhuizen (1966; y Ebbink, 1974) sugirió que la velocidad de degradación de los materiales de reserva sería un factor importante en la sobrevivencia del organismo (Tabla III).

Por el contrario, se ha observado en *Lactobacillus casei* (Hammond, 1971) que las células ricas en glucógeno mueren a mayor velocidad que una mutante de dicha bacteria que no lo acumula. Luego de 5 horas de ayuno, la disminución de la viabilidad fue del 98% para la cepa iodófila y del 48% para la no iodófila. Datos

semejantes se han obtenido con *Sarcina lutea* (Burleigh y Dawes, 1967) y en *Megasphaera elsdenii* (Cheng y col., 1973).

Tabla III. Relación entre la velocidad de degradación del glucógeno y la sobrevivencia celular.

Microorganismo	50% sobrevivencia	t _{1/2} de gno. acumulado	Referencia
<i>E. coli</i>	36 h	45 min	Ribbons y Dawes, 1963.
<i>A. aerógenes</i>	45 h	10 h	Strange y col., 1961.
<i>Pseudomonas V-19</i>	60 d	5 d	Zevenhuizen y Ebbink, 1974.
<i>Arthrobacter sp</i>	80 d	12 d	Zevenhuizen, 1966.

1.3. Metabolismo del glucógeno y del almidón.

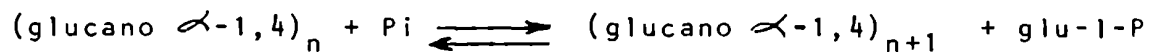
Es importante hacer primero una revisión del metabolismo de estos polisacáridos para luego comprender el metabolismo del glucógeno en bacterias, ya que si bien éstas acumulan un polisacárido, en general semejante al glucógeno, su metabolismo presenta semejanzas con el del almidón, en plantas.

El metabolismo de estos homopolisacáridos puede esquematizarse en dos etapas fundamentales: la biosíntesis y la degradación, etapas que se comentarán brevemente y en líneas generales.

1.3.1. Metabolismo del glucógeno en eucariotes.

1.3.1.1. Degradación.

a) Fosforólisis. La degradación del glucógeno se produce por separación de restos glucosídicos a partir de los extremos no reductores de las cadenas exteriores, en presencia de Pi, formando glucosa 1-fosfato. Esta reacción, catalizada por la glucógeno-fosforilasa o α -1,4-glucano:ortofosfato glucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.1.), es la siguiente:



La acción de esta enzima se detiene antes de los puntos de ramificación siendo de una especificidad tal que deja 4 residuos de glucosas en las cadenas A y B formando una Φ -dextrina límite (Walker y Whelan, 1960). Esta enzima está ampliamente distribuida en la naturaleza (Ryman y Whelan, 1971).

b) Desramificación. Cuando la fosforilasa ha degradado las cadenas externas del glucógeno hasta una longitud de 4 restos glucosídicos, no puede continuar su acción a menos que el punto de ramificación sea eliminado. La eliminación del punto de ramificación es catalizado por una glucosidasa-transferasa o amilo-(1,6)- α -D-glucosidasa oligo(1,4)-(1,4)- α -D-glucantransferasa (E.C.3.2.1.33). Se trata de una enzima de "doble cabeza", o sea, una proteína con dos actividades catalíticas (Brown y col., 1973). La transferasa

cataliza la transferencia de maltotriosa de la Φ -dextrina límite a la cadena principal, dejando sólo un residuo de glucosa en posición α -1,6, el que luego es hidrolizado por el componente amilo-1,6-glucosidasa del complejo (Marshall, 1974, pag.297-299).

c) Otras enzimas degradantes del glucógeno. Si bien se desconoce el papel que desempeña la α -amilasa en el metabolismo del glucógeno "in vivo", se la encuentra en hígado, sangre, páncreas y saliva. En el hígado se encuentra localizada en la fracción microsomal y es activada por detergentes (Mordoh y col., 1968). Es una endoenzima, y degrada las uniones α -1,4 del glucógeno. Esta enzima actúa en dos etapas (Olavarría y Torres, 1962). En la primera, rápida, rompe las cadenas exteriores del polisacárido, formando maltotetraosa, maltotriosa y maltopentaosa. En la segunda etapa, lenta, degrada el interior de la molécula liberando maltosa y α -dextrina límite. Estas dextrinas son oligosacáridos ramificados.

Trabajos posteriores (Sandruss y col., 1966) sugieren que esta α -amilolisis no es significativa "in vivo". Parodi (1967) había observado que durante la síntesis de glucógeno luego de la administración de glucosa, la distribución de pesos moleculares permanecía constante. Se producía un aumento en el número de moléculas pero el tamaño de las mismas no se incrementaba. Ese incremento en el número de moléculas podría ser debido a la acción de α -amilasa, que en hígado libera principalmente maltote-

traosa (Olavarría y Torres, 1962), la que puede ser utilizada como aceptor por la enzima glucógeno-sintetasa (Goldemberg, 1962).

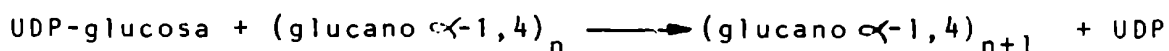
La degradación no fosforolítica del glucógeno y de malto-oligosacáridos puede llevarse a cabo también por liberación de glucosas a partir del extremo no reductor de la cadena. Esta hidrólisis es llevada a cabo por enzimas llamadas α -glucosidasas. Torres y Olavarría (1964) aislaron de extractos de hígado dos α -glucosidasas. Una ácida, presente en la fracción lisosomal, con acción sobre glucógeno, α -glucósidos y α -glucosil-disacáridos. La otra, neutra, presente en el citoplasma, en forma soluble, con mayor afinidad hacia maltosa. Jeffrey y col. (1970) purificaron una α -glucosidasa ácida a partir de la fracción lisosomal de hígado de rata. Esta enzima hidroliza las uniones α -1,4 y α -1,6 glucosídicas, catalizando por lo tanto, la completa degradación del glucógeno en glucosa.

1.3.1.2. Síntesis.

En la síntesis del glucógeno intervienen dos enzimas: la glucógeno-sintetasa o UDP-glucosa: α -1,4-glucan α -1,4 glucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.11) y la enzima ramificante o α -1,4-glucan- α -1,4-glucan-6-glucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.18).

a) Alargamiento. La glucógeno-sintetasa transfiere restos glucosídicos del UDP-glucosa al extremo no reductor de un aceptor, conduciendo a la formación de nuevos enlaces α -1,4, y

por lo tanto alargando las cadenas (Leloir y Cardini, 1957). La reacción es la siguiente:



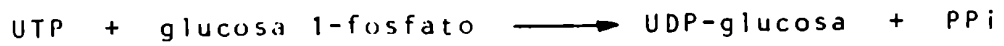
El aceptor generalmente es la cadena externa del glucógeno, pero los oligosacáridos, desde malto-tetraosa a maltooctaosa, pueden ser utilizados como aceptores. Sin embargo, el K_m para estos oligosacáridos es muy alto. Maltosa y maltotriosa en altas concentraciones actúan como aceptores, pero con muy baja eficiencia (Goldemberg, 1962; Brown y col., 1965).

Esta enzima, inicialmente descubierta en hígado por Leloir y Cardini (1957), se encuentra ampliamente distribuida. Se la ha aislado de insectos, levaduras, protozoarios, hongos y de prácticamente todos los tejidos del reino vertebrado (Ryman y Whelan, 1971).

b) Ramificación. Cuando la longitud de las cadenas llega a 10-12 unidades de glucosa, esta cadena lineal se convierte en sustrato adecuado para la enzima ramificante. Esta enzima cataliza la transferencia de un segmento de 6 o más restos glucosídicos, formando un punto de ramificación, a través de una unión $\alpha\text{-1,6}$ (Krisman, 1962; Verhue y Hers, 1966; Manners, 1967) (Figura 3).

Como se observa en la figura 3, algunas reacciones precedentes son importantes: la UDP-glucosa pirofosforilasa o UTP: $\alpha\text{-D-glucosa 1-fosfato uridiltransferasa}$ (E.C. 2.7.7.9) cataliza la

síntesis de UDP-glucosa de acuerdo a la siguiente reacción:



Por otra parte, el UDP, producido durante la síntesis del glucógeno, se fosforila a expensas del ATP formado en la fosforilación oxidativa, regenerándose UTP, el que nuevamente interviene en el ciclo.

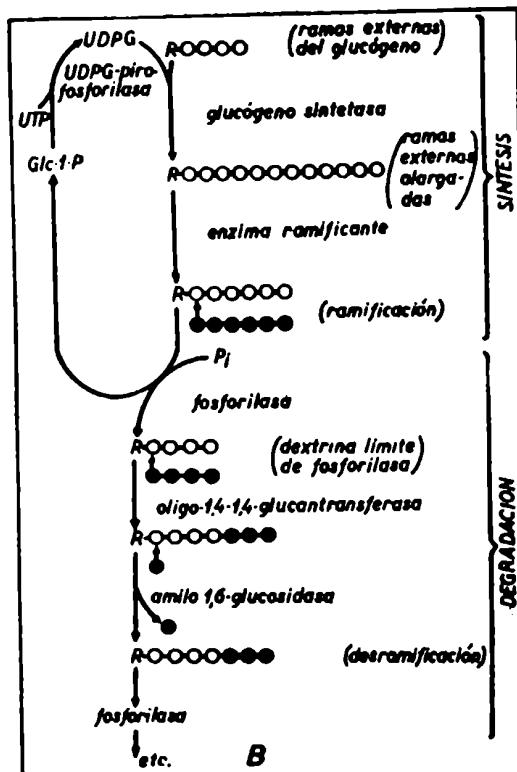


Figura 3. Síntesis y degradación del glucógeno. Enzimas que intervienen. (Krishnan y Marechal, 1966).

1.3.1.3. Regulación del metabolismo del glucógeno.

Tanto el sistema de la glucógeno-fosforilasa (Fischer y col., 1971; Krebs y Preiss, 1975) como el de la glucógeno-sintetasa (Krebs y Preiss, 1975; Hers, 1976; Roach y Larner, 1977) han sido ampliamente estudiados. Estas enzimas pueden ser reguladas por metabolitos y por interconversión en distintas formas enzimáticas.

La transformación de la fosforilasa, de una forma inactiva en una activa, implica la fosforilación de la proteína y conduce a un aumento de la glucogenólisis (Fischer y col., 1971).

Las reacciones de interconversión para el sistema de la glucógeno-sintetasa son semejantes a las de la glucógeno-fosforilasa, pero en dirección opuesta. Es decir, en el sistema de la sintetasa, la activación es una defosforilación (Krebs y Preiss, 1975). La capacidad del tejido de sintetizar glucógeno va a depender del balance que exista entre las formas fosforilada y defosforilada de la sintetasa.

Esta interconversión cíclica entre formas no modificadas y covalentemente modificadas constituye un mecanismo de real importancia en la regulación celular. Dado que estas modificaciones son catalizadas por enzimas diferentes, involucrando la acción de una enzima sobre otra, reciben el nombre de sistemas en cascada (Cohen, 1978; Chock y col., 1980).

1.3.2. Metabolismo del almidón.

Las similitudes entre glucógeno y almidón, indujeron a varios investigadores a tratar de encontrar un paralelismo entre el metabolismo de ambos polisacáridos, y muchos resultados estimularon estas comparaciones. Así, enzimas tales como amilasa, fosforilasa y sintetasa se encontraron tanto en plantas como en animales. Sin embargo, cuando se trató de profundizar en el estudio, se observaron diferencias notables.

1.3.2.1. Degradación.

Existen cinco tipos diferentes de enzimas que catalizan la degradación del almidón: α -amilasa, β -amilasa, α -glucosidasa, fosforilasa y enzima desramificante. Sin embargo, se cree que únicamente la α -amilasa (E.C. 3.2.1.1) es capaz de degradar el gránulo intacto de almidón y por lo tanto es la enzima predominante involucrada en el proceso de la germinación. Un cierto grado de α -amilolisis es necesario "in vivo" para la posterior fosforólisis o hidrólisis de este polisacárido (Manners, 1974).

En general los cereales no germinados poseen muy poca cantidad de α -amilasa. Sin embargo, la germinación provoca un dramático incremento de esta actividad enzimática (French, 1975, pág. 316). Además, la actividad de la α -amilasa en la célula, estaría regulada por la concentración de maltosa (Fekete y Vieweg, 1973).

En contraste con la amplia distribución de las enzimas α -amilolíticas en la naturaleza (Marshall, 1974), la β -amilasa (E.C. 3.2.1.2) se encuentra únicamente en plantas superiores. Se la ha aislado de distintos cereales, y su proporción aumenta durante la germinación. También se la encuentra en porotos de soya y batata dulce. Es una exoenzima y cataliza la hidrólisis tanto de la amilosa como de la amilopectina desde el extremo no reductor, liberando maltosa. Dado que se detiene a una cierta distancia en glucosas antes del punto de ramificación, también produce una β -dextrina límite (Greenwood y Milne, 1968).

Se cree que la α -glucosidasa (E.C. 3.2.1.20) interveniría en la última etapa de la hidrólisis enzimática del almidón, catalizando la transformación de los productos provenientes de la digestión amilásica, principalmente maltosa y oligosacáridos, en glucosa. Se han aislado α -glucosidasas de maíz dulce y alfalfa (Manners, 1974, pág. 116).

En 1940, Hanes demostró la presencia de fosforilasa (E.C. 2.4.1.1) en extractos de tubérculos de papa, la cual catalizaba una reacción reversible entre la glucosa 1-fosfato y el almidón:



Durante muchos años se supuso que esta enzima soluble, llamada también enzima P, estaba involucrada en la síntesis de las uniones α -1,4 del almidón, hasta que en 1960, un grupo de investigadores (Fekete y col, 1960) describió por primera vez la

almidón-sintetasa.

El papel de la almidón-fosforilasa en el metabolismo de este polisacárido no se ha aclarado todavía. Es posible que en las hojas, que poseen un contenido de almidón transitorio, la fosforilasa degrade este polisacárido. En los tejidos de reserva, el papel de esta enzima no es muy claro, dado que existen cantidades variables de enzimas amilolíticas (Manners, 1974, pag.117). Existen evidencias que indicarían que la fosforilasa es capaz de sintetizar almidón "in vivo" (Badenhuizen, 1973); o bien estaría involucrada en la síntesis de aceptores o "primers" para que posteriormente la almidón-sintetasa pueda actuar (sección 1.4). La almidón-sintetasa puede detectarse sólomente 6 días después de la aparición de almidón, en cambio la fosforilasa está siempre presente (Baxter y Duffus, 1971). Además la actividad de la almidón-sintetasa es muy baja en la mayoría de los tejidos que sintetizan almidón, siendo en cambio, muy abundante la fosforilasa (Fekete y Vieweg, 1974). Por otra parte, el pH del estroma es alrededor de 6, lo que hace que sea favorable para la actividad fosforilásica, pero no para la sintetasa soluble que tiene un pH óptimo de 8.4. En contraposición, la baja concentración de glucosa 1-fosfato en los tejidos que sintetizan almidón (Kaiser y Bassham, 1979) y la baja afinidad que posee la fosforilasa por este azúcar-fosfato, llevan a pensar que esta enzima predomina en la degradación del almidón (Burr y Nelson, 1975; Steup y Latzko, 1979).

A diferencia del proceso desramificante indirecto que requiere la acción concertada de dos actividades enzimáticas: la glucantransferasa y la amilo-1,6-glucosidasa (sección 1.3.1.1), las enzimas desramificantes directas hidrolizan simplemente las uniones α -1,6. Pueden distinguirse dos clases de enzimas desramificantes directas: pululanasa e isoamilasa.

La primera enzima desramificante del tipo de la pululanasa, se encontró en papas y porotos y se denominó enzima R (Hobson y col., 1951). Hidroliza las uniones α -1,6 de amilopectina, β -dextrina límite y pululano. No ataca al glucógeno. Si bien conserva el nombre de enzima R, por sus propiedades semejantes a las de la pululanasa de *Aerobacter aerógenes* (Lee y Whelan, 1971) se la denomina también pululanasa vegetal. Sin embargo, existen controversias acerca de la existencia de este tipo de actividad enzimática. Recientemente, Manners (1975) en base a los resultados obtenidos en su laboratorio, llegó a la conclusión de la existencia, en plantas, de una sola enzima desramificante, cuya denominación más correcta sería la de α -dextrina-6-glucanohidrolasa o dextrinasa-límite. Su función "in vivo" sería la de hidrolizar α -dextrinas ramificadas, productos de la digestión del almidón por α -amilasa.

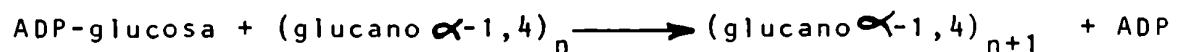
1.3.2.2. Síntesis.

La almidón-sintetasa se encontró inicialmente en forma particulada, formando parte del gránulo de almidón de arveja y ca-

talizaba la transferencia irreversible de glucosas del UDP-glucosa al almidón (Leloir y col., 1961). Sin embargo, Recondo y Leloir (1961) observaron que el ADP-glucosa era un sustrato mucho más eficiente. A partir de esto, se encontraron otras almidón-sintetasas particuladas (Preiss, 1969, pág. 126) y en todos los casos la velocidad de transferencia de glucosas del ADP-glucosa era de 1 a 10 veces mayor que a partir de UDP-glucosa. Posteriormente se demostró que la especificidad con respecto al sustrato de distintas almidón-sintetasas adsorbidas a gránulos de almidón, podía ser variable, pero en todos los casos el ADP-glucosa era el más activo (Frydman y Cardini, 1967).

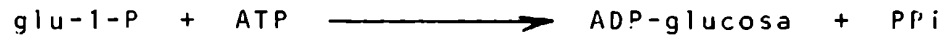
Por otra parte, en distintos tejidos vegetales se demostró la existencia de una almidón-sintetasa soluble, la que presentaba como propiedad esencial una total especificidad con respecto al ADP-glucosa (Preiss, 1969, pág. 126). La fitoglucógeno-sintetasa de maíz dulce sólo es activa en presencia de dicho nucleótido-azúcar (Frydman y Cardini, 1964, 1965).

Por lo tanto, la almidón-sintetasa recibió el nombre de ADP-glucosa: α -1,4-glucan- α -4-glucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.21) y es la que cataliza la siguiente reacción:



alargando las cadenas de amilosa, amilopectina o malto-oligosacáridos.

La síntesis de ADP-glucosa se realiza según la siguiente



catalizada por la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (E.C.2.7.7.27). Esta enzima se ha encontrado en una amplia variedad de tejidos vegetales (Preiss, 1969) y su contenido está asociado con una síntesis activa de almidón en los mismos (Turner y Turner, 1975). El hecho de que la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa sea mucho menor que la de UDP-glucosa pirofosforilasa en distintos vegetales, indicaría que se trata de una enzima regulatoria.

La enzima Q (E.C. 2.4.1.18) es una enzima ramificante presente en los tejidos vegetales, capaz de actuar sobre la amilosa para dar lugar a un polisacárido ramificado del tipo de la amilopectina. La característica esencial es que no ejerce ninguna acción sobre la amilopectina (Peat y col., 1959), si bien otros investigadores han observado lo contrario (Drummond y col., 1972).

Se ha comentado que el endosperma de las semillas de maíz dulce contiene además de almidón, un polisacárido semejante al glucógeno, denominado fitoglucógeno. Es justamente en este sistema donde se observó la existencia de dos enzimas ramificantes: una que actúa únicamente sobre amilosa (enzima Q) y la otra sobre amilopectina para dar un polisacárido ramificado semejante al fitoglucógeno (Lavintman y Krisman, 1964; Lavintman, 1966; Manners y col., 1968).

1.3.2.3. Regulación del metabolismo del almidón.

La ADP-glucosa pirofosforilasa juega un papel regulado muy importante: por un lado ejercería un control grueso a través de la variación de la cantidad de sus propias moléculas, y por otro, un control fino a través de diferentes metabolitos que actúan como inhibidores o activadores (Turner y Turner, 1975). Esta enzima es activada por 3'fosfoglicérico y otros intermedios glucolíticos (Preiss, 1969).

El regulador más importante de la síntesis y de la degradación del almidón sería el Pi. Los niveles de Pi disminuyen en las hojas durante la fotosíntesis y aumentan en la oscuridad (Santarius y Heber, 1965). Altas concentraciones de Pi inhiben la ADP-glucosa pirofosforilasa (Heldt y col., 1977), inhibiendo la síntesis de almidón y acelerando por otra parte, la degradación de dicho polisacárido por la vía de la fosforilasa, no sólo actuando como sustrato sino también inhibiendo a las enzimas glucosidasa y amilasa (Steup y col., 1976; Heldt y col., 1977; Schilling-Dittrich, 1979). Los niveles de Pi serían indicativos de la "carga energética" de la célula vegetal (Preiss, 1969).

1.3.3. Metabolismo del glucógeno en bacterias.

1.3.3.1. Degradación.

Se ha comentado en la sección 1.2.6. que el glucógeno bacteriano, almacenado intracelularmente, no es metabólicamente

inerte, sino que constituye un compuesto de reserva energética y carbonada, siendo utilizado vía degradación durante el ayuno.

El mecanismo empleado por estos microorganismos para el catabolismo del glucógeno, comenzó a dilucidarse en los últimos diez años. Se han identificado, en *Escherichia coli*, dos α -1,4-glucano-fosforilasas: la glucógeno-fosforilasa y la maltodextrina-fosforilasa (Chen y Segel, 1968). La glucógeno-fosforilasa es constitutiva (Chen y Segel, 1968a) y por lo tanto el nivel de su actividad es independiente de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento celular. La enzima es tres veces más activa con glucógeno que con maltodextrinas. La maltodextrina-fosforilasa, en cambio, es una enzima inducible, aumentando su nivel de 10 a 100 veces cuando las células de *Escherichia coli* se cultivan en maltosa (Chen y Segel, 1968). Muestra preferencia por α -1,4-oligoglucanos lineales (M_5 - M_7) respecto de glucógeno o maltotetraosa (Doudoroff y col., 1949; Schwartz y Hofnung, 1967).

En *Streptococcus mitis* también se observó la presencia de estas dos fosforilasas: la soluble, con mayor especificidad hacia maltodextrinas (Walker y col., 1969) y la particulada, hacia el glucógeno (Pulkownik y Walker, 1976). Si bien la primera no era inducible por maltosa, se denominó maltodextrina-fosforilasa, por su especificidad. Cuando la glucógeno-fosforilasa particulada se solubilizó con Tritón X-100, ella se comportó como la maltodextrina-fosforilasa. Pulkownik y Walker (1976) cuestionaron la presencia de dos entidades enzimáticas diferentes, por lo menos en

la cepa de *Streptococcus* estudiada, y postularon la idea de una sola enzima con propiedades dependientes del estado físico intracelular. La enzima actuaría como glucógeno-fosforilasa en el estado particulado y como maltodextrina-fosforilasa cuando se la solubiliza. El equilibrio entre ambas formas estaría relacionado con el contenido de glucógeno de las células.

Otra glucógeno-fosforilasa que se conoce, fue aislada de *Streptococcus salivarius* (Khandelwal y col., 1973).

Han sido infructuosos los intentos de demostrar en bacterias la existencia de dos formas interconvertibles de fosforilasa, semejantes a las formas fosforilada y defosforilada presentes en eucariotes. Las fosforilasas bacterianas son activadas en mayor o menor grado por 5'AMP (Chen y Segel, 1968; Spearman y col., 1973). Además, la glucógeno-fosforilasa de bacterias es inhibida por ADP-glucosa, TDP-glucosa, UDP-glucosa y glucosa (Madsen, 1961a; Chen y Segel, 1968; Spearman y col., 1973). Estos efectos de inhibición y activación proveerían a las bacterias de un sistema de control para la degradación del glucógeno "in vivo" (Krebs y Preiss, 1975).

Se sabe que varias enzimas involucradas en reacciones productoras de energía, se ven afectadas por nucleótidos de adenina. Atkinson (1968) entre otros, propuso que el balance entre las concentraciones de los distintos nucleótidos de adenina debería ser el factor regulador principal en cada punto donde un metabolito estuviera relacionado con el proceso generador, almacenador o

utilizador de energía. Así, definió la "carga energética" del sistema de adenilato en la siguiente forma:

$$\frac{(ATP) + 1/2 (ADP)}{(ATP) + (AMP) + (ADP)}$$

y su valor, que varía entre 0 y 1, da una idea cuantitativa del estado energético de la célula. Un valor igual a 1, significa que todo el "pool" de nucleótidos está como ATP y por lo tanto la célula se encuentra en el estado de máxima energía. Se ha considerado que una carga energética igual a 0.85 correspondería al punto de equilibrio entre las reacciones generadoras y utilizadoras de energía.

La carga energética en las células de *Escherichia coli* en crecimiento es aproximadamente 0.8. En fase estacionaria o durante el ayuno, este valor desciende lentamente a 0.6. Un valor de carga energética de 0.5 no es compatible con la vida (Chapman y col., 1971). De esto se deduce la importancia fundamental que tiene la carga energética del "pool" de adenilatos para la correlación de secuencias metabólicas y para el mantenimiento de la estabilidad metabólica necesaria para la vida celular.

Por lo tanto, en una célula con carga energética baja, o sea mayor concentración de (ADP + AMP), la fosforilasa se activaría y por lo tanto se incrementaría la degradación del glucógeno. A su vez, los intermediarios glucolíticos aumentarían la actividad de fosforilasa (Dawes y Senior, 1973; Krebs y Preiss, 1975).

Para la degradación completa del glucógeno es necesario también la acción de una enzima capaz de hidrolizar las uniones glucosídicas α -1,6. Se ha comentado, en la sección 1.3.2.1, que las enzimas desramificantes se dividen en dos clases: indirectas y directas. Walker y Builder (1967) describieron en *Streptococcus mitis* un sistema desramificante semejante al sistema indirecto de la glucosidasa-transferasa de hígado y de músculo (Brown y col., 1973). Sin embargo, en esta bacteria existen dos entidades proteicas separables: una de ellas posee actividad de α -1,6 glucosidasa, con ciertas características en cuanto a especificidad; la otra posee actividad de transferasa (Walker, 1966).

Dentro de las enzimas desramificantes directas, se distinguen dos tipos: pululanasa (E.C.3.2.1.41) e isoamilasa (E.C. 3.2.1.68). Dado que la primera, si bien se la ha encontrado en microorganismos (Krebs y Preiss, 1975), posee escasa acción sobre el glucógeno, no intervendría en la desramificación del poliglucosido almacenado. De *Cytophaga* (Gunja-Smith y col., 1970a) se ha aislado una isoamilasa que desramifica completamente al glucógeno, amilopectina y dextrinas límite de fosforilasa. En *Bacillus amyloliquefaciens* (Urlaub y Wober, 1975) se ha detectado una isoamilasa, tanto intracelular como extracelular. De extractos crudos de *Escherichia coli* se aisló una isoamilasa que hidroliza las uniones α -1,6 de las dextrinas límite de fosforilasa y de β -amilasa (Palmer y col., 1973).

Dada la escasa actividad de la glucógeno-fosforilasa observada tanto por Chen y Segel (1968) como por Palmer y col. (1973), se cuestionó su rol "in vivo" como enzima responsable del catabolismo del glucógeno (Palmer y Wober, 1975). Palmer y Wober (1975) propusieron que el paso más importante correspondería a la isoamilasa, la que al actuar sobre el polisacárido, originaría maltodextrinas. Posteriormente, por la acción concertada de las enzimas amilomaltasa (E.C. 2.4.1.25) y maltodextrina-fosforilasa sobre estos α -1,4-oligoglucanos lineales, se formaría glucosa y α -glucosa 1-fosfato. Estos productos entrarían en la cadena glicolítica.

Sin embargo, recientemente se aisló una enzima desramificante en *Escherichia coli* (Jeanningros y col., 1976) capaz de hidrolizar las uniones α -1,6 de la dextrina límite de fosforilasa, pero con escasa actividad sobre glucógeno o amilopectina. Basándose en estas propiedades, estos autores (Jeanningros y col., 1976) sugirieron un mecanismo de degradación del glucógeno en donde la enzima principal sería la glucógeno-fosforilasa.

Si bien en dicho esquema también estarían involucradas las enzimas amilomaltasa y maltodextrina-fosforilasa (Jeanningros y col., 1976), un estudio posterior, realizado con mutantes de *Escherichia coli*, amilomaltasa y maltodextrina-fosforilasa negativas, demostró que dichas enzimas no son esenciales para el catabolismo del glucógeno (Creuzet-Sigal y Frixon, 1977), lo que también fue corroborado por Macaskie y Palmer (1978).

En cuanto a las enzimas amilomaltasa y maltodextrina-fosforilasa, pertenecen al sistema inducible de la maltosa, juntamente con la maltosa-permeasa, y están involucradas en la utilización de maltosa y maltodextrinas exógenas (Schwartz, 1967).

Se conocen en la literatura una serie de α -amilasas bacterianas, que tienen como característica la de ser exocelulares (Takagi y col., 1971). Las únicas descritas como enzimas intracelulares son una α -amilasa de *Streptococcus bovis* (Walker, 1965) y otra aislada y purificada de *Escherichia coli* (Chambost y col., 1967). Esta última, "in vitro" parece actuar preferentemente sobre polisacáridos lineales del tipo de la amilosa o sobre ramas externas de amilopectina o glucógeno pero con menor eficacia. Esta amilasa no parece tener un papel importante en la degradación del glucógeno.

1.3.3.2. Síntesis.

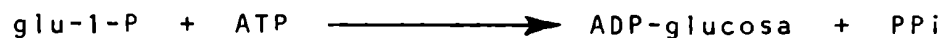
En 1961, Madsen informó sobre la presencia de una glucógeno-sintetasa en *Agrobacterium tumefaciens* que sólo utilizaba UDP-glucosa como dador de restos glucosilos. Posteriormente, Sigal y col. (1964) observaron que varias mutantes de *Escherichia coli*, UDP-glucosa pirofosforilasa negativas, eran capaces de acumular glucógeno en cantidades normales. Tal observación resultaba incompatible con la idea de ser el UDP-glucosa un precursor del glucógeno.

Casi simultáneamente, otros investigadores (Greenberg y

Preiss, 1964; Shen y col., 1964) demostraron en distintas bacterias incluyendo el *Agrobacterium tumefaciens*, no sólo la síntesis de glucógeno a partir de ADP-glucosa, sino también la presencia de una actividad de ADP-glucosa pirofosforilasa (E.C. 2.7.7.27) (Shen y Preiss, 1965; Preiss y col., 1965; Lehmann y Preiss, 1980).

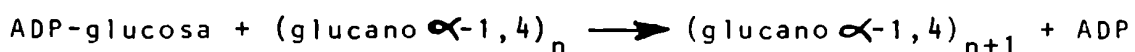
En *Streptococcus mitis* (Builder y Walker, 1970), *Chromatium* (Hara y Akazawa, 1974) y *Aerobacter aerógenes* (Kindt y Conra 1967) también se observó esa especificidad absoluta, por parte de la glucógeno-sintetasa, con respecto a dicho sustrato. Sin embargo, en *Pasteurella pseudotuberculosis* (Dietzler y Strominger, 1973) y *Bacillus stearothermophilus* (Goldemberg y Algranati, 1969), si bien el ADP-glucosa es el dador preferencial, UDP-glucosa y GDP-glucosa son sustratos eficientes. En *Mycobacterium smegmatis* (Ebein y Mitchell, 1973) GDP-glucosa y CDP-glucosa pueden servir también como dadores de glucosas. Fredrick (1964) aisló dos glucógeno-sintetasas de bacterias verde-azules. Ambas isoenzimas utilizan ADP-glucosa y UDP-glucosa como dadores de restos glucosídicos.

En la naturaleza, la función principal del ADP-glucosa, y quizás la única, es la de ser el precursor de los restos glucosídicos del glucógeno en bacterias y del almidón, en plantas. En base a estos resultados, se postuló el siguiente mecanismo de síntesis del glucógeno bacteriano (Dawes y Senior, 1973; Krebs y Preiss, 1975), semejante al observado con el almidón en plantas (sección 1.3.2.2.). En una primera etapa:



reacción catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa, enzima encontrada en distintos microorganismos (Preiss, 1973).

Posteriormente, en una segunda etapa,



catalizada por la glucógeno-sintetasa o ADP-glucosa α -1,4-glucan-4-glucosiltransferasa (E.C. 2.4.1.21).

Se ha observado que la ADP-glucosa α -1,4-glucan-4-glucosiltransferasa de *Escherichia coli* (Preiss y Greenberg, 1965; F y col., 1976) cataliza la transferencia de glucosas del ADP-glucosa a glucógeno, amilopectina, amilosa soluble, como así también a maltosa y oligosacáridos superiores de la serie α -1,4. Algo semejante ocurre con la glucógeno-sintetasa de *Arthrobacter* (She y col., 1964), *Aerobacter aerógenes* (Kindt y Conrad, 1967) y *Pasteurella pseudotuberculosis* (Dietzler y Strominger, 1973).

La enzima ramificante es la responsable de la formación de las uniones α -1,6 o puntos de ramificación del glucógeno. Esta enzima ha sido detectada en *Neisseria perflava* (Hehre y col 1947), en *Arthrobacter globiformis* (Zevenhuizen, 1964), en *Escherichia coli* (Boyer y Preiss, 1977), en *Streptococcus mitis* (Walker y Builder, 1971) y en cianobacterias (Fredrick, 1971).

Si bien la síntesis de glucógeno en bacterias se realiza comúnmente vía nucleótido-azúcar, un mecanismo totalmente diferente se ha observado en algunos microorganismos. Algunas especies de *Neisseria* acumulan grandes cantidades de un polisacárido semejante al glucógeno (Barker y col., 1950) cuando son cultivadas en un medio con sacarosa (Hehre, 1949). El sistema enzimático, denominado amilosacarasa (Okada y Hehre, 1974; Mackenzie y col., 1978) (E.C. 2.4.1.4) es constitutivo y cataliza la conversión de sacarosa directamente en glucógeno, según la siguiente reacción:



1.3.3.3. Factores que influyen en la acumulación de glucógeno.

a) Medio de cultivo. En general, se ha supuesto que el factor responsable de la acumulación de glucógeno en microorganismos, es la limitación del crecimiento por deficiencia de factores nitrogenados, en presencia siempre de un exceso de fuente de carbono. Es decir, la velocidad de síntesis del poliglucósido se incrementa por una reducción en la velocidad de síntesis de los compuestos nitrogenados. Distintas experiencias avalan esta hipótesis.

Palmstierna (1956) estudió el contenido de glucógeno en *Escherichia coli* B, en las distintas etapas del desarrollo bacteriano. Cuando la cultivó en un medio rico, observó que en la fase logarítmica temprana, la concentración de glucógeno total era

baja, coincidiendo con una mayor síntesis de compuestos celulares nitrogenados. Ya en la fase estacionaria, el glucógeno total comenzaba a incrementarse, pero por un aumento en la densidad celular, ya que el glucógeno/célula no presentaba variación significativa. En cambio, el contenido de dicho polisacárido, en *Escherichia coli* B cultivada en un medio limitante en nitrógeno, disminuyó durante la fase logarítmica, análogamente a lo observado en bacterias crecidas en un medio completo; pero al llegar a la fase estacionaria, por limitación de factores nutritivos nitrogenados, tanto el glucógeno total como el celular aumentaron linealmente (Holme y Palmstierna, 1956) Sigal y col., 1964; Preiss y col., 1975). Por otra parte, cuando se adicionaron nutrientes nitrogenados al cultivo (en forma de NH_4Cl), las bacterias comenzaron a dividirse inmediatamente, produciéndose un rápido decrecimiento tanto del glucógeno total como del celular (Holme y Palmstierna, 1956). Cuando las bacterias se cultivaron en un medio deficiente en carbono, si bien en la fase estacionaria el glucógeno total aumentó, lo hizo a una velocidad mucho menor. En esta fase, el glucógeno celular también se incrementó a muy baja velocidad, siendo su valor tres veces menor al acumulado en condiciones limitantes en nitrógeno (Holme y Palmstierna, 1956).

Aerobacter aerógenes (Duguid y Wilkinson, 1953), *Escherichia coli* (Sigal y col., 1964; Dietzler y col., 1973) y otras bacterias (Zevenhuizen, 1966; Antoine y Tepper, 1969a; Zevenhuizen

y Ebbink, 1974) acumulan una alta proporción de polisacárido al llegar a la fase estacionaria, cuando se las cultiva en un medio rico en carbohidratos y deficiente en nitrógeno. En cambio, *Rhodospseudomonas capsulata* (Eidels y Preiss, 1970), *Lactobacillus casei* (Hammond, 1971) y *Streptococcus mitis* (Gibbons y Kapsimalis, 1963; Derman y col., 1967) comienzan a acumular glucógeno en la mitad de la fase logarítmica e incluso antes.

Las condiciones de aerobiosis empleadas (Ribbons y Dawes, 1963; Dietzler y col., 1974) y la velocidad de crecimiento bacteriano (Holme, 1958; Wright y Lockhart, 1965) también producen un profundo efecto sobre el metabolismo endógeno de las células. Se ha demostrado que el efecto de la limitación de fosfato o sulfato es similar al obtenido por la limitación de nitrógeno (Duguid y Wilkinson, 1953; Holme y Palmstierna, 1956a; Zevenhuizen, 1966; Antoine y Tepper, 1969a). La acumulación de glucógeno también se produce cuando existen condiciones desfavorables para el crecimiento bacteriano, como bajo pH o temperaturas subóptimas (Duguid y Wilkinson, 1953; Zevenhuizen, 1966).

b) Metabolitos y regulación de la síntesis de glucógeno.

A diferencia de lo que ocurre en las células de eucariotes (sección 1.3.1.2) la glucógeno-sintetasa bacteriana no es activada por glucosa 6-fosfato ni por otros metabolitos o intermediarios glucolíticos. Se ha demostrado en cambio, que la regulación de la síntesis de glucógeno está a nivel de la ADP-glucosa pirofosforilasa, tal como acontece en la síntesis de almidón en plantas.

La enzima bacteriana es modulada por metabolitos provenientes de la cadena glicolítica y por el estado energético de las células. Los metabolitos más efectivos como activadores van a depender del microorganismo del cual proviene la ADP-glucosa pirofosforilasa y del camino utilizado por la bacteria para el catabolismo de la glucosa (Preiss, 1973). Así, las enterobacterias que acumulan glucógeno (*Escherichia coli*, *Aerobacter aerógenes*, *Salmonella typhimurium*, etc.) poseen una ADP-glucosa pirofosforilasa que es activada por fructosa 1,6-(bis)fosfato, NADPH y piridoxal 5-fosfato, e inhibida por 5'AMP (Krebs y Preiss, 1975). Estos organismos utilizan la vía de la glucólisis para el catabolismo de la glucosa. *Arthrobacter viscosus*, *Agrobacterium tumefaciens*, que catabolizan la glucosa por la vía Entner-Doudoroff, poseen una ADP-glucosa pirofosforilasa activada por fructosa 6-fosfato y por piruvato (Shen y Preiss, 1966; Eidels y col., 1970).

Basados en estudios "in vitro", Gentner y Preiss (1968) sugirieron que la acumulación de glucógeno en *Escherichia coli* se efectuaba a través de la modulación de la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa, por efecto de la concentración relativa del activador primario fructosa 1,6-(bis)fosfato con respecto a las concentraciones de ATP y del inhibidor principal 5'AMP. Este grupo de investigadores sugirió que durante la limitación del crecimiento bacteriano, en presencia de un exceso de glucosa, el ATP se incrementa a expensas de ADP y AMP, aumentando también la con-

centración de fructosa 1,6(bis)fosfato, favoreciendo la síntesis de ADP-glucosa y por lo tanto la del glucógeno.

Preiss y col. (Krebs y Preiss, 1975) habían observado que cuando las bacterias de *Escherichia coli* alcanzaban la fase estacionaria, se producía un incremento en las actividades específicas de la ADP-glucosa pirofosforilasa y de la glucógeno-sintetasa, incremento que variaba según las condiciones del medio de cultivo. Sin embargo, Dietzler y col. (1973) observaron que en *Escherichia coli* intacta, el pasaje del crecimiento exponencial a la fase estacionaria, inducido por agotamiento del nitrógeno del cultivo en presencia de un exceso de glucosa, se acompaña de un incremento de casi cuatro veces en la velocidad de síntesis del glucógeno, sin que se verifique un cambio en los niveles de actividad de las enzimas involucradas en la síntesis del mismo. Además se produce un incremento en la carga energética, que varía de 0.74 a 0.87, y una disminución de la fructosa 1,6(bis)fosfato en un 70% (Dietzler y col., 1974a). Dado que esa modificación de la carga energética a dicha concentración de fructosa 1,6(bis)fosfato, activa la ADP-glucosa pirofosforilasa "in vitro" (Shen y Atkinson, 1970; Govons y col., 1973), estos resultados indicarían que la activación por fructosa-(bis)fosfato contribuiría aparentemente a ese cambio de velocidad de síntesis del glucógeno "in vivo" (Dietzler y col., 1974a).

Recientemente, Dietzler y col., (1975, 1975a) sugirieron la existencia, en *Escherichia coli*, de un mecanismo general que

controlaría coordinadamente la síntesis de glucógeno, la utilización de la glucosa y la glucólisis, a través de las concentraciones de ATP, fructosa 1,6(bis)fosfato y glucosa 6-fosfato. Estos investigadores observaron que el aumento de la velocidad de síntesis de glucógeno, en la fase estacionaria, se acompaña de una menor velocidad de utilización de la glucosa, de un aumento en la concentración de ATP y de una disminución de los niveles de fructosa 1,6(bis)fosfato, permaneciendo constante la concentración de glucosa 6-fosfato (Dietzler y col. 1979).

Sigal y col.(1964) habían observado que el agregado de cloranfenicol a un cultivo de *Escherichia coli*, cercano a la fase estacionaria de desarrollo, producía una disminución en la acumulación de glucógeno. Estos investigadores sugirieron que alguna enzima involucrada en la síntesis de dicho polisacárido tendría una alta velocidad de recambio, y que por lo tanto al inhibirse la síntesis de proteína, disminuiría el nivel de dicha enzima; sin embargo, esta hipótesis no pudo ser confirmada (Dietzler y col., 1973). Por otra parte, estudios realizados con *Escherichia coli* (Dietzler y col., 1974) sometida a severos "stress" metabólicos (aeración inadecuada o presencia de cloranfenicol) demostraron que esa relación coordinada entre la síntesis de glucógeno y los niveles de glucosa 6-fosfato y fructosa 1,6(bis)fosfato se rompe, disminuyendo la velocidad de síntesis de glucógeno y la concentración de ATP, pese a mantenerse constante la carga energética. Estos resultados llevaron a pensar que podrían existir otros efec-

tores que actuarían sobre la ADP-glucosa pirofosforilasa. Recientemente, se observó que los nucleótidos ppGpp y pppGpp inhiben dicha enzima, y por lo tanto podrían regular la síntesis de glucógeno en *Escherichia coli* "in vivo" (Dietzler y col., 1979a; 1979b).

En bacterias, el glucógeno no ejerce ninguna acción regulatoria sobre su propia síntesis como ocurre en mamíferos y microorganismos eucarióticos. Una concentración de glucógeno al 1% no inhibe ni a la ADP-glucosa pirofosforilasa ni a la glucógeno-sintetasa (Krebs y Preiss, 1975). Tampoco "in vivo" se observa inhibición del sistema involucrado en la síntesis, ya que en ciertas condiciones la mayoría de las bacterias acumulan entre un 20 a un 40% de su peso seco como glucógeno.

Si bien la regulación alostérica de la ADP-glucosa pirofosforilasa puede jugar un papel importante en la regulación de la biosíntesis del glucógeno, se ha observado además la existencia de una regulación genética. No sólo se han obtenido diferentes mutantes que presentan una alteración en el metabolismo del glucógeno (Creuzet-Sigal y col., 1972; Krebs y Preiss, 1975) sino que experiencias de transducción realizadas en *Escherichia coli* B (Preiss y col., 1973) y en *Salmonella typhimurium* (Steiner y Preiss, 1977) sugieren la existencia de un operón glucógeno, constituido por tres genes contiguos. Creuzet-Sigal y col. (1972) localizaron estos genes estructurales a una distancia de 74 minutos en el mapa genético (Bachmann y col., 1976), cerca del operón maltosa (mal), entre el gen que codifica para la glicerol 3-fosfato dehidrogena-

sa (glp D) y el gen que codifica para la aspártico semialdehido dehidrogenasa (asd).

..... mal.....glp D glg A,B,C asd.....

Creuzet-Sigal y col. (1972) obtuvieron tres tipos de colonias, las que se caracterizaron por la coloración que daban con I₂. Así, las mutantes incoloras, habían perdido la capacidad de acumular glucógeno y no poseían actividad de glucógeno-sintetasa. La mutación aparentemente afectaba al gen estructural glg A que codifica para la glucógeno-sintetasa. Las mutantes azules no poseían enzima ramificante, y la mutación por lo tanto afectaba al gen estructural glg B. Las mutantes marrón-oscuro acumulan una gran cantidad de glucógeno. Algunas de estas mutantes tienen afectado el gen glg C de la ADP-glucosa pirofosforilasa. Se ha observado que en estas mutantes hay una de-represión de la síntesis de glucógeno.

Tanto en *Escherichia coli* B (Preiss y col., 1973) como en *Escherichia coli* K12 (Creuzet-Sigal y col., 1972) fue imposible sugerir el orden de estos genes. Dado que en *Salmonella typhimurium* los genes glg son suficientemente largos, el análisis co-translationa de los genes glg A y glg C con asd y glp D, permiten suponer el siguiente orden de los mismos:

..... glp Dglg A glg C asd

En esta bacteria, no se pudo mapear el gen glg B (Steiner y Preiss

1977).

La de-represión coordinada de las enzimas implicadas en la biosíntesis del glucógeno, antes de la acumulación de dicho polisacárido, en la fase logarítmica tardía (Krebs y Preiss, 1975), sugeriría que la regulación a nivel genético podría ser importante en la biosíntesis de dicho polisacárido; con todo más evidencias se necesitan que apoyen este tipo de mecanismo.

