

FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA

**Estudio de algunos sitios reguladores mediante
modificación química**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

JUAN CARLOS SLEBE TAJMUCH

Mayo de 1985

Profesor Patrocinante: Dra. Catherine Connelly

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E D O C T O R A D O

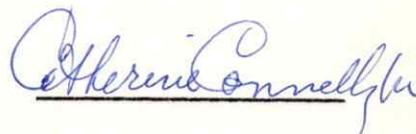
Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

JUAN CARLOS SLEBE TAJMUCH

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de Abril de 1985.

Profesor Patrocinante de Tesis:

Dra. Catherine Connelly M.



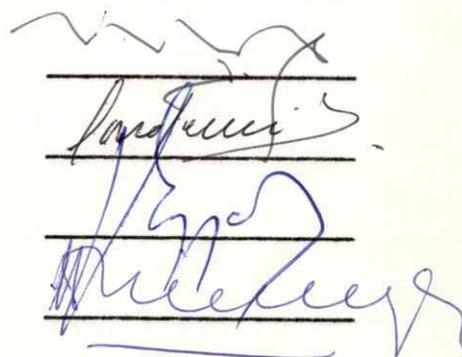
Comisión Informante de Tesis:

Dr. Jorge Babul C.

Dr. Emilio Cardemil U.

Dr. Jaime Eyzaguirre P.

Dr. Hermann Niemeyer F.



Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Enzimología del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, y fue financiada a través de subsidios otorgados por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile (Proyectos RMS-79-9, S-82-36 y RS-82-36), por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo PNUD-UNESCO (Proyecto CHI/81/001) y por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Proyecto 1243).

AGRADECIMIENTOS

La presentación de esta Tesis constituye el resultado de un prolongado proceso, muy laborioso pero también gratificante y pleno de satisfacciones. Como toda producción en ciencia, la labor creativa en una Tesis se obtiene por el esfuerzo mancomunado de un grupo de personas que, teniendo distintas motivaciones, se sienten impulsadas hacia una idea central común.

Esta Tesis no podría haber llegado a concretarse si no se hubiese contado con el importante apoyo, estímulo y colaboración de un grupo importante de colegas y amigos que, en el momento oportuno, estuvieron presentes para entregar su contribución. Su participación está tácitamente en cada párrafo y ha dejado una huella inolvidable, difícil de objetivar e individualizar, pero muy importante en su valor sustantivo.

Al momento de dar término a esta Tesis, se aglomeran las ideas junto a una serie de nombres y surgen los más profundos sentimientos de gratitud y reconocimiento para quienes, de muy diversas formas y en diferentes circunstancias, ofrecieron su apoyo y entregaron su contribución para la realización de esta Tesis, desde sus etapas iniciales hasta la confección del texto definitivo.

A riesgo de incurrir en más de alguna omisión, es mi íntimo deseo expresar aquí mis agradecimientos, a los integrantes del laboratorio de Enzimología del Instituto de Bioquímica de la Universidad Austral de Chile y a aquellos que en algún momento estuvieron en él, especialmente a Román Herrera, Elizabeth Hubert, Ricardo Maccioni, Alicia Ojeda y Alejandro Reyes, por su contribución en parte de los experimentos del presente trabajo.

Al Dr. Marino Martínez-Carrión, de la Virginia Commonwealth University, Richmond, Estados Unidos, por su constante ayuda y enriquecedora amistad.

A la Dra. Catherine Connelly, por el interés y generosidad con que aceptó patrocinar esta Tesis y cuya confianza en mi trabajo ha sido un constante estímulo.

A todos los miembros del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, particularmente a los Dres. Hermann Niemeyer y Tito Ureta, por la cariñosa hospitalidad, amistad, estímulo y apoyo que siempre me han brindado y que ha sido de incalculable valor, tanto en el inicio de mi formación como en el desarrollo de esta Tesis.

Al Dr. Darrell Peterson, de la Virginia Commonwealth University, por su colaboración generosa y efectiva en la realización de los estudios de secuencia.

A Mónica Brito, por su participación en parte de los análisis de composición de aminoácidos, y a Alejandro Reyes quién, con cariño y sacrificio, colaboró en la confección de este trabajo.

Al Sr. Risnel Bustos, por la confección de los dibujos, y a las Sras. Cristina Alvarez y María Angélica Espinoza, por su apoyo en la transcripción del texto de esta Tesis.

A todos los miembros del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, especialmente a Orlando Alarcón, Alejandro Araya, Luis Burzio y Manuel Krauskopf, por el apoyo, amistad, estímulo y crítica discusión.

A todos mis amigos que me estimularon durante la realización de esta Tesis, ayudándome a alcanzar el final.

Juan Carlos Slebe Tajmich

A

Irina,

Ilona, Joana y Felipe

y

Nuestros Padres y Hermanos

INDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
RESUMEN	xxi
ABSTRACT	xxvi
INTRODUCCION	1
Generalidades	1
Mecanismos de regulación	2
Sitios alostéricos	3
Cinética de enzimas no micaelianas	6
Fructosa-1,6-bisfosfatasa, una enzima alostérica	9
1. Propiedades de la enzima	13
2. Fosforilación	18
3. Modificación química	19
4. Propósito de nuevos estudios	23
MATERIALES Y METODOS	29
Reactivos	29
1. Reactivos químicos y materiales cromatográficos	29
2. Preparación del dialdehído-AMP	30
Preparación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa	32
1. Preparación del extracto crudo	32
2. Purificación de la enzima	33
Determinación de la actividad enzimática	35
1. Ensayo colorimétrico para determinar fosfato inorgánico	36
2. Ensayo espectrofotométrico para determinar fructosa-6-fosfato	37

	página
Modificación química	39
1. Modificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por AMP-dialdehído	39
2. Modificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por carbamilación	41
3. Marcación selectiva de la fructosa-1,6-bisfosfatasa	45
Fragmentación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa	46
1. Hidrólisis con subtilisina	46
2. Hidrólisis con tripsina	46
3. Hidrólisis con pronasa	47
4. Hidrólisis con carboxipeptidasas A y B	48
5. Hidrólisis con bromuro de cianógeno	48
6. Aislamiento de péptidos radiactivos	49
Cromatografía y electroforesis	51
1. Preparación de materiales para cromatografía	51
2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	52
3. Determinación de NH ₂ -terminal	54
4. Análisis de aminoácidos	55
5. Análisis de secuencia	57
Otras determinaciones	59
1. Determinación de la concentración de proteínas	59
2. Medición de radiactividad	59
3. Titulación de grupos sulfhidrilos	60
4. Determinación de la concentración de reactivos	60
Análisis de los resultados	61
Algunas consideraciones generales	67
RESULTADOS	71
Modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa con AMP-dialdehído	71
1. Características cinéticas de la Fru-P ₂ asa modificada por AMP _{ox}	71

	página
2. Incorporación de [^{14}C] AMP _{ox} a fructosa-1,6-bisfosfatasa	77
3. Hidrólisis del derivado [^3H] AMP _{ox} -Fru-P ₂ asa con subtilisina	82
4. Hidrólisis del derivado [^3H] AMP _{ox} -Fru-P ₂ asa con tripsina	83
Modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa con cianato de potasio	91
1. Características cinéticas de la Fru-P ₂ asa modificada por KNCO	91
2. Modificación selectiva de cooperatividad entre sitios de AMP	96
3. Pérdida de la activación por cationes monovalentes y su protección con Fru-1,6-P ₂	102
Efecto de potasio sobre la actividad de fructosa-1,6-bisfosfatasa	106
Modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa con cianato de sodio	112
1. Características cinéticas de la Fru-P ₂ asa modificada por NaNCO	112
2. Modificación de la cooperatividad para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa por carbamilación	117
3. Pérdida de la inhibición por AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa mediante tratamiento con cianato	121
4. Efecto de la carbamilación sobre el dominio de unión del nucleótido en la enzima	130
5. Incorporación de [^{14}C] cianato a fructosa-1,6-bisfosfatasa	138
6. Determinación del número de residuos esenciales para la inhibición alostérica de Fru-P ₂ asa por AMP	140
Localización preliminar de residuos lisina del sitio alostérico para AMP	148
1. Análisis de péptidos producidos por digestión de los derivados [^{14}C] cianato-enzima con subtilisina	148
2. Aislamiento de los péptidos que contienen la marca del sitio alostérico y de la región relacionada a la cooperatividad	149

	página
3. Evidencias de la reacción de cianato con residuos lisina	157
4. Localización del residuo lisina relacionado a la cooperatividad	160
5. Localización del residuo lisina del sitio de unión de AMP	163
Efecto del cianato de sodio sobre la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por potasio	167
1. Pérdida de la activación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+ y su reactivación	167
2. Aislamiento de S-[^{14}C] carbamilmcisteína	169
3. Cinética de la pérdida de la activación por K^+ mediante carbamilación	175
4. Efecto de ligandos específicos de fructosa-1,6-bisfosfatasa sobre la modificación por cianato	178
5. Determinación del número de residuos esenciales para la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+	184
6. Efecto del pH sobre la velocidad de pérdida de la activación por potasio	187
7. Características cinéticas de fructosa-1,6-bisfosfatasa carbamilada	190
8. Efecto de Mg^{2+} sobre la fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y carbamilada. Efecto de Fru-2,6- P_2 sobre la carbamilación	193
DISCUSION	198
Modificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa con AMP-dialdehido	198
Modificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa con cianato	209
Cinética de modificación de la cooperatividad hacia AMP	212
Cinética de modificación de la inhibición por AMP	213
Residuos lisina con reactividad diferenciada	215
Ubicación de lisinas en estructura primaria	219
Activación por K^+	222

	página
Inhibición por sustrato	224
Efecto de Mg^{2+}	228
Efecto de Fru-2,6-P ₂	229
Conclusiones finales y proyecciones	232
APENDICE	234
REFERENCIAS	242

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Propiedades de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo	26
Tabla 2.	Modificación química de residuos reactivos en regiones relacionadas con diferentes propiedades de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo	27
Tabla 3.	Efecto de fructosa-1,6-bisfosfato y AMP sobre la modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por AMP _{ox}	76
Tabla 4.	Composición de aminoácidos de fracciones radiactivas aisladas después de digestión de [³ H] AMP _{ox} ⁻ Fru-P ₂ asa con tripsina	88
Tabla 5.	Características cinéticas de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y carbamilada	95
Tabla 6.	Efecto de fructosa-1,6-bisfosfato y AMP sobre la modificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por cianato	101
Tabla 7.	Efecto de la concentración de potasio sobre la inhibición por exceso de sustrato de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa	109
Tabla 8.	Efecto de fructosa-1,6-bisfosfato y AMP sobre la modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por cianato	114
Tabla 9.	Parámetros de la inhibición por AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y modificada en función de la temperatura	132
Tabla 10.	Análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de los gráficos de Tsou en ausencia de Fru-1,6-P ₂	143

Tabla 11.	Análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de los gráficos de Tsou en presencia de Fru-1,6-P ₂	144
Tabla 12.	Composición de aminoácidos de los péptidos radiactivos DI-SPV y DI-HPII obtenidos por hidrólisis trípica	161
Tabla 13.	Identificación y cuantificación de las feniltiohidantoinas removidas por degradación manual de Edman del péptido DI-HPII	162
Tabla 14.	Composición de aminoácidos del péptido radiactivo DII-HPIII obtenido por hidrólisis trípica	164
Tabla 15.	Identificación y cuantificación de las feniltiohidantoinas removidas por degradación manual de Edman del péptido DII-HPIII	165
Tabla 16.	Recuperación de la activación por potasio de fructosa-1,6-bisfosfatasa carbamilada	170
Tabla 17.	Efecto de Fru-1,6-P ₂ sobre la modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por NANCO	182
Tabla 18.	Análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de los gráficos de Tsou Chen-Lu	186
Apéndice		
Tabla 1A.	Modificación química de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo y efectos que se producen en la forma modificada	240-241

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Regulación de la actividad de fosfofructoquinasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa producida por diferentes metabolitos	11
Figura 2. Ilustración esquemática de las características moleculares de los agentes modificantes AMP _{ox} y HNCO y su reacción con grupos reactivos de la proteína	24
Figura 3. Exploración de la estructura química de una enzima mediante modificación química	69
Figura 4. Inhibición de fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo por AMP	73
Figura 5. Inhibición de fructosa-1,6-bisfosfatasa por AMP a diferentes concentraciones de sustrato. Efecto de AMP-dialdehído	74
Figura 6. Inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa modificada por AMP _{ox} y no modificada (control), por concentraciones variables de AMP	78
Figura 7. Gráfico de Hill de la inhibición con AMP de la fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa (control) y modificada por AMP _{ox}	79
Figura 8. Incorporación de [¹⁴ C] AMP-dialdehído a fructosa 1,6-bisfosfatasa en función de la concentración de [¹⁴ C]AMP _{ox}	81
Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida del derivado ³ H AMP _{ox} -Fru-P ₂ asa hidrolizado con subtilisina y radiactividad asociada	84
Figura 10. Cromatografía en Sephadex G-25 de los productos de la hidrólisis de la Fru-P ₂ asa modificada con tripsina	85

	Página
Figura 11. Cromatografía en SP-Sephadex de la fracción 1 obtenida de la columna de Sephadex G-25	86
Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los péptidos trípticos radiactivos obtenidos de la cromatografía en SP-Sephadex	89
Figura 13. Inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa modificada por cianato y no modificada (control), por concentraciones variables de AMP	93
Figura 14. Efecto de la carbamilación sobre la inhibición de fructosa-1,6-bisfosfatasa por AMP	98
Figura 15. Gráficos de Hill para la inhibición de la fructosa -1,6-bisfosfatasa nativa y carbamilada por AMP	99
Figura 16. Cinética de cambios de la actividad de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por modificación con cianato de potasio	104
Figura 17. Efecto de la concentración de potasio sobre la saturación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa	107
Figura 18. Alteración de las propiedades regulatorias de fructosa-1,6-bisfosfatasa por carbamilación con NaNCO	113
Figura 19. Efecto de ligandos sobre la velocidad de modificación del coeficiente de Hill para AMP por carbamilación de fructosa-1,6-bisfosfatasa	119
Figura 20. Efecto de la concentración de potasio sobre la saturación por fructosa-1,6-bisfosfato de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y carbamilada	120
Figura 21. Cinética de modificación de la cooperatividad hacia AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa	122

	Página
Figura 22. Características cinéticas de la reacción de modificación de la cooperatividad para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa	123
Figura 23. Efecto de ligandos de la enzima sobre la velocidad de modificación de la constante de inhibición para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa	124
Figura 24. Cinética de modificación de la constante de inhibición para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa con su cooperatividad alterada	127
Figura 25. Características cinéticas de la reacción de modificación del K_i para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa con su cooperatividad alterada	129
Figura 26. Efecto de AMP sobre la actividad de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y modificada en función de la temperatura	131
Figura 27. Cromatografía en sefarosa-azul del derivado Fru- P_2 asa-cianato que no presenta cooperatividad entre los sitios de unión de AMP y de la Fru- P_2 asa modificada en el sitio alostérico para el nucleótido	135
Figura 28. Gráficos de Hill para la inhibición por AMP de las diferentes fracciones de fructosa-1,6-bisfosfatasa modificada y separadas por cromatografía en sefarosa-azul	137
Figura 29. Incorporación de [^{14}C] cianato en fructosa-1,6-bisfosfatasa	139
Figura 30. Gráfico de Tsou para la pérdida de cooperatividad hacia AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa modificada en presencia y ausencia de Fru-1,6- P_2	142
Figura 31. Gráfico de Tsou de la alteración de la afinidad de la enzima hacia AMP causada por modificación con cianato	146

	página
Figura 32. Efecto del tratamiento de los diferentes derivados [^{14}C] cianato-enzima con subtilisina	150
Figura 33. Cromatografía en Sephadex G-25 de los productos de la hidrólisis con tripsina de la enzima que no presenta cooperatividad entre los sitios de unión de AMP	153
Figura 34. Cromatografía en SP-Sephadex de la fracción radiactiva proveniente de la columna de Sephadex G-25	154
Figura 35. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los péptidos trípticos provenientes del derivado I que contiene [^{14}C] homocitrulina	155
Figura 36. Recromatografía en HPLC de los péptidos que contienen [^{14}C] homocitrulina y que están relacionados con la cooperatividad hacia AMP	156
Figura 37. Purificación de los péptidos trípticos provenientes del derivado II que contienen [^{14}C] homocitrulina, por HPLC	158
Figura 38. Recromatografía en HPLC de los péptidos que contienen [^{14}C] homocitrulina y que están relacionados con la inhibición por AMP	159
Figura 39. Efecto de la carbamilación de fructosa-1,6-bisfosfatasa sobre su activación por potasio	168
Figura 40. Efecto de ligandos de la enzima sobre la velocidad de disociación del complejo enzima-cianato que no presenta activación por K^+	171
Figura 41. Separación en Biogel P-2 de los productos de digestión con Pronasa del derivado [^{14}C] cianato-enzima	173
Figura 42. Identificación de S-[^{14}C] carbamilsteína mediante análisis de aminoácidos	174

	Página
Figura 43. Efecto de la concentración de cianato de sodio sobre la velocidad de pérdida de la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+	176
Figura 44. Características cinéticas de la reacción de modificación de la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+	179
Figura 45. Efecto de ligandos de la enzima sobre la velocidad de pérdida de la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+	180
Figura 46. Cinética de modificación de la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+	183
Figura 47. Gráfico de Tsou para la pérdida de activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+	185
Figura 48. Efecto del pH sobre la pérdida de activación por potasio de fructosa-1,6-bisfosfatasa	189
Figura 49. Efecto de la concentración de potasio sobre la saturación de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y carbamilada	191
Figura 50. Efecto de la modificación con cianato sobre las curvas de saturación por Mg^{2+} de fructosa-1,6-bisfosfatasa, en presencia y ausencia de potasio	194
Figura 51. Modificación de la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+ y su protección por fructosa-2,6-bisfosfato	196
 Apéndice	
Figura 1A. Secuencia de aminoácidos del monómero de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo	234
Figura 2A. Secuencia de aminoácidos del fragmento carboxilo terminal de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de hígado de conejo	235

	página
Figura 3A. Estructura primaria del péptido-S formado por digestión de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de hígado de conejo con subtilisina	236
Figura 4A. Secuencia de aminoácidos alrededor de las lisinas reactivas de diversas fructosa-1,6-bisfosfatasas	237
Figura 5A. Comparación de las secuencias del extremo carboxilo-terminal del péptido-S de diferentes fructosa-1,6-bisfosfatasas con la responsable de la cooperatividad hacia AMP en la enzima de riñón de cerdo	238
Figura 6A. Comparación de la secuencia supuestamente relacionada con el sitio de unión de AMP con secuencias complementarias de diferentes fructosa-1,6-bisfosfatasas	238
Figura 7A. Separación de PTH-aminoácidos por HPLC	239

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP _{ox}	:	AMP 2'3'-dialdehído
ANSA	:	Acido 1-amino-2-hidroxinaftaleno-4-sulfónico
2-azido AMP	:	2-azidoadenosina 5'-monofosfato
8-azido AMP	:	8-azidoadenosina 5'-monofosfato
CPA	:	Carboxipeptidasa A
CPB	:	Carboxipeptidasa B
DEAE-celulosa	:	Dietilaminoetilcelulosa
DNSaa	:	Dansilaminoácido
DNS-Cl	:	Cloruro de dansilo
DTNB	:	5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato)
EDTA	:	Acido etilendiaminotetraacético
Fru-6-P	:	Fructosa-6-fosfato
Fru-1,6-P ₂	:	Fructosa-1,6-bisfosfato
Fru-2,6-P ₂	:	Fructosa-2,6-bisfosfato
Fru-P ₂ asa	:	Fructosa-1,6-bisfosfatasa
GLc-6-P	:	Glucosa-6-fosfato
Glc-6-Pasa	:	Glucosa-6-fosfatasa
Hepes	:	Acido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazina etanosulfónico
NEM	:	N-etilmaleimida
6-P-gluconato	:	6-fosfogluconato
Pi	:	Ortofosfato inorgánico
Piridoxal-P	:	Piridoxal-5'-fosfato
Pipes	:	Acido piperazina-N',N-bis (2-etanosulfónico)

PITC	:	Fenilisotiocianato
PMSF	:	Fenilmetilsulfonil fluoruro
POPOP	:	1,4-bis 2(5-feniloxazolil)benceno
PPO	:	2,5-difeniloxazol
PTC	:	Feniltiocarbamil-d
PTH	:	Feniltiohidantoína
SDS	:	Dodecilsulfato de sodio
SP-Sephadex	:	Sulfopropil-Sephadex
TCA	:	Acido tricloroacético
TEMED	:	Tetrametilendiamina
TFA	:	Acido trifluoroacético
TPCK-Tripsina	:	Tripsina tratada con L-(tosilamido-2-feniletil-clorometilcetona)
Tris	:	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

El presente trabajo confirma que la fructosa-1,6-bisfosfatasa constituye un excelente modelo para analizar la relación estructura-función de una proteína y contribuye al conocimiento refinado tanto de la topografía de la enzima como de la función de las cadenas laterales de los aminoácidos lisina y cisteína que son claves en su mecanismo catalítico. Se ha estudiado el papel funcional de estos residuos mediante modificación química selectiva de grupos ϵ -amino y tiol, mediante el uso de AMP-dialdehído (AMP_{ox}) y cianatos de potasio y sodio.

El tratamiento de la Fru- P_2 asa de riñón de cerdo con AMP_{ox} (el cual no es inhibidor de la enzima) seguido por reducción con NaBH_4 produce un derivado estable que presenta una menor sensibilidad a la inhibición alostérica por AMP y menor actividad catalítica. Altas concentraciones de Fru-1,6- P_2 ejercen una protección significativa de la enzima contra su inactivación, mientras el nucleótido la protege preferencialmente contra la pérdida de su inhibición por AMP. Estudios de unión de [^{14}C] AMP_{ox} en presencia de Fru-1,6- P_2 muestran que hay pérdida total de la cooperatividad entre las subunidades y una disminución parcial de la inhibición de la enzima por AMP, cuando se incorporan 2 moles del análogo por mol de enzima. Estos experimentos sugieren que el análogo de AMP se une covalentemente en o cerca del sitio alostérico para el nucleótido. Análisis de composición de aminoácidos de las fracciones del derivado [^3H] AMP_{ox} -enzima

que contienen la radiactividad, reveló un alto contenido de los ácidos glutámico y aspártico. Esto insinúa que el sitio de unión de AMP_{ox} se corresponde con el descrito para piridoxal-P y que estaría localizado en una región hidrofóbica de la enzima la cual hace que estos residuos lisina tengan una alta reactividad.

El tratamiento de la enzima con cianato provocó una pérdida de la inhibición cooperativa por AMP y de la activación por cationes monovalentes. La presencia del sustrato en la reacción de modificación protegió la enzima contra la alteración de la inhibición por AMP y la activación por potasio, pero no la protegió de la pérdida de la cooperatividad por AMP. Cuando la modificación de la enzima por cianato se realizó en la presencia de AMP, se obtuvo una protección de la sensibilidad de la enzima por el nucleótido y una protección parcial de la cooperatividad.

La cinética de pérdida de la cooperatividad fue de primer orden aparente ($k = 2,3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) e independiente de la modificación simultánea de la inhibición por AMP y de la activación por potasio. Por otro lado, la pérdida de la inhibición de la enzima por AMP presentó una cinética que fue afectada por la modificación simultánea de la cooperatividad, pero fue independiente de la modificación de la activación por potasio. La alteración de la inhibición por AMP es bifásica, distinguiéndose dos constantes de velocidad de primer orden ($k = 1,26 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$; $1,5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$).

Se discuten probables cambios conformacionales inducidos por el sustrato como por la modificación química de residuos lisina. Se concluye que existen residuos lisina de reactividad diferencial hacia el cianato comprometidos en la cooperatividad entre las subunidades de la proteína y en la inhibición por AMP. La carbamilación de aquellos responsables de la interacción cooperativa no produce cambios significativos en el sitio de unión de AMP.

De acuerdo a los datos cinéticos se muestra que una molécula de reactivo debe combinarse por unidad funcional de enzima para formar un derivado enzima-cianato que no presenta cooperatividad entre los sitios de unión de AMP, y otra, para formar un derivado que no presenta inhibición por el nucleótido. La incorporación de [^{14}C]cianato a la enzima y el tratamiento de los datos mediante gráficos de Tsou muestran que 7 a 8 residuos por tetrámero reaccionan con el modificador, cuatro de los cuales son esenciales para la inhibición de la Fru- P_2 asa por el nucleótido. En presencia del sustrato reaccionan 6 a 7 residuos/mol enzima, cuatro de ellos esenciales para la cooperatividad.

La carbamilación de la enzima en presencia de Fru-1,6- P_2 permitió aislar y caracterizar el fragmento involucrado en la interacción cooperativa entre los sitios de unión del AMP. Degradación parcial y manual de Edman del péptido tríptico que contiene la homocitrulina radiactiva mostró la secuencia de residuos Lys-50 - Tyr-57 de Fru- P_2 asa de riñón de cerdo. El residuo modificado correspondió a lisina-50. La remodelación

selectiva de un derivado Fru-P₂asa-cianato con [¹⁴C]cianato permitió aislar y caracterizar un fragmento relacionado con la afinidad de la enzima por AMP. Degradación manual de Edman del péptido tríptico que contiene la radiactividad mostró la secuencia **Ala-291 - Lys-299**, de la secuencia de Fru-P₂asa de riñón de cerdo. El residuo modificado mostró ser el residuo Lys-292. Estos resultados indican que el fragmento aislado es diferente al relacionado con la cooperatividad entre los sitios de AMP.

Se estudió el efecto del K⁺ sobre la actividad de Fru-P₂asa. La adición de K⁺ aumentó la K_m aparente para Fru-1,6-P₂ y disminuyó el efecto inhibitorio producido por exceso de sustrato. A concentraciones de Fru-1,6-P₂ menores a 25 μM el catión monovalente produjo inhibición de la actividad enzimática. Se sugiere la presencia en la enzima de dos sitios distintos para la acción de los cationes monovalentes.

El tratamiento de la Fru-P₂asa con cianato de sodio afectó, además, la inhibición de la enzima por altas concentraciones del sustrato. La presencia de Fru-1,6-P₂ (25 mM) en la mezcla de incubación protegió contra las pérdidas de activación por K⁺ e inhibición por exceso de sustrato, mientras que AMP protegió sólo parcialmente.

La pérdida de la activación por potasio mostró una cinética bifásica, lo que permitió diferenciar dos grupos denominados R y L, en base a su rápida y lenta velocidad de reacción con cianato. Para determinar el pK y la constante de velocidad de segundo orden independiente del pH de los grupos modificados, se

estudió la velocidad de reacción entre Fru-P₂asa y cianato en función del pH. Los valores encontrados fueron: $pK_R = 7,2$, $pK_L = 5,7$, $k_R = 1041 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k_L = 35 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

El tratamiento de los datos de incorporación de [¹⁴C]cianato mediante gráficos de Tsou muestra que dos residuos por tetramero son esenciales para la activación de la enzima por cationes monovalentes. La carbamilación de estos residuos es reversible, se corresponde con la S-[¹⁴C]carbamil-cisteína aislada de la enzima modificada y no altera el efecto del catión monovalente a nivel del sitio catalítico. Se sugiere que K⁺ disminuye la afinidad de la enzima por Fru-1,6-P₂ en el sitio catalítico y en un sitio alostérico para el sustrato.

Por otro lado, la enzima carbamilada no presenta inhibición por altas concentraciones de Mg²⁺; se insinúa que la activación de la Fru-P₂asa por K⁺ puede deberse, además, al anulamiento de la inhibición de la enzima por Mg²⁺. La protección ejercida por Fru-2,6-P₂ contra la modificación del grupo tiol reactivo, comparada con la que presenta Fru-1,6-P₂, indica que el residuo cisteína está ubicado en o cerca de un sitio de alta afinidad de unión por el Fru-2,6-P₂, que no es el sitio catalítico; eventualmente sería un sitio alostérico. Se sugiere que el sitio alostérico se corresponde con el sitio inhibitorio para Fru-1,6-P₂ y el residuo cisteína reactivo podría ser la Cys-128.

ABSTRACT

The present work establishes that fructose-1,6-bisphosphatase is a good model to investigate the structure-function relationship in a protein and contributes to an understanding of the enzyme topography as well as the function of the lysine and cysteine side-chains which are important in its catalytic mechanism. The functional role of these residues have been studied by selective chemical modification of ϵ -NH₂ and thiol groups with AMP-dialdehyde (AMP_{ox}) and potassium and sodium cyanate.

Modification of pig kidney Fru-P₂ase with AMP_{ox} (which is not an inhibitor of the enzyme), followed by reduction with NaBH₄, produced a stable derivative with lower activity and decreased sensitivity to AMP allosteric inhibition. Significant protection from inactivation was afforded by the presence of high Fru-1,6-P₂ concentrations whereas the nucleotide preferentially protected the enzyme against the loss of AMP inhibition. Incorporation of [¹⁴C] AMP_{ox} in the enzyme in the presence of Fru-1,6-P₂ showed that there was total loss of cooperativity and partial decrease in the inhibition by AMP, when 2 moles of the analog were bound per mole of enzyme. These experiments suggest that the AMP analog is covalently bound at or near the nucleotide allosteric site. Amino acid analyses of the radioactive tryptic peptides obtained from the [³H] AMP_{ox}-enzyme derivative, revealed a high content of glutamic and aspartic acids. The AMP_{ox} binding site

probably corresponds to that described for pyridoxal-P and is located in a hydrophobic region of the enzyme that gives differential reactivity to the lysine residues.

The treatment of the enzyme with cyanate leads to a loss of allosteric inhibition as well as to a loss of the activation by monovalent cations. The presence of Fru-1,6-P₂ in the reaction system eliminated the loss of both AMP inhibition and the activation by potassium, but did not protect against the loss of cooperativity. When the modification of the enzyme by cyanate was carried out in the presence of AMP, a protection against the loss of AMP inhibition and a partial alteration of cooperativity was obtained.

The kinetics of the cooperativity change was pseudo first order ($k=2.3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) and independent of simultaneous alteration of both the sensitivity to AMP and activation by potassium. On the other hand, the loss of inhibition by AMP was affected by the changes on cooperativity but was not dependent on the loss of monovalent cation activation. The alteration of the inhibition by AMP is biphasic, with two first-order rates ($k=1.26 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ and $1.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) being distinguishable.

Conformational changes induced by both Fru-1,6-P₂ and chemical modification of lysine residues are discussed. From the evidence presented it is concluded that there are lysine residues in the enzyme with different reactivities towards cyanate. These lysine residues are involved in the cooperative inter-

action between the AMP binding sites and in the inhibition by AMP. The carbamylation of the lysine residues involved in AMP cooperativity does not perturb significantly the AMP binding site.

