

Tesis de Posgrado

Regulación de la síntesis de glucógeno en levadura

Rothman, Lucía B.

1967

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

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

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rothman, Lucía B.. (1967). Regulación de la síntesis de glucógeno en levadura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1292_Rothman.pdf

Cita tipo Chicago:

Rothman, Lucía B.. "Regulación de la síntesis de glucógeno en levadura". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1967.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1292_Rothman.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Regulación de la síntesis de glucógeno en levadura

Autor : Lucía B. Rothman

Director : Dr. Enrique Cabib

11202 ==

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN QUÍMICA

- 1967 -

Instituto de Investigaciones Bioquímicas, "Fundación Campomar"

A mi madre

A la memoria de mi padre

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Cabib, director de esta tesis, por el apoyo y enseñanzas que me ha brindado. A él debo mi iniciación en la investigación bioquímica.

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

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme concedido una beca durante la cual he realizado este trabajo.

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

Al Dr. Romano Piras por la lectura y discusión del manuscrito.

A la Srta. Cecilia Murillo, por la copia del manuscrito.

R E S U M E N

La glucógeno sintetasa de levadura es activada por el glucosa-6-fosfato, activación que depende del pH.

Se ha encontrado que sustancias aniónicas, como el cloruro, nitrato, maleato, etc., inhiben la actividad en ausencia del éster fosfórico, pero la adición del mismo restituye la actividad al valor original. Otros aniones como el succinato, lactato y fluoruro son no inhibitorios, descartándose un efecto de fuerza iónica.

Usando cloruro como inhibidor modelo, se determinó que la inhibición es mixta respecto del UDP-glucosa. Los gráficos de actividad en función de la concentración de UDP-glucosa son hiperbólicos, tanto en ausencia como en presencia de cloruro o de glucosa-6-fosfato. En cambio, cuando se estudia la actividad en función de la concentración de glucosa-6-fosfato, manteniendo constante el nivel de cloruro, se obtienen curvas sigmoides. El sistema se comporta en forma similar cuando se varía la concentración de cloruro en presencia de glucosa-6-fosfato.

Mediante el tratamiento de la enzima con 2,4-dinitrofluorbenceno a pH8 en presencia de UDP-glucosa se obtiene una pérdida irreversible de la sensibilidad a la inhibición por cloruro sin pérdida apreciable de la actividad. Se concluye, por lo tanto, que los inhibidores aniónicos se unen a un sitio diferente del sustrato.

Estudiando la inhibición a distintos pH se en-

contró que algunas sustancias tienen mayor poder inhibitorio a pH 6, que es probablemente el pH fisiológico de la levadura, que a pH 7,5. Los inhibidores más eficaces a pH 6 son el ATP, ADP y GTP. El mecanismo de acción es similar al presentado por el cloruro. La inhibición por nucleótidos es revertida por el glucosa-6-fosfato.

Se ha determinado que el fenómeno de reversión es específico para el glucosa-6-fosfato y para el glucosamina-6-fosfato. Existen otros activadores de la enzima: 2-fosfoglicérico, 3-fosfoglicérico, trehalosa-fosfato, pero carecen de la propiedad de reactivar la inhibición por las sustancias aniónicas.

En base a las teorías actuales de regulación alostérica, se discute un modelo probable de la enzima que concuerde con sus propiedades.

Se ha postulado un mecanismo de control de la síntesis de glucógeno "in vivo", de acuerdo al cual la actividad de la glucógeno sintetasa se hallaría permanentemente inhibida por la presencia de ATP y ADP. Serían los niveles de glucosa-6-fosfato (regulados por la fosfofructoquinasa en base a las concentraciones relativas de ATP y AMP) los determinantes de la velocidad de la síntesis de glucógeno.

Existiría además un mecanismo adicional mediante el cual los iones amonio -regulando la actividad de la fosfofructoquinasa- canalizarían, cuando es necesario, el carbono de la glucosa hacia la formación de compuestos nitrogenados esenciales para el crecimiento.

I N D I C E

	Pág.
Abreviaturas.....	1
<u>I. Introducción</u>	
Propiedades del glucógeno.....	2
Enzimas sintetizantes y degradantes del glucógeno.....	5
Regulación del metabolismo del glucógeno.....	15
Antecedentes del metabolismo del glucógeno en levadura....	20
<u>II. Parte experimental</u>	
a) Materiales y métodos	
Reactivos.....	22
Enzima.....	22
Ensayo de la enzima.....	23
b) Resultados	
1- Efecto de inhibidores de la enzima y reversión por glucosa-6-fosfato.....	25
2- Reversibilidad de la inhibición.....	27
3- Cinética de la inhibición por aniones y de la re - versión por glucosa-6-fosfato.....	28
a) Cinética en función de la concentración de UDP- glucosa.....	28
b) Efecto del glucosa-6-fosfato sobre la velocidad..	31
c) Efecto del cloruro de potasio sobre la velocidad.	31
4- Desensibilización de la enzima a los inhibidores....	35
5- Propiedades de la enzima desensibilizada.....	42
6- Efecto de los activadores.....	43
7- Tentativas de desensibilización del sitio del gluco- sa-6-fosfato.....	46
8- Curva de pH de la glucógeno sintetasa.....	47
9- Efecto del pH sobre la inhibición de la enzima.....	49

10-	El efecto del pH y la inhibición por nucleótidos...	50
11-	Cinética de la inhibición por ATP.....	51
12-	Pérdida de la sensibilidad a la inhibición por ATP.	55
13-	Mecanismo de acción del ATP.....	55
14-	Sedimentación de la enzima en presencia de ATP.....	56
15-	Efecto de los iones magnesio.....	58
16-	Reproducibilidad de los resultados.....	60

III. Discusión

1-	Consideraciones cinéticas.....	61
a)	Sobre la inhibición.....	61
b)	Sobre la reversión.....	62
c)	Sobre la activación.....	62
2-	Teorías y modelos de regulación alostérica.....	63
3-	Aplicaciones de las teorías alostéricas a la glucógeno sintetasa de levadura.....	66
4-	Modelo tentativo para la glucógeno sintetasa de levadura.....	67
5-	La inhibición por nucleótidos.....	70
6-	Proposición de un mecanismo de regulación de la actividad de la glucógeno sintetasa de levadura.....	72
7-	Consideraciones sobre la regulación por metabolitos y por hormonas en seres de distinto grado de complejidad.....	75

Bibliografía.....	77
-------------------	----

ABREVIATURAS

ADP	-5' adenosina difosfato
AMP	-5' adenosina monofosfato
3'5' AMP	-3'5' adenosina monofosfa to cíclico
ATP	-5' adenosina trifosfato
DNFB	-2-4 dinitrofluorbenceno
EDTA	-Etilendiamintetraacetato
ΔF	-variación de energía li- bre
F-6-P	-fructosa-6-fosfato
F-1,6-P	-fructosa-1,6-difosfato
(Glucosa) _{n-1} , (Glucosa) _n , (Glucosa) _{n+1}	-Glucógeno
G-1-P	-Glucosa-1-fosfato
GNH ₂ -6-P	-Glucosamina-6-fosfato
G-6-P	-Glucosa-6-fosfato
GDP	-5' guanosina difosfato
GMP	-5' guanosina monofosfato
GTP	-5' guanosina trifosfato
KAF	-factor proteico soluble necesario para obtener efecto de Ca ²⁺
P _i	-fosfato inorgánico
PP _i	-Pirofosfato
-P	-fosfato
PFK	-Fosfofructoquinasa
PMB	-p-mercuri benzoato
UDP	-5' uridina difosfato
UDPG, UDP-glucosa	-Uridina difosfato glucosa
UMP	-5' uridina monofosfato
UTP	-5' uridina trifosfato

I. INTRODUCCION

El glucógeno, polisacárido ramificado de glucosa, se halla ampliamente distribuido: mamíferos, invertebrados, bacterias, levaduras, etc. (1).

En todos los organismos es una fuente de reserva de hidratos de carbono, y por lo tanto, es fuente de energía.

PROPIEDADES DEL GLUCOGENO

El glucógeno tiene un peso molecular que varía entre 10^6 y 10^9 (2), dependiendo del origen y del método de extracción (3).

La estructura comunmente aceptada para el mismo se debe a Meyer (4) (Fig. 1). Presenta cadenas lineales de 10 a 14 glucosilos conectados entre sí por uniones $\alpha(1-4)$, ligadas a cadenas adyacentes por uniones glucosídicas $\alpha(1-6)$ (Fig.2). Los puntos de ramificación, es decir las uniones $\alpha(1-6)$ constituyen un 8% de las uniones totales (1). De esta forma, la longitud de las cadenas terminales es de 6 a 9 unidades glucosilos y las cadenas interiores poseen 3 a 4 glucosilos (5,6).

En la Tabla I se hallan resumidas las principales características estructurales de la molécula de glucógeno. En la parte (b) se presentan las propiedades del glucógeno de levadura.

Según Northcote, el glucógeno de levadura es similar al glucógeno de mamíferos (9), aunque mediciones de viscosidad parecen indicar que posee una mayor asimetría que el glucógeno animal.

TABLA I - Propiedades del glucógeno				
Propiedad	Mamiferos - (a)	Ref.	Levadura - (b)	Ref.
\overline{CL} (x)	10-14	1	12-13	9-10
Número de uniones $\alpha(1-6)$ o ramas externas	8-10%	1		
Longitud de cadenas terminales (xx)	6-9	1	8-9	9-10
Límite de β aminólisis	40-50%	1	44-50%	9-10
Longitud de cadenas terminales después de acción de β amilasa	2,5	1		
Longitud de cadenas terminales después de acción de fosforilasa de músculo	4	7		
Longitud de cadenas interiores	3-4	1	2-4	9-10
Coloración con I_2	marrón rojizo	1		
λ_{max} en $I_2, Cl_2 Ca$	460 $m\mu$	8		

(x) \overline{CL} : Longitud de cadena o número de residuos de D-glucosa por glucosilo terminal

(xx) : en residuos de glucosa

ENZIMAS SINTETIZANTES Y DEGRADANTES DEL GLUCÓGENO

El metabolismo del glucógeno puede esquematizarse en dos etapas fundamentales: la biosíntesis y la degradación, etapas que se desarrollarán a continuación.

A Degradación del glucógeno:

I. Fosforilasa: (α 1-4 glucan; ortofosfato-glucosil transferasa).

Esta enzima, fundamental en la degradación del glucógeno, cataliza la siguiente reacción:



Su función consiste en acortar las cadenas exteriores mediante el mecanismo de fosforólisis comenzando del extremo no reductor, y deteniéndose al llegar a 3-4 residuos glucosilos anteriores al punto de ramificación. Esta reacción es reversible "in vitro".

Tanto en músculo (12) como en hígado (13), la fosforilasa existe en más de una forma. En músculo se halla en dos formas interconvertibles (14), una activa o fosforilasa a y otra inactiva o fosforilasa b. La fosforilasa a posee 60-70% de su actividad máxima en ausencia de AMP mientras que la fosforilasa b requiere en forma absoluta la presencia de dicho cofactor para su actividad (x).

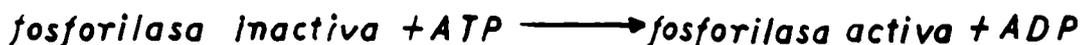
Ambas fosforilasas, a y b, son interconvertibles enzimáticamente. La fosforilasa b es convertida en fosforilasa a por la acción de la fosforilasa b quinasa (16-17) en presencia de

(x) Esto último no ocurre en la fosforilasa inactiva de hígado que sólo presenta actividad a altas concentraciones salinas (15).

de ATP de tal forma que cuatro moles de fosfato son incorporados por mol de fosforilasa a:



Esta reacción no es general dado que no ocurre en la fosforilasa de hígado ni en la de músculo de langosta (18). En hígado, la transformación de fosforilasa inactiva en fosforilasa activa no ocurre a través de una dimerización sino mediante la siguiente reacción (19):



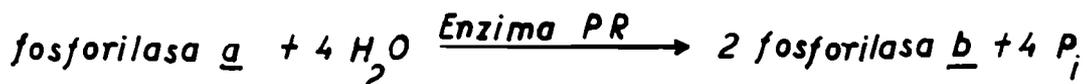
A su vez, la fosforilasa b quinasa existe en dos formas: cuando la enzima ha sido recientemente extraída, tiene muy poca actividad debajo de pH 7, actividad que aumenta algo al medirla a pH 8 (20). Esta forma ha sido denominada fosforilasa b quinasa inactiva y puede ser activada por:

a) preincubación con calcio y una proteína soluble denominada "KAF" o "kinase activating factor" (21).

b) incubaciones con ATP-Mg^{2+} - 3'5' AMP (22).

c) incubaciones cortas con tripsina (23).

La fosforilasa a es transformada en fosforilasa b mediante la acción de la fosforilasa a fosfatasa o enzima PR (24-25) según la siguiente reacción:



Esta enzima es altamente específica para la fosforilasa a (26). La reacción es inhibida por AMP que se combina con el sustrato, es decir con la fosforilasa a, y también por la presencia conjunta de glucosa-1-fosfato y Mg^{2+} . Esta propiedad puede servir así como mecanismo de control de la glucogenólisis (25).

II. Sistema deramificante:

Se ha visto que la fosforilasa degrada las ramas exteriores obteniéndose una dextrina límite que posee de tres a cuatro unidades de glucosa por cadena exterior (7). Esta dextrina es posteriormente atacada por la oligo 1-4,1-4 glucan transferasa (27) que transfiere residuos de maltotriosa de cadenas dadoras a cadenas receptoras, ya sea inter o intramolecularmente, dejando residuos $\alpha(1-6)$ de glucosa en posición terminal.

En este punto actúa la amiló (1-6) glucosidasa liberando D-glucosa. Quedan así nuevas cadenas lineales de $\alpha(1-4)$ glucosilos que pueden ser atacadas por la fosforilasa.

Se ha demostrado que con la acción de estas enzimas, que aparentemente se hallan formando parte de una misma molécula proteica, se puede llegar a una deramificación total del glucógeno en ausencia de fosforólisis (28,29).

III. Otras enzimas degradantes del glucógeno:

La degradación del glucógeno no es llevada a cabo exclusivamente por el mecanismo de fosforólisis, como en el caso de la fosforilasa, sino que también puede ser atacado por enzimas hidrolíticas.

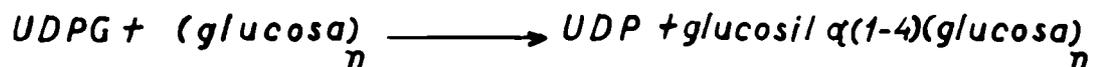
a) α amilasa (α 1-4 glucano hidrolasa): actúa en dos etapas (30): el primer paso consiste en liberar maltotriosa, maltotetraosa,

maltopentosa y algo de maltosa, pero no glucosa, de las cadenas exteriores (uniones α 1-4). En la segunda etapa se ataca el glucógeno restante obteniéndose maltosa y productos ramificados, dado que esta enzima no ataca las uniones α (1-6) (31, 32).

b) γ amilasas (α 1-4 glucan glucohidrolasas): separan residuos de D-glucosa del glucógeno a partir del extremo no reductor, obteniéndose por lo tanto glucosa y una dextrina límite de alto peso molecular o γ dextrina (33). Dado que vía fosfordólisis o α amilólisis la glucosa no es liberada como producto inicial, la amilólisis podría ser un camino importante cuando el organismo requiere una rápida liberación de glucosa.

B. Síntesis de Glucógeno:

I. Glucógeno sintetasa (UDPG: α 1-4 glucan α 1-4-glucosiltransferasa) cataliza la siguiente reacción:



Esta enzima transfiere glucosa del dador, o uridina difosfato glucosa (UDPG), al aceptor, o cadena externa del glucógeno, para formar uniones α (1-4).

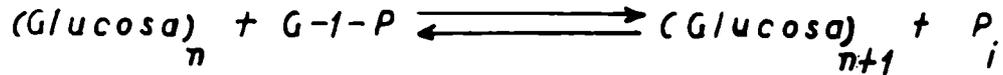
Hasta su descubrimiento, se creía que la fosforilasa era la enzima causante de la síntesis del glucógeno "in vivo", tanto como lo es "in vitro".

No obstante existen evidencias que indican que esto no sucede:

a) La epinefrina y el glucagon (34) o altas concentraciones de sodio en cortes de tejido de hígado (35) producen una estimulación

de la fosforilasa, pero, se ha demostrado que en esas condiciones sólo hay ruptura del glucógeno (36).

b) Recordando que la reacción que cataliza la fosforilasa es:



la constante de equilibrio para dicha reacción será:

$$K = \frac{(Glucosa)_{n+1} (P_i)}{(Glucosa)_n (G-1-P)}$$

Pero, dado que el agregado de una molécula de glucosa mediante el mecanismo de la fosforilasa, no hace variar el número de glucosilos terminales se tiene:

$$(Glucosa)_n = (Glucosa)_{n+1}$$

Y por lo tanto

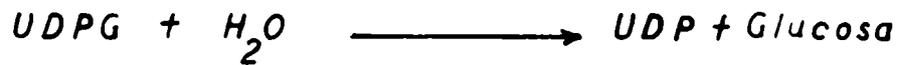
$$K = \frac{(P_i)}{(G-1-P)} \quad (37)$$

La constante K depende del pH, debido a los diferentes pK_i del fósforo inorgánico y del Glucosa-1-fosfato. A pH 7 su valor es de 3,2. Por otro lado se ha demostrado que la relación de P_i/G-1-P, estimada por las mediciones de fósforo inorgánico total y del glucosa-1-fosfato, es de 300 en diafragma de rata (38) y de 36 a 53 en levadura (39). Para el diafragma de rata,

este valor es 100 veces mayor que el de la constante de equilibrio y por lo tanto se deduce que la reacción de ruptura del glucógeno estará ampliamente favorecida "in vivo".

c) Cuando la enzima actuante es la fosforilasa, la energía necesaria para la síntesis será provista por la energía libre de hidrólisis del glucosa-1-fosfato, que se ha estimado en 5Kcal (40).

Teniendo en cuenta la reacción hipotética:



se ha determinado que , a pH 7,5, la energía libre de hidrólisis del uridina difosfato glucosa es de 8 K cal (41).

$$\begin{array}{r} \Delta F_{UDPG} = 8 \text{ Kcal} \\ \Delta F_{G-1-P} = 5 \text{ Kcal} \\ \hline \Delta F_{total} = 3 \text{ Kcal} \end{array}$$

Se puede observar que UDP-glucosa es un sustrato energéticamente más favorable que el glucosa-1-fosfato (en 3K cal) para ceder glucosilos.

d) En casos de ciertas miopatías en que la fosforilasa está ausente, o muy disminuida, se han determinado niveles de glucógeno normales o algo aumentados (42, 43,44, 45).

Por otra parte, en enfermedades en que no se acumula glucógeno ("glyoogen storage deficiency") (46) se han medido niveles normales de fosforilasa pero ausencia completa de glucógeno sintetasa.

Actualmente no existen dudas acerca del rol de la glucógeno sintetasa, descubierta en hígado por Leloir y Cardini (47), en la síntesis del glucógeno.

Posteriormente, esta enzima ha sido encontrada en músculo (48, 49), levadura (50), y muchos otros organismos.

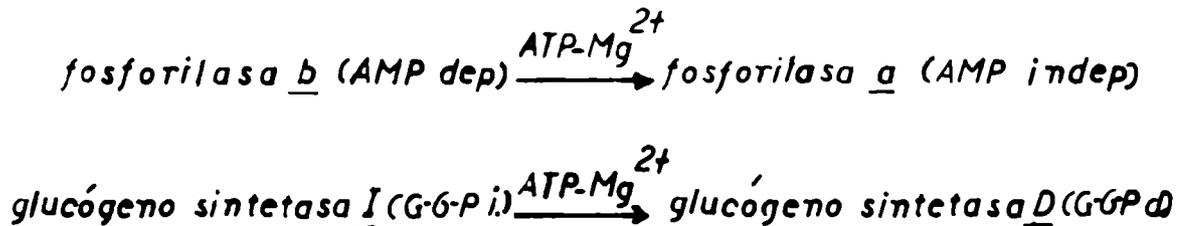
Probablemente, la propiedad más importante de esta enzima es su activación por el glucosa-6-fosfato. Esta activación varía de acuerdo a la preparación y a la especie de la cual proviene. Así, las enzimas de *Agrobacterium tumefaciens* (52), músculo de langosta (53), y cuerpo graso de cucaracha (54) no son activadas por el glucosa-6-fosfato. Casos intermedios se encuentran en las enzimas de músculo de conejo (55), o rata (56) y levadura (50), mientras que las de músculo fresco de perro (57) y de rana (58,51) presentan un requerimiento absoluto para la presencia de dicho cofactor. Leloir y col. (48) y Traut (51) han demostrado que la glucosa del éster fosfórico no interviene en la reacción, es decir que no se incorpora al glucógeno.