1.4. Mecanismo de iniciación en la biosíntesis de distintos polisacáridos.

La mayor parte de las enzimas que sintetizan polisacáridos son dependientes de la presencia de un aceptor para demostrar su actividad. Este aceptor es el mismo polisacárido o un fragmento de él, el cual se alarga debido a la acción de la transferasa, por el agregado de monómeros al extremo no reductor del mismo. Sin embargo, Feingold y col. (1958) con la callosa-sintetasa; Markowitz y Dorfman (1962) con la hialuronato-sintetasa; Maréchal y Goldemberg (1964) con la paramilon-sintetasa, no pudieron demostrar tales requerimientos.

Se ha sugerido (Barengo y Krisman, 1978) que en la naturaleza prácticamente todos los polisacáridos podrían formarse "de novo" unidos a proteína o a alguna estructura diferente de la del mismo polisacárido.

El paramilon, un glucano (α -1,3 encontrado en Euglena

gracilis, se sintetiza sobre un aceptor proteico. Los resultados (Deri Tomos y Northcote, 1978) sugieren que existiría una unión pirofosfato entre el polisacárido y la proteína.

En general se acepta que los glicosaminoglicanos, heteropolisacáridos presentes en tejidos animales, no se encuentran libres "in vivo", sino constituyendo proteoglicanos, en donde varias cadenas están ligadas covalentemente, a través del azúcar terminal reductor, a un "core" o esqueleto polipeptídico (Lindahl y Hook, 1978).

Con el nombre genérico de manano se distinguen distintos polisacáridos que poseen en común una alta proporción de residuos de manosa. Son polisacáridos altamente ramificados, unidos covalentemente a proteína (Nakajima y Ballou, 1974).

Se ha postulado la intervención de glucoproteínas como intermediarios en la síntesis de celulosa (Herth y col., 1972). Kjosbakken y Colvin (1975) observaron la presencia de un complejo poliglucano-proteico en la bacteria *Acetobacter xylinum*, el que tendría funciones de intermediario en la síntesis de celulosa. Al incubar UDP-(¹⁴C)glucosa con membranas del alga *Prototheca zopfii*, Hopp (1977) observó la formación de un polímero de glucosas, unidas en β -1,4, ligado a proteína. Esta glucoproteína "celulósica" era degradada por enzimas proteolíticas.

Si bien se observó que la síntesis del almidón, vía fosforilasa en ausencia de aceptor exógeno, era debido a la existencia de pequeñas cantidades de oligosacáridos presentes, ya sea en

el sustrato glucosa 1-fosfato, o en la preparación enzimática (Kamogawa y col., 1968), posteriormente distintos autores (Frydman y Slabnick, 1973; Burr y Nelson, 1973) sugirieron que una isoenzima de fosforilasa podría estar involucrada en la síntesis "de novo" de dicho polisacárido. Frydman y Slabnick (1973) aislaron cinco isoenzimas de fosforilasa de papa. Una de ellas era una glicoproteína que no requería aceptor exógeno.

No es clara aún la participación de la fosforilasa en la síntesis del almidón "in vivo", ya que también se observó que la iniciación de la síntesis de este polisacárido puede ocurrir a través de la almidón-sintetasa.

Ozbun y col., (1971;1972) aislaron múltiples formas de ADP-glucosa- α -1,4-glucan- α -4-glucosiltransferasas de distintos tejidos vegetales. Una de las transferasas de cada fuente es capaz de catalizar la síntesis de un glucano, en ausencia de aceptor externo. La reacción necesita albúmina y alta concentración de sales para producirse sin "lag". Estos resultados sugieren una síntesis "de novo" por parte de la α -glucan-sintetasa, puesto que la reacción de iniciación tiene lugar aún después del tratamiento con glucoamilasa, tanto del sustrato como de las enzimas. Sin embargo, los mismos autores no descartan la existencia de un glucano endógeno asociado a la enzima, que actuaría como aceptor y que sería resistente a la acción de la glucoamilasa (Hawker y col., 1974). Recientemente, Tandecarz y col., (1975;1978) aislaron de tubérculo de papa una isoenzima de fosforilasa, soluble, capaz de

formar, a partir de glucosa 1-fosfato y en ausencia de aceptor externo, un glucano α -1,4 unido a proteína.

Por otra parte, Lavintman y col. (1973, 1974) observaron que una fracción particulada de papa, compuesta principalmente de pro-plástidos, era capaz de transferir específicamente glucosas del UDP-glucosa a una proteína endógena para formar una glucoproteína, resistente a la acción de β -amilasa. Esa glucoproteína en una etapa posterior, actuaría como aceptor para el alargamiento de las cadenas a partir de ADP-glucosa, UDP-glucosa o glucosa 1-fosfato, en la biosíntesis del almidón. Recientemente, Tandecarz y Cardini (1979) observaron que en presencia de urea 8M, los gránulos rotos de almidón eran capaces de catalizar la incorporación de radioactividad, tanto a partir de UDP-(^{14}C)glucosa como de ADP-(^{14}C)glucosa, a un aceptor proteico. Distintas experiencias permiten sugerir que las glucosas o maltosas radioactivas están unidas a la proteína a través de una unión pirofosfato.

Con respecto al glucógeno, siempre preocupó saber cómo se originan las primeras moléculas del mismo. En hígado fetal de mamíferos (Kornfeld y Brown, 1962) resultó imposible detectar la presencia de glucógeno durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Su aparición posterior lleva a pensar que: o bien una parte, indetectable por los métodos utilizados, pasa de la célula madre a la hija durante la división celular, o bien las células poseen el sistema enzimático necesario para realizar una síntesis "de novo".

Illingworth y col. (1961) observaron que la fosforilasa de músculo, luego de una purificación exhaustiva, era capaz de sintetizar glucógeno "de novo", en ausencia de aceptor exógeno, luego de un cierto período de "lag". Además, demostraron la existencia de una cadena de 2 a 6 glucosas unidas a la enzima, sugiriendo que la misma enzima podría actuar como aceptor, formando una especie de glicoproteína (Brown y col., 1961).

Uno de los trabajos pioneros en el estudio del mecanismo de iniciación de la biosíntesis "in vitro" de polisacáridos, fue el de Krisman (1972;1973), quien demostró que una preparación enzimática parcialmente purificada de hígado de rata cataliza la transferencia de glucosas del UDP-glucosa a una fracción insoluble en TCA. La reacción se lleva a cabo en ausencia de aceptor exógeno y requiere altas concentraciones de sales. Dado que se forma un glucano α -1,4 unido a proteína a través de una unión ácido-lábil, Krisman (1972;1973) sugirió que podría ser un intermediario en la síntesis del glucógeno. En un trabajo posterior (Krisman y Barengo, 1975), se presentan evidencias que permiten establecer: a) que ese proteo-glucano es realmente el precursor del glucógeno y que por lo tanto una proteína o bien oligosacáridos que están unidos a una proteína constituyen el aceptor inicial en dicha síntesis; b) que parte de los malto-oligosacáridos radioactivos unidos a la proteína se han formado "de novo" a partir de UDP-(^{14}C)glucosa. Por otra parte, se sugiere que el mecanismo de biosíntesis del polisacárido, en ausencia de aceptor exógeno, se

llevaría a cabo por lo menos en dos etapas: en la primera, una nueva enzima, la glucógeno-sintetasa iniciadora, catalizaría la transferencia de glucosas del UDP-glucosa a un aceptor proteico. Este proteo-glucano así formado sirve de núcleo para que, en la segunda etapa, puedan manifestar su actividad la glucógeno-sintetasa y la enzima ramificante.

Paralelamente, otros autores (Berthillier y col., 1975) observaron que una fracción microsomal de hígado de rata sintetiza, a partir de UDP-glucosa, un glucano α -1,4 unido a proteína.

Que el glucógeno se sintetiza sobre un esqueleto proteico fue comprobado por Butler y col. (1977) quienes aislaron glucógeno insoluble en TCA y observaron que luego de un tratamiento exhaustivo con enzimas proteolíticas, una porción peptídica continuaba unida al glucano. Los procedimientos efectuados indicaron la existencia de una unión covalente entre la proteína y el poliglucósido.

Distintos investigadores habían encontrado que la extracción del glucógeno, de tejidos animales, con agua o solución de TCA influía en el rendimiento del polisacárido, siendo menor que el obtenido por digestión con solución alcalina. Así se distinguieron dos fracciones: una fácilmente extraíble, llamada lioglucógeno, y otra, unida a proteína, difícilmente extraíble, o desmoglucógeno (Stetten y Stetten, 1960). Si bien Roe y col. (1961) observaron que la recuperación incompleta de glucógeno de los tejidos se debía a una deficiente homogeneización, se ha comprobado

que el glucógeno está asociado fuertemente a proteínas, principalmente a las enzimas del metabolismo (Bueding y Orrell, 1964; Wanson y Drochmans, 1968; Marshall, 1972; Lomako, 1971).

Estudiando las propiedades del glucógeno particulado, Parodi y col. (1967) habían detectado algunas uniones ácido-lábiles, la ruptura de las cuales transformaba el glucógeno nativo de un peso molecular de 3×10^9 a 8×10^6 . Trabajos recientes (Geddes y Stratton, 1977; Chee y Geddes, 1977) han demostrado que las partículas α que son sintetizadas sobre un esqueleto proteico se mantienen unidas a través de puentes disulfuro. Además, la unidad fundamental consiste en una molécula de proteína que soporta 2-3 partículas β de un peso molecular aproximado de $15-40 \times 10^6$ (Chee y Geddes, 1977). Estos resultados hacen pensar que existiría una relación entre las uniones ácido-lábiles del glucógeno particulado (Parodi y col., 1967) y las uniones ácido-lábiles del proteoglicano de Krisman (1972; 1973).

La existencia de un complejo glucógeno-proteína también se observó en invertebrados. Del cestode *Moniezia expansa*, se aislaron dos fracciones, ambas conteniendo proteína y glucógeno; el complejo pobre en polisacárido se denominó "moniezina" y el rico en poliglucósido "baerina" (Hunt, 1970). De la pupa *Calliphora erythrocephala* se extrajo glucógeno unido a proteína, el que sólo se liberó por digestión con papaína (Hunt, 1970).

Ward y Wright (1965) observaron que la pared celular del *Dictyostelium discoideum* estaba constituida por un complejo de ce-

lulosa y glucógeno. Demostraron además, que la síntesis de glucógeno de la pared celular estaba catalizada por una enzima asociada a dicha pared.

Se ha observado en distintos hongos y levaduras que un polisacárido semejante a la amilosa o al glucógeno puede estar presente en la pared celular, constituyendo un componente menor. Del *Fusicoccum amygdali* se ha aislado un glucano lineal α -1,4 que se tiñe de azul con iodo (Obaidah y Buck, 1971). Esta amilosa, aparentemente constituída por moléculas cortas, parecería bastante importante estructuralmente, ya que luego del tratamiento con α -amilasa, la pared celular aparece más delgada (Buck y Obaidah, 1971). Se han obtenido moléculas cortas de amilosa (32-45 glucosas) asociadas a la pared celular de distintos hongos (McCracken y Dodd, 1971). En células de levadura, se han detectado gránulos de glucógeno, localizados en vesículas membranosas (Northcote, 1963) o asociados con la periferia de la célula (Ghosh y col., 1973). Recientemente se ha demostrado (Gunja-Smith y col., 1977) la existencia de dos "pools" de glucógeno en *Saccharomyces*. Uno de ellos, que corresponde al llamado glucógeno insoluble, estaría asociado a la pared celular a través de una unión estable, y podría desempeñar un papel importante en el metabolismo de la pared celular. Recientemente, Fontana y Krisman (1978) han demostrado la existencia en *Neurospora crassa*, de un glucano lineal α -1,4, asociado a alguna estructura de la pared celular. Sus resultados permiten sugerir que esta amilosa podría ser utilizada por el hon-

go, como aceptor para la síntesis de glucógeno. Por otra parte, Takahara y Matsuda (1977) han demostrado que una fracción enzimática de *Neurospora crassa* cataliza la transferencia de glucosas del UDP-glucosa a un aceptor proteico endógeno, en ausencia de altas concentraciones de sales. Estos autores sugieren que esta glucoproteína sería un intermediario en la iniciación de la síntesis del glucógeno.

1.5. Antecedentes sobre la síntesis "de novo" de glucógeno en bacterias. Objetivos de esta investigación.

1.5.1. Antecedentes recientes.

En lo que respecta a la síntesis "de novo" del glucógeno en bacterias, la misma fue estudiada por primera vez por Conrad y col. en *Aerobacter aerógenes*. Kindt y Conrad (1967) habían observado que la cepa $A_3(S_1)$, crecida en condiciones tales en las que muy poco glucógeno podía ser detectado en las células, poseía todos los componentes necesarios para la síntesis de este polisacárido, con la posible excepción del aceptor. Por lo tanto, si estas células carecían totalmente de glucógeno en alguna etapa del crecimiento logarítmico, pero lo acumulaban en un medio limitante en nitrógeno, debían poseer la capacidad para la biosíntesis "de novo" del mismo. Ensayos preliminares demostraron que cuando el extracto enzimático se incubaba con concentraciones sublimitantes

de aceptor exógeno, se observaba una incorporación de glucosas al glucógeno luego de un período de "lag" de 3-4 horas. Posteriormente, Gahan y Conrad (1968) consiguieron obtener una fracción purificada de glucógeno-sintetasa, que no posee glucógeno endógeno, y que es capaz de catalizar la síntesis "de novo" de este poliglucósido a muy baja velocidad. La reacción es estimulada en forma notable, eliminando el período de "lag", por una proteína activadora presente en el sobrenadante de 105.000 x g, que sin embargo, no es aceptora de los restos glucosídicos. Una estimulación semejante es producida también por albúmina bovina. Esencialmente en el esquema propuesto por Gahan y Conrad (1968) la proteína aceptora es la misma enzima. Por otra parte, estos autores sugieren que la síntesis "de novo" se realizaría por incorporación de los residuos glucosídicos al extremo terminal reductor, difiriendo así del mecanismo conocido involucrado en el alargamiento de las cadenas del glucógeno.

Fredrick (1971a) demostró la existencia de dos isoenzimas de fosforilasa en bacterias verde-azules, una de las cuales no requería aceptor externo. Aparentemente se trataría de una glucoproteína, a la cual se halla unida una porción glucosídica, la que puede ser eliminada por digestión con α -amilasa. Luego de este tratamiento, la isoenzima de fosforilasa se volvía dependiente de aceptor externo. Si bien Fredrick (1971a) consideró que esta fosforilasa podría estar involucrada en la síntesis "de novo" del polisacárido, la idea general aceptada es que en bacterias la fosfo

rilasa intervendría en el catabolismo del glucógeno.

Una mutante de *Escherichia coli*, glucosa-fosfato isomerasa y glucosa 6-fosfato dehidrogenasa negativas, cultivada en gluconato como fuente de carbono, posee todas las enzimas del metabolismo del glucógeno, pero no lo puede acumular. Cuando se agrega glucosa al cultivo, comienza a sintetizarlo inmediatamente. Chambost y col. (1972) sugieren una síntesis "de novo" del polisacárido. Posteriormente, demostraron que la fracción particulada de esta mutante no sólo catalizaba la transferencia de glucosas del ADP-glucosa al glucógeno, sino también a un producto insoluble en metanol (Chambost y col., 1973). Esta última reacción se producía en ausencia de aceptor externo, pero requería "in vitro" la presencia de albúmina y altas concentraciones de sales. Esta síntesis "de novo" también podía producirse en presencia de albúmina y de un factor proteico existente en la fracción soluble del extracto.

Simultáneamente, Fox y col (1973) observaron algo semejante con un extracto enzimático de *Escherichia coli* B. Distintas sales estimulaban la transferencia de glucosas del ADP-glucosa a una fracción insoluble en metanol, en ausencia de aceptor externo. En este sistema, la albúmina activaba de 10 a 120 veces. Si bien era factible pensar que un glucano aceptor estuviese presente en la preparación enzimática, el tratamiento del extracto con glucoamilasa no afectó la transferencia de azúcares. Por otra parte, Fox y col. (1973) intentaron demostrar la participación, en la bio-

síntesis del glucógeno en bacterias, de un intermediario glucoproteico, semejante al observado por Krisman (1972,1973) con una preparación enzimática de hígado de rata. Si bien Fox y col (1973) obtuvieron un producto precipitable por TCA, el que se degradó por tratamiento con glucoamilasa y α -amilasa, no pudieron demostrar que estaba unido a proteína. Dicha fracción precipitable por TCA resultó ser resistente a la digestión con pronasa.

1.5.2. Objetivos de esta investigación.

El propósito de este trabajo de investigación fue tratar de esclarecer el mecanismo de iniciación de la biosíntesis del glucógeno en bacterias.

Sobre la base de los resultados obtenidos por Krisman (1972;1973; y Barengo, 1975) con el sistema de hígado, se trató de ver si también en bacterias el acceptor inicial es un compuesto estructuralmente diferente al glucógeno.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. Sustratos, enzimas auxiliares y otros compuestos.

La mayor parte de los compuestos utilizados se obtuvieron de diferentes fuentes comerciales.

2.1.1. Sustratos.

UDP-glucosa, ADP-glucosa y glucógeno de hígado de conejo, de Sigma Chemical Co.

2.1.2. Preparación de sustratos radioactivos.

En la preparación de los sustratos radioactivos se utilizó (^{14}C)glucosa uniformemente marcada (Amersham, Searle, 200-300 mCi/mmol de actividad).

- UDP-(^{14}C)glucosa: fue preparado por Nora Iñón, de acuerdo al método de Wright y Robbins (1965) con ligeras modificaciones.

- ADP-(^{14}C)glucosa: fue preparado por Susana Raffo y Marta Eirin,

quienes se basaron en la técnica descrita por Recondo y col. (1963).

Ambos sustratos radioactivos, para ser utilizados en los ensayos enzimáticos, se diluyeron a 540.000 cpm/ μ mol con el nucleótido-glucosa no marcado correspondiente.

-(¹⁴C)glucógeno: se preparó por síntesis enzimática según el método descrito en (Krisman y Barengo, 1975). La enzima se obtuvo a partir de un homogenato de hígado de rata, según la técnica de Krisman (1973). La glucógeno-sintetasa parcialmente purificada se incubó con la siguiente mezcla:

buffer glicina-NaOH (pH 8.7)	100 mM
EDTA-Na (pH 7)	100 mM
DTT	5 mM
enzima (40 mg/ml de proteína)	10 μ l
glucógeno	4 mg
UDP-(¹⁴ C)glucosa (309 μ Ci/ μ mol)	6.6 x 10 ⁵ cpm
volumen final	0.1 ml

Luego de incubar 2 horas a 37°C, la reacción se detuvo precipitando las proteínas por el agregado de 0.5 ml de TCA 10% frío. El glucógeno radioactivo, que está presente en la fracción soluble en TCA, se precipitó por adición de 1.5 volúmenes de etanol de 96°. El precipitado, aislado por centrifugación, se redisolvió en agua y se reprecipitó con etanol. Esta operación de lavado se repitió dos veces más. Por último, el precipitado de (¹⁴C)glucógeno se disolvió en agua hasta una concentración de 10 mg/ml de polisacárido y 1.3 x 10⁶ cpm.

2.1.3. Enzimas auxiliares.

-Proteasa tipo VI de *Streptomyces griseus* (Sigma) y Pronasa, marca registrada de una mezcla de proteinasas de *Streptomyces griseus* (Calbiochem).

-Tripsina, tipo III, de páncreas de buey (Sigma).

-Lisozima (Sigma).

-DNAsa I, de páncreas de buey (Sigma).

- α -amilasa, se obtuvo de saliva humana. Luego de centrifugar la saliva a 4.000 rpm 10 minutos, el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

- β -amilasa (Mann Res. Lab.).

- α -amiloglucosidasa, grado II, de *Rhizopus genus* (Sigma)

-Enzima ramificante, se obtuvo a partir de un homogenato de hígado. Se usaron ratas alimentadas durante 5-6 hs con solución concentrada de sacarosa. Tres horas más tarde, los animales se decapitaron. Los hígados se perfundieron cuidadosamente con una solución fría conteniendo sacarosa 0.25 M, EDTA-Na 5 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM. La enzima se purificó siguiendo la técnica de Krisman (1962a). La enzima concentrada y dializada se diluyó con buffer citrato 0.5 M (pH 6.05), hasta una concentración de 14 mg/ml.

2.1.4. Otros compuestos.

-Tryptona (Oxoid); extracto de levadura y casaminoácidos

(Difco).

-Sephadex G-50 (Pharmacia), Amberlite MB-3 (Mallinkrodt).

-Tritón X-100 y digitonina (Sigma); Lubrol WX (Ici); Lubrol PX (Duperial); desoxicolato-Na (Mann Res. Lab.); Brij 58 (Atlas Chem.); Nonidet P-40 (Shell Chem.); Sarkosil NL-97 (Ciba-Geigy).

2.2. Cultivo de bacterias.

2.2.1. Organismo utilizado.

Todos los experimentos descriptos en este trabajo fueron realizados con la cepa de *Escherichia coli* AT₉ (met⁻, RNAsa I⁻), cedida gentilmente por la Dra. Mirtha Flawiá.

2.2.2. Almacenamiento de la cepa.

Un método conveniente para almacenar una gran cantidad de cepas durante varios años, es usar tubos con tapa conteniendo agar nutritivo al 0.6%. Este "almacenamiento en profundidad" permite guardar las cepas por aproximadamente dos años. Con ese objeto se utilizó el siguiente medio (Miller, 1972):

Bacto-triptona	10 gr
Bacto-extracto de levadura	10 gr
K ₂ HPO ₄	5 gr
MgSO ₄	0.2 gr
glicerol	4 gr
Bacto-agar	6 gr
H ₂ O c.s.p.	1.000 ml

Se esterilizó en autoclave a 1 atm. de presión durante 20 minutos.

Luego de sembrar una colonia en profundidad, los viales se incubaron durante una noche, luego se sellaron y se guardaron, lejos de la luz, en frío.

2.2.3. Mantenimiento y repíque.

Para el mantenimiento y repíque de las bacterias, se utilizó el medio de cultivo de composición siguiente:

K_2HPO_4	14	gr
KH_2PO_4	6	gr
extracto levadura	4	gr
agar	15	gr
$MgSO_4$	0.2	gr
glicerol	4	gr
H_2O c.s.p.	1	litro

Para mantener las células en condiciones viables se realizaron repiques cada 4-5 semanas.

2.2.4 Condiciones de crecimiento.

Para la obtención de enzima, las bacterias se cultivaron en dos medios distintos:

Medio A: descrito por Ribbons y Dawes (1963) y constituido por:

Bacto-triptona	10	gr
Bacto-extracto levadura	5	gr
K_2HPO_4	5	gr
$MgSO_4$	0.2	gr
H_2O c.s.p.	1	litro

El pH se ajustó a 7.2 con KOH al 33%.

Medio B:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	14 gr
KH_2PO_4	6 gr
MgSO_4	0.2gr
NH_4Cl	1.0gr
casaminoácidos	15 gr
glicerol	30 gr
vitamina B ₁	3 mg
H ₂ O c.s.p.	1 litro

Se ajustó el pH a 7.2 con KOH al 33%.

Las células se cultivaron a 30°C, aeróbicamente, con agitación constante (170 rpm), en frasco erlenmeyer de dos litros, conteniendo 500 ml de medio. Como inóculo se utilizó una suspensión de bacterias provenientes de un cultivo en fase estacionaria. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la absorbancia a 560 nm.

Las bacterias, generalmente provenientes de 2 litros de cultivo, se cosecharon una vez que entraron en la fase logarítmica tardía, por centrifugación a 7.000 rpm durante 5 minutos, a 4°C. A continuación se lavaron dos veces con buffer glicina-NaOH 10mM pH 8.7 conteniendo EDTA-Na 10 mM y se procesaron como se señala en "preparación de enzima" (sección 2.4).

2.3. Aislamiento de glucógeno.

2.3.1. De células.

Con el objeto de obtener un contenido en glucógeno que

reflejara exactamente el nivel de dicho polisacárido en las distintas etapas del desarrollo bacteriano, se preparó un cultivo de bacterias y a diferentes tiempos, se tomaron 10 ml del mismo y luego de enfriar rápidamente se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante, y las células sedimentadas se trataron con 0.9 ml de KOH 33%, calentando a 100 °C, 20 minutos. Después de la digestión alcalina, se precipitó el glucógeno agregando 3 ml de etanol de 96° (Krisman, 1962). Finalmente, el glucógeno se separó por centrifugación.

2.3.2. Del extracto enzimático.

A 0.2 ml de extracto enzimático se agregó 0.9 ml de KOH 33% y se procedió en la forma descrita en 2.3.1.

2.4. Preparación de enzima.

2.4.1. Obtención de esferoplastos.

Las células bacterianas están recubiertas por una pared celular, la cual está localizada hacia el lado externo de la membrana citoplasmática. La diferencia que presentan las bacterias a la coloración de Gram, es reflejo de una diferencia en la estructura de dicha pared (Nikaido, 1979), lo que permite clasificarlas en Gram-positivas y Gram-negativas. La envoltura de los organismos Gram-positivos está constituida por dos capas: una externa o pared celular propiamente dicha, densa, uniforme, responsable de

la rigidez celular y de la resistencia a la lisis osmótica (figura 4). Por debajo de la misma, constituyendo la capa interna, se encuentra la membrana citoplasmática (Reaveley y Burge, 1972). La misma se puede describir según el modelo del mosaico fluido (Singer y col., 1972), es decir una doble capa lipídica en la cual está intercalada la proteína. La pared rígida puede ser completamente removida por enzimas, como la lisozima, que hidroliza las uniones β -1,4 de la mureína (o péptidoglicano), transformando las bacterias en protoplastos, formas osmóticamente sensibles, rodeadas únicamente por la membrana citoplasmática (Strominger y Ghuyssen, 1967).

En cambio, las bacterias Gram-negativas poseen una pared celular constituída por una capa interna de mureína, que representa entre un 5-20% del peso seco de la pared celular, y la membrana externa. Esta última, si bien similar morfológicamente a la membrana citoplasmática posee menos fosfolípidos, menos proteína y un componente único que contiene hidratos de carbono, el lipopolisacárido (LPS) (Schnaitman, 1970). Funcionalmente es bastante diferente (Di Rienzo y col., 1978). La membrana externa junto con el péptido-glicano contribuyen al mantenimiento de la integridad estructural de la célula. Entre el péptido-glicano y la membrana citoplasmática está el espacio periplásmico, donde se encuentran diferentes enzimas hidrolíticas. Las bacterias Gram-negativas son más resistentes a la lisozima y sólo son susceptibles a la acción de esta enzima si previamente se sensibiliza la membrana

externa por calor, congelamiento y descongelamiento, por acción de EDTA y buffer Tris-HCl o por plasmolisis (Reaveley y Burge, 1972). Y esas formas esféricas, osmóticamente sensibles, que se obtienen, por retener la membrana externa, reciben el nombre de esferoplastos, para distinguirlos de los protoplastos que no poseen pared. Un esquema de la envoltura de las bacterias Gram-negativas se aprecia en la figura 4.

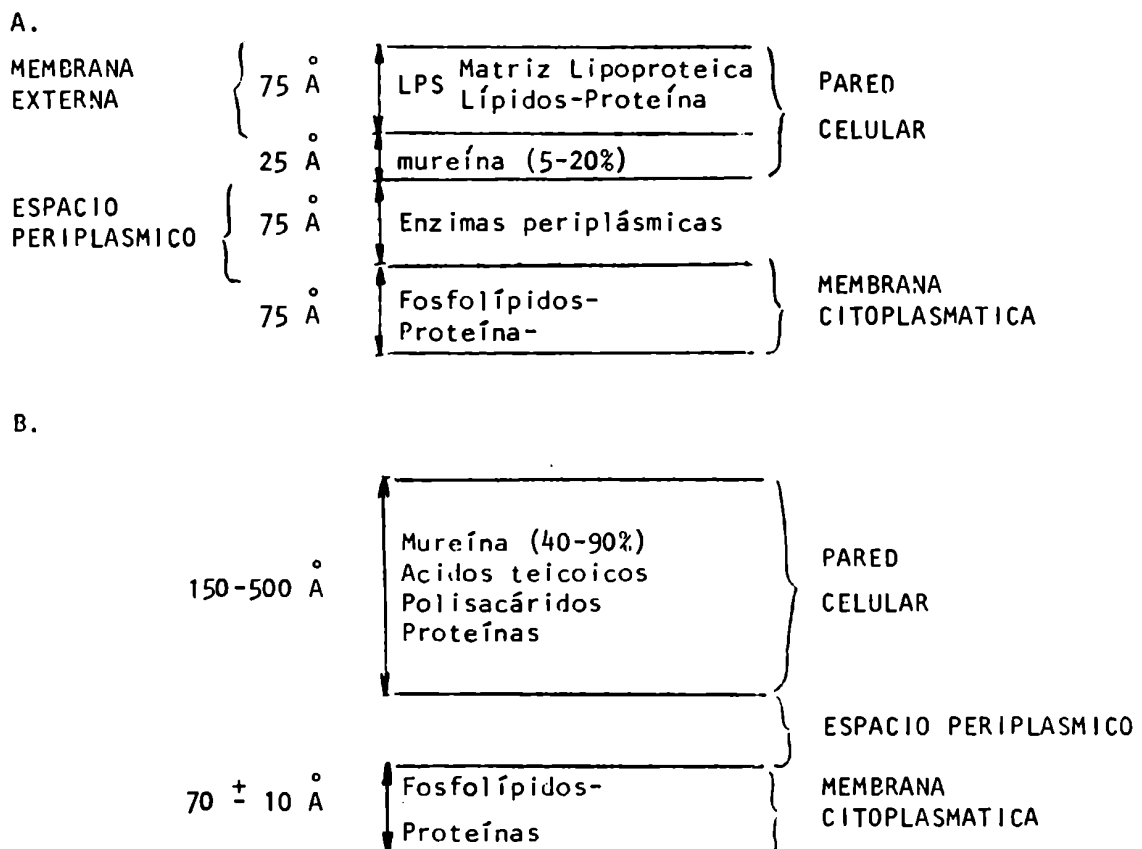


Figura 4. Esquema de la envoltura celular de bacterias Gram-negativas (A) y bacterias Gram-positivas (B).

Las células, lavadas como se explicó en 2.2.4, se resuspendieron en 5 ml de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.4) conteniendo 0.35 M de sacarosa, con el objeto de plasmolisarlas. Dado que se observó un mayor rendimiento en la obtención de esferoplastos, partiendo de una suspensión más diluida de bacterias, posteriormente las células lavadas se resuspendieron en 10 ml del buffer mencionado. Para la obtención de esferoplastos, se siguió el método descrito por Viñuela y col. (1967), incubando las células con lisozima (100 μ g/ml) en presencia de 0.8 mM de EDTA-Na (pH 8.4). La formación de los esferoplastos generalmente se completó en 30-60 minutos a temperatura ambiente. Dado que se observó algo de lisis celular, el tratamiento descrito se realizó posteriormente a 4°C, con el objeto de evitar la degradación de los componentes de la membrana (Yamato y col., 1975). El grado de conversión de esferoplastos se estimó por observación al microscopio. También se verificó turbidimétricamente, por la disminución de la absorbancia a 650 nm que se observa en la suspensión luego de diluir con agua destilada (Sistrom, 1958).

2.4.2. Lisis de los esferoplastos.

La lisis se llevó a cabo por dilución osmótica, agregando a la suspensión 80 ml de agua destilada fría y agitando vigorosamente durante unos minutos a 4°C. Posteriormente la preparación se dejó una noche a 4°C. Con la ruptura de los esferoplastos, la suspensión se volvió tan viscosa por la liberación del DNA, que

fue necesario degradarlo. Con ese objeto se adicionó DNAsa (500 μ g) y MgCl₂ 5 mM. Hidrolizado el DNA, al cabo de 30-60 minutos en frío, se centrifugó a 8.000 x g durante 20 minutos, para remover las células enteras y detritus.

2.4.3. Obtención de enzima.

El sobrenadante de 8.000 x g se centrifugó a 105.000 x g durante 120-150 minutos, con el objeto de obtener la fracción de membranas (Spencer y Guest, 1974). El sedimento de membranas se resuspendió en buffer glicina-NaOH 10 mM (pH 8.7) conteniendo EDTA-Na 5 mM, con la ayuda de un homogeneizador Potter-Elvehjem, de manera de obtener una concentración de aproximadamente 10-14 mg/ml de proteína. En los casos en que luego se sometió a un gradiente discontinuo de sacarosa, el sedimento de membranas se resuspendió en el mismo buffer, conteniendo 0.25 M de sacarosa. Esta preparación se utilizó como fuente de enzima en la mayor parte de los experimentos descriptos en este trabajo. La preparación se conservó a 4°C bajo vapores de tolueno.

2.4.4. Gradiente discontinuo de sacarosa.

Las membranas provenientes del shock osmótico de los esferoplastos constituyen una mezcla de membranas externa y citoplásmática (Miura y Mizushima, 1968; Schnaitman, 1970). En este trabajo, se utilizó el gradiente A, para estudiar la localización del complejo enzimático (Miura y Mizushima, 1968). Por otra parte,

cuando se intentó purificar rápidamente el sistema enzimático o analizar el producto sintetizado, se realizó el gradiente B.

2.4.4.1. Gradiente A. Se preparó con 1.4 ml de cada una de las siguientes soluciones: 10% (0.29M), 30% (0.88M) y 50% (1.46M) de sacarosa en buffer glicina-NaOH 10 mM, pH 8.7, conteniendo EDTA-Na 5 mM. Sobre la superficie del gradiente se sembró la preparación enzimática en un volumen de 0.7 ml. Se utilizaron tubos de nitrato de celulosa de 6 ml de capacidad. Se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman, modelo LB, a 25.000 rpm, 15 h, a 4°C, utilizando un rotor SW65. Finalizada la centrifugación, el gradiente se fraccionó en alícuotas de 0.5 ml, por aspiración a través de una aguja conectada a la bomba de succión. El sedimento (fracción 0) se resuspendió en 0.5 ml del buffer utilizado en el gradiente.

2.4.4.2. Gradiente B. En este caso, se preparó un gradiente en 5 capas, constituido por 0.8 ml de cada una de las siguientes soluciones: 1.3 M; 0.85 M; 0.70 M; 0.55 M y 0.40 M en buffer glicina-NaOH 10 mM (pH 8.7) conteniendo EDTA-Na 5 mM. Sobre la superficie del gradiente se sembró 0.8 ml de muestra suspendida en buffer glicina-NaOH conteniendo 0.25 M de sacarosa. Se centrifugó a 35.000 rpm, 3 h, a 4°C utilizando el mismo rotor y la misma ultracentrífuga descritos anteriormente. Finalizada la centrifugación, se recogieron fracciones de 0.5 ml, por succión desde la superficie. El sedimento de la centrifugación, se resuspendió en 0.5 ml del mismo buffer, constituyendo en este caso, la fracción 10.

Las fracciones permanecieron en hielo hasta la determinación de las actividades enzimáticas o medida de la radioactividad, según el caso.

2.5. Sistemas de incubación.

2.5.1. Incubación standard.

La mezcla de incubación standard contenía:

buffer glicina-NaOH pH 8.7	100 mM
EDTA-Na pH 7.0	50 mM
DTT	5 mM
UDP-(¹⁴ C)glucosa o ADP-(¹⁴ C)glucosa	1 mM (54.000 cpm)
enzima (10-14 mg/ml de proteína)	10 μ l
volumen total	100 μ l

Las incubaciones se realizaron normalmente a 30-37°C, según se especifica, durante los tiempos indicados.

En ciertos ensayos se utilizó la mezcla standard en una escala mayor, en cuyo caso, se indica en las leyendas correspondientes.

Para la incorporación de (¹⁴C)glucosas al glucógeno, se utilizó la misma mezcla de incubación, sólo que se adicionó 1 mg de glucógeno para 100 μ l de volumen final de mezcla de reacción.

Finalizada la incubación, la reacción se inactivó y se procesó por distintos métodos, dependiendo la metodología usada de la necesidad de medir la incorporación de radioactividad a un aceptor proteico (métodos A o B) o al glucógeno (método C).

2.5.2. Incubación en dos etapas.

Este procedimiento se utilizó cuando se quiso sintetizar glucógeno utilizando como precursor el proteoglucono radioactivo sintetizado. En la primera etapa se hizo una incubación standard en escala x 2, con 0.2 mg de enzima (fracción 3 del gradiente de sacarosa, figura 33) y 2×10^6 cpm de UDP-(^{14}C)glucosa ($309 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). El volumen final fue 0.2 ml y la reacción se incubó a 30°C durante 60 minutos. Posteriormente la mezcla se dividió en dos. Una alícuota se incubó nuevamente a 30° por 3-5 horas más, previo agregado de 3.5 mg de ADP-glucosa no marcado y $50 \mu\text{l}$ de enzima ramificante (14.3 mg de proteína/ml), mientras la otra alícuota se mantenía en hielo. Finalmente, ambas alícuotas se cromatografiaron por Sephadex G-50 y los productos eluidos se analizaron por gradiente de sacarosa, como se indica en la leyenda respectiva.

2.6. Procesamiento de los incubados.

Todas las operaciones se realizaron a temperatura no mayor de 4°C . Para medir la radioactividad incorporada a la fracción proteica, los incubados se procesaron siguiendo dos técnicas diferentes, aprovechando la diferente solubilidad que presentan las proteínas y el glucógeno en TCA.

2.6.1. Método de la precipitación con TCA (método A).

A la mezcla de reacción standard se le añadió 0.5 ml de

TCA 10% frío para inactivar la reacción (Krisman, 1972). Se agitó en vortex y se centrifugó a 12.000 x g 15 minutos. De esta manera se obtuvieron dos fracciones: un precipitado proteico, llamado de ahora en adelante "precipitado-TCA" (pptado-TCA), y una fracción soluble en ácido, llamada de ahora en adelante fracción "soluble en TCA-precipitable por etanol" (sol TCA-pptado EtOH).

En ciertos casos, se utilizó solución de TCA 10% fría conteniendo molibdato de amonio 2 mg/ml. Dado que esta sal produce desnaturalización de proteínas y favorece la precipitación de péptidos, se pensó que mejoraría la precipitación de la fracción proteica. Los valores de estos precipitados radioactivos son muy semejantes a los obtenidos con el método 2.6.2.

El "precipitado-TCA" se lavó dos veces con 0.5 ml de TCA 10% cada vez, para eliminar tanto el nucleótido-azúcar que no reaccionó como la radioactividad que corresponde a la fracción soluble en ácido. En los casos en que se utilizó nucleótido-azúcar de alta radioactividad específica, se hicieron en total 4 lavados con TCA 10% frío. Posteriormente se realizaron dos lavados con 0.5 ml de n-butanol cada vez, para eliminar el TCA, y el precipitado se secó bajo presión reducida. El "precipitado-TCA" se transfirió a un vial y la radioactividad se contó, previo agregado de 3 ml de mezcla de Bray (Bray, 1960) como líquido centellador.

Por otra parte, a la fracción soluble en ácido, a la que se adicionaron los líquidos de lavado del precipitado proteico, se añadieron 1 mg de glucógeno como portador y 1.5 volúmenes de eta-

nol de 96° (Krisman, 1972). De esta manera, al precipitar el glucógeno con alcohol de 65%, se evita la co-precipitación del nucleótido-azúcar que no reaccionó, posibilitando su eliminación. Se agitó en vortex, se calentó en B.M. hirviente por algunos segundos y se dejó en baño de hielo durante 5 minutos. Luego de centrifugar 10 minutos a 3.000 rpm, el sobrenadante se descartó y el precipitado se disolvió en 0.5 ml de agua y se reprecipitó con etanol, favoreciendo la precipitación por el agregado de 3 gotas de solución saturada de NH_4AcO . Por último, esa fracción "soluble en TCA-precipitable por etanol", ya libre de UDP-(^{14}C)glucosa o ADP-(^{14}C)glucosa, se disolvió en 0.5 ml de agua, se transfirió a un vial de plástico y luego de agregar 3 ml de solución de Bray se contó la radioactividad.

Como el método recién descrito es laborioso y está limitado por la capacidad de la centrífuga, se desarrolló otro método, para ser utilizado en trabajos rutinarios.

2.6.2. Método de los papeles de filtro tratados con TCA (método B).

Es importante hacer notar que este método, desarrollado en el laboratorio (Krisman y Barengo, 1975a), para medir la transferencia de azúcares a una glicoproteína, es rápido, simple, sensible y reproducible, siendo además menos costoso que el de la filtración por Millipore.

2.6.2.1. Preparación de los "papeles-TCA". Se cortaron rectángulos (3 x 4 cm) de papel de filtro Whatman N°4. Aproximadamente,

250 rectángulos se colocaron dentro de un vaso de precipitación conteniendo 1 litro de TCA al 20%. Luego de permanecer en esa forma por lo menos dos horas a temperatura ambiente, se volcó el TCA y los papeles se secaron en una estufa a 60°C durante una noche. Al día siguiente, se guardaron ligeramente húmedos dentro de un recipiente cerrado.

2.6.2.2. Adsorción de la muestra. Finalizada la incubación standard, se introdujo directamente en cada tubo, por medio de una pinza y en forma de rollito, un "papel-TCA" numerado con lápiz de grafito, haciéndolo rotar varias veces. Así, la mezcla de reacción quedó adsorbida (Tabla IV) y la actividad enzimática se detuvo inmediatamente, proceso éste que se realiza con mínimas manipulaciones. Los tubos permanecieron en hielo hasta que la última muestra estuvo lista para ser adsorbida.

Tabla IV: Capacidad del rollito de papel para adsorber la mezcla de reacción.

Método	cpm
A	50.108
B	49.940

100 μ l de mezcla de reacción fueron: A) sembrados directamente en el papelito; o B) adsorbidos introduciendo directamente en el tubo, en forma de rollito, un "papel-TCA". Luego de secar las muestras, la radioactividad se midió como se describió en materiales y métodos. Los valores representan un promedio de cuatro muestras.

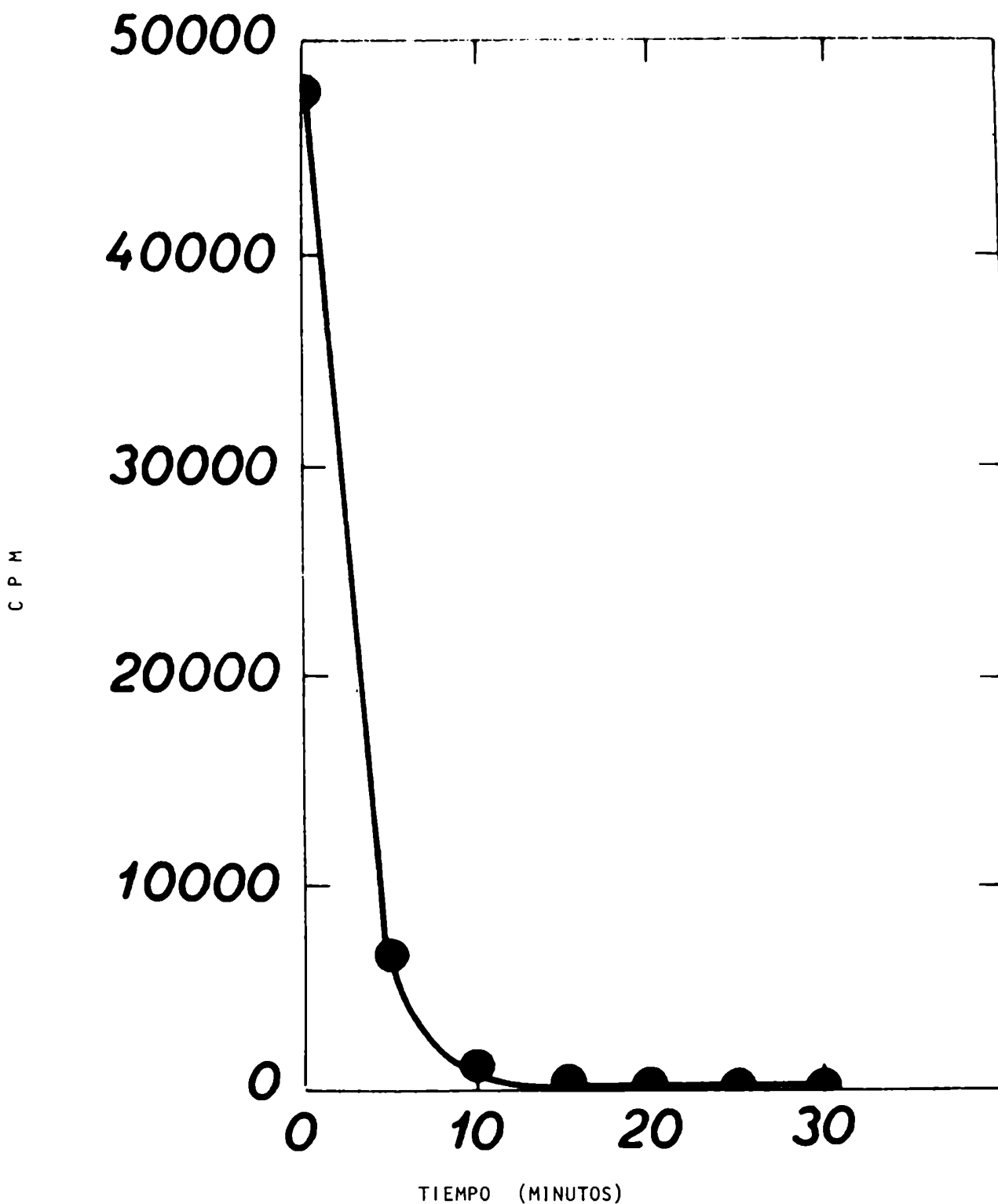


Figura 5. Eliminación de UDP-(^{14}C)glucosa del "papel-TCA". Se utilizaron varios rollitos de "papel-TCA". Cada uno adsorbió 100 μl de mezcla de reacción completa, no incubada. Todos los papeles, posteriormente, se sometieron al proceso de lavado. En cada uno de los tiempos indicados, dos papelitos se retiraron de la solución de TCA 10%. Luego de lavarlos con acetona, se secaron y contaron. El experimento se llevó a cabo por duplicado. El tiempo cero es UDP(^{14}C)-glucosa sembrado directamente sin lavar.

2.6.2.3. Lavado para eliminar la radioactividad soluble en ácido.

Este proceso se realizó a 4°C. Por medio de una pinza, se extrajeron los papeles de los tubos y todos juntos se introdujeron dentro de un vaso de precipitación conteniendo TCA 10% frío (aproximadamente 10 ml/ rollo). Se agitó ocasionalmente y al cabo de 10 minutos se volcó el TCA y se agregó un volumen igual para proceder a otro lavado. En forma análoga, se realizó el tercero. De esta manera, el 98% del nucleótido-azúcar radioactivo que no reaccionó se eliminó en el primer lavado (figura 5); otros probables compuestos presentes tales como glucógeno soluble (figura 6), oligosacáridos o glucosa se eliminaron totalmente luego de tres lavados consecutivos. Como se puede ver en la Tabla V, luego de tres lavados consecutivos, la radioactividad residual no varió, aún cuando se utilizaron hasta 0.3 mg de (^{14}C)glucógeno soluble.