Based on kinetic data, it is shown that one molecule of reagent must combine per enzyme functional unit in order to produce a cyanate-enzyme derivative with no cooperativity. An additional molecule per enzyme unit must combine to produce a derivative with decreased sensitivity to AMP. Incorporation of [^{14}C]cyanate in the enzyme and analysis of the data by the Tsou plot shows 7-8 residues per tetramer react with the modifier, four of them being essential for the inhibition by the nucleotide. In the presence of Fru-1,6- P_2 , 6-7 residues react per mole of enzyme, four of them essentials for AMP cooperativity.

The carbamylation of the enzyme in the presence of Fru-1,6- P_2 permitted the isolation and characterization of the fragment involved in AMP cooperativity. Partial, manual Edman degradation of the tryptic peptide that contains the radioactive homocitrulline showed the sequence of residues Lys-50-Tyr-57 of pig kidney Fru- P_2 ase. The modified residue was shown to be lysine-50. Selective remodification of a Fru- P_2 ase - cyanate derivative with [^{14}C] cyanate permitted the isolation and characterization of the fragment related to the AMP enzyme affinity. Manual Edman degradation of the tryptic peptide which contains the radioactivity showed the sequence Ala-291- Lys-299.

The modified residue was shown to be lysine-292. These results indicate that this fragment is different from that related to the cooperative interaction between AMP binding sites.

The effects of K^+ on the Fru- P_2 ase activity have been studied. The addition of K^+ increased the apparent K_m for Fru-1,6- P_2 and decreased the inhibitory effect at high concentrations of substrate. At concentrations of Fru-1,6- P_2 below 25 μ M, the monovalent cation became inhibitory. The presence of two distinct sites for the action of monovalent cations is suggested.

The treatment of Fru- P_2 ase with sodium cyanate also affected the high substrate inhibition. Significant protection from the loss of K^+ activation and substrate inhibition was afforded by the presence of Fru-1,6- P_2 (25 mM) while only a partial protection was obtained with AMP.

Alteration of monovalent cation activation showed biphasic kinetics and two groups, namely R or L type, were distinguishable based on their fast or slow rates of reaction with cyanate. To determine the pK and the pH independent second order rate constant of the modified groups, the reaction rate between Fru- P_2 ase and cyanate was followed as a function of pH . The values found were : $pK_R=7.2$, $pK_L=5.7$, $k_R=1041 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_L=35 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Two moles of [^{14}C] cyanate / mole of enzyme were incorporated concomitantly with the loss of K^+ activation. The carbamylation was reversible, corresponding to the S- [^{14}C] carbamyl-cysteine

isolated from the modified enzyme, and did not alter the monovalent cation effect on the catalytic site. It is suggested that K^+ decreases the affinity of the enzyme for Fru-1,6- P_2 at both the catalytic site and at an allosteric site for the substrate.

On the other hand, the carbamylated enzyme is not inhibited by high Mg^{2+} concentrations. This leads to the proposal that K^+ activation could be due, in addition, to the removal of the Mg^{2+} inhibition. The protection exerted by Fru-2,6- P_2 against the modification of the thiol group (as compared to that exerted by Fru-1,6- P_2) indicates that the cysteine residue is located at or near an allosteric site for Fru-2,6- P_2 and that the site is not the catalytic site. It is proposed that high levels of Fru-1,6- P_2 probably inhibit by binding to this allosteric site and that the reactive cysteine residue could be the cysteine-128.

INTRODUCCION

Generalidades

Las células rara vez sintetizan o degradan más material que el requerido para su metabolismo y crecimiento normal. En efecto, las principales vías metabólicas poseen la capacidad de autorregularse. El control del metabolismo celular, en su esencia, involucra la regulación de la actividad enzimática. Así, la modulación de una vía metabólica se puede lograr mediante la modificación de la actividad de la enzima limitante de la velocidad de la vía, proteína que suele denominarse enzima reguladora (Umbarger, 1969).

La función biológica de las proteínas requiere de una estructura condicionada por las uniones covalentes en la cadena polipeptídica y de una conformación que es modulada por ligandos específicos. Aunque la mayoría de las funciones celulares involucran la participación de proteínas, la unión de ligandos a la proteína es siempre el preludio a cualquier cambio causado por ella.

La gran diversidad de funciones de las proteínas hace necesario el estudio de los aspectos estructurales, como asimismo el de los mecanismos involucrados en las interacciones proteína-macromolécula y proteína-ligando. Es así que, para estudiar aquellas enzimas que están adaptadas para cumplir una

función reguladora, además de la catalítica, se requieren enfoques experimentales que proporcionen información sobre la relación entre la estructura de la proteína y su rol fisiológico. Para estudiar la relación estructura-función de proteínas es de primordial importancia la identificación y localización de residuos de aminoácidos de los sitios activo y reguladores de la enzima, así como la asignación de funciones específicas en el mecanismo enzimático. Se acepta que para cada enzima, la compartimentalización celular y su participación en el metabolismo están asociadas a las propiedades fisicoquímicas de la proteína. Por esto, se hace de particular interés entender los procesos que resulten de la interacción, en solución, de enzimas alostéricas con sus ligandos; i.e., sustratos, productos y metabolitos reguladores.

Mecanismos de regulación

La modulación de la velocidad de reacción por control directo de la actividad enzimática puede ocurrir ya sea a través del mecanismo catalítico propiamente tal, por ejemplo, efectos de sustratos, productos, coenzimas, como asimismo por acoplamiento de este mecanismo catalítico a otros procesos: retroinhibición, activación por precursor, polimerización-despolimerización, unión a membranas, modificación covalente catalizada enzimáticamente y control por cationes monovalentes y divalentes (para revisión y referencias ver Stadtman, 1970). He

estimado de particular interés considerar principalmente la base molecular de las isotermas de unión sigmoideas (efectos cooperativos) y el control ejercido por metabolitos que no son sustratos o productos de la reacción enzimática misma (regulación alostérica).

Sitios alostéricos

El concepto generalizado de sitios alostéricos en proteínas y sus interacciones con moléculas efectoras ha sido elegantemente discutido por Monod y col. (1963). Ellos pusieron de relieve el hecho que los metabolitos efectores de enzimas reguladoras son alostéricos (i.e., no tienen parecido estructural) con respecto a los sustratos normales de las enzimas. Este hecho, unido a la consideración de que las enzimas generalmente están caracterizadas por un alto grado de especificidad hacia el sustrato, los llevó a proponer que los metabolitos efectores de enzimas reguladoras ejercen sus efectos interactuando en sitios alostéricos específicos en la enzima y, de ese modo, inducen o estabilizan estados conformacionales, los cuales tienen una diferente afinidad por los sustratos en el sitio catalítico. Así, los efectores alostéricos fueron definidos como interacciones indirectas entre sitios de unión topográficamente distintos, lo que había sido sugerido con anterioridad por Gerhardt y Pardee (1962).

Se han utilizado diversos enfoques experimentales para poner de manifiesto la existencia de un sitio alostérico diferente al sitio catalítico:

1. Las enzimas reguladoras pueden hacerse insensibles a la acción de activadores o inhibidores sin que se altere su actividad catalítica. Así, se ha logrado obtener desensibilización selectiva por tratamientos de la enzima con agentes mercuriales, urea o calentamiento breve (Gerhardt y Pardee, 1962; Marcus, 1967), enzimas proteolíticas (Taketa y Pogell, 1965), anhídrido acético (Marcus, 1968), piridoxal 5-fosfato (Marcus y Hubert, 1968; Colombo y col., 1972), fuerza iónica o envejecimiento a 0°-5° (Murphy y Wyatt, 1965) y con cambios en el pH del medio (Hathaway y Atkinson, 1963). Esta desensibilización se atribuye a una desnaturalización o modificación química selectiva del sitio alostérico.
2. Retroinhibidores (efectores negativos) o metabolitos activadores (efectores positivos) a menudo protegen la actividad catalítica de una enzima reguladora contra agentes desnaturizantes, mientras los sustratos no lo hacen. Es improbable que la unión de efectores al sitio catalítico tenga algún efecto protector que no se manifieste con el propio sustrato (Stadtman y col., 1961).
3. Se han obtenido mutantes que afectan la susceptibilidad de ciertas enzimas reguladoras a la acción de efectores negativos, sin alteración de la actividad catalítica (Gerhardt y Pardee, 1962; Monod y col., 1963).

4. Enzimas provenientes de distintas fuentes muestran diferencias en cuanto a la presencia de un sitio alostérico. Así, en contraposición a las enzimas aisladas de tejidos gluconeogénicos animales, la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fru-P₂asa) de cloroplastos de espinaca no es inhibida por AMP (Buchanan y col., 1971), una de las propiedades mas generales de las fructosa-1,6-bisfosfatasas.
5. Estudios de unión de efectores negativos han mostrado que esta unión puede no ser influenciada por la presencia de concentraciones saturantes de sustratos y vice-versa. Por ejemplo, la unión del inhibidor AMP a ciertas formas de glutamina sintetasa de E. coli no es afectada por la presencia de concentraciones saturantes de los sustratos NH₃ o glutamato (Ginsburg, 1969). Más aún, en Fru-P₂asa de hígado de rata el sustrato aumenta la unión del inhibidor AMP (McGrane y col., 1983).
6. Se ha demostrado que, en algunas enzimas, el sitio de unión del efector y el sitio catalítico se encuentran en subunidades separadas y diferentes de la enzima, por ejemplo, aspartato transcarbamilasa (Gerhardt y Schachman, 1965).

En vista de estas consideraciones los efectores negativos que presentan aparentemente cinéticas que se definen clásicamente como de naturaleza competitiva, no ejercen su efecto por competencia directa con el sustrato por el sitio catalítico de la enzima. Estos efectores reaccionan en un sitio alostérico y

estabilizan o inducen un cambio conformacional de la enzima. Para clarificar la nomenclatura utilizada, se ha denominado "Sistema K" a aquellos que presentan un comportamiento cinético competitivo, ya que involucran cambios en la K_m aparente para el sustrato ($K_{0,5}$) y no cambian la $V_{m\acute{a}x}$. Los sistemas no competitivos son definidos como "Sistema V" pues involucran cambios en la $V_{m\acute{a}x}$ pero no en la K_m aparente (Monod y col., 1965).

Cinética de enzimas no micalianas

Normalmente la unión del sustrato a la enzima sigue una función de saturación hiperbólica, pero con frecuencia en las enzimas regulables la función de saturación del sustrato es sigmoidea (Umbarger, 1956; Gerhardt y Pardee, 1962). Tales cinéticas más complejas son compatibles con la existencia en la enzima de dos o más sitios interaccionantes de unión de sustrato, de forma que la unión de una molécula de sustrato facilitaría (efecto cooperativo positivo) la unión de la molécula siguiente. Este comportamiento cinético "anormal" es una característica común en un gran número de enzimas reguladoras (Neet, 1980). La curva sigmoidea presenta un intervalo de concentraciones donde la velocidad de reacción es mucho más sensible a la concentración de sustrato que en el caso de una función hiperbólica; así la actividad enzimática puede ser regulada en forma muy fina por las concentraciones de sustrato y efectores.

Las interacciones o efectos homotrópicos corresponden a los que se producen entre moléculas de ligando idénticas y pueden

la respuesta sigmoidea de la actividad enzimática frente a aumentos en la concentración del sustrato o efectores, es de gran importancia en la regulación celular.

El término enzima alostérica a veces ha llevado a confusión ya que en algunas oportunidades se ha propuesto que cualquier enzima que exhibe cinética sigmoidea, es alostérica. La definición original se basó en el hecho que el sitio de unión para los efectores (el sitio alostérico) es claramente diferente al sitio de unión para el sustrato. Esta definición no hace referencia a la presencia o ausencia del comportamiento cinético cooperativo, ni al mecanismo de los efectos cooperativos. De este modo, el uso del término en forma adecuada es útil ya que describe una situación única para muchas enzimas regulatorias. Sin embargo, al usarse en forma amplia, es decir, para denotar la existencia de un comportamiento cinético cooperativo o el mecanismo de éste, el término se hace ambiguo y a veces erróneo. La existencia de una cinética cooperativa no ha sido demostrada en todas las enzimas alostéricas y las funciones de saturación sigmoideas podrían derivar de alguno de los mecanismos propuestos, diferentes a aquel en que se basó el modelo de transición-concertada, por ejemplo glucoquinasa (Cárdenas, 1982). Por esto, el término "enzima alostérica" se restringe al conferido en la definición original (Monod y col., 1963). Así, puede eventualmente encontrarse que un gran número de enzimas son regulatorias mientras ninguna puede ser sólo alostérica.

Fructosa-1,6-bisfosfatasa, una enzima alostérica

Uno de los nutrientes que la célula utiliza como fuente de energía es la glucosa. En el metabolismo de este carbohidrato se destacan entre otras, la vía catabólica glicolítica y la vía anabólica gluconeogénica.

El control de la glicólisis y de la gluconeogénesis es ejercido a nivel de un limitado número de reacciones termodinámicamente irreversibles, de modo que se requieren enzimas diferentes para catalizar la interconversión de metabolitos en sentidos opuestos. Entre estas enzimas tenemos aquellas que conducen a la formación o a la hidrólisis de fructosa-1,6-bisfosfato, un metabolito común a ambas vías metabólicas (Pontremoli y Horecker, 1971). Una forma importante de control de la velocidad neta del flujo de estas reacciones opuestas sería la fluctuación de la concentración de Fru-1,6-P₂ (Kirtley y McKay, 1977). La concentración de este metabolito intermediario depende de la actividad de dos enzimas diferentes que catalizan estas reacciones. En la dirección de la glicólisis es requerida fosfofructoquinasa y en la gluconeogénesis la reacción inversa es catalizada por fructosa 1,6-bisfosfatasa. La figura 1 muestra las reacciones que generan y regulan el nivel de Fru-1,6-P₂ y el papel clave de la fructosa-1,6-bisfosfatasa en la regulación de la gluconeogénesis.

Ciclaje de sustratos. Si bien es cierto que el funcionamiento simultáneo de estas dos enzimas constituiría un ciclo de sustrato energéticamente inútil ya que conduciría a la hidrólisis innecesaria de ATP, hay pruebas de que este ciclo existe (Newsholme y

Gevers, 1967; Newsholme y col., 1972; Hers y col., 1981) y que la regulación del metabolismo de los glúcidos a este nivel dependería de la relación entre las actividades de fosfofructoquinasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa (Bloxham y col., 1973). Esta razón de actividades está relacionada directamente a la carga energética de la célula ya que ambas enzimas están sujetas, entre otros, a un control por AMP (McClard y Atkinson, 1979).

Es evidente que las actividades de estas dos enzimas deben ser controladas a través de mecanismos sensibles que permitan mantener su normal funcionamiento y disminuir la formación del ciclo del sustrato (para revisiones ver Scrutton y Utter, 1968; Katz y Rognstad, 1975; Hue, 1981; Hers y Hue, 1983; Tejwani, 1983). En esta y otras situaciones análogas, el acoplamiento de reacciones antagónicas se previene por la acción recíproca de metabolitos en las dos enzimas involucradas. Así, los efectores que activan una enzima inhiben la otra y vice-versa (Stadtman, 1970). Como se muestra en la figura 1, varios son los metabolitos que presentan efectos recíprocos sobre las actividades de fosfofructoquinasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa. La fosfofructoquinasa es activada por AMP y Fru-1,6-P₂ (Passoneau y Lowry, 1962, 1964; Ramaiah y col., 1964; Underwood y Newshold, 1965, 1967; Bloxham y Lardy, 1973) y es inhibida por ATP (Ramaiah y col., 1964); en cambio, sobre Fru-P₂asa, estos metabolitos tienen efectos opuestos (Mendicino y Vasarhely, 1963; Taketa y Pogell, 1965; Opie y Newsholme, 1967; McClard y Atkinson, 1979). La efectividad de este control aumenta ya que las concentraciones relativas de AMP

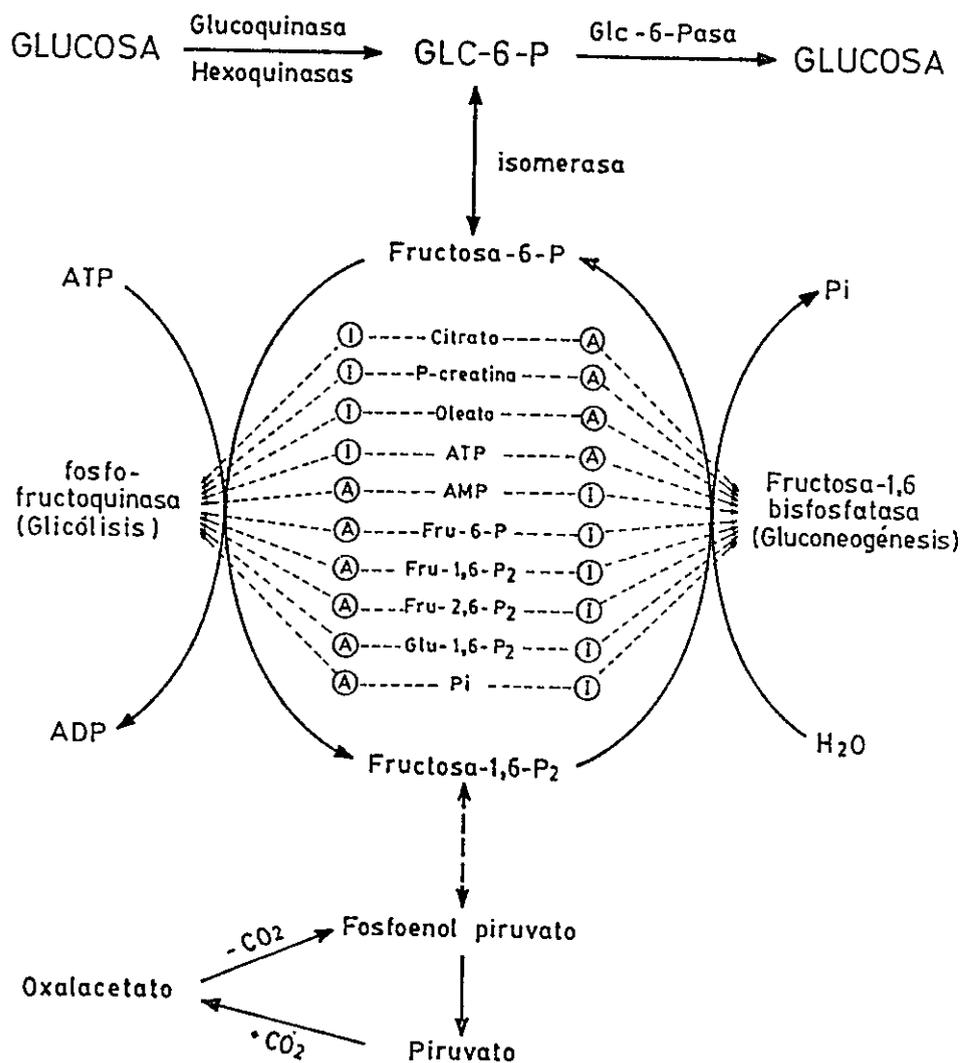


FIGURA 1. Regulación de la actividad de fosfofructoquinasa y fructosa 1,6-bisfosfatasa producida por diferentes metabolitos. La acción antagónica de activadores (A) e inhibidores (I) sobre las actividades de estas enzimas puede reducir la magnitud del ciclo del sustrato *in vivo*. (Adaptado de Pontremoli y Horecker, 1971; Tejwani, 1983).

y ATP varían inversamente. Además, en la figura 1 se indica el efecto recíproco de otros metabolitos (ver Tabla II en Stadtman, 1970; Tabla II y Fig. 3 en Tejwani, 1983) sobre las actividades de estas dos enzimas. Si bien la mayoría de las propiedades regulatorias de las fosfofructoquinasas y Fru-P₂asas de mamíferos son comunes, la intensidad de respuesta probablemente depende del organismo y tejido en el que se estudie. Por otro lado, Babul y Guixé (1983) han postulado que fosfoenolpiruvato podría prevenir la formación del ciclo del sustrato en Escherichia coli, pues ejerce un efecto activante sobre la Fru-P₂asa, es decir, bloquea la inhibición de la enzima por AMP (Babul y Guixé, 1983), e inhibe a la forma más abundante de fosfofructoquinasa de E. coli (Babul, 1978). Estudios de la existencia del ciclo futil bajo condiciones gluconeogénicas han mostrado que éste es marginal (Daldal y Fraenkel, 1983).

Marcus (1981) ha discutido el significado regulatorio de la inhibición de Fru-P₂asa por AMP. Utilizando datos obtenidos con la enzima de hígado de ratón concluye que, a concentraciones fisiológicas de AMP (150-200 µM), la actividad de la enzima se hace del orden de las velocidades de gluconeogénesis (i.e., hasta 2 umol/min/g de hígado) y que de esta forma AMP lleva a Fru-P₂asa al rango de actividad (0 a 3 U/g de hígado) de su contraparte, la enzima glicolítica fosfofructoquinasa. De esta forma, una disminución en la actividad de esta última enzima podría producir un gran aumento en el flujo gluconeogénico.

Algunas hormonas pueden interferir en la actividad de algunas enzimas regulatorias, por ejemplo a través de una fosforilación reversible que modifica la cinética de la enzima con respecto a sus sustratos y la susceptibilidad a la acción de activadores e inhibidores alostéricos.

Desde su descubrimiento por Gomori (1943), el rol clave de Fru-P₂asa en la gluconeogénesis ha sido ampliamente reconocido y, hasta ahora, se ha acumulado una gran cantidad de información referente a esta enzima (para revisiones recientes ver Hue, 1981; Marcus, 1981; Benkovic y De Maine, 1982; Tejwani, 1983; Hers y Hue, 1983).

Propiedades de la enzima. La fructosa-1,6-bisfosfatasa (D-fructosa-1,6-bisfosfato 1-fosfohidrolasa, E.C. 3.1.3.11), constituye un excelente modelo para estudiar las características estructurales de una enzima y cómo éstas se comportan en el complejo enzima-sustrato, dado que puede obtenerse en grandes cantidades en un alto estado de pureza. Además, se encuentra disponible una considerable cantidad de información química y física sobre ella (Pontremoli y Horecker, 1971; Horecker y col., 1975, 1980; Marcus, 1981; Benkovic y De Maine, 1982; Tejwani, 1983). Sin embargo, se conoce poco acerca del papel y de las propiedades de algunas cadenas laterales de aminoácidos, como los residuos lisina y cisteína, que son claves en el mecanismo catalítico de otras enzimas (Glazer, 1970; Braunstein, 1973; Chou y Wilson, 1974; Sigman y Mooser, 1975; Wood y col., 1981). Gran parte del trabajo realizado con Fru-P₂asa hasta alrededor de 1971 fue realizado con



raciones enzimáticas caracterizadas por un pH óptimo alcalino (enzima "alcalina"). En ese momento se estableció claramente que la forma nativa de la enzima muestra actividad máxima a pH neutro (Byrne y col., 1971; Traniello y col., 1972; Nakashima y Horecker, 1971). Estos cambios en pH óptimo y en otras propiedades de la enzima son producto de proteólisis limitada que se produce durante el proceso de purificación (Traniello y col., 1971; Colombo y Marcus, 1973). Por esto, la investigación de Fru-P₂asa puede dividirse cronológicamente en dos períodos: el primero, comprendido entre 1943 y 1971, en el que se estudia principalmente la enzima alcalina, y el segundo, desde 1972 a la fecha, dedicado a estudiar la forma "neutra" (nativa) de Fru-P₂asa.

La fructosa-1,6-bisfosfatasa cataliza la hidrólisis de fructosa-1,6-bisfosfato para lo que requiere Mg²⁺ (Gomori, 1943; Pontremoli y col., 1968; Hubert y col., 1970) o Mn²⁺ (Mokrash y McGilvery, 1956; Pontremoli y col., 1968). La Fru-P₂asa nativa aislada de diferentes fuentes es un tetrámero compuesto de subunidades idénticas con pesos moleculares que varían entre 36.000 y 40.000 (Benkovic y De Maine, 1982; Rittenhouse y col., 1983). Se ha determinado que el de la enzima de riñón de cerdo es de 36.534 (Marcus y col., 1982). El tetrámero posee cuatro sitios catalíticos y entre 2 y 4 sitios de unión de AMP (Taketa y Pogell, 1965; Nimmo y Tipton, 1975; Benkovic y De Maine, 1982; Tejwani, 1983; McGrane y col., 1983).

Además de su inhibición alostérica por AMP, la actividad de la Fru-P₂ asa es regulada por otros mecanismos, entre los que destacan la inhibición por altas concentraciones de su sustrato Fru-1,6-P₂ (Taketa y Pogell, 1963, 1965; Traniello y col., 1971; De Maine y Benkovic, 1972; Pontremoli y col., 1973; Marcus y col., 1973; Nimmo y Tipton, 1975a) y por el efector, recientemente descubierto, fructosa-2,6-bisfosfato (Van Schaftingen y Hers, 1981; Pilkis y col., 1981, 1981a; Hers y Van Schaftingen, 1982; Gottschalk y col., 1982; François y col., 1983). Son importantes también la activación por cationes monovalentes (K⁺, NH₄⁺) (Hubert y col., 1970; Nakashima y Tuboi, 1976) y por cationes divalentes (Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺) (Gomori, 1943; Mokrash y McGilvery, 1956; Nimmo y Tipton, 1975a; Tejwani y col., 1976, 1976a). Estos últimos esenciales para la actividad catalítica, además funcionan como efectores alostéricos; por ejemplo, Zn²⁺ puede actuar como activador o regulador alostérico negativo, dependiendo de su concentración; Mg²⁺ puede ser activador o inhibidor, dependiendo de la concentración de Fru-1,6-P₂ (para revisión, ver Tejwani, 1983). Se ha descrito la presencia de dos a tres sitios de unión para metales divalentes por subunidad (Tejwani, 1983) y se ha sugerido que Fru-P₂ asa podría funcionar *in vivo* como una zinc metaloproteína (Benkovic y col., 1978). Por otra parte, Marcus y col. (1973) han postulado la presencia de un segundo sitio de unión para Fru-1,6-P₂, relacionado a la inhibición por exceso de sustrato.

Algunas características cinéticas de estos procesos han sido analizadas. Se han observado diversos efectos, entre otros: la presencia de cationes monovalentes no solo aumenta la constante de afinidad aparente para Mg^{2+} y Fru-1,6-P₂, sino también la sensibilidad de la enzima hacia AMP; al aumentar la concentración del catión divalente aumenta la respuesta cooperativa de la enzima hacia AMP, observándose una disminución correlativa de la afinidad hacia el inhibidor (Hubert y col., 1970; Nimmo y Tipton, 1975a). Sin embargo, los mecanismos de las interacciones entre el sustrato, los efectores y la enzima, no han sido totalmente esclarecidos. Se sabe asimismo, que la enzima es susceptible a proteólisis durante el proceso de purificación, o en ciertas condiciones fisiológicas, liberándose un fragmento de 60 residuos (péptido-S) que corresponde al extremo amino terminal de la proteína. Se genera, además, una proteína-S con un pH óptimo alcalino, una menor sensibilidad a AMP y que no presenta activación por cationes monovalentes (Colombo y Marcus, 1973; Horecker y col., 1975; Dzugaj y col., 1976; Horecker y col., 1978; Marcus, 1981).

El efecto de los cationes monovalentes sobre Fru-P₂asa (Hubert y col., 1970; Behrisch, 1971; Black y col., 1972; González y col., 1972; Hochachka, 1972; Villanueva y Marcus, 1974; Marcus, 1975) ha sido poco estudiado, si se le compara al del nucleótido. En uno de los trabajos existentes sobre este tema (Nakashima y Tuboi, 1976) se ha sugerido la presencia de dos sitios distintos para la acción del catión monovalente en Fru-P₂asa

Uno de estos sitios sería el sitio catalítico y el otro sería un sitio alostérico para el K^+ .

Teniendo presente que la activación por cationes monovalentes es postulada como un mecanismo regulatorio de la enzima, es importante tratar de dilucidar el modo de acción del K^+ sobre Fru- P_2 asa, y asimismo esclarecer el rol funcional y las propiedades de aquellos grupos de la enzima involucrados en la interacción con este catión.

Por otro lado, puesto que la inhibición altamente específica de la Fru- P_2 asa por AMP es uno de los mecanismos postulados de regulación de la gluconeogénesis, el conocer a través de la modificación química las interacciones que se establecen entre una región específica de la enzima y su inhibidor alostérico AMP, conduciría a una mejor comprensión del mecanismo que modula la actividad catalítica de la Fru- P_2 asa.

La existencia del sitio de unión para el AMP ha sido demostrada por estudios de tipo cinético (Taketa y Pogell, 1965; Stone y Fromm, 1980), unión del nucleótido (Pontremoli y col., 1969, Kratowich y Mendicino, 1974), modificaciones químicas (para revisión, Benkovic y De Maine, 1982) y marcación por afinidad (Marcus y Haley, 1979; Slebe y col., 1981).

La menor sensibilidad que presenta la proteína-S al inhibidor alostérico AMP, apoyó la idea que el sitio de unión del nucleótido estaría localizado en este péptido. Sin embargo, no

ha sido posible hasta la fecha probar esta hipótesis y, por el contrario, la modificación química de Fru-P₂asa por reactivos que presumiblemente modifican el sitio de AMP, como piridoxal-P (Cruz y col., 1979; Marcus y col., 1981) y 8-azido-AMP (Marcus y col., 1981) dan como resultado la modificación de residuos de la proteína-S y no del péptido-S.

Recientemente se ha determinado la estructura primaria de la Fru-P₂asa de riñón de cerdo, en la que se han presumiblemente localizado los sitios catalítico, alostérico para AMP y de fosforilación (Marcus y col., 1982). Además, se conocen las secuencias del péptido-S (El-Dorry y col., 1977) y de los péptidos que contienen el sitio catalítico y el sitio alostérico para AMP (Xu y col., 1981, 1982; Suda y col., 1982), de la enzima de hígado de conejo (determinación de secuencia incompleta). Sin embargo, se ha sugerido que los residuos comprendidos en la cooperatividad hacia AMP son diferentes a los relacionados con la afinidad hacia el inhibidor (Slebe y col., 1981). Esto hace pensar que deberían encontrarse dos residuos modificados por subunidad (8 residuos por tetrámero), relacionados con la inhibición alostérica hacia AMP, presumiblemente localizados en diferentes regiones de la proteína.

Fosforilación. Parte de los trabajos recientes sobre Fru-P₂asa se ha centrado en la posibilidad de que la enzima de tejidos gluconeogénicos esté bajo control hormonal (Marcus, 1981). La enzima de hígado de rata es fácilmente fosforilable en estado nativo, en

un sitio localizado cerca de su extremo carboxilo terminal (Hosey y Marcus, 1981). Sin embargo, la enzima de otras fuentes, ni la de riñón de cerdo, lo es. La enzima de riñón de cerdo es sustrato sólo cuando la reacción de fosforilación se realiza en presencia de altas concentraciones (1,6 M) de urea (Hosey y Marcus, 1981). Más aún, la localización del residuo serina fosforilable en las Fru-P₂asas de hígado y riñón, es completamente diferente.