Tomando como evidencias las características de esta activación Traut (51) y Villar-Palasi y Larner (59) aislaron y purificaron dos formas de la glucógeno sintetasa, que denominaron:

Independiente (I): activa en ausencia de G-6-P y

Dependiente (D) : sólo activa en presencia de G-6-P

Tanto las enzimas "I" y "D" de músculo (61,62) como las enzimas de hígado (63) son enzimáticamente interconvertibles entre sí. La obtención de glucógeno sintetasa D a partir de la forma I ocurre a través de un proceso similar a la transformación de fosforilasa b en a (51, 60).



Esta última reacción es activada por la presencia de (66) 3'-5' AMP. La transformación de la enzima independiente en la forma dependiente ha sido llevada a cabo en presencia de ATP -P³². Posteriormente, por degradación de la proteína radioactiva se determinó que el fosfato radioactivo se había incorporado a una serina (64), en forma similar a lo obtenido con la fosforilasa b quinasa de músculo (65). Aunque las enzimas, fosforilasa b quinasa y glucógeno sintetasa, tienen propiedades similares (66,67) existen evidencias (68) de que ambas actividades enzimáticas están asociadas a proteínas diferentes.

La similitud entre las dos transformaciones es aún más marcada dado que el pasaje de forma I a D puede efectuarse, además, por:

a) incubación de la forma I con calcio y un factor proteico soluble que parece similar al "KAF" del sistema de fosforilasa b quinasa (69).

b) incubación de la forma I con tripsina (66).

La transformación inversa, es decir el pasaje de D a I, ocurre mediante la incubación de preparaciones crudas con agentes sulfidrilicos (56).



En esta reacción ha sido involucrada una fosfatasa dado que durante la transformación se libera P^{32} existente en la glucógeno sintetasa D preparada a partir de ATP- P^{32} (62).

En cuanto a la glucógeno sintetasa de hígado, comparte muchas propiedades con la enzima de músculo, pero, además de las formas I y D, Hizukuri y Larner (63) han descrito una forma inactiva, aún en presencia de Glucosa-6-fosfato. Esta forma es convertible en la forma independiente por incubación con Glucosa-6-fosfato y Mg^{2+} .

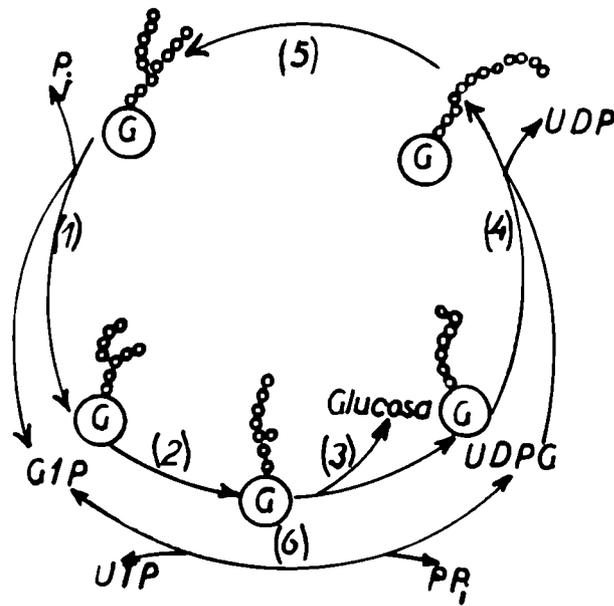
II. Enzima ramificante:

Como hemos visto, la glucógeno sintetasa solamente produce uniones $\alpha(1-4)$ alargando las cadenas exteriores.

Para producir la estructura ramificada típica del glucógeno, es necesaria la acción de una segunda enzima: la enzima ramificante (amiló 1-4,1-6 transglucosidasa) cuya misión es transferir parte de las cadenas exteriores (uniones $\alpha(1-4)$) a otra parte de la molécula formando uniones $\alpha(1-6)$ (70-71). La transferencia se produce cuando el largo de las cadenas externas ha alcanzado a 10-12 unidades, trasladando entonces un segmento de 6 o más grupos glucosilos (72).

Figura 3

Metabolismo del Glucógeno



-  : glucógeno
- (1) : fosforilasa
- (2) : oligo 1-4,1-4 glucantransferasa
- (3) : amilo 1,6 glucoosidasa
- (4) : glucógeno sintetasa
- (5) : enzima ramificante
- (6) : UDPG pirofosforilasa

REGULACION DEL METABOLISMO DEL GLUCOGENO

La regulación del metabolismo celular se lleva a cabo gracias a variaciones de la actividad enzimática, variaciones que pueden ser debidas a tres causas principales:

- a) cambios en la concentración de metabolitos específicos.
- b) variaciones en las propiedades de la enzima.
- c) aumento o disminución de la cantidad de enzimas.

Las células utilizan estos delicados recursos para la acumulación o para el uso de sus reservas de glucógeno, en los momentos apropiados.

La concentración del glucógeno en las células cambia rápidamente en respuesta a diversas condiciones y agentes. Estos cambios en los niveles de glucógeno parecen ser debidos principalmente a la acción de dos enzimas: la fosforilasa y la glucógeno sintetasa.

Las demás enzimas intervinientes en el proceso, es decir: enzimas ramificantes, desramificantes, amilasa, parecen estar en exceso y no se conocen propiedades regulatorias de las mismas. Se supone, por lo tanto, que no intervienen en este proceso de regulación (73).

I. Regulación del nivel de glucógeno en músculo:

Mediante el uso de técnicas rápidas para determinar toda actividad enzimática, Danforth, Helmreich y Cori (74) demostraron que casi un 95% de la fosforilasa total se halla presente en la forma b. Por lo tanto, durante el reposo, su actividad estaría regulada por los niveles de AMP, como activador, y de ATP y

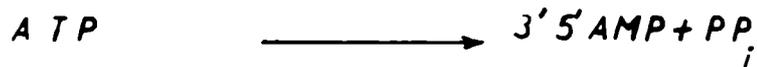
Glucosa-6-fosfato como inhibidores (75,76).

Cuando se produce la contracción muscular debe degradarse el glucógeno para producir energía. En músculo Sartorio de rana, Danforth y cel. han demostrado que hay transformación de fosforilasa b en fosforilasa a (74). Existen varias líneas de evidencia que hacen pensar que esta transformación es mediada por la acción del ión calcio y un factor proteico (KAF). Por un lado, se ha determinado que durante la excitación de las fibras musculares el calcio penetra dentro de la célula (77, 78). Esto determina que el glucógeno y sus enzimas se hallen en un medio con calcio. En ese momento, se produciría la transformación de fosforilasa b en a mediada por la fosforilasa b quinasa, activa gracias a la acción del calcio y del "KAF" (79) (*). En consecuencia, se desencadenaría el proceso glucogenolítico necesario para el suministro de energía.

Paralelamente, gracias a un mecanismo similar, la glucógeno sintetasa independiente se convertiría a la forma dependiente (69), deteniéndose la síntesis de glucógeno.

a) Acción de la adrenalina:

La acción de la adrenalina está localizada primariamente a nivel de la membrana celular (80, 81). Allí activaría a la adenil ciclasa, enzima que cataliza la siguiente reacción:



(*) Estos resultados se hallan en duda, debido a que la transformación mediada por "Ca + KAF" involucra una acción proteolítica que es, por lo tanto irreversible.

El 3'-5' AMP actuaría como mensajero de la adrenalina provocando una activación de la fosforilasa p quinasa inactiva. El resultado final de esta cadena de reacciones es la transformación de fosforilasa p en a (83).

Paralelamente, el 3'-5' AMP actuaría sobre la glucógeno sintetasa quinasa, convirtiendo la glucógeno sintetasa independiente en dependiente (84, 85).

Tanto la adrenalina como la contracción muscular tienen efectos glucogenolíticos, es decir que mediante el balance fosforilasa/glucógeno sintetasa se produce la degradación neta del glucógeno. En forma opuesta actúan la insulina y los glucocorticoides.

b) Acción de la insulina:

Villar-Palasi y Larner, trabajando con hemidiafragmas de ratas, encontraron que la insulina aumenta la cantidad de glucógeno sintetasa independiente, produciendo paralelamente un pequeño aumento de la enzima total, (I + D). Este aumento de la cantidad de la forma I parece producirse a partir de la forma D (59). Paralelamente los mismos investigadores han hallado aumentos en los niveles de glucosa-6-fosfato (86). Por lo tanto, la acción de la insulina parece radicar en la glucógeno sintetasa y no en la fosforilasa. Este hecho llama la atención dado que los mecanismos de regulación hasta el momento conocidos, actúan paralelamente sobre ambos sistemas: la degradación (a nivel de la fosforilasa p quinasa) y la síntesis (a nivel de la glucógeno sintetasa).

En resumen, la insulina parece controlar la sintesis preferencial del glucógeno, directamente a partir de la glucosa.

II. Acción de los glucocorticoides:

Su rol, no está todavía claramente definido. Se ha determinado que, aún en ayunas, producen aumento del glucógeno hepático. Esto es debido a un aumento de la gluconeogénesis, es decir de la producción de azúcares a partir de sustancias tales como los aminoácidos.

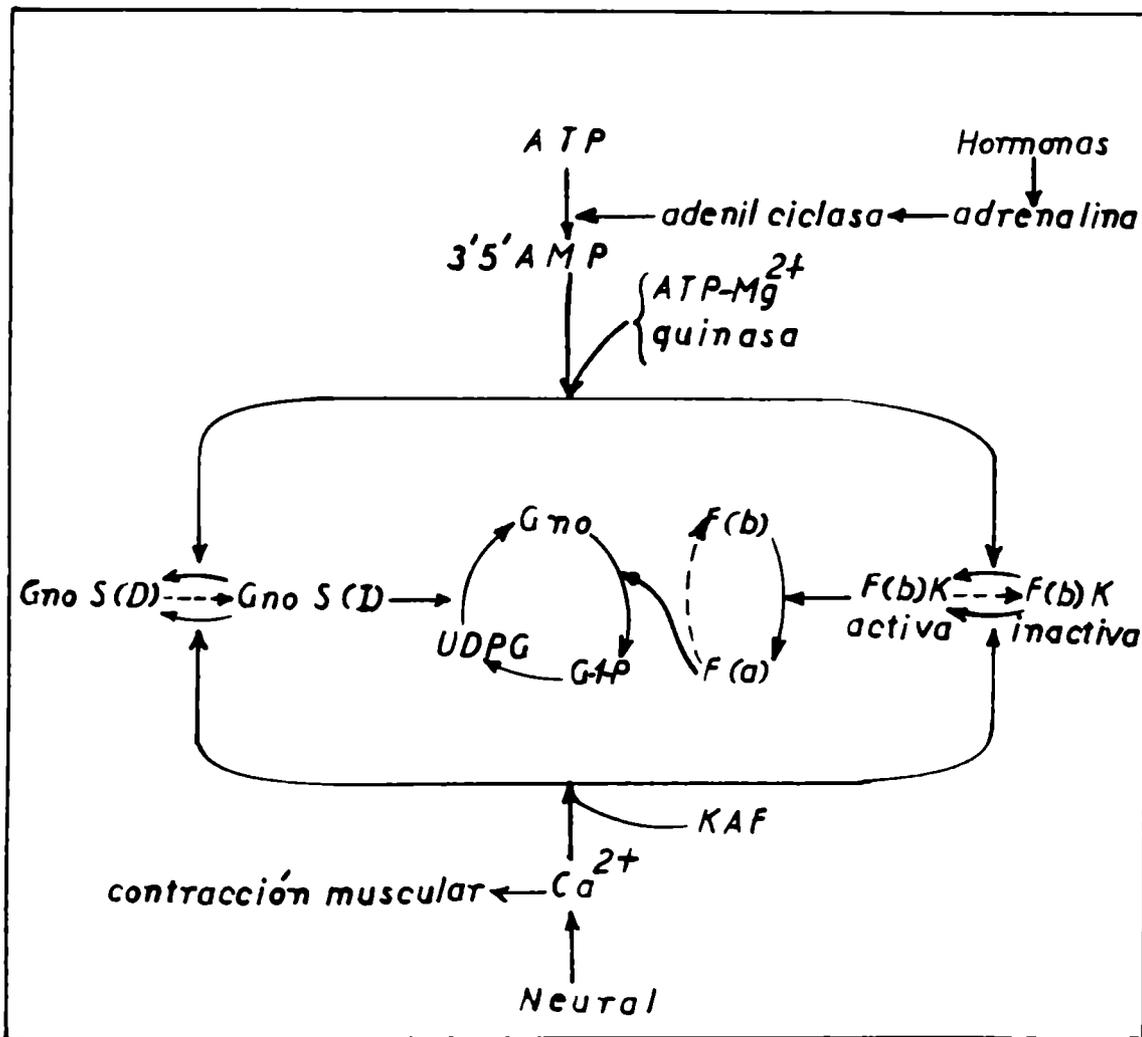
Tarnowski y col. (87) indican que el aumento observado en los niveles de glucógeno se debe a la acción indirecta de las hexosamonofosfatos (*). Estas actuarían a dos niveles:

- a) mediante la activación de la glucógeno sintetasa.
- b) por un mecanismo de inducción, produciendo un aumento en los niveles de enzima.

(*) Sin embargo, Hornbrook y col. (88) atribuyen estos resultados a la liberación de Glucosa-6-fosfato resultante de la glucogénesis provocada por la isquemia que ocurre inmediatamente después de la muerte del animal.

Figura 4

Regulación del Metabolismo del Glucógeno



- Gno** : glucógeno
- Gno S**: glucógeno sintetasa
- F(b)K**: fosforilasa (b) quinasa
- F(X)** : fosforilasa (a) o (b)
- : acciones fosfatásicas

ANTECEDENTES DEL METABOLISMO DEL GLUCÓGENO EN LEVADURA

La célula de levadura posee dos hidratos de carbono de reserva: el glucógeno y la trehalosa. Este es un disacárido (α -D glucopiranosil - α -D glucopiranosido) de glucosa. Ambos azúcares se hallan en el citoplasma.

La trehalosa parece existir libre en la célula. La síntesis de este disacárido se produce mediante la siguiente reacción (89):



Posteriormente el éster fosfórico es hidrolizado mediante una fosfatasa específica (90). La trehalasa es la enzima que produce su movilización.

La observación al microscopio de células de levadura teñidas con yodo sugiere que el glucógeno se halla en el citoplasma en solución y disperso en forma de gránulos (91). Cuando las células de levadura son molidas con perlas de vidrio (92) y se separan las paredes por centrifugación a 1500 x g, el glucógeno sedimenta recién a 14000 x g en forma de finas partículas. No obstante, se desconoce la proporción del glucógeno total que se halla en forma particulada.

En 1938 Cori y col. demostraron, usando extractos dializados de levadura, que la degradación del glucógeno se produce vía fosforólisis. No obstante la enzima aún no ha sido purificada y se desconocen sus propiedades (por ejemplo: existencia de dos formas de la misma (93)).

En extractos de levadura, Gunja y col. (94), encontraron una enzima a la que denominaron isoamilasa o enzima dera-

nificante.

Por lo tanto la degradación del glucógeno se lleva a cabo por la acción conjunta de estas dos enzimas: fosforilasa e isomilasa.

En cuanto a la síntesis del glucógeno, Algranti y Cabib (50) aislaron y purificaron la enzima responsable. Esta es similar a las de hígado y músculo pero sus propiedades cinéticas son diferentes y no utiliza como "primer" oligosacáridos.

Como ya hemos visto, esta enzima es activada por el glucosa-6-fosfato. Este efecto es relativamente pequeño a pH fisiológicos (pH 6), aunque es más notable a pH elevados.

Dado que el glucosa-6-fosfato se halla en el camino metabólico de la síntesis del glucógeno y es un activador de la misma nos hallamos ante un fenómeno de "activación por precursor". Este hecho ha llamado la atención debido a la probable importancia del mismo "in vivo".

Los estudios efectuados sobre las características de la activación por glucosa-6-fosfato y el rol de este fenómeno en la regulación de la glucógeno sintetasa de levadura serán relatados y discutidos a continuación.

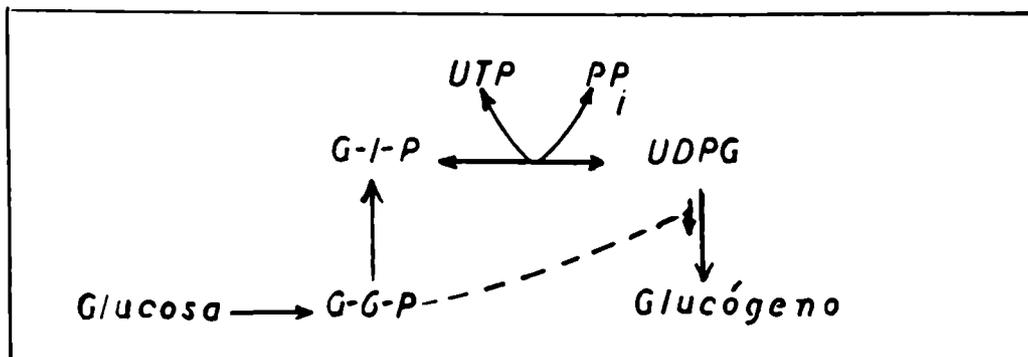


Figura 5. Metabolismo del Glucógeno en Levadura
---↓ : activación por G-6-P.

II. PARTE EXPERIMENTAL

a) Materiales y métodos

Reactivos

El AMP, ADP, ATP, UMP, UDP, UTP, GMP, GDP, GTP, el G-6-P y glucógeno fueron obtenidos de Sigma Chemical Company(USA).

El UTP fue purificado por cromatografía en etanol - acetato de amonio 1 M (7,5:1) (95) para liberarlo de posibles impurezas de UDP.

El UDPG fue una donación de Boehringer & Soehne (Alemania).

El UDP-glucosa C¹⁴ fue sintetizado de acuerdo a Roseman y col. (96) a partir de glucosa C¹⁴-1-fosfato u obtenido de International Chemical and Nuclear Corporation (USA).

El ácido corísmico, el ácido 3-deoxi-D-arabino heptalesónico-7-fosfato y el enolpiruvilshikimate-5-fosfato fueron obsequiados por los Dres. D. Sprinson y J.A. DeMoss.

Las demás drogas usadas fueron de origen vario y se utilizaron sin purificación previa.

Enzima

La glucógeno sintetasa de levadura fue purificada según Algranati y Cabib (50) con algunas modificaciones.

Purificación de la Enzima (50)

Fración	Factor de purificación	Recuperación %
Extracto crudo dializado	1	100
Sulfato de amonio (precipitado)	1,6	90
Producto absorbido a amilosa	56	31
Primer eluido	482	15
Segundo eluido	182	5

Se efectuaron las siguientes modificaciones a la preparación original:

-El tratamiento con sulfato de amonio se hizo en presencia de mercaptoetanol 10^{-2} M.

-La diálisis del precipitado del sulfato de amonio se realizó en presencia de mercaptoetanol 5×10^{-3} M.

-Se eliminaron los lavados con sulfato de amonio al 25% de saturación de la enzima absorbida a la amilosa retrogradada.

Ensayo de la enzima

La mezcla de incubación contiene: buffer glicilglicina 0,1 M de pH 7,5, UDP - glucosa C^{14} 0,4 mM (uniformemen

te marcada en la glucosa de actividad específica 375.000 opm/ μ mol) glucógeno 3% y enzima en un volumen total de 0,050 ml.