Tabla V: Eliminación de glucógeno soluble.

Inicial		Residual	
mg	cpm	cpm	%
0.1	11.430	420	3.7
0.2	22.900	786	3.4
0.3	35.000	1.210	3.5

Se utilizaron cantidades crecientes de (^{14}C)glucógeno. Adsorbida la muestra se procedió como se describe en materiales y métodos.

Para remover el TCA remanente en los papeles, se reali-

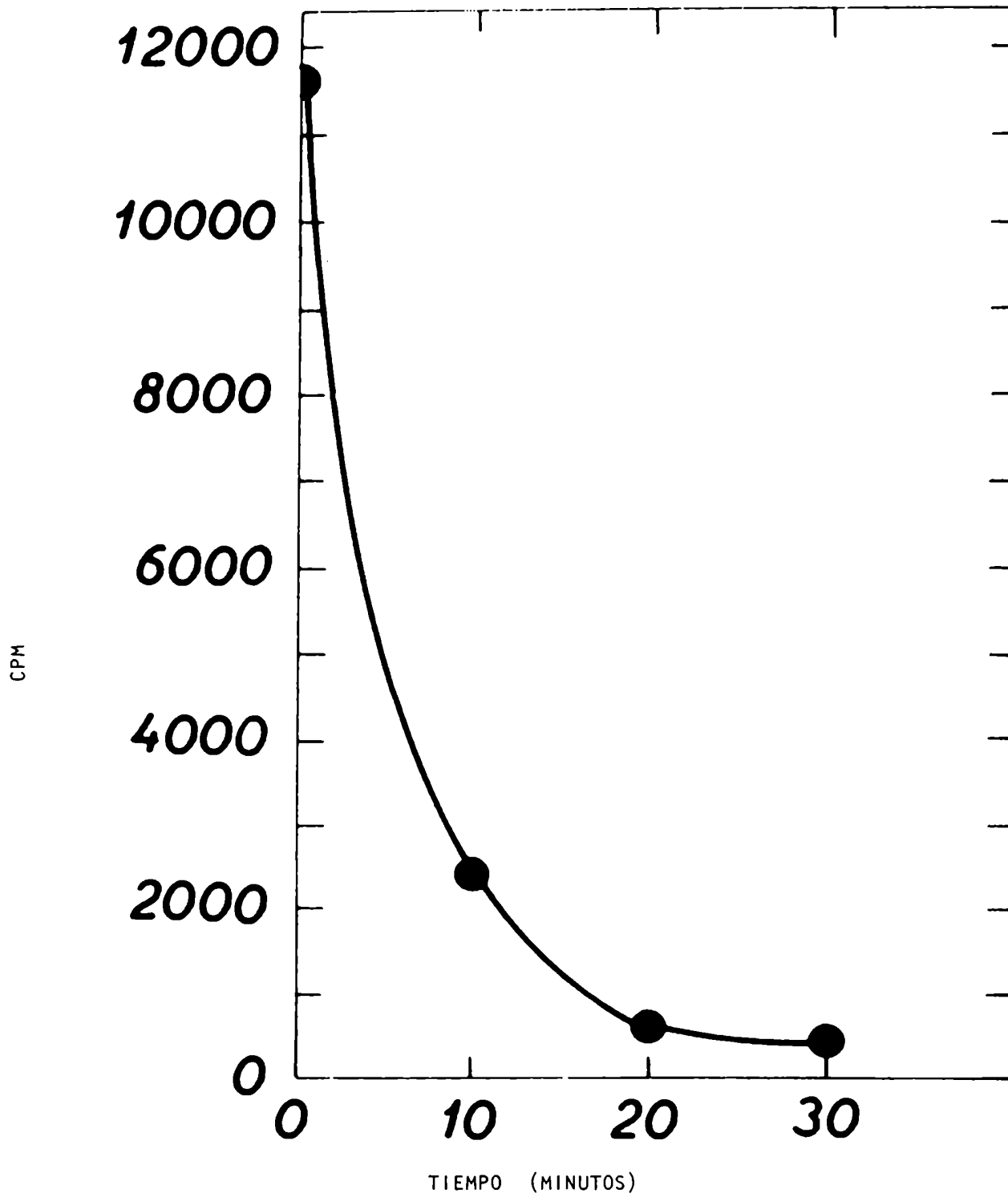


Figura 6. Eliminación de (^{14}C)glucógeno de los "papeles-TCA". El procedimiento fue similar al descrito en la figura 5, sólo que el compuesto radioactivo utilizado fue (^{14}C)glucógeno.

zaron posteriormente dos lavados con acetona, dejando en contacto durante 10 minutos cada vez.

Finalmente, los papeles, aún dentro del vaso de precipitación, se secaron por medio de una corriente de aire caliente, con ayuda de un secador de cabello. Cada rectángulo, en forma de rollito nuevamente, se introdujo en un vial de plástico, se agregaron 3.5 ml de omnifluor al 4% en tolueno como líquido centellador, y se contó la radioactividad. La acetona utilizada en los lavados se recuperó por destilación.

2.6.2.4. Recuperación de la muestra. Una vez determinada la radioactividad adsorbida en los "papeles-TCA", es posible preservar la muestra para su reuso. Para ello se procedió de la siguiente manera: los rollitos se extrajeron de los viales por medio de una pinza y todos juntos, dentro de un vaso de precipitación, se lavaron como mínimo cuatro veces con metanol (10 ml/rollo) para eliminar el centellador. Posteriormente se realizaron dos lavados con acetona y los papeles, conteniendo el proteoglucano adsorbido, se secaron con una corriente de aire frío.

2.6.3. Método del KOH (método C).

Cuando se agregó glucógeno a la mezcla de incubación standard, el (^{14}C) glucógeno sintetizado se aisló de acuerdo a técnicas ya descritas (Hassid y Abraham, 1957). La reacción se inactivó por el agregado de 0.5 ml de KOH 33% y se calentó a 100°C

en B.M. hirviendo durante 20 minutos. De esta manera, las proteínas son totalmente digeridas y el nucleótido-azúcar remanente descompuesto. El (^{14}C) glucógeno soluble, se precipitó selectivamente de la solución por el agregado de 1.5 volúmenes de etanol de 96°. Finalmente, se procedió en forma similar a la descrita para medir la radioactividad soluble en TCA, precipitable por etanol, en el método A (sección 2.6.1).

2.7. Tratamientos químicos.

2.7.1. Hidrólisis ácida.

Se realizó de dos maneras dependiendo del material de partida utilizado:

a) "Precipitado-TCA": a los "precipitados-TCA", lavados con butanol y secos, se les agregó 0.2 ml de HCl 0.1N. Se calentaron a 100°C en B.M. hirviendo durante los tiempos indicados en cada gráfico, al cabo de los cuales se enfriaron inmediatamente. Posteriormente, se agregó a cada tubo 0.5 ml de TCA 10% helado. Luego de centrifugar, el sobrenadante de TCA se lavó 3 veces con 1 ml de eter cada vez para eliminar el TCA. Se llevó a sequedad bajo presión reducida y se resuspendió tres veces en 0.1 ml de agua, llevando a seco cada vez, para eliminar el HCl. Finalmente se contó la radioactividad liberada o bien se analizó por cromatografía en papel o en Sephadex G-50. Como control, se contó también la radioactividad residual de los precipitados, previo lavado de éstos con TCA 10% y butanol.

b) "Papeles-TCA": una vez contada la radioactividad adsorbida en los "papeles-TCA", estos se reusaron para estudiar la labilidad ácida del compuesto sintetizado (Krisman y Barengo, 1975). Luego de eliminar el líquido de centelleo, como se explicó en la sección 2.6.2.4, cada rollito se introdujo en un tubo de hemólisis y se agregó HCl 0.1N hasta cubrirlo. Posteriormente, los tubos se colocaron en un B.M. hirviente durante distintos tiempos. La hidrólisis se detuvo colocando inmediatamente los tubos en un baño de hielo. Luego de ser lavados con TCA y acetona en la forma descrita en 2.6.2.3, los papeles se secaron y contaron. El tiempo cero, se obtuvo agregando HCl 0.1N a un rollito introducido en un tubo y dejándolo en hielo durante todo el tiempo que duró la hidrólisis.

2.7.2. Reducción con borohidruro.

Luego de someter el "precipitado-TCA" a hidrólisis ácida suave (HCl 0.1N, 100°C, 15 min.) el sobrenadante radioactivo se analizó por cromatografía en papel (ver sección 2.9.2). Los picos radioactivos situados desde el origen hasta maltotetraosa, se eluyeron, y se concentraron. Se adicionó 0.3 ml de NH_4HCO_3 0.15 M y una punta de espátula de NaBH_4 . Luego de 20 horas a 4°C, la reacción se inactivó por el agregado de 1-2 gotas de HCl 5N (pH 1.2) (hasta que no se observó más efervescencia). El ácido bórico se eliminó por sucesivas evaporaciones con metanol. Finalmente, se realizó la hidrólisis ácida total con HCl 2N, 100°C, 4 horas.

Las sales se eliminaron pasando el producto hidrolizado por una minicolumna de resina Amberlite MB-3 (forma acetato).

En algunas ocasiones también se eliminaron según el método descrito por Leloir y col.(1973). Este consiste en sembrar la muestra en un rectángulo de papel Whatman N°1 (2.5 x 10 cm) y cromatografiar en forma ascendente, 7-10 veces con piridina anhidra. De esta manera las sales quedan retenidas en el origen, mientras que las sustancias radioactivas migran, pudiendo ser luego eluidas para su posterior análisis.

Una vez eliminadas las sales, se concentró la muestra y se sometió a electroforesis en papel, utilizando como solvente molibdato de sodio 2%, pH 5 (ver sección 2.9.3).

2.7.3. Otros tratamientos.

Los tratamientos efectuados con álcali, fenol, etc., se describen en cada caso, en la leyenda correspondiente.

2.8. Tratamiento con enzimas degradantes.

En general, para estos estudios se utilizó el proteoglicano radioactivo desnaturalizado como "precipitado-TCA".

2.8.1. Proteasa.

El "precipitado-TCA" seco se incubó según las condiciones descritas por Spiro (1966). La muestra desnaturalizada se resuspendió en una mezcla constituida por: buffer Tris-HCl 100 mM (pH 7.5),

CaCl₂ 5mM y 0.1 mg de proteinasa, en un volumen total de 0.2 ml. Se incubó a 37°C durante 96 horas bajo vapores de tolueno. Durante el curso de la reacción, a las 24, 48 y 72 hs, se hicieron pequeñas adiciones de proteasa (0.1 mg cada vez).

2.8.2. Tripsina.

Se utilizó la mezcla de incubación anterior, sin el agregado de CaCl₂.

2.8.3. α -amilasa.

El "precipitado-TCA" se resuspendió en un volumen de 200 μ l, de una mezcla que contenía 50 mM de tampón Tris-HCl (pH 7.5), 10 μ l de amilasa salival y CaCl₂ 15 mM. Se incubó durante 60 horas a 37°C bajo vapores de tolueno (Greenwood y Milne, 1968).

2.8.4. β -amilasa.

La mezcla de reacción contenía el "precipitado-TCA" resuspendido en 200 μ l de buffer Tris-HCl 100 mM (pH 7.5) y 0.4 mg de enzima. Se incubó durante 60 horas, a 37°C bajo vapores de tolueno.

2.8.5. α -amiloglucosidasa.

Se siguió el método descrito por Lee y Whelan (1966). El "precipitado-TCA" se resuspendió en 200 μ l de buffer acetato 50 mM (pH 5), conteniendo 20 μ g de enzima y se incubó a 45°C, 24 horas.

En todos los casos, al término de la incubación, se la

inactivó agregando 0.5 ml de TCA 10% frío. Después de centrifugar, se procedió por separado con cada una de las fracciones "precipitado" y "sobrenadante" obtenidas. El "precipitado-TCA" se volvió a lavar con TCA 10%, luego dos veces con n-butanol y finalmente se contó la radioactividad. En cuanto al "sobrenadante", se eliminó el TCA con tres lavados de eter (1 ml cada vez). Se tomó una alícuota para medir radioactividad y el resto se analizó por cromatografía o electroforesis en papel.

2.9. Cromatografía y Electroforesis.

2.9.1. Cromatografía en Sephadex.

Se utilizó Sephadex G-50, medium, en una columna de 1 x 18 cm, equilibrada con formiato de amonio 0.1M o con buffer glicina-NaOH 10 mM (pH 8.7) conteniendo EDTA-Na 5 mM.

Los volúmenes totales de exclusión y de inclusión se determinaron por los volúmenes de elución del Azul Dextrano (BD) y del rojo fenol (RF) respectivamente.

Se sembró 0.2 ml de muestra y se colectaron fracciones de 0.5 ml. El procesamiento posterior se indica en la leyenda respectiva, ya que en algunos casos además de medir la radioactividad total, se determinó la radioactividad precipitable por TCA. Por otra parte, algunas fracciones se analizaron por cromatografía en papel o gradiente discontinuo de sacarosa.

2.9.2. Cromatografía en papel.

Los análisis cromatográficos se realizaron sobre muestras previamente desalificadas con resina Amberlite MB-3 (forma acetato). Luego de concentrarlas convenientemente aquéllas se sembraron sobre papel Whatman N°1 o su equivalente Schleicher & Schuell 2043a.

La cromatografía fue descendente y se utilizó como solvente n-butanol:piridina:agua, en la proporción 4:3:4 (Leloir y col., 1971). El tiempo de corrida fue de 48-72 horas.

Como standard interno de azúcares, se sembró una mezcla de malto-oligosacáridos, los que se obtuvieron por hidrólisis parcial de amilosa, según el método de Thoma y col.(1959). Los malto-oligosacáridos se revelaron con reactivo alcalino de nitrato de plata (Trevelyan y col., 1950).

2.9.3. Electroforesis en papel.

Se utilizó papel Whatman N°1, y los siguientes solventes:
A: acetato de piridina pH 6.5 (Acético gl.:piridina:H₂O- 0.4:10:90).
B: molibdato de sodio 2% al cual se agrega H₂SO₄ en cantidad suficiente como para llevar el pH a 5 (Bourne y col., 1961). En este buffer, la glucosa permanece en la zona neutra, en cambio el sorbitol al formar un complejo con el molibdato, adquiere cierta movilidad.

Normalmente se aplicaron 1.000 volts (25 V/cm) durante 120 minutos.

2.9.4. Medida de la radioactividad.

La radioactividad en electroforogramas y cromatogramas papel, se detectó con un radiocromatógrafo Packard modelo 7201. También se cortaron los cromatogramas y se midió la radioactividad en un contador de centelleo Packard Tri-carb modelos 2002 y 2003, usando la mezcla de omnifluor en tolueno como líquido centellador

2.10. Métodos colorimétricos.

2.10.1. Determinación de glucógeno.

La concentración de glucógeno se determinó por el método colorimétrico de Krisman (1962). Se basa en la coloración pardo amarillenta que da el glucógeno con el I_2 -KI, color que es incrementado varias veces por el agregado de altas concentraciones de $CaCl_2$. Presenta un máximo de absorción catacterístico a 460 nm.

El reactivo de Krisman se preparó mezclando 130 ml de solución saturada de $CaCl_2$ (filtrada) con 0.5 ml de solución iodo iodurada (0.26 gr de I_2 y 2.6 gr de KI disueltos en 10 ml de agua destilada).

El glucógeno aislado por digestión alcalina y precipitado por etanol, como se explicó en la sección 2.3.1, se disolvió e 0.2 ml de HCl 0.5N en frío, para neutralizar la alcalinidad residual y evitar interferencias con el reactivo de iodo. Finalmente se agregaron 1.5 ml de reactivo de Krisman y se leyó a 460 nm. En ciertos casos se utilizó un micrométodo para lo cual se suspen

dió el glucógeno en 0.1 ml de HCl 0.5N frío y se agregaron 0.5 ml del reactivo de iodo.

En ambos casos, se construyó una curva standard, empleando una solución de glucógeno de 1 mg/ml.

2.10.2. Determinación de proteína.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (1951). La reacción de una proteína en solución con el reactivo de Folin-Ciocalteu se produce en dos etapas: a) reacción del Cu^{++} alcalino con la proteína para dar un complejo; b) reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotúngstico por la tirosina y el triptofano presentes en el complejo proteína- Cu^{++} , dando finalmente una coloración azul característica con un máximo de absorción a 650 nm. Para la curva patrón, se utilizó solución de albúmina sérica bovina (1 mg/ml).

3. RESULTADOS

3.1. Especificidad del nucleótido-azúcar en la transferencia de (¹⁴C)glucosas a una fracción precipitable por TCA.

Se ha comentado en la sección 1.4, que una fracción parcialmente purificada de glucógeno-sintetasa de hígado de rata fue capaz de catalizar la transferencia de glucosas del UDP-(¹⁴C)glucosa a un aceptor proteico, sintetizándose un proteoglucano α -1,4 (Krisman, 1972; 1973), real intermediario en la biosíntesis del glucógeno (Krisman y Barengo, 1975).

Sobre la base de dichos resultados es que se intentó el estudio del mecanismo de iniciación de este polisacárido en bacterias. Como puede apreciarse en la Tabla VI, la fracción enzimática de *Escherichia coli*, prácticamente desprovista de glucógeno endógeno y sin el agregado de aceptor exógeno, fue capaz de catalizar la transferencia de (¹⁴C)glucosas a una fracción insoluble en TCA, tanto a partir de UDP-(¹⁴C)glucosa como de ADP-(¹⁴C)glucosa. Los resultados obtenidos son representativos del comportamiento de una serie de preparaciones enzimáticas y el porcentaje de la formación de los compuestos varía con la preparación. En algunos ex-

perimentos la cantidad de glucosa incorporada a partir de UDP-glucosa al compuesto precipitable por TCA fue hasta 4 veces mayor que la obtenida a partir de ADP-glucosa. En otros fue igual o menor. Como se verá más adelante, esto estaría relacionado con el contenido de aceptor endógeno de las diferentes preparaciones.

Tabla VI: Especificidad del nucleótido-azúcar en la síntesis de glucoproteína.

Mezcla de incubación	Sustrato radioactivo	Incorporación de (^{14}C)glucosas al	
		pptado-TCA	sol.TCA-pptado EtOH $\mu\text{moles}/30\text{ min}$
Completa	UDP-(^{14}C) glucosa	0.017	0.0001
Completa	ADP-(^{14}C) glucosa	0.009	0.0001
Completa + glucógeno	UDP-(^{14}C) glucosa	0.0001	0.002
Completa + glucógeno	ADP-(^{14}C) glucosa	0.0001	0.025

Se utilizó la mezcla de incubación standard, y se incubó durante 30 minutos a 37°C . En los casos indicados se agregó además 1 mg de glucógeno. Se inactivó la reacción por agregado de TCA 10% frío y se procesó según el método A, descrito en materiales y métodos.

Por otra parte, la incorporación de (^{14}C)glucosas a la fracción insoluble en TCA resultó severamente inhibida cuando a la mezcla de incubación se le agregó 1 mg de glucógeno. En cambio, se observó una pequeña incorporación de radioactividad al glucógeno a partir de UDP-glucosa, mientras que, en presencia de ADP-glucosa, que es el donador específico en bacterias, la incor-

poración de (^{14}C)glucosas al glucógeno fue 10 veces mayor.

3.2. Estudio estructural de los productos radioactivos sintetizados

Con el objeto de identificar el producto radioactivo sintetizado al incubar la fracción de membranas de *Escherichia coli* con UDP-(^{14}C)glucosa o ADP-(^{14}C)glucosa, el "precipitado-TCA" se sometió a diferentes tratamientos.

3.2.1. Tratamiento con enzimas proteolíticas y glucolíticas.

Como puede observarse en la Tabla VII, el 90-99% de la radioactividad original se recuperó en el sobrenadante de TCA luego del ataque enzimático, excepto en el caso de la tripsina, donde sólo se liberó un 66% de la radioactividad del producto sintetizado a partir de UDP-glucosa y un 55% del sintetizado a partir de ADP-glucosa.

Los resultados con pronasa no pueden ser tomados como una proteólisis exclusivamente, ya que parte de los productos liberados, al ser analizados por cromatografía en papel, demostraron ser maltosa, maltotriosa y maltotetraosa. Esto sugirió la presencia de una actividad enzimática de tipo amilolítico como contaminante en la preparación de pronasa, lo que fue posteriormente confirmado por incubación con glucógeno radioactivo.

Sin embargo, la degradación llevada a cabo con proteasa, tipo VI (libre de actividad amilolítica) permitió la liberación de radioactividad al sobrenadante de TCA. Con todo, este producto

radioactivo corrido en electroforesis (acetato de piridina, pH 6.5) permaneció en el origen, dado que tanto el péptido como la porción glucolítica son lo suficientemente largos como para impedir su movilidad.

Tabla VII: Efecto de distintas enzimas en la liberación de radioactividad del producto insoluble en TCA.

Tratamiento enzimático	cpm remanentes en el "pptado-TCA" sintetizado a partir de	
	UDP-(¹⁴ C)glucosa	ADP-(¹⁴ C)glucosa
-----	20.800	14.310
pronasa	1.849	1.300
proteasa tipo VI	5.824	3.577
tripsina	7.072	6.296
α-amilasa	1.033	1.479
β-amilasa	1.068	586
α-amiloglucosidasa	103	93

Una serie de mezclas de reacción standard se incubaron a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo por el agregado de TCA 10% frio. El precipitado proteico, lavado y seco, se incubó con las distintas enzimas degradantes, tal como se indicó en materiales y métodos.

La radioactividad liberada al sobrenadante de TCA, por acción de las enzimas glucolíticas, se analizó por cromatografía en papel. Los resultados se muestran en las figuras 7 y 8.

Como se puede observar, ya sea que se trate del producto

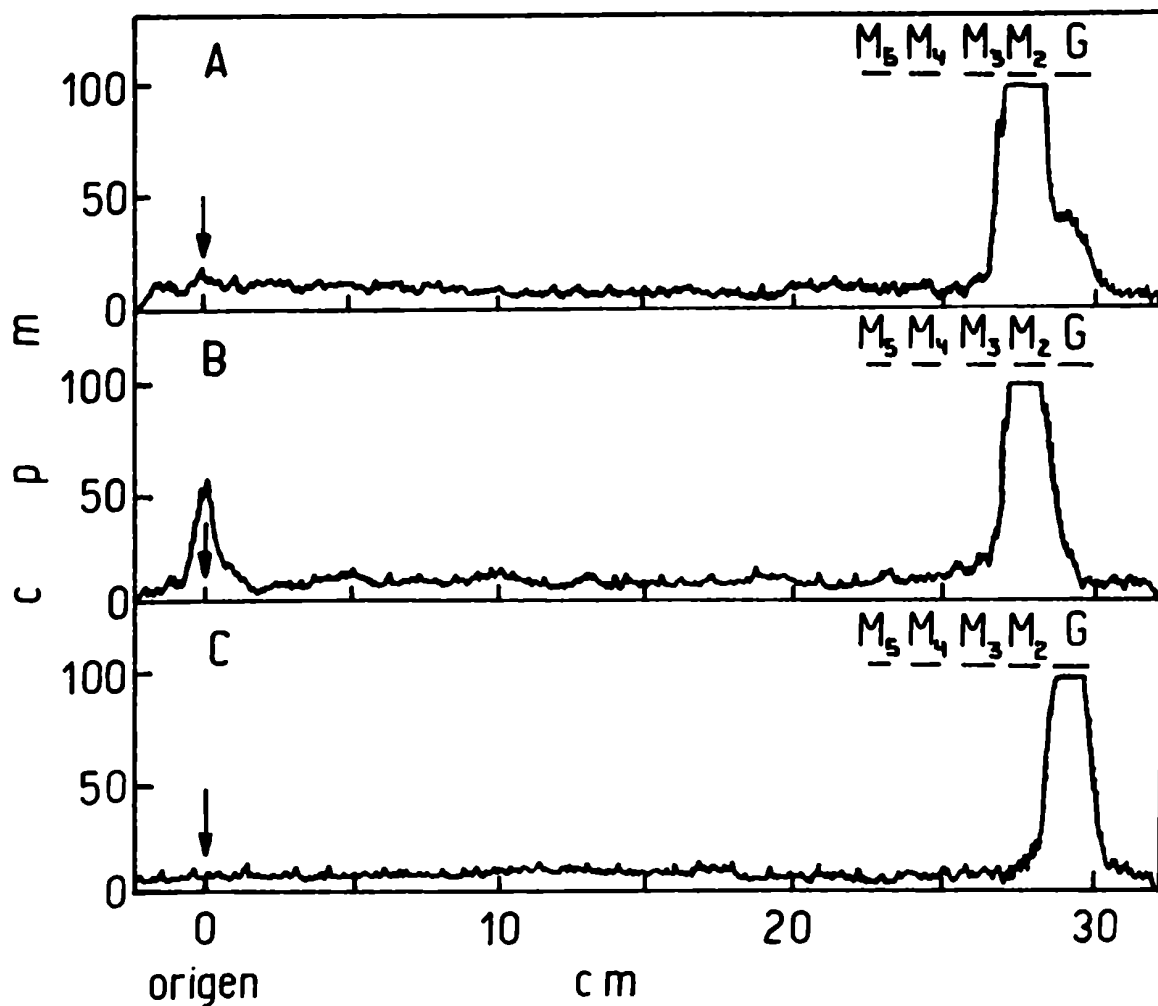


Figura 7. Cromatografía en papel del producto sintetizado a partir de UDP- (^{14}C) glucosa y digerido por enzimas glucolíticas. El procedimiento experimental fue similar al de la Tabla VII. Luego de la digestión enzimática, los sobrenadantes se analizaron por cromatografía en papel, tal como se describió en materiales y métodos. Se utilizó una mezcla de malto-oligosacáridos como standard interno. G: glucosa; M_2 : maltosa; M_3 : maltotriosa, etc. Las enzimas utilizadas fueron: α -amilasa (A); β -amilasa (B) y α -amiloglucosidasa (C).

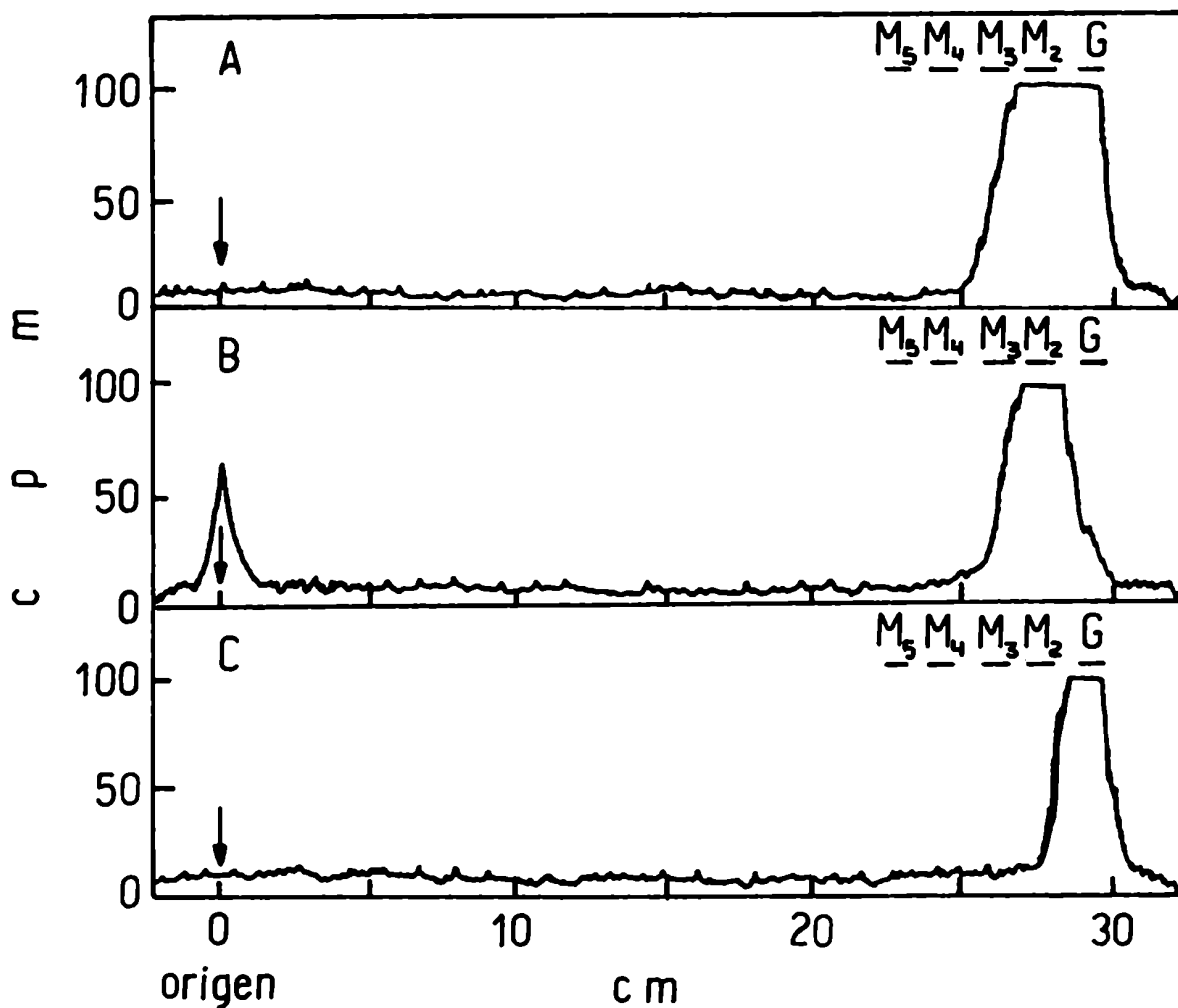


Figura 8. Cromatografía en papel del producto sintetizado a partir de ADP- ^{14}C glucosa y digerido por enzimas glucolíticas. El procedimiento experimental fue similar al de la Tabla VII. Luego de la digestión enzimática, los sobrenadantes se analizaron por cromatografía en papel, tal como se describió en materiales y métodos. Se utilizó una mezcla de malto-oligosacáridos como standard interno. G:glucosa; M_2 :maltosa; M_3 :maltotriosa, etc. Las enzimas utilizadas fueron: α -amilasa (A); β -amilasa (B) y α -amiloglucosidasa (C).

sintetizado a partir de UDP-(^{14}C)glucosa como del obtenido a partir de ADP-(^{14}C)glucosa, la incubación del mismo con α -amilasa lo convirtió en (^{14}C)maltosa y (^{14}C)glucosa; con β -amilasa en (^{14}C)maltosa y con α -amiloglucosidasa en (^{14}C)glucosa. Es necesario aclarar que en tiempos menores de incubación, el producto de la digestión por α -amilasa fue principalmente maltosa y maltotriosa.

Estos resultados apuntan a confirmar la hipótesis de que la fracción enzimática de *Escherichia coli* catalizó la transferencia de glucosas del UDP-glucosa o ADP-glucosa a una proteína o bien a oligosacáridos unidos a una proteína, es decir a una glucoproteína, sintetizándose en ambos casos un glucano α -1,4 unido a la misma.

Por último, los resultados observados en Tabla VI, sugerirían la existencia de por lo menos dos actividades enzimáticas diferentes. La enzima que transfiere las glucosas al glucógeno tendría una gran especificidad por el ADP-glucosa, que es el sustrato natural en bacterias (Preiss, 1969), mientras que la que sintetiza la glucoproteína utilizaría ambos nucleótidos de glucosa.

3.2.2. Tratamientos químicos.

En lo que se refiere a los diferentes tratamientos químicos realizados, los resultados están resumidos en la Tabla VII.

3.2.2.1. Tratamiento alcalino. Sometido el "precipitado-TCA" a condiciones alcalinas (NaOH 0.1N, 3 días, 4°C) un 93-94% de la

radioactividad permaneció insoluble en TCA, demostrando estabilidad del producto sintetizado a estas condiciones.

Tabla VIII: Efecto de distintos tratamientos químicos sobre el proteoglicano.

Tratamiento				% cpm del producto sintetizado a partir de	
				UDP-(¹⁴ C)glucosa	ADP-(¹⁴ C)glucosa
A.				Reprecipitables por TCA 10% frío.	
Urea 8 M	4°C	24 h		98	96
NaOH 0.1 N	4°C	3 d		93	94
HCl 0.1 N	4°C	30 min		95	95
HCl 0.1 N	100°C	10 min		23	19
B.				En la fase fenólica.	
Fenol 80%	20°C	30 min		91	90

Una serie de mezclas de reacción standard se incubaron a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo por el agregado de TCA 10% frío. Cada precipitado, lavado y seco, se resuspendió en 0.2 ml de cada uno de los reactivos indicados en la tabla y se procesó de la siguiente manera: parte A, luego del tiempo considerado, se neutralizó y se reprecipitó con solución de TCA 10% frío, se lavó con butanol y se contó la radioactividad tanto del precipitado como del sobrenadante; parte B, la solución de fenol se extrajo 3 veces con agua saturada de fenol. Luego se midió la radioactividad en ambas fases.

3.2.2.2. Tratamiento con urea. El agregado de urea 8 M, desnaturizante no iónico que rompe los puentes hidrógeno, no alteró la solubilidad de la radioactividad. Como se observa en la Tabla VIII, al volver a precipitar con TCA 10%, la radioactividad se re-

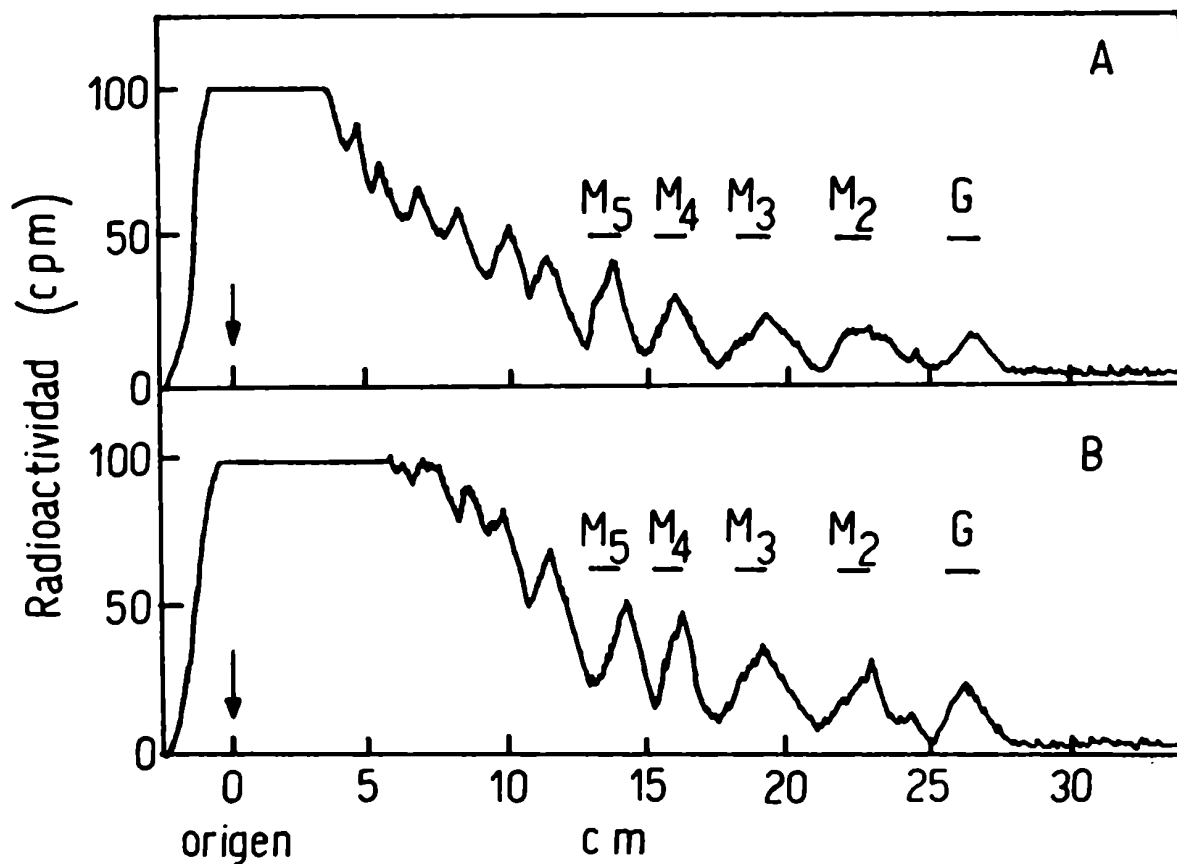


Figura 9. Cromatografía en papel del material radioactivo, solubilizado por hidrólisis ácida suave. El producto sintetizado a partir de UDP-(¹⁴C)glucosa (A) y ADP-(¹⁴C)glucosa (B) se precipitó por TCA y se sometió a hidrólisis ácida (HCl 0.1 N, 100°C, 10 min.). La radioactividad liberada al sobrenadante de TCA se analizó por cromatografía en papel, tal como se describió en materiales y métodos. Como standard interno se utilizó una mezcla de malto-oligosacáridos. G:glucosa; M₂: maltosa; M₃: maltotriosa, etc.

cuperó en la fracción insoluble en ácido.

3.2.2.3. Tratamiento con fenol al 80%. Cuando el producto radioactivo se sometió a una partición con solución de fenol al 80%, la mayor parte de la radioactividad se recuperó en la fase fenólica (Tabla VIII).

3.2.2.4. Hidrólisis ácida. La tabla VIII muestra que el producto sintetizado a partir de UDP-(^{14}C)glucosa o ADP-(^{14}C)glucosa, precipitable por TCA, es sensible a la hidrólisis ácida. El tratamiento con HCl 0.1N, 100°C durante 10 minutos, permitió liberar alrededor del 90% de la radioactividad a la fracción soluble en TCA. Estos sobrenadantes radioactivos, sometidos a electroforesis (acetato de piridina, pH 6.5), se comportaron como compuestos neutros. Cuando el sobrenadante se cromatografió en papel, se constató que los productos liberados por hidrólisis ácida, constituían oligosacáridos que co-cromatografiaban con los de la serie α -1,4 (figura 9).

3.2.2.4.1. Cinética de la hidrólisis ácida del producto insoluble en TCA. La cinética de la hidrólisis ácida (HCl 0.1N, 100°C) (figura 10) permitió determinar que la unión entre el azúcar y la proteína posee un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de 4 minutos.

Es de hacer notar que hasta el presente no se conoce ninguna unión glicosídica que posea estas características de labilidad. La labilidad ácida observada se aproxima a la del ester fos-

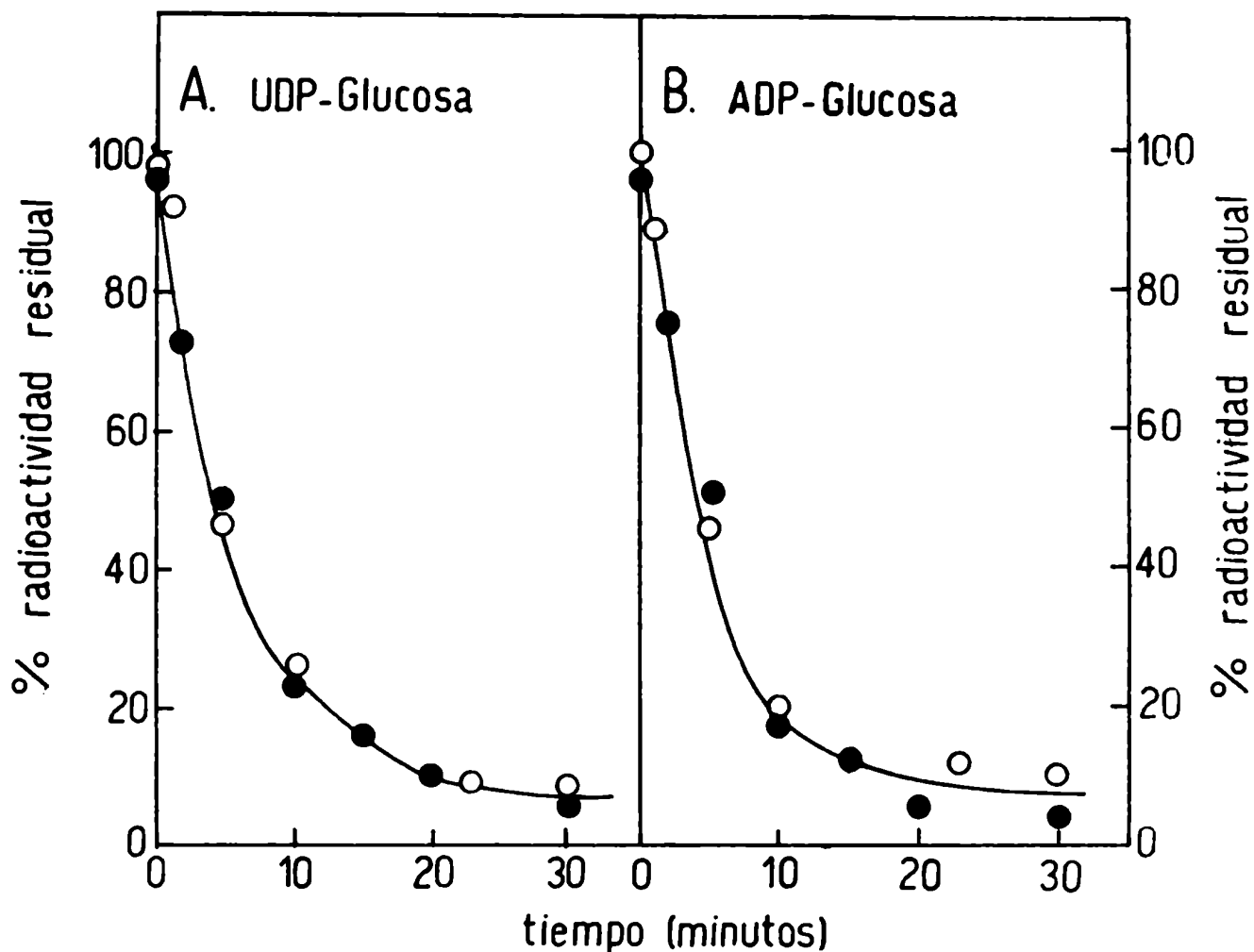


Figura 10. Cinética de la hidrólisis ácida del proteoglicano. Una serie de mezclas de reacción standard (por duplicado) se incubaron a 37°C durante 60 min con UDP-(¹⁴C) glucosa (A) y durante 30 min con ADP-(¹⁴C) glucosa (B). En una serie, la reacción se detuvo por el agregado de TCA 10% helado conteniendo molibdato de amonio (2mg/ml) y los precipitados se procesaron según lo descrito en materiales y métodos. En la otra serie, la reacción se inactivó introduciendo en cada tubo un rollito de "papel-TCA", según el método explicado en la sección 2.6.2. Tanto los "pptados-TCA" (●-●) como los "papeles-TCA" con la muestra adsorbida (o-o) se sometieron a hidrólisis ácida (HCl 0.1N 100°C) y la radioactividad residual se determinó como se describió en materiales y métodos.

fórico α -glucosa 1-fosfato, que en las mismas condiciones, tiene una vida media de 1.5 minutos (Cardini y col., 1949).

Todos estos resultados indicarían que la unión entre el glucano y la proteína es mucho más estable que si fuera un complejo de adsorción. Las cadenas glucosídicas estarían unidas a la proteína aceptora a través de una unión covalente, ácido-lábil.

3.2.3. Estructura macromolecular del proteoglucano sintetizado. Tamaño aproximado del glucano.

Con el objeto de determinar el tamaño aproximado del producto de la reacción, los proteoglucanos sintetizados a partir de UDP-(^{14}C)glucosa y de ADP-(^{14}C)glucosa se analizaron por columna de Sephadex G-50.

Como se observa en la figura 11, un 88% de la radioactividad correspondiente al proteoglucano intacto se excluyó de la columna. Esto sugiere que la radioactividad está asociada a una macromolécula. En cambio, cuando se analizó el producto que se obtiene por hidrólisis ácida (HCl 0.1N, 100°C, 10 min.) del proteoglucano, sólo el 25% de la radioactividad eluyó con el volumen muerto, indicando que parte del glucano tendría un peso molecular mayor de 10.000, o sea, estaría constituido por más de 60 glucosas. Ya sea que el producto fuere sintetizado a partir de UDP-glucosa o de ADP-glucosa, el perfil de elución fue el mismo.

La fracción que se incluyó en Sephadex G-50 se analizó por cromatografía en papel, obteniéndose oligosacáridos de la serie α -1,4.