Modificación química. Una de las herramientas más utilizadas en el análisis de grupos funcionales de enzimas, es la modificación química. Esta permite estudiar la estructura y topografía del centro activo, la localización individual de residuos de aminoácidos y su participación en la mantención de la conformación activa (Cohen, 1970; Colombo y Marcus, 1974; Sigman y Mooser, 1975; Nimmo y Tipton, 1975a; Slebe y Martínez-Carrión, 1978; De Maine y Benkovic, 1980; Cunningham y col., 1981). Este mismo enfoque experimental se utilizó para estudiar los residuos implicados en la regulación de la actividad de Fru-P₂asa. Se relacionan las constantes de primer orden de velocidad de modificación de grupos de cadenas laterales de aminoácidos específicos, con la alteración de la actividad biológica.

Parte del trabajo dirigido a tener una mayor comprensión de las propiedades funcionales de Fru-P₂asa neutra, se ha llevado a cabo mediante la modificación química de ciertos residuos de aminoácidos (para revisión y referencias, ver Benkovic y De Maine, 1982).

Los estudios de modificación química realizados con N-acetil-

imidazol, en Fru-P₂asa de hígado, han demostrado que existen residuos tirosina relacionados con la inhibición por AMP y con la actividad catalítica (Pontremoli y col., 1966). La acetilación de 4 de estos residuos por mol de enzima produce una pérdida total de la inhibición. El efector alostérico AMP proporciona una protección específica de las tirosinas del sitio regulatorio. La reactividad relativa de estos residuos de tirosina hacia N-acetilimidazol se correlaciona con un valor anormal de pK, cercano a 8,4, determinado espectrofotométricamente (Pontremoli y col., 1969).

La participación de los grupos tioles en la inhibición de la Fru-P₂asa de músculo por AMP ha sido estudiada por modificación con DTNB (Van Tol, 1974; De Maine y Benkovic, 1980). Después de la titulación de 4 grupos sulfhidrilos reactivos, la enzima es desensibilizada con respecto a la inhibición por AMP. Este nucleótido, a una concentración que satura la enzima en experimentos de unión directa (Fernando y col., 1970), no protege contra la pérdida de la inhibición alostérica. Por el contrario, la modificación del residuo cisteína reactivo no produce cambios en la sensibilidad hacia AMP de la Fru-P₂asa renal (Chatterjee y col., 1984; Reyes y col., 1985). Esto sugiere que los residuos de cisteína modificados no estarían en el sitio de unión de AMP, pero serían elementos estructurales necesarios para la inhibición alostérica. Esto está de acuerdo con la postulación que la modificación de grupos SH induce un cambio conformacional (Little y col., 1969; Geller y col., 1971).

El tratamiento de la enzima renal con 2,3-butanodiona conduce a una pérdida de la activación por cationes monovalentes y a una pérdida de la inhibición por AMP, demostrando la participación de residuos arginina en ambos procesos (Marcus, 1975, 1976). Estos resultados indican que un residuo de arginina por subunidad es esencial para la inhibición por AMP a través de su probable participación en la unión del grupo fosfato del nucleótido; y otro residuo arginina es esencial para la activación por el catión monovalente.

Además de los reactivos descritos, los cuales modifican residuos específicos de tirosina, cisteína y arginina en la proteína, se ha descrito que la modificación de cuatro residuos lisina por mol de Fru-P₂asa renal con piridoxal fosfato, produce una pérdida de la inhibición por AMP y de la cooperatividad o interacción entre los sitios de AMP (Colombo y col., 1972). Este tratamiento también conduce a una pérdida parcial de la actividad enzimática y elimina la inhibición por exceso de sustrato (Marcus y Hubert, 1968; Krulwich y col., 1969; Colombo y col., 1972; Colombo y Marcus, 1974). Esta última propiedad también se altera con la modificación de residuos cisteína (Geller y Byrne, 1972; Nimmo y Tipton, 1975a). En general, la modificación de un cierto aminoácido específico por subunidad conduce a la pérdida de la inhibición por AMP, sin embargo no existe un residuo único que sea responsable. Por otra parte, para abolir la actividad catalítica se requiere, aparentemente, una modificación de Fru-P₂asa más extensa (> 1 aminoácido/subunidad).

Si bien es cierto que la modificación de residuos de lisina produce una pérdida de la cooperatividad y como consecuencia de esto una menor sensibilidad al AMP (Colombo y col., 1972), sugiriendo que ambas propiedades podrían residir en la misma región de la proteína, nuevos estudios han permitido postular (Slebe y col., 1981) que la carbamilación de Fru-P₂asa renal permitiría diferenciar residuos de lisina involucrados en la interacción entre las subunidades de aquellos relacionados con la afinidad de la enzima por AMP. En este trabajo se diferencian estos residuos lisina estudiando su cinética de modificación. Por otro lado, no se ha establecido aún el número y rol de grupos esenciales para la activación por cationes monovalentes, ni el mecanismo mediante el cual estos iones modulan la actividad de la enzima. Por lo tanto, en el desarrollo de esta tesis se estudia el mecanismo de acción del K⁺ sobre la enzima para establecer la relación entre activación por cationes monovalentes e inhibición por exceso de sustrato.

A pesar de lo que ha sido publicado sobre la ubicación y estructura de las regiones de la proteína comprometidas en cada uno de los procesos reguladores, existen controversias en relación a datos estructurales, las que han impedido dilucidar importantes interrogantes, por ejemplo: ¿Cuál es el número de sitios de unión del inhibidor alostérico AMP en la proteína? ¿Cuál es el mecanismo de acción de los cationes monovalentes? ¿La activación por K⁺ es una resultante de la pérdida de inhibición por exceso de Fru-1,6-P₂? ¿Existe un sitio de unión para K⁺? ¿Tiene la en-

zima un sitio alostérico para Fru-1,6-P₂? ¿Es éste, a su vez, el mismo sitio de unión para Fru-2,6-P₂? ¿Es la inhibición por Fru-1,6-P₂ producto de una interacción del sustrato con el sitio para AMP?

Propósito de nuevos estudios. Para contribuir a dilucidar parte de las múltiples interrogantes, se iniciaron estudios sobre la modificación de la enzima con un potencial marcador de afinidad para el sitio de unión del nucleótido, el dialdehído de AMP (AMP_{ox}), producido por la ruptura, con peryodato, de la ribosa de la adenina 5'-monofosfato. Por otro lado, se utilizó cianato de potasio o de sodio, para bloquear selectivamente grupos amino de la enzima con una mínima perturbación en el microambiente del sitio alostérico o de otras regiones específicas de la proteína. Tanto los dialdehído-nucleósido-fosfatos (Powell y Brew, 1976; Ranieri y Raggi, 1976; Hinrichs y Eyzaguirre, 1982), como el cianato (Veronese y col., 1972; Shen y Colman, 1975; Slebe y Martínez-Carrión, 1976), han sido usados con éxito en varios sistemas proteicos. Las características moleculares de estos dos agentes modificadores y las reacciones descritas se encuentran esquematizadas en la Figura 2. En algunos casos la reacción del dialdehído puede producir un derivado morfolino como el postulado en la quinasa pirúvica (Hinrichs y Eyzaguirre, 1982) y el cianato, puede reaccionar reversiblemente con grupos tioles (Stark, 1964).

La reacción selectiva de AMP_{ox} y cianato con solo algunos grupos amino reactivos en enzimas, hace a estos modificadores extremadamente útiles para la identificación de grupos ϵ -amino

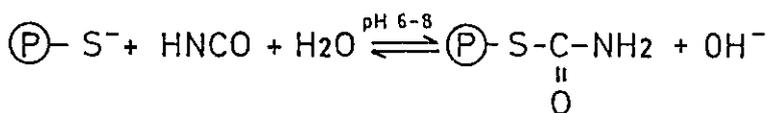
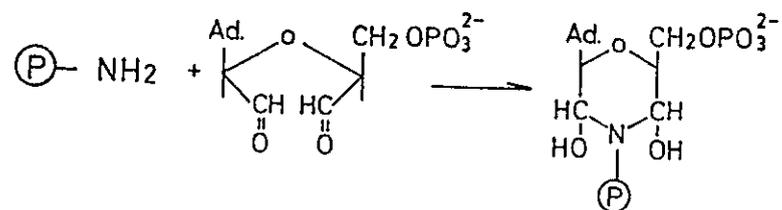
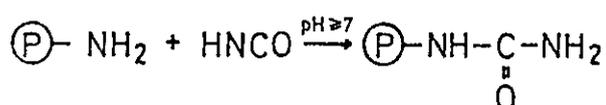
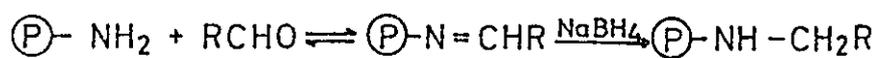
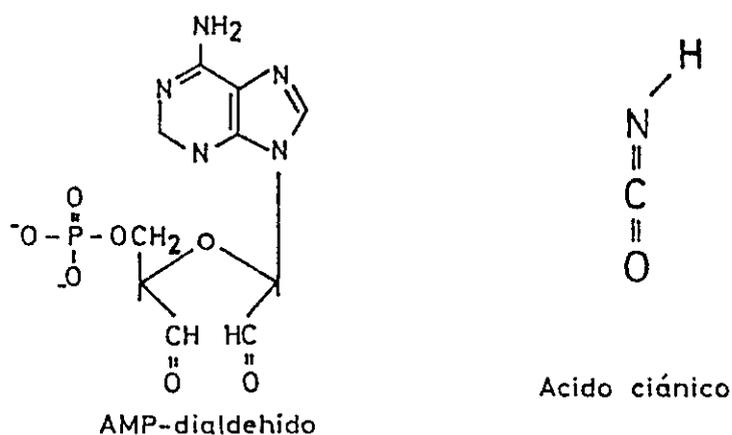


FIGURA 2. Ilustración esquemática de las características moleculares de los agentes modificantes AMP_{ox} y HNCO y su reacción con grupos reactivos de la proteína.

de residuos de lisina participantes en la función enzimática. Se examinaron en este trabajo los efectos de AMP_{ox} y cianato sobre fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo, en un esfuerzo por localizar residuos lisina específicos en los sitios funcionales de la molécula. Siendo así, los grupos ϵ -amino de la enzima reaccionan con un grupo aldehído para formar una base de Schiff la que es fácilmente reducida y radiactivamente marcada; o si las condiciones escogidas son apropiadas, los grupos ϵ -amino de residuos lisina de la enzima pueden ser selectivamente bloqueados con cianato de sodio para formar un producto estable.

La etapa de caracterización de las condiciones de modificación para obtener derivados de la enzima con grupos ϵ -amino de residuos lisina selectivamente modificados, aparte de ser un paso previo obligado constituyó a la vez un objetivo en sí. En efecto, se propuso obtener, y se obtuvieron, derivados enzima-modificador en los cuales sólo la inhibición alostérica por AMP o la activación por K^+ fuera alterada, lo que nos permitió realizar estudios de localización y caracterización cinética y estequiométrica de algunos de los sitios reguladores de la enzima i.e., sitio de unión de AMP, sitio de acción de K^+ .

La información disponible en relación con la enzima permite individualizarla mediante algunos parámetros muy útiles para su estudio. En las tablas 1 y 2 se entregan, a modo de resumen, las propiedades hasta ahora descritas para la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo y algunos datos de modificación química de la enzima.

TABLA 1

Propiedades de la Fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo

pH óptimo neutro	(pH 7.5)
Alta afinidad para Fru-1,6-P ₂	(K _m < 10 uM)
Inhibición por exceso de Fru-1,6-P ₂	(> 200 uM)
Requerimiento de un catión divalente	(Mg ²⁺ o Mn ²⁺)
Activación por cationes monovalentes	(K ⁺ o NH ₄ ⁺)
Inhibición por AMP	(K _i = 20 uM; n _H = 2,5)
Inhibición por Fru-2,6-P ₂	(K _i = 3-5 uM; n _H = 1,4-1,8)
Mr = 146.136	
Cuatro subunidades idénticas	(Mr = 36.534)
Muy sensible a proteólisis limitada	
Subunidad-S	(Mr = 29.000)
Péptido-S	(Mr = 6.500)

TABLA 2

Modificación química de residuos reactivos en regiones relacionadas con diferentes propiedades de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo^a

Residuo modificado	Reactivo usado	Región que se modifica	Referencias
Lisina	Piridoxal-P	-Sitio activo (Lisina-274) -Sitio de unión de AMP (Lisina-141)	d
	AMP ox	-Sitio activo	e,f
	8-azido-AMP ^b	-Sitio de unión de AMP (Lisina-141)	g
	2-azido-AMP ^b	-Sitio de unión de AMP	h
	Cianato ^c	-Sitio de unión de AMP	f,i
	2,3-butanodiona	-Sitio relacionado a cooperatividad hacia AMP (Lisina-50)	j
Cisteína	Cianato ^c	-Sitio de interacción de K ⁺ (alostérico) -Sitio de unión de AMP	f
	DTNB, iodoacetamida	-Sitio de interacción de K ⁺ (alostérico) -Sitio de baja afinidad para Fru-1,6-P ₂ , probablemente sitio alostérico para Fru-2,6-P ₂	k
	N-etilmaleimida	-Región que contiene grupo SH de mayor reactividad (cisteína-128)	l

^aSe consideran datos desde 1971. La selectividad depende de las condiciones de modificación empleadas, para detalles ver Tabla I.A del Apéndice y referencias.

^bLa modificación produce inactivación total de la enzima, lo que se interpreta como unión irreversible del reactivo al sitio de unión de AMP.

^cSe utilizan las sales de potasio y sodio.

^dColombo y col., 1972; Colombo y Marcus, 1974; Marcus y col., 1982. ^eMaccioni y col., 1979. ^fStebe y col., 1981; esta tesis. ^gMarcus y Haley, 1979. ^hRiquelme y Czarnecki, 1983. ⁱStebe y col., 1983. ^jMarcus, 1975, 1976. ^kChatterjee y col., 1984. ^lReyes y col., 1985.

Los objetivos de esta tesis son:

- 1.- Analizar el efecto de modificaciones químicas de residuos lisina y cisteína sobre las interacciones proteína-efectores y su actividad catalítica. Esto permitirá obtener información acerca de: a) el rol de estos residuos en la interacción de la proteína con AMP, cationes monovalentes, y cationes divalentes, Fru-2,6-P₂ y el sustrato; b) la caracterización cinética y estequiométrica de aminoácidos (lisina y cisteína) relacionados a la inhibición alostérica por AMP y a la activación por cationes monovalentes.
- 2.- Estudiar la localización y caracterización del sitio de unión de AMP y de la región de la proteína relacionada con la interacción cooperativa de estos sitios.
- 3.- Establecer la existencia de los sitios de unión de cationes monovalentes y de inhibición por exceso de sustrato (sitio alostérico para Fru-1,6-P₂). Además, se pretende determinar si este último se corresponde con el sitio de unión de Fru-2,6-P₂.
- 4.- Estudiar posibles cambios conformacionales en Fru-P₂asa derivados de: a) modificaciones químicas de la enzima; b) la interacción de la Fru-P₂asa con sustrato, inhibidores o activadores de su función catalítica.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS

1. **Reactivos químicos y materiales cromatográficos.** Las sales sódicas de fructosa-1,6-bisfosfato, fructosa 2,6-bisfosfato, fructosa 6-fosfato, glucosa 6-fosfato, AMP y NADP; DL-ditio-treitol, 2-mercaptoetanol, ácido etilendiaminotetraacético, ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico), Tris base, Hepes, Pipes, glicina, acrilamida, bisacrilamida, TEMED, persulfato de amonio, azul de bromofenol, azul de Coomassie, reactivo Folin-Ciocalteu, SDS, ácido iodoacético, PMSF, urea, guanidina-HCl, bromuro de cianógeno, Triton X-100, PPO, POPOP, albúmina de bovino, S-carbamil -cisteína, subtilisina Carlsberg (Proteasa tipo VIII), glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49, tipo VII de levadura) y fosfoglucosa-isomerasa (EC 1.1.1.9, tipo III de levadura) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., EE.UU.). En ocasiones también se usaron enzimas auxiliares adquiridas de Boehringer y Soehne (Mannheim, Alemania). TPCK-Tripsina y Carboxipeptidasa A fueron obtenidos de Worthington (New Jersey, EE.UU.). DEAE-celulosa (DE-52), papel cromatográfico (Whatman 3 MM) y fosfocelulosa fueron productos de Whatman Ltd. (Springfield, Kent, Inglaterra). Sulfopropil-Sephadex y Sephadex (G-10, G-25, G-50 y G-100) fueron obtenidos de Pharmacia Fine Chemi-

cals (Uppsala, Suecia). El sulfato de amonio, de pureza para uso enzimológico, se obtuvo de Mann Research Laboratories (New York, EE.UU.) y la L-homocitrulina de Nutritional Biochemicals Co. Ninhidrina, cloruro de titanio, metilcelosolve, ácido trifluoroacético, acetonitrilo, trimetilamina anhidra, fenilisotiocianato, cloruro de dansilo, dansil-aminoácidos, PTH-aminoácidos, placas de polietilenimina y de poliamida fueron obtenidos de Pierce Chemical Co. (Rockford, EE.UU.). KNC0, NaNC0, TCA y el ácido 1-amino-2-hidroxinaftaleno 4-sulfónico fueron obtenidos de Merck A.G. (Darmstadt, Alemania). [^{14}C]-cianato como sal de potasio y el [$2 \pm ^3\text{H}$]AMP se obtuvieron de Amersham International plc (Buckinghamshire, Inglaterra), y el [$\text{U-}^{14}\text{C}$]AMP era de New England Nuclear (Boston, EE.UU.). Hexano, benceno, etilacetato, heptano, metilacetato, metanol, ácido acético, ácido clorhídrico y piridina fueron productos (A.C.S. y/o grado espectral) de Fisher Scientific Co. (New Jersey, EE.UU.). Otros reactivos eran de calidad analítica, generalmente Merck A.G. (Darmstadt, Alemania).

2. **Preparación del dialdehído-AMP.** El derivado 2'3'-dialdehído de AMP utilizado en este trabajo fue preparado en el laboratorio. El método adoptado de Easterbrook-Smith (Easterbrook-Smith y col., 1976), se basa en la oxidación

del AMP con peryodato de sodio en agua destilada a pH neutro, lo que permite romper la unión carbono-carbono entre los carbonos 2 y 3 de la ribosa del nucleótido. Una solución acuosa (0,5 ml) de AMP 20 mM, pH 6,0, se incubó con un volumen equivalente de NaIO_4 (22 mM) a 4°, por 1 h en la obscuridad. La reacción se detuvo por adición de glicerol (0,5 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ AMP). La preparación de $[^{14}\text{C}]\text{-AMP}_{\text{ox}}$ y $[^3\text{H}]\text{-AMP}_{\text{ox}}$ se realizó en forma similar, a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{AMP}$ y de $[2\text{-}^3\text{H}]\text{AMP}$, excepto que previo a su oxidación con peryodato se diluyeron (1/20) con AMP. El análogo fue purificado por cromatografía en una columna de Sephadex G-10 (40 x 2,5 cm), equilibrada en KCl 25 mM. La presencia de yodato o peryodato que no reaccionó, se determinó colocando en una placa una gota de cada fracción del eluido de la columna, seguida por una gota de KI 0,5 M y otra de H_2SO_4 6 N. La aparición de un color pardo, debido a la formación de I_2 , se consideró como un test positivo para IO_4^- . Las fracciones con absorbancia a 258 nm y libres de yodato, se reunieron y liofilizaron. La concentración de las muestras se calculó utilizando el coeficiente de extinción milimolar (14,9 $\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$) del AMP_{ox} (Easterbrook-Smith y col., 1976). La pureza de la muestra fue determinada por cromatografía usando 3 sistemas de solventes diferentes. Se cromatografió AMP como referencia y las manchas se localizaron por luz UV y

detección de radioactividad. Cromatografía descendente en papel (Whatman 3 MM) en ácido isobutírico: $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{EDTA}$ 0,1 M (66:1:32:1, v/v), mostró un solo compuesto que permaneció en el origen. No se detectó AMP (R_f 0,65). Cromatografía en papel usando como solvente 1-butanol:ácido acético: H_2O (4:1:5, v/v), también mostró un compuesto con un valor de R_f de 0,08. Cromatografía en placa fina en hojas de polietilenimina-celulosa, con NH_4HCO_3 0,3 M como solvente, confirmó la pureza del material y mostró que el $[\text{U}-^{14}\text{C}] \text{AMP}_{\text{ox}}$ y $[\text{2-}^3\text{H}] \text{AMP}_{\text{ox}}$ eran esencialmente puros ($> 96\%$). Se prepararon en forma similar ATP-dialdehído, GMP-dialdehído y GTP-dialdehído. Todas las muestras purificadas se guardaron a pH 5,0 y a -80° .

PREPARACION DE LA FRUCTOSA 1,6-BISFOFATASA

La Fru- P_2 asa neutra fue aislada y purificada a partir de riñones de cerdo, esencialmente siguiendo el procedimiento descrito por Colombo y col. (1972) con algunas modificaciones (Colombo y Marcus, 1973; Marcus y Haley, 1979). Este método permite el aislamiento de una enzima, que mantiene durante la purificación su razón inicial de actividades medidas a pH 7,5 y 9,5.

1. Preparación de extracto crudo. El material biológico fue obtenido en el Matadero de Valdivia. Los animales fueron sacri-

ficados por corte de la vena yugular y se desangraron. Los órganos (4-6) se extrajeron en un tiempo máximo de 15 minutos después del sacrificio de los animales, se colocaron en hielo molido y se transportaron al laboratorio para ser procesados. Una vez obtenidos los riñones, se depositaron sobre papel filtro para sacarles el máximo de tejido conectivo, se les separó la corteza (aproximadamente 350 g), que fue homogeneizada con 2 volúmenes de una solución fría de EDTA 1 mM, pH 8,0 en una juguera Waring Blendor a máxima velocidad por 2 minutos. De esta forma se obtuvo un extracto que presentó actividad hidrolizante de Fru-1,6-P₂. Todo el proceso de extracción fue realizado entre 2 y 4°.

2. Purificación de la enzima. El extracto obtenido en la etapa anterior se llevó a pH 4,5 mediante la adición, a temperatura ambiente, de ácido acético 1,7 M. La solución fue agitada por 5 minutos y el precipitado resultante fue separado centrifugando durante 30 minutos en una centrífuga Sorvall a 6.000 x g a 4°. El sobrenadante se filtró a través de lana de vidrio, evitando así la contaminación con materia grasa, se ajustó a pH 7,0 con una solución de Tris-base 2 M y fue calentado en un baño de agua a 55° por 5 minutos. El precipitado formado fue removido por centrifugación a 4°, por 30 minutos a 6.000 x g. Al sobrenadante a 4° se le agregó, lentamente y con agitación suave, sulfato de amonio sólido hasta una concentración de 45% de saturación, manteniendo el pH en 7,0 con KOH 10 M. Terminada la adición de

sal, se dejó agitando suavemente 10 minutos y luego se centrifugó a 6.000 x g durante 30 minutos. El sobrenadante se llevó a un 60% de saturación agregándole una cantidad adicional de sulfato de amonio sólido, procediéndose en forma similar a la descrita. El precipitado 45-60% fue retirado por centrifugación, se resuspendió en el menor volumen posible de una solución amortiguadora que contenía malonato de potasio 10 mM, pH 6,5, EDTA 0,1 mM y se dializó durante 24 h contra 3 litros de la misma solución.

El dializado fue centrifugado para eliminar el material agregado que ocasionalmente pudo formarse y fue aplicado a una columna de fosfocelulosa (3 x 30 cm) equilibrada con malonato de potasio 10 mM, pH 6,5, EDTA 0,1 mM. Una vez aplicada la muestra, se lavó la columna con la misma solución eliminando todo el material no retenido, y la enzima se eluyó a temperatura ambiente con una solución amortiguadora que contenía malonato de potasio 10 mM, pH 6,5, EDTA 0,1 mM, Fru-1,6-P₂ 10 mM y AMP 0,5 mM. Se recolectaron fracciones de 4 ml a un flujo de 1 ml/min en un colector Gilson UV-280 IF provisto de un registrador automático de absorbancia a 280 nm. La actividad enzimática de las fracciones se ensayó como se describe más adelante, y aquellas fracciones con actividad mayor que 20 unidades/ml fueron reunidas y concentradas por precipitación con sulfato de amonio al 90% de saturación. Después de centrifugar por 15 minutos a 27.000 x g, el sedimento se suspendió en el mínimo volumen posible de una solución de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM, y

fue desalado por filtración en una columna de Sephadex G-75 (1,5 x 20 cm) equilibrada con el mismo amortiguador. Se colectaron fracciones de 1 ml y se reunieron aquellas con absorbancia mayor que 1,0. El eluido seleccionado se calentó en un baño de agua a 62° por 5 minutos, y el precipitado formado fue removido por centrifugación.

La enzima así purificada presenta una sola banda de proteínas y es estable durante varios meses a -18°. Antes de usarla se comprobaban sus parámetros cinéticos con Fru-1,6-P₂ 0,5 mM y Mg²⁺ 5 mM, especialmente su inhibición por concentraciones variables de AMP, su activación por K⁺ y la razón de actividades entre pHs 7,5 y 9,5. La actividad específica de la enzima obtenida fue de 11 a 12 U/mg ensayada en ausencia de 150 mM K⁺ y de 27 a 30 U/mg de proteína, ensayada en presencia de 150 mM K⁺, en las condiciones que se describen más adelante.

La razón de las actividades medidas a pH 7,5 y 9,5 se mantuvo sobre 1,7 durante todas las etapas de purificación, variando el valor final entre 1,8 y 2,0. Esta razón es una estimación aproximada de la cantidad de Fru-P₂asa modificada por proteólisis durante el proceso de purificación (Nakashima y Horecker, 1971). Valores menores que 1,6 indican una alta proporción de la forma alcalina de la enzima.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La actividad se determinó mediante dos métodos y en ambos la reacción se inició al agregar la preparación enzimática.

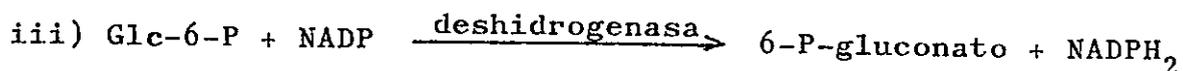
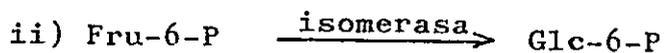
1. **Ensayo colorimétrico para determinar fosfato inorgánico.** La actividad hidrolizante se midió determinando la cantidad de fosfato inorgánico liberado a partir de Fru-1,6-P₂ (Fiske y Subbarow, 1925), en un sistema de ensayo similar al discontinuo descrito por Marcus (1967). Este ensayo aprovecha la formación del ácido fosfomolibdico por acción del ácido ortofosfórico sobre el ácido molibdico. El ácido fosfomolibdico al ser reducido origina óxido de molibdeno de color azul, cuya intensidad del color es directamente proporcional a la concentración del ortofosfato presente.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 0,1 mM; MgSO₄ 5 mM; K₂SO₄ 75 mM; Fru-1,6-P₂ 0,5 mM y 0,1 ml de una solución de enzima. La reacción se detuvo agregando 0,5 ml de una solución de molibdato de amonio al 2,5% en ácido sulfúrico 5 N. El desarrollo del color se logró adicionando 0,2 ml de una solución reductora que contenía ANSA 0,25%, bisulfito de sodio 14,5% y sulfito de sodio 0,5%. Se completó con agua a un volumen final de 5 ml y se dejó desarrollar el color durante 20 minutos a temperatura ambiente. La cantidad de enzima (1-2 µg) en la mezcla de ensayo fue tal que siempre se trabajó en velocidad inicial. A menos que se indique otra cosa, todas las diluciones de la enzima se hicieron en una solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 0,1 mM.

Cuando se estudió la inhibición de la actividad de Fru-P₂asa por AMP o exceso de Fru-1,6-P₂, éstos fueron agregados a la mezcla de ensayo en las concentraciones indicadas en las leyendas de las figuras y tablas. La medición de la actividad enzimática en ausencia de potasio se realizó en la misma mezcla de ensayo descrita anteriormente, excepto que el K₂SO₄ fue omitido de ésta. Por otra parte, el efecto de la concentración del Mg²⁺ se determinó variando la concentración del metal en la mezcla de reacción. Todos los ensayos se hicieron a 30° , a menos que se indique otra temperatura. Este método se utilizó de rutina.

2. Ensayo espectrofotométrico para determinar fructosa-6-fosfato.

El método usado consistió en medir el Fru-6-P generado en la reacción de desfosforilación a través de la reducción de NADP en presencia de un exceso de fosfoglucosa-isomerasa (E.C. 5.3.1.9.) y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49) como enzimas acoplantes (Pontremoli, 1966).



La formación de NADPH₂ se siguió midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Gilford 2400 provisto de un registrador automático y de un sistema para mantener la temperatura a 30°. El cambio de absorbancia se registró por

varios minutos con el objeto de tener seguridad de que se estaba trabajando con la porción lineal de la curva de progreso. Para obtener una mayor precisión se procuraba tener una pendiente de 45° en la curva de progreso. Los ensayos se realizaban en cubetas de cuarzo de 1 ml con paso de luz de 1 cm. La velocidad de formación de NADPH_2 , proporcional a la producción de Fru-6-P, se calculó de la pendiente del trazado densitométrico y del coeficiente de extinción molar ($6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) del NADPH a 340 nm (Horecker y Kornberg, 1948).

El medio de reacción, a menos que se indique otra cosa, contenía (concentraciones finales), en un volumen de 1 ml: Hepes-NaOH 50 mM, pH 7,5; EDTA 0,1 mM; MgSO_4 5 mM; NADP 0,3 mM; 2,3 unidades de fosfoglucosa-isomerasa; 0,6 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; fructosa-1,6-bisfosfatasa y concentraciones variables de Fru-1,6- P_2 . Los ensayos se realizaron en presencia y ausencia de 150 mM K^+ (75 mM K_2SO_4). Como norma habitual, los componentes del medio, incluidos desde Hepes-NaOH hasta las enzimas auxiliares, se mezclaban previamente al ensayo, en forma de disponer de una mezcla de reacción con K^+ y otra sin el catión monovalente. Las variaciones en la composición del medio se indican en las leyendas de las figuras y tablas correspondientes. Generalmente se usaba una alícuota de 0,01 a 0,1 ml de fructosa-1,6-bisfosfatasa. La cantidad de Fru- P_2 asa utilizada se eligió de modo que la velocidad de la reacción fuera lineal al menos durante 10 min. Cuando la concentración de Fru-1,6- P_2 era muy baja, se tomó como velo-

cidad inicial la pendiente inicial del trazado densitométrico. A estas concentraciones de sustrato (μM) se requirió una solución de enzima muy diluida. Un ensayo tipo usó alrededor de 20 ng de proteína. La enzima diluida era inestable, de modo que se guardaba a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ en seroalbúmina de bovino (10 mg/ml) y MgSO_4 5 mM. La dilución en el ensayo final era generalmente 100 veces. El ensayo se efectuó siempre en condiciones tales que la actividad de las enzimas auxiliares no fuera limitante de la velocidad bajo ninguna condición usada. De igual modo, se comprobó que la reacción variaba linealmente con respecto al tiempo y a la concentración de proteínas en el ensayo. Este método se usó especialmente para determinar la actividad enzimática a concentraciones variables del sustrato.