Después de incubar durante 15 min. a 30°C, se agregaron 0,25 ml de hidróxido de potasio al 33% y los tubos fueron mantenidos durante 10 min. en baño de agua hirviente. Posteriormente se agregó 0,25 ml de agua y se precipitó el glucógeno con 0,7 ml de etanol 96%. Después de una segunda precipitación se redisolvió el glucógeno en agua para transferirlo a planchetas de acero inoxidable o vidrio. Las muestras así preparadas fueron medidas en un contador de flujo gaseoso.

Para asegurar la ausencia de actividad amilolítica se incubó glucógeno - C¹⁴ con la enzima en las condiciones del ensayo pero omitiendo el agregado de UDP-glucosa. Esta prueba fue hecha en ausencia y en presencia de 0,1 M ClK, dado que el ión cloruro es un activador de la amilasa. De estos tubos se realizó el glucógeno y se determinó la radioactividad remanente como se indicó en el párrafo anterior. Se encontró que no hubo pérdida de radioactividad.

b) Resultados

1 - Efecto de inhibidores de la enzima y reversión por glucosa-6-fosfato.

Al estudiar las características de la activación por glucosa-6-fosfato llama la atención el hecho de que dicho efecto sea relativamente pequeño, lo cual hace dudar de su importancia "in vivo".

Al determinar algunos aspectos cinéticos de este efecto se encontró, accidentalmente, que el cloruro era inhibitorio y que dicha inhibición era contrarrestada por la presencia de glucosa-6-fosfato.

Como se ve en la Tabla I, esta propiedad es compartida por una serie de sustancias.

Se puede observar que el efecto inhibitorio se obtiene a concentraciones relativamente elevadas (0,1 - 0,2 M) y por lo tanto no fisiológicas. No obstante se descarta un efecto de tipo iónico dado que compuestos como el succinato, fluoruro, malato, β hidroxibutirato y acetato no son inhibitorios.

Dado que las sustancias probadas fueron usadas como sales de potasio se deduce que la inhibición es debida al anión y es independiente de la presencia del catión; por ejemplo en un determinado experimento el cloruro de potasio 0,2 M inhibió 76,5%. Al reemplazar el potasio por sodio la inhibición fue de 80%.

Por otra parte, se puede observar que existe una cierta especificidad para la inhibición, dado que análogos estructurales como el maleato y fumarato o piruvato y lactato no se comportan de la misma forma.

TABLA I - Efecto inhibitorio de diferentes aniones y su reversión por glucosa-6-fosfato (1)

Adiciones a la mescla de reacción	Concen- tración M	Actividad		Factor de activación $\frac{-0-6-P}{+0-6-P}$
		- 0-6-P	+ 0-6-P	
Ninguna	-	100	171	1,71
Cloruro	0,2	40	160	4
Bromuro	0,1	55	162	2,95
Ioduro	0,1	13	78	6
Fluoruro	0,2	111	203	1,85
Nitrato	0,1	44	142	3,2
Sulfato	0,1	36	140	3,9
Fosfato	0,2	35	140	4
Piruvato	0,2	68	170	2,7
Lactato	0,2	114	166	1,46
Acetato	0,2	123	210	1,68
Oxalato	0,2	15	163	10,8
Malato	0,2	96	160	1,67
Malonato	0,2	55	148	2,7
Succinato	0,2	100	148	1,48
Maleato	0,2	19	170	7,9
Fumarato	0,2	70	185	2,65
Oxalacetato	0,2	37	162	4,4
Glicolato	0,2	87	178	2,05
β hidroxibutirato	0,2	100	160	1,6
UDP	5×10^{-4}	32	72	2,25

(1) El glucosa-6-fosfato, cuando se agregó, fue usado a 10 mM. Los com-
puestos probados fueron usados como sales de potasio. A la acti-
vidad en ausencia de glucosa-6-fosfato e inhibidores se le dio
el valor de 100.

El efecto inhibitorio de estas sustancias es altamente contrarrestado por el glucosa-6-fosfato a concentración 10 mM. Esto determina que, para algunos inhibidores, se obtenga un factor de activación (actividad en presencia de glucosa-6-fosfato / actividad en ausencia de glucosa-6-fosfato) sumamente alto (por ejemplo: oxalato, maleato).

La acción revertidora del glucosa-6-fosfato es compartida por el glucosamina-6-fosfato, conocida ya como activador de la enzima (50) (Tabla II).

TABLA II - Efecto de la reactivación		
Reactivador	Factor de activación	
	- CLK 0,3 M	+ CLK 0,3 M
G-6-P, 10 mM	1,4	3,5
GNH ₂ -6-P, 10 mM	1,4	3,4

2 - Reversibilidad de la inhibición

Ante la posibilidad de que el efecto de los inhibidores radicase en una inactivación de la enzima se efectuó el siguiente experimento, usando CLK como inhibidor.

Mediante el uso de una concentración suficientemente alta de cloruro (0,4 M) se logró una inhibición casi total de la enzima (Tabla III). Se puede observar que mediante una dilución y el agregado de glucosa-6-fosfato se restablece la actividad al valor original, lo que indica que la inhibición es reversible.

TABLA III-Reversibilidad de la inhibición por cloruro ^(*)		
Adiciones a la mezcla de preincubación	Adiciones a la mezcla de ensayo.	Actividad
-	-	100
-	G-6-P, 10 mM	175
ClK, 0,4 M	ClK, 0,4 M	5
ClK, 0,4 M	G-6-P, 10 mM (')	150

(") La mezcla de preincubación contenía buffer glicilglicina 0,1 M, pH 7,5 y enzima. Donde se indica se adicionó ClK. Después de 15 minutos a 30°C, se agregó una alícuota de cada tubo a la mezcla de ensayo. Las concentraciones finales fueron: glicilglicina 0,1 M, pH 7,5, UDP-glucosa Cl⁴ 0,4 mM (375.000 cpm/ μ mol) y glucógeno 3%. Se añadió ClK y glucosa-6-fosfato donde se indica. A la actividad en ausencia de glucosa-6-fosfato y ClK se le dio el valor de 100. No se encontró pérdida de la actividad después de la preincubación.

(') Queda ClK de la mezcla de incubación; por lo tanto, su concentración final en la mezcla de ensayo fue 0,12 M.

3 - Cinética de la inhibición por aniones y de la reversión por glucosa-6-fosfato.

a) Cinética en función de la concentración de UDP-glucosa:

En los estudios siguientes se eligió al cloruro como inhibidor modelo.

En la Fig. 1 se puede observar que el cloruro presenta una cinética de inhibición de tipo parcialmente competitivo hacia el UDP-glucosa.

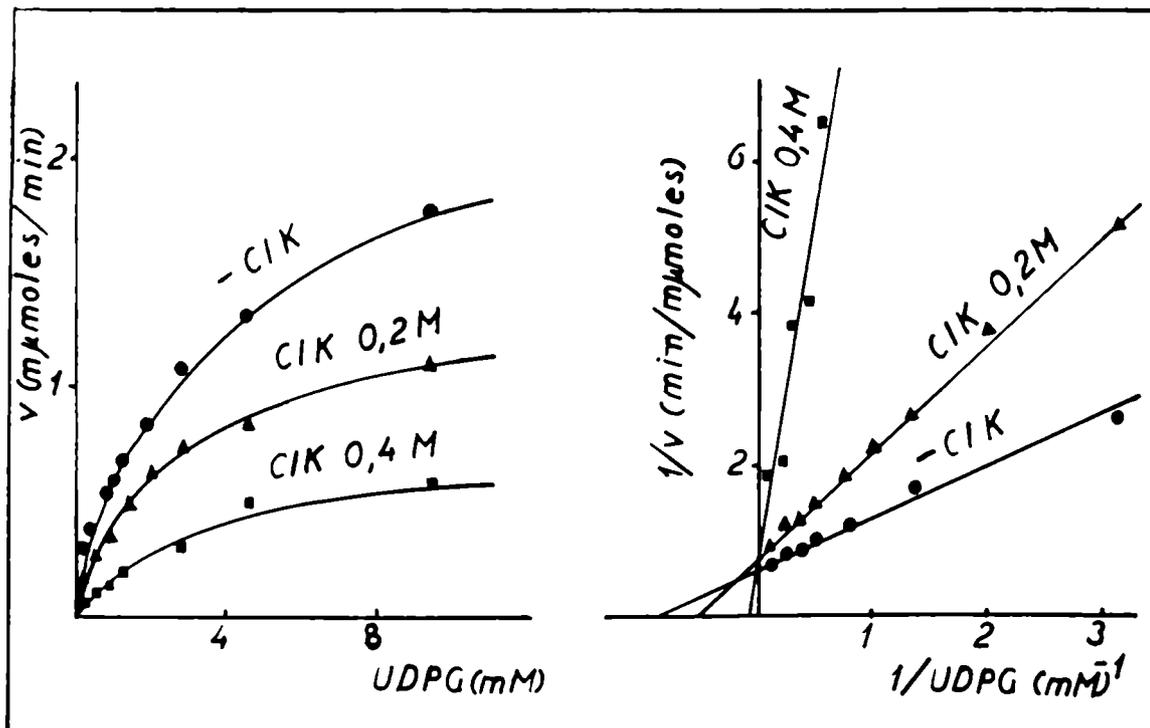


Fig. 1: Efecto de la concentración del UDP-glucosa sobre la velocidad de reacción, en ausencia y en presencia de ClK. Condiciones de ensayo indicadas en "métodos".

No obstante se han obtenido casos de tipo competitivo (Fig. 2). La cinética es de tipo hiperbólico y los gráficos de inversas son rectilíneos.

El agregado de glucosa-6-fosfato vuelve los valores de V_{max} y K_m , cambiados por el ClK, a los valores originales. Por lo tanto, se obtiene una reversión casi total de la inhibición (Fig. 2).

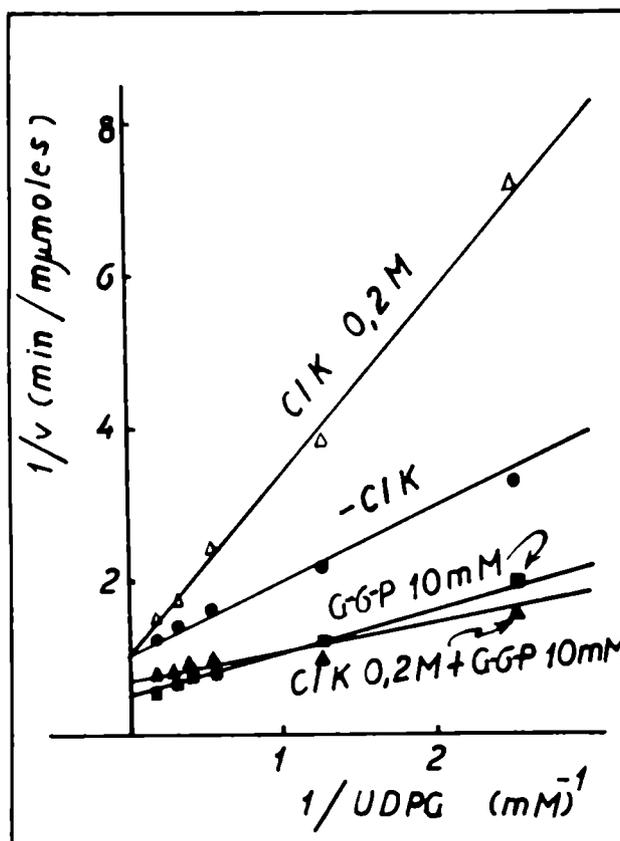


Fig. 2: Reversión del efecto del ClK por glucosa-6-fosfato. Condiciones de ensayo como en la Fig. 1.

El efecto del ión cloruro fue comparado con el efecto inhibitorio del UDP, análogo estructural del UDP-glucosa. La inhibición, en este caso, es de tipo competitivo puro (Fig. 3). La K_i para el UDP es de 0,2 mM, en ausencia de glucosa-6-fosfato. En este caso, el efecto revertidor del glucosa-6-fosfato, se halla prácticamente ausente (Ver Tabla I).

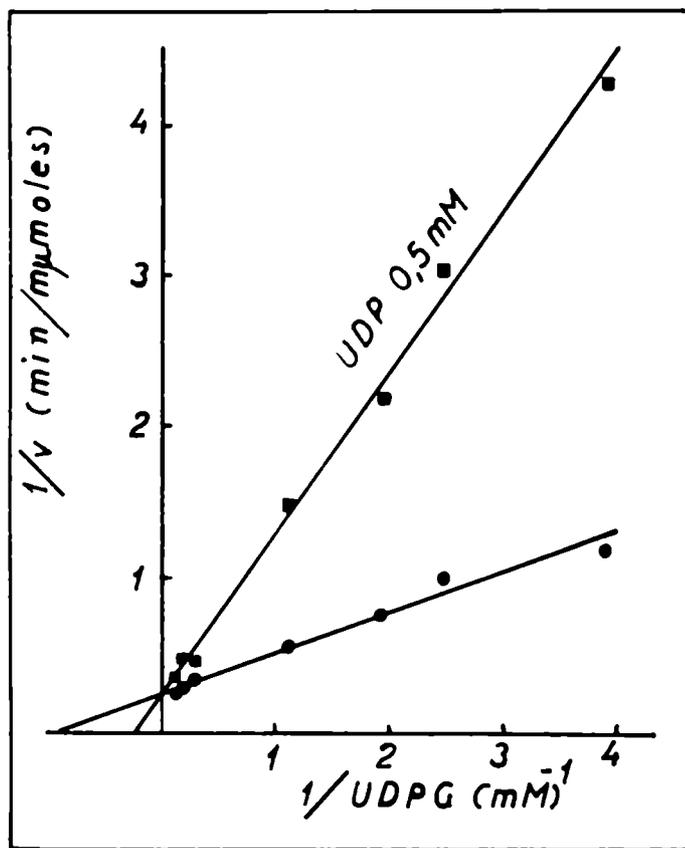


Fig. 3: Inhibición por UDP. Condiciones de ensayo como en "métodos".

b) Efecto del glucosa-6-fosfato sobre la velocidad

En la Fig. 4 A, se puede observar que el comportamiento de la enzima en función de la concentración de glucosa-6-fosfato es Michaeliano (curvas de tipo hiperbólico).

La presencia de CLK produce un cambio en el comportamiento de la enzima, dando lugar a la aparición de curvas sigmoideas. Los gráficos de inversa son curvas (Fig. 4 B).

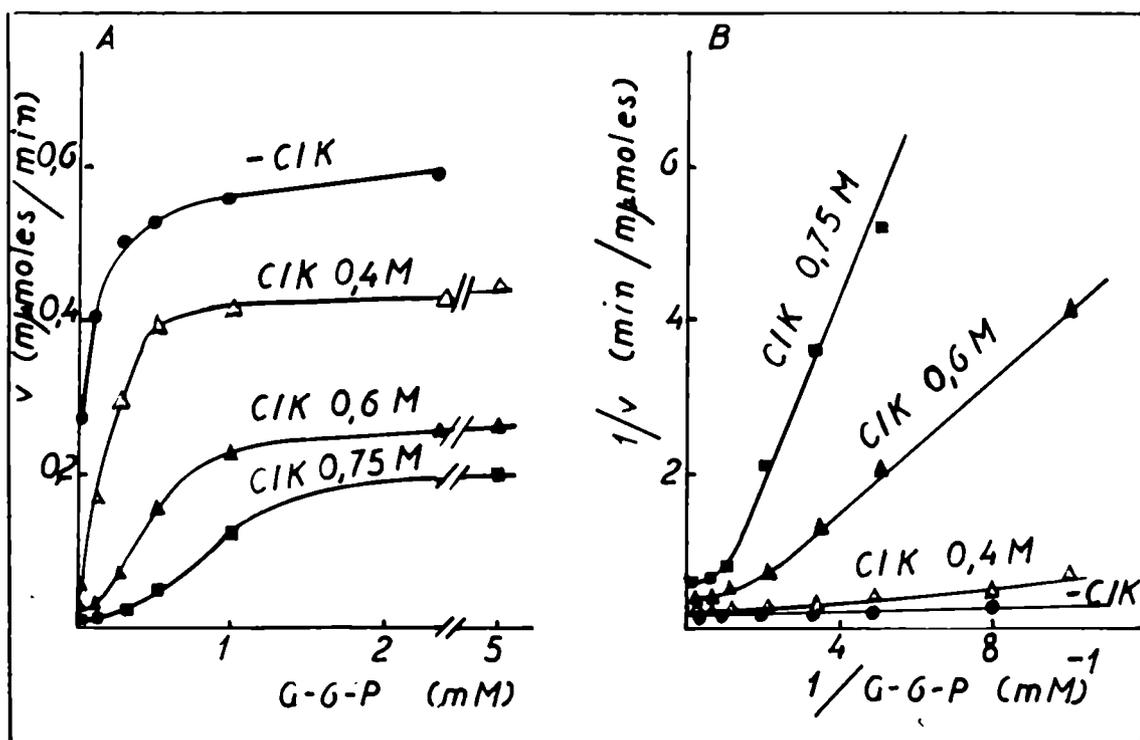


Fig. 4: Efecto del glucosa-6-fosfato sobre la velocidad de reacción en ausencia y en presencia de ClK. Condiciones de ensayo como en Fig. 1.

e) Efecto del cloruro de potasio sobre la velocidad

Curvas de tipo sigmoide, similares a las obtenidas para el glucosa-6-fosfato, pero en sentido inverso, se obtuvieron para la velocidad en función de la concentración de cloruro de potasio. Se indica la presencia de efectos cooperativos cuando el glucosa-6-fosfato se halla presente (Fig. 5 A y B).

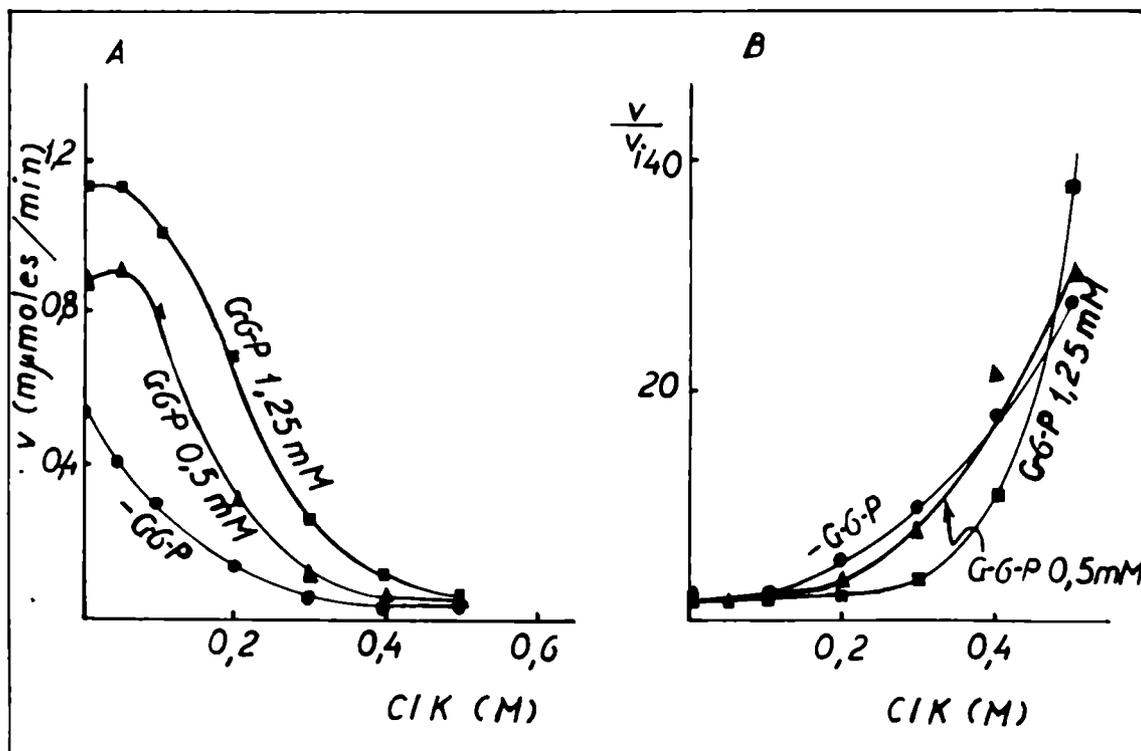


Fig. 7: Efecto del ClK sobre la velocidad de reacción en ausencia y en presencia de glucosa-6-fosfato. Condiciones de ensayo como en Fig. 1. v y v_1 indican la velocidad inicial sin y con cloruro respectivamente.