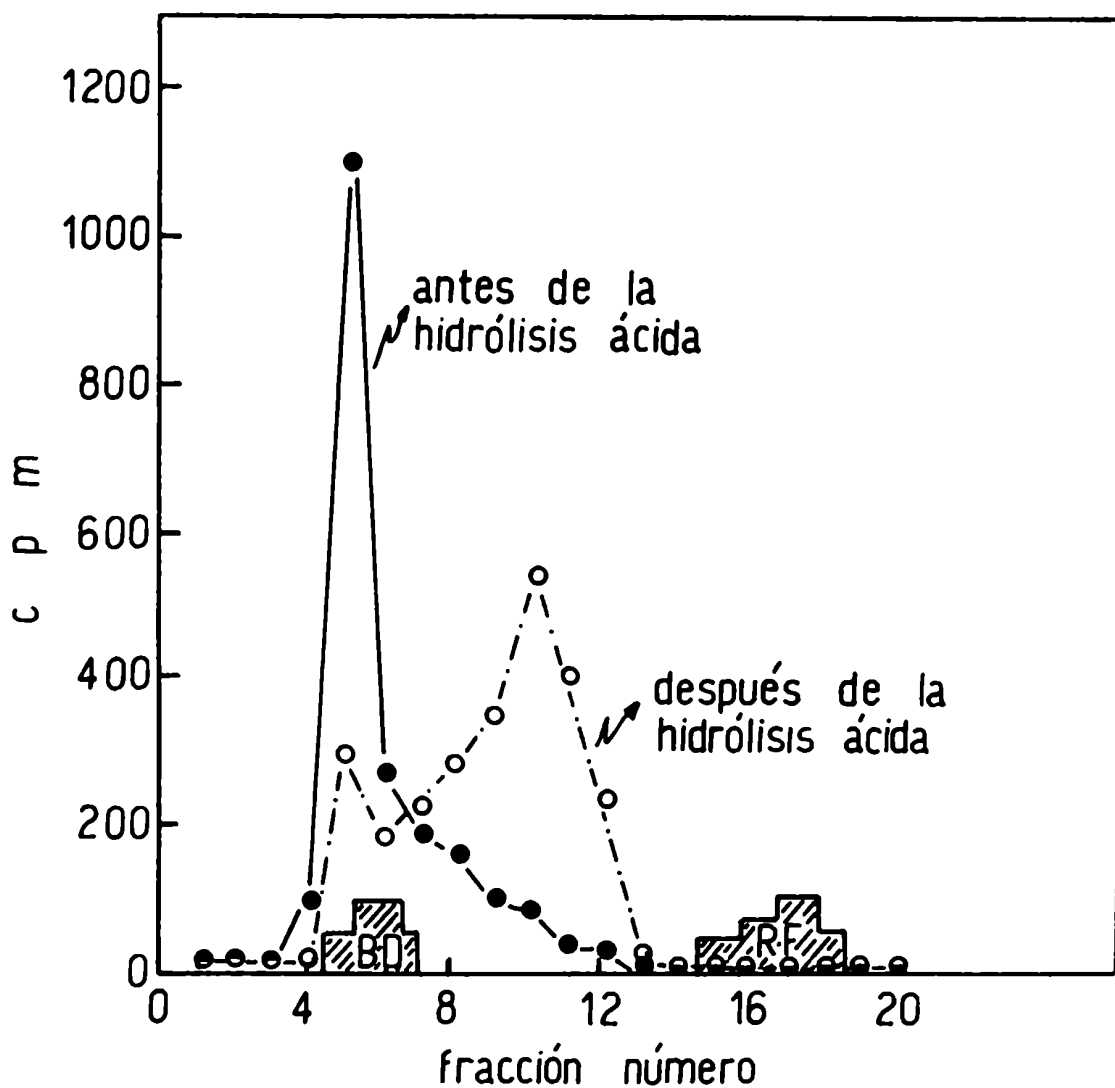


Figura 11. Columna de Sephadex G-50. Se realizó una incubación standard con UDP-(¹⁴C)glucosa a 37°C durante 60 min. La reacción se detuvo por el agregado de TCA 10%. El "pptado-TCA" (7.000 cpm), lavado y seco se disolvió en 0.2 ml de urea 8 M y se cromatografió en Sephadex G-50 equilibrada con formiato de amonio 0.1M. Otro "pptado-TCA" se sometió a hidrólisis ácida (HCl 0.1N, 100°C, 10 min). El sobrenadante, lavado con eter y evaporado a sequedad, se disolvió en 0.2 ml de formiato de amonio 0.1 M y se pasó por la misma columna.

3.3. Preparación del extracto enzimático.

Dado que el glucógeno inhibía la síntesis del proteoglicano (Tabla VI), se buscaron condiciones de cultivo de *Escherichia coli* en las cuales no se acumulase dicho polisacárido.

3.3.1. Acumulación de glucógeno.

Ribbons y Dawes (1963) al cultivar *Escherichia coli* en el medio A, descrito en materiales y métodos, observaron que la cantidad de glucógeno acumulada, expresada en % de peso seco, era baja y permanecía invariable durante el desarrollo bacteriano. Se intentó entonces reproducir esos resultados. Como puede observarse en la figura 12-A, si bien en tales condiciones el contenido de glucógeno por célula no varió apreciablemente, la cantidad total se incrementó notablemente. Resultados similares se obtuvieron utilizando otro medio rico en compuestos nitrogenados y carente de azúcares (figura 12-B).

Se recurrió entonces al ayuno de las bacterias para favorecer la desaparición de glucógeno. Para ello, una vez que el crecimiento bacteriano llegó a la fase estacionaria, las células se colectaron por centrifugación y luego de lavadas, se las incubó en un medio mínimo sin fuente de carbono. En tales condiciones, si bien el polisacárido disminuyó sensiblemente, no fue posible obtener esferoplastos.

Es interesante destacar, sin embargo, que el complejo en-

zimático que se obtuvo de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, poseía muy poco e incluso muchas veces no contenía glucógeno, capaz de ser detectado por el método del iodo.

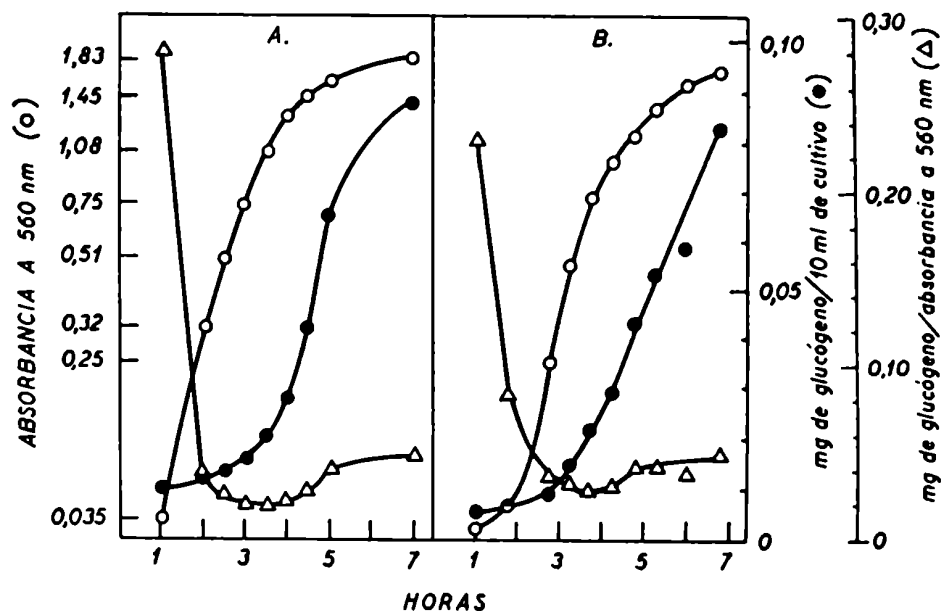


Figura 12. Acumulación de glucógeno en *Escherichia coli* durante el crecimiento. A: medio A; B: medio B. Se procedió de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos.

3.3.2. Actividad del complejo enzimático en distintas etapas del desarrollo bacteriano.

Para investigar la posibilidad de que en alguna fase del crecimiento, pudiera observarse alguna diferencia entre las actividades de incorporación de glucosas a la proteína y la de incorporación de glucosas al glucógeno, se hizo una curva de crecimiento de *Escherichia coli*, tomándose alícuotas en distintas etapas del desa-

rollo. Luego de obtener los esferoplastos y preparar el extracto enzimático, como se indicó en materiales y métodos, se determinó la actividad enzimática. Como se observa en las Tablas IX y X, el nivel de las actividades tanto de transferencia de glucosas al glucógeno como de la síntesis del proteoglicano, en los extractos celulares obtenidos en diferentes etapas del desarrollo, aumentó durante el crecimiento bacteriano.

Tabla IX: Actividades de las transglucosilasas en diferentes etapas del crecimiento bacteriano, utilizando el medio de cultivo A.

Etapa del desarrollo (Absorbancia a 560 nm)	Sustrato	Incorporación de (^{14}C) glucosas a	
		Proteína $\mu\text{moles/mg proteína en}$ 60 min	Glucógeno 30 min
0.320	UDP-(^{14}C) glucosa	0.028	0.003
	ADP-(^{14}C) glucosa	0.168	0.350
1.454	UDP-(^{14}C) glucosa	0.720	0.040
	ADP-(^{14}C) glucosa	2.200	2.300
1.607	UDP-(^{14}C) glucosa	0.750	0.040
	ADP-(^{14}C) glucosa	2.300	2.300

Cuando las bacterias cultivadas aeróbicamente en el medio A, alcanzaron los valores de absorbancia indicados, inmediatamente se cosechó una porción apropiada del cultivo. Se preparó el extracto enzimático como se describió en materiales y métodos. Posteriormente se determinaron las actividades enzimáticas, según el método B o C, ya sea que a la mezcla de incubación se le agregase o no, 1 mg de glucógeno. Las incubaciones para la medida de la actividad enzimática se realizaron a 30°C.

Tabla X: Actividades de las transglucosilasas en diferentes etapas del desarrollo bacteriano, utilizando el medio de cultivo B.

Etapa del desarrollo (Absorbancia a 560 nm)	Sustrato	Incorporación de (^{14}C) glucosas a	
		Proteína $\mu\text{moles/mg proteína en}$ 60 min	Glucógeno 30 min
0.570	UDP-(^{14}C) glucosa	0.11	0.005
	ADP-(^{14}C) glucosa	0.70	1.200
1.140	UDP-(^{14}C) glucosa	0.25	0.020
	ADP-(^{14}C) glucosa	1.02	1.600
1.600	UDP-(^{14}C) glucosa	0.78	0.030
	ADP-(^{14}C) glucosa	3.00	2.600

Se procedió en forma análoga a lo descrito en Tabla IX.

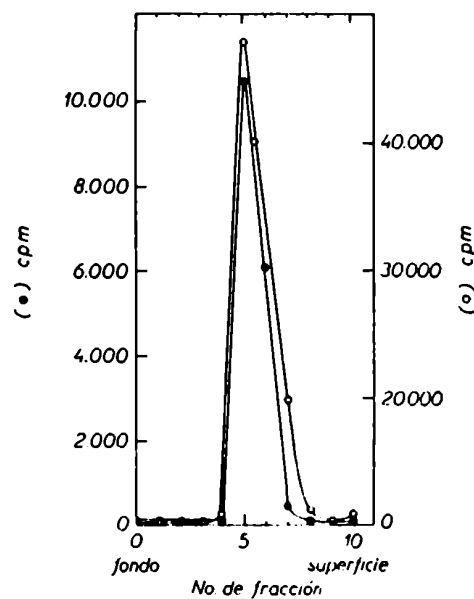
Habiendo observado que el medio de cultivo no influía en el nivel de las actividades enzimáticas, y dado que en el laboratorio, en esos momentos, había escasez de triptone, la preparación rutinaria de esferoplastos se realizó con células crecidas en el medio B, cosechadas al final del período logarítmico.

3.3.3. Localización.

Dado que se trataba de una fracción de membranas crudas (Spencer y Guest, 1974), se intentó purificar más el sistema, sometiendo a un gradiente discontinuo de sacarosa (gradiente A) según se describió en materiales y métodos.

En la zona correspondiente al 30% del gradiente de saca-

rosa se recuperó la máxima actividad de transferencia de glucosa a la proteína (figura 13). La actividad correspondiente a la transferencia de glucosas al glucógeno, también se superpuso en misma zona del gradiente (datos no mostrados).



.Figura 13. Centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. Se procedió de acuerdo al método A, descrito en materiales y métodos (sección 2.4.4).

●-●-●: radioactividad incorporada a la proteína a partir de UDP-(^{14}C)glucosa.
 o-o-o: radioactividad incorporada a la proteína a partir de ADP-(^{14}C)glucosa.
 La fracción precipitable por TCA se midió por el método B.

Cuando se purificó por gradiente discontinuo de sacarosa una fracción de membranas crudas de *Escherichia coli* (Miura y Mizushima, 1968) o de *Salmonella typhimurium* (Osborn y col, 1972), la membranas citoplasmáticas se recuperaron en la zona correspondiente al 30-35% de sacarosa, mientras que las membranas externas se aislaron de la zona correspondiente al 45-50% de sacarosa.

Por lo tanto, el perfil obtenido (figura 13) indicó una posible asociación del complejo enzimático con la fracción de membranas citoplasmáticas.

En algunas ocasiones, cuando la preparación enzimática estuvo contaminada con glucógeno, fue posible separar el complejo enzimático del polisacárido, mediante la centrifugación en gradiente. El glucógeno sedimentó en el fondo del tubo como una minúscula pastilla semitransparente, junto con parte de la actividad que transfiere glucosas a partir del ADP-glucosa a la proteína y al glucógeno, no detectándose en esta fracción actividad de transferencia a la proteína a partir de UDP-glucosa.

3.4. Propiedades del sistema enzimático.

3.4.1. Efecto del tiempo y de la concentración de proteína sobre el curso de la reacción.

Los primeros experimentos se realizaron con preparaciones enzimáticas "frescas" o recién obtenidas. En la figura 14, se observa la síntesis de la glucoproteína, a partir de ADP-(¹⁴C)-glucosa y UDP-(¹⁴C)glucosa, en función del tiempo. La velocidad de incorporación a la proteína aceptora a partir de ADP-glucosa, fue muy rápida en los primeros cinco minutos, para disminuir luego y hacerse constante hacia los 20 minutos de incubación. En ese tiempo, un 50% de la glucosa del nucleótido-azúcar se transfirió a la proteína. La síntesis del proteoglucano a partir de UDP-glucosa presentó un pequeño período de "lag" (2-3 minutos) pero

posteriormente, la incorporación de (^{14}C)glucosas fue prácticamente lineal.

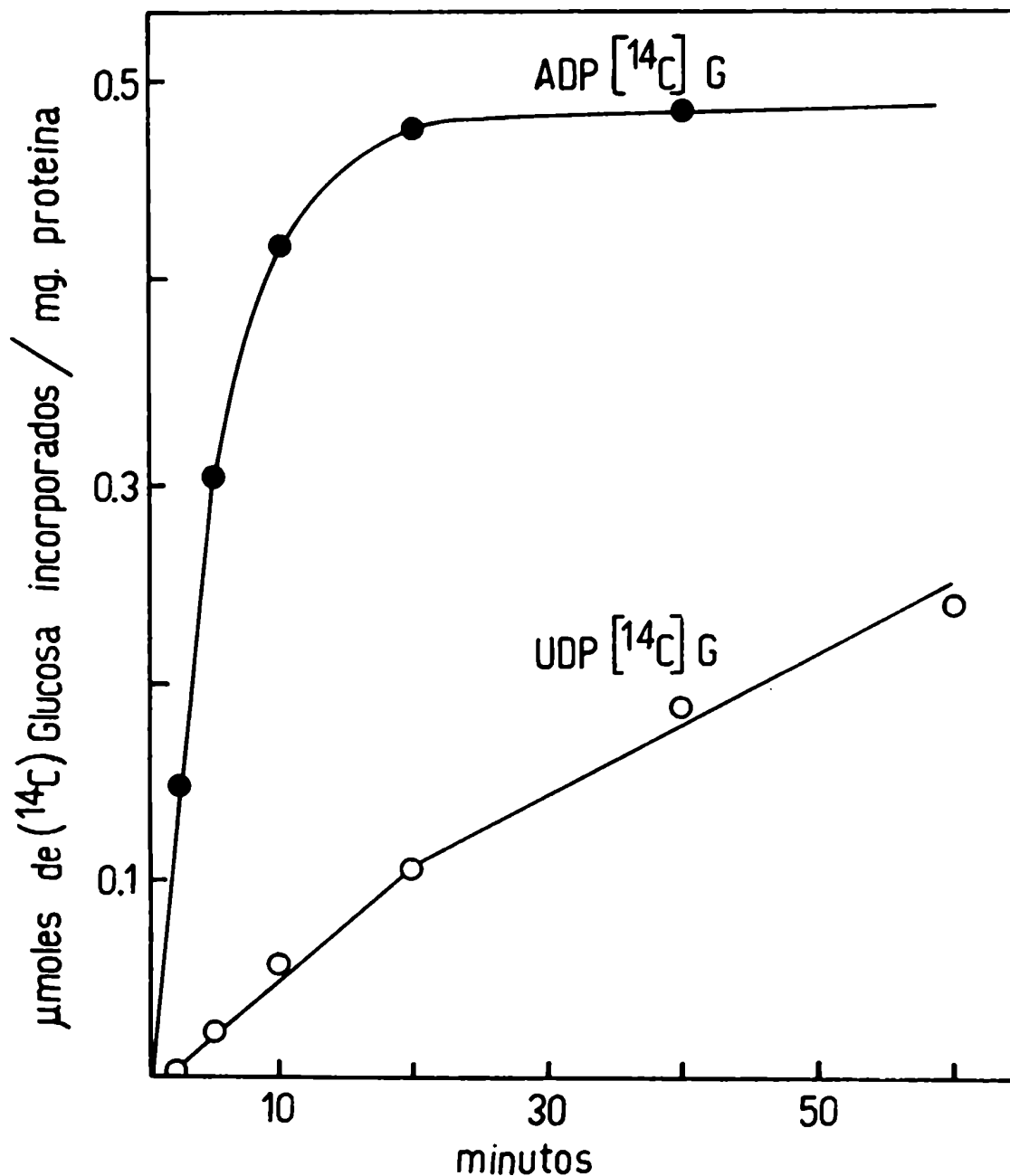


Figura 14. Relación entre la actividad enzimática y el tiempo. El procedimiento experimental se realizó como se explicó en materiales y métodos. La mezcla de incubación contenía 130 μg de proteína, y se incubó a 30°C . Se midió la incorporación de radioactividad a la fracción precipitable por TCA, según el método B. Sustrato: ADP-(^{14}C)glucosa (●-●-●), UDP-(^{14}C)glucosa (o-o-o).

En la figura 15, se aprecia el efecto de la concentración de enzima sobre la incorporación de glucosas al aceptor proteico. Puede observarse que la incorporación de glucosas tanto a partir de UDP-(^{14}C)glucosa como de ADP-(^{14}C)glucosa, en función de la concentración de proteína sigue una curva sigmoideal. En ambos casos, la linealidad sólo se observa entre 100 y 400 μg de proteína.

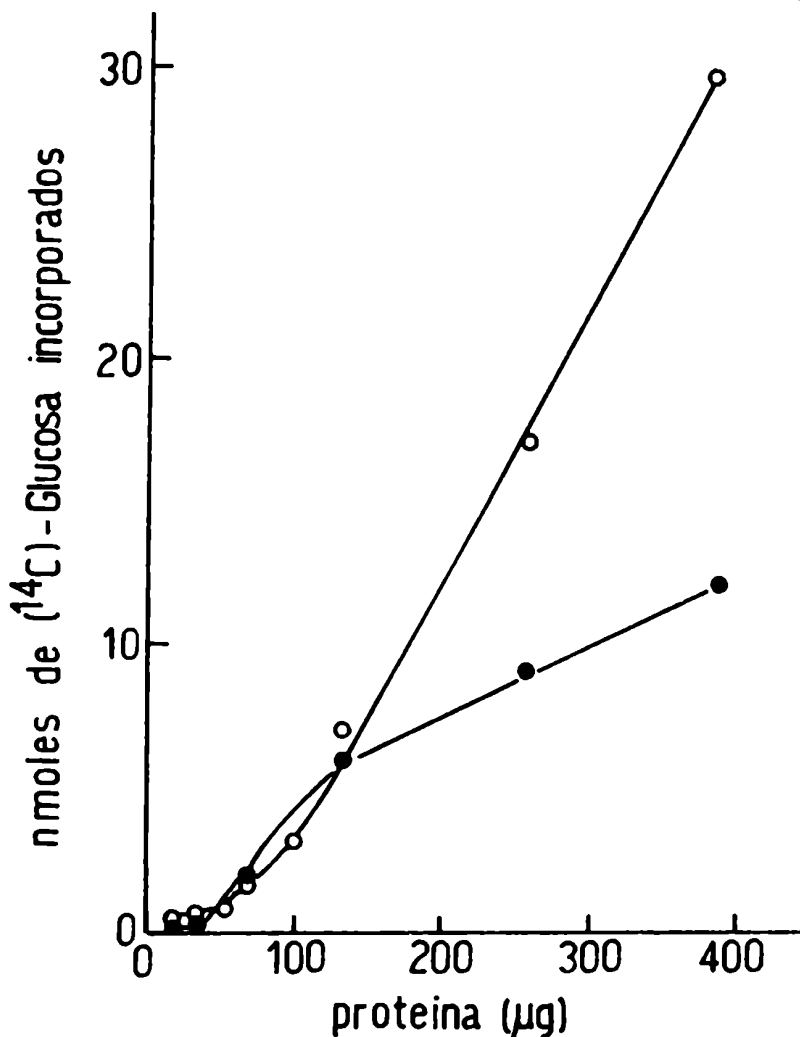


Figura 15. Efecto de la concentración de enzima en el curso de la reacción. El procedimiento experimental se realizó como se explicó en materiales y métodos. La reacción se llevó a cabo a 30°C . El tiempo de incubación fue de 2 min. con ADP-glucosa y de 10 min. con UDP-glucosa. Para medir la incorporación a la fracción precipitable por TCA, se utilizó el medio B.
 o-o-: con ADP-(^{14}C)glucosa; ●-●-: con UDP-(^{14}C)glucosa.

3.4.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

Con ambos sustratos, la temperatura óptima para la incorporación de (^{14}C)glucosas al aceptor proteico fue de 30°C (figura 16). Sin embargo, en los casos en que la preparación enzimática estuvo ligeramente contaminada con glucógeno, la temperatura óptima fue de 37°C .

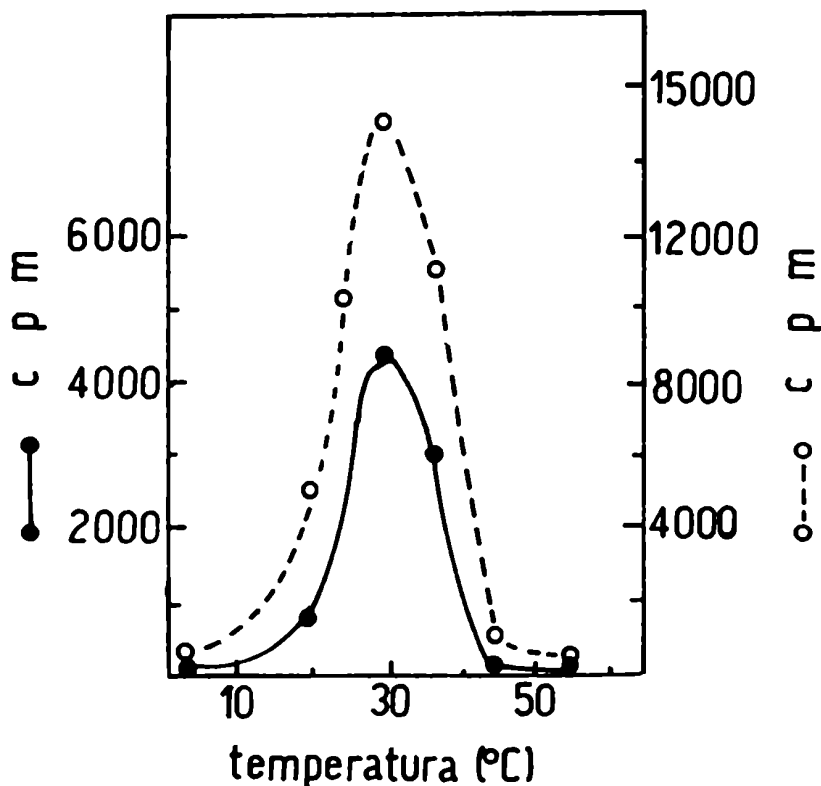


Figura 16. Temperatura óptima para la formación del proteoglucano. Condiciones standard ya descritas, excepto que el tiempo de incubación fue de 10 min. con ADP-glucosa (o-o-o) y de 20 min. con UDP-glucosa (●-●-●). Los incubados se procesaron según el método B.-

3.4.3. Estabilidad del complejo enzimático al calentamiento.

Tabla XI: Efecto de la pre-incubación a diferentes temperaturas sobre la actividad del complejo enzimático.

Temperatura (°C)	% de radioactividad incorporada al "pptado-TCA" a partir de	
	UDP-(¹⁴ C)glucosa	ADP-(¹⁴ C)glucosa
I. 4	96	103
20	98	101
30	100	100
37	86	95
45	4.1	28
55	1.3	0.7
II. 4	98	110
20	101	110
30	100	100
37	90	67
45	1.2	1.9
55	1.0	0.7

I. El complejo enzimático se pre-incubó 15 min a las temperaturas indicadas, luego se enfrió y se agregaron los demás componentes de la mezcla de incubación. Posteriormente se ensayó la actividad a 30°C, a partir de UDP-(¹⁴C)glucosa (60 min) y de ADP-(¹⁴C)glucosa (10 min). Los incubados se procesaron según el método B.

II. Todos los componentes de la mezcla de reacción standard, con excepción del nucleótido-azúcar se pre-incubaron 15 min a las temperaturas indicadas. Se enfrió y una vez agregado el nucleótido-azúcar radioactivo correspondiente, se ensayó la actividad a 30°C, en forma análoga a lo realizado en I.

La pre-incubación a 30°C durante períodos largos, inactivó el sistema. Como se observa en la Tabla XI, la pre-incubación

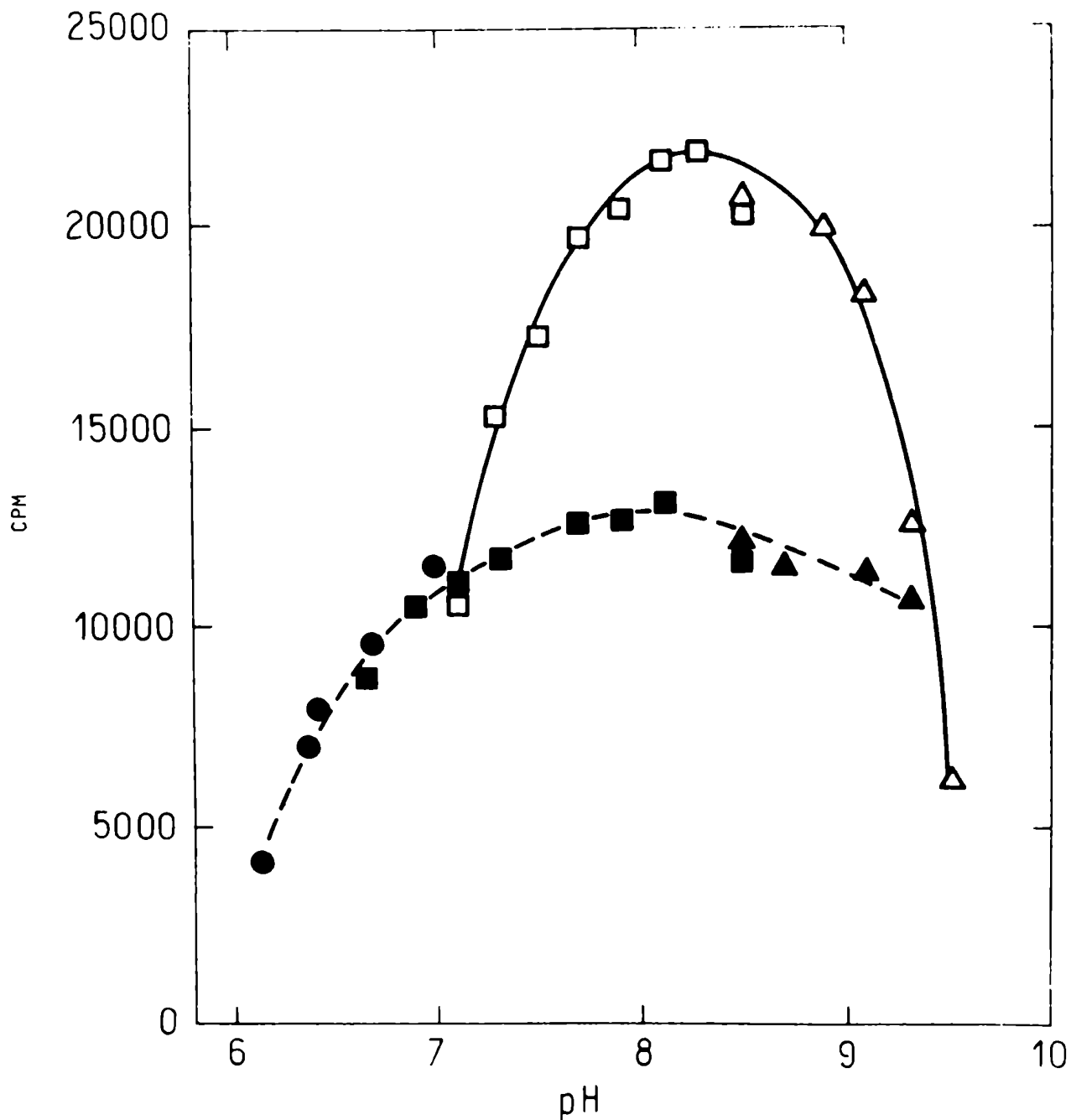


Figura 17. Curva de actividad en función del pH. La actividad detectada con UDP-glucosa (—) y con ADP-glucosa (----) se midió en las condiciones de la mezcla de incubación standard, pero utilizando buffers de diferente pH: glicil-glicina (□,■); glicina-NaOH (△,▲); imidazol-HCl (●-●). La reacción se llevó a cabo a 30°C y la incorporación de radioactividad se midió según el método B.

durante 15 minutos a 4°C, 20°C y 30°C no afectó el complejo enzimático, recuperándose, cuando posteriormente se la ensayó a 30°C, una actividad del 100%. Con el calentamiento a 37°C durante 15 minutos, se comenzó a notar una pequeña pérdida de actividad y a 45°C, ésta se perdió totalmente.

El agregado de los componentes de la reacción standard, no contribuyeron mayormente a la estabilización del sistema.

3.4.4. Efecto del pH.

En la figura 17, se observa la cinética de incorporación de glucosa radioactiva a la fracción precipitable por TCA en función del pH.

Con UDP-(¹⁴C)glucosa, el máximo de actividad se obtuvo a pH 8.3, con una disminución del 50% a pH 7.2 y 9.2

Con ADP-(¹⁴C)glucosa, en cambio, la enzima fue activa en un rango amplio de pH, de 6.0 a 9.0 .

3.4.5. Presencia de una actividad degradante en el extracto enzimático.

La figura 18 muestra los resultados de la radioactividad incorporada al proteoglucano en función del tiempo. Puede observarse que mientras con UDP-(¹⁴C)glucosa, aquélla aumentó constantemente, con ADP-(¹⁴C)glucosa no sucedió lo mismo: la incorporación llegó a un máximo a los 5-10 minutos, para luego declinar. Este resultado, observado con relativa frecuencia, sugirió la presencia

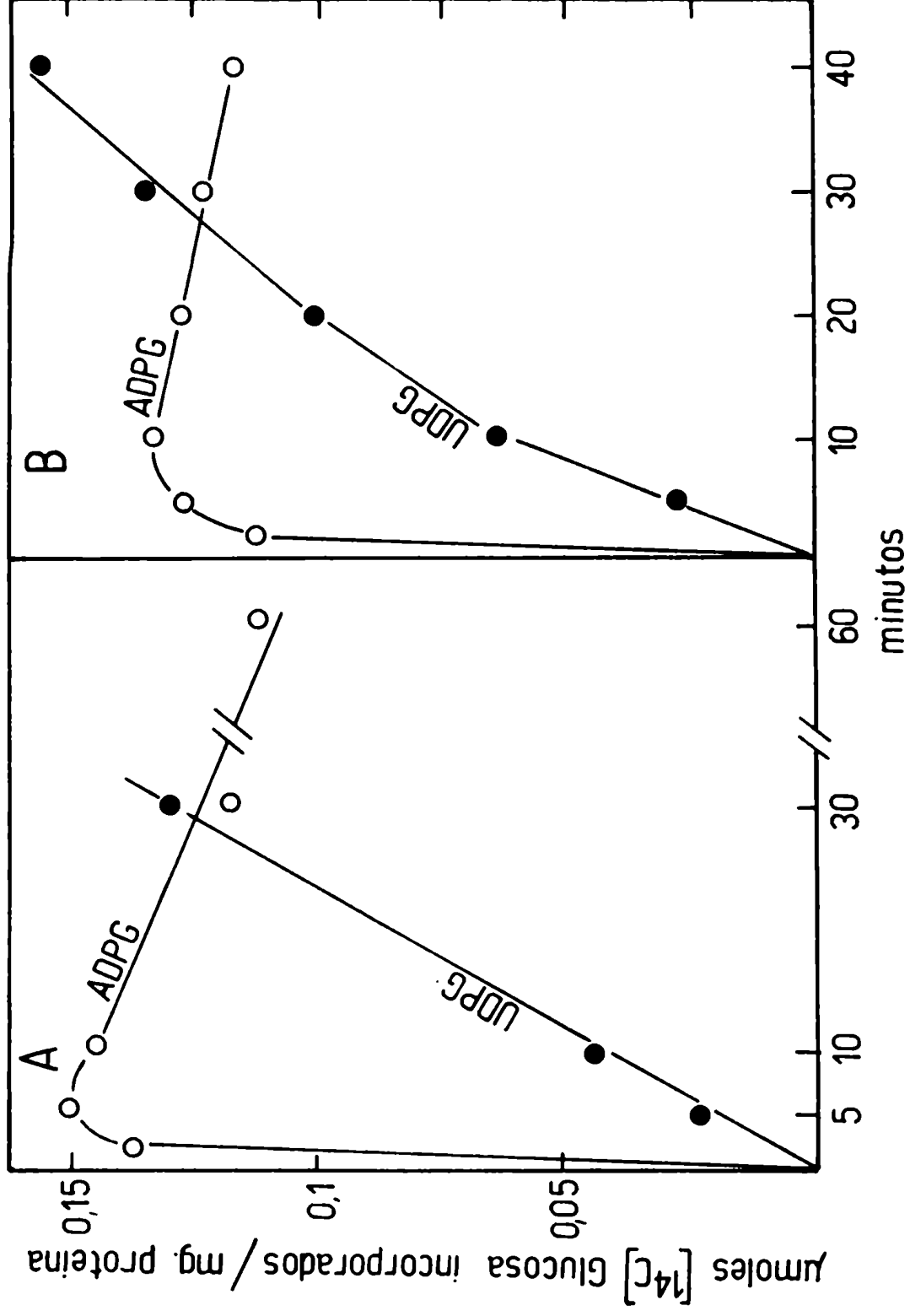


Figura 18. Incorporación de la radioactividad a la fracción precipitable por TCA a partir de $\text{ADP-}(^{14}\text{C})$ -glucosa (o-o-o) y $\text{UDP-}(^{14}\text{C})$ glucosa (●-●-●). Condiciones standard, se incubó a 30°C y la radioactividad se midió según el método B. A y B: distintas preparaciones enzimáticas.

de una actividad degradante.

Mayores evidencias se obtuvieron cuando el producto de la incubación con ADP-(^{14}C)glucosa y UDP-(^{14}C)glucosa, se analizó por cromatografía en Sephadex G-50. Como se observa en la figura 19, el producto radioactivo fue excluído de la misma, indicando asociación a una macromolécula. Analizando inmediatamente las diferentes fracciones se vio que las cuentas precipitables por TCA coincidían con la radioactividad total excluída. Sin embargo, tal coincidencia desapareció cuando la medida de la radioactividad se realizó al cabo de 1 o 5 horas después de la elución y manteniendo las fracciones a 4°C .

En la misma figura se puede observar que al cabo de 1 hora, por ejemplo, la radioactividad precipitable por TCA disminuyó un 30%, con UDP-(^{14}C)glucosa, y un 70%, con ADP-(^{14}C)glucosa, respecto de aquéllas analizadas inmediatamente.

Con el objeto de determinar en qué se transformaba la radioactividad soluble, una alícuota de la fracción 6 (figura 19) se analizó por cromatografía en papel. Como puede verse en la figura 20, aquélla consistió en una serie de oligosacáridos que cromatografiaron con la serie de maltosa. Estos mismos compuestos fueron a su vez degradados por β -amilasa y α -amiloglucosidasa a maltosa y glucosa, respectivamente (resultados no presentados).

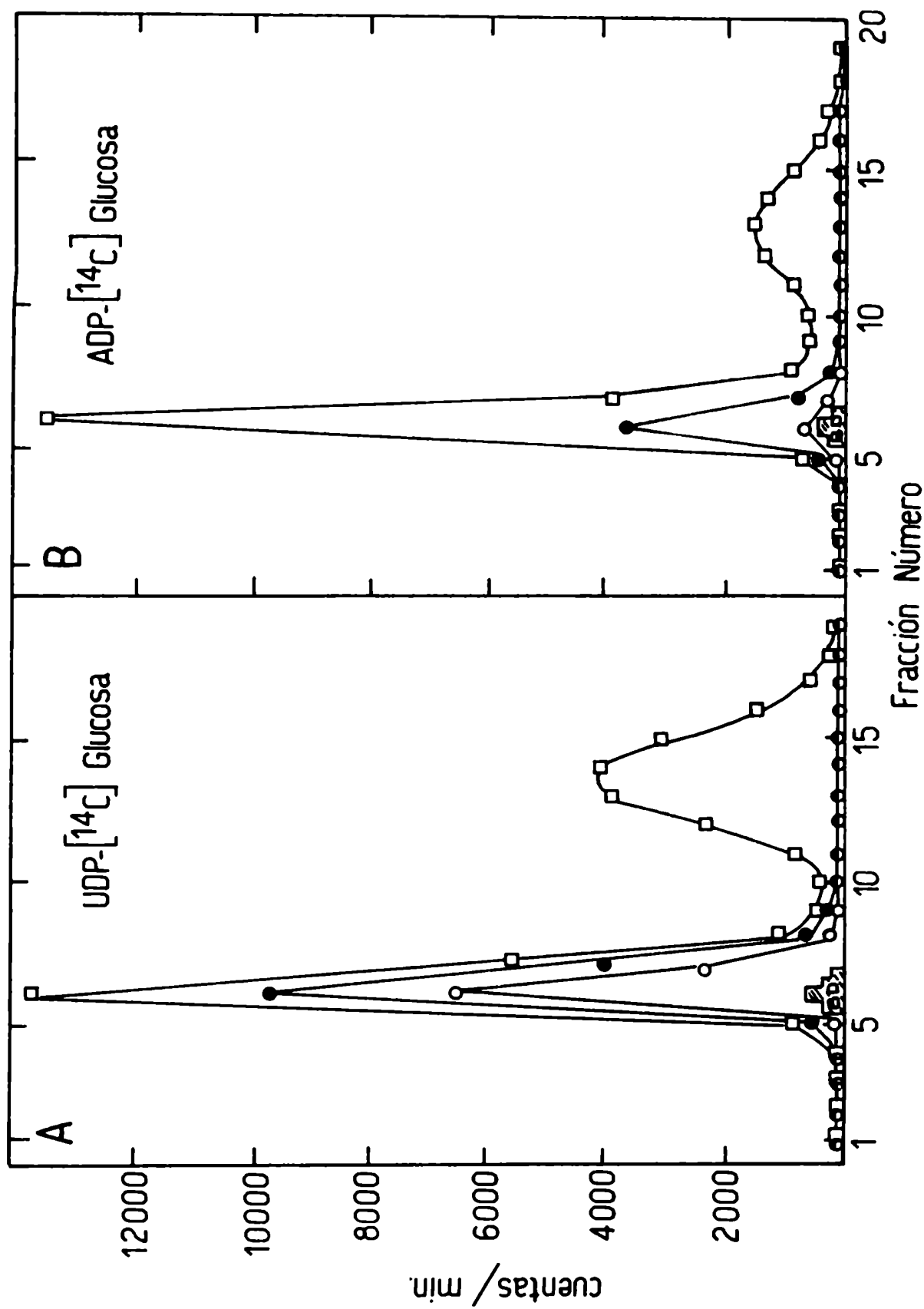


Figura 19. Cromatografía en Sephadex G-50. Se preparó una mezcla de incubación standard, sólo que se utilizaron 0.4 mg de proteína y 2×10^6 cpm de UDP(^{14}C)glucosa (309 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) o ADP(^{14}C)glucosa (228 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). Se incubó 1 h a 37°C y toda la mezcla se pasó por la columna, equilibrada con buffer glicina- NaOH 10 mM (pH 8.7)conteniendo EDTA- Na 10 mM. El proceso se desarrolló a 4°C . Posteriormente, se contó la radioactividad total (\square) y la radioactividad precipitable por TCA (método B). Esta última se determinó a la hora (\bullet) y al cabo de 5 h (\circ) de haber eluido de la columna.

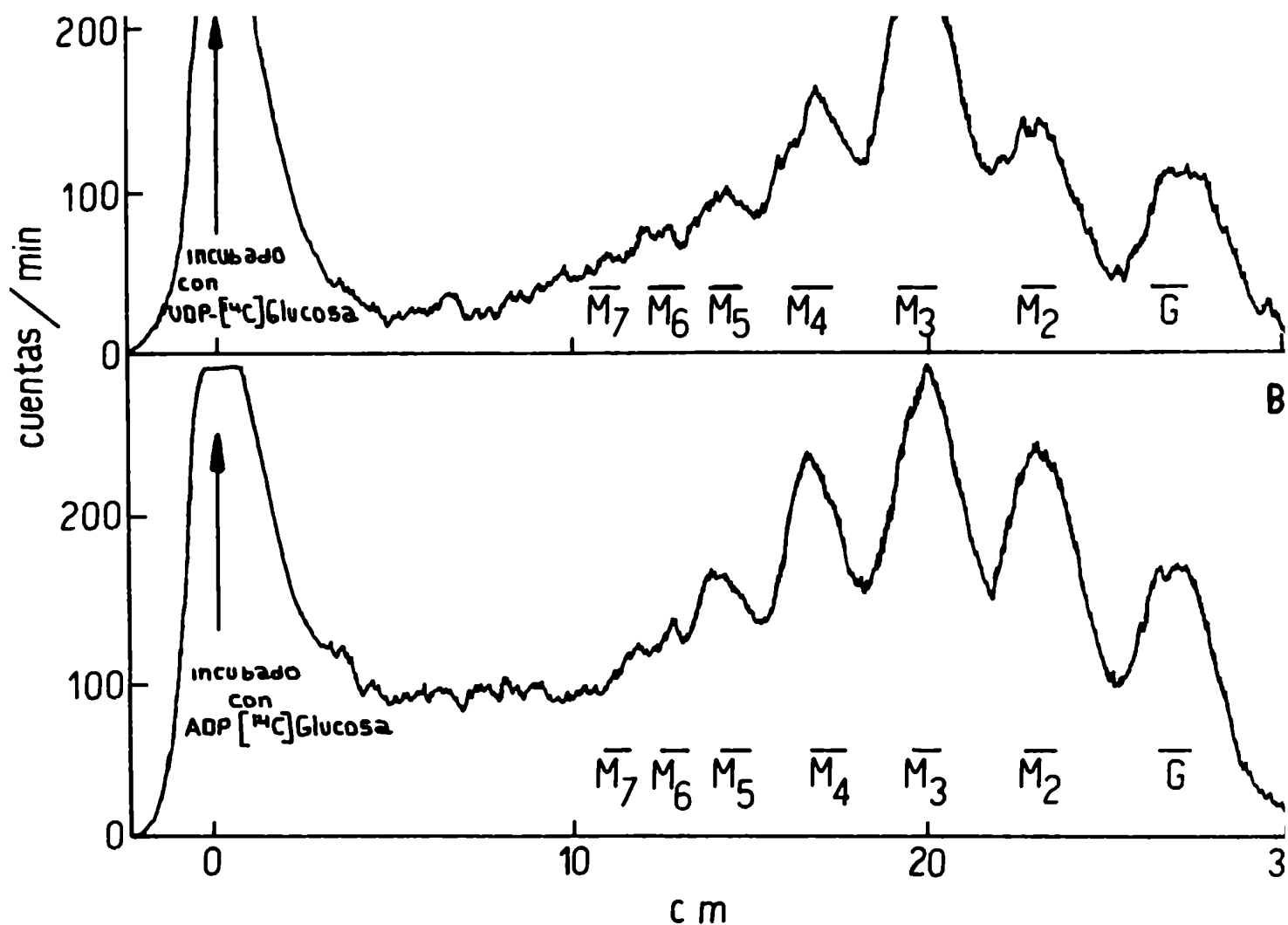


Figura 20. Análisis por cromatografía en papel de la radioactividad soluble en TCA. Después de dejar durante 5 h a 4°C los eluidos de la figura 19, se tomó una alícuota de 40 μ l de la fracción de cada columna de Sephadex G-50 (A y B). Se sembró en papel Whatman N°1 y se cromatografió en butanol:piridina:agua (4:3:4). Se utilizó como standard interno una mezcla de malto-oligosacáridos. G:glucosa, \bar{M}_2 : maltosa; \bar{M}_3 : maltotriosa, etc.

Una confirmación adicional de la presencia de una actividad de tipo amilolítico en el extracto enzimático se obtuvo al incubar éste con glucógeno radioactivo. Los resultados están indicados en la Tabla XII.

Tabla XII: Distribución de radioactividad en cromatografía en papel de los oligosacáridos obtenidos al incubar (^{14}C)glucógeno con el extracto enzimático de Escherichia coli.

Mezcla de reacción	Porcentaje de radioactividad en Origen	Zona de M_7 a G
Sin enzima	100	0
Completo	44	56
Completo + 0.1 μmol de ADP-glucosa frio	16	84

La mezcla de reacción, en un volumen total de 100 μl contenía: 5 mM de DTT; 100 mM de buffer glicina-NaOH (pH 8.7); enzima y (^{14}C)glucógeno (0.1mg y 13.670 cpm). Luego de 3 horas de incubación a 37°C, la mezcla se pasó por una columna de Amberlite MB-3 para eliminar sales. Los eluidos se concentraron y sembraron en papel Whatman N°1, para realizar una cromatografía descendente en butanol:piridina:agua (4:3:4). Las tiras de papel se cortaron en rectángulos de 1 x 2.5 cm y se contaron luego de agregar 3.5 ml de líquido de centelleo.

Como puede observarse, el agregado de ADP-glucosa no radioactivo estimuló la actividad amilolítica, debido probablemente al alargamiento de las cadenas de la molécula de glucógeno.