Una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 μmol de sustrato en 1 min a 30° en las condiciones de ensayo. La actividad específica de una preparación de fructosa 1,6-bisfosfatasa se expresa como el número de unidades por mg de proteína.

MODIFICACION QUIMICA

1. **Modificación de la fructosa 1,6-bisfosfatasa por AMP-dialdehído.** La enzima guardada a -18°, última etapa en el procedimiento de purificación, se descongelaba y dializaba a 4° durante la noche contra 1 l de borato de sodio 50 mM, pH 7,5, conteniendo

do 0,1 mM EDTA. A la solución de la enzima (10-40 μ M) en amortiguador borato, preincubada a 30° por 5 min en presencia de algunos ligandos (e.g. Fru-1,6-P₂, AMP) cuando se señala, se le agregaba el AMP-dialdehído de manera tal que su concentración, en el medio de incubación, fuera 10 mM, a menos que se indique lo contrario. A los 20 min de incubación a 30° la mezcla se colocaba a 4°, se agregaba una gota de alcohol octílico, 2 a 4 mg de NaBH₄ y se dejaba con agitación suave por 15 min. Una vez reducido el complejo enzima-AMP_{ox}, se dializaba contra Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM y se filtraba a través de una columna de Sephadex G-50 de 30 x 1,2 cm equilibrada en el mismo amortiguador. La columna se eluía a temperatura ambiente, recogién-dose fracciones de 1 ml en las que se analizaba la absorbancia a 280 nm y la actividad enzimática. El control consistía en otra muestra de Fru-P₂asa tratado en forma similar a la cual se agregaba el mismo volumen de solvente en vez de AMP_{ox}. Con estas preparaciones de enzima se determinaba la actividad catalítica: i) en presencia o ausencia de K⁺ 150 mM, índice de activación; ii) en presencia de una alta concentración de Fru-1,6-P₂ (5 ó 10 mM), índice de inhibición por exceso de sustrato; y iii) en presencia de 70 μ M AMP, índice de inhibición por AMP. Paralelamente se determinó la Km aparente para Fru-1,6-P₂ y la constante de inhibición (K_i) e índice de cooperatividad (n_H) para AMP con el derivado enzima-AMP_{ox}. Los valores obtenidos se comparaban con los correspondientes en la enzima no modificada

(control). En los estudios de fragmentación el derivado Fructosa- P_2 asa-AMP_{ox} se obtenía en forma similar, excepto que la columna de Sephadex G-50 se equilibraba en: i) acetato de amonio 100 mM, pH 6,5, para la hidrólisis con subtilisina; ii) bicarbonato de amonio 100 mM, pH 8,0, para la hidrólisis con tripsina; y iii) H₂O, en los casos en que se hidrolizaba con bromuro de cianógeno.

La incorporación de AMP-dialdehído se determinó incubando la enzima (0,9 mg) con concentraciones de [U-¹⁴C]AMP_{ox} (1,4 mCi/mmol) que variaron desde 0,35 mM a 11 mM, en forma similar a la descrita excepto que una vez reducido el complejo ¹⁴C AMP_{ox}-enzima, éste se precipitaba con TCA al 12%. El precipitado era inmediatamente filtrado a través de filtros Millipore (25 mm, 0,45 µm) y lavados exhaustivamente con TCA al 5% frío. Los filtros se secaban y se determinaba la radiactividad. La radiactividad en cada muestra era corregida por la radiactividad de un control. Este control se preparaba en forma similar a la descrita excepto que el [U-¹⁴C] AMP_{ox} era agregado después de la precipitación de la enzima con TCA.

**2. Modificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por carbamila-
ción.** El tratamiento de la enzima se hacía con una solución de cianato de sodio (NaNCO) o cianato de potasio (KNCO), preparadas en el momento de usar. La incubación de la enzima (10-40 µM) con el agente modificador, a las concentraciones que se indican en las leyendas de las figuras y tablas, se realizaba a

37° en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM, a menos que se indique de otro modo. En todos los experimentos, la reacción de carbamilación de la enzima se iniciaba agregando la solución de cianato preparada en el mismo amortiguador. Puesto que el pH aumentaba al añadir el cianato a la solución amortiguadora, ésta se reajustaba a pH 7,5 previo a que se adicionara a la mezcla de modificación. No se requerían nuevos ajustes de pH durante la carbamilación. A diferentes tiempos de iniciada la modificación se retiraban alícuotas (10 µl), se detenía la reacción por dilución (1/100) en una solución fría (4°) de Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM y se ensayaba actividad enzimática en presencia y ausencia de K⁺ 150 mM, en presencia de Fru-1,6-P₂ (5 ó 10 mM) y en presencia de AMP 70 µM. Además, se determinaba rutinariamente la inhibición de la actividad por concentraciones variables de AMP. En la determinación de actividad la enzima se diluía, a lo menos, 10 veces más. Alternativamente, cuando se requiría una dilución menor de la enzima modificada, la reacción se detenía mediante la separación de los componentes de la mezcla de reacción por filtración en una columna de Sephadex G-50 (30 x 1,2 cm) equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM. En algunos experimentos la reacción de modificación se detuvo utilizando el amortiguador Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM. Cuando la modificación se realizó en presencia de ligandos protectores (Fru-1,6-P₂, AMP o Fru-2,6-P₂), la enzima se preincubó con ellos durante 10 minutos a 4° y luego de llevar

la mezcla de incubación a 37° se inició la reacción de modificación. En los experimentos realizados para estudiar la velocidad de modificación en función de la concentración de cianato, la fuerza iónica se mantuvo constante mediante la adición de NaCl al medio de reacción.

El efecto del pH sobre la velocidad de pérdida de la activación de la Fru-P₂asa por potasio fue estudiado modificando la enzima con NaNCO 15 mM. Cuando la modificación se hizo a pH entre 6,0 y 7,5 se usó una solución amortiguadora de Pipes-NaOH 20 mM, EDTA 0,1 mM. Entre pH 7,0 y 8,0 se usó una solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,1 mM.

La estequiometría de las reacciones que conducen a la pérdida de la activación de Fru-P₂asa por potasio, la pérdida de cooperatividad entre sitios de AMP y la pérdida de inhibición de la enzima por AMP, se determinaron midiendo la radiactividad incorporada en la proteína luego de realizar las modificaciones selectivas correspondientes, utilizando [¹⁴C] cianato de sodio. Puesto que la sal de sodio de [¹⁴C] cianato no se encontraba disponible comercialmente, la sal de potasio ([¹⁴C] KNCO, 57 µCi/µmol) era diluida con NaNCO a las concentraciones requeridas. La reacción de modificación se realizaba agregando NaN¹⁴CO 75 mM (0,89 µCi/µmol) a la enzima (15 mg/ml) en las condiciones ya descritas. A los tiempos seleccionados, se retiraban alícuotas de 20 µl de la mezcla de incubación y se agregaban a 1 ml de ácido tricloroacético al 10% para medir la radiactividad, o a Tris-

HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM, para medir la activación por potasio e inhibición por AMP. Las muestras precipitadas con TCA al 10% eran filtradas a través de filtros Millipore (25 mm, 0,45 μ m). Los filtros eran lavados exhaustivamente con TCA 5% frío, secados, y luego puestos en tubos con 10 ml de mezcla de centelleo para determinar la radiactividad precipitada. La radiactividad en cada muestra era corregida por la radiactividad de un control en forma similar a la descrita para la incorporación de AMP_{ox}. En una oportunidad se hizo la modificación de Fru-P₂asa con [¹⁴C] KNCO 100 mM a 37° en amortiguador ácido bórico-borax 50 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM, en presencia o ausencia de Fru-1,6-P₂ o AMP. La incorporación de [¹⁴C] KNCO (0,26 μ Ci/ μ mol) se determinó en forma similar a la descrita. Separadamente, se transfirieron alícuotas de los diferentes derivados [¹⁴C] cianato-enzima formados, a columnas de Sephadex G-50 (25 x 1,2 cm) equilibradas con Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 0,1 mM. La incorporación se determinó de la concentración de proteínas y de la radiactividad presente en cada muestra después de su elución a través de la columna.

El complejo enzima-cianato que no presentaba activación por K⁺ se obtuvo incubando Fru-P₂asa (25 μ M) con [¹⁴C]-cianato de sodio 25 mM (0,5 μ Ci/ μ mol) en una solución conteniendo Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; EDTA 0,1 mM, en un volumen final de 300 microlitros. La mezcla se mantuvo a 37° durante 30 minutos, al cabo de los cuales el complejo formado se separó de los demás compo-

nentes mediante filtración en gel a 4° en una columna de Sephadex G-50 (30 x 1,2 cm) equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM. La enzima fue eluída con la misma solución amortiguadora y se recolectaron fracciones de 0,5 ml. La radiactividad se determinó en 50 µl de cada fracción, y la proteína se midió por su absorbancia a 280 nm. Las fracciones que contenían el complejo fueron reunidas, y en una alícuota de la mezcla se determinó la actividad de la enzima en presencia y ausencia de potasio.

El estudio de recuperación de la activación por potasio, a partir del complejo enzima-cianato, se realizó ya sea incubando el complejo en las condiciones indicadas en las leyendas de las figuras, o filtrando a través de columnas de Sephadex G-50 (30 x 1,2 cm) equilibradas en las condiciones descritas en Resultados. Cuando la recuperación se realizó incubando el complejo, ésta se determinó ensayando la actividad enzimática en presencia y ausencia de 150 mM de K^+ a los tiempos indicados en las figuras correspondientes.

3. Marcaje selectivo de la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Los diferentes derivados [^{14}C] cianato-enzima es decir, derivados que han perdido selectivamente la interacción cooperativa entre los sitios de AMP, afinidad por el nucleótido o la activación por K^+ , y el derivado [3H] AMP_{ox}-enzima fueron preparados incubando por 20 a 60 min la proteína con [^{14}C] cianato o [3H] AMP_{ox}, bajo di-

versas condiciones (concentración de modificador, presencia de ligandos, pH y temperatura de aislamiento del complejo), y el exceso de modificador se removió por filtración como se describió con anterioridad. Las condiciones de modificación selectivas se indican con detalle en Resultados. Estos derivados se sometieron a fragmentación para aislar y caracterizar los péptidos que contenían la radiactividad.

FRAGMENTACION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA

1. **Hidrólisis con subtilisina.** Los derivados radiactivos de Fru-P₂asa (1-10 mg), equilibrados en acetato de amonio 0,1 M, pH 6,5, EDTA 0,1 mM o dializados exhaustivamente contra el mismo amortiguador, eran digeridos con subtilisina (250:1, p/p) por 3 h, a 24°, en un volumen final de 1 ml, en forma similar a la descrita por Dzugaj y col. (1976) para la enzima de hígado de conejo. La reacción se detenía por la adición de un volumen igual de HCOOH 45% o de 0,05 volúmenes de una solución etanólica de fenilmetil-sulfonil fluoruro 2 mM y posteriormente, la solución era liofilizada. Con este procedimiento la razón de actividades a pH 7,5 y 9,5 en las muestras era alrededor de 0,4.

2. **Hidrólisis con tripsina.** Previo a la digestión con tripsina los derivados radiactivos de Fru-P₂asa (40-60 mg) eran reducidos y carboximetilados por el método de Crestfield y col. (1963), excepto que se usaba cloruro de guanidina 6 M en lugar de urea

8 M. En varios experimentos se cambió la solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 por bicarbonato de amonio, y se procedió de la siguiente manera: los derivados se trataban con 2-mercaptoetanol 10 mM en presencia de cloruro de guanidina 6 M, NH_4HCO_3 50 mM, pH 8,5 y EDTA 10 mM por 2 h a 45°, con burbujeo de N_2 durante los primeros 5 min. Posteriormente se carboximetilaba con monoyodoacetato de sodio 2 mM, en la oscuridad y bajo burbujeo constante de N_2 , por 15 min a 22°. La mezcla de alquilación era dializada por 20 h a 4° contra tres cambios de 2 litros de agua destilada. El precipitado reunido por centrifugación era suspendido en 20 ml de NH_4HCO_3 50 mM, pH 8,0 e hidrolizado con TPCK-tripsina (0,5 mg) por 20 h a 37°. A las 4 h de iniciada la hidrólisis se hacía una segunda adición de 0,5 mg de la tripsina libre de actividad quimotriptica contaminante y se dejaba durante la noche con agitación suave. La reacción se detenía llevando el pH a alrededor de 4, mediante la adición de ácido acético 1 N. El digerido triptico era posteriormente liofilizado.

3. Hidrólisis con Pronasa. Para la detección de S-[^{14}C] -carbamil-cisteína, se aisló el complejo [^{14}C] cianato-Fru- P_2 asa que no presentaba activación por K^+ como se describió en la sección de Modificación por carbamilación, excepto que la columna estaba equilibrada en amortiguador fosfato de sodio 10 mM, pH 6,7. El complejo se trató con Pronasa (Kaken Chemical Co.) en amortiguador fosfato de sodio 2 mM, pH 6,7, CaCl_2 1 mM. La proteasa se adi-

cionó en alícuotas de 0,1 ml (1 mg) a los 0, 15 y 45 min, permitiéndose que la hidrólisis continuara a 37° durante la noche. A las 0, 1 y 14 h se retiraron muestras y la reacción se detuvo por adición de TCA de manera que su concentración fuera 5% final. Las muestras hidrolizadas se sometieron a cromatografía en papel (Whatman 3 MM) con butanol:ácido acético:agua (12:3:5, v/v) o filtración en gel, usando una columna de Biogel P-2 (80 x 1,4 cm) equilibrada en acetato de sodio 0,1 M, pH 4,5.

4. Hidrólisis con carboxipeptidasas A y B. La digestión de los péptidos trípticos radiactivos con carboxipeptidasas A y B, se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito por Ambler (1972). Los péptidos (20-100 nmoles) eran disueltos en 0,2 a 0,8 ml de acetato de N-etilmorfolina 0,1 M, pH 9,0, se les adicionaban 10 µl de CPA (40 U/mg) y 10 µl de CPB (83 U/mg) y la mezcla se incubaba durante 3 h a 37°. Se retiraban alícuotas (40-100 µl) a diferentes tiempos y la reacción se detenía adicionando ácido acético concentrado (18 M). La mezcla era evaporada a sequedad al menos 3 veces en un evaporador rotatorio o en un evaporador/concentrador al vacío SAVANT, el residuo se disolvía en 0,5 a 1 ml de citrato de sodio 0,2 N, pH 2,0 y se analizaba en el analizador de aminoácidos.

5. Hidrólisis con Bromuro de cianógeno. Los derivados [³H]-AMP_{ox}-enzima o [¹⁴C]-cianato-enzima, preparados como se describió previamente, se carboximetilaban. La proteína S-alqui-

lada resultante (5-10 mg), se resuspendió en ácido fórmico al 70% y se le adicionaba bromuro de cianógeno (5 mg/mg de proteína). Al cabo de 24 h a temperatura ambiente y en la oscuridad, se diluían 10 veces con agua y se liofilizaban.

6. Aislamiento de péptidos radiactivos. Los péptidos eran generalmente resuspendidos en urea 6 M, ácido acético 5% y purificados por filtración en gel en columnas de Sephadex G-75, G-50 y G-25 (195 x 2,5 cm ó 100 x 1,8 cm) equilibradas y eluidas con ácido acético, ya sea al 5% o al 30%. Para la purificación de algunos péptidos (e.g. aquellos provenientes de la hidrólisis con tripsina), se realizaba una etapa adicional de cromatografía de intercambio iónico. Esta etapa era llevada a cabo en una columna (16 x 1,8 cm) de sulfopropil-Sephadex (SP-Sephadex) equilibrada con acetato de amonio 100 mM, pH 3,5. Los péptidos eran eluidos con un gradiente lineal de acetato de amonio (pH 3,5 - pH 8,5; 100-200 mM en 300 ml).

Alternativamente los péptidos tripticos, generados a partir de los derivados [^{14}C] cianato-enzima (Fru- P_2 asas con alteración en n_{H} o K_i para AMP), eran separados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los digeridos tripticos liofilizados eran disueltos en 1 a 2 ml de una solución de fosfato de sodio 54,4 mM, pH 2,85. La separación de los péptidos se llevaba a cabo con un cromatógrafo Varian 5000 y una columna de fase reversa Liquid Pack C_{18} (5 μm , 25 cm x 4 mm), la cual se equilibraba con fosfato de sodio 54,4 mM, pH 2,85. En algunos experimentos se usó una columna LiChrosorb RP-18 (5 μm , 30 cm

x 4,6 mm). Alícuotas de la muestra (100-200 μ l) conteniendo aproximadamente 500 μ g eran aplicadas a la columna y, subsiguientemente, eluidas con un gradiente de este amortiguador y acetonitrilo como segundo solvente. El porcentaje de acetonitrilo, inicialmente cero, era aumentado a 12% durante los primeros 13 min, luego aumentaba a 28% durante los siguientes 65 min, y finalmente llegaba a 70% durante los 30 min finales. El efluente era medido espectrofotométricamente a 215 nm con un monitor de longitud de onda variable, provisto de un registrador automático (Vari-Chrom 9176), y colectado en fracciones de 1 ml (1 min) en tubos pre-tratados con ácido. Se tomaban alícuotas (100 μ l) de cada fracción, en las que se determinaba radiactividad. El procedimiento de purificación se repetía varias veces, y las fracciones equivalentes que contenían la radiactividad se reunían y secaban en un evaporador-concentrador rotatorio a baja presión (Savant). Este material, que contenía los péptidos parcialmente purificados, era redisuelto en 0,5 ml de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y sometido a una cromatografía en una columna HPLC de fase reversa C-18. Los péptidos se eluían con un gradiente lineal entre TFA 0,1% y acetonitrilo 70% en TFA 0,1%, en forma similar a la descrita (Schroeder y col., 1979). El gradiente era desde 0 a 100% del segundo solvente en un período de 150 min. Las fracciones purificadas eran secadas y sometidas a análisis de aminoácidos.

En el caso de los péptidos generados por hidrólisis con pronasa, se utilizaba una columna de Biogel P-2 (80 x 1,4 cm)

equilibrada en y eluída con acetato de sodio 100 mM, pH 4,5. El péptido-S era aislado por cromatografía en columnas de Sephadex G-50 (195 x 1,5 cm) equilibradas y eluidas en HCOOH 9% de acuerdo a Dzugaj y col. (1976). El liofilizado obtenido al tratar con subtilisina las enzimas nativa o modificada, era carboximetilado, dializado y liofilizado como se describió con anterioridad (1 y 2, en esta sección) y, subsiguientemente, se suspendía y aplicaba a la columna de Sephadex G-50. En forma paralela, el liofilizado que contenía el péptido-S se disolvía y, sin carboximetilar, se sometía a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS o urea y SDS.

CROMATOGRAFIA Y ELECTROFORESIS

1. Preparación de materiales para cromatografía. Todos los materiales se procesaron según las instrucciones que dan los fabricantes (Catálogos Whatman; Pharmacia Fine Chemicals, 1979; BioRad, 1976).

Reactive blue Sepharose CL-6B (Sefarosa azul) y Reactive blue-2-agarose fueron donadas gentilmente por el Dr. Marino Martínez-Carrión (Virginia Commonwealth University) y el Dr. Tito Ureta (Universidad de Chile), respectivamente. Las columnas (2,5 x 0,7 cm) eran equilibradas con amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 y EDTA 0,1 mM, a temperatura ambiente. Se eluían con el mismo amortiguador, seguido por una solución del amorti-

guador conteniendo AMP 0,2 mM o de NaCl 0,5 M. El polímero se regeneraba lavándolo con 5 volúmenes de KCl 2 M, luego con 5 volúmenes de urea 6 M, y finalmente con agua destilada hasta una conductividad aproximada a 0,01 mmho. La columna se guardaba a 4°, previo haberle pasado 3 volúmenes de una solución de amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM y azida de sodio 0,02%.

2. Electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis en condiciones no desnaturalantes se realizaba de acuerdo con las técnicas usuales (Davis, 1964). Se utilizaban geles de poliacrilamida (7%, p/v) preparados a pH 8,8 en tubos de vidrio de 7 cm de largo y 0,5 cm de diámetro interno. Las muestras liofilizadas se disolvían en Tris-HCl 50 mM, pH 6,8 conteniendo 0,004% de azul de bromofenol para una concentración de proteína de 100 µg/ml. Los geles se teñían por 1 h con azul de Coomassie R-250 al 0,3% en metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y se desteñían por difusión en metanol 30% (v/v), ácido acético 7% (v/v), durante 24 a 48 horas. Los registros densitométricos de los geles fueron efectuados en un accesorio de registro para geles (modelo 2410) acoplado al espectrofotómetro Gilford 2400, a 660 nm con una velocidad de 2 cm/min y una velocidad del papel de 2 pulgadas/min.

La electroforesis en condiciones desnaturalantes se realizaba con amortiguadores y soluciones de acuerdo a Laemmli (1970) o Swank y Munkres (1971). En el primer sistema, las muestras lio-

filizadas (100-200 μg) se disolvían en 0,5 a 1 ml de amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, conteniendo 2% de SDS, 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol, 15% (v/v) de glicerol y 0,005% (v/v) de azul de bromofenol. Después de hervir por 3 a 5 min, se aplicaban alícuotas de la muestra a geles cilíndricos (7 x 0,5 cm) o geles en placa (15 x 15 x 0,15 cm) de acrilamida al 10%. En algunas ocasiones se utilizaba una placa con un gradiente de acrilamida (10-20%) preparada de acuerdo a Vera y col. (1981). La electroforesis se realizaba aplicando entre 7 a 10 mA durante 12 a 14 h. Los geles se fijaban durante 10 a 12 h con una solución de metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y se teñían y destañían como se describió para los geles en condiciones nativas.

Como marcadores de peso molecular se utilizaban β -galactosidasa (116.000), seroalbúmina bovina (66.000), ovoalbúmina (45.000), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (36.000), anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29.000), tripsinógeno (tratado con PMSF, 24.000) y citocromo c de corazón de caballo (12.400), de Sigma; tripsina bovina (6.160; Dayhoff, 1969) e insulina (5.700; Dayhoff, 1969), de Mann Research Laboratories. Se consideró un peso molecular de 3.400 para insulina B y de 2.300 para insulina A (Dayhoff, 1969). De acuerdo a los pesos moleculares esperados para las muestras a analizar, se seleccionaban de 4 a 6 de los marcadores. En el análisis de pesos moleculares de oligopéptidos por electroforesis en gel de poli-acrilamida se usó, alternativamente, el sistema poliacrila-

mida-urea-SDS (Swank y Munkres, 1971), el cual presenta algunas ventajas en la separación de péptidos en el rango de masa molecular de 1.200 a 10.000 daltons. Las muestras liofilizadas (200-400 μg) eran disueltas en 0,5 ml de amortiguador fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8 conteniendo 1% SDS, 8 M urea, 1% (v/v) de 2-mercaptoetanol, 10% (v/v) glicerol y 0,005% (v/v) de azul de bromofenol, calentadas a 60° por 10 min y guardadas durante la noche a temperatura ambiente. Alícuotas (5-10 μl) de la muestra se aplicaban a geles cilíndricos (7 x 0,5 cm) de acrilamida al 10%. La electroforesis se realizaba a corriente constante de 5 mA por gel. Los geles se fijaban, teñían y desteñían como se describió con anterioridad.

3. Determinación de NH_2 - terminal. La determinación del aminoácido N-terminal con cloruro de dansilo (DNS-Cl) se realizaba de acuerdo al procedimiento descrito por Hartley (1970). Una alícuota que contenía 5-10 nmoles de péptido era evaporada a sequedad, se le agregaban 5 μl de agua desionizada y se secaba nuevamente al vacío. El péptido se disolvía en 10 μl de una solución de NaHCO_3 0,2 M, se evaporaba a sequedad y, subsiguientemente, se le agregaba una mezcla de 5 μl de DNS-Cl (3 mg/ml en acetona) y 5 μl de agua bidestilada. Después de incubar a 37° durante 1 h, la solución se secaba al vacío, se le agregaban 20 μl de HCl 6 N, y el contenido se sometía a hidrólisis a 105° durante 18 h. El hidrolizado seco se extraía con 2,5 μl de etanol al 50% (v/v) y los DNS-aa se identificaban por cromato-

grafía en capa fina en placas de poliamida (7,5 x 7,5 cm). La muestra se colocaba a 1,5 cm de cada borde de la placa y una mezcla de DNS-aa, usadas como marcadores, era colocada en la misma posición que la muestra pero en el lado inverso de la placa. La cromatografía se dejaba proceder durante 15 min hasta que el solvente I, agua-ácido fórmico 90% (200:3, v/v) llegaba a 1 cm del borde superior de la hoja. La placa se sacaba, se rotaba en 90°, se cromatografiaba durante 15 min en el solvente II, benceno-ácido acético (9:1, v/v), se secaba nuevamente y se examinaba bajo la luz UV a 254 nm. Con el objeto de tener una mejor separación de algunos DNS-aa, se hacía una tercera corrida en el solvente III, acetato de etilo-metanol-ácido acético (20:1:1, v/v/v), en la misma dirección que el solvente II.

La pureza de los péptidos aislados se determinaba, en algunas oportunidades, mediante dansilación. Los péptidos dansilados eran preparados y separados en forma similar a la descrita, excepto que no se sometían a hidrólisis ácida y se usaban otros solventes. En la primera dimensión se utilizaba acetato de metilo-isopropanol 25%-amonio (9:6:4, v/v/v) y en la segunda dimensión, el solvente era isobutanol-ácido acético-agua (15:4:2, v/v/v).

4. Análisis de aminoácidos. Las composiciones de aminoácidos de los péptidos provenientes de los derivados AMP_{ox}-Fru-P₂asa y cianato-Fru-P₂asa, eran obtenidas por cromatografía de intercambio iónico de acuerdo al procedimiento general de Spackman

y col. (1958) con un analizador de aminoácidos Beckman 120 C. Los análisis se realizaban en muestras (10-50 μ g) hidrolizadas con HCl 6 N a 112° durante 12 h, en tubos sellados en el vacío. En algunos experimentos se utilizó un analizador Durrum D-500 o un Durrum MBF con detección de fluorescencia usando oftalaldehído. La cuantificación obtenida en estos análisis se usaba como referencia para la determinación precisa de las concentraciones de péptido, en las muestras sometidas a degradación de Edman.

Para demostrar la presencia de S-carbamil-cisteína y de N-carbamil-lisina, en las enzimas modificadas, se utilizó análisis de aminoácidos. La S-carbamoilcisteína eluía a los 69 min entre serina y ácido glutámico mientras el derivado de lisina, homocitrulina, eluía a los 117 min entre cistina/2 y valina. La salida del fotómetro del analizador era conectada a un colector de fracciones y las muestras se colectaban en fracciones de 1 min. Usando una mezcla de aminoácidos de referencia con [14 C]-leucina se determinó que el tiempo transcurrido entre el pico de leucina y el pico radiactivo era 3 min. La identificación se efectuó también mediante cromatografía en papel, como se describió para la S-carbamil-cisteína (sección Fragmentación con pronasa, págs. 47-48). En el caso de homocitrulina, el hidrolizado ácido de los [14 C]-cianato-péptidos se sometía a cromatografía ascendente en papel, utilizando como solvente una mezcla 1-butanol-ácido acético glacial-agua (120:30:50, v/v/v) durante 18 h.

5. **Análisis de secuencia.** En la degradación secuencial manual de péptidos se usaba la modificación introducida por Tarr (1975, 1977) del procedimiento original de Edman y Begg (1967). El péptido purificado (5-10 nmoles) se secaba al vacío en un pequeño tubo (1 ml) de fondo cónico. La muestra se disolvía en 20 μ l de piridina (bidestilada) al 30%, se removía el oxígeno mediante una corriente de N_2 y se agregaban 20 μ l de trimetilamina al 25%. La reacción de acoplamiento se realizaba agregando 40 μ l de una solución de fenilisotiocianato (PITC) al 10% en piridina, agitando e incubando la mezcla por 5 min a 50°. Para eliminar el exceso de PITC y otros productos secundarios, la mezcla se lavaba con 400 μ l de una solución de heptano-acetato de etilo (10:1), seguido por 4 lavados con heptano-acetato de etilo (2:1). Las fases superiores de heptano eran eliminadas y el residuo final secado al vacío. En la reacción de ruptura se agregaban al residuo seco 40 μ l de HCl concentrado y, subsiguientemente, se incubaba por 2 min a 50°. Después de secar la mezcla de reacción al vacío, el residuo se suspendía en 20 μ l de piridina al 30% y el feniltiocarbamil (PTC) derivado del aminoácido N-terminal del péptido (tiazolinona), se extraía agregando 100 μ l de una solución de benceno-acetato de etilo (1:2). La mezcla era agitada vigorosamente en un vortex, centrifugada y la capa superior orgánica que contenía el derivado, se retiraba cuidadosamente. La extracción con benceno-acetato de etilo se repetía y se reunían las dos fases orgánicas que contenían el PTC-deri-

vado del aminoácido N-terminal. La conversión de la tiazolinona a su isómero, la feniltiohidantoína (PTH), se realizaba en un medio ácido. Al residuo seco de tiazolinona se le agregaban 100 μ l de HCl 1 N en metanol, la mezcla se incubaba a 50° por 10 min y luego se secaba al vacío para su posterior análisis.

La identificación de los PTH-aminoácidos liberados después de cada ciclo de degradación se hacía mediante HPLC. Para ello se usaba el aparato descrito anteriormente, con el detector UV ajustado a 254 nm. Aproximadamente 70% de la muestra se redisolvió en acetonitrilo y se inyectaban (2-4 nmoles) a la columna de fase reversa C-18, equilibrada inicialmente en acetato de sodio 0,01 N, pH 4,5. La elución se hacía con un gradiente de esta solución y acetonitrilo como segundo solvente. El porcentaje de acetonitrilo, inicialmente cero, se aumentaba a 25% en el primer minuto, luego se incrementaba a 42% durante los siguientes 5 min, se mantenía a esta concentración por otros 8 min y, finalmente, se llevaba a 23%, concentración que se mantenía por otros 8 min. Para identificar cada derivado se comparaba su tiempo de retención, con los tiempos de retención de PTH-aminoácidos patrones, cromatografiados en forma paralela (Zimmerman y Pisano, 1977; Hunkapiller y Hook, 1978). En algunos casos, la identificación realizada por este procedimiento se confirmaba por cromatografía en capa fina de las feniltiohidantoína usando placas de poliamida (Summers y col., 1973). En ambos casos la homocitrulina se confirmaba por la presencia de radiactividad.