Como hemos visto en la Tabla I, el maleato actúa en forma similar al cloruro. En la Fig. 6 se puede observar que la cinética en función de la concentración del mismo presenta características similares al caso del cloruro.

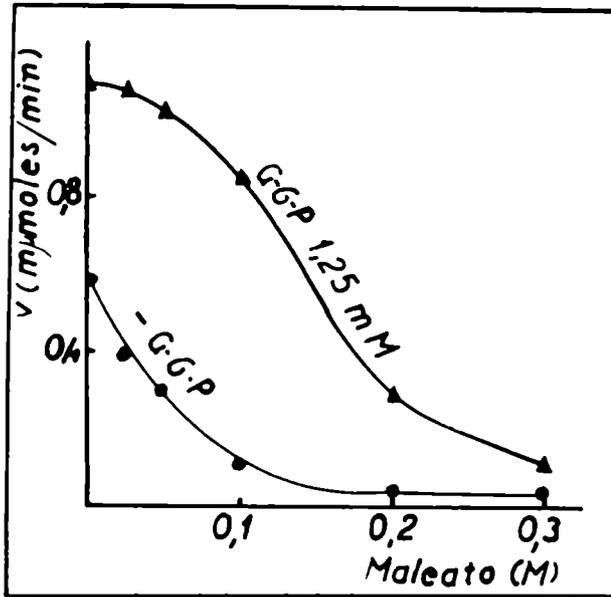


Fig. 6: Efecto del maleato sobre la velocidad de reacción en presencia y en ausencia de glucosa-6-fosfato. Condiciones de ensayo como en la Fig. 1.

Para los items a), b) y c) se muestran los gráficos de Hill (97). (Fig. 7).

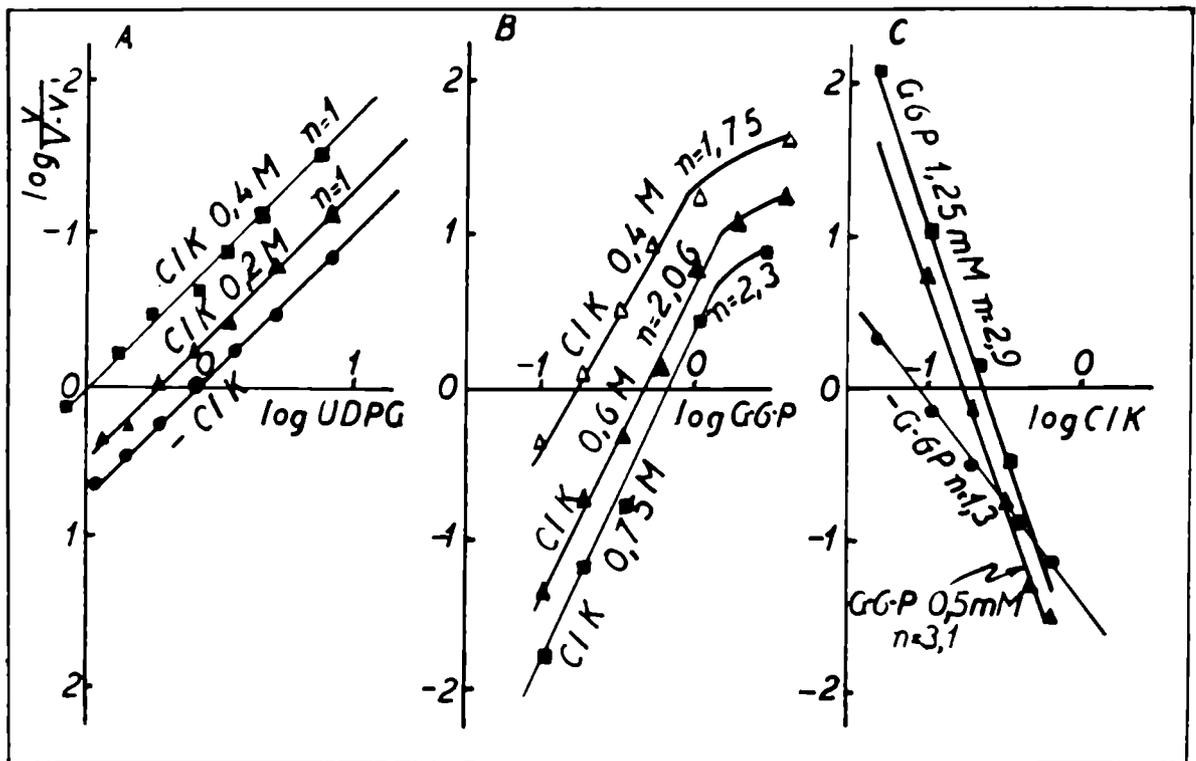


Fig. 7: Gráficos de Hill para los datos de las Fig. 1, 3 y 4.

La ecuación de Hill está dada por la siguiente expresión:

$$\log \frac{v}{V - v} = n \log (S) - \log K$$

donde: v velocidad de reacción

V velocidad máxima de reacción

S concentración del ligando cuyo efecto se va a estudiar

K constante

n número de sitios a los que el ligando puede unirse

El factor n para el glucosa-6-fosfato varía entre 0,4 y 2,28, aumentando al incrementarse la concentración de ClK. Valores entre 1,3 y 3,1 se obtuvieron para el ClK a concentraciones crecientes de glucosa-6-fosfato (Figs. 7 B y C). En cambio, se puede observar que la pendiente se mantiene constante, aunque se incrementan las concentraciones de ClK, cuando la variable es la concentración de UDP-glucosa (Fig. 7 A).

4 - Desensibilización de la enzima a los inhibidores

En el tratamiento de los temas precedentes hemos visto que:

a) No hay relación entre la efectividad del inhibidor y su semejanza estructural con el UDP-glucosa.

b) La inhibición del ClK es contrarrestada por el glucosa-6-fosfato. Esto no sucede en el caso del UDP, que es un inhibidor competitivo de la enzima.

c) Estudios de cinética en función de la concentración de glucosa-6-fosfato en presencia de ClK, y viceversa, dan lugar a la aparición de curvas sigmoides.

Las consideraciones anteriores indican que la inhibición por sustancias podría ser de tipo alostérico (96). Este hecho implica que la interacción entre la proteína enzimática y el inhibidor se produce en un sitio diferente del sitio catalítico, teniendo como resultado una inhibición de la actividad enzimática.

Para reafirmar esta hipótesis se usaron métodos de desensibilización (98) o sea, tratamientos de la proteína que lleven a la destrucción del sitio del inhibidor manteniéndose intacto el sitio catalítico.

En la Tabla IV se presentan los resultados obtenidos por tratamiento de la enzima con sales mercuriales, p-mercuri-benzoato y nitrato de plata.

TABLA IV - Tratamiento de la enzima con agentes mercuriales y nitrato de plata. (")					
Concentración de UDPG mM	Preincubación 5'	Concentración ClK en ensayo M	Inhib. % por ClK		Pérdida de actividad.
			antes trat.	después trat.	
0,4	Hg ⁺⁺ 5x10 ⁻⁷ M	0,2	52	32	53
4,7	Hg ⁺⁺ 5x10 ⁻⁷ M	0,4	72	74	49
4,7	Hg ⁺⁺ 5x10 ⁻⁶ M	0,2	72	(')	100
4,7	Ag ⁺ 10 ⁻³ M	0,2	72	(')	100

(") La preincubación se hizo en presencia de UDP-glucosa a la concentración indicada en la Tabla.

(') No se pudo calcular pues hay pérdida total de la actividad.

El uso del nitrato de mercurio resultó inoperante. El tratamiento de la enzima con p-mercuri-benzoato o nitrato de plata llevó a una pérdida total de la actividad catalítica.

Finalmente, se pudo conseguir la desensibilización de la enzima mediante el tratamiento con dinitrofluorbenzenceno (99,100). El tratamiento se llevó a cabo en la obscuridad, a temperatura ambiente y con agitación continua.

La Tabla V muestra los resultados de la desensibilización a distintos pH.

TABLA V - Efecto del pH en la dinitrofenilación (*)			
pH	Pérdida de actividad %	Inhib. por ClK 0,2 M %	
		Antes DNFB	Después DNFB
9,05	53	35	0 (*)
8,3	36	32	6
8,05	25	41	0 (*)
7,5	10	36	43

(*) La mezcla de dinitrofenilación contenía buffer 20 mM, UDP-glucosa 12,5 mM, 2-4 dinitrofluorbenzenceno 0,5 mM y enzima. El pH final de las distintas mezclas se obtuvo como sigue:

- pH 9,05 con buffer $\text{CO}_3^{2-}/\text{CO}_3\text{H}^-$ de pH 9,5
- pH 8,3 con buffer Tris-succinato de pH 8,85
- pH 8,05 con buffer Tris-succinato de pH 8,47
- pH 7,5 con Tris-maleato de pH 7,5

Después de agitar durante 15 min. a temperatura ambiente y en la oscuridad, la mezcla se enfrió en hielo. De ellas se tomaron alícuotas que se agregaron a una mezcla de incubación standard. La composición final de ésta fue: buffer glicilglicina 0,1 M de pH 7,5, UDP-glucosa C^{14} 5 mM (actividad específica 50.000 cpm/ μ mol) y 3% de glicógeno en un volumen final de 0,1 ml.

(*) Se obtuvo activación por ClK.

Del experimento anterior se deduce que el pH 8,05 es el más apropiado para la desensibilización total con una pérdida mínima de la actividad. A pH superiores se pierde mucha actividad mientras que a pH inferiores no hay desensibilización.

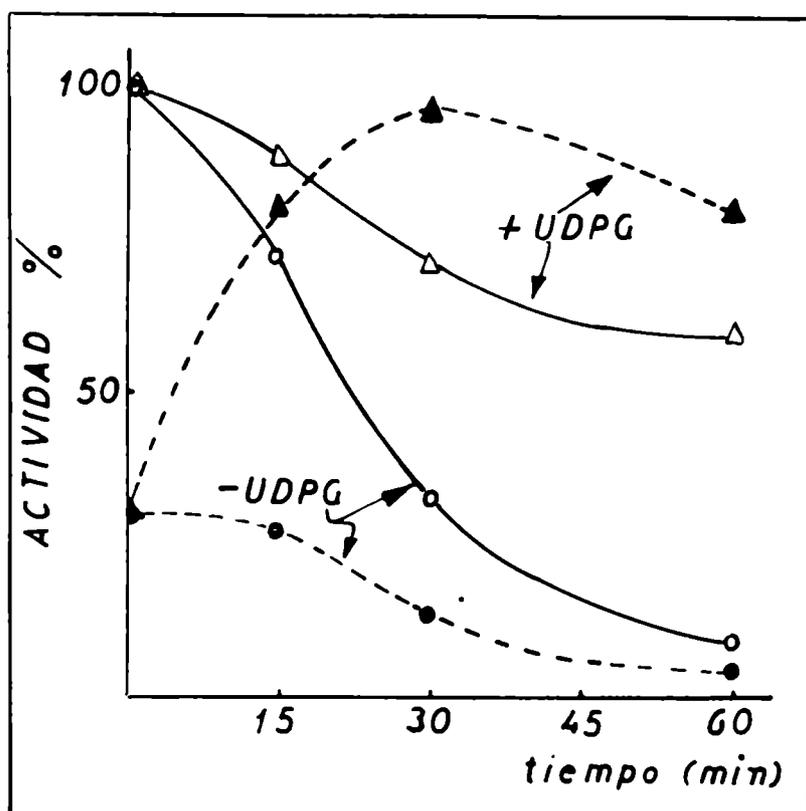


Fig. 8: Curva de tiempo de la dinitrofenilación en presencia y en ausencia de UDP-glucosa.

La mezcla de dinitrofenilación contenía: buffer Tris-succinato - 25 mM a pH 8,5, UDP-glucosa 12,5 mM, 2,4 dinitrofluorobenceno 1,5 mM y enzima. El pH final de la mezcla fue 8. Después de agitar durante los tiempos indicados, en obscuridad y a temperatura ambiente, se enfrió y se tomaron alícuotas que se agregaron a la mezcla de incubación. La composición final de la misma fue: buffer glicil-glicina 0,1 M de pH 7,5, UDP-glucosa C^{14} 3 mM (actividad específica 50.000 cpm/ μ mol) y 3% de glucógeno en un volumen final de 0,1 ml. Donde se indica se omitió la presencia de UDP-glucosa. La actividad fue medida en ausencia (—) y en presencia (----) de ClK 0,25 M.

La Fig. 8 muestra que la actividad desciende poco durante la dinitrofenilación. Paralelamente, la actividad medida en presencia del inhibidor aumenta de tal forma que a los 15 min. la enzima ha perdido su sensibilidad a la inhibición. Si se continúa el tratamiento, el cloruro llega a producir activación de la enzima.

Por otra parte, si el tratamiento se hace en ausencia de UDP-glucosa no sólo se pierde totalmente la actividad (dado que el UDP-glucosa no se halla presente para proteger el sitio catalítico), sino que no hay desensibilización de la enzima.

En la Fig. 9 se observan resultados de desensibilización similares pero en función de la concentración de dinitrofluorobenceno

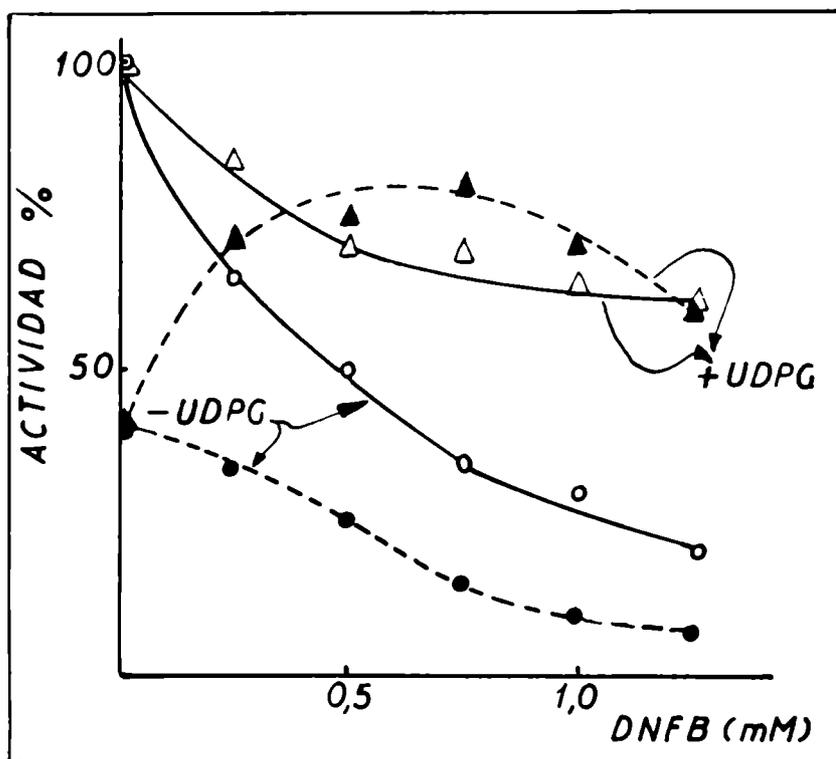


Fig. 9: Efecto de la concentración de dinitrofluorobenceno sobre la desensibilización. Condiciones de ensayo como en la Fig. 8, siendo el tiempo de preincubación de 15 min.

La concentración de dinitrofluorbeneno, para la obtención de una desensibilización óptima, varía entre 0,5 y 1,5 mM dependiendo de la preparación.

La enzima se desensibiliza tanto respecto del olguro como del maleato (Tabla VI). No obstante, la inhibición a dos niveles diferentes de UDP no varía después de la dinitrofenilación.

TABLA VI - Inhibición de la enzima dinitrofenilada (")			
Inhibidor	Concen- tración mM	Inhibición %	
		Enzima nativa	Enzima dinitrofen.
ClK	200	45 (')	0
Maleato	200	43 (')	2
UDP	0,5	39	37
UDP	2	67	69

(") Condiciones como en la fig. 8, pero tiempo de dinitrofenilación de 15 min.

(') La inhibición es menor que en la Tabla I debido a la mayor concentración de UDP-glucosa en el experimento.

En los experimentos anteriores la dinitrofenilación era detenida por el agregado de buffer glicilglicina. La incubación se llevaba a cabo sin separar el dinitrofenildipéptido. Para confirmar que los efectos de la dinitrofenilación se debían a un cambio permanente en la enzima, se usó el pasaje por una columna de Sephadex G-25. De esta forma se separa la enzima de los componentes de la mezcla de dinitrofenilación. Este tratamiento no varía los resultados de los experimentos anteriores (Tabla VII, primera línea).

Se han probado los efectos de la presencia de distintos metabolitos durante la dinitrofenilación (Tabla VII).

TABLA VII - Efecto de diferentes adiciones a la mezcla de dinitrofenilación (")				
Exp	Adiciones	Actividad recuperada después de DNFB %	% de inhibición por CLK 0,2 M	
			antes de DNFB	después de DNFB
1	-	53	45	0
	G-6-P, 7 mM	35	44	0
	CLK, 0,3 mM	7	45	0
2	-	27	52	0
	Maleato, 0,25 M	5	52	-
	UDP, 10 mM (*)	36	52	15

(") La dinitrofenilación se llevó a cabo como en la fig. 8. Un mililitro de la mezcla de dinitrofenilación se pasó a través de una columna de Sephadex G-25 (1,4x 7 cm) equilibrada con 0,025 M de buffer Tris-succinato de pH 8,5; las alícuotas del efluente se usaron para determinar la actividad enzimática como se describe en "métodos". En este caso la concentración de UDP-glucosa C¹⁴ fue 4mM (actividad específica 62.000 cpm/ μ mol)

(*) En este caso no se agregó UDP-glucosa a la mezcla de dinitrofenilación.

Se puede observar que la presencia de UDP-glucosa no varía los resultados. Por otra parte, las tentativas de proteger el sitio del inhibidor con CLK o maleato produjeron una pérdida casi total de la actividad. El UDP puede reemplazar al UDP-glucosa como protector del sitio activo.

5- Propiedades de la enzima desensibilizada

En la fig. 10 se puede observar que la enzima desensibilizada es activable por el glucosa-6-fosfato. No obstante la dependencia de dicha activación con el pH ha variado, ya no se observa la caída de actividad que existía a pH alcalino en ausencia del éster fosfórico.

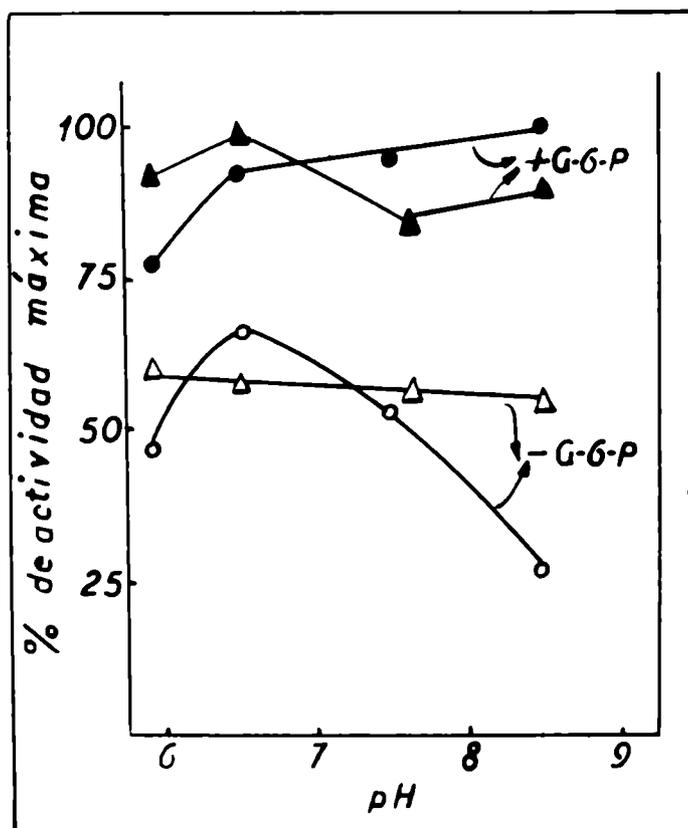


Fig. 10: Curva de pH de la enzima nativa (○, ●) y de la enzima dinitrofenilada (△, ▲).