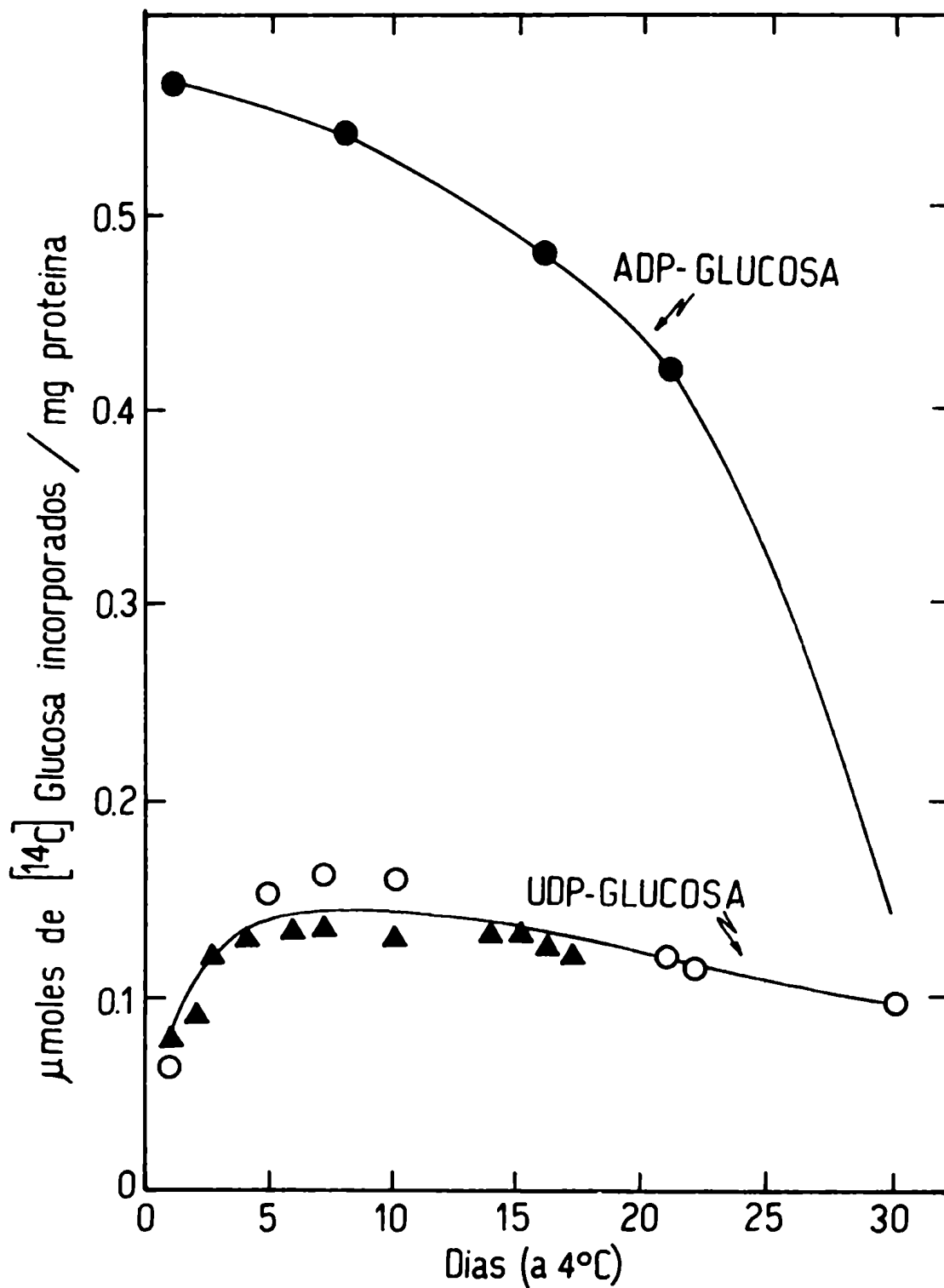


Figura 21. Estabilidad del complejo enzimático durante su conservación a 4°C . La preparación enzimática se conservó a 4°C bajo vapores de tolueno. En diferentes días, se tomaron alícuotas para medir la actividad de transferencia de glucosas a la proteína, con ADP- $[^{14}\text{C}]$ glucosa (●-●-●) y con UDP- $[^{14}\text{C}]$ glucosa (○-○▲). La mezcla de incubación se realizó como se explicó en materiales y métodos, la reacción se incubó a 30°C durante 20 min, y se midió la radioactividad según el método B.

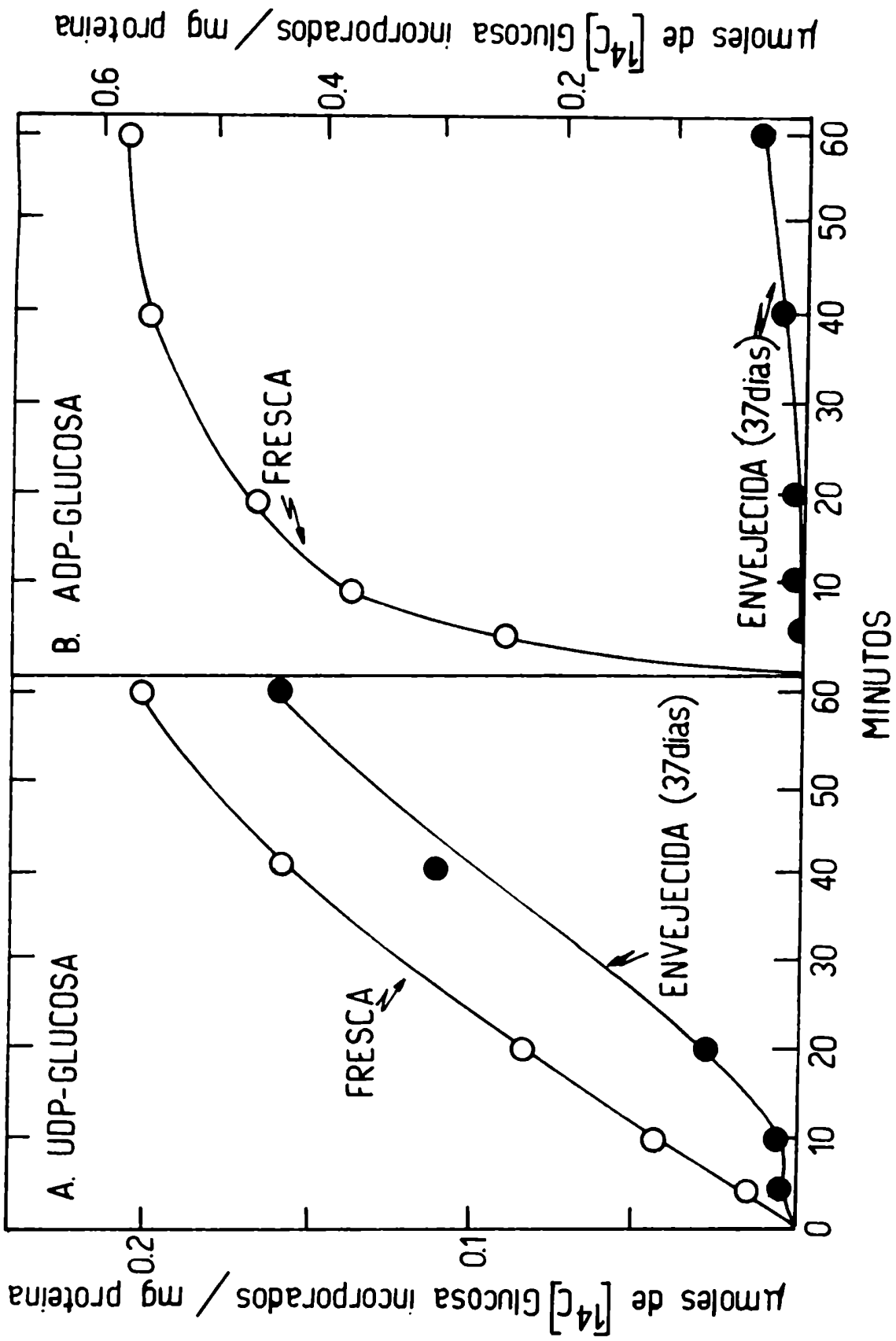
3.5. Envejecimiento del sistema enzimático. Propiedades.

3.5.1. Preparaciones "envejecidas". Sus características.

Accidentalmente se observó que cuando la preparación enzimática de *Escherichia coli* se conservó en heladera a 4°C, bajo vapores de tolueno, la actividad de transferencia a la fracción precipitable por TCA, utilizando UDP-glucosa como sustrato, varió desde un valor inicial bajo hasta un máximo, que se alcanzó aproximadamente a los 6 días, para luego ir disminuyendo lentamente. En cambio, cuando se ensayó la actividad con ADP-glucosa, la misma fue máxima en un extracto recién preparado, disminuyendo rápidamente en función del tiempo de permanencia a 4°C. Estos resultados se pueden apreciar en la figura 21.

En base a las variaciones observadas, se definió como preparación "fresca" a la preparación enzimática recién obtenida y preparación "envejecida", a aquélla que permaneció un mínimo de 15 días a 4°C bajo vapores de tolueno.

Posteriormente, se comparó la actividad de transferencia de glucosas al aceptor proteico en función del tiempo, de ambas preparaciones, a partir de ambos nucleótidos de (^{14}C)glucosa. En la figura 22-A, se observa que con UDP-glucosa, si bien ambas actividades presentaron un período de "lag", este fue mayor en la preparación "envejecida". En la figura 22-B, se puede apreciar que con ADP-glucosa, la enzima "fresca" mostró una rápida incorporación en función del tiempo. En cambio, en la preparación envej



cida", la actividad detectada fue mínima en el tiempo considerado. Sin embargo, cuando el tiempo de incubación se prolongó por un tiempo más largo (2-3 horas), se observó una incorporación creciente de glucosas a la fracción precipitable por TCA, que alcanzó los valores de una preparación recién obtenida (datos no mostrados). Con preparaciones menos envejecidas, se pudo observar claramente la aparición de "lag" (figura 28-D).

3.5.2. Degradación del glucógeno endógeno.

Se ha comentado, en la sección 3.3, que el complejo enzimático obtenido poseía muy poco e incluso muchas veces no contenía glucógeno capaz de ser detectado por el método de Krisman (1962). Además, como puede observarse en la figura 23, esa pequeña cantidad de glucógeno, presente en el extracto "fresco", es degradado durante el período de almacenamiento.

Si bien no hubo forma de medir la cantidad de proteoglucano existente en la preparación enzimática "fresca", dado que tanto el glucógeno como la glucoproteína poseen uniones glucosídicas α -1,4, es correcto pensar que también el glucano unido a proteína se degradó durante el almacenamiento a 4°C. Una evidencia de esto está dada por los datos presentados en la Tabla XIII. Los resultados sugieren que, en la preparación "fresca" existe un glucano α -1,4 unido a proteína, y por lo tanto precipitable por TCA, el que fue utilizado como aceptor de glucosas por el complejo enzimático "envejecido".

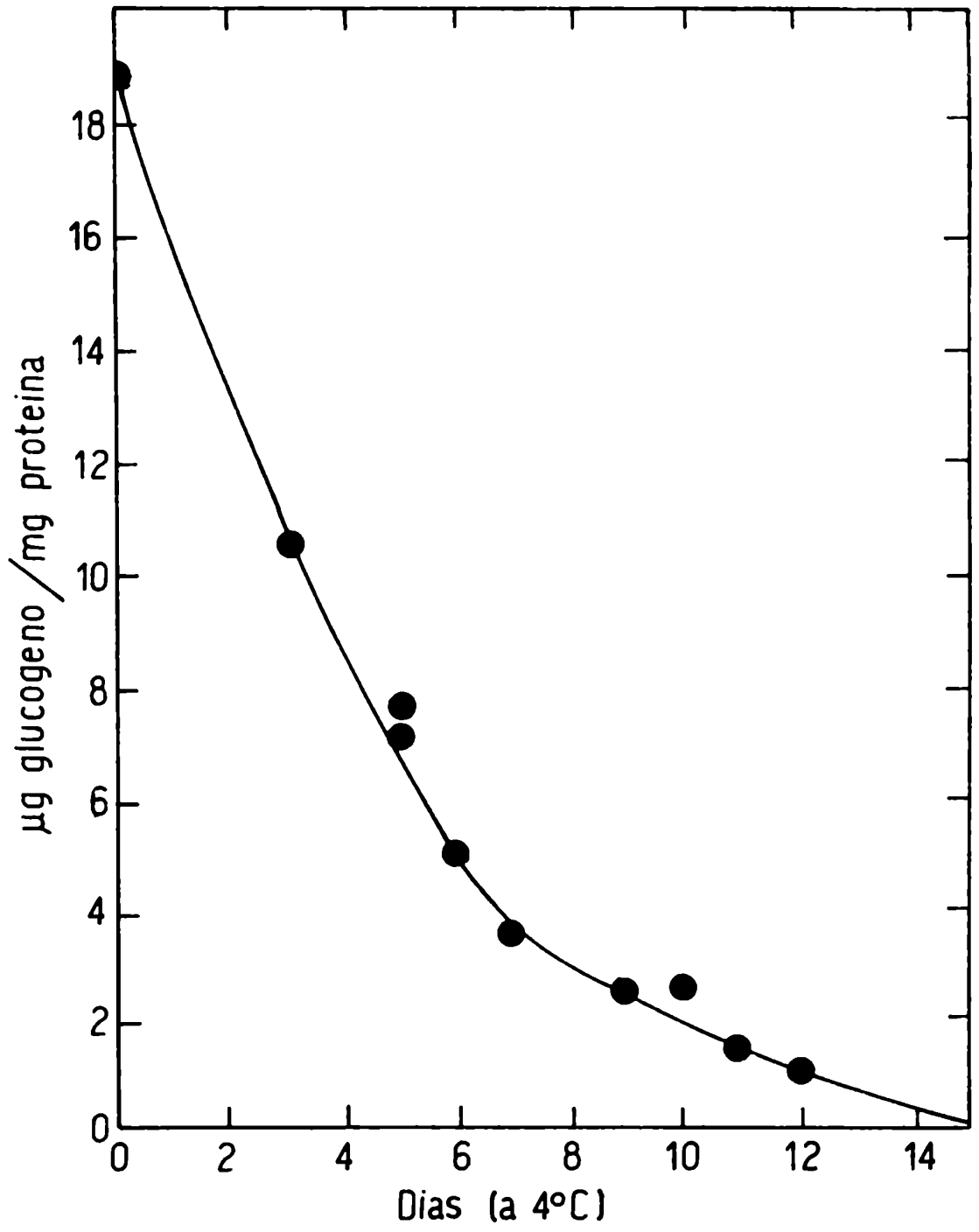


Figura 23. Disminución del glucógeno endógeno en función del almacenamiento a 4°C del complejo enzimático. La determinación del glucógeno endógeno se realizó como se explicó en materiales y métodos.

Tabla XIII: Efecto del extracto enzimático "fresco" inactivado por calor sobre la actividad de una preparación enzimática "envejecida".

Enzima	cpm de (^{14}C)glucosa incorporados a partir de ADP-glucosa	UDP-glucosa
Fresca	38.200	12.521
Envejecida	4.192	14.037
Fresca Ø 100°C	160	98
Envejecida + Fresca Ø 100°C	34.605	7.752
Envejecida + Envejecida Ø 100°C	4.428	14.000

La mezcla de reacción standard se incubó a 30°C, durante 60 min con UDP-(^{14}C)-glucosa, y 15 min con ADP-(^{14}C)glucosa. La fracción precipitable por TCA se midió según el método B, descrito en materiales y métodos.

3.5.3. Estabilidad del complejo enzimático.

Estudios sobre la estabilidad del complejo enzimático, demostraron que la actividad de incorporación con UDP-(^{14}C)glucosa a la fracción precipitable por TCA, comienza a disminuir a partir de los 30 días de su conservación a -20°C. En cambio, la actividad medida con ADP-(^{14}C)glucosa, es mucho más estable, ya que se conservó durante dos meses, inclusive luego de ciclos de congelamiento y descongelamiento (Tabla XIV-A).

Por otra parte, en la preparación "envejecida" y congelada, se observó una inversión de la estabilidad. El complejo enzimático retuvo sólo un 30% de su actividad original con ADP-glu-

cosa luego de 9 días de permanencia a -20°C . En iguales condiciones, la actividad con UDP-glucosa, fue de un 60% respecto de la original (Tabla XIV-B).

Tabla XIV: Estabilidad del complejo enzimático.

Condiciones de almacenamiento	Incorporación al "pptado-TCA" a partir de UDP-glucosa	ADP-glucosa (actividad relativa)
A. Preparación "fresca".		
Fresca	100	100
Congelada a -20°C , 10 días	91	100
Congelada a -20°C , 30 días	85	96
Congelada a -20°C , 60 días	57	84
Congelada a -20°C , 60 días y 3 ciclos de congel. y descongel.	45	82
B. Preparación "envejecida" (*).		
17 días a 4°C	100	100
17 días a 4°C , congelada 2 días	100	80
17 días a 4°C , congelada 9 días	65	30

(*). La preparación enzimática se conservó a 4°C bajo vapores de tolueno, y cuando se congeló, fue a una temperatura de -20°C .

La mezcla de reacción standard se incubó a 30°C , y la fracción precipitable por TCA se midió según el método B, descripto en materiales y métodos.

3.5.4. Efecto salino.

Un estudio comparativo del efecto de diferentes sales sobre la actividad con UDP-glucosa y ADP-glucosa utilizando extrac-

tos envejecidos, se muestra en la Tabla XV. Arbitrariamente se dio un valor de 100% a la actividad con cada sustrato, cuando la preparación se ensayó en presencia de 50 mM de EDTA-Na. Al omitir este compuesto o al reemplazarlo por 100 mM de KCl, NaCl, NaF o $MnCl_2$ muy poca incorporación pudo detectarse a la fracción precipitable por TCA. Otras sales tuvieron un efecto claramente diferente sobre las dos actividades. Así, mientras el $MgCl_2$ fue un 50% más activo que el EDTA-Na con ADP-glucosa como sustrato, cuando se ensayó con UDP-glucosa ese valor fue de apenas 2% respecto de mismo compuesto. Efectos similares se ven cuando se compara la acción de los iones $SO_4^{=}$.

Un comentario aparte merece el efecto del molibdato de amonio sobre la reacción. Cuando la actividad se midió en ausencia de EDTA, en ambos casos, el molibdato no lo pudo reemplazar. Pero cuando el ensayo se realizó agregando conjuntamente molibdato y EDTA, la reacción de incorporación de glucosas a la proteína con UDP-glucosa se inhibió, mientras que aumentó 9 veces en los incubados con ADP-glucosa.

Del análisis de estos resultados, surgió así la posibilidad de que el complejo enzimático estuviera constituido por lo menos por tres actividades enzimáticas diferentes, y no dos como se sugirió en un principio. Dos de ellas intervendrían en la transferencia de glucosas al aceptor proteico, a partir de UDP-glucosa y de ADP-glucosa, respectivamente. La tercera actividad sería la de la glucógeno-sintetasa, ya conocida, que alarga las

cadena del glucógeno.

Tabla XV: Efecto de distintas sales sobre la actividad enzimática de un extracto envejecido.

Compuesto agregado	Concentración	Actividad relativa de incorporación de (¹⁴ C)glucosas al "pntado-TCA" a partir de	
		UDP-(¹⁴ C)glucosa	ADP-(¹⁴ C)-glucosa %
-----	-----	0.35	1.53
EDTA	50 mM	100	100
EDTA	100 mM	37	78
MgCl ₂	100 mM	1.6	149
MnCl ₂	100 mM	0	3.0
Na ₂ SO ₄	100 mM	18.5	400
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM	29.5	200
NaF	100 mM	2.8	4
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	10 mM	2.9	29
[EDTA	50 mM]	42.7	880
[(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	10 mM]		
NaCl	100 mM	1.5	0.2
KCl	100 mM	4.2	0.2

El ensayo se realizó preparando una serie de tubos con la mezcla de reacción standard, reemplazando el EDTA-Na 50 mM por las sales indicadas en la Tabla. La incubación se llevó a cabo a 30°C, durante 20 min con UDP-glucosa y durante 5 min con ADP-glucosa. Se midió la fracción precipitable por TCA, según el método B, descrito en materiales y métodos.

3.5.5. Estudio comparativo del efecto del molibdato.

En un principio, se utilizó el molibdato como un posible inhibidor de la enzima degradante (Greenwood y Milne, 1968a), existente en el extracto. Sin embargo, ese interés se vio desviado al observar el efecto causado por esta sal en la transferencia de glucosas del UDP-glucosa o del ADP-glucosa al aceptor proteico. Por lo tanto, se trató de estudiar un poco más dicho efecto.

Como se observa en la figura 24-A, la incorporación de glucosas a partir de ADP-glucosa a la proteína aceptora, cuando utilizó una preparación "fresca", no se vio afectada por la presencia de molibdato en la reacción standard. En cambio, en una preparación "envejecida", el agregado de molibdato a la mezcla de incubación favoreció la desaparición del "lag" que se observa en ausencia de éste (figura 24-B). Así, una enzima "envejecida" en presencia de molibdato, tendría aproximadamente la misma cinética que una preparación "fresca", cuando se utiliza ADP-glucosa como nucleótido-azúcar dador.

Con UDP-glucosa, como dador de restos glucosilos, el efecto del molibdato es totalmente opuesto. Sea que se trate de una preparación "fresca" como de una "envejecida", el molibdato produjo una inhibición de la incorporación de glucosas a la fracción precipitable por TCA (figura 25).

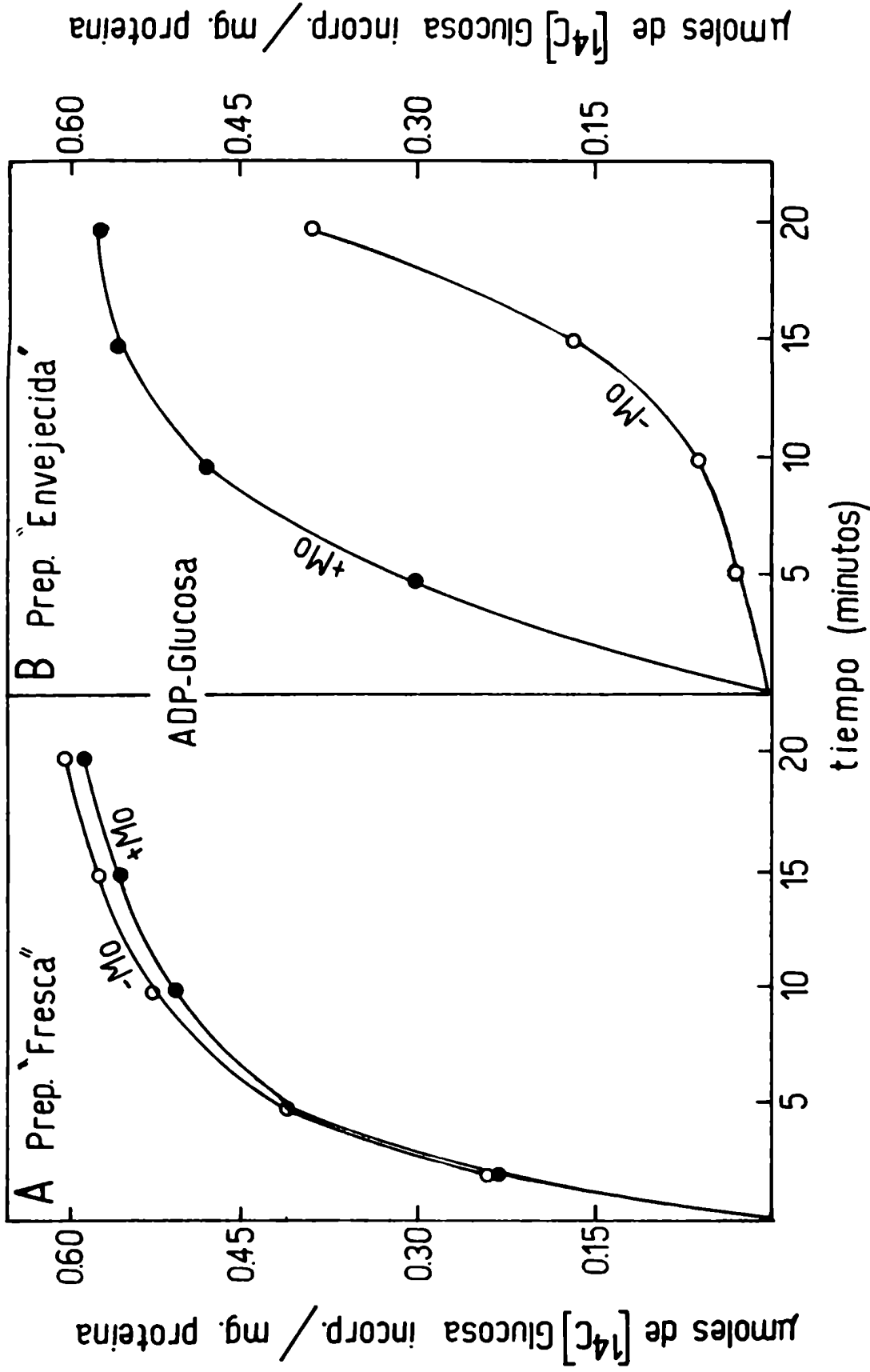


Figura 24. Efecto del molibdato de amonio en la síntesis del proteoglucano a partir de ADP- (^{14}C) -glucosa. Una serie de mezclas de reacción standard se incubaron a 30°C , en ausencia (o-o-o) o en presencia (●-●-●) de molibdato de amonio 10 mM. La radioactividad incorporada al "pptado-TCA" se midió según el método B, descrito en materiales y métodos.

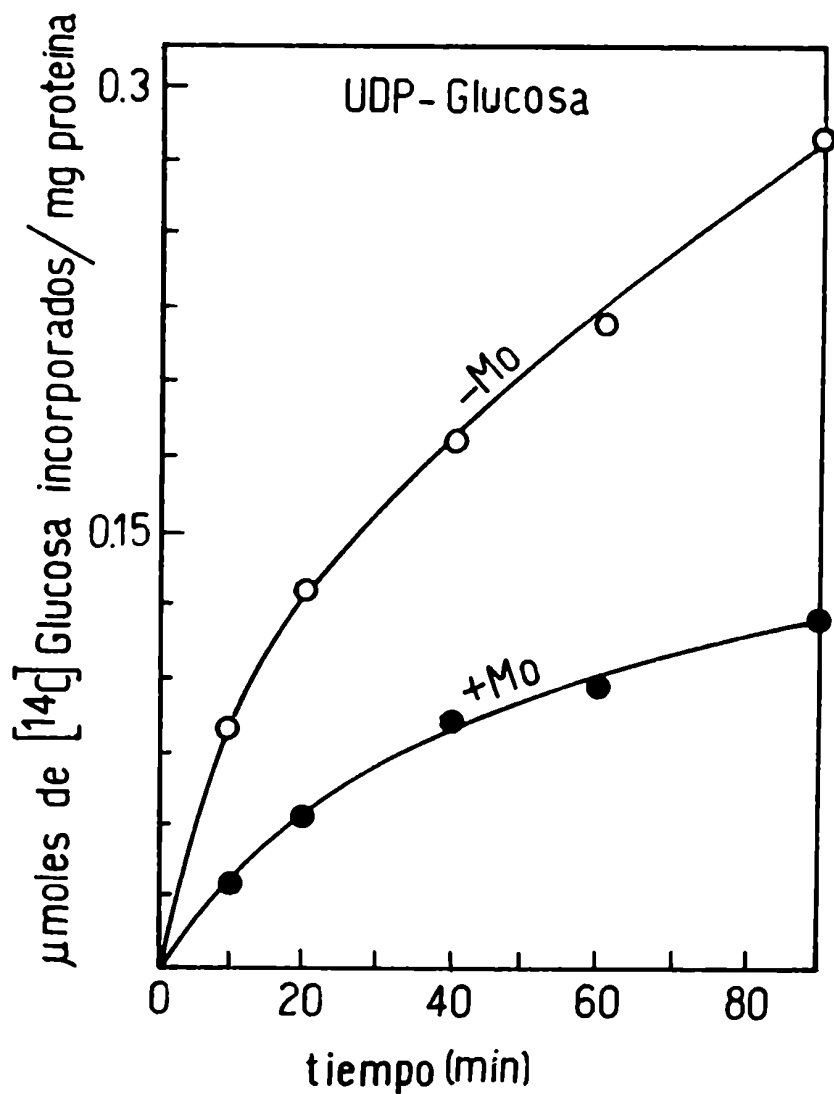


Figura 25. Efecto del molibdato de amonio en la síntesis del proteogluano a partir de UDP- (^{14}C) glucosa. Una serie de mezclas de reacción standard se incubaron a 30°C , en ausencia (o-o-o) o en presencia (●-●-●) de molibdato de amonio 10 mM. La radioactividad incorporada a la fracción precipitable por TCA se midió según el método B, descrito en materiales y métodos.

Se ha mencionado que el agregado de molibdato de amonio 10 mM activó (figura 24-B) o inhibió (figura 25) la incorporación de glucosas al aceptor proteico, a partir de ADP-(^{14}C)glucosa o UDP-(^{14}C)glucosa, respectivamente. Con el objeto de verificar si para esa activación era necesaria la presencia simultánea de EDTA y molibdato, o bien influía el orden de adición de dichos reactivos, se pre-incubó el complejo enzimático "envejecido" con ADP-(^{14}C)glucosa y demás componentes de la mezcla de reacción con excepción de EDTA, en presencia de molibdato de amonio 10 mM. Como puede verse en la figura 26, sólo cuando se agregó EDTA, se pudo medir incorporación de radioactividad a la fracción precipitable por TCA.

Contrariamente, el agregado de EDTA a la mezcla de reacción preincubada con UDP-(^{14}C)glucosa en presencia de molibdato de amonio, en las mismas condiciones anteriores, no ejerció ningún efecto (figura 27). Si bien se sabe que el molibdato acelera la hidrólisis de los fosfatos orgánicos (Weil-Malherbe y Green, 1951) y por lo tanto la inhibición observada podría ser efecto de la eliminación del sustrato del medio, este hecho debe descartarse en este caso dado que con ADP-glucosa se observó una activación.

3.5.6. Efecto de detergentes.

Los resultados de la Tabla XVI muestran el efecto directo de distintos detergentes sobre la actividad enzimática en el caso de una preparación "fresca".

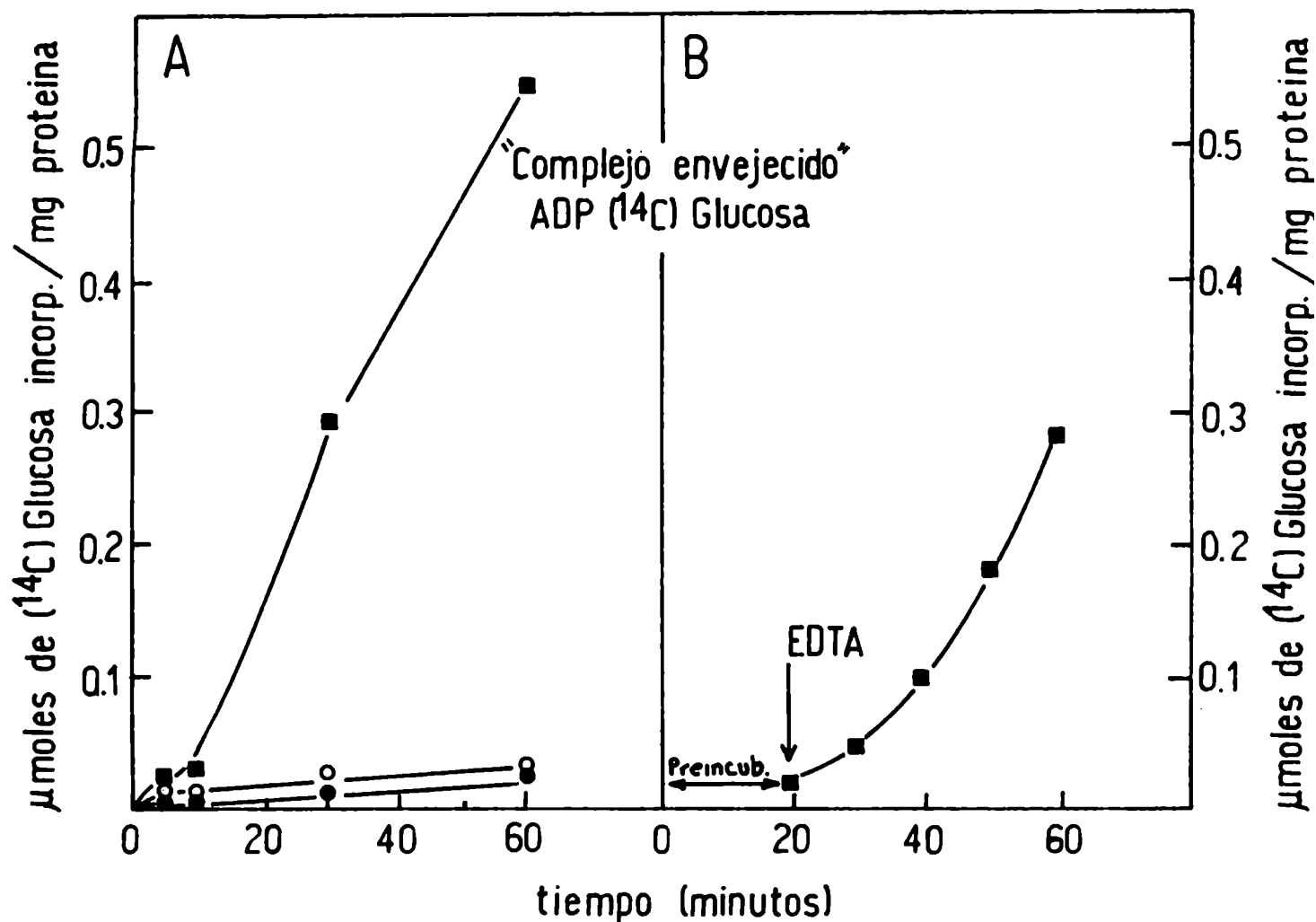


Figura 26. Efecto del molibdato en la síntesis del proteoglicano.

A. El complejo enzimático "envejecido" se incubó a 30°C en presencia de ADP- (^{14}C) glucosa con todos los componentes de la mezcla standard (●-●-●); reemplazando el EDTA 50 mM por molibdato de amonio 10 mM (○-○-○); adicionando a la mezcla completa standard molibdato de amonio 10 mM (■-■-■).

B. El complejo enzimático "envejecido", con ADP- (^{14}C) glucosa y todos los componentes de la mezcla de reacción standard, con excepción de EDTA, se preincubaron a 30°C durante 20 min en presencia de molibdato de amonio 10 mM (←→: preincubación). En el tiempo indicado se adicionó a la mezcla de reacción EDTA 50 mM.

En ambos casos los incubados se procesaron según el método B, descrito en materiales y métodos.

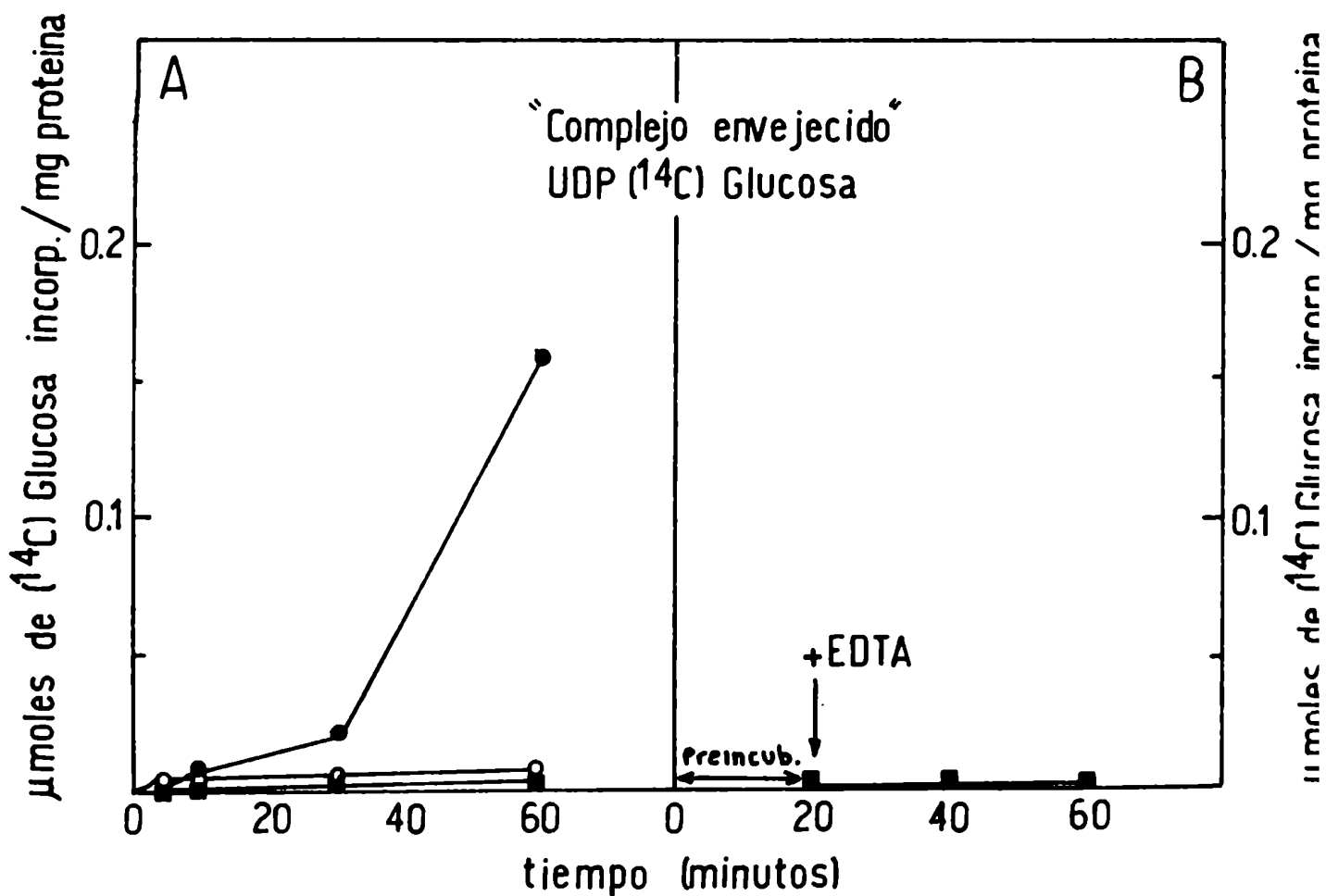


Figura 27. Efecto del molibdato en la síntesis del proteoglicano

A. El complejo enzimático "envejecido" se incubó a 30°C en presencia de UDP-(¹⁴C)glucosa con todos los componentes de la mezcla standard (●-●-●); reemplazando el EDTA 50 mM por molibdato de amonio 10 mM (○-○-○); adicionando a la mezcla standard completa molibdato de amonio 10 mM (■-■-).

B. El complejo enzimático "envejecido" con UDP-(¹⁴C)glucosa y todos los componentes de la mezcla de reacción standard, con excepción de EDTA, se pre-incubaron a 30°C durante 20 min, en presencia de molibdato de amonio 10 mM (←→:preincubación). En el tiempo indicado, se adicionó a la mezcla de reacción EDTA 50 mM.

En todos los casos, los incubados se procesaron según el método B, descrito en Materiales y Métodos.

Tabla XVI: Efecto de detergentes sobre la actividad del complejo enzimático.

Detergente	Concentr. final	% de incorporación de (¹⁴ C)glucosa a partir de		
		UDP-(¹⁴ C)Glu	ADP-(¹⁴ C)Glu	ADP-(¹⁴ C)Glu
		Proteína	Glucógeno	
Nada	-----	100	100	100
Digitonina	1%	102	89	102
Nonidet P-40	1%	97	74	99
Tritón X-100	2%	100	69	94
Lubrol PX	20 mM	68	20	98
Lubrol WX	1.5%	58	21	100
Brij 58	1%	63	15	97
Sarcosil	0.5%	1.3	0.7	1.1
Deoxicolato	1%	0.6	1.9	44

El detergente se agregó directamente a la mezcla de incubación standar. La fracción precipitable por TCA se midió según el método B; para la incorporación de radioactividad al glucógeno, se utilizó el método C.

Mientras que el Sarkosil y deoxicolato inhibieron totalmente la transferencia de glucosas a la proteína a partir de ambos nucleótidos-azúcar, con otros detergentes se observó un efecto diferencial, según que el dador de restos glucosilos fuese UDP-glucosa o ADP-glucosa. Nonidet P-40 y Tritón X-100 inhibieron en baja proporción la actividad enzimática a partir de ADP-glucosa. Esa misma enzima fue inhibida en un 80-90% por Brij 58 o Lubrol. Por otra parte, cuando el sustrato fue UDP-glucosa, la inhibición producida por Lubrol y Brij 58 fue sólo de un 40%, no observándose efecto alguno con Nonidet P-40 o Tritón X-100.

Es importante destacar que cuando se midió la transferencia de glucosas al glucógeno no se observó inhibición, excepto con deoxicolato y sarcosil. Este último inhibió totalmente la enzima.

Dado que ciertos detergentes afectaban la actividad del extracto "fresco" en forma diferente, según fuese el sustrato utilizado (Tabla XVI), se trató de ver qué efecto producían los mismos, sobre las preparaciones "fresca" y "envejecida", en función del tiempo.

Como se observa en la figura 28-A-B, el agregado de Brij 58, inhibió en un pequeño grado la actividad dependiente de UDP-glucosa, tanto en la preparación "fresca" como en la "envejecida". En cambio, se observó un fenómeno diferente cuando la preparación se ensayó con ADP-glucosa. La figura 28-C, muestra que el detergente no afectó aparentemente la velocidad inicial del extracto "fresco", pero la reacción, al cabo de veinte minutos, se inhibió en un 80% respecto del control. Con la preparación "envejecida", el Brij 58 inhibió casi por completo la incorporación de glucosas al precipitado de TCA en el tiempo considerado (figura 28-D).

Por otro lado, es importante destacar que el detergente no afectó la transferencia de glucosas, cuando se midió la síntesis de glucógeno, esto es la incorporación de radioactividad al precipitado de etanol, cuando se ensayó tanto la enzima "fresca" como la "envejecida" con ADP-glucosa y glucógeno exógeno (figura 29).

Así como por el efecto de distintas sales, también por

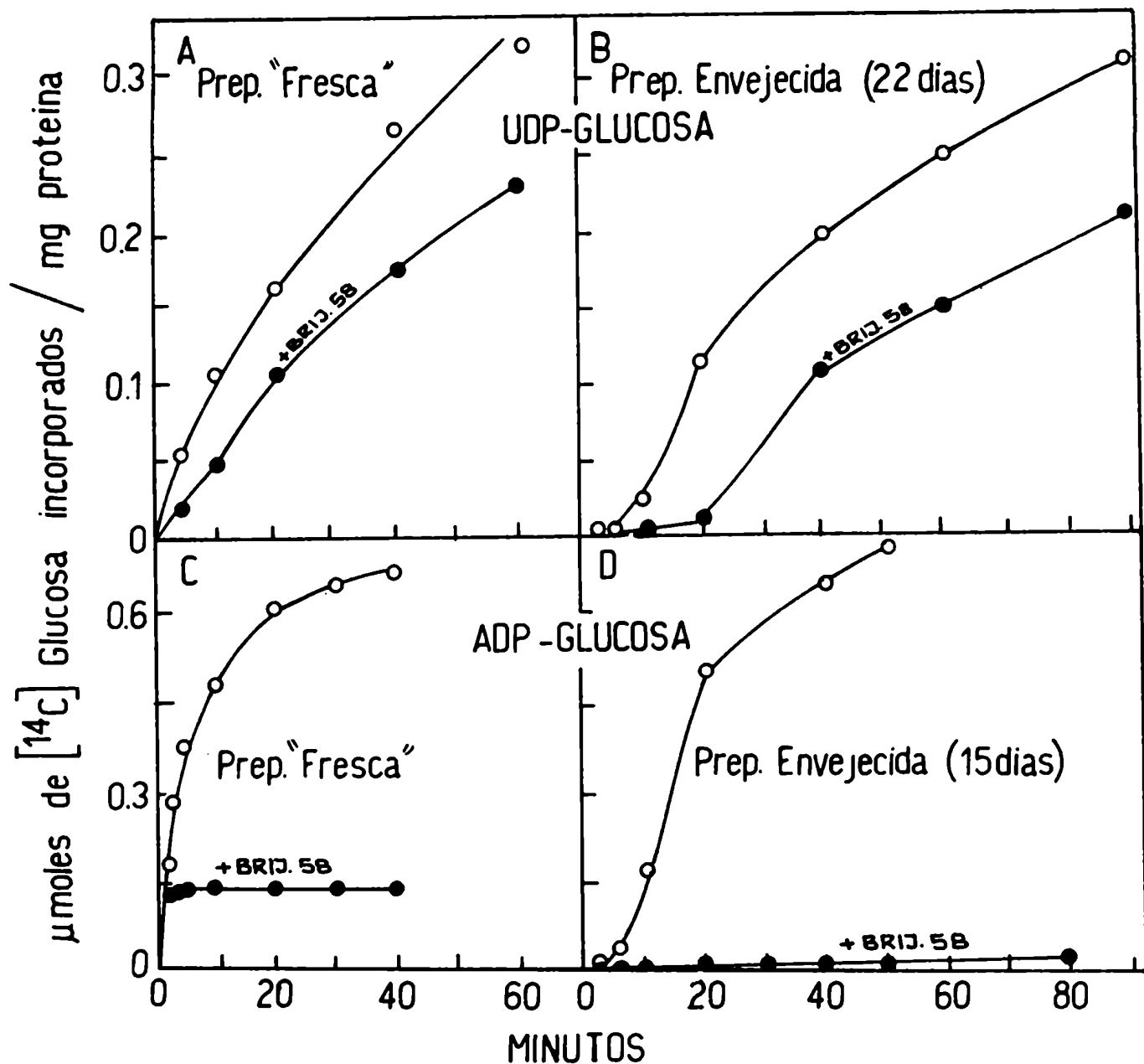


Figura 28. Síntesis del proteoglucano en función del tiempo, en presencia (●-●-●) o ausencia (o-o-o) de Brij 58. La mezcla de reacción standard se incubó a 30°C, con UDP-(^{14}C)glucosa (A,B) o con ADP-(^{14}C)glucosa (C,D). La concentración del detergente en la incubación fue del 1%. El procesamiento de los incubados se realizó según el método B, descrito en materiales y métodos.

la acción diferencial que tienen algunos detergentes sobre el complejo enzimático, se puede postular la posible existencia de tres actividades enzimáticas.