OTRAS DETERMINACIONES

1. **Determinación de la concentración de proteínas.** La concentración de proteínas se determinó con la modificación de Miller (1959) del método de Lowry y col. (1951). Para estimar la cantidad de proteínas en las fracciones obtenidas en las columnas cromatográficas se midió la absorbancia a 280 nm. La concentración de Fru-P₂asa purificada se determinó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción igual a 0,755 para una solución de 1 mg/ml de proteína (Marcus y Hubert, 1968).
2. **Medición de radiactividad.** Las mediciones de radiactividad se efectuaron en un contador de centelleo líquido Tracor Analytic modelo 6892, con una eficiencia de 95% para ¹⁴C y 62% para ³H. Los filtros Millipore secos y alícuotas (50-500 µl) de las fracciones eluidas de columnas, eran puestos en frascos de 20 ml de capacidad, con 5 ó 10 ml de líquido de centelleo para muestras hexánicas o acuosas, respectivamente. Para determinar la radiactividad contenida en solución se agregaba a la muestra agua (c.s.p. 0,7 ml), y se usaba una mezcla de centelleo que contenía una parte de Tritón X-100 y dos partes de solución de centelleo de tolueno. La última contenía 4 g de PPO y 0,1 g de POPOP por litro de tolueno. La solución de tolueno también se utilizó para cuantificar la radiactividad contenida en los filtros Millipore usados en los ensayos de incorporación. Para la detección de la radiactividad en los geles, éstos se cortaron

transversalmente con un bisturí en segmentos de 3 mm. En las placas, los surcos radiactivos se procesaron en forma similar. Cada trozo se transfirió a un tubo, el que contenía 0,5 ml de peróxido de hidrógeno al 30%, y se incubó a 60° durante la noche. Se determinó la radiactividad presente usando la mezcla para soluciones acuosas.

3. Titulación de grupos sulfhidrilos. La titulación de los grupos sulfhidrilos en la Fru-P₂asa (0,5 µM) nativa y modificada con DTNB (0,15 mM) se efectuó a 30° y la velocidad de formación del anión tionitrobenzoato se siguió espectrofotométricamente a 412 nm con un Gilford 2400. Las reacciones se realizaron en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM, y otras adiciones que se indican en Resultados. Las reacciones siempre se comenzaban con la adición de DTNB. La absorbancia de un blanco que contenía el amortiguador y DTNB era continuamente sustraída de la mezcla de reacción. En todos los cálculos se usó un coeficiente de extinción molar de $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$, para el anión tionitrobenzoato liberado (Ellman, 1959).

4. Determinación de la concentración de reactivos. Las concentraciones de AMP y NADP se determinaron espectrofotométricamente a 260 nm, usando coeficientes de extinción iguales a 15 y 18 para soluciones 1 mM, a pH 7,0, de AMP y NADP, respectivamente (Boehringer y Soehne, 1968). La concentración de Fru-1,6-P₂ se determinó enzimáticamente con el sistema acoplado ya descrito.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En una reacción catalizada enzimáticamente la velocidad está limitada por el número de sitios catalíticos disponibles, y la curva que describe la variación de la velocidad de la reacción (v) en función de la concentración del sustrato (s), corresponde a una hipérbola equilátera. En las enzimas alostéricas corresponde con frecuencia a una sigmoide. Sin embargo, se puede obtener una función lineal que en el caso de la cinética sigmoidea quedará descrita por la ecuación de Hill (1). Se usa una función de la velocidad que representa una fracción de saturación y es el cociente entre la velocidad medida (v) y la diferencia entre la velocidad máxima (V) y esta velocidad medida.

$$\log \frac{v}{V-v} = n_H \log S - \log K \quad (1)$$

Si se expresa en una gráfica $\log \frac{v}{V-v}$ en función de $\log S$, se obtiene una línea recta, donde la pendiente tiene el valor de n_H . El grado de sigmoidicidad de la función de saturación está dado por n_H . K es el valor de $v/(V-v)$ cuando $S = 1$, o sea, $\log S = 0$.

Para el tratamiento y caracterización de los datos sobre asociación cooperativa de ligandos, es una práctica común usar una aproximación empírica y, entonces, interpretar el significado físico de los parámetros empíricos que se han obtenido (Cantor y Schimmel, 1980). Esto está basado en el postulado

que la unión en el intervalo de saturación puede describirse por ecuaciones parecidas a aquellas para un sistema infinitamente cooperativo. En el caso extremo de cooperatividad infinita, la unión puede ser representada como una reacción "todo o nada".



$$K^n = (M_o)(L)^n / (M_n) \quad (3)$$

donde K es la constante de disociación aparente para los sitios que están interaccionando. La fracción de saturación en este caso (\bar{Y}) es:

$$\bar{Y} = \left[(L)^n / K^n \right] / \left[1 + (L)^n / K^n \right] \quad (4)$$

Las ecuaciones 2 a 4 están basadas en la suposición que la unión es infinitamente cooperativa para los n ligandos. En la práctica no se observa cooperatividad infinita. Por el contrario, los datos sobre interacciones cooperativas comúnmente son descritas para un intervalo entre 25% y 75% de saturación por relaciones análogas a las ecuaciones 2-4. Esta relación es

$$\bar{Y} = \left[(L)^{n_H} / K^{n_H} \right] / \left[1 + (L)^{n_H} / K^{n_H} \right] \quad (5)$$

donde $1 \leq n_H \leq n$. El parámetro n_H comúnmente es conocido

como el coeficiente de Hill y, como se señaló anteriormente, es un índice de la cooperatividad. Cuando $n_H = n$, el sistema se comporta como perfectamente cooperativo, mientras $n_H = 1$ indica no cooperatividad.

El efecto de concentraciones variables de AMP sobre la actividad de fructosa 1,6-bisfosfatasa no obedece la simple teoría de acción de masa. Al graficar la actividad enzimática relativa contra la concentración de inhibidor da una curva sigmoídea en lugar de una curva hiperbólica rectangular, sugiriendo que más de una molécula de AMP por molécula de enzima participa en la formación de un complejo enzima-inhibidor. El tratamiento cinético de esta inhibición fue descrito por Taketa y Pogell (1965). Estos autores suponen la siguiente reacción total



entonces

$$K = \frac{[E-AMP_n]}{[E] [AMP]^n} \quad (7)$$

y

$$\log \frac{[E-AMP_n]}{[E]} = \log K + n \log [AMP] \quad (8)$$

donde

E = Fru-P₂asa activa

$E-AMP_n$ = complejo inactivo enzima-inhibidor

n = número aparente de moléculas de AMP por molécula de enzima que reaccionan para formar un complejo enzimático inactivo, suponiendo un sitio activo por molécula de enzima.

K = constante de asociación aparente.

A partir de los datos de inhibición obtenidos se grafica $\log E-AMP_n / E$ en función de $\log AMP$. Se obtiene una línea recta en que la pendiente de la curva es n , y $\log K$ es la intersección sobre la ordenada donde $\log AMP = 0$.

En la práctica se usa $\log (V_0-v)/v$ como $\log E-AMP_n / E$, donde V_0 es la actividad control sin AMP y v es la actividad de la enzima en presencia de AMP. Se obtiene de esta manera un valor de n de 2,3 a 2,5, lo que sugiere que la unión de cada molécula de AMP influencia la constante de unión de las subsiguientes moléculas de inhibidor. De estos mismos datos se obtiene el valor de K (K_i o $I_{0,5}$) que denota la concentración de AMP necesaria para obtener una inhibición del 50%. Su valor es entre 18 y 20 μM . Para hacer el gráfico se consideraban los valores de velocidad entre 0,2 V y 0,8 V .

Para los cálculos del porcentaje de cooperatividad remanente se consideró a tiempo infinito de modificación un valor de n_H igual a 1,0. Las constantes de velocidad de pseudo primer orden para la pérdida de cooperatividad, se obtuvieron de las pendientes de las rectas obtenidas al graficar la varia-

ción del coeficiente de Hill ($n_{H_t} - n_H$) en función del tiempo de modificación.

La disminución de la afinidad de la enzima por AMP se estimó determinando el incremento en K_i ($K_{i_t} - K_{i_0}$). El valor teórico máximo de la constante de inhibición (K_{i_∞}), se calculó graficando la variación en K_i a los 60 min de modificación ($K_{i_{60}} - K_{i_0}$), en función del recíproco de la concentración del agente modificador. Los valores de las constantes de modificación, calculadas utilizando el valor de K_{i_∞} obtenido de este modo, diferían generalmente en menos de un 5% con los calculados empleando un método alternativo (Jencks, 1969; Gutfreund, 1972; Cornish-Bowden, 1979) para determinar constantes de primer orden. En este procedimiento (método de Guggenheim), no se requiere conocer el valor de la constante de inhibición en el punto final de la reacción (K_{i_∞}), para obtener las constantes de velocidad de reacciones de primer orden. Métodos similares se utilizaron para determinar las constantes de velocidad para la pérdida de activación por K^+ .

El análisis de los resultados del efecto del pH sobre las constantes de velocidad de pseudo primer orden para la pérdida de activación, se hizo a través de métodos gráficos, empleando la ecuación general (9) descrita por Veronese y col. (1972) y Garner y col. (1975).

$$\frac{C_c}{k_{obs}} = \frac{K_b K_c + (H^+)^2}{k K_b (H^+)} + \frac{(K_b + K_c)}{k K_b} \quad (9)$$

En esta ecuación, C_c es la concentración de cianato, k_{obs} es la constante de velocidad de pseudo primer orden observada en seg^{-1} , k es la constante de velocidad independiente del pH en $\text{M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ y K_b y K_c son las constantes de disociación del grupo que se modifica y el ácido ciánico, respectivamente. En el rango de pH usado, el primer término del lado derecho de la ecuación se reduce a $K_c/k(\text{H}^+)$, de tal manera que graficando C_c/k_{obs} versus $K_c/(\text{H}^+)$ y empleando el pK de 3,8 para HNCO (Smyth, 1967), se puede conocer el valor de k y K_b a partir de la pendiente y del intercepto del gráfico.

Todas las rectas representadas en los gráficos han sido trazadas por el método de los cuadrados mínimos.

Para establecer el número de residuos esenciales carbamylados, los datos de incorporación de ^{14}C -cianato se graficaron de acuerdo a Tsou Chen-Lu (1962). Los datos obtenidos de los gráficos de Tsou para $i = 1$, $i = 2$, $i = 3$, $i = 4$ se sometieron a un análisis de regresión polinomial en un computador Digital DEC 2020, usando un programa escrito por el Centro de Computación de Ciencias de la Salud, U.C.L.A. Los parámetros p , q , y r representan el coeficiente de la ecuación (10), y fueron calculados para la mejor ecuación binomial para cada grupo de datos ($i = 1$, $i = 2$, $i = 3$, $i = 4$).

$$a^{1/i} = p + qm + rm^2 \quad (10)$$

Los valores calculados para homocitrulina, a partir de los análisis de aminoácidos, fueron corregidos por pérdida de este derivado. Bajo nuestras condiciones de hidrólisis ácida, 23% de la homocitrulina utilizada como patrón interno se convirtió a lisina, valor que está de acuerdo con otros descritos (Stark y col., 1960; Shen y Colman, 1975; Slebe y Martínez-Carrión, 1976).

ALGUNAS CONSIDERACIONES GENERALES

El procedimiento general a utilizar en los estudios de modificación es:

- La enzima es tratada con un reactivo de aminoácidos bajo condiciones cuidadosamente controladas. No es esencial que el reactivo reaccione con sólo un tipo de residuos, pero para efectos prácticos es aconsejable que sea un número pequeño. Para simplificar la cinética, es deseable que la concentración del reactivo permanezca constante durante la reacción. Esto se puede conseguir usando el reactivo en exceso.
- A determinados tiempos se sacan alícuotas y se determina la alteración de algún parámetro cinético (e.g. K_i , n_H) y la posible pérdida de actividad enzimática, en función del tiempo de reacción. Se calculan las constantes de velocidad para la alteración del parámetro medido y para la modificación de los residuos que han reaccionado.
- Correlacionando las constantes de velocidad con modelos teóri-

cos es posible identificar el tipo y número de residuos involucrados en la acción enzimática. Debe señalarse que esta correlación se obtiene de constantes derivadas del análisis de la proteína misma y no por deducción basada en la reactividad de aminoácidos libres en solución. Esto es esencial ya que la reactividad del residuo en la proteína puede ser diferente al del aminoácido en solución. La reactividad de un tipo de residuo dado dependerá considerablemente de su localización en la proteína.

- Subsiguiente al marcaje selectivo se localizan los residuos modificados, fragmentando la proteína y aislando los péptidos que contienen la radiactividad.
- Se realizan experimentos de protección que son importantes para proponer el rol de los residuos modificados en la regulación de la actividad enzimática. En el caso de Fru-P₂asa, Fru-1,6-P₂ protegerá el sitio catalítico y AMP el alostérico.

La idea básica de este procedimiento de marcación específica, se presenta en la Figura 3. Así, cuando un reactivo químico modifica covalente y específicamente un residuo de aminoácido, entre muchos otros en la proteína, y este cambio conduce a una alteración medible en los parámetros que describen a la proteína nativa, es posible derivar algunas conclusiones acerca de la contribución de este residuo a la estructura y función nativa.

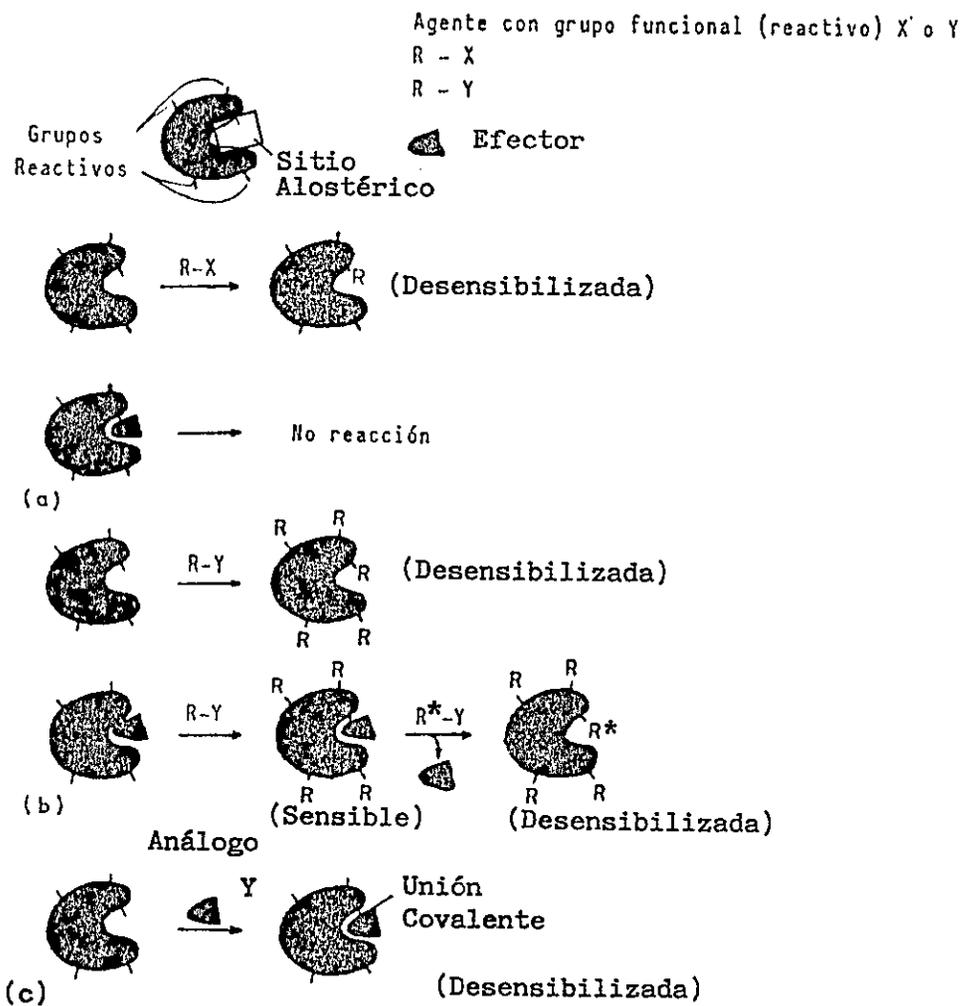


Figura 3. Leyenda en la página siguiente.

FIGURA 3. Exploración de la estructura química de una enzima mediante modificación química.

- (a) Reacción preferente en el sitio alostérico: reacción de un solo residuo de aminoácido produce desensibilización. Presencia del efector "protege" la enzima contra la reacción.
- (b) Reacción no específica: cuando varios residuos reaccionan produciendo desensibilización. En este caso la interpretación de los resultados es compleja. El procedimiento seguido, usualmente, es modificar primero en presencia del ligando, reaccionan los residuos no importantes, se eliminan el efector y el reactivo que no ha reaccionado y, a continuación, se hace reaccionar la enzima con el mismo reactivo marcado isotópicamente (reaccionan todos los residuos sensibles al reactivo utilizado, pero sólo los del sitio alostérico llevan la marca isotópica por la que pueden ser fácilmente identificados).
- (c) Marcación por afinidad: se induce la reacción preferencial con el sitio alostérico, usando un reactivo que está estructuralmente relacionado con el efector. (Adaptado de Wold, 1971).

RESULTADOS

MODIFICACION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA CON AMP-DIALDEHIDO

1. Características cinéticas de la Fru-P₂asa modificada por AMP_{ox}.

La técnica de marcaje de afinidad (Wofsy y col., 1962) es una herramienta útil para dilucidar la naturaleza de los residuos de aminoácidos que participan en la catálisis, unión del sustrato al sitio activo, o unión de efectores a los sitios alostéricos de enzimas (Wofsy y col., 1962; Shaw, 1970). Para que un reactivo se considere marcador de afinidad debe poseer una estructura similar a la del sustrato u otro ligando de la enzima en estudio (y por lo tanto, ser capaz de unirse al sitio activo o alostérico), y presentar un grupo químico reactivo que pueda formar una unión covalente con un residuo de aminoácido en o cerca de ese sitio.

Se han realizado numerosos estudios de marcación de afinidad para conocer la naturaleza de los residuos de aminoácidos que participan en la interacción enzima-nucleótido (Yount, 1975), siendo los derivados dialdehído de nucleótidos un grupo de marcadores potenciales de afinidad, ya que presentan alteraciones menores en la estructura del nucleótido.

Se conoce que el AMP es un inhibidor alostérico altamente específico de la Fru-P₂asa (Taketa y Pogell, 1965), lo que nos llevó a concebir que un análogo del AMP, con la estructura química parecida al efector (i.e. AMP_{ox}), pudiera unirse al sitio alostérico. Sin embargo, encontramos que el análogo oxidado no es un inhibidor de la Fru-P₂asa neutra de riñón de cerdo (Slebe y col., 1978; Maccioni y col., 1979). La Figura 4 muestra que AMP_{ox} hasta una concentración de 0,8 mM no inhibió la actividad de la enzima a pH 7,5. Resultados que no se muestran probaron que los siguientes compuestos, cuando se agregaron después del sustrato a una concentración final de 5 mM (concentración alrededor de 250 veces la K_i para AMP), no tenían efecto sobre la actividad de la Fru-P₂asa: adenosina, ADP, ATP, GMP, GTP y sus respectivos derivados oxidados. AMP_{ox} tampoco inhibió a esta concentración. Los datos de la Figura 5 muestran que este comportamiento de AMP_{ox} no es dependiente de la concentración de sustrato. Al hacer los gráficos del recíproco de la velocidad (en presencia y ausencia de AMP) en función del recíproco de la concentración de Fru-1,6-P₂, se obtuvieron líneas rectas que se intersectaron sobre la abscisa (recuadro de la figura 5), característico de la inhibición no competitiva de AMP; probándose que AMP_{ox} no presenta esta inhibición clásica.

Tratamiento de la enzima con AMP_{ox} seguido de una reducción con borohidruro de sodio (usado para estabilizar uniones entre aldehídos y grupos amino en varias enzimas), produjo un deriva-

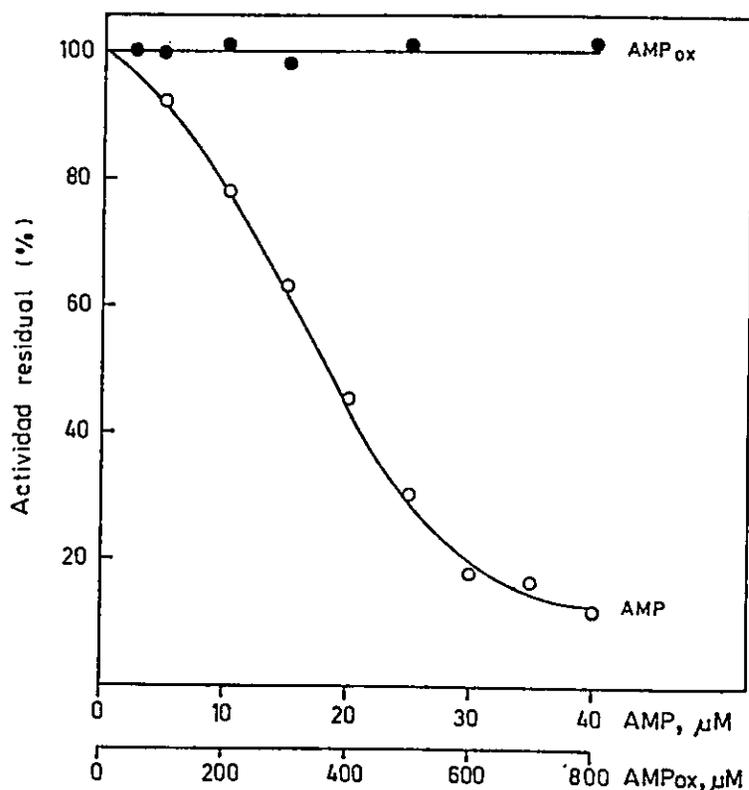


Figura 4. Inhibición de fructosa-1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo por AMP; efecto de AMP-dialdehído. La actividad enzimática fue medida como se describe en Materiales y Métodos por la velocidad de formación de fosfato inorgánico. El medio de ensayo contenía potasio 150 mM y las concentraciones variables de nucleótido que se indican. Un valor relativo de 100 es dado a la actividad específica (32 U/mg) de la enzima en ausencia de nucleótido.

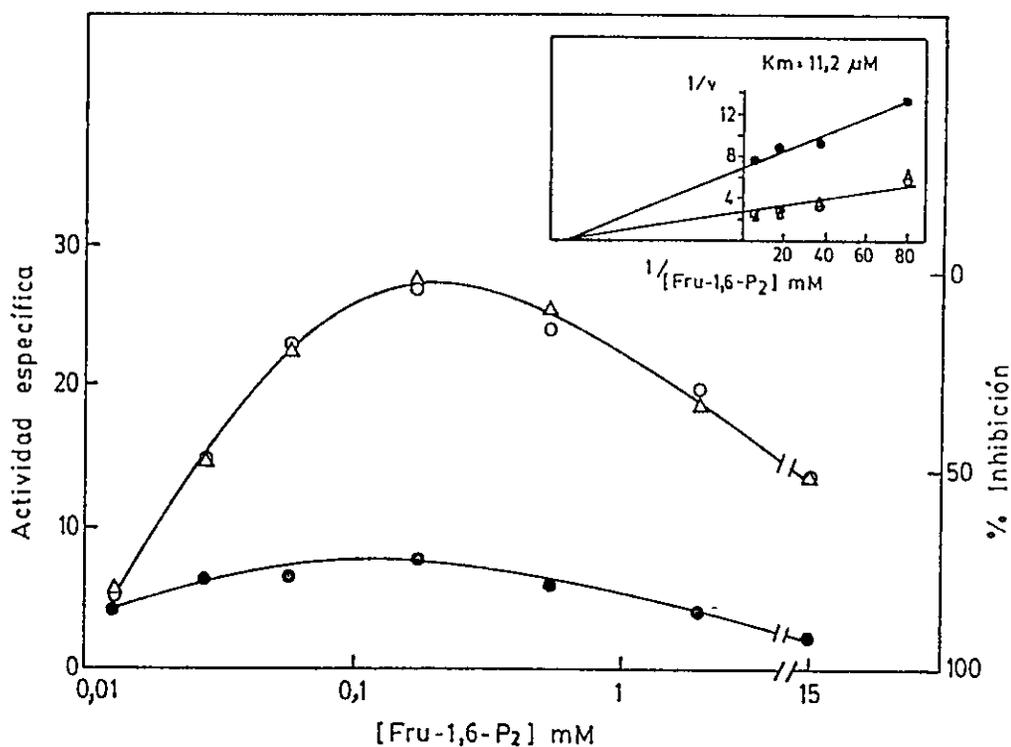


Figura 5. Inhibición de fructosa-1,6-bisfosfatasa por AMP a diferentes concentraciones de sustrato. Efecto de AMP-dialdehído. La actividad enzimática fue medida espectrofotométricamente en presencia de K_2 150 mM. Se realizaron los ensayos a diferentes concentraciones de Fru-1,6-P₂ con o sin la adición de los nucleótidos: sin inhibidor (○); con AMP 25 μM (●); y con AMPox 1 mM (△). El recuadro muestra los gráficos de dobles recíprocos de los datos de esta figura para el intervalo de concentraciones no inhibitorias de sustrato.

do estable que mostró una disminución en su afinidad por AMP. La Tabla 3 resume los efectos ejercidos por Fru-1,6-P₂, AMP o ambos, sobre la modificación de la enzima por AMP_{ox}. Como se muestra, la actividad específica y la inhibición por altas concentraciones de sustrato disminuyeron, después de la modificación irreversible con AMP_{ox} 10 mM de la enzima no protegida. Bajo estas condiciones de modificación el sustrato protegió parcialmente a la enzima contra la pérdida de actividad. Una protección mayor se obtuvo cuando la modificación se efectuó en presencia de Fru-1,6-P₂ (10 mM) y AMP (2 mM), pero el nucleótido solo no ejerció protección contra esta pérdida de actividad. La disminución en actividad podría estar relacionada a una pérdida de la activación de la enzima por K⁺ (Slebe y col., 1978) y, además, sugiere la asociación de residuos lisina a la región(es) de la enzima responsable de la unión del sustrato(s). En todas las condiciones de protección no hubo cambios en la inhibición por altas concentraciones de Fru-1,6-P₂.

El tratamiento con AMP_{ox} de la enzima no protegida causó un cambio marcado en la afinidad de la enzima por AMP, disminuyendo considerablemente la extensión de la inhibición y aumentando el valor de K_i en un orden de magnitud con respecto a la enzima nativa (Tabla 3, figura 6).. Además, como resultado de la modificación se observó una disminución en el coeficiente de Hill para AMP (n_H = 1,1), indicando una pérdida de la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP (Tabla 3, figura 7).

TABLA 3

Efecto de fructosa-1,6-bisfosfato y AMP sobre la modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por AMP_{ox}^a

Condición de modificación	Actividad específica ^b (U/mg)	Inhibición por Fru-1,6-P ₂ ^c (%)	Inhibición por AMP ^d (%)	K _i AMP ^e (μM)	n _H
Control (tratada con NaBH ₄) ^f	28,8	43	94	15	2,0
Protección con Fru-1,6-P ₂ 25 mM	18,3	-	64	52	1,1
Protección con AMP 2 mM	6,5	36	78	34	1,7
Protección con Fru-1,6-P ₂ 10 mM y AMP 2 mM	23,3	42	88	17	1,5
Sin protección	8,8	25	21	187	1,1

^a La modificación de la enzima (32 μM) se realizó con 10 mM AMP_{ox} durante 20 min, como está descrito en Materiales y Métodos, en la presencia de los ligandos que se indican en esta Tabla.

^b La actividad enzimática se midió a 30° en presencia de potasio 150 mM por la velocidad de formación de Pi.

^c Para la inhibición, por exceso de sustrato, la actividad fue medida a una concentración de Fru-1,6-P₂ igual a 10 mM y se dió un valor relativo de 100% a la actividad medida a 0,5 mM de Fru-1,6-P₂.

^d La actividad fue medida como se describe pero en presencia de AMP 70 μM.

^e Los valores de K_i y n_H fueron calculados de los datos de la Figura 7, de acuerdo a Taketa y Pogell (1965).

^f Enzima sometida al mismo tratamiento de la enzima modificada excepto por la omisión de AMP_{ox}.

Cuando la modificación de la enzima se llevó a cabo en presencia de AMP 2 mM, se obtuvo una protección parcial contra la pérdida de inhibición por AMP. Asimismo, AMP más Fru-1,6-P₂ 10 mM mostraron un extraordinario efecto protector de esta propiedad de la enzima, manteniendo el valor de K_i sin alteración después de la modificación (tabla 3, figura 7). Como resultado de la modificación en la presencia de AMP o de ambos (AMP + Fru-1,6-P₂), hubo una alteración parcial de la cooperatividad (tabla 3, figura 7). El sustrato también mostró un leve efecto protector sobre la sensibilidad de la enzima por AMP, pero no tuvo efecto sobre la pérdida de cooperatividad.

Estos resultados muestran que ocurrió un cambio significativo en la respuesta de la enzima modificada a la inhibición por AMP. Además, sugieren la existencia en la enzima de residuos lisina de reactividad diferenciada que pudieran estar relacionados, unos a la susceptibilidad de la enzima al AMP, y otros, a la cooperatividad entre los sitios del nucleótido.

2. Incorporación de [¹⁴C]AMP_{ox} a fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Los experimentos de protección indicaron que era posible modificar selectivamente residuos lisina reactivos, involucrados en las propiedades regulatorias de Fru-P₂asa, usando altas concentraciones de Fru-1,6-P₂ durante la modificación con AMP_{ox}. Por lo tanto, la incorporación de [¹⁴C]AMP_{ox} a la enzima se midió en estas condiciones de protección.