La enzima se trató con dinitrofluorobenceno y se pasó por una columna de Sephadex G-25 como se describió en la Tabla VII. A pH 6 y 6,5 se usó buffer succinato-cacodilato (0,1 M de cada uno). A pH más alcalinos se usó buffer glicilglicina 0,1 M. Otras condiciones como en "métodos".

Cambios similares en la curva de pH por efe-

to de la dinitrofenilación han sido encontrados para la fructosa-1,6-difosfatasa (97).

Durante los trabajos con diferentes preparaciones de enzima se dió el caso de una desensibilización accidental al mantener la preparación durante 20 días en la heladera, en vez de conservarla en la forma usual a -20°C . Se perdió la sensibilidad a la inhibición por el ClK, pero la curva de pH en ausencia y en presencia de glucosa-6-fosfato se mantuvo normal.

6 - Efecto de los activadores

Se llevó a cabo un estudio cinético del efecto activador del glucosa-6-fosfato. En la fig. 11 se observa que el éster fosfórico aumenta la velocidad máxima, pero no tiene influencia sobre la constante de Michaelis.

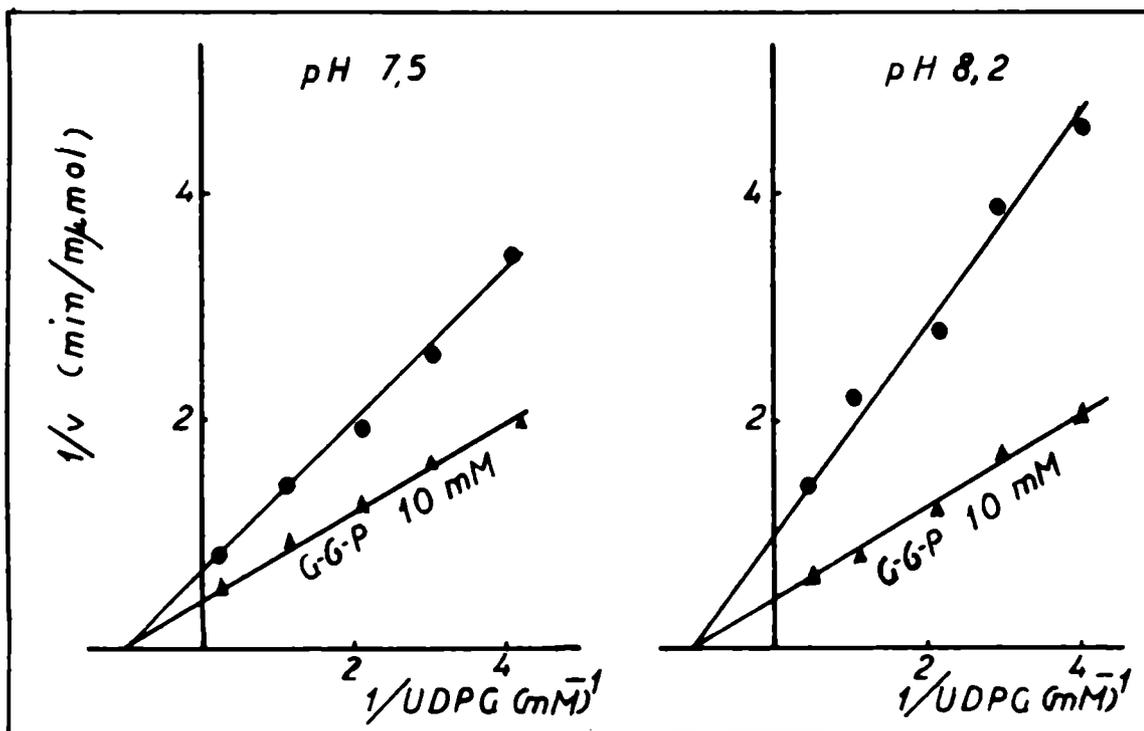


Fig. 11: Efecto del glucosa-6-fosfato sobre la cinética de reacción a dos pH diferentes. En ambos casos se usó glicilglicina como buffer. Condiciones de ensayo indicadas en "métodos".

Este comportamiento se mantiene a otros pH (ver fig. 11) y contrasta con el marcado efecto que tiene el glucosa-6-fosfato, al incrementar la afinidad del UDP-glucosa por la glucógeno sintetasa de músculo (101).

Dado que a pH 7,5 la activación por el éster fosfórico no es muy grande (1,9 veces), se estudió la cinética de la reacción en función de la concentración de glucosa-6-fosfato como activador a pH 8,4. En esta zona de pH el factor de activación alcanza valores que oscilan entre 3,5 y 4. En la fig. 12 A se puede observar que el gráfico de Lineweaver-Burk es curvo. Del gráfico de la ecuación de Hill se obtuvo para n el valor de 1,5.

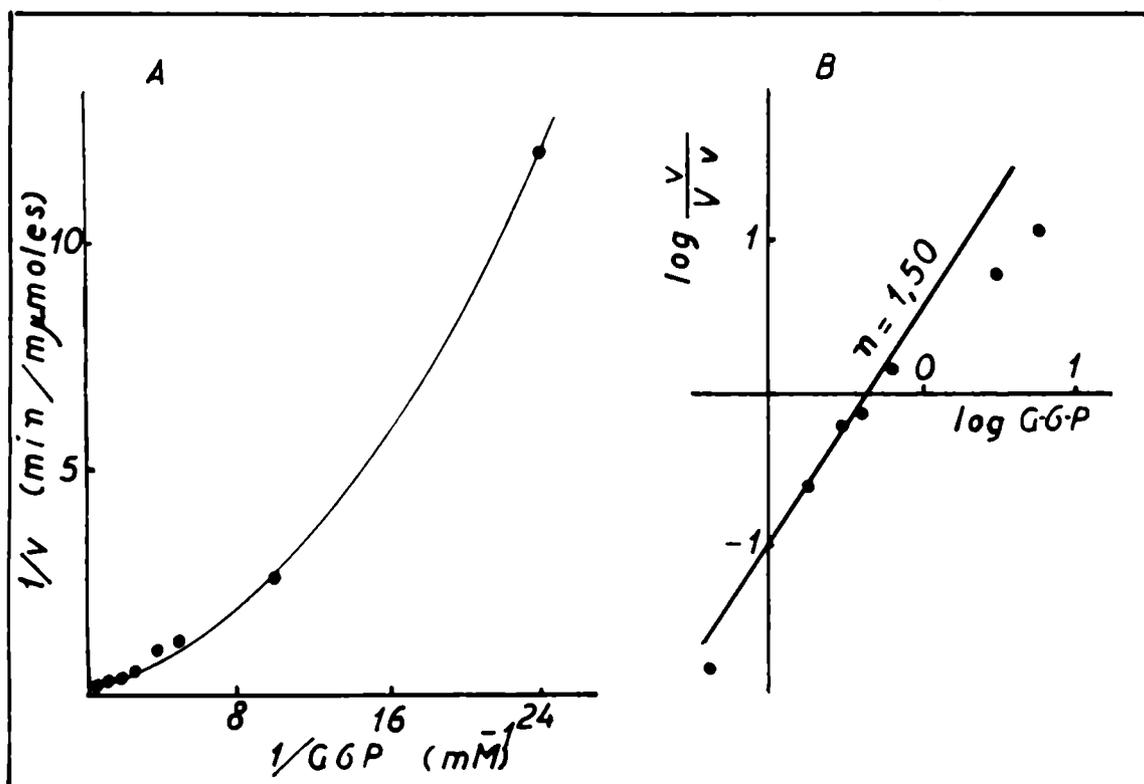


Fig. 12: Efecto del glucosa-6-fosfato sobre la cinética de reacción a pH 8,4. Condiciones de ensayo como en la fig. 11.

Estos resultados están de acuerdo con las evidencias presentadas por Algranati y Cabib (50).

En la Tabla IX puede observarse el efecto activador de una serie de sustancias a concentración 10 mM.

TABLA IX - Efecto del cloruro en presencia de diferentes activadores (")					
pH	Activador	Concentración mM	Actividad		Inhibición %
			- CLK	+ CLK 0,2M	
7,5	Ninguno	-	100	48	52
	G-6-P	10	157	156	0
	G-1-P	12	121	47	61
	Trehalosa-P	10	140	79	44
	ac.3-P-glicérico	10	158	73	54
	Sulfato	10	147	85	42
	Fosfato	10	129	63	51
9,1	Ninguno	-	100	20	80
	G-6-P	10	510	350	31
	ac.3-P-glicérico	10	178	-	-

(") Condiciones de ensayo descriptas en "métodos", excepto que la glicilglicina fue usada a dos pH diferentes. Se dió el valor de 100 a la actividad medida en ausencia de activador y de CLK. La actividad a pH 9,1 fue un 35 % de la actividad a pH 7,5.

Otros activadores no incluidos en la Tabla son los ácidos 2-fosfoglicérico y 2,3-difosfoglicérico.

Se puede observar que el fosfato y el sulfato, inhibidores a concentraciones altas, son activadores a concentración 10 mM. (comparar con Tabla I).

El efecto de activación no es aditivo dado que cuando el glucosa-6-fosfato a concentración 10 mM activaba un 77 % y el ácido 3-fosfoglicérico a concentración 10mM activaba un 81 % una mezcla de ambos sólo alcanzó a activar un 100 %. Esto indica - que se llega a un proceso de saturación y que probablemente ambos ésteres fosfóricos actúan mediante un mecanismo similar. No obstante, a pH 9,1 donde hay un aumento considerable de la activación por glucosa-6-fosfato (50) , el ácido 3-fosfoglicérico es un activador relativamente pobre.

De la Tabla IX se puede concluir que sólo el glucosa-6-fosfato (y el glucosamina-6-fosfato, Tabla II) es capaz de contrarrestar eficientemente el efecto del cloruro de potasio. De allí se deduce que existe una muy alta especificidad para la reversión.

7 - Tentativas de desensibilización del sitio del glucosa - 6-fosfato

Para poseer un mayor conocimiento de la estructura de la enzima y del mecanismo activador del glucosa-6-fosfato se trató de desensibilizar la enzima a la activación por el éster fosfórico.

Para ello se trató a la enzima con distintas concentraciones de urea.

En la Tabla X se puede observar que los resultados fueron negativos.

TABLA X - Acción de la urea sobre la activación por el glucosa-6-fosfato (")			
Preincubación		Factor de activación por G-6-P	Pérdida de actividad(*) %
Concentración UDPC mM	Concentración urea mM		
-	-	1,54	0
-	0,1	2,6	57
-	0,2	5,7	82
0,4	-	1,58	0
0,4	0,1	1,33	41
0,4	0,2	1,42	72

(") La preincubación se llevó a cabo durante 15 min a 30°C en presencia de buffer glicilglicina 0,1 M de pH 7,5 y de 3 mg de glucógeno en un volumen final de 0,06 ml. Se determinó actividad como se indica en "métodos".

(*) Calculada respecto al ensayo preincubado en ausencia de urea.

Se efectuó otra tentativa usando sustancias de estructura similar al glucosa-6-fosfato pero que, careciendo de acción activadora, impidieran la acción del mismo: por ejemplo fosfogluconato, glucosa-1-fosfato, sorbitol-fosfato. En todos los casos el glucosa-6-fosfato continuó activando.

8 - Curva de pH de la glucógeno sintetasa

Las determinaciones anteriores de la curva de pH (50) fueron efectuadas usando como buffer Tris-maleato. En la Tabla I

se pudo observar que el maltrato es un inhibidor de la enzima. Por esta razón se repitió la curva usando buffers no inhibitorios. Los cambios se pueden apreciar en la fig. 13.

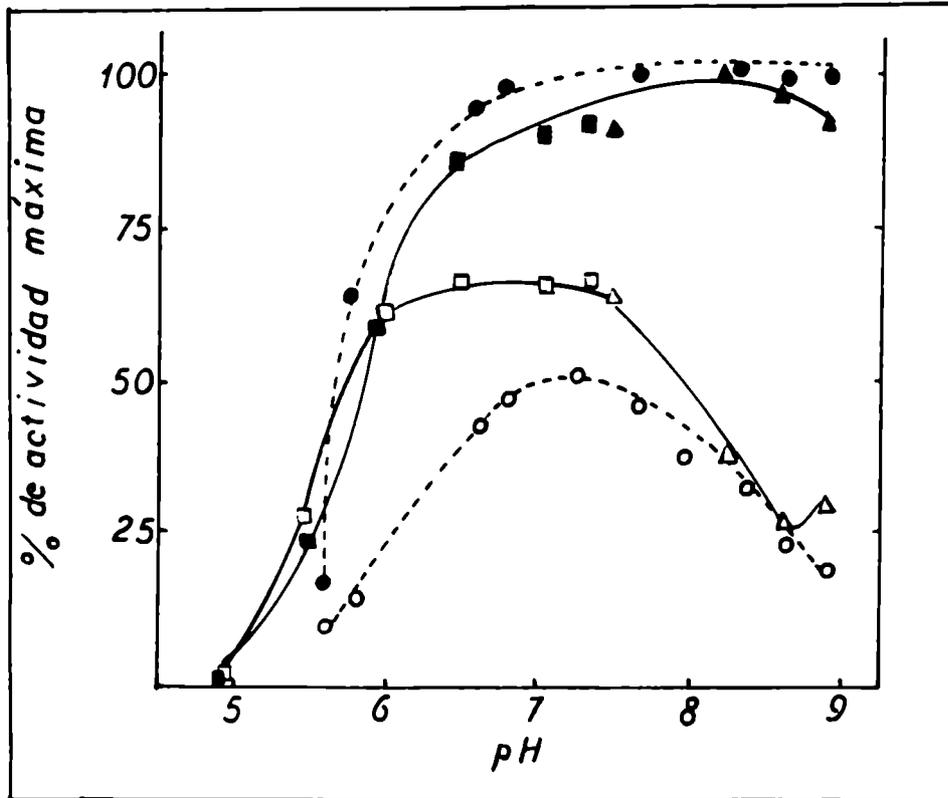


Fig. 13: Curva de pH de la glucógeno sint. enz. (-----) se obtuvo usando Tri-maltrato 0,1 M (o, ●) como buffer (50). (—) se obtuvo usando succinato-cacodilato 0,1 M (□, ■) o glicilglicina 0,1 M (Δ, ▲) como buffers. Símbolos abiertos: ausencia de glucosa-6-fosfato; símbolos cerrados: presencia de glucosa-6-fosfato. La incubación se llevó a cabo como se describió en "métodos", pero con UDP-glucosa C¹⁴ 5mM (actividad específica 62.000 cpm/μmol).

Debido a la ausencia del inhibidor, la actividad medida en ausencia de glucosa-6-fosfato ha aumentado. Este máximo se extiende entre pH 5,5 y 7,5 apareciendo un considerable aumento de la actividad a pH inferiores a 7. En consecuencia el maltrato es un inhibidor más potente a pH 6 que a pH 7. Cabe destacar que el pH 6

es considerado el pH fisiológico de la levadura (102, 103).

La forma de la curva de pH en presencia de glucosa-6-fosfato no ha variado. Este hecho era de esperar dado que la inhibición por maleato es contrarrestada por el éster fosfórico.

9 - Efecto del pH sobre la inhibición de la enzima

Las evidencias presentadas en el párrafo anterior fueron confirmadas para una serie de inhibidores(Tabla XI).

TABLA XI - Efecto de inhibidores a diferentes pH (")							
Inhibidor	Concentración m M	pH 7,5			pH 5,9		
		Actividad		Factor de activación	Actividad		Factor de activación
		- G-6-P	+ G-6-P		- G-6-P	+ G-6-P	
Ninguno	-	100	173	1,73	100	145	1,45
ClK	200	40	160	4,0	46	126	2,75
Maleato	60	-	-	-	46	-	-
	100	50	-	-	10,5	-	-
Citrato	60	-	-	-	23	-	-
	100	87	-	-	5,5	83	15
Fosfoenolpiruvato	10	86	-	-	55	146	2,65
	20	-	-	-	26	78	3
	30	-	-	-	11	73	6,6
Corismato	10	-	-	-	50	140	2,8
3-deoxi-D-arabino heptulosónico-7-P	10	-	-	-	64	173	2,7
Enolpiruvil-shi- minato-5-P	10	-	-	-	75	165	2,2

(") Se midió la actividad como en "métodos" pero a pH 5,9 se usó buffer succinato-cacodilato. La actividad medida en ausencia de inhibidor y de G-6-P se le dió el valor de 100 a cada pH.

Existen varias sustancias que comparten la propiedad del maleato. Entre ellas cabe destacar al fosfoenolpiruvato que es 20 veces más efectivo que el ClK. Análogos del fosfoenolpiruvato como el enolpiruvilshikimato-5-P, corismato y 3-deoxi-D-arabino-heptulosónico-7-P tienen poder inhibitorio similar. En cambio, la inhibición por ClK no varía mayormente con el pH (Tabla XI).

10 - El efecto del pH y la inhibición por nucleótidos

En una búsqueda de inhibidores más eficaces se determinó el efecto de varios nucleótidos (Tabla XII)

TABLA XII - Efecto de nucleótidos a diferentes pH (*)								
Exp	Inhibidor	Concen- tración m M	pH 7,5			pH 5,9		
			Actividad		Factor de acti- vación	Actividad		Factor de acti- vación
			- G-6-P	+ G-6-P		- G-6-P	+ G-6-P	
I	Ninguno	-	100	173	1,73	100	145	1,45
	ATP	2,5	-	-	-	28	132	4,7
		5	61	146	2,4	10	95	9,5
	ADP	5	38	128	3,35	13	90	6,9
	AMP	5	64	142	2,2	70	125	1,8
	GTP	5	89	178	2	14	90	6,4
	GDP	5	80	138	1,72	40	65	1,6
	GMP	5	77	158	2,05	65	125	1,9
	UDP	0,5	32	72	2,2	42	59	1,4
II	Ninguno	-	100	220	2,2	100	195	1,95
	UTP	0,5	68	150	2,2	57	114	2,0
	UMP	3	18	34	1,9	27	68	2,5

(*) Condiciones de ensayo como en la Tabla XI

El ATP, ADP y el GTP son los inhibidores más eficaces. El AMP, GMP y GDP son mucho menos inhibitorios. El glucosa-6-fosfato mantiene a pH 5,9 su poder revertidor, alcanzando los factores de activación valores de hasta 9 como en el caso del ATP 5 mM. La inhibición por UDP no varía mayormente con el pH y no es revertida por el glucosa-6-fosfato.

11 - Cinética de la inhibición por ATP

El comportamiento presentado por el ATP, ADP y GTP a pH 5,9 presenta características similares al estudiado para los aniones a pH 7,5.

En la fig. 14 se puede observar que el ATP es un inhibidor competitivo del UDP-glucosa, con K_i de 0,62 mM.