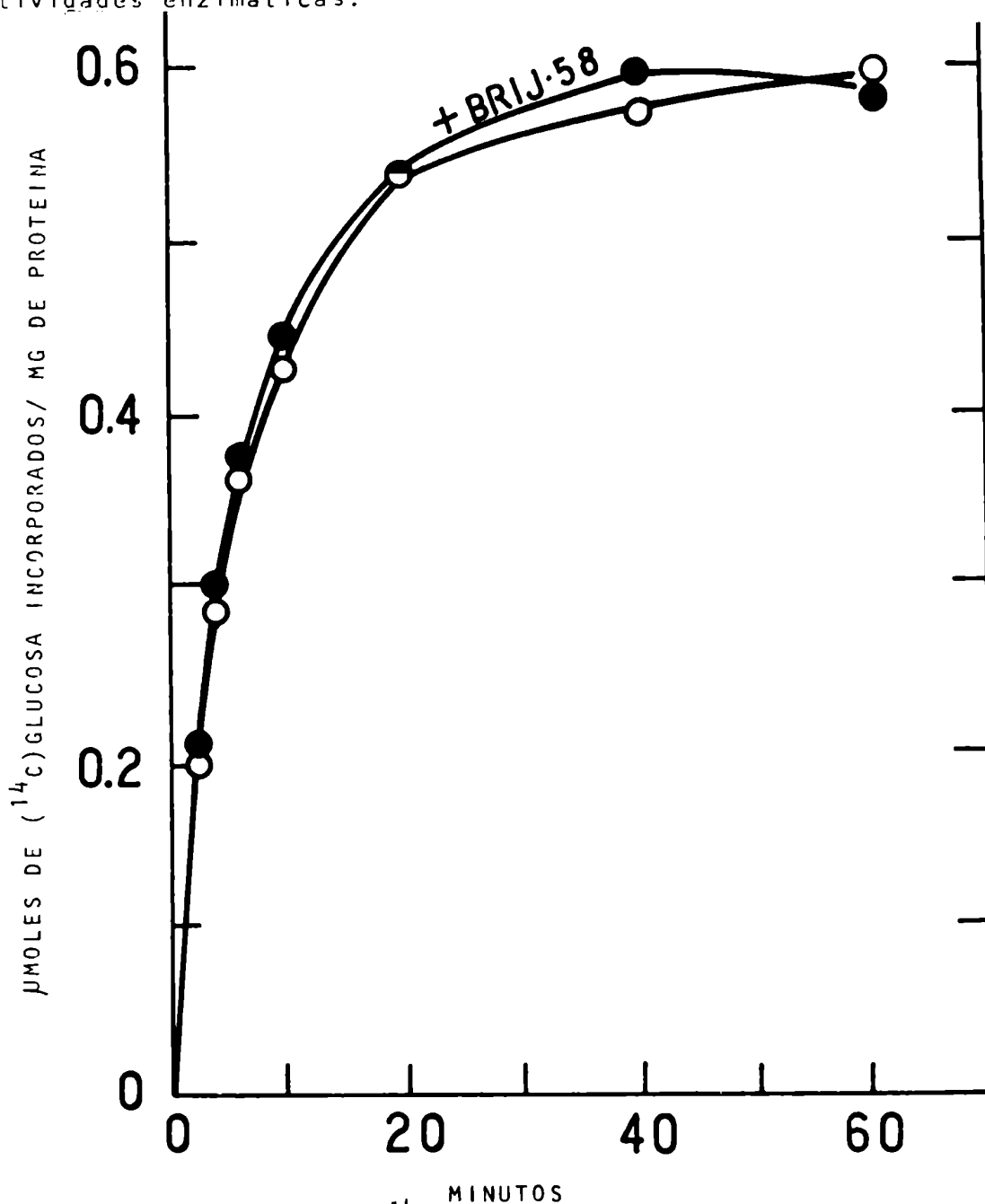


Figura 29. Incorporación de (^{14}C)glucosas al glucógeno, en presencia (●-●-●) o en ausencia (○-○-○) de Brij 58, en función del tiempo. La reacción standard se llevó a cabo a 30°C , y se procesó según el método del KOH(método C).

3.5.7. Solubilización del complejo enzimático.

Tabla XVII: Sedimentabilidad de las actividades enzimáticas en función del tiempo de envejecimiento.

Enzima	Fracción	Sustrato	Incorporación de cpm a		proteína
			proteína	glucógeno	mg
"Fresca"	sobrenadante	UDP-(¹⁴ C)glu	107	---	
	sedimento	UDP-(¹⁴ C)glu	7.936	---	0.012
	sobrenadante	ADP-(¹⁴ C)glu	128	590	
	sedimento	ADP-(¹⁴ C)glu	28.709	17.390	0.012
Conservada* (3d)	sobrenadante	UDP-(¹⁴ C)glu	3.254	---	0.036
	sedimento	UDP-(¹⁴ C)glu	12.762	---	0.042
	sobrenadante	ADP-(¹⁴ C)glu	18.464	17.897	0.036
	sedimento	ADP-(¹⁴ C)glu	30.766	28.684	0.042
Conservada* (14d)	sobrenadante	UDP-(¹⁴ C)glu	7.409	---	0.048
	sedimento	UDP-(¹⁴ C)glu	330	---	0.036
	sobrenadante	ADP-(¹⁴ C)glu	26.916	15.830	0.048
	sedimento	ADP-(¹⁴ C)glu	263	13.859	0.036

*: la misma preparación. La radioactividad incorporada a la fracción precipitable por TCA, se midió según el método B, y la incorporada al glucógeno, según el método C, descritos en materiales y métodos.

Se ha comentado que el complejo enzimático inicialmente era particulado, obteniéndose en forma de sedimento por centrifugación a 105.000 x g (sección 2.4.3). Lo que llamó la atención fue la solubilización de parte del complejo enzimático durante el proceso de envejecimiento. Como se observa en la Tabla XVII, luego de 14 días de conservación a 4°C, bajo vapores de tolueno, las

actividades enzimáticas que transfieren glucosas al aceptor proteico a partir de UDP-glucosa y ADP-glucosa se recuperaron en el sobrenadante. En cambio, la actividad que transfiere glucosas al glucógeno, se encontró distribuida tanto en el sobrenadante como en el sedimento.

3.6. Obtención de sorbitol radioactivo.

Observando las características del extracto enzimático "envejecido", surgió la idea de que la enzima que utiliza ADP-glucosa como sustrato tuviera más afinidad por las cadenas pre-existentes del glucano α -1,4 unido a proteína, mientras que aquélla que utiliza UDP-glucosa, catalizaría la transferencia de glucosas al aceptor proteico. Si esto fuera cierto, en el primer caso, en tiempos de incubación cortos, aparecerían en mayor proporción malto-oligosacáridos radioactivos de cadena larga. En cambio, con UDP-glucosa aparecerían en mayor proporción glucosa, maltosa y oligosacáridos radioactivos cortos.

Para comprobar esta posibilidad, se aprovechó la propiedad que tienen estos oligosacáridos de estar unidos a la proteína a través de una unión ácido-lábil. Obtenido el proteoglucano (^{14}C), por incubación del extracto enzimático "envejecido" con el nucleótido- (^{14}C) glucosa correspondiente, se lo sometió a una hidrólisis ácida suave. La radioactividad liberada al sobrenadante de TCA se analizó por cromatografía en papel, tal como se describió en materiales y métodos (sección 2.9.2). Para no ser redundantes, en

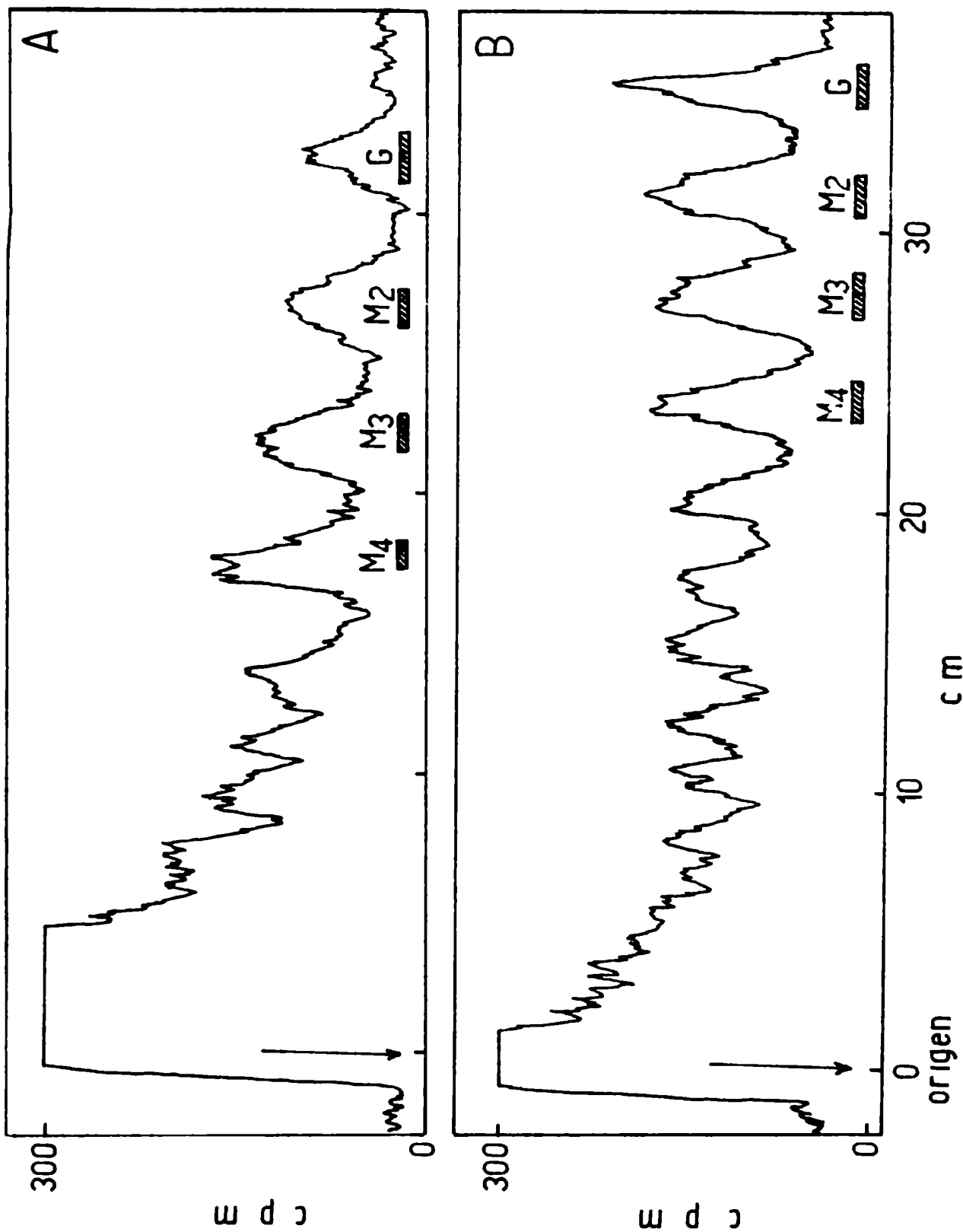


Figura 30. Cromatografía en papel de los productos liberados por hidrólisis ácida. Se incubó en condiciones standard, con ADP(¹⁴C)glucosa (5×10^5 cpm) (A) o con UDP-(¹⁴C)glucosa (2×10^6 cpm) (B) durante 40 min a 30°C. La reacción se inactivó según el método A. Los "pptos-TCA" obtenidos se sometieron a hidrólisis ácida suave, y los sobrenadantes se analizaron por cromatografía en papel. El solvente usado fue butanol:piridina:agua (4:3:4). Como standard interno se usó una mezcla de malto-oligosacáridos.

la figura 30 se muestran solamente las cromatografías correspondientes a los 40 minutos de incubación, con UDP-(^{14}C)glucosa y ADP-(^{14}C)glucosa, respectivamente. En ambos casos se observan una serie de picos que co-cromatografían con oligosacáridos de la serie α -1,4. Posteriormente, 1/3 de cada uno de los cromatogramas correspondientes a los distintos tiempos de incubación, se cortó en cuadrados de 1 cm para cuantificar la radioactividad. Como se observa en la Tabla XVIII, tanto por incubación con UDP-(^{14}C)glucosa como con ADP-(^{14}C)glucosa hay formación de oligosacáridos largos y también de maltotriosa y de maltosa con el transcurso del tiempo y aún desde las primeras etapas. Con ambos sustratos hay aparición de (^{14}C)glucosas. Pero, mientras que la transferencia de marca radioactiva, cuando el nucleótido-azúcar fue UDP-glucosa, varió entre un 64-80% para la zona del origen y entre un 11-2% para la zona de maltotriosa-glucosa; cuando se utilizó ADP-glucosa, la radioactividad en la zona del origen fue mayor, variando entre un 74% y un 95%. En la zona de maltotriosa-glucosa, la variación estuvo entre 4-2%.

Para verificar la posibilidad de una síntesis "de novo", los oligosacáridos liberados por hidrólisis ácida suave fueron sometidos a una reducción con borohidruro. Solamente se obtendrá (^{14}C)sorbitol en aquellos casos en que los malto-oligosacáridos comenzaron "de novo", vale decir, la primera glucosa de la cadena ha sido transferida al aceptor proteico a partir del nucleótido-azúcar radioactivo.

Tabla XVIII: Distribución de oligosacáridos en función del tiempo de incubación.

Sustrato	Tiempo de incubación (min)	cpm sembradas	Porcentaje de radioactividad en las zonas de						
			or-M ₇	M ₆	M ₅	M ₄	M ₃	M ₂	G
UDP-(¹⁴ C)glu	5	2.620	63.52	5.16	5.88	4.00	5.36	4.28	11.24
	20	13.309	77.39	2.16	1.86	4.35	7.68	9.06	3.48
	40	25.000	69.1	2.91	1.95	2.41	2.54	2.63	3.16
	60	46.920	79.76	2.9	1.00	3.00	2.80	2.40	1.70
ADP-(¹⁴ C)glu	10	13.610	73.50	6.30	2.80	5.70	2.50	2.60	2.70
	40	16.886	78.00	4.40	3.00	4.10	3.50	4.20	4.70
	60	43.439	82.60	3.30	2.40	3.30	3.00	2.20	1.00
	90	51.248	94.80	2.50	1.70	1.60	2.50	2.00	2.80

Los productos correspondientes a los distintos tiempos de incubación con UDP-(¹⁴C)glucosa y ADP-(¹⁴C)glucosa, liberados por hidrólisis ácida suave, según lo descrito en sección 2.7.1, fueron analizados por cromatografía en papel como en la figura 30. 1/3 de cada cromatograma se cortó en cuadrados de 1 cm y se determinó la radioactividad.

Con ese objeto, de los 2/3 restantes de cada cromatograma, se eluyeron los picos radioactivos comprendidos entre maltotetraosa y el origen. Como se observa en la figura 31, estos malto-oligosacáridos eluidos, tratados con borohidruro y luego de hidrólisis ácida total, sometidos a una electroforesis en papel, se resolvieron en dos picos únicos: uno correspondiente a (^{14}C)glucosa y el otro a (^{14}C)sorbitol.

En algunos casos y a manera de control, de algunos cromatogramas, los malto-oligosacáridos que se eluyeron se trataron con β -amilasa y α -amiloglucosidasa. Al ser analizados los productos de digestión por cromatografía en papel, se obtuvieron (^{14}C)-maltosa y (^{14}C)glucosa, respectivamente (datos no mostrados).

De estos resultados se puede decir que si bien hay transferencia de (^{14}C)glucosas a cadenas de oligosacáridos pre-existentes en forma de glucoproteína, la obtención de sorbitol radioactivo indica que parte de las glucosas provenientes ya sea de ADP-(^{14}C)glucosa como de UDP-(^{14}C)glucosa, formaron "de novo" cadenas glucosídicas α -1,4 unidas a la proteína, a través de esa unión que es ácido-lábil. Por otro lado, cuando la síntesis se realiza a partir de ADP-glucosa es mayor la formación de oligosacáridos de cadena larga.

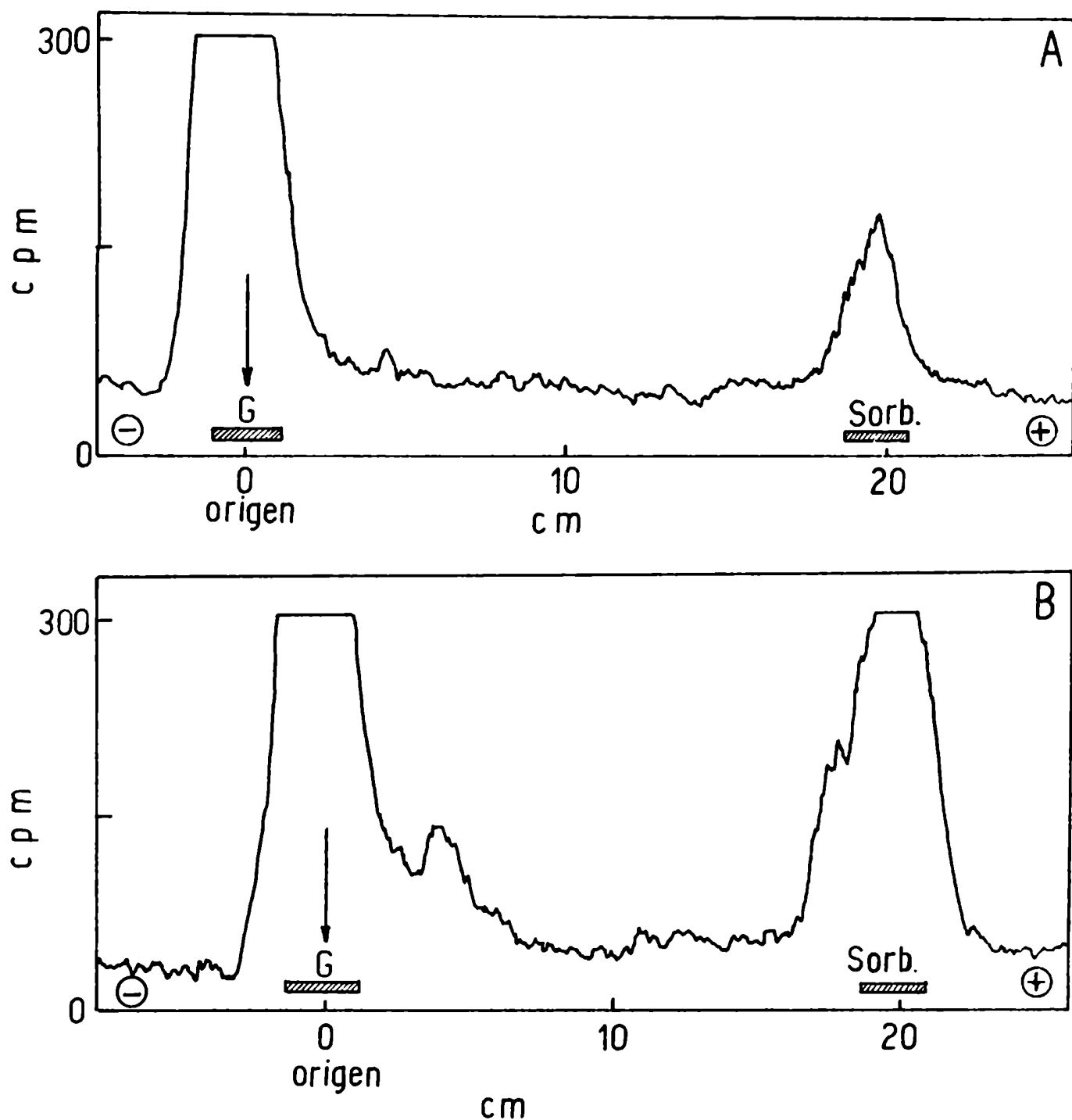


Figura 31. Obtención de (^{14}C)glucosa y de (^{14}C)sorbitol. Las condiciones de incubación y procesamiento son las de la figura 30. Efectuada la cromatografía en papel, se eluyó la zona de malto-oligosacáridos entre M_4 y el origen y se redujeron con borohidruro. Después de una hidrólisis ácida total ($\text{HCl } 2\text{N}$, 100°C , 4 h) el producto se sometió a una electroforesis en papel (sección 2.9.3). Como standard internos se utilizaron glucosa (G) y sorbitol (sorb.).

3.7. Es el proteoglucono α -1,4 sintetizado, un precursor en la biosíntesis del glucógeno?

Un punto que no había quedado aclarado era establecer cuál era la función del proteoglucono sintetizado. En otras palabras, si realmente constituía un intermediario en la biosíntesis del glucógeno.

Esto fue posible estudiarlo dado que, por razones no establecidas, en algunas preparaciones de *Escherichia coli* no se detectó enzima degradante capaz de degradar el proteoglucono sintetizado. Los resultados descritos en este punto son demostrativos de tres preparaciones enzimáticas.

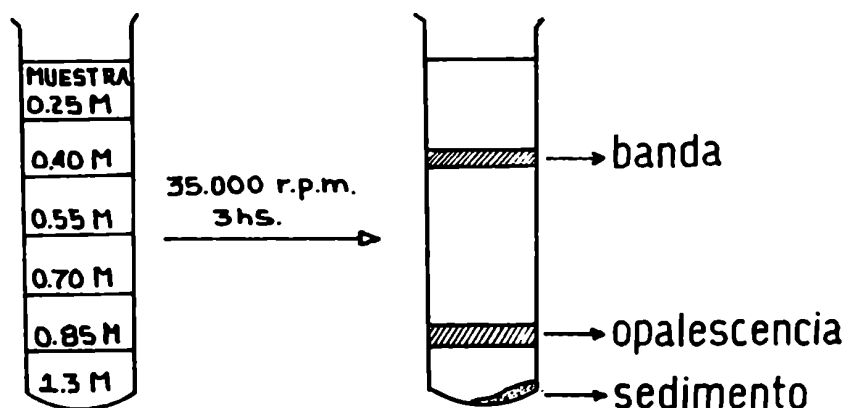


Figura 32. Separación de membranas de *Escherichia coli* por gradiente discontinuo de sacarosa. Tanto la preparación del gradiente como el fraccionamiento del mismo se realizó como se describió en materiales y métodos.

En primer lugar, el extracto crudo se purificó sometién-
dolo a un gradiente discontinuo de sacarosa (gradiente B), tal co-
mo se explicó en materiales y métodos. Después del gradiente,
se observaron dos bandas, una bien nítida, a nivel de la capa 0.55M
de sacarosa del gradiente; la otra, opalescente, a nivel de 1.3M
de sacarosa (figura 32).

En la figura 33, se observan los perfiles de actividad
de transferencia de glucosas al aceptor proteico y al glucógeno,
tanto con UDP-(^{14}C)glucosa como con ADP-(^{14}C)glucosa como dadores
de restos glucosilos. La máxima actividad coincide con la banda
ubicada a nivel de la capa 0.55 M de sacarosa.

Dado que en estos casos, el extracto enzimático poseía
una pequeñísima cantidad de glucógeno, éste sedimentó en el fondo
del tubo como una pastilla gelatinosa, juntamente con parte de la
actividad enzimática que transfiere glucosas al glucógeno y a la
proteína a partir de ADP-glucosa (figura 33).

Con la fracción N°3 del gradiente, que presentó máxima
actividad enzimática, se realizó una incubación en dos etapas, tal
como se explicó en materiales y métodos (sección 2.5.2). Se in-
cubó primero con UDP-(^{14}C)glucosa para sintetizar el proteoglucano.
Posteriormente, la mezcla se dividió en dos alícuotas. Una, que
constituyó el control, permaneció en hielo. A la otra, se le
agregó ADP-glucosa frío y enzima ramificante de hígado de rata y
se incubó durante 3-5 horas.

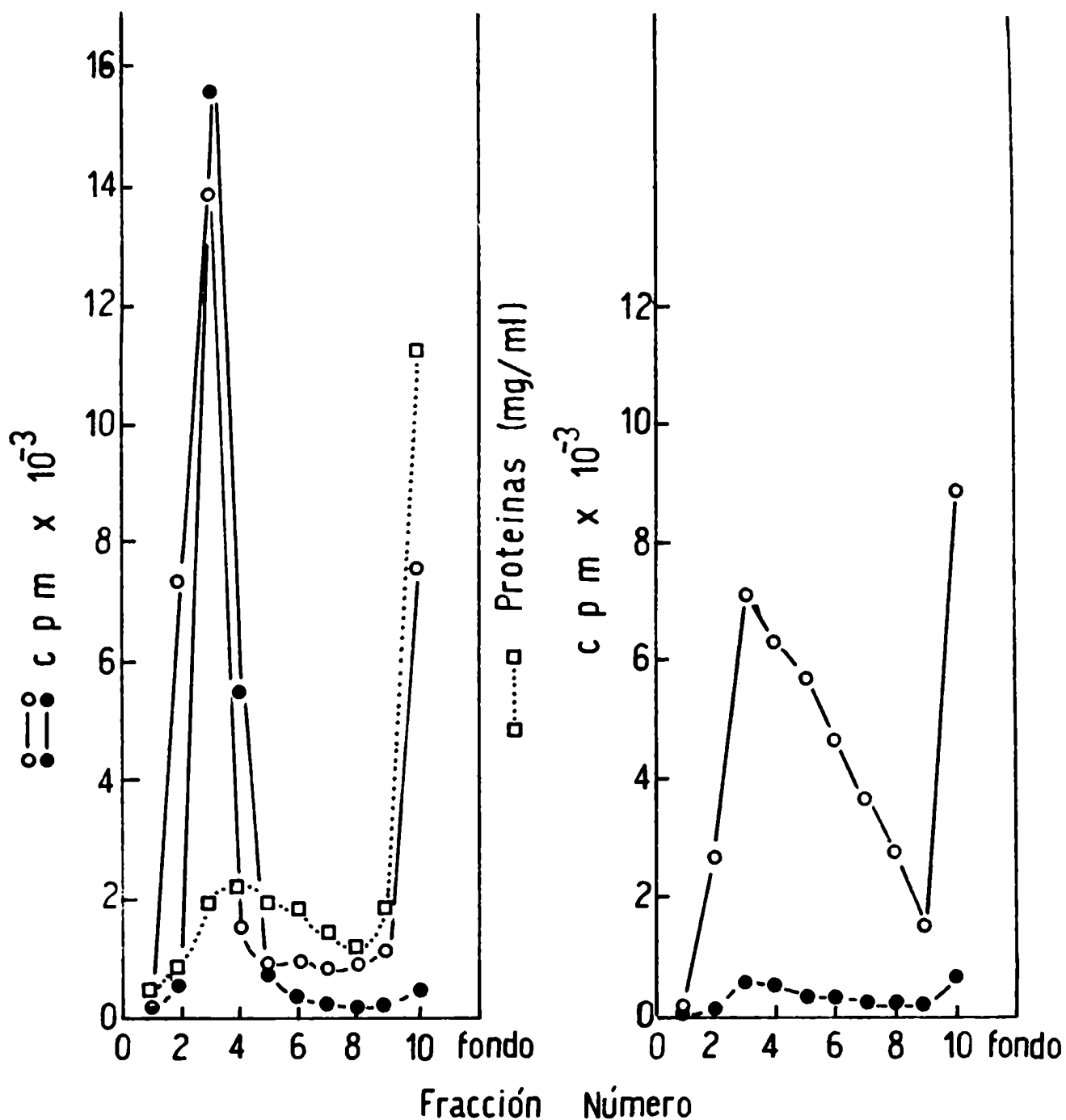
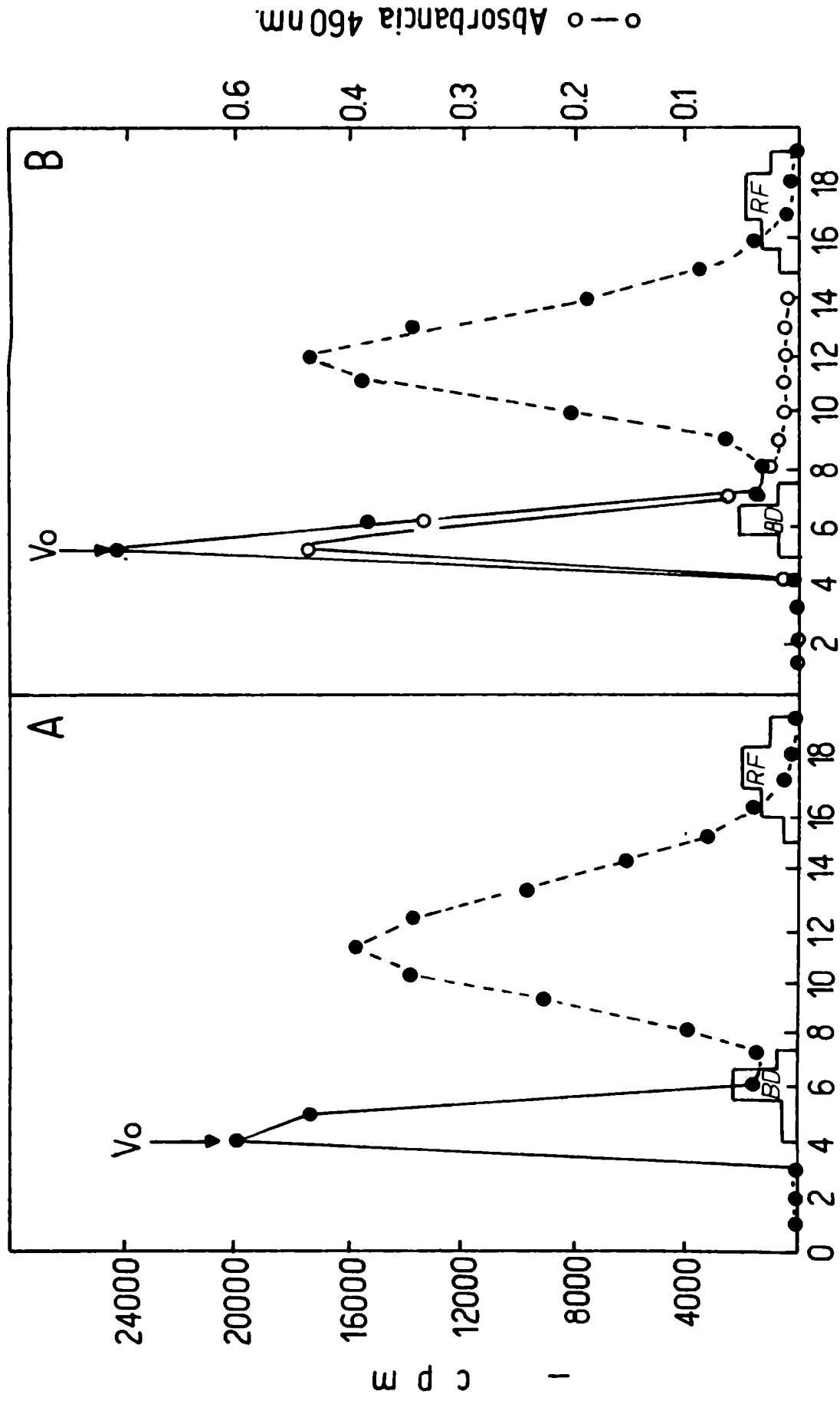


Figura 33. Centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. Se utilizó el gradiente B, descrito en materiales y métodos, sección 2.4.4. Se determinó la actividad enzimática de cada fracción, midiendo la incorporación de (¹⁴C)glucosas a la proteína (A) y al glucógeno (B) a partir de UDP-(¹⁴C)glucosa y de ADP-(¹⁴C)glucosa. Según el caso, se utilizaron los métodos B o C para la medida de la radioactividad.

En otros casos, la mezcla de reacción, luego de la primera incubación se centrifugó a 50.000 rpm, 3 horas, y el pellet, conteniendo el proteoglucano-(^{14}C) se utilizó en la segunda etapa. En ambos casos, el resultado fue el mismo, ya que en presencia de UDP-glucosa, no se logra alargar las cadenas del proteoglucano lo suficiente como para formar glucógeno, por lo tanto su presencia no interfiere en la segunda etapa.

Finalizada la segunda incubación, se cromatografió por Sephadex G-50, con el objeto de eliminar el nucleótido radioactivo que no reaccionó y (^{14}C)oligosacáridos cortos. El perfil de elución que se muestra en la figura 34-A, muestra un pico de radioactividad que eluye con el volumen muerto. Se ha demostrado anteriormente, que ese pico radioactivo es precipitable por TCA y constituye el proteoglucano α -1,4 (sección 3.4.5, figura 19). En el perfil de elución que se muestra en la figura 34-B, el pico de radioactividad que se excluye con el volumen muerto, coincide con el glucógeno sintetizado, identificado por el método del yodo (Krisman, 1962).

Si bien se había observado que el UDP-glucosa no es sustrato para la transferencia de glucosas al glucógeno (Tabla VI), se realizó el siguiente control. Luego de centrifugar a 50.000 rpm, 3 horas, el pellet conteniendo el proteoglucano-(^{14}C) sintetizado en la primera etapa, se incubó con todos los componentes de la segunda reacción, pero en presencia de UDP-glucosa no radioactivo (6 mg). Al cabo de 5 horas de incubación a 37°C, no se



Fracción Número

Figura 34. Cromatografía en Sephadex G-50. Se realizó una incubación en 2 etapas, tal como se explicó en sección 2.5.2. y los productos de reacción se pasaron por Sephadex G-50. La columna equilibrada con formiato de amonio 0.1 M, se desarrolló tal como se explicó en materiales y métodos. A: proteoglucano sintetizado a partir de UDP-(14C)glucosa en la 1era. etapa; B: síntesis de glucógeno (1era. y 2da. etapas). (●-●-●): radioactividad medida en alícuotas de 100 μ l de cada fracción; (○-○-○): contenido de glucógeno, determinado en 100 μ l de cada fracción y expresado en unidades de Absorbancia a 460 nm (una unidad corresponde aproximadamente a 0.05 mg de glucógeno). -

pudo detectar glucógeno por el método de Krisman (1962).

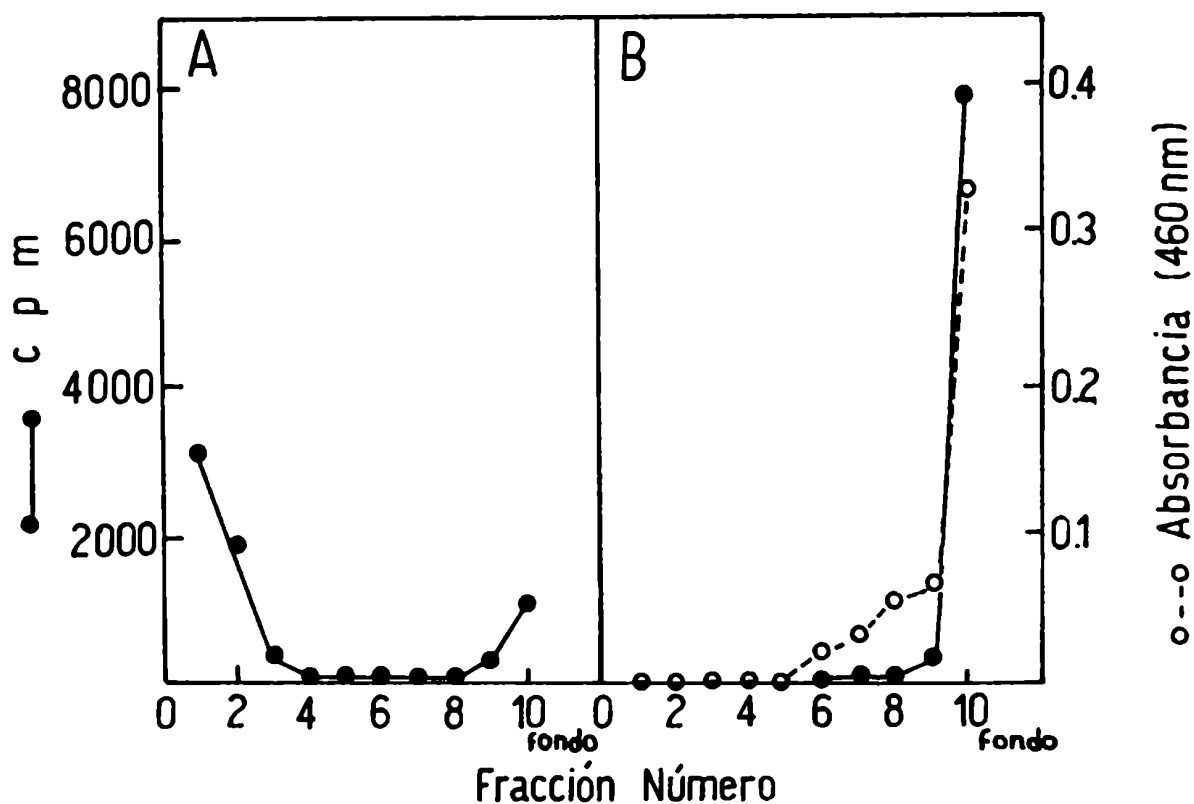


Figura 35. Centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. 0.2 ml de la fracción 4 (figura 34-A) o de la fracción 5 (figura 34-B) de la columna de Sephadex G-50, se diluyeron a 0.8 ml con buffer glicina-NaOH 10 mM, pH 8.7 conteniendo EDTA-Na 5 mM y DTT 1mM , y se sembraron sobre la superficie del gradiente de sacarosa (gradiente B) preparado tal como se explicó en materiales y métodos. Fraccionado el gradiente, se determinaron la radioactividad (●-●-●) en alícuotas de 100 μ l de cada tubo y el contenido en glucógeno (o-o-o) (expresado en unidades de absorbancia a 460 nm) en alícuotas de 200 μ l.

Con el objeto de verificar que el proteoglucano- (^{14}C) sintetizado en la primera etapa es el que fue utilizado como precursor para la síntesis de glucógeno en la segunda etapa, una alícuota de los excluidos (fracción 4-figura 34-A; fracción 5-figura 34-B) fueron analizados por gradiente discontinuo de sacarosa, según se describe en materiales y métodos. El perfil de sedimentación de ambos compuestos, proteoglucano y glucógeno sintetizados, se observa en la figura 35. La mayor parte de la radioactividad (78%) del proteoglucano(^{14}C) se recuperó en las fracciones de menor densidad (figura 35-A). En cambio, cuando ese proteoglucano radioactivo se utilizó para sintetizar glucógeno, como se puede ver en la figura 35-B, la radioactividad coincidió con el perfil de sedimentación del glucógeno y ambos sedimentaron en el fondo del tubo. Por lo tanto, se confirmó que tal proteoglucano- (^{14}C) ha sido el precursor de la síntesis del glucógeno.

4. DISCUSION Y CONCLUSIONES

4.1. Aceptor - glucanos.

En general se acepta que la mayor parte de las enzimas glucógeno-sintetasas solamente son activas en presencia de un aceptor, siendo efectivos los glucanos del tipo del glucógeno. Sin embargo, oligosacáridos de bajo peso molecular también pueden ser utilizados como aceptores. La eficiencia de éstos, dependerá del origen de la enzima.

En condiciones fisiológicas normales, algunas moléculas de glucógeno siempre están presentes. Además en los tejidos existe una enzima del tipo de la α -amilasa, cuyo rol probable es el de proveer fragmentos de glucógeno que pueden servir como iniciadores de nuevas moléculas de dicho polisacárido (Mordoh y col., 1968). Pero qué ocurre cuando el glucógeno desaparece totalmente? Cuál es la molécula más pequeña que puede servir como aceptor?

Con una preparación enzimática de músculo, Goldemberg (1962) observó que a igualdad de concentración del aceptor, consi-

derando la velocidad de transferencia de glucosas al glucógeno igual a 1, las velocidades de incorporación a oligosacáridos tales como M_4 - M_6 ; M_3 y M_2 son 1/500, 1/5.000 y 1/14.000, respectivamente. Por lo tanto, incluso la maltosa puede servir como aceptor pero a muy baja velocidad. Si en la célula existe una mínima traza de glucógeno, la enzima prácticamente va a ignorar a este disacárido (Leloir, 1964). Si la reacción debe comenzar utilizando maltosa como aceptor, será muy lenta en sus comienzos, para hacerse más rápida a medida que se forman aceptores más adecuados.

Si bien Goldemberg (1962) observó que la glucosa era inactiva como aceptor, Larner y col. (1976) demostraron que la glucógeno-sintetasa, además de elongar las cadenas de oligosacáridos y las cadenas exteriores del polisacárido, puede utilizar glucosa para sintetizar maltosa, pero solamente a partir de una concentración de glucosa muy elevada.

En *Escherichia coli* (Fox y col., 1976) se ha observado que a igualdad de concentración, M_3 es 7 veces más eficiente que M_2 . M_4 y M_7 son 11-12 veces más activos que maltosa y prácticamente igualan la capacidad que posee el glucógeno de ser utilizado como aceptor.

La preparación enzimática de *Chromatium* (Hara y Akazawa, 1974) requiere glucanos ramificados. Maltosa, maltotriosa y maltotetraosa son aceptores pobres y la glucosa es ineficiente.

En el caso de la glucógeno-sintetasa de *Streptococcus mitis* (Builder y Walker, 1970), se observa preferencia por polisacá-

ridos ramificados. Sin embargo, a diferencia de la glucógeno-sintetasa de eucariotes (Leloir y col., 1959; Vardanis, 1968), la β -dextrina límite de glucógeno es un 7% más eficiente que el polisacárido nativo. Además esta enzima presenta mayor afinidad por malto-oligosacáridos de \overline{CL} intermedia, siendo los más efectivos M_4 y M_5 , disminuyendo su afinidad tanto por los de mayor como por los de menor peso molecular. Encontraron además que la α -macro-dextrina límite, proveniente de la digestión de glucógeno por α -amilasa, era 80-100% más eficiente como aceptor que el mismo glucógeno.

Recientemente, Yamada y Ballou (1979) aislaron de extractos de *Mycobacterium smegmatis*, cosechadas en fase estacionaria, malto-oligosacáridos de una longitud comprendida entre M_2 y M_{11} y concluyeron que estos oligosacáridos eran intermediarios en la síntesis de glucógeno.

La glucógeno-sintetasa de *Neurospora crassa* ha sido purificada hasta homogeneidad, y es inactiva en ausencia de aceptor exógeno (Takahara y Matsuda, 1978). Esta enzima cataliza la transferencia de glucosas al glucógeno y a su β -dextrina límite. Sin embargo, se observó que la afinidad por los aceptores dependía de la longitud de las cadenas externas de los mismos, y la enzima no es activa en presencia de la β -dextrina límite de glucógeno. Además, maltosa y maltotriosa no son utilizados como aceptores. Takahara y Matsuda (1977) demostraron que una preparación enzimática del hongo cataliza la transferencia de glucosas a partir de ADP-glucosa no solamente al glucógeno endógeno sino también a una fra-

cción insoluble en TCA. Si bien se sugirió que este producto glucoproteico podría ser utilizado como aceptor para la posterior síntesis de glucógeno, no había evidencias concretas sobre si estas dos reacciones de transferencia eran catalizadas por una sola enzima o por dos entidades proteicas diferentes. El hecho de que la glucógeno-sintetasa no pueda utilizar aceptores de cadenas cortas sugiere la existencia de otro sistema enzimático responsable de la síntesis "de novo" del aceptor in vivo.

4.2. Aceptor - proteico.

Los resultados de la Tabla VI (pág. 97) muestran que una preparación enzimática de *Escherichia coli* es capaz de catalizar la transferencia de (^{14}C)glucosas a una fracción insoluble en TCA, tanto a partir de ADP-glucosa como de UDP-glucosa y en ausencia de aceptor exógeno. Es importante recalcar que es la primera vez que se obtiene este tipo de actividad en bacterias. Cuando se adicionó 1 mg de glucógeno a la mezcla de incubación, la incorporación de (^{14}C)glucosas a la fracción insoluble en TCA se vio severamente inhibida. Esa inhibición producida por el glucógeno, también fue observada por otros investigadores (Krisman, 1973; Takahada y Matsuda, 1977).

Si bien anteriormente se habían realizado estudios sobre la iniciación del glucógeno en bacterias (Gahan y Conrad, 1968) se había observado que la reacción se llevaba a cabo sólo en presencia de ADP-glucosa como dador de restos glucosilos. A partir de los

trabajos publicados por Krisman (1972; 1973; y Barengo, 1975) comenzaron a realizarse trabajos similares en otros laboratorios (Fox y col., 1973). Kawaguchi y col. (1978) habían observado que una concentración de UDP-(^{14}C)glucosa de 0.14 mM era virtualmente inactiva y no substituía al ADP-glucosa en la transferencia de glucosas a una fracción precipitable por TCA, en ausencia de aceptor exógeno. Esta aparente contradicción entre los resultados presentados en esta tesis con respecto a los de Kawaguchi y col. (1978) podría explicarse tal vez si se considera que ellos utilizaron una concentración de UDP-glucosa siete veces menor a la utilizada en estos experimentos. Sin embargo, recientemente (Holmes y Preiss, 1979; Cattaneo y col., 1979) empleando concentraciones de UDP-glucosa de 0.6 mM a 1 mM, observaron incorporación de glucosas a una fracción insoluble en metanol y a otra insoluble en TCA, confirmando los resultados presentados en esta tesis (Tabla VI, pag. 97).

Por otra parte, Johnson y Wilson (1977) estudiando en *Escherichia coli* la síntesis del ácido colánico, un polisacárido extracelular, observaron que una fracción de membranas catalizaba, como reacción secundaria, la transferencia de glucosas del UDP-(^{14}C)glucosa a un glucano. Este glucano-(^{14}C) sintetizado era hidrolizado por α -amilasa y α -amiloglucosidasa, constituyendo por lo tanto un glucano α -1,4.

4.3. Proteoglucano- Acción de enzimas.

Los resultados presentados en la Tabla VII (pág. 99) indican que el producto insoluble en TCA, sintetizado tanto a partir de

UDP-(^{14}C)glucosa como de ADP-(^{14}C)glucosa, es un proteoglucano, ya que es solubilizado por enzimas proteolíticas y glucolíticas. La acción de pronasa no puede ser considerada como una proteólisis exclusivamente ya que se detectó una actividad amilolítica como contaminante en la preparación de esta enzima. Con todo, la digestión del producto radioactivo con Proteasa tipo VI (libre de actividad amilolítica) permitió solubilizar entre un 55-66% de la radioactividad inicialmente insoluble en TCA. En lo que respecta a la porción glucosídica, la misma es degradada por α - y β -amilasa y por α -amiloglucosidasa, indicando que se trata de un glucano α -1,4.

Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Krisman (1972;1973) con una preparación enzimática de hígado de rata.

Takahara y Matsuda (1977) observaron que el producto insoluble en TCA, sintetizado con un extracto enzimático de *Neurospora crassa*, también es digerido por distintas enzimas degradantes. Por acción de pronasa o de α -amiloglucosidasa, el 84% y 89% de la radioactividad, respectivamente, se liberó al sobrenadante.