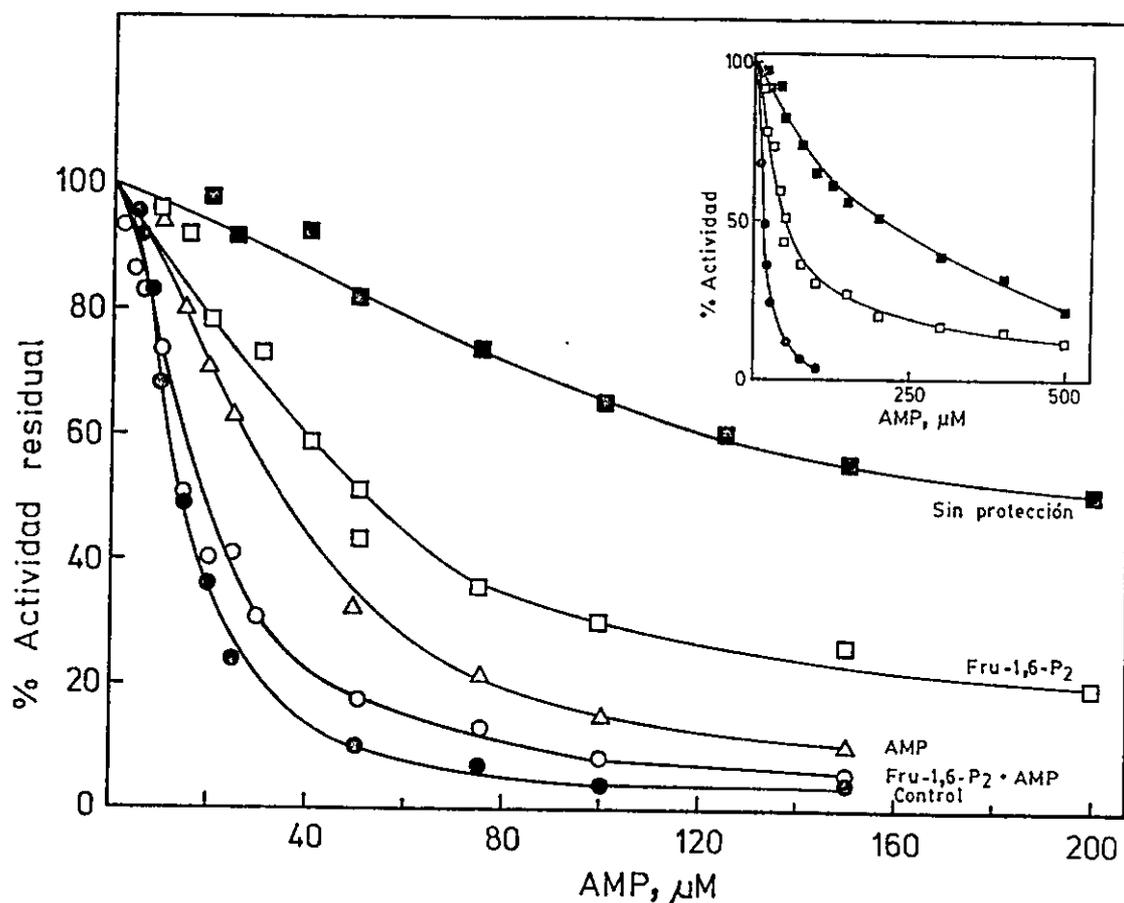


Figura 6. Inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa modificada por AMPox y no modificada (control), por concentraciones variables de AMP. Las enzimas fueron tratadas con AMPox (10 mM) bajo diferentes condiciones de protección: en presencia de Fru-1,6-P₂ 20 mM (□); AMP 2 mM (△); Fru-1,6-P₂ 10 mM y AMP 2 mM (○), y sin protección (■). La modificación se realizó como se describe en Materiales y Métodos y la enzima control (●) fue sometida al mismo tratamiento excepto por la omisión de AMPox. La actividad de estas preparaciones se determinó a través de la medición del fosfato inorgánico formado, en presencia de K⁺ 150 mM y de AMP como se indica. En el recuadro se muestran los valores de actividad residual obtenidos con concentraciones de AMP hasta 500 μM.

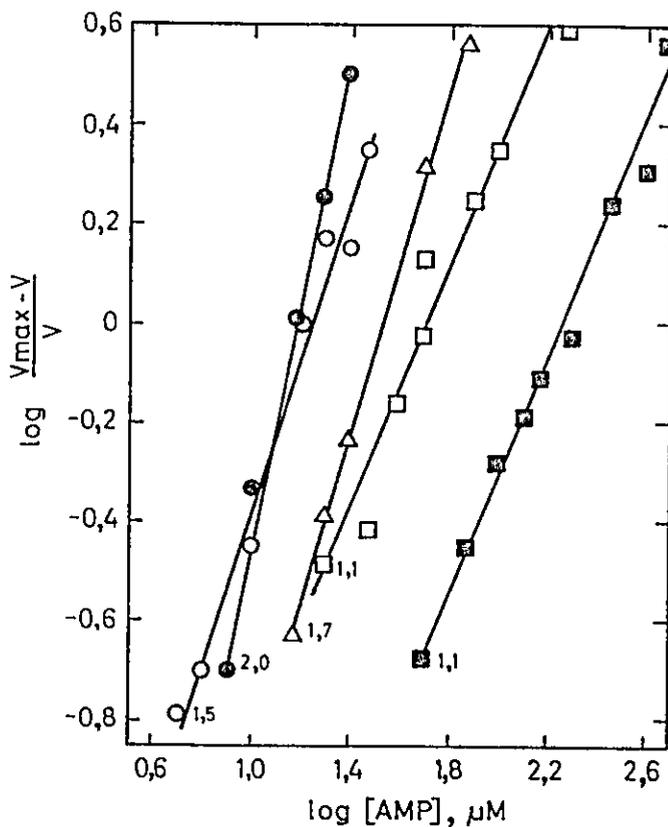


Figura 7. Gráfico de Hill de la inhibición con AMP de la fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa (control) y modificada por AMPox. Los datos mostrados en la figura 6 fueron graficados de acuerdo a Taketa y Pogell (1965). No se colocaron los valores de todas las concentraciones de AMP, sino solo de aquellas que producen entre un 20 a 80% de inhibición.

La Figura 8 muestra el número de moles de AMP_{ox} incorporados por mol de enzima, cuando se usan cantidades variables de AMP_{ox} para modificar la Fru- P_2 asa en presencia del sustrato. El resultado muestra una curva de saturación típica, de la cual se obtiene, de la intersección con la ordenada en un gráfico de dobles recíprocos, un valor máximo de 2 moles del análogo de AMP incorporados por mol de enzima (recuadro de la figura 8). Bajo estas condiciones hay una modificación preferencial de la cooperatividad (tabla 3, figura 7). Cuando la modificación se realizó en ausencia de ligandos (AMP o Fru-1,6- P_2), se observó una unión covalente de 4,1 moles de AMP_{ox} por mol de enzima. Estudios de modificación con una concentración menor de AMP_{ox} (2,5 mM), en condiciones de protección por el sustrato, producen un derivado (1 mol AMP_{ox} /mol enzima) el cual exhibe el mismo valor de K_i de la enzima control y un n_H para AMP de 1,5. El AMP_{ox} no es un inhibidor apropiado de la Fru- P_2 asa, pero después de la modificación covalente hay una desensibilización de la enzima hacia AMP.

En forma paralela, se realizaron mediciones de la reactividad de grupos sulfhidrilos con DTNB, como un indicador de cambios conformacionales. La enzima modificada por AMP_{ox} en condiciones de no protección mostró un número menor (4) de grupos SH expuestos al solvente, comparados con los 7 grupos titulables que exhibió la enzima nativa (resultados que no se muestran), sugiriendo un cambio conformacional asociado a la modificación con AMP_{ox} .

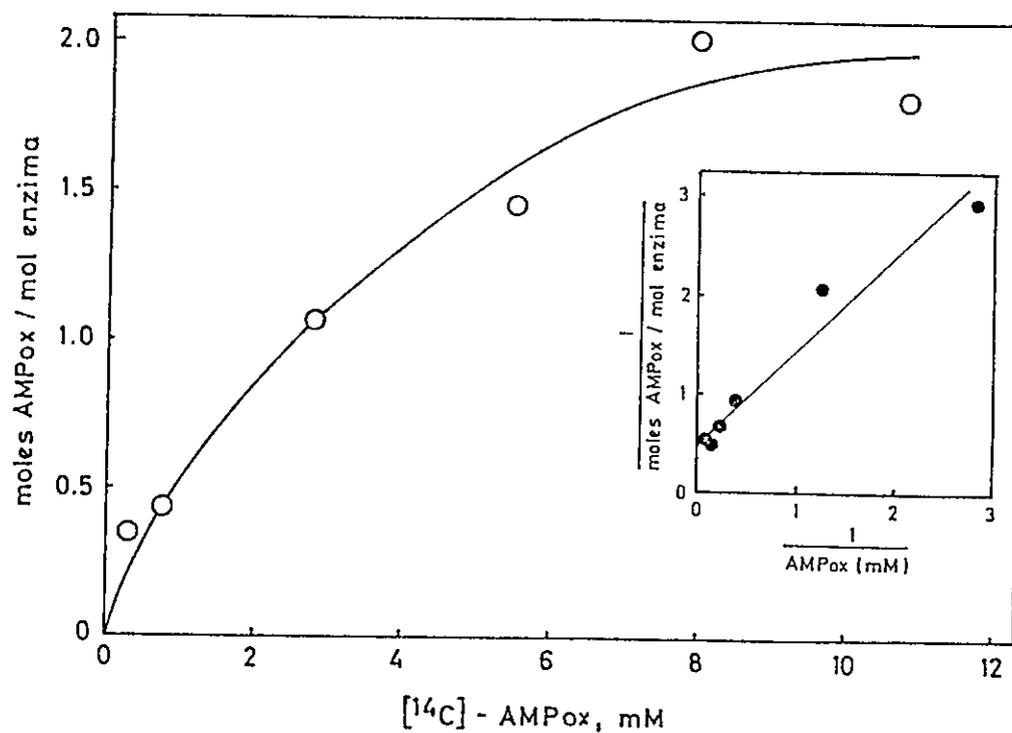


Figura 8. Incorporación de $[^{14}\text{C}]$ AMP-dialdehído a fructosa 1,6-bisfosfatasa en función de la concentración de $[^{14}\text{C}]$ AMPox. La incorporación del derivado de AMP se realizó como se describe en Materiales y Métodos en presencia de Fru-1,6- P_2 20 mM. Alícuotas de 0,2 ml de enzima (0,9 mg) fueron modificadas usando las concentraciones de $[^{14}\text{C}]$ AMPox indicadas. El recuadro muestra un gráfico de doubles recíprocos de los datos de la figura.

3. Hidrólisis del derivado [^3H]AMP_{ox}-Fru-P₂asa con subtilisina.

El derivado [^3H]AMP_{ox}-enzima mostró ser bastante estable a diálisis exhaustiva o filtración en columnas de Sephadex G-50, sin embargo, la presencia de bases nitrogenadas o Tris facilitó el rompimiento del conjugado. Los resultados sugerían que un grupo aldehído del AMP_{ox} formaba una base de Schiff con un grupo amino de un residuo lisina, el cual se localizaba en o cerca del sitio alostérico para AMP.

Considerando que al usar altas concentraciones de Fru-1,6-P₂ (20 mM) durante la modificación con AMP_{ox}, se pueden modificar selectivamente los residuos lisina asociados a la inhibición alostérica de la enzima por AMP, se realizaron experimentos para aislar el sitio de unión de AMP_{ox}. Por lo tanto, éstas fueron las condiciones de modificación escogidas.

Con el objeto de aislar el fragmento de la enzima que contenía el sitio de unión de AMP_{ox}, se exploró, inicialmente, la ruptura de la enzima con bromuro de cianógeno y subtilisina. El derivado [^3H]AMP_{ox}-enzima (2 moles [^3H]AMP_{ox}/mol de enzima) fue fragmentado con bromuro de cianógeno, y los péptidos generados fueron separados por cromatografía en Sephadex G-50 (resultados que no se muestran). Aunque una fracción de la radiactividad se encontró asociada con péptidos pequeños, la mayor parte estaba asociada con péptidos que eluían en el volumen de exclusión de la columna (Hubert y col., 1979).

Se conoce que subtilisina corta a la enzima en dos fragmen-

tos muy bien caracterizados, denominados proteína-S (Mr 29.000) y péptido-S (Mr 6.500) (Horecker y col., 1975, 1978; Botelho y col., 1977; El-Dorry y col., 1977), de ahí que, el derivado $[^3\text{H}]\text{AMP}_{\text{ox}}$ fuera tratado con subtilisina. Los fragmentos de la hidrólisis se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, encontrándose que alrededor del 80% del total de la radiactividad estaba asociada a la proteína-S (figura 9). Este experimento sugiere que el sitio de unión de AMP_{ox} estaría localizado en el fragmento mayor de la Fru- P_2 asa.

4. Hidrólisis del derivado $[^3\text{H}]\text{AMP}_{\text{ox}}$ -Fru- P_2 asa con tripsina.

Con el propósito de aislar un péptido de menor tamaño que incluyera este sitio regulatorio, la enzima marcada y carboximetilada fue digerida con tripsina. El perfil cromatográfico de los péptidos obtenidos, se muestra en la Figura 10. La mayor parte de la radiactividad se distribuyó en las fracciones 1 a 3. Mediante cromatografía descendente en papel se identificó el material que eluía con un V_e igual al volumen interno de la columna (fracción 3), como derivados de AMP_{ox} probablemente producidos por ruptura del complejo AMP_{ox} -enzima. Ya que la fracción 2 presentaba baja actividad específica, los estudios subsiguientes se realizaron con el material de la fracción 1. Cromatografía de este material en una columna de intercambio iónico (SP-Sephadex C-25) mostró la presencia, a su vez, de tres fracciones (figura 11). La radiactividad eluyó al comienzo del gra-

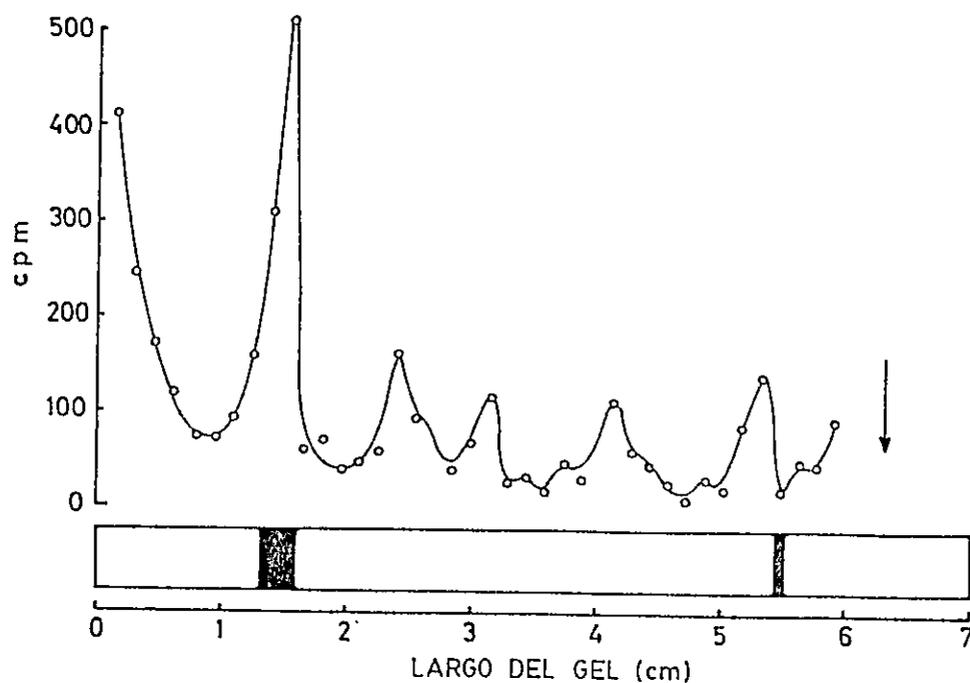


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida del derivado ^3H AMPOx-Fru- P_2 asa hidrolizado con subtilisina y radiactividad asociada. Los productos de la hidrólisis de la enzima marcada fueron liofilizados y resuspendidos en fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8, SDS 1% y úrea 8 M. La muestra (100 μg) se sometió a electroforesis en tubos cilíndricos con el sistema poliacrilamida-urea-SDS (Swank y Munkres, 1971). El gel se cortó en secciones de 2 mm y se midió la radiactividad. La parte inferior muestra un dibujo del gel teñido con azul de Coomassie después de la electroforesis. La flecha indica la posición del azul de bromofenol.

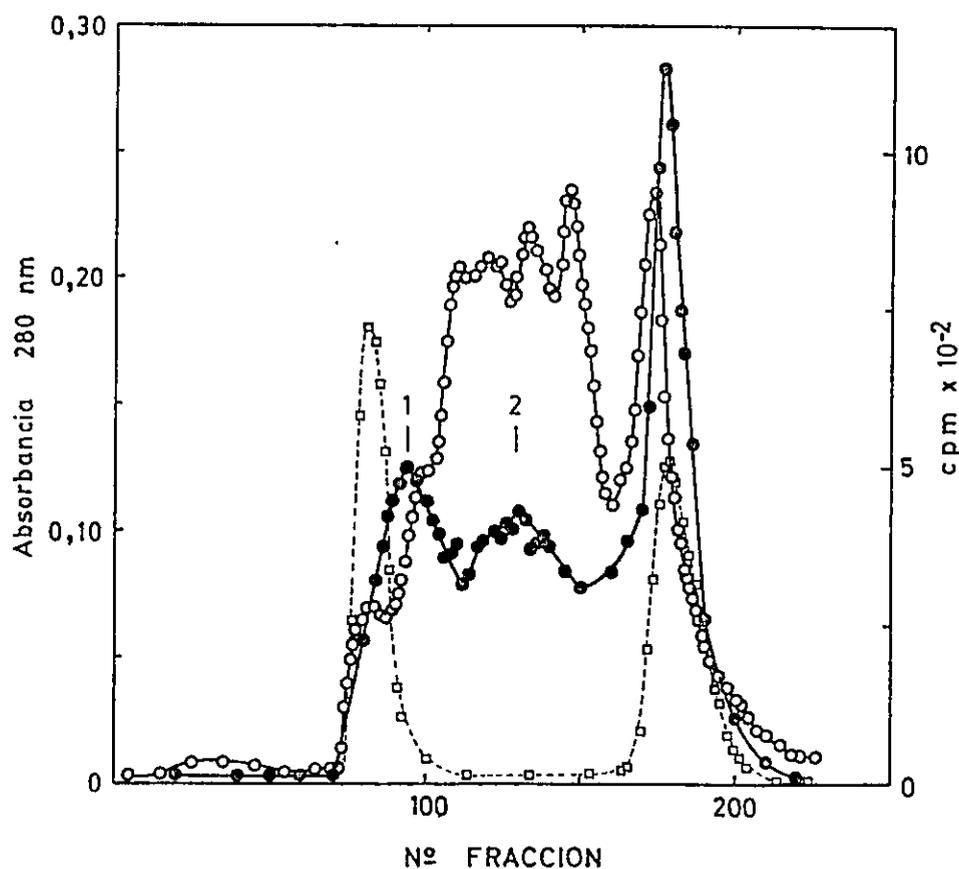


Figura 10. Cromatografía en Sephadex G-25 de los productos de la hidrólisis de la Fru-P₂asa modificada con tripsina. Los péptidos obtenidos por hidrólisis triptica de la [³H]AMPOx-enzima carboximetilada, resuspendidos en ácido acético 5% y urea 8 M, fueron aplicados a una columna de Sephadex G-25 (100 x 1,8 cm) equilibrada y eluida con ácido acético 5%. Se colectaron fracciones de 2 ml, a un flujo de 0,5 ml/min, en las cuales se midió absorbancia a 280 nm (○) y radiactividad en alícuotas de 50 μ l (●). Vo y Vi (□) fueron determinadas con azul dextrano y AMP, respectivamente.

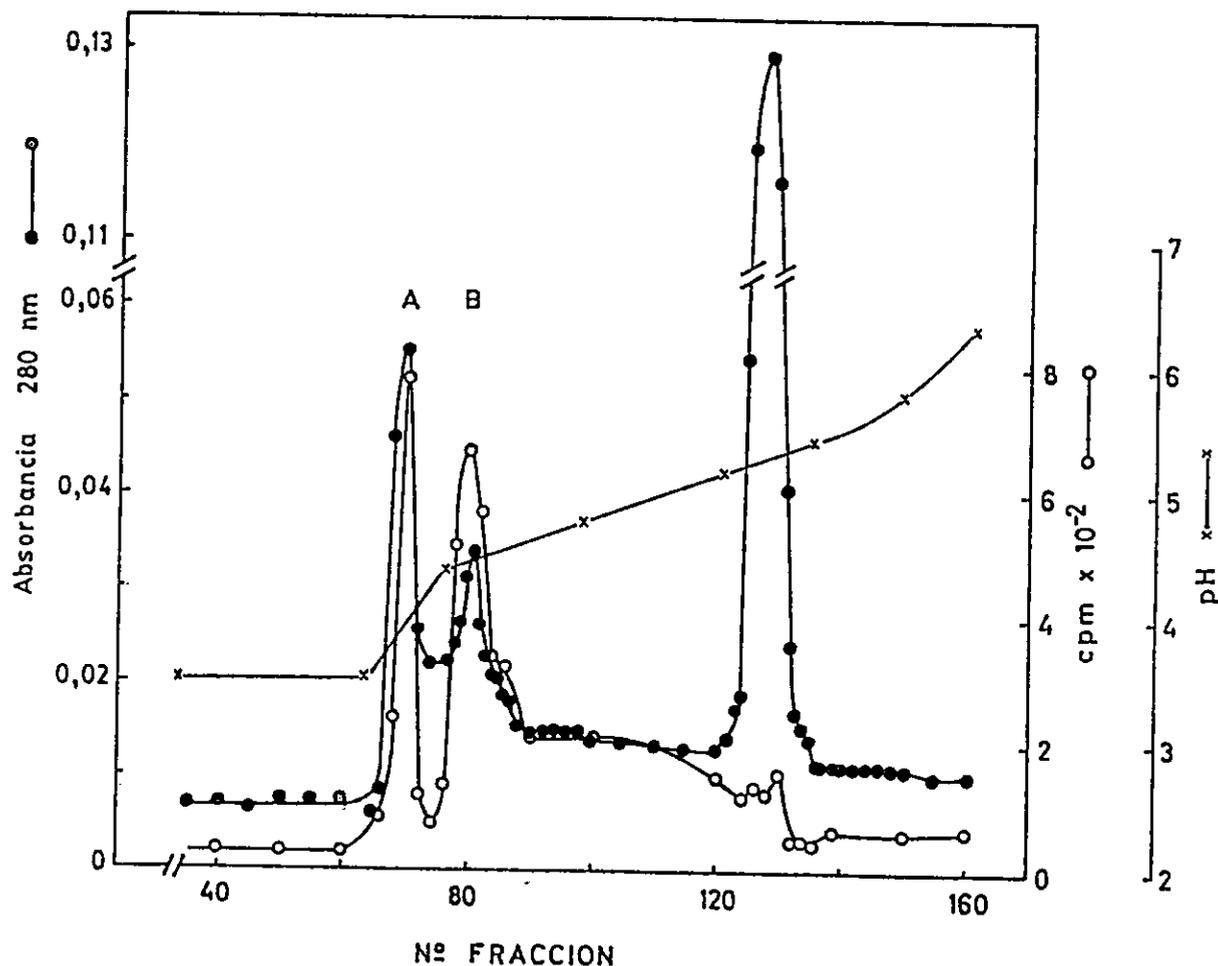


Figura 11. Cromatografía en SP-Sephadex de la fracción 1 obtenida de la columna de Sephadex G-25. La fracción 1 (88-120) liofilizada, fue resuspendida en acetato de amonio 0,1 M pH 3,5 y aplicada a una columna de SP-Sephadex G-25 (16 x 1,8 cm) equilibrada con acetato de amonio 0,1 M pH 3,5. Una vez aplicada la muestra, la columna se lavó con 40 ml del mismo amortiguador, y se eluyó con una gradiente de acetato de amonio desde 0,1 M pH 3,5 a 0,2 M pH 8,5 (150 ml de c/u). Se colectaron fracciones de 1,5 ml a un flujo de 0,8 ml/min. La radiactividad se midió en alícuotas de 50 μ l de las fracciones.

diente como dos picos, A (30%) y B (70%), correspondiendo a los de pH 3,9 y 4,5. Análisis electroforético de la fracción A, en presencia de urea-SDS, mostró la aparición de dos bandas con radiactividad con aproximadamente un 15 y 85%, respectivamente (figura 12). La radiactividad estaba asociada a la banda A-2 ($M_r \approx 3.500$). El mismo análisis de la fracción B reveló un solo péptido que contenía radiactividad, con un peso molecular de aproximadamente 6.000.

La Tabla 4 muestra el análisis de la composición de aminoácidos del péptido radiactivo contenido en la fracción B. Las propiedades más notables de este material son el alto contenido de los aminoácidos glutámico y aspártico, y la gran proporción de aminoácidos apolares. El análisis de la fracción A mostró que hay semejanzas en la composición de aminoácidos de B, con la mezcla de péptidos presentes en A. Puesto que en esta última fracción la radiactividad estaba presente en el péptido de mayor movilidad electroforética, una explicación tentativa fue que este péptido podía estar contenido en el péptido B (Slebe y col., 1979). Por otro lado, los iones amonio eran retirados de las muestras por sucesivas liofilizaciones y resuspensiones en ácido acético. Sin embargo, el relativo alto porcentaje de amonio (12-14%) presente en los análisis de aminoácidos, sugiere que una proporción de los ácidos glutámico y aspártico podrían estar como residuos glutamina y asparragina (Slebe y col., 1981; Hubert y col., 1981). Si éste es el caso, la hidrofobicidad del

TABLA 4

Composición de aminoácidos de fracciones radiactivas aisladas
después de digestión de [^3H] AMPox-Fru-P₂asa con tripsina

Aminoácidos*	% Residuos	
	Fracción A	Fracción B
Lisina	5,4 (1)	4,6 (1)
Histidina	0,5 -	2,5 -
Arginina	0,5 -	4,1 (0,9)
Acido Aspártico	8,3 (1,5)	12,9 (2,8)
Treonina	7,1 (1,3)	7,4 (1,6)
Serina	5,1 (0,9)	4,8 (1,0)
Acido Glutámico	18,1 (3,4)	16,9 (3,7)
Prolina	7,4 (1,4)	7,5 (1,6)
Glicina	7,2 (1,3)	6,0 (1,3)
Alanina	6,2 (1,1)	6,8 (1,4)
Valina	7,0 (1,3)	8,0 (1,7)
Metionina	0,7 -	0,7 -
Isoleucina	8,6 (1,6)	6,7 (1,4)
Leucina	15,2 (2,8)	10,0 (2,2)
Tirosina	2,6 (0,5)	1,2 (0,2)

* Valores no corregidos por destrucción de aminoácidos e hidrólisis incompleta. Los valores en paréntesis indican el número de residuos en relación a lisina.

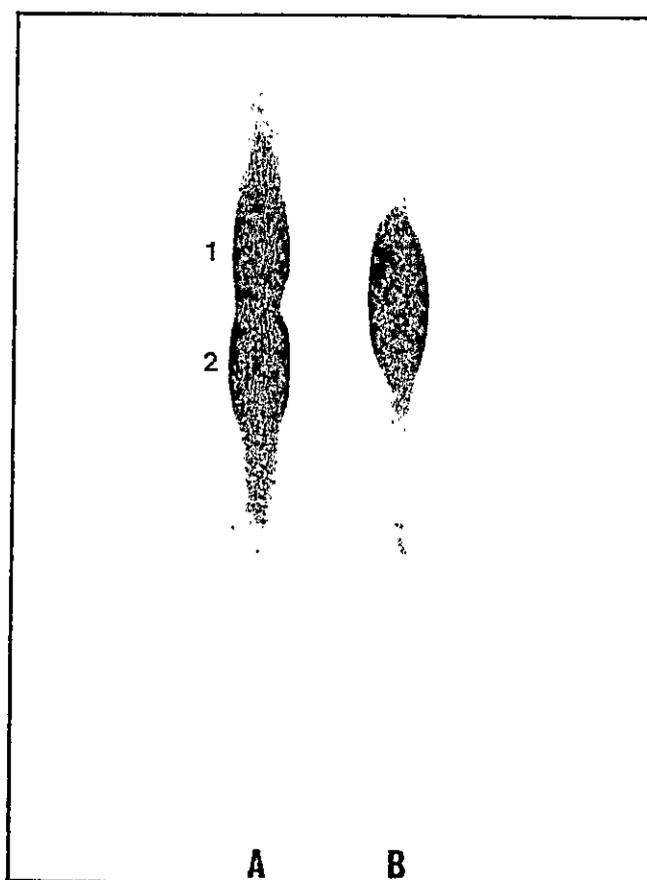


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los péptidos tripticos radiactivos obtenidos de la cromatografía en SP-Sephadex. Las fracciones A y B (140 μg c/u) se sometieron a electroforesis en tubos cilíndricos con acrilamida al 10% en condiciones desnaturalantes y fueron posteriormente teñidas con Azul de Coomassie. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

sitio de unión del nucleótido será mayor que la que se puede predecir de la composición de aminoácidos del péptido B.

MODIFICACION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA CON CIANATO DE POTASIO

1. Características cinéticas de Fru-P₂asa modificada por KNC0.

El tautómero reactivo de cianato, el ácido isociánico, es un reactivo relativamente no específico que reacciona con grupos amino, sulfhidrilo, hidroxilo fenólico, imidazol y carboxilo de proteínas (Stark, 1972). Sin embargo, sólo la reacción con grupos amino (i.e. el grupo ϵ -amino de lisina o el α -amino terminal) conduce a la formación de un derivado estable; la reacción con otros residuos de aminoácidos da aductos relativamente inestables, los cuales se descomponen por dilución o un cambio en el pH (Stark, 1972).

Por lo tanto, era de esperar que cianato produjera una carbamilación selectiva de los grupos amino involucrados en las propiedades regulatorias de Fru-P₂asa, con una perturbación mínima en el dominio del sitio alostérico.

Experimentos iniciales indicaron (Slebe y col., 1979; 1980) que la modificación de Fru-P₂asa con KNC0 causa pérdidas en la actividad, la activación por K⁺ y la cooperatividad entre sitios de AMP, y una disminución tanto en la inhibición por AMP como en la inhibición por altas concentraciones de sustrato.

El tratamiento de la enzima no protegida con KNC0 produjo un marcado cambio en la afinidad por AMP, disminuyendo considerablemente la extensión de la inhibición y aumentando el valor

de K_i , lo que se ilustra en la Figura 13 a, b; panel I (izquierda). Además, se observó una pérdida de cooperatividad (figura 13 a, b; panel II, derecha). El AMP previno de la pérdida de sensibilidad de la enzima hacia el nucleótido por el tratamiento con KNCO (figura 13 a,c; panel I), y la mezcla del efector con el sustrato (AMP + Fru-1,6-P₂) mostró un extraordinario efecto protector (figura 13 a). Por otro lado, esta mezcla protegió solo parcialmente contra la pérdida de cooperatividad, mientras el nucleótido solo, no mostró protección (figura 13 a, c; panel II). Por su parte, Fru-1,6-P₂ previno de la pérdida de afinidad de la enzima por AMP, pero no contra la pérdida de cooperatividad (figura 13 a).