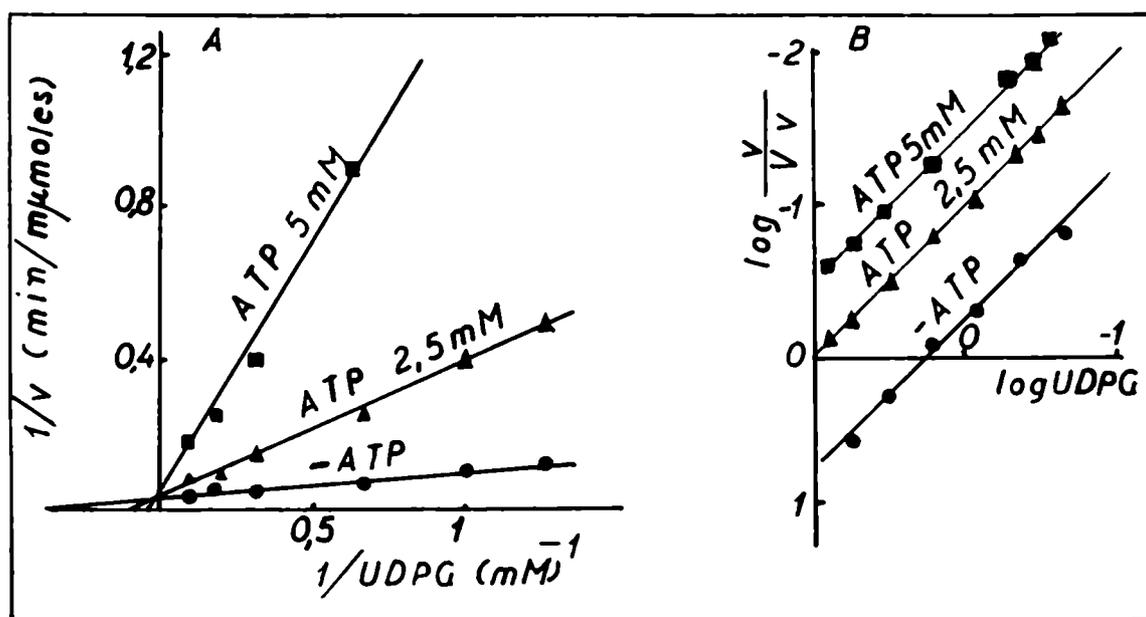


Fig. 14: (A) Efecto de la concentración de UDP-glucosa sobre la velocidad de reacción en ausencia y en presencia de ATP. Condiciones de ensayo como se indican en "métodos" pero usando buffer succinato-cacodilato (0,1 M en cada uno) a pH 5,9.

(B) Gráfico de Hill para los datos de (A).

El gráfico de Lineweaver - Burk es rectilíneo, similar al obtenido para el CLK. Del gráfico de Hill para este sistema se ha obtenido el valor de n igual a 1 en ausencia y presencia de ATP (Fig. 14)

Por el contrario, al estudiar la velocidad de reacción en función de la concentración de glucosa-6-fosfato en presencia de ATP, aparecen curvas sigmoides. (fig. 15).

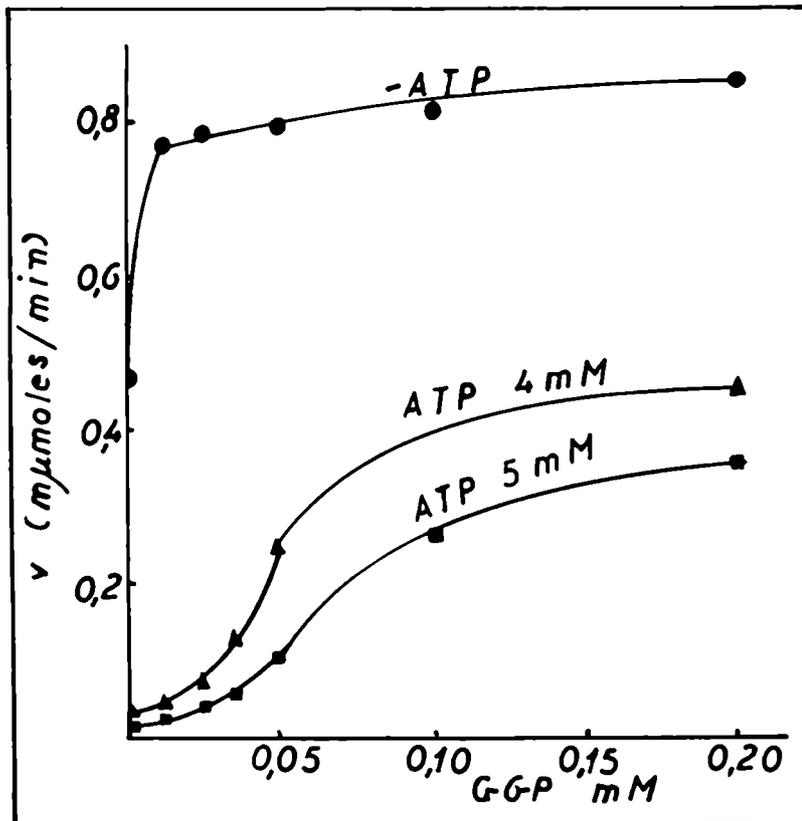


Fig. 15 : Efecto de la concentración de glucosa-6-fosfato sobre la velocidad de reacción en ausencia y en presencia de ATP. Condiciones de ensayo como en la fig. 14.

Se puede observar que 0,2 M de glucosa-6-fosfato activa 20 veces la inhibición producida por 4 mM de ATP.

Paralelamente, las curvas de velocidad en función de la concentración de ATP, a distintas concentraciones de glucosa-6-fosfato, muestran efectos cooperativos (fig. 16).

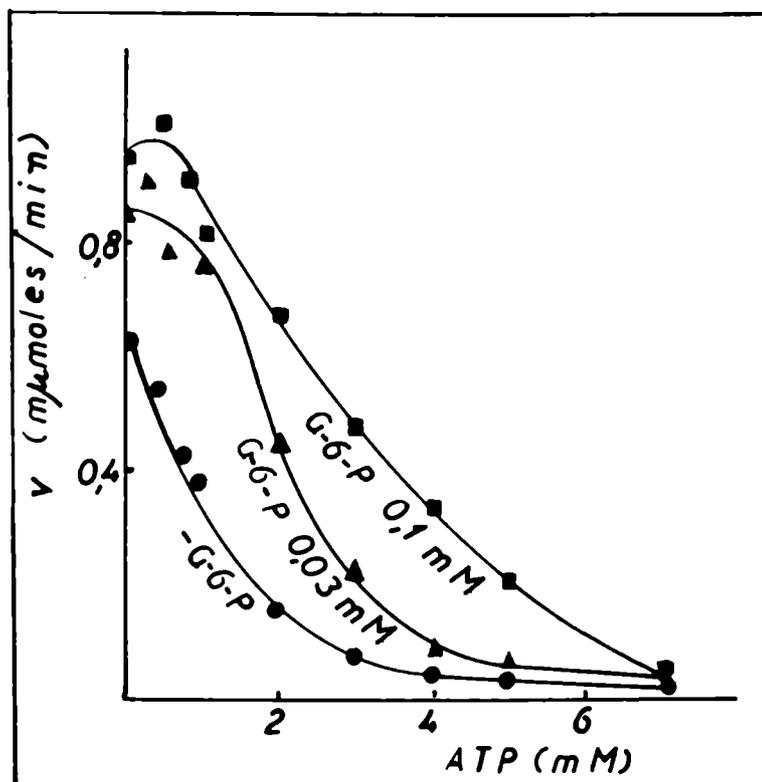


Fig. 16: Efecto del ATP sobre la velocidad de reacción en ausencia y en presencia de glucosa-6-fosfato. Condiciones de ensayo como en la fig. 14.

En la figura 17 se muestran los gráficos de Hill para los datos representados en las figuras 15 y 16.

Se puede observar que las pendientes alcanzan valores hasta 2,3.

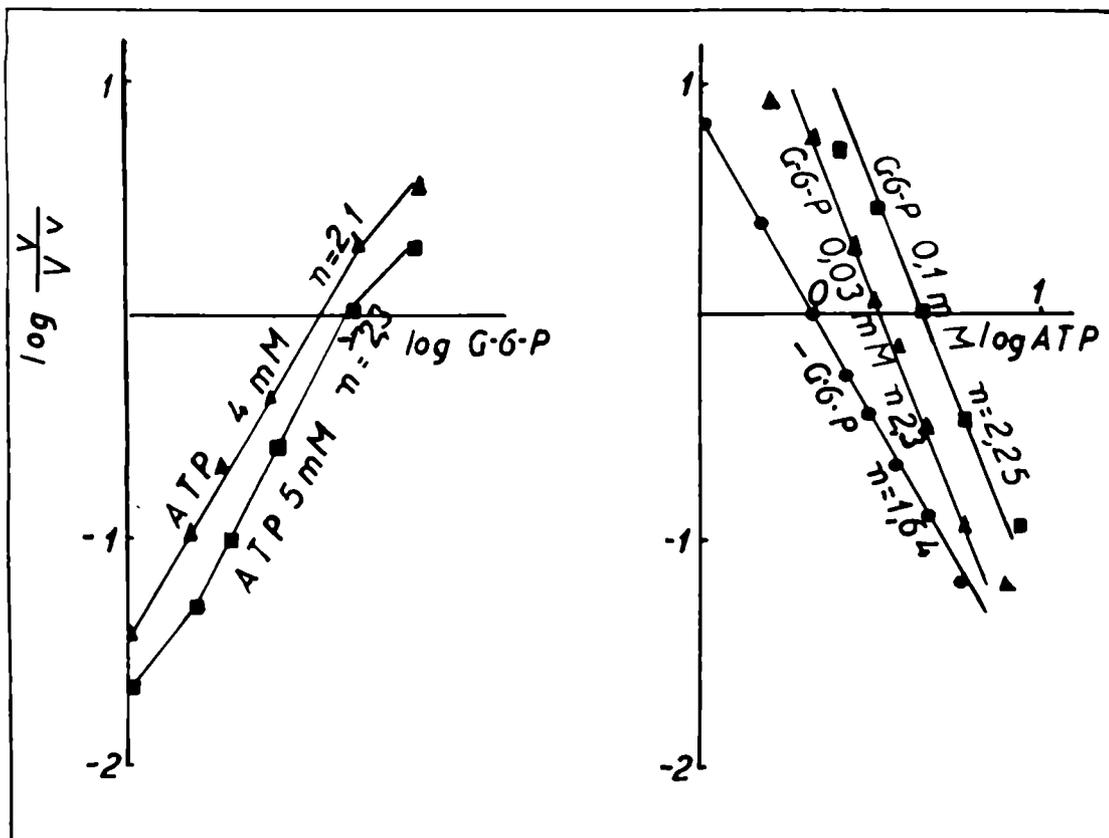


Fig. 17 : Gráficos de Hill para los datos representados en las figuras 15 y 16.

12 - Pérdida de la sensibilidad a la inhibición por ATP

Para obtener una prueba adicional de la similitud de los mecanismos de inhibición del ATP y del GK se desensibilizó la enzima bajo las condiciones ya conocidas. En este caso la dinitrofenilación sólo se detuvo por dilución, dado que la mezcla de incubación contenía succinato-cacodilato en vez de glicilglicina como buffer.

En la Tabla XIII se puede observar que hubo desensibilización al ATP, aunque no fue tan eficiente como en el caso del GK. Paralelamente, no se obtuvo pérdida de sensibilidad a la inhibición por UDF.

TABLA XIII- Inhibición a pH 5,9 de la enzima dinitrofenilada (*)			
Inhibidor	Concentración mM	Inhibición %	
		Enzima nativa	Enzima dinitro.
GK	200	48	2
ATP	2,5	33	13
UDF	2	75	70

(*) La dinitrofenilación y el ensayo de la enzima se llevaron a cabo como en la Fig. 8. En el ensayo se usó buffer succinato-cacodilato 0,1M pH 5,9.

13 - Mecanismo de acción del ATP

Friedman y Lerner (10) determinaron que por incubación de la glucógeno sintetasa de músculo con ATP- Mg^{2+} se produce una nueva forma de la enzima.

Para estudiar si eso ocurría con la glucógeno sintetasa de levadura, se incubó la enzima en las condiciones usuales,

a pH 5,9, en presencia de 16 mM de ATP y en ausencia de UDP-glucosa durante 15 min a 30°C. Esta mezcla fue pasada por una columna de Sephadex G-25 y se determinó la actividad del efluente en distintas condiciones.

En la Tabla XIV se presentan las propiedades de la enzima antes y después del tratamiento.

TABLA XIV - Incubación de la enzima con ATP (")				
Enzima	Actividad		Factor de activación $\frac{(+G6P)}{(-G6P)}$	
	- ATP	+ ATP	- ATP	+ ATP
sin tratar	100	14	1,6	6,0
tratada	100	17	2,2	6,4

(") Condiciones de ensayo como en "métodos" pero se usó buffer succinato-cacodilato de pH 5,9 (0,1 M).

La preincubación de la enzima con ATP no hace variar las propiedades de la misma, por ejemplo: inhibición por ATP, activación por glucosa-6-fosfato y reversión de la inhibición. Se descarta, por lo tanto, la transformación de la enzima a una nueva forma.

14 - Sedimentación de la enzima en presencia de ATP

Dado que los estudios precedentes demostraron que el ATP produce cambios en la afinidad del UDP-glucosa por la enzima y que esta se halla asociada al glucógeno, se decidió estudiar el efecto del ATP sobre las propiedades de sedimentación de la enzima.

La enzima purificada con la cual se ha trabajado fue obtenida por elución con glucógeno de amilosa retrogradada, es decir que tiene gran cantidad de dicho polisacárido (50). Por esta razón se decidió mantener su concentración saturante y constante.

Por centrifugación a 100.000 x g durante tres horas, se ha determinado que la enzima sedimenta junto con el glucógeno, manteniéndose adsorbida al mismo (Tabla XV).

TABLA XV - Centrifugación de la enzima a 100,000 x g (").			
Preparación	Actividad		Factor de actividad
	- G-6-P	+ G-6-P	
Enzima	100	126	1,26
Sobrenadante de 100.000xg	0	0	-
Sedimento de 100.000 x g	360	560	1,56

(") A la actividad de la preparación original (enzima purificada según (50)) en ausencia de glucosa-6-fosfato se le dio el valor de 100. Las actividades del sobrenadante y del sedimento de 100.000 x g fueron medidas en volúmenes equivalentes al de la enzima original. La actividad fue determinada según se indica en "métodos", pero usando buffer succinato-cacodilato 0,1 M de pH 5,9.

Esta técnica fue utilizada , no sólo como método de concentración de la enzima sino también para averiguar si la adición de ATP producía algún cambio en la afinidad de la enzima por el glucógeno. Para tal fin, la enzima fue centrifugada en presencia de ATP. Se encontró que la enzima se hallaba en el sedi

mento y que el sobrenadante carecía de actividad enzimática, medida en presencia de glucosa-6-fosfato.

15 - Efecto de los iones magnesio

Los experimentos hasta ahora relatados fueron realizados en ausencia de iones magnesio.

Cuando se probó el efecto del acetato de magnesio a concentración 10 mM aumentó la actividad de la enzima en un 50 %, ya sea en ausencia o en presencia de glucosa-6-fosfato. Este efecto podía ser debido a dos causas:

a) que el magnesio formase un complejo con el UDP, transformándolo así en una sustancia no inhibitoria.

b) que existiese una activación "per se" de la enzima.

Ambas posibilidades fueron estudiadas.

El UDP a concentración 0,5 mM inhibe un 68,5 la actividad de la enzima, actividad medida a UDP-glucosa 0,4 mM. La adicción de 10 mM de magnesio reduce esta inhibición al 29 %.

Por otra parte se observó activación de la enzima por magnesio cuando se midió la actividad en condiciones en que el UDP no inhibía como producto de la reacción.

La ausencia de magnesio no invalida los experimentos realizados con respecto al ClK dado que este inhibe en la misma proporción en ausencia o en presencia de magnesio.

No fue igual el resultado obtenido cuando se midió la inhibición por ATP en presencia de magnesio. En la Tabla XVI se puede observar que en esas condiciones la inhibición por ATP disminuye, probablemente debido a la formación de un complejo parcialmente o no inhibitorio.

TABLA XVI - Efecto de los iones magnesio sobre la inhibición por ATP a pH 5,9 (")					
Agregados a la mezcla standard de reacción				Actividad	Inhibición % (")
Mg ²⁺	Fructosa-1,6-diP 1mM + Fosfato inorgán. 20mM	ATP 5mM	0-6-P 5 mM		
-	-	-	-	100	
-	-	+	-	17	83
1 mM	-	-	-	116	
	-	+	-	58	50
	+	-	-	103	
	+	+	-	23	76
	+	-	+	155	
	+	+	+	103	33
5 mM	-	-	-	116	
	-	+	-	88	24
	+	-	-	80	
	+	+	-	43	46
	+	-	+	90	
	+	+	+	104	

(") Condiciones experimentales como en la fig. 14.

(') En cada caso , se tomó como referencia el valor obtenido con la misma mezcla de reacción pero en ausencia de ATP.

En el citoplasma de la levadura existen varios metabolitos que pueden formar sales poco disociadas con el magnesio. Por lo tanto en la tabla precedente (Tabla XVI) se ha determinado

PTC-60-N.A.

la influencia de la presencia de los mismos sobre el par ATP-Mg²⁺ y su inhibición en la glucógeno sintetasa. Para el caso se ha usado fructosa-1,6-difosfato y fosfato. Este último fue probado a concentración no inhibitoria y ambos a concentraciones fisiológicas.

Se puede observar que la presencia de fosfato y fructosa-1,6-difosfato en la mezcla de reacción restituye el poder inhibitorio del ATP, cuando existe magnesio en el medio. Esta inhibición es revertida por el glucosa-6-fosfato.

16 - Reproducibilidad de los resultados

Debe mencionarse que ,dentro de una misma preparación, los resultados fueron reproducibles. No obstante, al variar de preparaciones, cambian los valores cuantitativos de la inhibición por ClK o ATP, de la reversión y de la activación por glucosa-6-fosfato, el esquema cualitativo se mantuvo.

Esto es de esperar dado que se trata de una enzima alostérica.

Este comportamiento es general. Cabe recordar que las propiedades de las enzimas alostéricas radican en cambios en la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína, cambios que en algunas ocasiones pueden ser producidos por el simple manipuleo.

III. D I S C U S I O N

1 - CONSIDERACIONES CINÉTICAS

En los experimentos realizados, la concentración de glucógeno se ha mantenido constante. Estudios de la cinética de la enzima respecto de la concentración de glucógeno no han sido realizados pues la preparación utilizada contiene cantidades casi saturantes del mismo.(50). Por lo tanto, se asume que las actividades enzimáticas medidas son un reflejo de las variaciones en el sitio del UDP-glucosa solamente.

a) Sobre la inhibición

Aunque la inhibición por aniones es de tipo competitivo (Fig. 1, 2), las evidencias presentadas indican que el inhibidor y el UDP-glucosa poseen grupos ligantes diferentes sobre la superficie de la enzima.

Se ha visto que no hay similitud estructural entre el UDP-glucosa y los inhibidores.

La inhibición es revertida por el glucosa-6-fosfato mientras que la inhibición por UDP, inhibidor competitivo (Figura 3), se mantiene constante en ausencia y en presencia del óxido fosfórico (Tabla I).

Finalmente, el hecho de que la enzima haya podido ser desensibilizada a estos inhibidores, sin pérdida mayor de la actividad, mientras que el UDP continúa inhibiendo (Tabla VI) es una prueba decisiva de que nos hallamos ante un fenómeno de tipo alostérico. Una prueba indirecta de que el sitio catalítico se ha

mantenido intacto durante la dinitrofenilación está dada por el hecho de que a dos concentraciones diferentes, la inhibición por UDP no varía (Tabla VI).

b) Sobre la reversión

Se ha determinado que la inhibición por aniones es contrarrestada por el glucosa-6-fosfato y el glucosamina-6-fosfato.

Al estudiar la cinética de los inhibidores en presencia de glucosa-6-fosfato o viceversa (Fig. 4 y 5) se obtuvieron curvas sigmoides indicando que ambos efectores poseen más de un sitio de unión sobre la enzima. Este hecho se confirma con los valores de las pendientes de los gráficos de Hill (Fig. 7 B y C); de allí se infiere que cada ligando (cloruro y glucosa-6-fosfato) posee por lo menos tres sitios.

No se puede afirmar si estos sitios son comunes para el inhibidor y el glucosa-6-fosfato. No obstante existen evidencias indirectas de que cada efector posee sus grupos ligantes propios:

- I) A altas concentraciones del inhibidor, el glucosa-6-fosfato es incapaz de contrarrestar esta inhibición (Fig. 4).
- II) El glucosa-6-fosfato no protege el sitio del inhibidor durante la dinitrofenilación (Tabla VII).

c) Sobre la activación

Se ha comprobado que este efecto no tiene relación con el fenómeno de reversión.

La activación es compartida por una serie bas

tante amplia de sustancias mientras que la reversión es específica para el glucosa-6-fosfato y el glucosamina-6-fosfato (Tabla IX)

Ambos efectos, reversión y activación, tienen parámetros cinéticos diferentes: el proceso de activación hace variar la V_{max} del sistema manteniendo invariable la K_m (Fig. 11), - mientras que la reversión produce un cambio en la afinidad del UDP glucosa (Fig. 2).