En el laboratorio de Preiss J. (Fox y col., 1973; Kawaguchi y col., 1978) se había demostrado que una preparación enzimática de *Escherichia coli* era capaz de catalizar la síntesis, a partir de ADP-glucosa, de un producto precipitable por TCA. Si bien este producto fue degradado por enzimas glucolíticas, resultó ser resistente a la acción de pronasa. Sin embargo, recientemente, Holmes y Preiss (1979) observaron que la pronasa podía digerirlo parcialmente, si bien sugirieron que ello sería debido a la acción de una

amilasa contaminante en la preparación comercial de pronasa.

4.4. Proteoglucano- Tratamientos químicos.

Distintos tratamientos químicos (Tabla VIII, pág. 103) sugirieron que la unión entre el glucano α -1,4 y la proteína es mucho más estable que si fuera un complejo de adsorción. Las cadenas glucosídicas estarían unidas a la proteína aceptora a través de una unión covalente. La cinética de la hidrólisis ácida permitió determinar el tiempo de vida media de dicho enlace, siendo éste de 4 minutos (figura 10, pág. 106). El tratamiento del "precipitado-TCA" con HCl 0.1N, 100°C, produjo un incremento de la solubilidad de la radioactividad (Tabla VIII y figura 10), liberándose al sobrenadante oligosacáridos de la serie α -1,4 (figura 9, pag. 104). En cambio, a 4°C y en presencia de HCl 0.1N, el 99% de la radioactividad volvió a recuperarse en la fracción precipitable por TCA. Resultados similares se obtuvieron con el producto insoluble en TCA sintetizado a partir de una preparación enzimática de hígado de rata (Krisman, 1972; 1973), de *Neurospora crassa* (Takahara y Matsuda, 1977) y de *Escherichia coli* B (Fox y col., 1973).

Se ha observado que los gránulos de glucógeno extraídos de *Escherichia coli*, al microscopio electrónico presentan un tamaño aproximado de 30-130 nm, siendo más pequeños que las partículas alfa descritas por Drochmans (1962) en hígado (20-280 nm). El tratamiento del poliglucósido con HCl 0.1N, 100°C, 15 minutos, transforma el glucógeno bacteriano en partículas más pequeñas (10-50 nm). Tho-

mas y Chambost (1978) sugirieron la posibilidad de que en este tratamiento se rompan algunas uniones covalentes, semejantes a las observadas por Krisman (1972,1973) con el intermediario glucoproteico, en hígado de rata.

Aparentemente el proteoglucano α -1,4 descrito en este trabajo es diferente al producto obtenido por Holmes y Preiss (1979), dado que es afectado en forma distinta por hidrólisis ácida suave. El tratamiento con HCl 0.1N, 100°C, 5 minutos solubilizó sólo un 10% de dicho producto, insoluble en metanol, precipitable por TCA (Holmes y Preiss, 1979). Por otra parte, estos datos son contradictorios con los obtenidos por los mismos autores en lo referente a solubilidad del producto en función del pH, del tiempo y de la temperatura (Tabla XIX).

Tabla XIX: Solubilidad del glucano.

Temperatura	Tiempo	pH	% glucano soluble
18°C	60 min	2(buffer citrato-Na)	5
18°C	10 min	2(buffer citrato-Na)	35
100°C	5 min	2(HCl 0.1N)	10

4.5. Existencia de una enzima degradante.

Accidentalmente, como consecuencia de analizar a diferentes tiempos de procesamiento, se observó una disminución del componente precipitable por TCA y la aparición concomitante de oligosacáridos solubles en TCA (figuras 19 y 20, pags.123-124). Estos

resultados fueron atribuidos a la presencia de una enzima degradante del tipo amilolítico. La presencia de esta enzima, descarta la síntesis de un compuesto del tipo de la amilosa, el cual retrogradaría y falsearía en cierto modo los resultados de precipitabilidad por TCA.

Holmes y Preiss (1979) objetaron estos resultados y sugirieron que el incremento de la solubilidad en función del tiempo de la fracción precipitable por TCA, era debido al efecto de la enzima ramificante durante la reacción. Es decir, al hacerse más ramificado el producto, se hacía más soluble en TCA. Sin embargo, como se observa en la Tabla XII (pág. 125), la incubación de (^{14}C)glucógeno con el extracto enzimático, trajo como consecuencia la degradación del polisacárido, liberándose un 56% de malto-oligosacáridos, de un tamaño entre maltoheptaosa y glucosa.

Por otra parte, Holmes y Preiss (1979) observaron que en ausencia de enzima ramificante, el producto insoluble en metanol, sintetizado en ausencia de aceptor exógeno, se solubilizaba en mayor o menor grado, dependiendo del pH y del tiempo en que se demorara en colectarlo. Así a pH 8, un 30% del glucano se solubilizaba si sólo se demoraba 10 minutos en recuperarlo; en cambio, al cabo de 60 minutos, sólo un 12% se liberaba al sobrenadante. Estos resultados juntamente con los obtenidos a pH ácido (Tabla XIX) indican que lo que se les sintetizó es un glucano α -1,4 lineal de alto peso molecular, y por lo tanto con características de ser amilosa, que retrograda con el tiempo, siendo incluso insoluble en agua.

Por otro lado, Holmes y Preiss (1979) obtienen un complejo con I_2 que posee una absorción máxima a 610 nm, característica del complejo amilosa- I_2 (Krisman, 1962).

Contrariamente, en este trabajo de investigación, el proteoglucano α -1,4 obtenido, cromatografiado en Sephadex G-50 en buffer glicina-NaOH pH 8.7 (figura 19, pág. 123) y analizado inmediatamente, fue 100% insoluble en TCA; al cabo de una hora la radioactividad precipitable por TCA disminuyó en un 30% y un 70%, según que el proteoglucano hubiera sido sintetizado a partir de UDP-glucosa o ADP-glucosa, respectivamente. Esta disminución de la radioactividad insoluble en ácido, fue debido a la acción de la enzima degradante (figura 20, pag. 124; Tabla XII, pag.125). Cabe mencionar, por otra parte, que dicho proteoglucano en presencia del reactivo de Krisman (1962) no da color con iodo.

4.6. Complejo enzimático- Asociación con membranas citoplasmáticas.

Las glucógeno-sintetasas bacterianas pueden encontrarse ya sea en forma soluble o particulada. Mientras que esta enzima, en *Arthrobacter* (Greenberg y Preiss, 1965), *Agrobacterium tumefaciens* (Greenberg y Preiss, 1964), *Micrococcus lysodeiktitikus* (Greenberg y Preiss, 1964) se encuentra en el sobrenadante de $105.000 \times g$, el 75-90% de la glucógeno-sintetasa en *Escherichia coli* se encuentra principalmente en la fracción particulada (Preiss y Greenberg, 1965). En *Streptococcus mitis* (Builder y Walker, 1970) esta actividad de transferasa se encuentra tanto en el sobrenadante como

en el sedimento, semejante a lo observado en *Rhodospirillum rubrum* (Greenberg y Preiss, 1964).

Dado que la mayor parte del glucógeno en la célula bacteriana se encuentra en la fracción que sedimenta entre 30.000 y 105.000 x g, Preiss (1969) sugirió que por lo menos en las Enterobacterias la glucógeno-sintetasa podría estar unida al glucógeno, formando un complejo particulado enzima-glucógeno. La incubación de este complejo con α -amilasa solubiliza la enzima, la que permanece totalmente activa (Fox-resultados no publicados-Preiss, 1969). Sin embargo, a partir de la cepa A3(S1) de *Aerobacter aerógenes*, mutante que no acumula glucógeno, Kindt y Conrad (1967) recuperaron un 70% de la actividad de la glucógeno-sintetasa en el sedimento de 106.000 x g. En forma análoga ocurrió con el 87-94% de la glucógeno-sintetasa de *Escherichia coli*, DF 2000, una mutante que no puede acumular glucógeno en determinadas condiciones de cultivo (Chambost y col., 1973).

En este trabajo de tesis, el complejo enzimático proveniente de un extracto crudo de *Escherichia coli* se recuperó en la fracción que sedimenta entre 8.000 y 105.000 x g. Es interesante destacar, sin embargo, que el complejo enzimático poseía muy poco e incluso muchas veces no contenía glucógeno capaz de ser detectado por el método del iodo (Krisman, 1962).

Accidentalmente se observó que, cuando el extracto enzimático se conservó a 4°C bajo vapores de tolueno, esa pequeña cantidad de glucógeno presente era degradada, durante el período de

almacenamiento (figura 23, pág. 130). Es factible suponer que las enzimas se encuentran asociadas al glucógeno, sedimentando con él y que por lo tanto, la degradación del polisacárido durante el proceso de envejecimiento, conduce a la solubilización de las mismas. Sin embargo, cuando la preparación enzimática estuvo contaminada con glucógeno, fue posible separar el complejo enzimático del polisacárido por centrifugación en gradiente. El glucógeno sedimentó en el fondo del tubo con parte de la actividad que transfiere glucosas a partir de ADP-glucosa. En la zona correspondiente al 30% del gradiente de sacarosa se recuperó la máxima actividad de transferencia de glucosas a la proteína, como así también la actividad enzimática que cataliza la incorporación de glucosas al glucógeno. Por otra parte, el hecho de que en las condiciones descritas no fuera posible separar las actividades transglucosilantes indicaría que se encuentran asociadas a la misma estructura celular (figura 13, pág.113).

No es extraño que exista esa posible asociación con las membranas citoplasmáticas. En *Streptococcus mitis* (Berman y col., 1967) se ha observado que los primeros gránulos de glucógeno se formaban cerca o en la periferia de las células, sugiriendo que el lugar de la síntesis del polisacárido está en o cerca de la membrana. Por otra parte, Chambost y col.(1973); Thomas y Chambost(1978) observaron que en células de *Escherichia coli* carentes de glucógeno, la sintetasa se encuentra adsorbida a la membrana. Además por microscopía electrónica, observaron que la neo-glucogénesis se produce

en contacto con la membrana celular y en sitios bien definidos, principalmente en los polos (Thomas y Chambost, 1978).

Se ha sugerido que las proteínas asociadas a membranas se pueden clasificar en dos grandes categorías: periféricas e integrales (Singer, 1974), de acuerdo a la forma en que se encuentran unidas a membranas. Es difícil en nuestro caso decir si se tratan de proteínas periféricas o integrales, dado que no se ha hecho un estudio profundo del problema. Se sabe que las proteínas periféricas se liberan rápidamente de las membranas por acción de EDTA 1mM, y en este caso, el complejo enzimático se encuentra suspendido en una solución de EDTA 5 mM. Sin embargo, una preparación "fresca", suspendida en buffer glicina-NaOH (pH 8.7) y EDTA-Na 5 mM, después de centrifugar, vuelve a recuperarse en el sedimento. Se intentó, además, solubilizar la actividad enzimática pre-incubando el extracto "fresco" con detergentes. Cuando se realizó la pre-incubación a 4°C, durante 10 minutos en presencia de distintos detergentes, el 100% de la actividad enzimática se recuperó en el sedimento de 105.000 x g.

Sin embargo, luego de varios días de permanencia a 4°C, bajo vapores de tolueno, las enzimas comenzaron a solubilizarse, y en una preparación "envejecida", toda la actividad enzimática que transfiere glucosas a la proteína se encontró en el sobrenadante de 105.000 x g (Tabla XVII, pág. 145). Por lo tanto es factible pensar que el complejo enzimático, inicialmente formando parte integral de membranas, se solubilizó por acción de una enzima

proteolítica durante el proceso de envejecimiento.

Gahan y Conrad (1968) recuperaban la glucógeno-sintetasa de *Aerobacter aerógenes* en el sedimento de 176.000 x g. Sin embargo, habían logrado solubilizarla mediante Tritón X-100. Utilizando el detergente a una concentración de 0.15% extraían el 100% de la actividad, siempre y cuando hubieran dejado envejecer el extracto enzimático durante 14 días a 4°C. Con tiempos menores de envejecimiento, la enzima no se extraía completamente.

4.7. Aceptor endógeno - Envejecimiento.

Durante el transcurso de esta investigación se observó que las preparaciones "frescas" o recién obtenidas de *Escherichia coli*, tenían una actividad de transferencia de glucosas a la proteína, tanto a partir de ADP-glucosa como de UDP-glucosa, que variaba según las preparaciones, sugiriendo una posible relación con la mayor o menor cantidad de aceptor endógeno de los distintos extractos. Accidentalmente, cuando la preparación enzimática se conservó a 4°C bajo vapores de tolueno, la actividad de transferencia de glucosas del UDP-glucosa a la proteína sufrió cambios inversos a los que presentaba la enzima cuando se la ensayó en presencia de ADP-glucosa. En el primer caso, la actividad, inicialmente baja, fue incrementándose con el transcurso de los días hasta alcanzar un máximo a los 6, para luego ir disminuyendo lentamente. En cambio, la actividad de transferencia de glucosas a la proteína a partir de ADP-glucosa, poseía un valor máximo en una preparación "fresca",

pero disminuía rápidamente en función del tiempo de permanencia a 4°C (figura 21, pág. 126). Los datos de la Tabla XIII (pág. 131) sugieren que en una preparación "fresca" existe un glucano α -1,4 de bajo peso molecular unido a una proteína, el que es utilizado como aceptor por el complejo enzimático "envejecido". Ese pequeño porcentaje de glucano α -1,4 que contiene la preparación "fresca" está firmemente unido a membrana (figura 13, pág. 113). Por otro lado, ese glucano α -1,4 es degradado durante el periodo de estacionamiento (Tabla XIII; figura 23, pág. 130).

Los datos obtenidos con UDP-glucosa (figura 21, pág. 126) concuerdan con lo observado recientemente por otros investigadores (Holmes y Preiss, 1979; Cattaneo y col., 1979). Ellos demostraron que a concentraciones entre 0-50 μ g /ml de glucógeno endógeno, se observaba una activación de la incorporación de glucosas a la fracción insoluble en metanol, inhibiéndose a mayores concentraciones del mismo.

De la figura 22 (pág. 128) se deduce que en la preparación "envejecida", en la cual el glucano endógeno ya ha sido degradado, el período de "lag" observado podría ser debido a la transferencia de las primeras glucosas a la proteína originando un aceptor más adecuado para la subsiguiente incorporación de nuevos residuos de glucosa, incrementándose recién entonces la velocidad de reacción hasta hacerse paralela a la de la enzima "fresca".

En 1967, Kindt y Conrad, utilizando niveles subsaturantes de glucógeno en la incubación con el sistema enzimático de *Aerobac-*

ter aerógenos, habían observado un incremento autocatalítico de la velocidad de incorporación de glucosas al glucógeno, luego de un período de "lag" de 3-4 horas.

Algo semejante fue observado por Illingworth y col.(1961). En condiciones apropiadas la glucógeno-fosforilasa podía catalizar la síntesis "de novo" del poliglucósido. Durante la etapa de "lag" se formaba y alargaba un glucano, el cual podía ser utilizado luego como aceptor por la enzima, para poder así ésta manifestar su actividad total. Cuando agregaron enzima ramificante a la mezcla de incubación, observaron un aumento en la velocidad de reacción, ya que al generarse nuevos terminales no reductores, se incrementan los sustratos aceptores.

4.8. Enzima ramificante.

Fox y col.(1973) habían demostrado que la incubación del extracto enzimático de *Escherichia coli* B con glucoamilasa, no afectaba la síntesis de glucógeno en ausencia de aceptor externo. Sin embargo, posteriormente, Kawaguchi y col (1978) y Cattaneo y col. (1978) sugirieron que la supuesta capacidad de catalizar la síntesis "de novo", en *Escherichia coli*, se debería a la existencia de un aceptor endógeno asociado a la glucógeno-sintetasa, dado que esta actividad disminuye cuando se preincuba la enzima con α -amilasa y glucoamilasa. Sugirieron además (Kawaguchi y col,1978; Cattaneo y col.,1978;1979) que la supuesta síntesis "de novo" era solamente debido a la existencia de la enzima ramificante, la que en presencia

de altas concentraciones de EDTA, citrato u otras sales, aumentaría la afinidad por dicho glucano α -1,4 endógeno. Estos autores sostienen que el activador proteico encontrado por Gahan y Conrad (1968) y que estimulaba la síntesis "de novo" de glucógeno en *Aerobacter aerógenes*, sería la misma enzima ramificante. En cuanto a esta suposición, si bien no fueron estudiadas las propiedades de la enzima ramificante de dicha bacteria, llama la atención la labilidad al almacenamiento de dicho factor proteico (Gahan y Conrad, 1968). La activación de la síntesis "de novo" por acción de este factor proteico presente en el sobrenadante de 176.000 x g, se reduce a cero cuando se lo conserva a -10°C , durante 20 horas. En contraposición, las enzimas ramificantes de *Streptococcus mitis* (Walker y Builder, 1971) y de *Escherichia coli* (Boyer y Preiss, 1977) son muy estables, pudiendo conservarse a -20°C por varios meses, incluso años sin perder actividad, siendo resistentes además al congelamiento y descongelamiento sucesivos.

Se conoce el efecto estimulante que ejerce el citrato sobre diferentes enzimas ramificantes. La enzima ramificante de hígado (Krisman, 1962a) es estimulada por citrato e inhibida por EDTA, y además resiste años de conservación. Dado que en *Streptococcus mitis* se observó un efecto inhibitorio del citrato sobre la glucógeno-sintetasa, y al mismo tiempo un efecto estimulatorio de la enzima ramificante, se sugirió la posibilidad (Walker y Builder, 1971) de que este efecto constituya un mecanismo para regular el grado de ramificación del glucógeno en esta bacteria. En la

literatura no constan datos sobre algún posible efecto inhibitorio sobre la glucógeno-sintetasa ejercido por el citrato.

Como se comentó anteriormente, Illingworth y col.(1961) observaron que en la síntesis "de novo" catalizada por la fosforilasa, el agregado de enzima ramificante permite observar un incremento en la velocidad de reacción y también un acortamiento del período de "lag", si bien éste último no desaparece. Estos autores, aclaran que la reacción "de novo" no depende de la enzima ramificante. Simplemente sirve para aumentar el efecto de la actividad de la fosforilasa, creando múltiples puntas terminales.

Walker y Builder(1971) observaron que la pre-incubación de la enzima ramificante con la glucógeno-sintetasa de *Streptococcus mitis*, asociada a un aceptor endógeno (Builder y Walker, 1970), no incrementa la actividad de la glucógeno-sintetasa en presencia de dicho aceptor. El efecto de la enzima ramificante sería la ramificación de las cadenas del aceptor endógeno luego de que éstas han sido alargadas por la glucógeno-sintetasa.

4.9. Actividad enzimática y concentración de proteína.

A bajas concentraciones del complejo enzimático, se observó un "lag"; sólo fue posible una incorporación lineal de glucosas a la fracción insoluble en TCA, tanto a partir de UDP-(^{14}C)glucosa como de ADP-(^{14}C)glucosa, a partir de los 100 μg de proteína (figura 15, pág. 116).

De igual modo, Gahan y Conrad (1968) observaron que en

ausencia de glucógeno exógeno, la velocidad de síntesis del mismo, sólo era lineal a altas concentraciones de enzima. Kawaguchi y col. (1978) habían observado que la aparición de "lag" en la velocidad de incorporación de glucosas se asociaba con concentraciones bajas de glucógeno-sintetasa. Esto contrasta con lo observado cuando se mide la actividad en presencia de glucógeno, donde la velocidad de incorporación es lineal en función del tiempo y en función de la concentración de proteína.

4.10. Efecto de sales y detergentes.

Se ha comentado anteriormente que el glucano α -1,4 endógeno, unido a membrana, se degrada por almacenamiento a 4°C.

Si bien el EDTA y otras sales pueden aumentar la afinidad del complejo enzimático por esa pequeña cantidad de aceptor endógeno posiblemente todavía presente en la preparación enzimática "envejecida", llama la atención la diferente actividad que se observó, dependiendo del nucleótido-azúcar utilizado. Como se aprecia en la Tabla XV (pág. 134) tanto el $MgCl_2$, como el Na_2SO_4 y el $(NH_4)_2SO_4$ estimularon en un 150, 400 y 200%, respectivamente, la incorporación de glucosas a la fracción precipitable por TCA, a partir de ADP-glucosa; en cambio, cuando el dador fue UDP-glucosa, la estimulación fue sólo de un 2; 20 y 30% respectivamente, respecto de la actividad observada en presencia de EDTA 50 mM. A diferencia de lo observado por Cattaneo y col. (1979) el NaF no estimula la transferencia de glucosas del ADP-glucosa o UDP-glucosa al aceptor proteico.

Un efecto diferente es el que se observa cuando a la mezcla de incubación completa se le adiciona molibdato de amonio 10mM. Así, en presencia de ADP-glucosa, el molibdato no posee ningún efecto sobre una preparación enzimática "fresca" (figura 24, pág. 136); en cambio, en una preparación "envejecida" se observa desaparición del "lag". Cuando se ensayó la actividad con UDP-glucosa, tanto con una preparación "envejecida" como con una preparación "fresca", se encontró que la incorporación de la radioactividad a la fracción precipitable por TCA era inhibida (figura 25, pág. 137). Estos efectos opuestos, se observan cuando en la mezcla de incubación se encuentran simultáneamente EDTA y molibdato (figuras 26 y 27; pags. 139-140).

Se ha comentado anteriormente que varios autores sugerían que la supuesta síntesis "de novo" observada en bacterias, era sólo debido a que en presencia de enzima ramificante y altas concentraciones de sales, se incrementaba la afinidad de la glucógeno-sintetasa por el glucano α -1,4 asociado a ella. Cattaneo y col. (1979) observaron que en presencia de Brij 35 al 1%, se inhibía la incorporación de glucosas a la fracción metanol insoluble, en ausencia de aceptor exógeno, tanto a partir de UDP-glucosa como de ADP-glucosa. Estos autores explicaron sus resultados sobre la base de que el Brij 35 es un potente inhibidor de la enzima ramificante. Sin embargo, en este trabajo de tesis, si bien la incorporación de glucosas a la fracción precipitable por TCA, a partir de ADP-glucosa fue inhibida en un 85%, la inhibición observada, cuando el sustrato

fue UDP-glucosa, fue sólo de un 40% (Tabla XVI pg.141, figura 28, pg. 143).

4.11. El proteoglucano es un intermediario en la síntesis de glucógeno.

El efecto diferencial observado cuando se agregan a la mezcla de reacción distintas sales (Tabla XV) o detergentes (Tabla XVI) como así también la distinta estabilidad al envejecimiento (figura 21, pág. 126) y al congelamiento (Tabla XIV, pág. 132) sugieren la existencia de un verdadero complejo enzimático. Este complejo enzimático estaría constituido en primer lugar, por dos enzimas diferentes que catalizan la incorporación de glucosas ya sea a un aceptor proteico o bien, a oligosacáridos pre-existentes unidos a la proteína, constituyendo una glucoproteína. Una de las actividades enzimáticas utilizaría UDP-glucosa como dador de restos glucosilos, la otra utilizaría el ADP-glucosa. En ambos casos, el producto es un proteoglucano (Tabla VII, pág. 99), en el cual las cadenas glucosídicas α -1,4 lineales (Tabla VII y figura 9, pág. 104) están unidas a la proteína a través de una unión covalente y ácido-lábil (figura 10, pág. 106).

Una vez que la porción glucosídica de la glucoproteína ha adquirido una cierta longitud, en una segunda etapa se produce la síntesis del glucógeno. En esta etapa, las cadenas glucosídicas del proteoglucano se alargan por acción de la enzima glucógeno-sintetasa, la que cataliza la transferencia de glucosas únicamente a partir del ADP-glucosa. Esta glucógeno-sintetasa, que también for-

ma parte del complejo enzimático, juntamente con la enzima ramificante sintetizan un polisacárido con características de glucógeno unido a proteína (figura 35, pág. 157).

4.12. Síntesis "de novo".

Como se postuló que a partir de los nucleótidos de glucosa hay incorporación de (^{14}C)glucosas no sólo a oligosacáridos pre-existentes unidos a proteína, sino también directamente a la proteína, fue necesario diferenciar ambas transferencias. Solamente se obtendrá (^{14}C)sorbitol en aquellos casos en que los malto-oligosacáridos sintetizados se formaron "de novo", vale decir, la primera glucosa de la cadena ha sido transferida al aceptor proteico a partir del nucleótido-azúcar radioactivo. Para ello, las cadenas glucosídicas α -1,4 unidas al aceptor proteico, se liberaron de la proteína por hidrólisis ácida suave, recuperándose en el sobrenadante de TCA (figura 30, pág. 147). Estos oligosacáridos radioactivos solubles, por tratamiento con borohidruro y posterior hidrólisis ácida total, se resolvieron en (^{14}C)glucosa y (^{14}C)sorbitol (figura 31, pág. 151). Esto confirma que las glucosas radioactivas no fueron transferidas únicamente a cadenas pre-existentes de oligosacáridos unidos a la proteína, sino que algunas de las cadenas unidas al aceptor proteico se sintetizaron "de novo" a partir de UDP-(^{14}C)glucosa y de ADP-(^{14}C)glucosa.

En base a los resultados presentados en esta tesis, se propone, así como se ha indicado para el sistema de hígado (Kris-

man y Barengo, 1975), el siguiente esquema para la iniciación de la biosíntesis del glucógeno en bacterias (figura 36). El "complejo enzimático" estaría constituido por lo menos por los siguientes componentes: a) una proteína aceptora, que puede o no tener una cierta cantidad de glucano α -1,4 unido a la misma; b) dos enzimas iniciadoras, una dependiente de UDP-glucosa y la otra de ADP-glucosa. Ambas son enzimas nuevas y catalizan la transferencia de las primeras glucosas a la proteína formando el proteoglucano intermedio; c) la glucógeno-sintetasa (E.C.2.4.1.21), que alarga los oligosacáridos unidos a la proteína utilizando ADP-glucosa como dador de restos glucosilos. En esta etapa, conjuntamente con la enzima ramificante (E.C.2.4.1.18), de localización citoplasmática, se logra finalmente la síntesis de las moléculas del glucógeno que quedarían unidas a una proteína. Este glucógeno unido a proteína, al ser degradado por acción de las enzimas del tipo de las amilasas, encontrada también, en este trabajo, asociada al complejo enzimático, proveerá el aceptor necesario para la síntesis, ampliamente conocida, del glucógeno citoplasmático.

El hecho de que no solamente en hígado (Krisman y Barengo, 1975), sino también en plantas (Tandecarz y Cardini, 1979), hongos (Takahara y Matsuda, 1977), en protozoarios (Northcote, 1978) y en bacterias (Gahan y Conrad, 1968; esta tesis), el polisacárido de reserva se sintetiza sobre un aceptor que posee una estructura diferente de la del mismo polisacárido, sugeriría que se trata de un

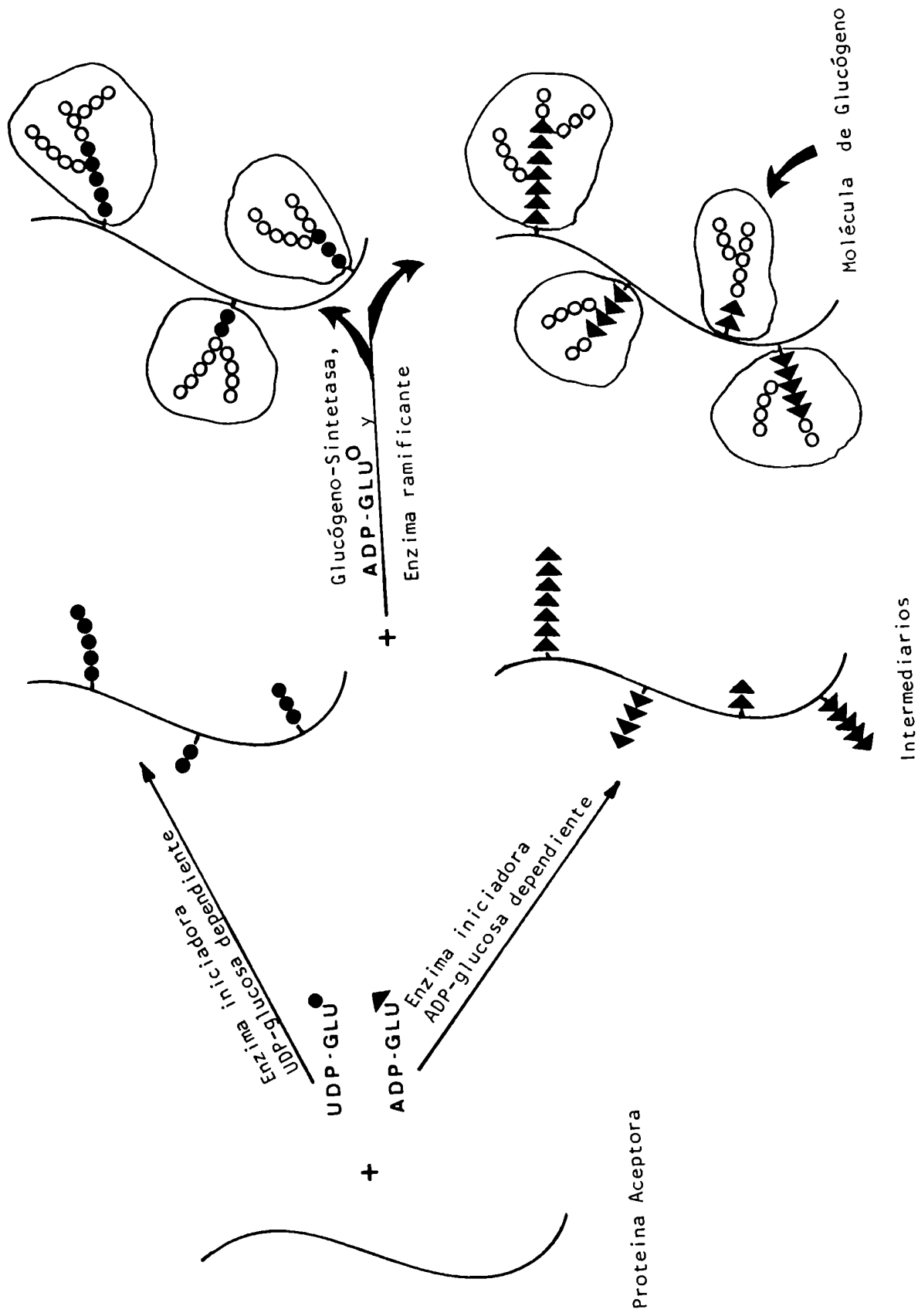


Figura 36. Representación esquemática de la iniciación de la biosíntesis del glucógeno en bacterias. (^{14}C) glucosa: \blacktriangle ; glucosa: \circ .

mecanismo general. Es posible que en la naturaleza prácticamente todos los polisacáridos se formen "de novo" unidos a proteína o bien a alguna estructura diferente de la del mismo polisacárido.

Parte del presente trabajo de investigación ha sido publicado en:

- Febs Lett. 53, 274-278 (1975).
- Acta physiol. latinoam. 26, 289-296 (1976).
- Biochim. Biophys. Acta 540, 190-196 (1978).


Dra. Clara R. Krisman de Fischman


Lic. Renée Barengo

5. BIBLIOGRAFIA

- ANTOINE A.D. y TEPPER B.S. 1969. Characterization of glycogen from Mycobacteria. Arch. Biochem. Biophys. 134,207-213.
- ANTOINE A.D. y TEPPER B.S. 1969a. Environmental control of glycogen and lipid content in Mycobacterium phlei. J.Gen.Microbiol. 55, 217-226.
- ANTOINE A.D. y TEPPER B.S. 1969b. Environmental control of glycogen and lipid content in Mycobacterium tuberculosis. J.Gen.Microbiol. 100,538-539.
- ATKINSON D.E. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry,7,4030-4034.
- BACHMANN B.J.,LOW B.K. y TAYLOR A.L. 1976. Recalibrated linkage map of Escherichia coli K12. Bacteriol.Rev. 40,116-167.
- BADENHUIZEN N.P. 1973. Fundamental problems in the biosynthesis of starch granules, en Storage polyglucosides. Ann.N.Y.Acad.Sci. 210, 11-16.
- BARENGO R. y KRISMAN C.R. 1978. Initiation of glycogen biosynthesis in Escherichia coli. Studies of the properties of the enzymes involved. Biochim. Biophys.Acta, 540, 190-196.
- BARKER S.A.,BOURNE E.J. y STACEY M. 1950. The structure of the starch-type polysaccharide synthesized from sucrose by Neisseria perflava. J.Chem. Soc. 2884-2887.
- BARRY C.,GAVARD R.,MILHAUD G. y AUBERT J.P. 1953. Etude du glycogene extrait de Bacillus megatherium. Ann.Inst.Pasteur, 84, 605-610.
- BAXTER E.D. y DUFFUS C.M. 1971. Starch synthetase in developing barley amyloplasts. Phytochemistry, 10, 2641-2644.
- BERMAN K.S.,GIBBONS R.J. y NALBANDIAN J. 1967. Localization of intracellular polysaccharide granules in Streptococcus mitis. Arch.oral Biol.12,1133-1138.
- BERTHILLIER G.,AZZAR C.G.J. y GOT R. 1975. Etude de l'activité de transfert de glucose a partir d'UDP-glucose, dans les membranes microsomiques des hépatocytes de rat. Eur.J.Biochem. 51, 275-282.
- BOURNE E.J., SITCH D.A. y PEAT S. 1949. The enzymic shnthesis and degradation of starch. III. The role of carbohydrate activators. J.Chem.Soc. 1448-1457.
- BOURNE E.J.,HUTSON D.H. y WEIGEL H. 1961. Complexes between molybdate and acyclic polyhidroxy-compounds. J.Chem.Soc. 35-38.
- BOYER C. y PREISS J. 1977. Biosynthesis of bacterial glycogen. Purification and properties of the E.coli B α -1,4-glucan: α -1,4glucan-6-glycosyltransferase. Biochem. 16, 3693-3699.

- BOYLEN C.W. y ENSIGN J.C. 1970. Intracellular substrates for endogenous metabolism during long-term starvation of rod and spherical cells of *Arthrobacter crystallopoietes*. *J.Bacteriol.* 103, 578-587.
- BOYLEN C.W. y PATE J.L. 1973. Fine structure of *Arthrobacter crystallopoietes* during long-term starvation of rod and spherical stage cells. *Can. J. Microbiol.* 19, 1-5.
- BOYLEN C.W. y MULKS M.H. 1978. The survival of Coryneform bacteria during periods of prolonged nutrient starvation. *J.Gen.Microbiol.* 105, 323-334.
- BRAY G.A. 1960. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal.Biochem.* 1, 279-285.
- BROWN D.H., ILLINGWORTH B. y CORI C.F. 1961. The mechanism of the de novo synthesis of polysaccharide by phosphorylase. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 47, 479-485.
- BROWN D.H., ILLINGWORTH B. y KORNFELD R. 1965. Transfer of glucosyl units to oligosaccharide and polysaccharides by the action of uridine-diphosphoglucose- α -glucan transglucosylase. *Biochemistry*, 4, 486-495.
- BROWN D.H., GORDON R.B. y BROWN B.I. 1973. Studies on the structure and mechanism action of the glycogen debranching enzymes of muscle and liver. *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 210, 238-253.
- BUCK K.W. y OBAIDAH M.A. 1971. The composition of the cell wall of *Fusicoccus amygdali*. *Biochem.J.* 125, 461-471.
- BUEDING E. y ORRELL S. 1964. A mild procedure for the isolation of polydisperse glycogen from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 239, 4018-4020.
- BUILDER J.E. y WALKER GJ. 1970. Metabolism of the reserve polysaccharide of *Streptococcus mitis*. Properties of glycogen synthetase. *Carbohydr. Res.* 14, 35-51.
- BURLEIGH I.G. y DAWES E.A. 1967. Studies on the endogenous metabolism and senescence of starved *Sarcina lutea*. *Biochem. J.* 102, 236-250.
- BURR B. y NELSON O.E. 1973. The phosphorylases of developing maize seeds, en Storage polyglucosides. *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 210, 129-138.
- BURR B. y NELSON O.E. 1975. Maize α -glucan phosphorylase. *Eur.J.Biochem.* 56, 539-546.
- BUTLER N.A., LEE E.Y. y WHELAN W.J. 1977. A protein-bound-glycogen component of rat liver. *Carbohydr. Res.* 55, 73-82.
- CARDINI C.E., PALADINI A.C.,CAPUTTO R.,LELOIR L.F. y TRUCCO R.E. 1949. The isolation of the coenzyme of phosphoglucomutase. *Arch.Biochem.* 22, 87-100.

- CARLSON A.S. y HEHRE E.J. 1949. Composition of the starch synthesized from glucose 1-phosphate by diphtheriae bacilli. *J.Biol.Chem.* 177, 281-288.
- CATTANEO J., CHAMBOST J.P. y CREUZET-SIGAL N. 1978. Combined action of *Escherichia coli* glycogen synthase and branching enzyme in the so-called "unprimed" polyglucoside synthesis. *Arch. Biochem.Biophys.* 190, 85-96.
- CATTANEO J., MAGNANI M. y BIGLIARDI J. 1979. *Escherichia coli* K12 glycogen synthase: ability to use UDP-glucose and ADP-glucose as glucosyl donors in the absence of added primer. *Arch.Biochem.Biophys.* 196, 449-458.
- CEDERGREN B. y HOLME T. 1959. On the glycogen in *Escherichia coli* B, electron microscopy of ultrathin sections of cells. *J.Ultrastr. Res.* 3, 70-73.
- COHEN P. 1978. The role of cAMP dependent protein kinase in the regulation of glycogen metabolism in mammalian skeletal muscle. *Curr.Topics Cell.Reg.* 14, 118-196.
- COHEN-BAZIRE G. y KUNISAWA R. 1963. The fine structure of *Rhodospirillum rubrum*. *J.Cell Biol.* 16, 401-419.
- COLE J.A. 1977. A biochemical approach to the control of dental caries. *Biochem.Soc.Trans.* 5, 1232-1239.
- CREUZET-SIGAL N., LATIL-DALMOTTE M., CATTANEO J. y PUIG J. 1972. Genetic analysis and biochemical characterization of mutants impairing glycogen metabolism in *E.coli* K12, en *Biochemistry of the glycosidic linkage*, pags. 647-680. (R.Piras y H.Pontis, eds.) Academic Press, N.York.
- CREUZET-SIGAL N. y FRIXON C. 1977. Catabolism of glycogen in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* 1, 235-238.
- CROWLEY N. y JEVONS P.M. 1955. The formation of a starch-like polysaccharide from maltose by strains of *Streptococcus pyogenes*. *J.Gen.Microbiol.* 13, 226-231.
- CHAMBOST J.P., FAVARD A. y CATTANEO J. 1967. Purification et propriétés d'une α -amylase endocellulaire d'*E.coli*. *Bull.Soc.Chim.Biol.* 49, 1231-1246.
- CHAMBOST J.P., FAVARD A. y CATTANEO J. 1972. Synthèse de novo de glycogen par un mutant d'*E.coli* dépourvu d'activités glucose-phosphate isomérase et D-glucose-6-phosphate déshydrogénase. *Carbohydr.Res.* 24, 379-391.
- CHAMBOST J.P., FAVARD A. y CATTANEO J. 1973. Unprimed glucan biosynthesis by a particulate ADP-glucose-glucan glycosyltransferase from an *E.coli* mutant and its stimulation by a protein factor. *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 55, 132-140.
- CHAO L. y BOWEN C.C. 1971. Purification and properties of glycogen isolated from a blue-green alga *Nostoc muscorum*. *J.Bacteriol.* 105, 331-338.
- CHAPMAN A.G., FALL L. y ATKINSON D.E. 1971. Adenylate energy charge in *E.coli* during growth and starvation. *J.Bacteriol.* 108, 1072-1086.

- CHARGAFF E. y MOORE D. 1944. On bacterial glycogen: the isolation from avian tubercle bacilli of a polyglucosan of very high particle weight. *J.Biol.Chem.* 155, 493-501.
- CHEE N.P. y GEDDES R. 1977. The structure of liver glycogen. *FEBS Lett.* 73, 164-166.
- CHEN G.S. y SEGEL I.H. 1968. Escherichia coli polyglucose phosphorylase. *Arch. Biochem.Biophys.* 127, 164-174.
- CHEN G.S. y SEGEL I.H. 1968a. Purification and properties of glycogen phosphorylase from Escherichia coli. *Arch. Biochem.Biophys.* 127, 175-186.
- CHENG K.J., HIRONAKA R., ROBERTS D.W.A. y COSTERTON J.W. 1973. Cytoplasmic glycogen inclusions in cells of anaerobic gram negative rumen bacteria. *Can. J.Microbiol.* 19, 1501-1506.
- CHOCK P.B., RHEE S.G. y STADTMAN E.R. 1980. Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation. *Ann.Rev.Biochem.* 49, 813-843.
- DAWES E.A. y SENIOR P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Advan.Microbial Physiol.* 10, 135-266.
- DERI TOMOS A. y NORTHCOLE D.H. 1978. A protein-glucan intermediate during paramylon synthesis. *Biochem.J.* 174, 283-290.
- DIETZLER D.N. y STROMINGER J.L. 1973. Purification and properties of the ADPG:glycogen transglucosylase of Pasteurella pseudotuberculosis. *J.Bacter.* 113, 946-952.
- DIETZLER D.N., LECKIE M. y LAIS C. 1973. Rates of glycogen synthesis and cellular levels of ATP and FDF during exponential growth and the nitrogen-limited stationary phase of Escherichia coli W 4597(K). *Arch.Biochem.Biophys.* 156, 684-693.
- DIETZLER D.N., LAIS C., MAGNANI J. y LECKIE M. 1974. Maintenance of the energy charge in the presence of large decreases in the total adenylate pool of E. coli and concurrent changes in G-6-P; FDF and glycogen synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 875-881.
- DIETZLER D.N., LAIS C.J. y LECKIE M.P. 1974a. Simultaneous increases of the adenylate energy charge and the rate of glycogen synthesis in nitrogen-starved E.coli W4597(K). *Arch.Biochem.Biophys.* 160, 14-25.
- DIETZLER D.N., LECKIE M.P., LAIS C. y MAGNANI J. 1975. Evidence for the allosteric regulation of glycogen synthesis in the intact E.coli cell. *J.Biol. Chem.* 250, 2383-2387.
- DIETZLER D.N., LECKIE M.P., BERGSTEIN P.E. y SUGHRUE M.J. 1975a. Evidence for the coordinate control of glycogen synthesis, glucose utilization and glycolysis

- in *E. coli*. I. Quantitative covariance of the rate of glucose utilization and the cellular level of fructose-1,6-diphosphate during exponential growth and nutrient limitation. *J. Biol. Chem.* 250, 7188-7193.
- DIETZLER D.N., LECKIE M.P., STERNHEIM W.L., UNGAR J.M., CRIMMINS D.L. y LEWIS J.W. 1979. Regulation of glycogen synthesis and glucose utilization in *E. coli* during maintenance of the energy charge. *J. Biol. Chem.* 254, 8276-8287.
 - DIETZLER D.N., LECKIE M.P., LEWIS J.W., PORTER S.E., TAXMAN T.L. y LAIS C.J. 1979a. Evidence for new factors in the coordinate regulation of energy metabolism in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 254, 8295-8307.
 - DIETZLER D.N., LECKIE M.P., MAGNANI J.L., SUGHRUE M.J., BERGSTEIN P.E. y STERNHEIM W.L. 1979b. Contribution of cyclic adenosine 3'5' monophosphate to the regulation of bacterial glycogen synthesis in vivo.
 - DIPERSIO J.R., MATTINGLY S.J., HIGGINS M.L. y SHOCKMAN, G.D. 1974. Measurement of intracellular iodophilic polysaccharide in two cariogenic strains of *Streptococcus mutans* by cytochemical and chemical methods. *Infect. Immunity*, 10, 597-604.
 - DIRIENZO J.M., NAKAMURA R., INOUE M. 1978. The outer membrane proteins of Gram negative bacteria: biosynthesis, assembly and functions. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 481-532.
 - DOETSCH R.N., HOWARD B.H., MANN S.O. y OXFORD A.E. 1957. Physiological factors in the production of an iodophilic polysaccharide from pentose by a sheep rumen bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 16, 156-168.
 - DOUDOROFF M., HASSID W.Z., PUTMAN E.W., PORTER A. y LEDERBERG J. 1949. Direct utilization of maltose by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 179, 921-934.
 - DROCHMANS P. 1962. Morphologie du glycogène. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. *J. Ultrastr. Res.* 6, 141-163.
 - DRUMMOND G.S., SMITH E.E. y WHELAN W.J. 1972. Purification and properties of potato α -1,4-glucan- α -1,4-glucan-6-glycosyltransferase (Q-enzyme). *Eur. J. Biochem.* 26, 168-176.
 - DUGUID J.P. y WILKINSON J.F. 1953. The influences of cultural conditions on polysaccharide production by *Aerobacter aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 9, 174-189.
 - DUXBURI T., GRAY T.R.G. y SHARPLES G.T. 1977. Structure and chemistry of walls of rods, cocci and cystites of *Arthrobacter globiformis*. *J. Gen. Microbiol.* 103, 91-99.