La Tabla 5 resume los efectos ejercidos por Fru-1,6-P₂, AMP o ambos sobre la modificación de la enzima por KNCO 0,6 M. Como se muestra, la actividad específica, la inhibición por exceso de sustrato y la razón de actividades medidas en presencia y ausencia de potasio disminuyeron después de la modificación de la enzima no protegida, insinuando una pérdida de la activación producida por el potasio. Fru-1,6-P₂ protegió a la enzima contra las pérdidas de activación por cationes monovalentes e inhibición por exceso de sustrato. Además, no se observó efecto protector de AMP, pero éste, junto a Fru-1,6-P₂, protegieron parcialmente contra la pérdida de estas propiedades. Estos resultados permitieron sugerir (Slebe y col., 1981) que posiblemente hay una relación entre la pérdida de activación por cationes monovalentes y la pérdida de inhibición por exceso de sus -

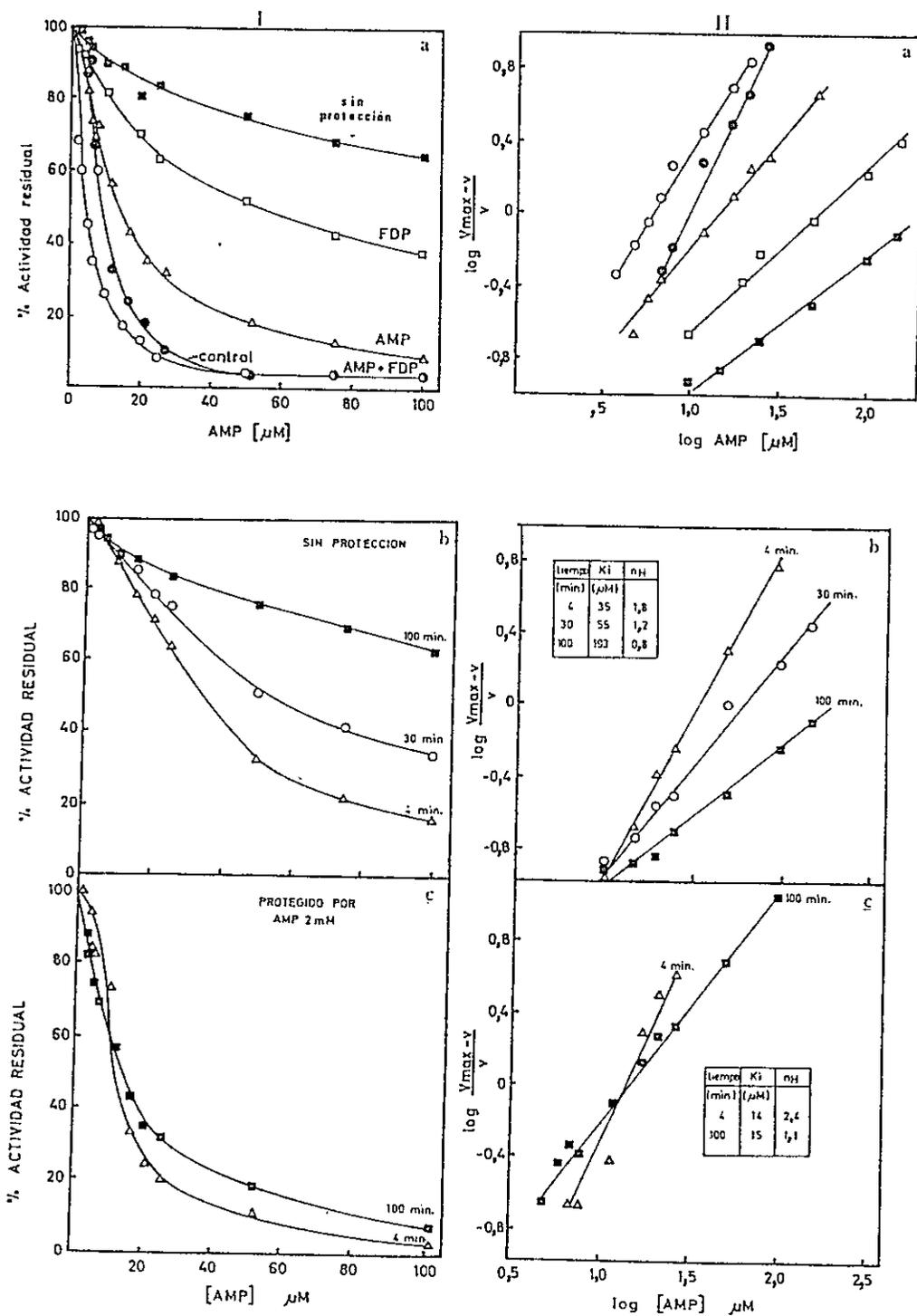


Figura 13. Leyenda en la página siguiente

Figura 13. Inhibición de la fructosa-1,6-bisfosfatasa modificada por cianato y no modificada (control), por concentraciones variables de AMP. La enzima fue tratada con KNCN 0,6 M bajo diferentes condiciones de protección: en presencia de Fru-1,6- P_2 23 mM; AMP 2 mM; Fru-1,6- P_2 46 mM y AMP 2 mM; y sin protección. Panel I (izquierda). A los 100 min de incubación (figura a) o a los intervalos de tiempo indicados (figuras b,c), se tomaron alícuotas (10 μl) que se diluyeron a 1 ml con amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 0,1 mM EDTA, para los ensayos de actividad. La actividad de estas preparaciones se determinó a través de la medición del fosfato inorgánico formado en presencia de K^+ 150 mM y de AMP como se indica. Panel II (derecha). Gráficos de Hill para la inhibición de Fru- P_2 asa por AMP de los datos obtenidos en experimentos mostrados en el panel I y graficados de acuerdo a Taketa y Pogell (1965). Datos adicionales y resultados se entregan en la Tabla 5 y en Materiales y Métodos.

TABLA 5

Características cinéticas de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y carbamilada^a

Condiciones de modificación	Tiempo ^c min	Actividad específica ^b U/mg	Inhibición por Fru-1,6-P ₂ %	Razón de actividades: Ki AMP		n _H
				μM	n _H	
Control ^d	30	23,8	48	2,5	18	2,5
	100	22,6	45	2,4	18	2,5
Protección con Fru-1,6-P ₂ 23 mM	30	17,5	40	1,9	21	1,0
	100	14,0	32	1,4	55	1,0
Protección con Fru-1,6-P ₂ 46 mM	30	21,5	42	2,2	19	1,1
	100	17,0	37	1,7	50	0,9
Protección con AMP 2 mM	100	8,8	-	1,0	15	1,1
Protección con AMP 2 mM más Fru-1,6-P ₂ 23 mM	30	15,8	43	2,0	7	1,8
	100	7,8	22	1,0	6	1,6
Sin protección	30	11,0	-	1,3	55	1,2
	100	8,4	-	1,0	193	0,8

^aLa modificación de la enzima (13 μM) se realizó con KNCO 0,6 M a 37° en amortiguador ácido bórico-borax 50 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM, en la presencia o ausencia de Fru-1,6-P₂ y/o AMP como se indica en esta Tabla. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas (10 μl), se diluyeron a 1 ml con amortiguador Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 0,1 mM y se ensayó la actividad como en la Tabla 3.

^bLa actividad específica, inhibición por exceso de sustrato, Ki y n_H se obtuvieron como se describe en la Tabla 3, con la excepción que los datos de inhibición por AMP se obtuvieron de la figura 13.

^cLos ensayos de actividad se realizaron en presencia y ausencia de K⁺ 150 mM. La razón se refiere al cociente entre ambas determinaciones.

^dEnzima sometida al mismo tratamiento de la enzima modificada excepto por el reemplazo de KNCO por KCl.

^eDenota tiempo de tratamiento con KNCO.

trato. Por otro lado, la susceptibilidad de la Fru-P₂asa a la inactivación (presumible) con KNCO 0,6M dependió de la presencia o ausencia del sustrato.

2. Modificación selectiva de cooperatividad entre sitios de AMP

Los resultados presentados demuestran que la disminución en la sensibilidad hacia AMP, producida por el tratamiento de Fru - P₂asa con KNCO (figura 13,b panel I), es completamente prevenida por la adición del efector, AMP (figura 13, c, panel I). Como una consecuencia de la modificación bajo estas condiciones, la enzima carbamilada mostró una pérdida completa de la interacción cooperativa entre los sitios de AMP, sin sufrir alteración en su afinidad por el nucleótido (figura 13, c).

Los cambios en la interacción cooperativa entre las subunidades, después de la modificación por cianato en presencia de AMP, indican la existencia en la enzima de residuos lisina esenciales, con diferentes reactividades, involucrados en la cooperatividad y sensibilidad al AMP.

La modificación química de los grupos funcionales de Fru-P₂asa, usada como herramienta para estudiar los residuos involucrados en la regulación de la actividad de la enzima por AMP, debería producir pérdida de la inhibición alostérica por el nucleótido sin afectar la actividad catalítica. Los datos recién descritos mostraron que la modificación de Fru-P₂asa con una concentración al

ta de KNC0 (0,6M), causó una pérdida de la inhibición alostérica por AMP. Sin embargo, también se observó una pérdida significativa de activación por potasio y de actividad catalítica. Se consideró por ello importante explorar la posibilidad de obtener una enzima modificada, alterada solamente en su susceptibilidad a la inhibición por AMP.

La modificación de Fru-P₂asa con KNC0 200 mM a 37°, pH 7,4, dió como resultado una rápida y total desensibilización de la enzima a la inhibición por AMP (figura 14). La actividad específica disminuyó solamente 28% después de 100 min de modificación. Para determinar si la modificación era irreversible, el derivado enzima-cianato se dializó exhaustivamente contra amortiguador Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 conteniendo EDTA 0,1 mM o, se filtró en una columna de sephadex G-50 equilibrada con el mismo amortiguador, no observándose recuperación de la respuesta de la enzima al inhibidor AMP por ninguno de los dos procedimientos (Slebe y col., 1983). A la inversa, después de cualquiera de los dos tratamientos se observó una recuperación casi total de la actividad. Así, la enzima carbamilada obtenida con este tratamiento muestra un cambio sólo en la respuesta al nucleótido, mientras ninguno de los otros parámetros estudiados (actividad específica, activación por potasio, inhibición por sustrato, curva de saturación para Mg²⁺) se alteraron significativamente (Slebe y col., 1983).

La Figura 15 ilustra que el cambio dramático en la respuesta de la enzima modificada a la inhibición por AMP, comparada a

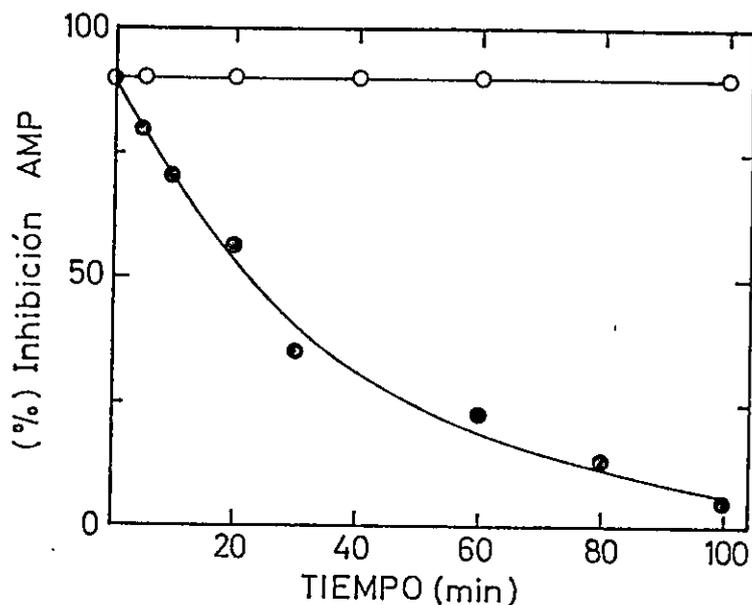


Figura 14. Efecto de la carbamilación sobre la inhibición de fructosa - 1,6-bisfosfatasa por AMP. La enzima (20 μM) fue tratada con KNCO 200 mM, sin protección, en las condiciones descritas en la Tabla 5. La actividad se midió en la presencia de K^+ 150 mM y de AMP 75 μM por la velocidad de formación de fosfato inorgánico. Un valor relativo de 100 se dió a la actividad específica (30 U/mg) de la enzima en ausencia de AMP. La enzima control fue sometida al mismo tratamiento de la enzima modificada excepto por el reemplazo de KNCO por KCl . Enzima carbamylada (●); enzima control (○).

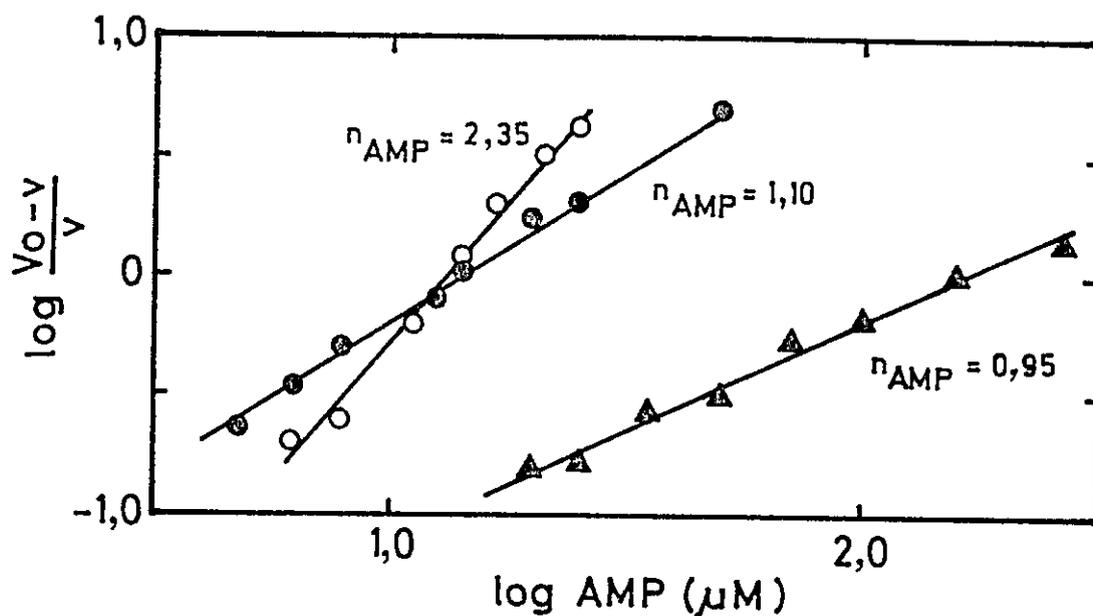


Figura 15. Gráficos de Hill para la inhibición de la fructosa -1,6-bisfosfatasa nativa y carbamilada por AMP. La modificación de la enzima (20 μM) se realizó con KNCO 200 mM por 60 min en las condiciones descritas en la Tabla 4. La actividad enzimática fue determinada a través de la medición del Pi formado en la presencia de K^+ 150 mM y de AMP como se indica. Los datos de inhibición por AMP fueron graficados de acuerdo a Taketa y Pogell (1965); n_{AMP} es la pendiente de la línea y corresponde al coeficiente de Hill. (○) enzima control; (▲) sin protección; (●) modificada en presencia de 1 mM AMP.

la enzima nativa, es similar al obtenido al modificar con una alta concentración de KNCN (cf. figura 13 b,c). El cambio en la sensibilidad al AMP se manifiesta en un aumento en el valor de K_i desde 17 a 151 μM . Además, hay una pérdida en la cooperatividad de la enzima hacia la inhibición por AMP, ya que el coeficiente de Hill varió desde 2,35 en la enzima control a 0,95 en la enzima carbamilada (figura 15).

La Tabla 6 resume los efectos ejercidos por Fru-1,6-P₂ y AMP sobre la modificación de la enzima por cianato 0,2 M. Como se muestra, el sustrato protege parcialmente a la enzima contra las pérdidas de actividad y de inhibición por AMP, pero no protege contra la pérdida de cooperatividad. Al contrario, AMP previno contra la pérdida de sensibilidad al AMP por el tratamiento con cianato. Sin embargo, AMP no protegió contra la notable pérdida de la interacción cooperativa entre los sitios de AMP y la pérdida de actividad (figura 15, tabla 6). La pérdida de cooperatividad no se debió a disociación, agregación o conversión de la enzima a su forma alcalina (Slebe y col., 1983).

La incorporación de [¹⁴C] cianato en la Fru-P₂asa depende de las condiciones de modificación utilizadas (tabla 6). En la enzima no protegida el número de grupos modificados fue aproximadamente de dos por subunidad. Cuando la modificación se realizó en presencia de AMP o Fru-1,6-P₂, se encontró alrededor de 1 mol de cianato/mol de subunidad. En todos los casos, 10-15% de la

TABLA 6

Efecto de fructosa 1,6-bisfosfato y AMP sobre la modificación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por cianato^a

Condiciones de modificación	Actividad específica	Ki AMP ^b	n ^c _H	Incorporación de [14C]KNCO ^d		Contenido de Homocitruilina ^e
				U/mg	μM	
Control	22,0 (21,3)	17 (19)	2,35 (2,27)	-	-	-
Protección con Fru-1,6-P ₂ 25 mM	18,3 (21,5)	48 (36)	1,25 (1,30)	4,48		(3,87)
Protección con AMP 2 mM	16,5 (20,4)	18 (18)	1,10 (1,10)	4,25		(3,49)
Sin protección	16,2 (20,7)	151(117)	0,95 (1,00)	8,29		(7,31)

^a La modificación de la enzima (20 μM) se realizó con KNCO 200 mM por 60 min en las condiciones descritas en la Tabla 5. Parte de las mezclas de reacción se aplicaron a columnas de Sephadex G-50, como se describe en Materiales y Métodos. Los valores en paréntesis fueron obtenidos de estas muestras. La enzima control se sometió al mismo tratamiento de la enzima modificada excepto por el reemplazo de KNCO por KCl.

^b Denota la concentración de AMP necesaria para obtener un 50% de inhibición.

^c Coeficiente de Hill.

^d Determinada por precipitación ácida.

^e Determinado por análisis de aminoácidos y corregido por la conversión de homocitruilina en Lisina.

radiactividad incorporada fue removida por diálisis o filtración a través de una columna de Sephadex G-50. Coincidente con esta remoción de radiactividad, hubo una recuperación de la actividad específica. Tal pérdida reversible de la actividad corresponde a una disminución de la activación por cationes monovalentes, lo que será analizado posteriormente. Los valores de homocitrulina recuperados después de la hidrólisis ácida son aproximadamente 12-18% menores que los valores calculados a partir de los datos de incorporación de [^{14}C] cianato (tabla 6). Esto se atribuye al pequeño porcentaje de modificación reversible producido, el que podría deberse a la formación de carbamil-derivados que se descomponen en soluciones acuosas a pH neutro (Stark, 1972), presumiblemente de cisteína (Slebe y col., 1981).

Los resultados descritos indican la participación de dos residuos lisina por subunidad, uno relacionado a la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP y el otro, esencial para la inhibición por AMP.

3. Pérdida de la activación por cationes monovalentes y su protección con Fru-1,6-P₂.

Pareció conveniente llevar a cabo un estudio adicional del efecto de la carbamilación sobre la actividad de la enzima y su inhibición alostérica por AMP. Para ello se siguieron los cambios en la actividad enzimática, ocasionados por la incubación

de Fru-P₂asa con KNCO 0,6 M bajo diferentes condiciones de protección. Como se esperaba, cuando la enzima fue tratada con cianato en ausencia de protección hubo una rápida y total pérdida de la activación de la Fru-P₂asa por iones potasio, con una cinética bifásica, no obstante la actividad de la enzima medida en ausencia de potasio no disminuyó (figura 16). Además, concomitante con la pérdida de activación por potasio, se observó una progresiva pérdida de la inhibición de la enzima por AMP 75 μ M. La presencia del nucleótido mostró un notable efecto protector de la pérdida de inhibición de Fru-P₂asa por AMP, pero no influyó en la velocidad y extensión de la pérdida de actividad (figura 16). En contraposición al efecto mínimo de AMP, la inclusión de Fru-1,6-P₂ en el medio de reacción proporcionó una protección considerable contra la pérdida de activación por potasio, ocasionada por el KNCO (figura 16). Los experimentos de protección indican que dos regiones diferentes de la proteína parecerían estar involucradas en la inhibición por AMP y en la activación por potasio.

Por otro lado, se observó que la velocidad de carbamilación del grupo(s) involucrado en la pérdida de activación por potasio fue mayor que la velocidad de modificación de los grupos esenciales para la inhibición por AMP (figura 16) y, al someter al derivado enzima-cianato a una diálisis exhaustiva contra amortiguador Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 0,1 mM o filtración en una columna de Sephadex G-50 equilibrada en el mismo amortiguador, se mostró que la modificación de los grupos involucrados en la activa -

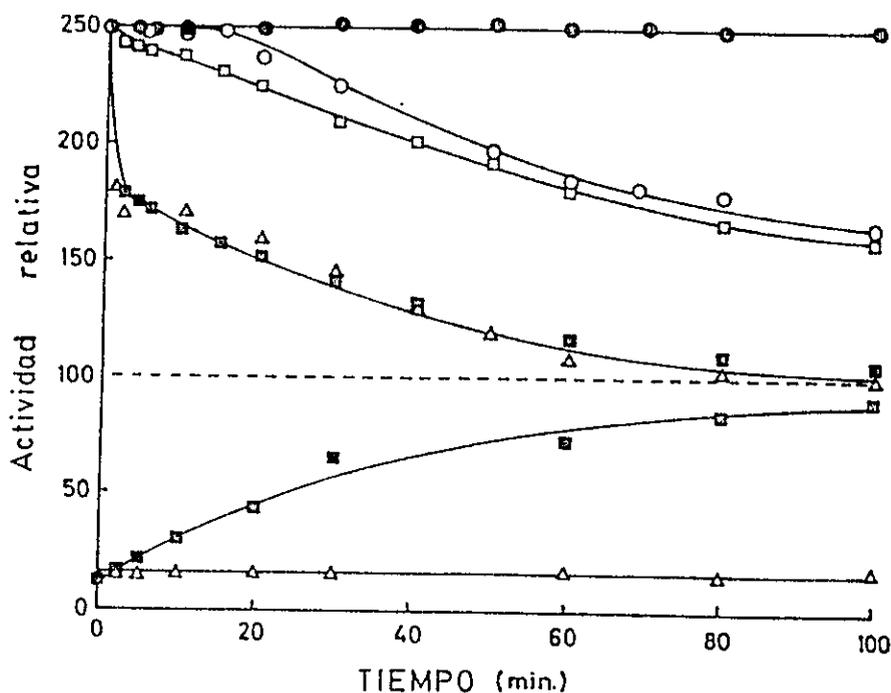


Figura 16. Cinética de cambios de la actividad de la fructosa-1,6-bisfosfatasa por modificación con cianato de potasio. La enzima (13 μ M) fue incubada con KNCN 0,6 M a 37° en amortiguador ácido bórico-borax 50 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM bajo diferentes condiciones de modificación: sin protección (■); en presencia de AMP 2 mM (Δ); en presencia de Fru-1,6-P₂ 46 mM (\square); en presencia de AMP 2 mM y Fru-1,6-P₂ 23 mM (O). La enzima control (●) se sometió al mismo tratamiento excepto por el cambio de KNCN por KCl. Un valor relativo de 100 se dió a la actividad específica (10,5 U/mg) de la enzima control ensayada en ausencia de K⁺ (línea punteada). Se tomaron alícuotas (10 μ l) a los tiempos indicados, se diluyeron (1/100) y se ensayó actividad en la presencia de K⁺ 150 mM midiendo la formación de Pi. Los símbolos bajo la línea discontinua representan ensayos de actividad en presencia de AMP 75 μ M.

ción por potasio era reversible (Slebe y col., 1981; 1983).

Se conoce que el cianato reacciona más rápido con grupos tioles que con grupos amino, siendo la reacción de los primeros rápidamente reversible (Stark, 1964; 1972). Asimismo, se ha sugerido que existe una estrecha correlación entre la reactividad de un grupo tiol altamente reactivo y la reactividad de un residuo arginina esencial para la activación de la Fru-P₂asa por cationes monovalentes (Marcus, 1975).

La modificación de Fru-P₂asa por KNCO bajo condiciones en las cuales el grupo SH reactivo está expuesto (no protección, en presencia de AMP o potasio) (Marcus, 1975) condujo a la pérdida de activación por K⁺; mientras que bajo condiciones en las cuales el grupo SH se encuentra apantallado (en presencia de Fru-1,6-P₂), no se produce pérdida de activación por cationes monovalentes. Así, los resultados de modificación de la enzima con cianato sugieren la participación de grupos tioles en la activación de la Fru-P₂asa por cationes monovalentes.

EFEECTO DE POTASIO SOBRE LA ACTIVIDAD
DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA

Con el fin de tratar de explicar el mecanismo de acción de los cationes monovalentes sobre la Fru-P₂asa, se estudió el efecto del potasio sobre la afinidad de la enzima por el sustrato. Para ello se determinó el efecto de concentraciones variables de Fru-1,6-P₂ sobre la velocidad de la enzima nativa en presencia de concentraciones crecientes de K₂SO₄.

En la Figura 17 se observa que cuando se mide la actividad de la enzima a bajas concentraciones de Fru-1,6-P₂, la presencia de potasio produce una inhibición de la actividad enzimática. La constante de Michaelis para Fru-1,6-P₂, estimada a partir de los datos a concentraciones menores que 0,025 mM, aumentó linealmente al aumentar la concentración del catión monovalente (figura 17, recuadro). La Km en ausencia de K⁺ corresponde al valor de 10 μM para Tris-HCl 50 mM, el cual está como amortiguador. Este valor es similar a los valores para las enzimas de riñón (cerdo y conejo) e hígado (rata y conejo) de 5 a 10 μM en presencia de Tris-HCl 50 mM o trietanolamina 40 mM (Colombo y Marcus, 1974; Tashima y col., 1972; François y col., 1983; Nakashima y Tuboi, 1976).

Cuando la actividad se mide a mayores concentraciones de Fru-1,6-P₂, se observa una activación de la enzima por el potasio. Así, a concentraciones de 0,15 mM Fru-1,6-P₂ y 150 mM K⁺

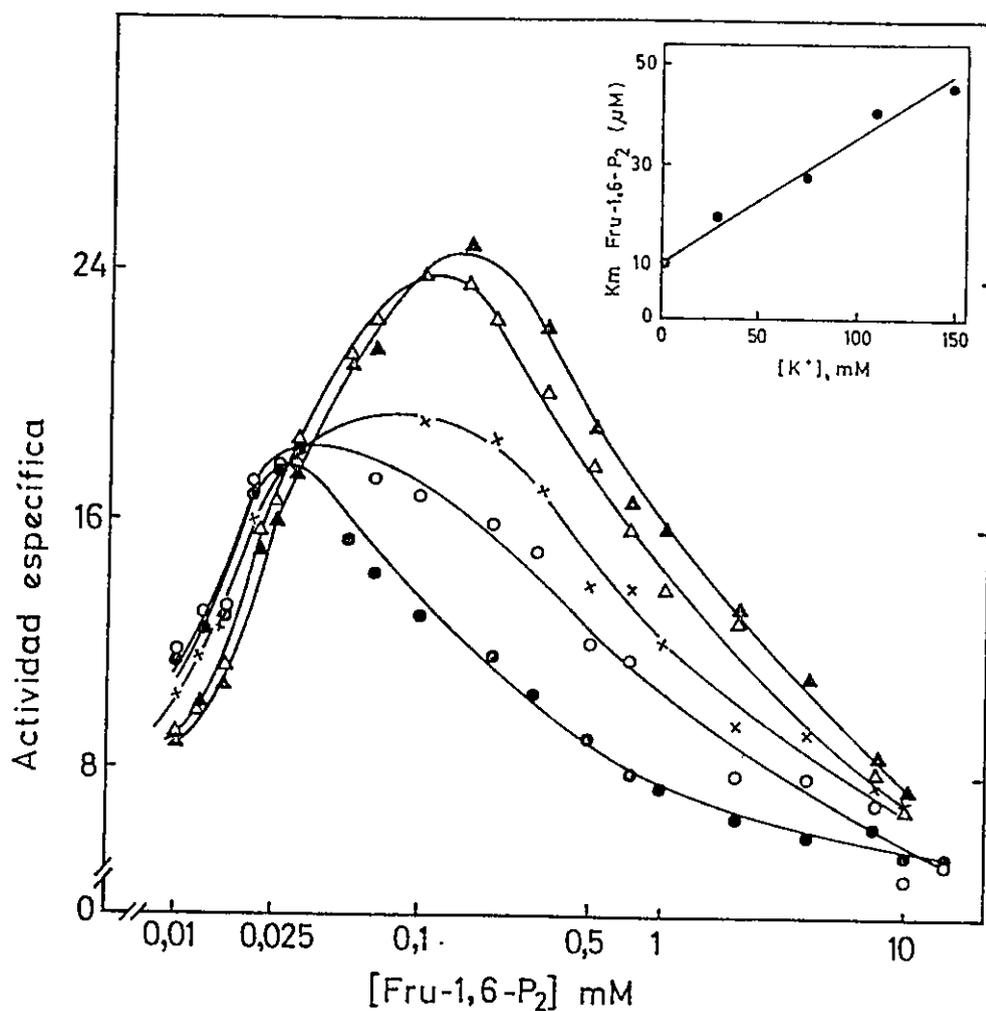


Figura 17. Efecto de la concentración de potasio sobre la saturación de la fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa. La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente como está descrito en Materiales y Métodos en la ausencia (●) y en presencia de concentraciones fijas de K^+ : 30 mM (○); 75 mM (×); 110 mM (△), y 150 mM (▲), a las concentraciones de sustrato que se indican. El recuadro muestra la variación de la K_m para Fru-1,6- P_2 en función de la concentración del ion potasio.

se obtiene un aumento de 2,3 veces en la actividad de la enzima, respecto a aquella medida en las mismas condiciones pero en ausencia de potasio (figura 17). Se puede observar, también, que a medida que aumenta la concentración de K^+ , la concentración de sustrato óptima para la máxima actividad de la enzima sufre un desplazamiento desde 25 μM Fru-1,6- P_2 , en ausencia de K^+ , a 150 μM Fru-1,6- P_2 cuando la concentración de potasio es de 150 mM. En otras palabras, la concentración de sustrato requerida para inhibir la enzima aumenta a medida que se incrementa la concentración de potasio, aunque a concentraciones altas de Fru-1,6- P_2 (sobre 10 mM), la velocidad de la reacción se hace independiente del catión monovalente. Estos resultados han llevado a sugerir (Slebe y col., 1979; 1980) que, además del efecto del potasio sobre el sitio catalítico, el catión monovalente podría producir un cambio en la estructura de la enzima, lo que la haría susceptible de ser activada por potasio. Así, el aumento observado en la actividad enzimática medida a 0,15 mM Fru-1,6- P_2 , y producido al incrementar la concentración de K^+ (figura 17), sería el resultado de una pérdida de la inhibición por exceso de sustrato causada por un cambio conformacional de la enzima promovido por el catión monovalente.