Finalmente durante el proceso de dinitrofenilación se obtiene una desaparición completa del fenómeno de inhibición y consecuentemente del de reversión. Por otro lado, la enzima sigue siendo activable por el glucosa-6-fosfato. Las características de la activación han variado dado que la curva de pH es diferente (Fig. 10).

De lo anteriormente expuesto se puede postular la existencia de sitios específicos (sigmoidicidad de las curvas de la Fig. 12) sobre la enzima para los activadores. La existencia de los mismos explicaría el efecto activador del cloruro sobre la enzima dinitrofenilada (Fig. 8); en esas condiciones ha desaparecido el poder inhibitorio y predomina la activación. Cabe recordar que la enzima, a concentraciones elevadas de glucosa-6-fosfato, es activada por cloruro (Fig. 5). Por otra parte el sulfato y el fosfato, inhibidores a altas concentraciones, producen activación a concentración 10 mM.

2 - TEORIAS Y MODELOS DE REGULACION ALOSTERICA

Las primeras especulaciones para dar una base molecular al comportamiento de las enzimas cuya actividad está modulada por la presencia de metabolitos, proviene del trabajo de Cor

hart y Pardee (104). En él postulaban la existencia de sitios inde
pendientes y específicos sobre la enzima para el sustrato y el me-
tabolito; la presencia de este último producía cambios conformacio
nales en la enzima, de donde la interacción con el sustrato.

Esta suposición fue sustentada por posteriores estudios sobre otras enzimas: treonina-dehidrasa de Escherichia Co-
li (105, 106) y fosfofructoquinasa (107, 108). La prueba necesaria
para verificar dichas ideas provino de Gerhart y Schachman (109) ,
que mediante el uso de p-mercuribenzoato produjeron la disocia -
ción de la aspártico - transcarbamilasa en dos tipos de subunida -
des: "subunidad catalítica" que posee toda la actividad enzimática
y es insensible al metabolito regulador y la "subunidad regulato -
ria", que posee el sitio receptor para el regulador y no posee ac-
tividad catalítica. La subunidad catalítica aislada posee cinética
Michaeliana, pero su unión con las unidades regulatorias da lugar
a la aparición de cinética sigmoide (109).

La aparición de curvas sigmoides sugirió que
estos sistemas no cumplían los postulados de la cinética clásica o
Michaeliana. De ahí la necesidad de modelos nuevos para explicar es
te problema.

Actualmente se han propuesto dos esquemas:

a) La teoría de Monod, Wyman y Changeux (110).

Monod, Wyman y Changeux postulan la existencia
de proteínas formadas por subunidades idénticas (o protómeros) aso
ciadas en tal forma que ocupan posiciones simétricas. En cada sub-
unidad existe un sitio específico para el sustrato y otro sitio pa
ra el metabolito regulador.

Estas enzimas pueden existir en por lo menos dos

formas en equilibrio, interconvertibles entre sí, a las que denominan T y R:



La transición entre T y R, o transición alostérica, es de forma tal que la simetría de la enzima se conserva (es decir que, todos los protómeros deben tener en cada momento la misma configuración).

El efecto de un ligando (F), al combinarse preferencialmente con una de las dos formas, será de modificar el equilibrio (I), como se indica en (II):



Como resultado de este proceso, la afinidad aparente para los nuevos ligandos que se unen a la enzima aumenta. Matemáticamente, Monod y col. (110) han demostrado que dicho efector mostrará efectos homotrópicos (") cooperativos, fenómeno que se evidencia en la aparición de curvas sigmoideas.

b) Las teorías de Koshland (111,112) y Atkinson (113, 114).

Atkinson y Koshland, separadamente, han presentado teorías similares.

(") Los autores han denominado "efecto homotrópico" a la interacción entre ligandos iguales, y "efecto heterotrópico" a la interacción entre ligandos diferentes.

Explican los resultados obtenidos mediante un modelo que difiere fundamentalmente del anterior en que la proteína puede existir en estados conformacionales híbridos, es decir que cada subunidad puede cambiar de forma sin producir un cambio de la misma magnitud en las subunidades adyacentes. No obstante, el cambio en la configuración de una subunidad producido por la entrada de un ligando, puede cambiar la estabilidad relativa de las configuraciones de las subunidades adyacentes por interacción entre las mismas. Así la entrada de un ligando en un sitio produce un cambio configuracional tal que puede aumentar o disminuir la afinidad hacia el ligando en un segundo sitio y así sucesivamente.

3 - APLICACIONES DE LAS TEORIAS ALLOSTERICAS A LA GLUCOGENO SINTETASA DE LEVADURA

Al comparar los resultados obtenidos con las características del sistema de Monod y col. surgen algunas discrepancias.

Hemos visto que según esta teoría, las variaciones en la afinidad de un efector al combinarse preferencialmente con una de las dos formas de la enzima, da lugar a curvas sigmoides.

En nuestro caso, la presencia de cloruro da lugar a una variación en la afinidad del UDP-glucosa pero no aparecen efectos cooperativos (Fig. 1). Esta discrepancia puede solucionarse si se postula un solo sitio para el UDP-glucosa sobre la enzima.

Asimismo, se ha visto que los gráficos de la velocidad en función de la concentración de glucosa-6-fosfato en presencia de cloruro y viceversa son sigmoides. De allí se deduce que tanto el éster fosfórico como los inhibidores aniónicos poseerán, por lo menos, un sitio cada uno por subunidad.

La aplicación de la teoría de Atkinson-Koshland a este modelo requiere una restricción adicional. Para obtener en este caso gráficos de Lineweaver - Burk rectilíneos e inhibición competitiva, el sustrato sólo puede unirse a la fracción de enzima libre de inhibidor.

Los resultados de la Tabla VII parecen afirmar esta suposición. La dinitrofenilación de la enzima en presencia del inhibidor y del sustrato lleva a una pérdida casi total de la actividad. Una probable explicación a este fenómeno sería la siguiente: la presencia de cloruro impide que el UDP-glucosa proteja su sitio catalítico y en estas condiciones éste es dinitrofenilado con pérdida de la actividad.

Recientemente se ha demostrado que la N-acetilglutamato 5-fosfotransferasa, enzima del camino metabólico de la biosíntesis de arginina en *Clamydomonas*, posee un sitio catalítico y dos sitios regulatorios (115). Por otra parte, existen varias enzimas regulatorias (116, 117, 118 y 119) con características similares a la glucógeno sintetasa de levadura: presentan gráficos de Lineweaver - Burk rectilíneos en presencia y en ausencia del inhibidor competitivo; pero en estos casos no se ha estudiado la cinética respecto de la concentración del inhibidor. Por lo tanto, este tipo de comportamiento podría no ser una excepción. Un estudio más profundo sobre estas enzimas podría suministrar mayor información para la interpretación de los fenómenos alostéricos .

4 - MODELO TENTATIVO PARA LA GLUCOGENO SINTETASA DE LEVADURA

En base a los resultados obtenidos se ha esquematizado en la Fig. 18 un posible modelo molecular de esta enzima.

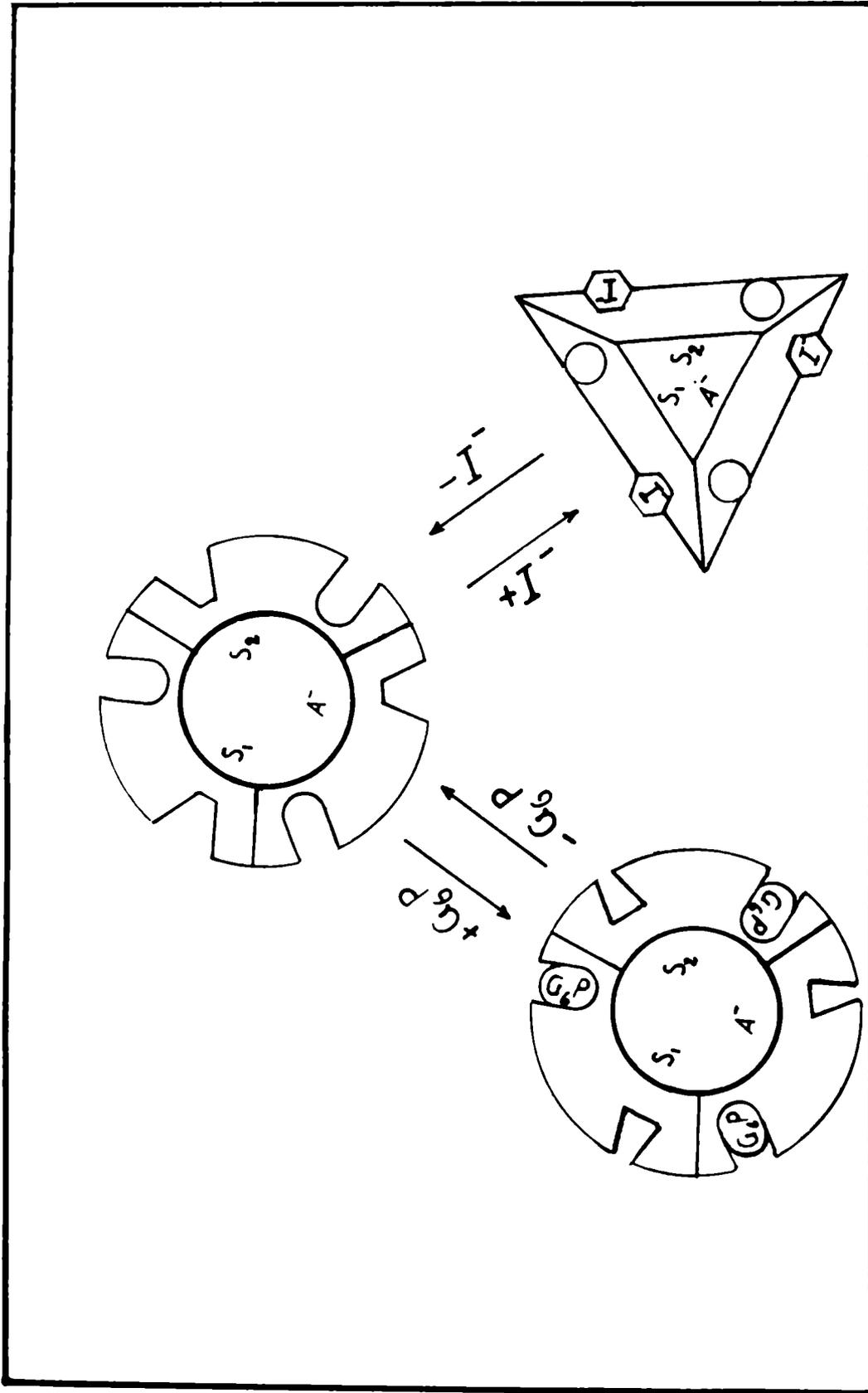


Fig. 18: Esquema tentativo de la interacción entre la enzima y los efectores alostéricos. S₁ y S₂ son los sitios para el UDP-glucosa y el glucógeno; A, sitio para el activador alostérico; G-6-P, glucose-6-fosfato; I, inhibidor alostérico.

Se presenta un solo sitio para cada uno de los sustratos, UDP-glucosa y glucógeno. No han podido realizarse estudios sobre este último, se le ha dado un solo sitio para simplificar el modelo. En el mismo lugar se ha ubicado, para simplificar, el sitio del activador, aunque existen evidencias (Fig. 12) de que es ta poseería más de un sitio.

Estos sitios se hallan ubicados sobre una subunidad central y única. Además, se encuentran las subunidades regulatorias que se han dibujado en número de tres (de los datos obtenidos de los gráficos de Hill). Sobre cada unidad regulatoria, existe un sitio para el inhibidor y otro para el glucosa-6-fosfato, que actúa como revertidor de la inhibición.

La disminución de la afinidad se ha representado mediante sitios cerrados.

En la figura se presentan tres estados extremos de la enzima. En el centro se halla libre de efectores alostéricos y por lo tanto relajada.

Por la adición de moléculas de inhibidor la enzima se satura del mismo, se contrae y los sitios del activador se hacen menos accesibles. Pero, la presencia de este último desplaza el equilibrio hacia una forma más favorable para el mismo, disminuyendo así la afinidad para el inhibidor.

Estos no son las tres únicas formas posibles de la enzima, dado que existen formas intermedias que dependen de las cantidades relativas de inhibidor y de glucosa-6-fosfato presentes.

5 - LA INHIBICIÓN POR NUCLEÓTIDOS

Las sustancias probadas en la Tabla I inhiben a concentraciones muy elevadas (0,1 - 0,2 M) y por lo tanto no fisiológicas. Posteriormente, se estudió el efecto de varios nucleótidos pero esta vez a pH 5,9.

Las pruebas cinéticas obtenidas (Fig. 14) y el experimento de dinitrofenilación (Tabla XIII) indican que la inhibición es de tipo alostérico.

Dado que la inhibición por cloruro no aumenta al disminuir el pH se deduce que la acción del pH se basa en la ionización del inhibidor y no de la enzima.

Los datos bibliográficos existentes (120, 121, 122) asignan al ATP concentraciones fisiológicas que oscilan entre 2 y 5 mM. Por otra parte, se ha indicado que el pH celular de la levadura (102, 103) parece ser alrededor de 6. De los valores de la Tabla XII se deduce que el ATP y el ADP son fuertemente inhibidores a concentraciones y al pH fisiológico de la levadura.

El glucosa-6-fosfato es capaz de revertir la inhibición de estos dos nucleótidos; pequeños cambios en su concentración producen grandes variaciones en la actividad de la enzima inhibida.

Todos estos factores configuran un panorama atractivo para la postulación de un mecanismo de regulación de la síntesis de glucógeno, que tenga vigencia "in vivo".

No obstante, un posible sistema regulatorio basado en la inhibición por ATP parecería, a primera vista, paradójico. El ATP es el compuesto primario de reserva de energía y es la

vía casi obligada para la transferencia de grupos fosfatos de alta energía, a partir de los procesos respiratorios a los sistemas que en la célula necesitan energía.

La energía almacenada en el ATP es en algunos casos usada directamente y en otros debe ser previamente transferida a compuestos similares al mismo, en estructura y función.

En el caso de la síntesis del glucógeno el sustrato, UDP-glucosa, se forma a partir de UTP y glucosa-1-fosfato mediante la siguiente serie de reacciones (123, 124)



Del siguiente esquema se puede observar que la síntesis de glucógeno se llevará a cabo cuando exista una provisión suficiente de energía acumulada en forma de ATP.

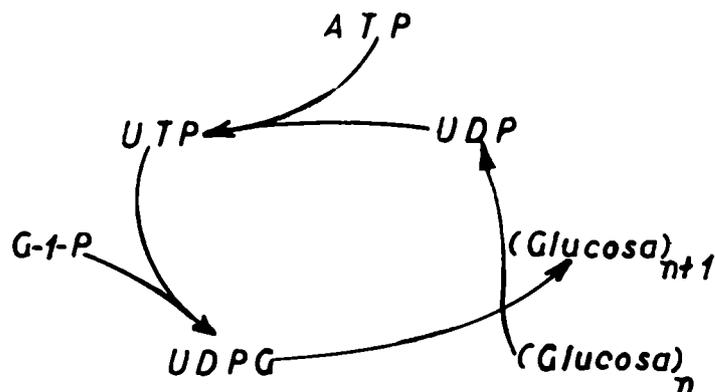


Fig 19

Por otra parte, la degradación del glucógeno dará lugar a la formación de ATP.

De lo antes expuesto se deduce que el ATP no debiera ser un inhibidor de la síntesis de la substancia para cuya formación actúa como fuente de energía. Pero cabe recordar que aunque su concentración disminuya, se transformará en ADP que es un inhibidor tan efectivo como el ATP. Por lo tanto, no serán los cambios relativos de las concentraciones de ADP y ATP los que afectarán la actividad de la enzima, dado que la suma de las concentraciones de ambos la mantendrá permanentemente inhibida. Será entonces el glucosa-6-fosfato el factor responsable de la regulación de la misma.

6 - PROPOSICION DE UN MECANISMO DE REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOGENICO SINTETASA, DE LEVADURA.

En base a los resultados obtenidos y a las ideas anteriormente expuestas se postula un mecanismo de regulación esquematizado en la Fig. 20.

El glucosa-6-fosfato es el primer producto del metabolismo de la glucosa, paso catalizado por la hexoquinasa. En la levadura esta enzima no es inhibida por el producto de reacción, es decir el glucosa-6-fosfato (125). Este es transformado en fructosa-6-fosfato mediante la glucosa-6-fosfato isomerasa. Suponiendo que esta reacción está en equilibrio, el paso limitante y determinante de la concentración del glucosa-6-fosfato será la fosfofructoquinasa. En levadura, la actividad de esta enzima está determinada por la relación ATP/AMP (126).

Cuando la relación ATP/AMP es alta, la fosfofructoquinasa se halla inhibida y la fructosa-1, 6-difosfatasa activada. En este caso, la concentración de fructosa-6 fosfato será

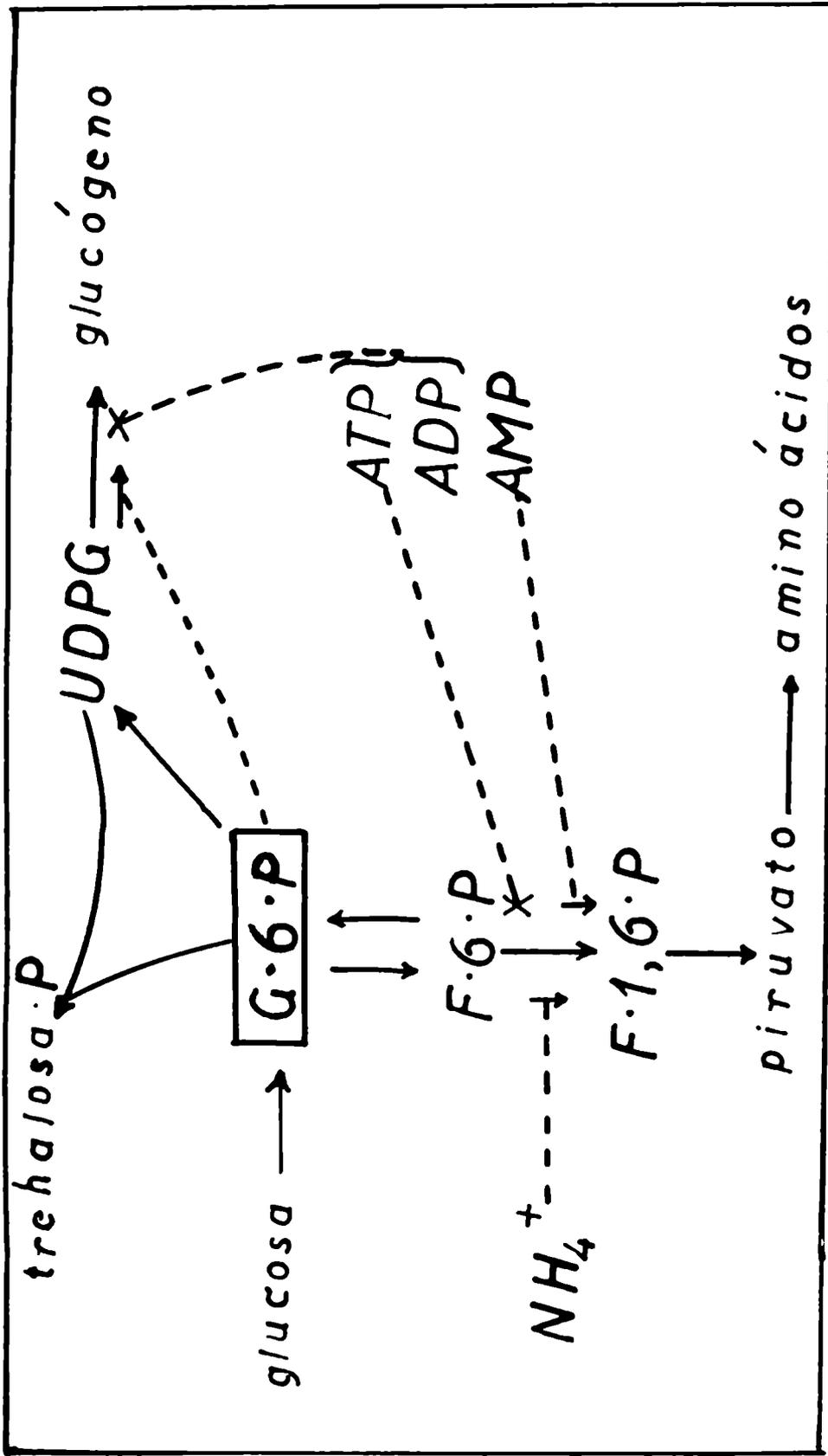


Fig. 20: Esquema tentativo de regulación de la glucógeno sintetasa de levadura. —→ : estimulación de la reacción; X : inhibición de la reacción (símbolos de acuerdo a Atkinson(97))

alta y consecuentemente lo será la de glucosa-6-fosfato. Al elevarse el nivel de glucosa-6-fosfato se desinhibirá la glucógeno sintetasa (inhibida constantemente por ATP y ADP), produciéndose síntesis de glucógeno.