- EIDELS L., EDELMANN P.L. y PREISS J. 1970. Biosynthesis of bacterial glycogen. Activation and inhibition of the adenosine diphosphoglucose pyrophosphorylases of *Rhodospseudomonas capsulata* and of *Agrobacterium tumefaciens*. *Arch.Biochem. Biophys.* 140, 60-74.
- EIDELS L. y PREISS J. 1970. Carbohydrate metabolism in *Rhodospseudomonas capsulata*: enzyme titers, glucose metabolism and polyglucose polymer synthesis. *Arch.Biochem. Biophys.* 140, 75-89.
- EISENBERG R.J., ELCHISAK M. y LAI C. 1974. Glycogen accumulation by pleomorphic cells of *Streptococcus sanguis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 959-966.
- ELBEIN A.D. y MITCHELL M. 1973. Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and the purification and properties of the glycogen synthetase. *J. Bacteriol.* 113, 863-873.
- FEINGOLD D.S., NEUFELD E.F. y HASSID W.Z. 1958. Synthesis of a β -1,3 linked glucan by extracts of *Phaseolus aureus* seedlings. *J. Biol. Chem.* 233, 783-788.
- FEKETE M.A.R.de, LELOIR L.F. y CARDINI C.E. 1960. Mechanism of starch biosynthesis. *Nature*, 187, 918-919.
- FEKETE M.A.R.de y VIEWEG G. 1973. The role of phosphorylase in the metabolism of starch, en *Storage polyglucosides*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 210, 170-180.
- FEKETE M.A.R.de y VIEWEG G.H. 1974. Starch metabolism: synthesis versus degradation pathways, en *Plant Carbohydrate Chemistry*, pags. 127-144. *Proc. of the Phytochem. Soc. Symp.* 1973. (J.B.Pridham, ed.) Academic Press, London, N.Y.
- FISCHER E.H., HEILMEYER L.M.G. y HASCKE R.H. 1971. Phosphorylase and the control of glycogen degradation. *Curr. Topics in Cell. Reg.* 4, 211-250.
- FONTANA J.D. y KRISMAN C.R. 1978. Glycogen synthesis in the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 540, 183-189.
- FOX J., KENNEDY L.D., HAWKER J.S., OZBUN J.L., GREENBERG E., LAMMEL C. y PREISS J. 1973. De novo synthesis of bacterial glycogen and plant starch by ADPG: α -glucan 4-glucosyl transferase, en *Storage polyglucosides*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 210, 99-103.
- FOX J., KAWAGUCHI K., GREENBERG E. y PREISS J. 1976. Biosynthesis of bacterial glycogen. Purification and properties of the *E. coli* B ADPglucose:1,4- α -glucan 4- α -glucosyltransferase. *Biochemistry*, 15, 849-857.
- FREDRICK J.F. 1964. Polyacrylamide gel studies of the isozymes involved in polyglucoside synthesis in algae. *Phyton(Bs.As.)* 21, 85-89.
- FREDRICK J.F. 1971. Polyglucan branching isoenzymes in algae. *Physiol. Plant.* 24, 55-58.

- FREDRICK J.F. 1971a. De novo synthesis of polyglucans by a phosphorylase isoenzyme in algae. *Physiol.Plant.* 25, 32-34.
- FRENCH D. 1964. Structure of glycogen and its amylolytic degradation, en *Control of glycogen metabolism.* pags. 7-25. Ciba Foundation Sympos. (W.J. Whelan y M.P. Cameron, ed.) Churchill, London.
- FRENCH D. 1966. The contribution of α -amylases to the structural determination of glycogen and starch. *Biochem.J.* 100, 2P.
- FRENCH D. 1975. Chemistry and biochemistry of starch, en *Biochemistry of carbohydrates.* MTP International Rev. of Sciences. Vol.5, pag. 267-335. (W.J. Whelan, ed.) Butterworths, Univ.Park Press.
- FRYDMAN R.B. y CARDINI C.E. 1964. Biosynthesis of phyto glycogen from adenosine diphosphate D-glucose in sweet corn. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 14, 353-357.
- FRYDMAN R.B. y CARDINI C.E. 1965. Studies on adenosine diphosphate-D-glucose α -1,4-glucan α -4-glucosyltransferase of sweet corn endosperm. *Biochim.Biophys. Acta*, 96 294-303.
- FRYDMAN R.B. y CARDINI C.E. 1967. Studies on the biosynthesis of starch. II. Some properties of the adenosine diphosphate glucose-starch glucosyltransferase bound to the starch granule. *J.Biol.Chem.* 242, 312-317.
- FRYDMAN R.B. y SLABNICK E. 1973. The role of phosphorylase in starch biosynthesis, en *Storage polyglucosides.* *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 210, 153-169.
- GAHAN L.C. y CONRAD H.E. 1968. An enzyme system for de novo biosynthesis of glycogen in *A.aerogenes*. *Biochemistry*, 7, 3979-3990.
- GARVARD R. y MILHAUD G. 1952. Sur un polysaccharide isolé de *Clisotridium butyricum*. *Ann.Inst.Pasteur*, 82, 471-483.
- GEDDES R. y STRATTON C.G. 1977. Molecular and metabolic heterogeneity of liver glycogen. *Carbohydr.Res.* 57, 291-299.
- GENTNER N. y PREISS J. 1968. Biosynthesis of bacterial glycogen. VI. Diferencie in the kinetic properties of the *E.coli* B adenosine di-phosphate glucose pyrophosphorylase depending on whether Mg or Mn serves as divalent cation. *J. Biol.Chem.* 243, 5882-5891.
- GHOSH H.P. y PREISS J. 1965. The isolation and characterization of glycogen from *Arthrobacter* sp NRRL E 1973. *Biochim.Biophys.Acta*, 104, 274-277.
- GHOSH B.K., MONTENECOURT B. y LAMPEN J.O. 1973. Abnormal cell envelope structure of a *Saccharomyces* mutant with invertase formation resistant to hexose. *J. Bacteriol.* 116, 1412-1420.

- GIBBONS R.J. y KAPSIMALIS B. 1963. Synthesis of intracellular iodophilic polysaccharide by *Streptococcus mitis*. *Arch.oral Biol.* 8, 319-329.
- GIBBONS R.J. 1964. Metabolism of intracellular polysaccharide by *Streptococcus mitis* and its relation to inducible enzyme formation. *J.Bacteriol.* 87, 1512-1520.
- GOLDEMBERG S.H. 1962. Specificity of uridine-diphosphate glucose-glycogen glucosyltransferase. *Biochim.Biophys.Acta*, 56, 357-359.
- GOLDEMBERG S.H. y ALGRANATI I.D. 1969. Biosynthesis of an α -1,4-glucan by extracts of a thermophilic bacterium. *Biochim.Biophys.Acta*, 177, 166-168.
- GOLDEMBERG S.H. 1972. Glycogen from thermophilic bacteria, en *Biochemistry of the glycosidic linkage*, pags. 621-627. (R.Piras y H.Pontis, eds.) Academic Press, N.York.
- GOVONS S., GENTNER E. y PREISS J. 1973. Biosynthesis of bacterial glycogen. Kinetic characterization of an altered adenosine diphosphate glucose synthase from a "glycogen excess" mutant of *E.coli* B. *J.Biol.Chem.*, 248, 1731-1740.
- GREENBERG E. y PREISS J. 1964. The occurrence of adenosine diphosphate glucose:glycogen transglucosylase in bacteria. *J.Biol.Chem.* 239, P4314-4315.
- GREENBERG E. y PREISS J. 1965. Biosynthesis of bacterial glycogen. II. Purification and properties of the adenosine diphosphoglucose:glycogen transglucosylase of *Arthrobacter* sp. NRRL B 1973. *J.Biol.Chem.* 240, 2341-2348.
- GREENWOOD T.C. y MILNE E.A. 1968. Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. *Adv.Carbohydr.Chem.* 23, 281-366.
- GREENWOOD T.C. y MILNE E. A. 1968a. Studies on starch-degrading enzymes. VIII. A comparison of α -amylases from different sources, their properties and action pattern. *Die Starke*, 20, 139-150.
- GUNJA-SMITH Z., MARSHALL J.J., MERCIER C., SMITH E.E. y WHELAN W.J. 1970. A revision of the Meyer-Bernfeld model of glycogen and amylopectin. *FEBS Lett.* 12, 101-104.
- GUNJA-SMITH Z., MARSHALL J.J., SMITH E.E. y WHELAN W.J. 1970a. A glycogen-debranching enzyme from *Cytophaga*. *FEBS Lett.*, 12, 96-100.
- GUNJA-SMITH Z., PATIL N.B. y SMITH E.E. 1977. Two pools of glycogen in *Saccharomyces*. *J.Bacteriol.* 130, 818-825.
- HAMILTON I.R. 1968. Synthesis and degradation of intracellular polyglucose in *Streptococcus salivarius*. *Can.J.Microbiol.* 14, 65-77.

- HAMMOND B.F. 1971. Intracellular polysaccharide production by human oral strains of *Lactobacillus casei*. *Arch.oral Biol.* 16, 323-338.
- HANES C.S. 1940. The breakdown and synthesis of starch by an enzyme system from pea seeds. *Proc.Royal Soc.B*, 128, 421-450.
- HARA F., AKAZAWA T. y KOJIMA K. 1973. Glycogen biosynthesis in *Chromatium* strain D. Characterization of glycogen. *Plant and Cell Physiol.* 14, 737-745.
- HARA F. y AKAZAWA T. 1974. Glycogen biosynthesis in *Chromatium* strain D. Purification and properties of glycogen synthetase. *Plant and Cell Physiol.* 15, 545-554.
- HASSID W.Z. y ABRAHAM S. 1957. Chemical procedures for analysis of polysaccharides, en *Methods in Enzymology*, vol. III, pags. 37-38. (S.P.Colowick and N.O. Kaplan, eds.) Academic Press, N.York.
- HAWKER J.S., OZBUN J.L., OZAKI H, GREENBERG E. y PREISS J. 1974. Interaction of spinach leaf adenosine diphosphate glucose α -1,4-glucan α -4-glucosyltransferase and α -1,4-glucan- α -1,4-glucan-6-glucosyltransferase in synthesis of branched α -glucan. *Arch.Biochem.Biophys.* 160, 530-551.
- HAWORTH W.N., HIRST E.L. e ISHERWOOD F.A. 1937. Polysaccharides. Part XXIII. Determination of the chain length of glycogen. *J.Chem.Soc.* 577-581.
- HEHRE E.J., CARLSON A.S. y NEILL J.M. 1947. Production of starch-like material from glucose 1-phosphate by diphtheriae bacilli. *Science*, 106, 523-524.
- HEHRE E.J. 1949. Synthesis of a polysaccharide of the starch-glycogen class from sucrose by a cell free, bacterial enzyme system (amylsucrase). *J.Biol. Chem.* 177, 267-279.
- HELDT H.W., CHON C.J.A., MARONDE D., HEROLD A., STANKOVIC Z.S., WALKER D.A., KRAMINER A., KIRK M.R. y HEBER U. 1977. Role of orthophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 59, 1146-1155.
- HERTH W., FRANKE W.W., STADLER J.S., BITTIGER H., KEILICH G. y BROWN R.M. 1972. Further characterization of the alkali-stable material from the scales of *Pleurochysis scherfelii*: a cellulosic protein. *Planta*, 105, 79-92.
- HERS H.G. 1976. The control of glycogen metabolism in the liver. *Ann.Rev. Biochem.* 45, 167-189.
- HOBSON P.N., WHELAN W.J. y PEAT S. 1951. The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XIV. R-enzyme. *J.Chem.Soc.* 1451-1459.
- HOBSON P.N. y MANN S.O. 1955. Some factors affecting the formation of iodophilic polysaccharide in group D *Streptococci* from the rumen. *J.Gen.Microbiol.* 13, 420-435.

- HOLME T. y PALMSTIERNA H. 1956. Changes in glycogen and nitrogen-containing compounds in E.coli B during growth in deficient media.I. Nitrogen and carbon starvation. Acta Chem.Scand. 10, 578-586.
- HOLME T. y PALMSTIERNA H. 1956a. Changes in glycogen and nitrogen-containing compounds in E.coli B during growth in deficient media.II. Phosphorus and sulphur starvation. Acta Chem.Scand. 10, 1553-1556.
- HOLME T. y PALMSTIERNA H. 1956b. On the glycogen of E.coli B, its synthesis and break down and its specific labelling with ¹⁴C. Acta.Chem.Scand. 10, 1557-1562.
- HOLME T., LAURENT T. y PALMSTIERNA H. 1957. On the glycogen in E.coli B. Variations in molecular weight during growth.I. Acta Chem.Scand. 11, 757-762.
- HOLME T., LAURENT T. y PALMSTIERNA H. 1958. On the glycogen in E.coli B. Variations in molecular weight during growth. II. Acta Chem.Scand. 12, 1559-1563.
- HOLME T. 1958. On the glycogen of E.coli B. Variations in molecular weight during growth. III. Acta Chem.Scand. 12, 1564-1567.
- HOLME T. y CEDERGREN B. 1961. Demonstration of intracellular polysaccharide in E. coli by electron microscopy and by citochemical methods. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 51, 179-186.
- HOLMES E. y PREISS J. 1979. Characterization of E.coli B glycogen synthase enzymatic reactions and products. Arch.Biochem.Biophys. 196, 436-448.
- HOPP H.E. 1977. Lípidos intermediarios en algas, estudio de sus características y función en la síntesis de glicanos complejos. Tesis Doctoral.
- HORTON D. y WOLFROM M.L. 1965. Polysaccharides, en Comprehensive Biochemistry, vol. 5, pags. 185-188. (M.Florkin y Stotz E., eds.) Elsevier, Amsterdam.
- HOW M.J., WITHNALL M.T. y SOMERS P.J. 1973. Allergenic glucans from dermatophytes. Enzymic degradation. Carbohydr.Res. 26, 21-31.
- HUNT S. 1970. Glycogen, en Polysaccharide-protein complexes in invertebrates. pags. 171-175. Academic Press, N.York.
- ILLINGWORTH B., BROWN D.H. y CORI C.F. 1961. The de novo synthesis of polysaccharide by phosphorylase. Proc.Nat.Acad.Sci. 47, 469-478.
- JEANINGROS R., CREUZET-SIGAL N., FRIXON C. y CATTANEO J. 1976. Purification and properties of a debranching enzyme from E.coli. Biochim.Biophys.Acta, 438, 186-199.
- JEFFREY P.L., BROWN D.H. y ILLINGWORTH BROWN B. 1970. Studies of lysosomal α -glucosidase. I. Purification and properties of the rat liver enzyme. Biochemistry, 9, 1403-1415.

- JIRJIS R.I. y MOORE D. 1976. Involvement of glycogen in morphogenesis of *Coprinus cinereus*. *J.Gen.Microbiol.* 95, 348-352.
- JONES J.B., BOWES B. y STADTMAN T.C. 1977. *Methanococcus vannielii*: ultra-structure and sensitivity to detergents and antibiotics. *J.Bacteriol.* 130, 1357-1363.
- JOHNSON J.G. y WILSON D.B. 1977. Role of a sugar-lipid intermediate in colanic acid synthesis by *E.coli*. *J.Bacteriol.* 129, 225-236.
- KAISER W.M. y BASSHAM J.A. 1979. Light-dark regulation of starch metabolism in chloroplasts. *Plant Physiol.* 63, 109-113.
- KAMOGAWA A., FUKUI T. y NIKUNI Z. 1968. Potato α -glucan phosphorylase: crystallization, amino acid composition and enzymatic reaction in the absence of added primer. *J.Biochem.* 63, 361-369.
- KAWAGUCHI K., FOX J., HOLMES E., BOYER C. y PREISS J. 1978. De novo synthesis of *E. coli* glycogen is due to primer associated with glycogen synthase and activation by branching enzyme. *Arch.Biochem.Biophys.* 190, 385-397.
- KHANDLWAL R., SPEARMAN T.N. y HAMILTON I.R. 1972. Isolation and characterization of glycogen from *Streptococcus salivarius*. *Can.J.Biochem.* 50, 440-442.
- KHANDLWAL R.L., SPEARMAN T.N. y HAMILTON I.R. 1973. Purification and properties of glycogen phosphorylase from *Streptococcus salivarius*. *Arch.Biochem. Biophys.* 154, 295-305.
- KILLICK K. y WRIGHT B. 1974. Regulation of enzyme activity during differentiation in *Dictyostellium discoideum*. *Ann.Rev.Microbiol.* 28, 139-166.
- KINDT T.J. y CONRAD H.E. 1967. The role of primer in glycogen biosynthesis in *A.aerogenes*. *Biochemistry*, 6, 3718-3729.
- KJØLBERG O. y MANNERS D.J. 1962. α -1,4-glucosans. Part XV. Structural analysis of glycogen on a milligram scale. *J.Chem.Soc.* 4596-4600.
- KJOSBAKKEN J. y COLVIN J.R. 1975. New evidence for an intermediate polymer of glucose in cellulose biosynthesis by *Acetobacter xylinum*. *Can.J.Microbiol.* 21, 111-120.
- KORNFELD R. y BROWN D.H. 1962. The activity of some enzymes of glycogen metabolism in fetal and neonatal guinea pig liver. *J.Biol.Chem.* 238, 1604-1607.
- KREBS E.G. y PREISS J. 1975. Regulatory mechanisms in glycogen metabolism, en MTP International Review of Science, *Biochemistry of Carbohydrates*. Series one, vol.5, pags. 337-389 (W.J.Whelan, ed.) Butterworths, Londond.
- KRISMAN C.R. 1962. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analytical Biochem.* 4, 17-23.

- KRISMAN C.R. 1962a. α -1,4-glucan: α -1,4-glucan 6-glycosyltransferase from liver. *Biochim.Biophys.Acta*, 65, 307-315.
- KRISMAN C.R. y MARECHAL L.R. 1966. Regulación hormonal en el metabolismo de hidratos de carbono. *Rev.Arg.Endocr.Metab.* 12, 102-115.
- KRISMAN C.R. 1972. A possible intermediate in the initiation of glycogen biosynthesis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 46, 1206-1212.
- KRISMAN C.R. 1973. A possible intermediate in the initiation of glycogen biosynthesis., en *Storage polyglucosides.* *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 210, 81-89.
- KRISMAN C.R. y BARENGO R. 1975. A precursor of glycogen biosynthesis: α -1,4 glucan-protein. *Eur.J.Biochem.* 52, 117-123.
- KRISMAN C.R. y BARENGO R. 1975a. Assay of glucoprotein formation from uridine diphosphate glucose by a rapid filter-paper technique. *Analytical Biochem* - 66, 584-589.
- LANG N.J. 1968. The fine structure of blue-green algae. *Ann.Rev.Biochem.* 22, 15-46.
- LARNER J.,TAKEDA Y.y HIZUKURI 1976. The influence of chain size and molecular weight on the kinetic constants for the span glucose to polysaccharide for rabbit muscle glycogen synthase. *Mol.& Cell.Biochemistry*, 12,131-136.
- LASHLEY E.J.,MACALISTER T.J.,CLEMETS I. y YOUNG C. 1973. Isolation and morphology of native intracellular polyglucose granules from *Clostridium pasteurianum*. *Can.J.Microbiol.* 19, 991-994.
- LASKOV R. y MARGOLIASH E. 1963. Properties of high molecular weight glycogen from rat liver. *Bull.Res.Counc.Israel,Sect.A*, 11, 351-363.
- LAVINTMAN N. y KRISMAN C.R. 1964. The α -glucan-branching glycosyltransferase of sweet corn. *Biochim.Biophys.Acta*, 89, 193-196.
- LAVINTMAN N. 1966. The formation of branched glucans in sweet corn. *Arch. Biochem.Biophys.* 116, 1-8.
- LAVINTMAN N. y CARDINI C.E. 1973. Particulate UDP-glucose:protein transglycosylase from potato tuber. *FEBS Lett.* 29, 43-46.
- LAVINTMAN N., TANDECARZ J., CARCELLER M.,MENDIARA S. y CARDINI C.E. 1974. Role of UDP-glucose in the biosynthesis of starch. Mechanism of formation and enlargement of a glucoproteic acceptor. *Eur.J.Biochem.* 50, 145-155.
- LAZAROW A. 1942. *Anat.Record.* 84, 31-50.
- LEE E.Y.C. y WHELAN W.J. 1966. Enzymic method for the microdetermination of glycogen and amylopectin and their unit-chain lengths. *Arch.Biochem.Biophys.* 116, 162-167.

- LEE E.Y.C. y WHELAN W.J. 1971. Glycogen and starch debranching enzymes, en *The enzymes*, vol.5, pags. 191-234.
- LEHMANN M. y WOBER G. 1975. Accumulation, mobilization and turnover of glycogen in the blue-green bacteria *Anacystis nidulans*. *Biochem.Soc.Trans.* 3, 1074-1076.
- LEHMANN M. y PREISS J. 1980. Biosynthesis of bacterial glycogen: purification and properties of *Salmonella typhimurium* LT-2 ADP-glucose pyrophosphorylase. *J.Bacteriol.* 143, 120-127.
- LELOIR L.F. y CARDINI C.E. 1957. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *J.Amer.Chem.Soc.* 79, 6340-6341.
- LELOIR L.F., OLAVARRIA J.M., GOLDEMBERG S.H. y CARMINATTI H. 1959. Biosynthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose. *Arch.Biochem.Biophys.* 81, 508-520.
- LELOIR L.F., FEKETE M.A. R. de, y CARDINI C.E. 1961. Starch and oligosaccharide synthesis from UDPglucose. *J.Biol.Chem.* 236, 636-641.
- LELOIR L.F. 1964. The biosynthesis of polysaccharides. *Proc.Plenary Sessions 6th Int.Congress Biochemistry*. N.York.
- LELOIR L.F., PARODI A.J. y BEHRENS N.H. 1971. Cromatografía de los restos hidrofílicos de algunos derivados del dolicol. *Rvta.Soc.Arg.Biol.* 47, 108-110.
- LELOIR L.F., STANELONI R.J., CARMINATTI H. y BEHRENS N. 1973. The biosynthesis of a N,N'-diacetylchitobiose containing lipid by liver microsomes. A probable dolichol pyrophosphate derivative. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 52, 1285-1292.
- LEVINE S., STEVENSON H., TABOR E., BORDNER R. y CHAMBERS L. 1953. Glycogen of enteric bacteria. *J.Bacteriol.* 66, 664-670.
- LINDAHL U. y HOOK M. 1978. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Ann.Rev.Biochem.* 47, 385-417.
- LOMAKO J. 1971. *Acta Biochim.Pol.* 18, 261-269.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. y RANDALL R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265-275.
- MACASKIE L.E. y PALMER N.T. 1978. The role of amyloamylase and maltodextrin phosphorylase in the pathway of glycogen metabolism in *Escherichia coli*. *Biochem.Soc.Trans.* 6, 405-407.
- MACKENZIE C.R., MCDONALD I.J. y JOHNSON K.G. 1978. Glycogen metabolism in the genus *Neisseria*: synthesis from sucrose from amylosucrase. *Can.J. Microbiol.* 24, 357-362.

- MACKEY B.M. y MORRIS J.G. 1971. Ultrastructural changes during sporulation of *Clostridium pasteurianum*. *Can.J.Microbiol.* 66, 1-13.
- MADSEN N.B. 1961. The occurrence and enzymic synthesis of glycogen in extracts of *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim.Biophys.Acta*, 50, 194-195.
- MADSEN N.B. 1961a. The inhibition of glycogen phosphorylase by uridine diphosphate glucose. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 6, 310-315.
- MANNERS D.J. 1957. The molecular structure of glycogens. *Advan.Carbohydr.Chem.* 12, 261-298.
- MANNERS D.J. 1962. Enzymic synthesis and degradation of starch and glycogen. *Advan. Carbohydr.Chem.* 17, 371-430.
- MANNERS D.J. 1967. Branching enzymes, en Control of glycogen metabolism. *FEBS Symp.* pags. 83-100. (W.J.Whelan,ed.)Academic Press, N.York and London.
- MANNERS D.J., ROWE J.J.M. y ROWE K.L. 1968. Studies on carbohydrate-metabolising enzymes. Part XIX. Sweet-corn branching enzymes. *Carbohydr.Res.* 8,72-81.
- MANNERS D.J. 1974. Some aspects of the enzymic degradation of starch, en *Plant Carbohydrate Biochemistry; Proc. Phytochem.Soc.Symp. 1973.* pags. 109-125. (J.B. Pridham, ed.) Academic Press, London y New York.
- MANNERS D.J. 1975. Debranching enzymes in plant tissues, en *The biochemistry of 1,6- α -glucosidic linkages.* *Biochem.Soc.Trans.* 3, 49-53.
- MARECHAL L.R. y GOLDEMBERG S.H. 1964. Uridine diphosphate glucose- (β -1,3-glucan (β -3-glucosyltransferase from *Euglena gracilis*. *J.Biol.Chem.* 239, 3163-3167.
- MARKOVITZ A. y DORFMAN A. 1962. Synthesis of a capsular polysaccharide (hyaluronic acid) by protoplast membrane preparations of group A *Streptococcus*. *J.Biol.Chem.* 237, 273-279.
- MARSHALL R.D. 1972. Glycoproteins. *Ann.Rev.Biochem.* 41, 673-702.
- MARSHALL J.J. 1974. Application of enzymic methods to the structural analysis of polysaccharides. *Advan.Carbohydr.Chem.Biochem.* 30, 257-370.
- MCCRACKEN D.A. y DODD J.L. 1971. Molecular structure of starch-type polysaccharides from *Herichium ramosum* and *Herichium coralloides*. *Science*, 174,419.
- MCGREW S.B. y MALLETT M.F. 1965. Maintenance of *E.coli* and the assimilation of glucose. *Nature*, 208, 1096-1097.
- MEYER K.H. y FULD M. 1941. Recherches sur l'amidon. XII. L'arrangement des restes de glucose dans le glycogene. *Helv.Chim.Acta.* 24, 375-378.

- MEYER K.H. y JEANLOZ R. 1943. Le glycogene du muscle natif. *Helv.Chim. Acta*, 26, 1784-1798.
- MILLER J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory.
- MIURA T. y MIZUSHIMA S. 1968. Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplast membrane of E.coli K12. *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 158-161.
- MORDOH J., KRISMAN C.R. y LELOIR L.F. 1966. Further studies on high molecular weight liver glycogen. *Arch.Biochem.Biophys.* 113, 265-272.
- MORDOH J., KRISMAN C.R., PARODI A.J. y LELOIR L.F. 1968. Some properties of rat liver amylase. *Arch.Biochem.Biophys.* 127, 193-199.
- NAKAJIMA T. y BALLOU C.E. 1974. Structure of the linkage region between the polysaccharide and protein parts of *Saccharomyces cerevisiae* mannan. *J.Biol.Chem.* 249, 7685-7694.
- NIKAIDO H. 1979. Permeability of the outer membrane of bacteria. *Angewandte Chemie*, 18, 337-350.
- NORRMAN J., WOBER G. y CANTINO E.C. 1975. Variation in average unit chain length of glycogen in relation to developmental stage in *Blastocladiella emersonii*. *Mol. & Cell.Biochem.* 9, 141-148.
- NORTHCOTE D.H. 1963. The structure and organization of the polysaccharides of yeast glycogen. pags. 669-675. *Proc.Symp. on Chem.and Biochem. of fungi and yeast*, London.
- OBAIDAH M.A. y BUCK K.W. 1971. Characterization of two cell-wall polysaccharides from *Fusicoccum amygdali*. *Biochem.J.* 125, 473-480.
- OKADA G. y HEHRE E. 1974. New studies on amylosucrase, a bacterial α -D-glycosylase that directly converts sucrose to a glycogen-like α -glucan. *J.Biol.Chem.* 249, 126-135.
- OLAVARRIA J.M. y TORRES H.N. 1962. Mechanism of action of liver α -amylase. *J.Biol.Chem.* 237, 1746-1751.
- ORPIN C.G. 1973. The intracellular polysaccharide of the rumen bacterium *Eadie's Oval*. *Arch.Mikrobiol.* 90, 247-254.
- ORRELL S.A. y BUEDING E. 1964. A comparison of products obtained by various procedures used for the extraction of glycogen. *J.Biol.Chem.* 239, 4021-4026.
- ORRELL S.A., BUEDING E. y REISSIG M. 1964. Physical characteristics of undegraded glycogen, en *Control of glycogen metabolism*, pags. 29-52. *Ciba Found. Symp.* (W.J.Wheelan, y M.P. Cameron, eds.) Churchill, London.

- OSBORN M.J., GANDER J.E., PARISI I. y CARSON J. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *S.typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J.Biol.Chem.* 247, 3962-3972.
- OZBUN J.L., HAWKER J.S. y PREISS J. 1971. Adenosine diphosphoglucose-starch glucosyltransferase from developing kernels of waxy maize. *Plant Physiol.* 48, 765-769.
- OZBUN J.L., HAWKER J.S. y PREISS J. 1972. Soluble adenosine diphosphate glucose- α -1,4-glucan α -4-glucosyltransferase from spinach leaves. *Biochem.J.* 126, 953-963.
- PALMER N.T., WOBER G. y WHELAN W.J. 1973. The pathway of exogenous and endogenous carbohydrate utilization in *Escherichia coli*: a dual function for the enzymes of the maltose operon. *Eur.J.Biochem.* 39, 601-612.
- PALMER N.T. y WOBER G. 1975. The metabolic role of debranching enzymes, en *The biochemistry of 1,6- α -glucosidic linkages.* *Biochem.Soc.Trans.* 3, 53-56.
- PALMSTIERNA H. 1956. Glycogen-like polyglucose in *Escherichia coli* B during the first hours of growth. *Acta Chem.Scand.* 10, 567-577.
- PARODI A.J., MORDOH J., KRISMAN C.R. y LELOIR L.F. 1970. Action pattern of phosphorylase and glycogen synthetase on glycogen. *Eur.J.Biochem.* 16, 499-507.
- PARODI A.J. 1967. Factors affecting the molecular weight distribution of liver glycogen. *Arch.Biochem.Biophys.* 120, 547-552.
- PARODI A.J., KRISMAN C.R., LELOIR L.F. y MORDOH J. 1967. Properties of synthetic and native liver glycogen. *Arch.Biochem.Biophys.* 121, 769-778.
- PEAT S., WHELAN W.J. y THOMAS G.J. 1952. Evidence of multiple branching in waxy maize starch. *J.Chem.Soc.* 4546-4548.
- PEAT S., WHELAN W.J. y TURVEY J.R. 1956. The soluble polyglucose of sweet corn (*Zea mays*). *J.Chem.Soc.* 2317-2322.
- PEAT S., TURVEY J.R. y JONES G. 1959. The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XXIV. The purification of D- and Q-enzymes. *J.Chem.Soc.*, 1540-1544.
- PETITPREZ A. y DARIEUX J.C. 1970. Mise en évidence de polysaccharides sur quelques types de bactéries. *J.Microscopie*, 9, 263-272.
- PHELPS C.F. 1972. Polysaccharides. *Oxford Biology Readers* (J.J.Head y O. E. Lowenstein, eds.). Oxford University Press, London.
- PIRT S.J. 1965. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proc.Royal Soc. B*, 163, 224-231.

- PREISS J. y GREENBERG E. 1965. Biosynthesis of bacterial glycogen. III. The ADP-glucose transferase of E.coli B. *Biochemistry*, 4, 2328-2334.
- PREISS J., SHEN L. y PARTRIDGE M. 1965. The activation of E.coli ADP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 18, 180-185.
- PREISS J. 1969. The regulation of the biosynthesis of α -1,4 glucans in bacteria and plants. *Curr.Topics Cell.Reg.* 1, 125-160.
- PREISS J., OZBURN J.L., HAWKER J.S., GREENBERG E. y LAMMEL C. 1973. ADP-glucose synthetase and ADP-glucose- α -glucan-4-glucosyltransferase:enzymes involved in bacterial glycogen and plant starch synthesis, en Storage polyglucosides. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 210, 265-278.
- PREISS J. 1973. Adenosine diphosphoryl glucose pyrophosphorylase, en *The Enzymes*, vol. VIII, pags. 73-119.
- PREISS J., GREENBERG E. y SABRAW A. 1975. Biosynthesis of bacterial glycogen. Kinetic studies of a glucose 1-phosphate adenyltransferase from glycogen deficient mutant of Escherichia coli. *J.Biol.Chem.* 250, 7631-7638.
- PULKOWNIK A. y WALKER G.J. 1976. Metabolism of the reserve polysaccharide of Streptococcus mitior (mitis): is there a second α -1,4-glucan phosphorylase? *J.Bacteriol.* 127,281-290.
- REAVELEY D.A. y BURGE R.E. 1972. Walls and membranes in bacteria. *Adv. Microbial Physiol.* 7, 2-81.
- RECONDO E. y LELOIR L.F. 1961. Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 6, 85-88.
- RECONDO E., DANKERT M. y LELOIR L.F. 1963. Isolation of adenosine diphosphate D-glucose from corn grains. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 12, 204-207.
- RIBBONS D.W. y DAWES E.A. 1963. Environmental and growth conditions affecting the endogenous metabolism of bacteria. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 102,art.3,564-586.
- RICKSON F.R. 1973. Review of glycogen plastid differentiation in Mullerian body cells of Cecropia peltata, en Storage polyglucosides. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 210, 104-114.
- ROACH P.J. y LARNER J. 1977. Covalent phosphorylation in the regulation of glycogen synthase activity. *Mol.& Cell.Biochemistry*, 15, 179-200.
- ROBERTS P.J. y WHELAN W.J. 1960. The mechanism of carbohydrase action.V. Action of human salivary α -amylase on amylopectin and glycogen. *Biochem.j.* 76, 246-252.
- ROBSON R.L., ROBSON M.R. y MORRIS G.J. 1974. The biosynthesis of granulose from Clostridium pasteurianum. *Biochem.J.* 144, 503-511.

- ROE J., BAILEY J.M., GRAY R.R. y ROBINSON N. 1961. Complete removal of glycogen from tissues with cold TCA solution. *J.Biol.Chem.* 236, 1244-1246.
- RYMAN B.E. y WHELAN W.J. 1971. New aspects in glycogen metabolism. *Advan. in Enzymology*, 34, 285-443.
- SANDRUSS R., GODEKEN O.G. y OLAVARRIA J.M. 1966. Formation of oligosaccharides in liver. *Arch.Biochem.Biophys.* 116, 69-74.
- SANTARIUS K.A. y HEBER U. 1965. Changes in the intracellular levels of ATP, ADP, AMP and Pi and regulatory function of the adenylate system in leaf cells during photosynthesis. *Biochim.Biophys.Acta*, 102, 39-54.
- SCHILLING N. y DITTRICH P. 1979. Interaction of hydrolytic and phosphorytic enzymes of starch metabolism in *Kalanchoe daigremontiana*. *Planta*, 147, 210-215.
- SCHNAITMAN C.A. 1970. Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *E. coli*. *J.Bacteriol.* 104, 890-901.
- SCHWARTZ M. y HOFNUNG M. 1967. La maltodextrine phosphorylase d'*Escherichia coli*. *Eur.J.Biochem.* 2, 132-145.
- SHEN L., GHOSH H.P., GREENBERG E. y PREISS J. 1964. ADP-glucose-glycogen transglucosylase in *Arthrobacter* sp NRRL B 1973. *Biochim.Biophys.Acta*, 89, 370-372.
- SHEN L. y PREISS J. 1965. Biosynthesis of bacterial glycogen. I. Purification and properties of the ADP-glucose pyrophosphorylase of *Arthrobacter* sp NRRL B 1973. *J.Biol.Chem.* 240, 2334-2340.
- SHEN L. y PREISS J. 1966. Biosynthesis of bacterial glycogen. V. The activation and inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase of *A. viscosus* NRRL B 1973. *Arch.Biochem.Biophys.* 116, 375-390.
- SHEN L. y ATKINSON D.L. 1970. Regulation of ADP-glucose synthase from *E.coli*. Interactions of adenylate charge and modifier concentration. *J.Biol.Chem.* 245, 3996-4000.
- SHIVELY J.M. 1974. Inclusion bodies of prokaryotes. *Ann.Rev.Microbiol.* 28, 167-187.
- SIGAL N., CATTANEO J. y SEGEL I.H. 1964. Glycogen accumulation by wild-type and UDP-glucose pyrophosphorylase-negative strains of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 108, 440-451.
- SINGER S.J. y NICOLSON G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720-731.

- SINGER S.J. 1974. The molecular organization of membranes. *Ann.Rev.Biochemistry* 43, 805-833.
- SISTROM W.R. 1958. On the physical state of the intracellularly accumulated substrate of β -galactosides-permease in *Escherichia coli*. *Biochim.Biophys. Acta*, 29, 579-587.
- SLOCK J.A. y STAHLY D.P. 1974. Polysaccharide that may serve as a carbon and energy storage compound for sporulation in *Bacillus cereus*. *J.Bacteriol.* 120, 399-406.
- SPEARMAN T.N., KHANDELWAL R.L. y HAMILTON I.R. 1973. Some regulatory properties of glycogen phosphorylase from *Streptococcus salivarius*. *Arch.Biochem.Biophys.* 154, 306-313.
- SPENCER M.E. y GUEST J.R. 1974. Proteins of the inner membrane of *E.coli*: identification of succinate dehydrogenase by polyacrylamide gel electrophoresis with sdh amber mutants. *J.Bacteriol.* 117, 947-953.
- SPIRO R.G. 1966. Characterization of carbohydrate units of glycoprotein, en *Methods in Enzymology*, vol. VIII, pag. 26.
- STANIER R.Y., DOUDOROFF M., KUNISAWA R. y CONTOPOULOU R. 1959. The role of organic substrates in bacterial photosynthesis. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 45, 1246-1260.
- STANIER R.Y. y COHEN-BAZIRE G. 1977. Phototropic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann.Rev.Microbiol.* 31, 225-274.
- STAUDINGER H. y HUSEMAN E. 1937. *Ann.Chem.* 527, 195-198.
- STEINER K.E. y PREISS J. 1977. Biosynthesis of bacterial glycogen: genetic and allosteric regulation of glycogen biosynthesis in *S.typhimurium* LT-2. *J. Bacteriol.* 129, 246-253.
- STEUP M, PEAHEY D.G. y GIBBS M. The regulation of starch metabolism by Pi. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 72, 1554-1561.
- STEUP M. y LATZKO E. 1979. Intracellular localization of phosphorylase in spinach and pea leaves. *Planta*, 145, 69-75.
- STETTEN M.R., KATZEN H.M. y STETTEN D. 1956. Metabolic inhomogeneity of glycogen as a function of molecular weight. *J.Biol.Chem.* 222, 587-599.
- STETTEN D. y STETTEN M.R. 1960. Glycogen metabolism. *Physiol.Rev.* 40, 505-537.
- STRANGE R.E., DARK F.A. y NESS A.G. 1961. The survival of stationary phase *A.aerogenes* stored in aqueous suspension. *J.Gen.Microbiol.* 25, 61-76.

- STRANGE R. 1968. Bacterial glycogen and survival. *Nature*, 220, 606-607.
- STRASDINE G.A. 1972. The role of intracellular glucan in endogenous fermentation and spore maturation in *Clostridium* type E. *Can.J.Microbiol.* 18, 211-217
- STROMINGER J.L. y GHUYSSEN J.M. 1967. Mechanism of enzymatic bacteriolysis. *Science*, 156, 213-221.
- TAKAGI T., TODA H. e ISEMURA T. 1971. Bacterial and mold amylases, en *The Enzymes*, vol 5, pags. 235-271.
- TAKAHARA H. y MATSUDA K. 1976. The structure of *Neurospora crassa* glycogen. *Agr. Biol.Chem.* 40, 1699-1703.
- TAKAHARA H. y MATSUDA K. 1977. Biosynthesis of glycogen in *Neurospora crassa*. Existence of a glucoproteic intermediate in the initiation process. *J.Biochem.* 81, 1587-1594.
- TAKAHARA H. y MATSUDA K. 1978. Biosynthesis of glycogen in *Neurospora crassa*. Purification and properties of the UDP-glucose:glycogen-4- α -glucosyltransferase. *Biochim.Biophys.Acta*, 522, 363-374.
- TAKEUCHI T., WEINBACK E. y DIAMOND L.S. 1977. *Entamoeba histolytica*: localization and characterization of phosphorylase and particulate glycogen. *Exptl. Parasitology*, 43, 107-113.
- TANDECARZ J., LAVINTMAN N. y CARDINI C.E. 1975. Biosynthesis of starch. Formation of a glucoproteic acceptor by a potato non-sedimentable preparation. *Biochim.Biophys.Acta*, 399, 345-355.
- TANDECARZ J., SIVAK M.N. y CARDINI C.E. 1978. A primer independent form of potato tuber phosphorylase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 82, 157-164.
- TANDECARZ J. y CARDINI C.E. 1979. A new ADP(UDP) glucose glucosyltransferase activity in disrupted starch grains. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 86, 620-627.
- THOMA J.A., WRIGHT H.B. y FRENCH D. 1959. Partition chromatography of homologous saccharides on cellulose columns. *Arch.Biochem.Biophys.* 85, 452-460.
- THOMAS P. y CATTANEO J. 1971. Etude ultrastructurale et chimique des polyglucosides cytoplasmiques synthétisés par des mutants d'*E.coli* K12. *J.Microscopie* 12, 349-362.
- THOMAS P. y CHAMBOST J.P. 1978. Ultrastructure du glycogène et de l'amylose extraits d'*E.coli*. Localisation juxta-membranaire de leur néo-synthèse. *Biol.Cell.* 33, 235-242.
- TORRES H.N. y OLAVARRIA J.M. 1964. Liver α -glucosidases. *J.Biol.Chem.* 239, 2427-2434.

- TOSIC J. y WALKER T.K. 1957. *Acetobacter acidum-mucosum* Totic and Walker sp. an organism forming a starch-like polysaccharide. *J.Gen.Microbiol.* 4, 192-197.
- TREVELYAN W.E., PROCTER D. y HARRISON J.S. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 166, 4445.
- TU J.C. y MALOTRA S.K. 1977. The significance of cAMP induced alterations in the cellular structure of *Phycomyces*. *Can.J.Microbiol.* 23, 378-388.
- TURNER J.F. y TURNER D.H. 1975. The regulation of carbohydrate metabolism. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 26, 159-186.
- TURNQUIST R.L. y GAURHT HANSEN R. 1973. Uridine diphosphoryl glucose pyrophosphorylase, en *The Enzymes*, vol. VIII, pags. 51-71.
- URLAUB H. y WOBER G. 1975. Identification of isoamylase, a glycogen-debranching enzyme, from *Bacillus amyloliquefaciens*. *FEBS Lett.*, 57, 1-4.
- VAN HOUTE J. y JANSEN H.M. 1968. The iodophilic polysaccharide synthesized by *Streptococcus salivarius*. *Caries Res.* 2, 47-56.
- VAN HOUTE J. y JANSEN H.M. 1970. Role of glycogen in survival of *Streptococcus mitis*. *J.Bacteriol.* 101, 1083-1085.
- VAN VEEM W.L., MULDER E.G. y DEINEMA M.H. 1978. The *Sphaerotilus-Leptothrix* group of bacteria. *Microbiol.Rev.* 42, 329-356.
- VARDANIS A. 1968. Utilization of native primer by mammalian liver glycogen-synthetase: primer efficiency in binding the enzyme and in catalysis. *Can.J.Biochem.* 46, 579-586.
- VERHUE W. y HERS H.G. 1966. A study of the reaction catalyzed by the liver branching enzyme. *Biochem.J.* 99, 222-227.
- VIÑUELA E., ALGRANTI I.D. y OCHOA S. 1967. Synthesis of virus-specific proteins in *E. coli* infected with RNA bacteriophage MS₂. *Eur.J.Biochem.* 1, 3-11.
- WALKER G.J. y WHELAN W.J. 1960. The mechanism of carbohydrase action. 8. Structures of the muscle phosphorylase limit dextrins of glycogen and amylopectin. *Biochem.J.* 76, 264-268.
- WALKER G.J. 1965. The cell bound α -amylase of *Streptococcus bovis*. *Biochem. J.* 94, 289-298.
- WALKER G.J. y BUILDER J.E. 1967. Metabolism of the reserve polysaccharide of *Streptococcus mitis*. Properties of α -1,6-glucosidase, its separation from transglucosylase, and the action of the two enzymes on branched oligosaccharides. *Biochem.J.* 105, 937-942.

- WALKER G.J. 1966. Metabolism of the reserve polysaccharide of *Streptococcus mitis*. Properties of a transglucosylase. *Biochem.J.* 101, 861-872.
- WALKER G.J., LUKAS M.C. y LAVROVA A. 1969. Metabolism of the reserve polysaccharide of *Streptococcus mitis*. Properties of maltodextrin phosphorylase. *Carbohydr.Res.* 9, 381-395.
- WALKER G.J. y BUILDER J. 1971. Metabolism of the reserve polysaccharide of *Streptococcus mitis*. Properties of branching enzyme and its effect on the activity of glycogen synthetase. *Eur.J.Biochem.* 20, 14-21.
- WANSON J.C. y DROCHMANS P. 1968. Detection of phosphorylase with the electron microscope., en *Control of glycogen metabolism*, pags. 169-177 (W.J. Whelan, ed.), Academic Press, N.York and London.
- WARD C. y WRIGHT B.E. 1965. Cell wall synthesis in *Dictyostelium discoideum*. I. In vitro synthesis from UDP-glucose. *Biochemistry*, 4, 2021-2027.
- WEBER M. y WOBER G. 1975. The fine structure of the branched α -D-glucan from the blue-green alga *Anacystis nidulans*: comparisons with other bacterial glycogens and phytoglycogen. *Carbohydr.Res.* 39, 295-302.
- WEIL-MALHERBE H. y GREEN H.R. 1951. The catalytic effect of molybdate on the hydrolysis of organic phosphate bonds. *Biochem.J.* 49, 286-292.
- WEISMAN R.A. 1976. Differentiation in *Acanthamoeba castellani*. *Ann.Rev. Microbiol.* 30, 189-219.
- WHISTLER R. y BEMILLER J. 1962. Extraction of glycogen with dimethylsulfoxide. *Arch.Biochem.Biophys.* 98, 120-123.
- WHITE J.N.C. y STRASDINE G.A. 1972. An intracellular α -D-glucan from *Clostridium botulinum* type E. *Carbohydr.Res.* 25, 435-441.
- WILKINSON J.E. 1959. The problem of energy storage compounds in bacteria. *Exptl. Cell. Res., Suppl.* 7, 111-130.
- WOLK P.C. 1973. Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. *Bacteriol.Rev.*, 37, 32-101.
- WRIGHT D.N. y LOCKHART W.R. 1965. Effects of growth rate and limiting substrate on glucose metabolism in *E.coli*. *J.Bacteriol.* 89, 1082-1085.
- WRIGHT A. y ROBBINS P.W. 1965. The enzymatic synthesis of uridine diphosphate (¹⁴C)glucose. *Biochim.Biophys.Acta*, 104, 594-596.
- YAMADA H. y BALLOU C.E. 1979. Amylooligosaccharides from *Mycobacterium smegmatis*. *J.Bacteriol.* 139, 302-304.

- YAMATO E., ANRAKU Y. y HIROSAWA K. 1975. Cytoplasmic membranes vesicles of *Escherichia coli*. I. A simple method for preparing the cytoplasmic and outer membranes. *J. Biochem.* 77, 705-718.
- ZEVENHUIZEN L.P.T.M. 1964. Branching enzyme of *Arthrobacter globiformis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 81, 608-611.
- ZEVENHUIZEN L.P.T.M. 1966. Formation and function of the glycogen-like polysaccharide of *Arthrobacter*. *Ant. van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 32, 356-372.
- ZEVENHUIZEN L.P.T.M. y EBBINK A.G. 1974. Interrelations between glycogen, poly- β -hydroxybutyric acid and lipids during accumulation and subsequent utilization in a *Pseudomonas*. *Ant. van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 40, 103-120.