En la situación inversa, es decir a relaciones ATP/ADP bajas, el fructosa-6-fosfato se transformará en fructosa-1,6-difosfato, pues la inhibición por ATP de la fosfofructoquinasa habrá desaparecido por acción del ADP. El glucosa-6-fosfato será distribuido, deteniéndose la síntesis de glucógeno.

Este mecanismo de regulación está relacionado al sistema energético de la levadura.

En base a trabajos efectuados por Trevelyan y Harrison (127) se puede sugerir un mecanismo similar relacionado al crecimiento de las células.

Trevelyan y Harrison han determinado que tanto el glucógeno como la trehalosa se acumulan en células de levadura incubadas en un medio que contiene 0,3 M de glucosa y sales. Al adicionar sales de amonio a este medio, la síntesis de hidratos de carbono de reserva se detiene. Existen evidencias indirectas, basadas en experimentos de fermentación alcohólica de levaduras (128), que hacen suponer que la enzima estimulada por la presencia de sales de amonio es la fosfofructoquinasa. En ausencia de amonio, la glucosa es transformada en hexosamonofosfatos que se acumulan. La presencia del catión produce la fermentación de los ésteres fosfóricos.

Por otra parte, Lowry y Lassonneau (129) han encontrado activación de la fosfofructoquinasa animal por el ión amonio.

En base a las evidencias expuestas, los experimentos de Trevelyan y Harrison se explicarían de la siguiente forma: los iones amonio activan la PFK produciéndose una disminución del glucosa-6-fosfato. En esas condiciones la glucógeno sintetasa es inhibida por el ATP y el ADP deteniéndose así la síntesis de glucógeno. Es así que el carbono de la glucosa se canalizará vía glicólisis para dar lugar a la formación de sustancias nitrogenadas necesarias para el crecimiento.

7 - CONSIDERACIONES SOBRE LA REGULACIÓN POR METABOLITOS Y POR HORMONAS EN SERES DE DISTINTO GRADO DE COMPLEJIDAD

Razones de complejidad y evolución parecen apoyar el esquema de regulación anteriormente postulado.

Los organismos unicelulares, tienen funciones restringidas: crecer y multiplicarse. Es lógico pues suponer que una regulación basada en la variación de niveles de metabolitos sea suficiente para cumplir sus necesidades. En nuestro caso, la actividad de la glucógeno sintetasa de levadura se hallaría modulada por la variación en los niveles de glucosa-6-fosfato y la presencia constante de ATP y ADP.

La evolución ha llevado a las células a diferenciarse, agruparse en tejidos, éstos en órganos para dar lugar a seres complejos que deben llevar a cabo una gran cantidad de funciones.

Tomemos como ejemplo la aparición de una "reacción de alarma" en animales. Una de las respuestas a esta situación es la descarga de adrenalina. Como se ha descrito en "Introducción" una de las acciones de la adrenalina se ubica a nivel de la activación de la adenil ciclasa, que da lugar a la formación de 3' 5' AMP.

Por la presencia de este último se produce una activación "en cascada" (130) de enzimas cuyo resultado final es la transformación de fosforilasa b en a y de glucógeno sintetasa independiente en dependiente, activándose así la glucogenólisis.

Para agregar otro ejemplo de la rapidez a respuestas por mecanismos similares, cabe recordar el sistema de coagulación sanguínea.

Estos mecanismos se caracterizan por la presencia de un "sistema disparador" - en nuestro caso es la activación de la adenil ciclasa- y un "sistema amplificador" - transformaciones sucesivas de enzimas inactivas en activas o, viceversa, por la acción de otras enzimas. De esta forma pueden ser satisfechas las necesidades urgentes en forma rápida.

No por lo anteriormente expuesto debe dejarse de lado la existencia de sistemas de regulación por variaciones en los niveles de metabolitos, en animales. Estos mecanismos llenarían las necesidades locales de las células, mientras que el sistema hormonal se encargaría de efectuar las conexiones con otros lugares del organismo.

El esquema de regulación propuesto debe ser confirmado. Para ello es necesario determinar los niveles de ATP, ADP, glucosa-6-fosfato y glucógeno en distintas condiciones de crecimiento y "habitat" de la levadura.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Manners, D.J., *Advances in Carb. Chem.* 12, 272 (1957).
- 2) Mordoh, J., Krisman, C.R., Leloir, L.F., *Arch. Biochem.* 113, 265 (1966).
- 3) Orrel, S.A., Budding, J., Weissig, M., en *Control of Glycogen Metabolism*, W.J. Whelan y M.P. Cameron ed., Churchill Ltd., London 1964, pág. 29.
- 4) Meyer, K.H., *Helv. Chim. Acta* 24, 375 (1941).
- 5) Illingworth, B., Lerner, J., Cori, G.T., *J. Biol. Chem.* 199, 631 (1954).
- 6) Lerner, J., Illingworth, B., Cori, C.F., *J. Biol. Chem.* 199, 641 (1952).
- 7) Walker, G.J., Whelan, W.J., *Biochem. J.* 76, 264, (1960).
- 8) Krisman, C.R., Tesis, Universidad de Buenos Aires, 1963.
- 9) Northcote, D.H., *Biochem. J.* 53, 348 (1953).
- 10) Manners, D.J., Maung, K., *J. Chem. Soc.* 867 (1955).
- 11) Green, A.A., Cori, G.T., *J. Biol. Chem.* 151, 21 (1943).
- 12) Fischer, E., Krebs, E., *J. Biol. Chem.* 231, 65 (1960).
- 13) Sutherland, R.W., Wosilait, S.D., *J. Biol. Chem.* 218, 459 (1956).
- 14) Krebs, E., Fischer, E., *Advances in Enzymology*, 24, 277 (1962).
- 15) Fischer, E., Appleman, M.M., Krebs, E., en *Control of Glycogen Metabolism*, W.J. Whelan y M.P. Cameron ed., Churchill Ltd., London 1964, pág. 94.
- 16) Krebs, E., Kent, A.B., Fischer, E., *J. Biol. Chem.* 231, 73 (1958).
- 17) Krebs, E., Fischer, E., *Biochim. et Biophys. Acta* 20, 150 (1956).
- 18) Cowgill, R.W., Cori, C.F., *J. Biol. Chem.* 216, 133 (1955).

- 19) Sutherland, E.W., Rall, T.W., Wosilait, W.D., J. Biol. Chem. 218, 483 (1956).
- 20) Krebs, E., Graves, D.J., Fischer, E., J. Biol. Chem. 234, 2867, (1959).
- 21) Meyer, W.L., Fischer, E., Krebs, E., Biochemistry 3, 1033 (1964)
- 22) Krebs, E., Love, D.S., Bratvold, G.E., Trayser, K.A., Mayer, W.L., Fischer, E., Biochemistry 3, 1022 (1964).
- 23) Trayser, K.A., Bratvold, G.E., Fischer, E., Krebs, E., Fed. Proc. 21, 83, (1962).
- 24) Fischer, E., Hurd, S.S., Novoa, W.B., Krebs, E., Biochem. J. 89, 398 (1963).
- 25) Keller, P.J., Cori, G.T., J. Biol. Chem. 214, 127 (1965).
- 26) Graves, D.J., Fischer, E., Krebs, E., J. Biol. Chem. 235, 805 (1960)
- 27) Brown, D.H., Illingworth, B., Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 479 (1961)
- 28) Abdullah, M., Whelan, W.J., Nature 197, 979 (1963).
- 29) Brown, D.H., Illingworth, B., Cori, C.F., Nature 197, 982 (1963).
- 30) Rutter, W.J., Brosemer, R.W., J. Biol. Chem. 236, 1247 (1961).
- 31) Olavarría, J.M., Torres, H.N., J. Biol. Chem. 237, 1746 (1962).
- 32) Torres, H.N., Olavarría, J.M., Acta Physiol. Lat. 66, 95 (1961).
- 33) Rosenfeld, E.L., en Control of Glycogen Metabolism, W.J. Whelan y M.P. Cameron, Churchill Ltd, London 1964, pág. 176.
- 34) Sutherland, E.W., Cori, C.F., J. Biol. Chem. 188, 531 (1951).
- 35) Cahill, G.F., Zetter, S., Hastings, A.B., J. Biol. Chem. 224, 237 (1957).
- 36) Hastings, A.B., Ashmore, J., Cahill, G.F., Arch. Biochem. and Bio phys. 65, 83 (1956).
- 37) Brown, D., Cori, C.F., en The Enzymes, P.D. Boyer, C. Lardy, Myr - bäck ed., New York, Academic Press, 1961, 3, pág. 207.
- 38) Lerner, J., Villar-Palasi, C., Richman, D.J., Ann. New York Acad. Sci. 82, 345 (1959).

- 39) Lynen, F., Hartmann, G., Netter, K.F., Schuegraf, A., en Regulation of Cell Metabolism, G.B.W. Wolstenholme y C.M. O'Connor, Churchill Ltd, London 1959, pág. 256.
- 40) Glaser, L., en Comprehensive Biochemistry, M. Florkin y E.H. Stotz ed., Elsevier P.C., 15, 122 (1964).
- 41) Neufeld, E.F., Hassid, A.Z., Advances in Cart. Chem. 18, 309, (1953).
- 42) Hauk, R., Illingworth, B., Brown, D.H., Cori, C.F., Biochim. et Biophys. Acta 33, 554 (1959).
- 43) Larner, J., Villar-Palasi, C., Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 1234 (1959).
- 44) Mommaerts, W.F., Illingworth, B., Pearson, C.M., Guillory, R.J. Seraydarian, K., Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 791 (1959).
- 45) Schmid, R., Robbins, P.W., Traut, R.R., Proc. Nat. Acad. Sci. 45, 1236 (1959).
- 46) Lewis, G.M., Stewart, K.M., Spencer-Pett, J., Biochem. J. 84, 115P (1962).
- 47) Leloir, L.F., Cardini, C.E., J. Amer. Chem. Soc. 79, 5340 , (1957).
- 48) Leloir, L.F., Olavarría, J.M., Goldemberg, S.H., Carminatti, H. Arch. Biochem. and Biophys. 31, 508 (1959).
- 49) Villar-Palasi, C., Larner, J., Biochim. et Biophys. Acta 30 , 449 (1958).
- 50) Algranati, I.D., Cabib, E., J. Biol. Chem. 237, 1007 (1962) .
- 51) Traut, R.R., Doctoral Thesis, Faculty of the Rockefeller Institute, 1962.
- 52) Madsen, N.B., Biochim. et Biophys. Acta 50, 194 (1961).
- 53) Trivelloni, J.C., Arch. Biochem. and Biophys. 59, 149 (1960).
- 54) Vardanis, A., Biochim. et Biophys. Acta 73, 565 (1963).
- 55) Rosell-Perez, M., Larner, J., Biochemistry 3, 75 (1964).

- 56) Rosell-Perez, M., Villar-Palasi, C., Larner, J., *Biochemistry* 1, 763 (1962).
- 57) Rosell-Perez, M., Larner, J., *Fed. Proc.* 22, 463 (1963).
- 58) Rosell-Perez, M., Larner, J., *Biochemistry* 1, 769 (1962).
- 59) Villar-Palasi, C., Larner, J., *Arch. Biochem. and Biophys.* 94 436 (1961).
- 60) Traut, R.K., Lipmann, F., *J. Biol. Chem.* 238, 1213 (1963).
- 61) Friedman, D.L., Larner, J., *Biochim. et Biophys. Acta* 64, 185 (1962).
- 62) Friedman, D.L., Larner, J., *Biochemistry* 2, 669 (1963).
- 63) Mizukuri, S., Larner, J., *Biochemistry* 3, 1783 (1964).
- 64) Friedman, D.L., Larner, J., *Fed. Proc.* 21, 206 (1962).
- 65) Nolan, C., Nevoa, W.B., Krebs, E., Fischer, E., *Biochemistry* 3, 542 (1964).
- 66) Appleman, M.M., Belocopitow, E., Torres, H.N., *Biochem. Biophys Research Commun.* 14, 550 (1964).
- 67) Appleman, M.M., Birnbaumer, L., Belocopitow, E., Torres, H.N., *Fed. Proc.* 24, 537 (1965).
- 68) Huijing, F., Villar-Palasi, C., Larner, J., *Biochem. Biophys. Research Commun.* 20, 380 (1965).
- 69) Belocopitow, E., Appleman, M.M., Torres, H.N., *J. Biol. Chem.* 240, 3474 (1965).
- 70) Larner, J., *J. Biol. Chem.* 202, 491 (1953).
- 71) Krisman, C.R., *Biochim. et Biophys. Acta* 65, 307 (1962).
- 72) Verhue, W., Hers, H.G., *Biochem. J.* 99, 222 (1966).
- 73) Leloir, L.F., *The Metabolism of Glycogen and its Regulation*, Proc. VIth Pan American Congress of Endocrinology, México, 1965.
- 74) Danforth, W.H., Helmreich, E., Ceri, C.F., *Proc. Nat. Acad. Sci* 48, 1191 (1962).

- 75) Morgan, H.F., Parmeggiani, A., J. Biol. Chem. 239, 2435 (1964).
- 76) Morgan, H.F., Parmeggiani, A., J. Biol. Chem. 239, 2440 (1964).
- 77) Tobias, J., Agin, D.P., Pawlowski, R., J. Gen. Physiol. 45, 989 (1962).
- 78) Winegrad, S., Shanes, A.M., J. Gen. Physiol. 45, 371 (1962).
- 79) Meyer, W.L., Fischer, E., Krebs, E., Biochemistry 3, 1033 (1964)
- 80) Sutherland, E.W., Rall, T.M., Menon, T., J. Biol. Chem. 237, 1220 (1962).
- 81) Sutherland, E.W., Davoren, P., Markman, R., en Control of Glycogen Metabolism, W.J. Whelan y M.P. Cameron ed., Churchill Ltd, London 1964, pág. 233.
- 82) Sutherland, E.W., Rall, T.M., Pharmacological Rev. 12, 265, (1960).
- 83) Posner, J.B., Stern, R., Krebs, E., J. Biol. Chem. 240, 982, (1965).
- 84) Rosell-Perez, M., Lerner, J., Biochemistry 3, 81 (1964).
- 85) Huijing, F., Lerner, J., Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 647 (1966)
- 86) Lerner, J., Rosell-Perez, M., Friedman, D.L., Craig, J.W. en Control of Glycogen Metabolism, W.J. Whelan y M.P. Cameron ed., Churchill Ltd, London 1964, pág. 273.
- 87) Tarnowski, W., Kitter, M., Hilz, H., Biochem. Z. 341, 45 (1964).
- 88) Hornbrook, K.R., Burch, H.B., Lowry, O.H., Biochim. Biophys. Research Commun. 18, 206 (1965).
- 89) Trevelyan, W.E., en The Chemistry and Biology of Yeasts, A.E. Cook ed., Academic Press, New York 1958, pág. 379.
- 90) Cabib, E., Leloir, L.F., J. Biol. Chem. 231, 259 (1958).
- 91) Lindegren, C.C., The Yeast Cell, its Cytology and Genetics, Educational Publishers, St Louis 1949, 7-1.
- 92) Northcote, D.H., Horne, R.W., Biochem. J. 51, 232 (1952).
- 93) Cori, G.T., Colowick, S.P., Cori, C.F., J. Biol. Chem. 123, 375 (1933).

- 94) Gunja, Z.H., Manners, D.J., Maung, K., Biochem. J. 81, 392 (1961).
- 95) Paladini, A.C., Leloir, L.L., Biochem. J. 51, 426 (1956).
- 96) Roseman, S., Distler, J.J., Moffat, J.C., Khorana, H.C., J. Amer. Chem. Soc. 83, 659 (1961).
- 97) Atkinson, D.E., Ann. Rev. Biochem. 35, 85 (1966).
- 98) Monod, J., Changeux, J.P., Jacob, J., J. Mol. Biol. 6, 306 (1962).
- 99) Pontremoli, S., Luppis, E., Wood, W.A., Traniello, S., Horecker, B.L., J. Biol. Chem. 240, 3464 (1965).
- 100) Rosen, C.M., Rosen, S., Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 1156 (1966).
- 101) Villar-Palasi, C., Rosell-Perez, M., Hizukuri, S., Huijing, F., Larner, J., en Methods in Enzymology, E.F. Neufeld y V. Guirgurg ed., 8, 374 (1966).
- 102) Caldwell, P.C., Internatl. Rev. Cytol. 5, 229 (1956).
- 103) Eddy, A.A., en The Chemistry and Biology of Yeasts, A.H. Cook ed., Academic Press, 1958, pág. 157.
- 104) Gerhart, J.C., Pardee, A.B., J. Biol. Chem. 237, 891 (1962).
- 105) Changeux, J.P., J. Mol. Biol. 4, 220 (1962).
- 106) Changeux, J.P., Bull. Soc. Chim. Biol. 46, 1151 (1964).
- 107) Mansour, T.E., Mansour, J.H., J. Biol. Chem. 237, 629 (1962). 67
- 108) Mansour, T.E., J. Biol. Chem. 240, 2165 (1965). 70
- 109) Gerhart, J.C., Schachman, H.K., Biochemistry 4, 1054 (1965).
- 110) Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P., J. Mol. Biol. 12, 88 (1965).
- 111) Koshland, D.E., Nemethy, G., Filmer, D., Biochemistry 5, 365 (1966).
- 112) Kirtly, M., Koshland, D.E., comunicación personal.
- 113) Atkinson, D.E., Hathaway, J., Smith, S., J. Biol. Chem. 240, 2682 (1965).
- 114) Atkinson, D.E., Walton, G.M., J. Biol. Chem. 240, 757 (1965).
- 115) Faragó, A., Dénes, G., Biochim. Biophys. Acta 136, 6 (1967).
- 116) Umbarger, H.E., Brown, B., J. Biol. Chem. 233, 1156 (1958).

- 117) Sturani, E., Datta, F., Hughes, M., Gest, H., Science 141, 1053 (1963).
- 118) Caskey, C.T., Ashton, D.M., Wyngaarden, J.B., J. Biol. Chem. 239, 2570 (1964).
- 119) Kornfeld, S., Kornfeld, R., Neufeld, H.F., O'Brien, P.J., Proc. Nat. Acad. Sci. 52 371 (1964).
- 120) Betz, A., Chance, B., Arch. Biochem. Biophys. 109, 585 (1965).
- 121) Kopperschläger, E., Hofmann, E., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 339, 90 (1964).
- 122) Maitra, P.K., Biochim. Biophys. Research Commun. 25, 462 (1966).
- 123) Berg, J.T., Joklik, W.K., J. Biol. Chem. 210, 657 (1954).
- 124) Kalekar, H.M., Anderson, F.P., Isselbacher, K.J., Biochim. et Biophys. Acta 20, 262 (1956).
- 125) Colowick, S.P., Kalekar, H.M., J. Biol. Chem. 148, 117 (1943).
- 126) Ramaiah, A., Hathaway, J.A., Atkinson, D.E., J. Biol. Chem. 239, 3619 (1964).
- 127) Trevelyan, W.E., Harrison, J.S., Biochem. J. 63, 23 (1956).
- 128) Muntz, J.A., J. Biol. Chem. 171, 653 (1947).
- 129) Lowry, O.H., Passonneau, J., J. Biol. Chem. 241, 2268 (1966).
- 130) Bowness, J.M., Science 152, 1370 (1966).