En la Tabla 7 se muestra claramente el efecto del potasio sobre la inhibición de la enzima por exceso de sustrato. A 500 μM Fru-1,6- P_2 y en ausencia de potasio se observa un 50% de inhibición de la actividad enzimática, respecto de aquella medida a

TABLA 7

Efecto de la concentración de potasio sobre la inhibición
 por exceso de sustrato de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa^a

Concentración de K ⁺	Inhibición por Fru-1,6-P ₂ ^b
mM	%
0	50
30	29
75	16
110	0
150	0

^a La actividad enzimática se midió espectrofotométricamente como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de las concentraciones de potasio que se indican.

^b El porcentaje de inhibición por exceso de sustrato es expresado en función de la actividad enzimática medida a 500 μ M Fru-1,6-P₂. El 100% de actividad enzimática corresponde a aquella medida con 25 μ M Fru-1,6-P₂.

25 μM Fru-1,6- P_2 (en ausencia de potasio). Sin embargo, a medida que se aumenta la concentración de potasio se observa una disminución de la inhibición por exceso de sustrato, siendo ésta totalmente eliminada a 150 mM K^+ , concentración a la cual la activación es máxima.

Dado que el potasio pareciera producir una reversión de la inhibición por exceso de sustrato, los resultados presentados aquí sugieren que la activación por cationes monovalentes y la inhibición por exceso de sustrato estarían relacionadas. Uno de los mecanismos por el cual el potasio activa a la Fru- P_2 asa sería alterando la afinidad de la enzima por el sustrato, en un segundo sitio (sitio inhibitorio). De esta misma manera, el efecto inhibitorio del potasio a bajas concentraciones de Fru-1,6- P_2 se podría explicar, también, por una alteración de la afinidad del sitio catalítico por el sustrato.

La alteración sobre el sitio inhibitorio producida por el potasio se podría deber a una interacción directa del ion con este sitio o a un mecanismo indirecto a través de la interacción del catión con otra región de la proteína.

Una forma de estudiar estas alternativas sería a través de la modificación química selectiva de la enzima, de manera tal que se elimine sólo la activación por K^+ . Luego, en la enzima modificada estudiar la inhibición por exceso de sustrato. Si los grupos involucrados en ambas propiedades fueran los mismos, se esperaría que la modificación de la enzima produjera pérdida

de la activación por potasio simultáneamente con la pérdida de inhibición por exceso de sustrato. Estos estudios serán analizados posteriormente.

MODIFICACION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA CON
CIANATO DE SODIO

1. Características cinéticas de Fru-P₂asa modificada por NaNCO.

Los estudios descritos utilizando KNCO, dirigidos inicialmente a la elucidación del mecanismo de activación por cationes monovalentes, mostraron que el cianato producía una alteración importante en la inhibición de la enzima por AMP. La alta concentración de KNCO requerida para eliminar la activación por potasio podría haberse debido a la competencia entre la especie activa (ac. isociánico) y el contra-ión (potasio) por los residuos reactivos, y/o a un cambio conformacional provocado por el catión monovalente.

Con el propósito de estudiar la región de interacción de la enzima con el inhibidor alostérico AMP, se realizaron experimentos de modificación utilizando cianato de sodio. Los efectos de la modificación sobre la actividad de Fru-P₂asa y sobre su inhibición por AMP, se muestran en la Figura 18 y Tabla 8. Estos experimentos introductorios fueron esenciales para corroborar los resultados previamente obtenidos bajo condiciones experimenta - les similares, pero esta vez usando NaNCO como agente modifica - dor. Se ha demostrado que las fructosa-1,6-bisfosfatasas de ri - ñón de cerdo e hígado de conejo no son activadas por Na⁺ en for

MODIFICACION DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATASA CON
CIANATO DE SODIO

1. Características cinéticas de Fru-P₂asa modificada por NaNCO.

Los estudios descritos utilizando KNCO, dirigidos inicialmente a la elucidación del mecanismo de activación por cationes monovalentes, mostraron que el cianato producía una alteración importante en la inhibición de la enzima por AMP. La alta concentración de KNCO requerida para eliminar la activación por potasio podría haberse debido a la competencia entre la especie activa (ac. isociánico) y el contra-ión (potasio) por los residuos reactivos, y/o a un cambio conformacional provocado por el catión monovalente.

Con el propósito de estudiar la región de interacción de la enzima con el inhibidor alostérico AMP, se realizaron experimentos de modificación utilizando cianato de sodio. Los efectos de la modificación sobre la actividad de Fru-P₂asa y sobre su inhibición por AMP, se muestran en la Figura 18 y Tabla 8. Estos experimentos introductorios fueron esenciales para corroborar los resultados previamente obtenidos bajo condiciones experimentales similares, pero esta vez usando NaNCO como agente modificador. Se ha demostrado que las fructosa-1,6-bisfosfatasas de riñón de cerdo e hígado de conejo no son activadas por Na⁺ en for

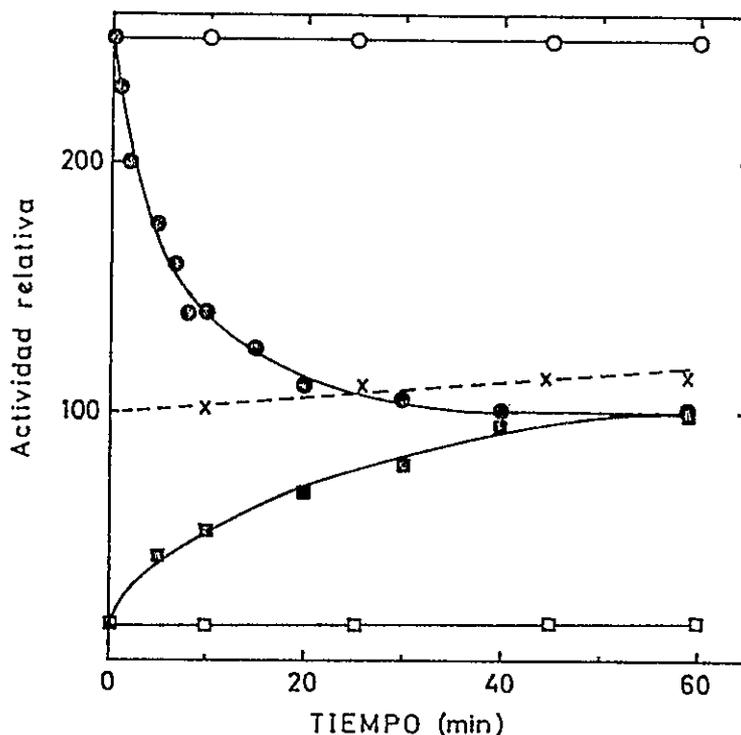


Figura 18. Alteración de las propiedades regulatorias de fructosa-1,6-bisfosfatasa por carbamilación con NaNCO. La enzima (30 μ M) fue incubada con NaNCO 100 mM, como se describe en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, se detuvo la reacción y se midió la actividad enzimática en la presencia de 150 mM de potasio. La enzima control (símbolos abiertos) fue sometida al mismo tratamiento excepto que el NaNCO fue cambiado por NaCl. Un valor relativo de 100 es asignado a la actividad específica (12 U/mg) de la enzima control medida en ausencia de potasio y AMP. La línea discontinua es la actividad de la enzima modificada medida en estas últimas condiciones. Los símbolos (■, □) indican ensayos de actividad en presencia de AMP 75 μ M. La actividad se ensayó por la liberación de Pi.

TABLA 8

Efecto de fructosa-1,6-bisfosfato y AMP sobre la modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por cianato^a

Condiciones de modificación	Actividad específica ^b	R ^c	Inhibición por Fru-1,6-P ₂ ^d	Ki AMP ^e	n _H
	U/mg		%	μM	
Control	27,2	2,25	50	20,0	2,17
Protección con AMP 2 mM	12,1	1,10	-	18,7	1,80
Protección con Fru-1,6-P ₂ 25 mM	25,0	2,08	50	32,0	1,41
Sin protección	12,0	0,91	11	90,2	1,40

^aLa modificación de la enzima se realizó con NaNCO 50 mM por 60 min, como está descrito en Materiales y Métodos, en la presencia de los ligandos que se indican.

^bLa actividad de la enzima se midió por la determinación del Pi formado.

^cR denota el índice de activación y corresponde a la razón de las actividades medidas en presencia y ausencia de 150 mM potasio en el medio de ensayo.

^dPara la inhibición por exceso de sustrato la actividad de la enzima se midió espectrofotométricamente a una concentración de Fru-1,6-P₂ igual a 500 μM en ausencia de potasio. Se asignó un valor de 100% a la actividad medida con 25 μM sustrato.

^eLos valores de Ki y n_H para AMP fueron calculados de acuerdo a Taketa y Pogell (1965).

ma significativa, y a concentraciones sobre 100 mM, el catión produce un leve efecto inhibitorio (Hubert y col., 1970; Nakashima y Tuboi, 1976). Por otro lado, se conoce que el K^+ no tiene efecto sobre la inhibición por AMP de las enzimas de riñón de cerdo e hígados de conejo y pescado (Raja chilensis) (Hubert y col. 1970; Nakashima y Tuboi, 1976) pero, a su vez, el mismo catión potasio hace más sensibles a las enzimas de músculo esquelético de conejo (Hubert y col., 1970) e hígado de pescado (Cyprinus carpio) (Villanueva y Marcus, 1974) a la inhibición por AMP. Un caso extremo lo presenta la enzima de pescado (Geniapterus chilensis) la cual no es inhibida por AMP, a menos que haya presente un catión monovalente en el ensayo de actividad (Hubert y col., 1970). La extensión de la inhibición por AMP depende en este caso del catión usado, siendo el orden de efectividad $K^+ > Na^+$.

Estos antecedentes muestran que K^+ y Na^+ producen en la enzima algunos efectos diferentes. Además, si K^+ induce un cambio conformacional en la proteína, lo más probable es que Na^+ no sea capaz de reproducir este efecto. Se consideró por ello importante explorar si el NaNCO producía en la proteína un efecto similar al causado por el KNC0.

En general, los resultados que se muestran en la Figura 18 y Tabla 8 corroboran los datos anteriores, demostrando que a menos que el sustrato Fru-1,6- P_2 esté presente durante la modificación, hay una disminución drástica en la actividad específica

concomitante con una pérdida rápida y total de la activación de la enzima por K^+ . Sin embargo, hay algunas diferencias significativas en los resultados obtenidos con $NaNCO$, ya que la razón de las actividades medidas en presencia y ausencia de potasio disminuyó de un valor de 2,25 a un valor menor que 1,0 a medida que transcurrió el tiempo de modificación (figura 18, curva superior). Esta caída en la activación por potasio se obtuvo con una concentración seis veces menor de agente modificante y, además, permitió seguir los cambios que sufre esta propiedad en el tiempo. La actividad enzimática medida en ausencia de potasio (línea punteada) sufrió un ligero aumento, indicando un efecto inhibitorio del K^+ en la enzima carbamilada por 60 min, lo que será analizado con más detalle en la sección Efecto del cianato de sodio sobre la activación de Fru- P_2 asa por potasio. Por otro lado al emplear Fru-1,6- P_2 como agente protector no se altera en forma significativa la inhibición por AMP, pero la cooperatividad para AMP se pierde en un alto porcentaje (70%). El sustrato en este caso simula el efecto protector de AMP (cf. figuras 13 c, 15 y tablas 5,6), pero con la ventaja de proteger contra la pérdida de activación por cationes monovalentes. Así, se puede modificar la cooperatividad entre los sitios de AMP, sin alterar ninguna otra propiedad de la enzima. Cabe hacer notar que en la modificación con $KNCO$ se requería recuperar la activación por cationes monovalentes mediante diálisis o filtración en columnas.

Al usar una concentración mayor (150 mM) de cianato de so-

dio, con el objeto de acentuar el efecto causado y disminuir el tiempo de modificación, se perdió totalmente la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP, como lo indica el valor del coeficiente de Hill que disminuyó de 2,17 a 1,05. En estas condiciones (ausencia de protección), la constante de inhibición aumentó de 20 μ M a 200 μ M. La estructura cuaternaria de la enzima se mantiene inalterada puesto que el volumen de elución de la enzima carbamilada, en una columna de Sephadex G-200, coincide con el volumen de elución de la enzima nativa. Esto indicaría que la pérdida de la cooperatividad no se debe a la disociación de la proteína en sus subunidades. Además, la razón de las actividades medidas a pH 7,5 y 9,5 se mantiene igual a la enzima nativa.

Estos resultados reafirman la insinuación dada con anterioridad, de que estas propiedades funcionales residen en diferentes residuos dentro de la topografía de la proteína. Por lo tanto, el interés subsiguiente fue caracterizar cinéticamente la pérdida de la cooperatividad y de la inhibición por AMP, para obtener pruebas que apoyaran la hipótesis anterior.

2. Modificación de la cooperatividad para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa por carbamilación.

La modificación del coeficiente de Hill para AMP sigue una cinética de pseudo-primer orden (Slebe y col., 1980 a). Esta ve

locidad de modificación es independiente de la presencia o ausencia de Fru-1,6-P₂, cuando éste se empleó como agente protector, ya que las constantes de velocidad observadas en ausencia o presencia del ligando tienen un mismo valor, igual a $2,3 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ (figura 19). Esto indica que la velocidad de pérdida de la cooperatividad es independiente de la pérdida de la activación por potasio. Si estos parámetros estuviesen relacionados, los valores de las constantes observadas deberían ser diferentes, ya que el sustrato protege a la enzima de la pérdida de la activación por cationes monovalentes (tabla 8).

Esta independencia, entre el efecto de activación de la enzima por potasio y la cooperatividad para AMP, se encuentra apoyada también por el hecho que tanto la Fru-P₂ asa que posee sólo su cooperatividad alterada, como la enzima nativa, responden de igual forma al efecto activador del potasio (figura 20, cf. figura 17). La modulación de la actividad catalítica de la enzima nativa por potasio depende de la concentración del sustrato Fru-1,6-P₂. A bajas concentraciones del sustrato el potasio produce una inhibición de la actividad enzimática, pero a concentraciones inhibitorias de sustrato produce una activación de la actividad catalítica (figuras 17, 20).

Cuando la reacción de modificación se realizó en presencia de AMP 1 mM, se obtuvo una protección parcial de la interacción cooperativa entre las subunidades de la enzima, con una constante de velocidad observada igual a $6,3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (figura 19).

La velocidad de pérdida de la cooperatividad depende de la

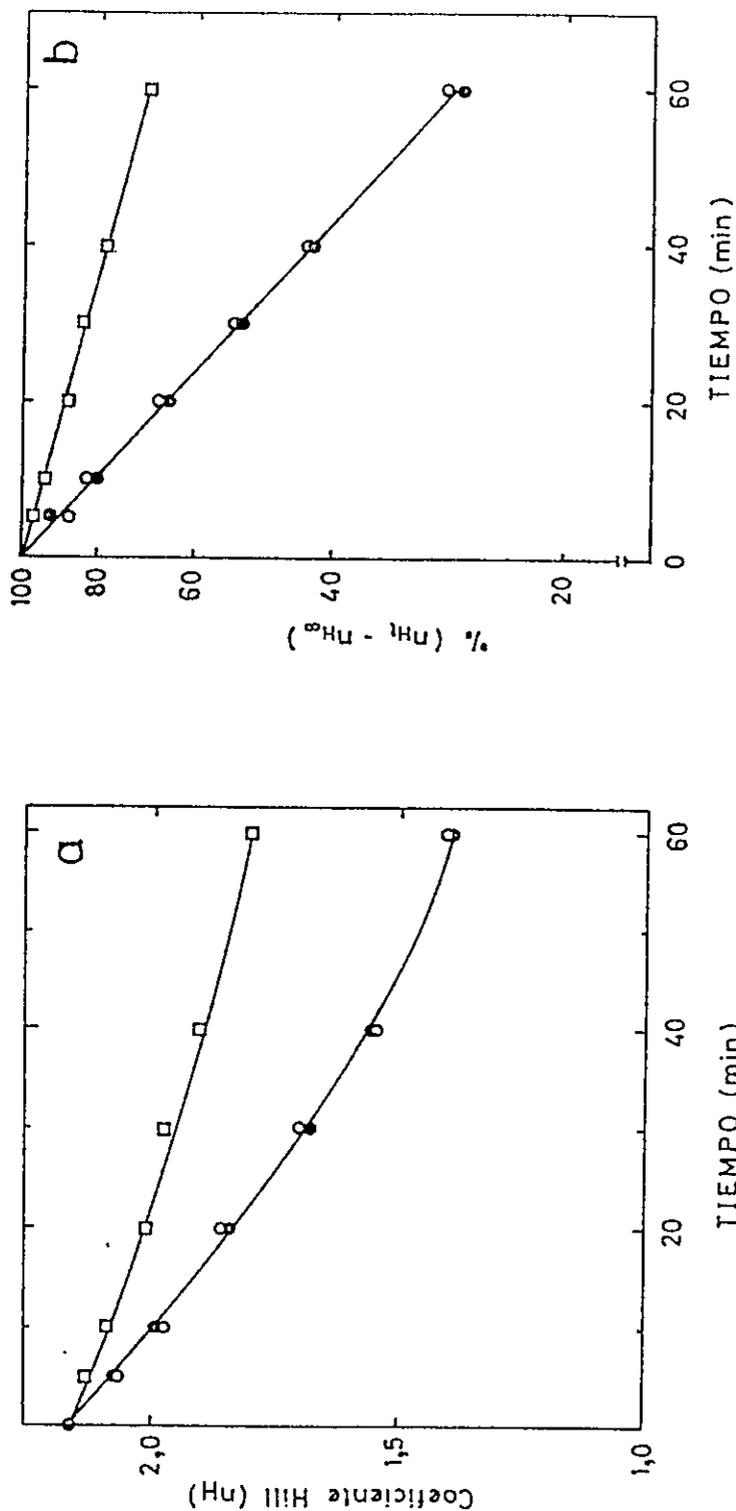


Figura 19. Efecto de ligandos sobre la velocidad de modificación del coeficiente de Hill para AMP por carbamilación de fructosa-1,6-bisfosfatasa. a, el tratamiento de la enzima (25 μ M) se realizó con NaNCO 50 mM en la presencia de Fru-1,6-P2 25 mM (O); AMP 1 mM (□), o sin protección (O), como está descrito en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se tomó una alícuota, se diluyó (1/100) y se midió la inhibición por concentraciones variables de AMP. La actividad enzimática se determinó en presencia de K^+ 150 mM, a través de la medición del Pi formado. Los valores graficados son las pendientes de cada una de las curvas obtenidas, calculadas en forma similar a la figura 15. b, los datos graficados fueron obtenidos de los datos presentados en a. Para los cálculos del porcentaje de cooperatividad remanente se consideró como valor a tiempo infinito de modificación (n_H) igual a 1,0.

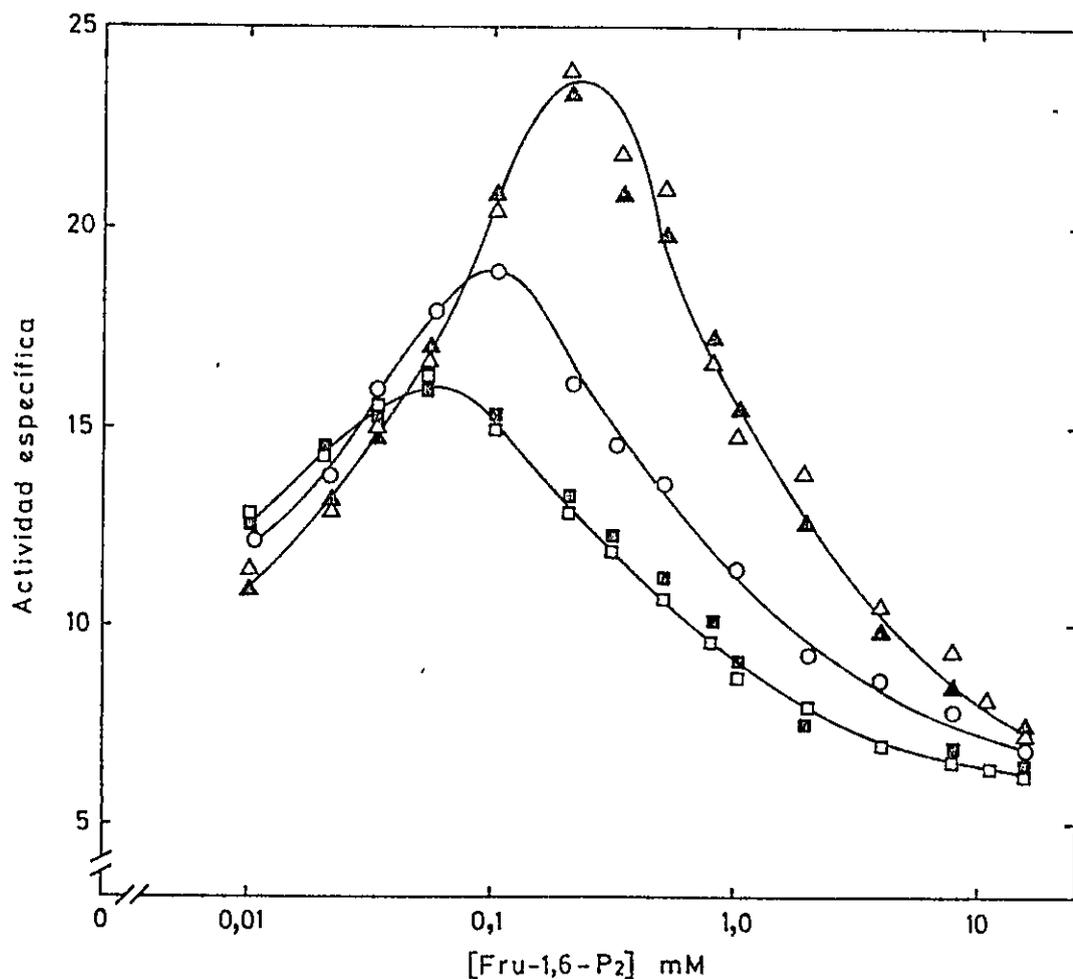


Figura 20. Efecto de la concentración de potasio sobre la saturación por fructosa-1,6-bisfosfato de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y carbamílada. La enzima fue modificada en las condiciones descritas en la leyenda de la Tabla 8 en presencia de Fru-1,6-P₂ 25 mM. La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente como está descrito en Materiales y Métodos en la ausencia (\square) o presencia de concentraciones fijas de potasio: 75 mM (\circ); 150 mM (\triangle), a las concentraciones variables de sustrato que se indican. Los símbolos llenos corresponden a la enzima carbamílada y los vacíos a la nativa.

concentración de cianato (figura 21 a). Las gráficas logarítmicas de la cooperatividad remanente en función del tiempo de modificación son líneas rectas, indicando que las velocidades de modificación son de primer orden aparente (figura 21 b).

Las constantes de velocidad de pseudo-primer orden observadas (k_{obs}) siguen una relación lineal con la concentración de cianato, característica de todas las reacciones de segundo orden (figura 22 a). La Figura 22 b muestra que el orden cinético de la reacción con respecto al cianato es cercano a 1, calculado según lo descrito por Hollenberg y col. (1971).

3. Pérdida de la inhibición por AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa mediante tratamiento con cianato.

La disminución de la afinidad de la enzima por AMP se estimó determinando el incremento en K_i . El grado de incremento ($K_{i_t} - K_{i_0}$) dependió de la presencia de ligandos protectores (figura 23 a). En ausencia de ellos, el incremento de K_i con el tiempo de modificación siguió una relación hiperbólica, alcanzando un valor cuatro veces superior ($K_i = 80 \mu M$) luego de 60 minutos de modificación. La pérdida de afinidad de la enzima por AMP es reducida considerablemente cuando la reacción de modificación se realiza en presencia de Fru-1,6-P₂ 25 mM. En presencia de AMP 1 mM no se observó variación en el valor de K_i (figura 23 a).

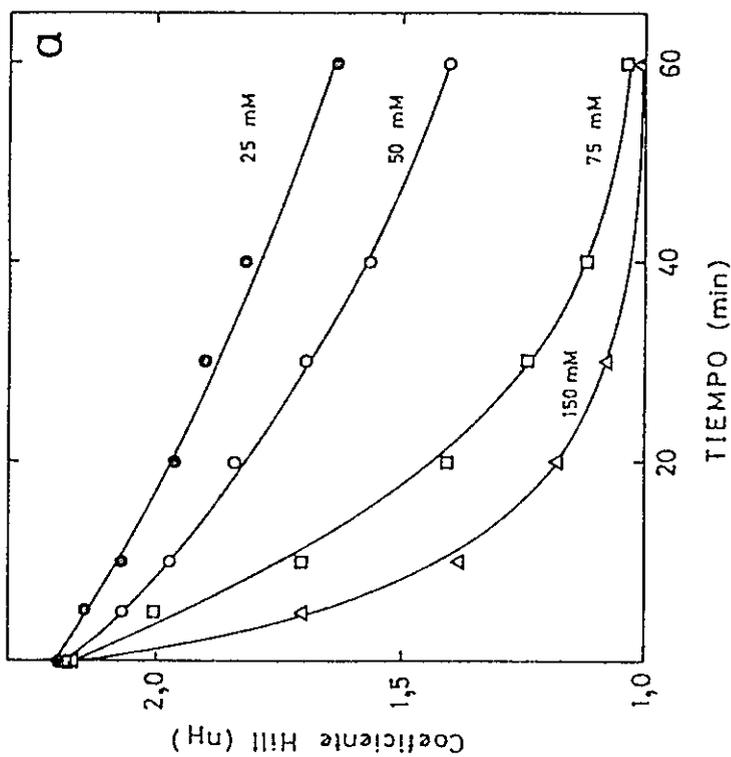
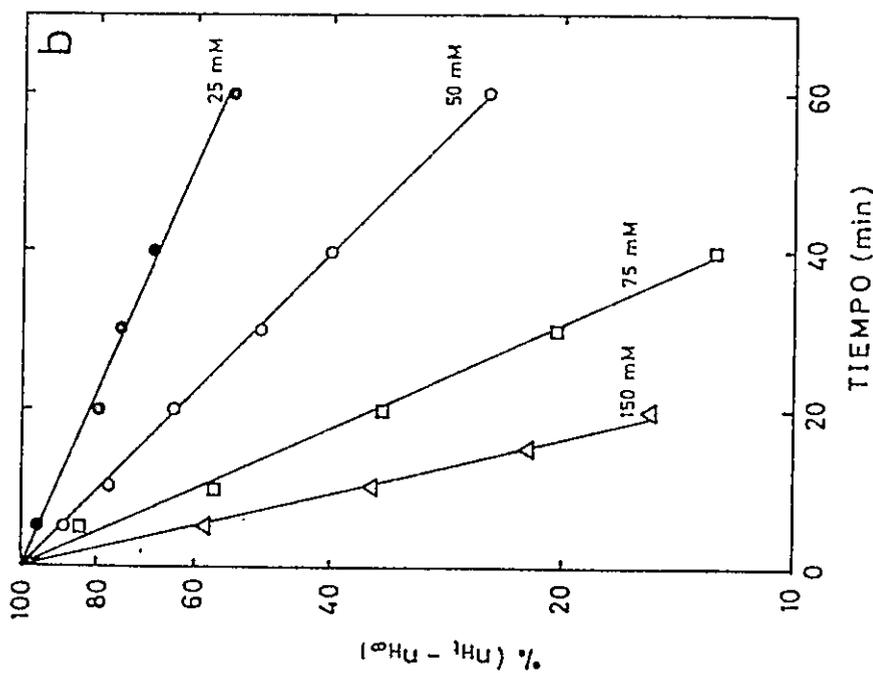


Figura 21. Cinética de modificación de la cooperatividad hacia AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa. a, la enzima (25 μ M) fue tratada con NaClO en la presencia de Fru-1,6-P₂ 25 mM, como está descrito en Materiales y Métodos, a las concentraciones de cianato que se indican. La fuerza iónica se mantuvo constante agregando NaCl. A los tiempos indicados se procedió como está descrito en la leyenda de la figura 19 y se calcularon los diferentes valores de n_H . Los números representan la concentración de cianato. b, los datos se obtuvieron de aquellos presentados en a, y la cooperatividad remanente se calculó en forma similar a la descrita en la leyenda de la figura 19.

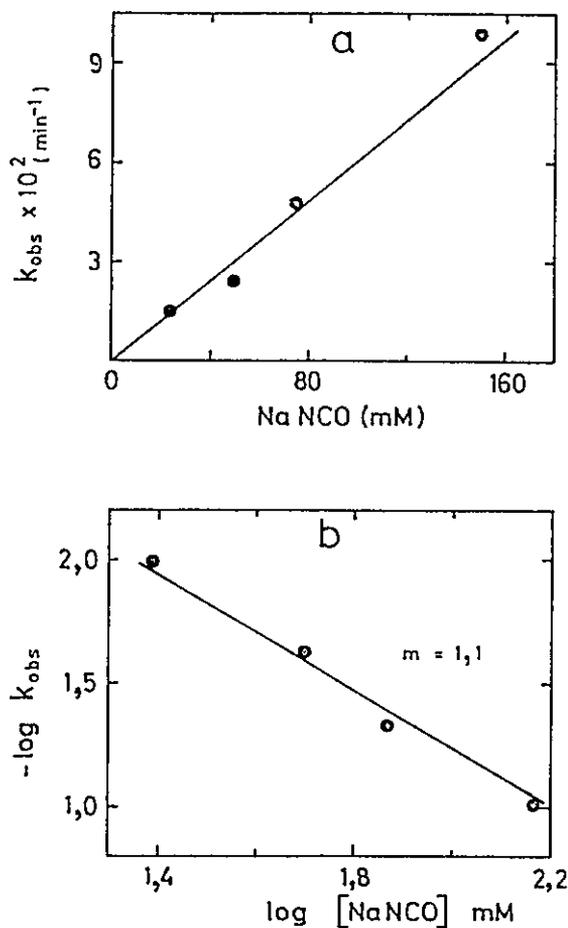


Figura 22. Características cinéticas de la reacción de modificación de la cooperatividad para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa. a, efecto de la concentración de cianato sobre la constante de velocidad de primer orden aparente para la modificación de la cooperatividad para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa. Los valores de las constantes fueron obtenidos de la figura 21. b, orden cinético de la reacción de modificación de la cooperatividad para AMP. Los valores fueron obtenidos de los datos presentados en a.

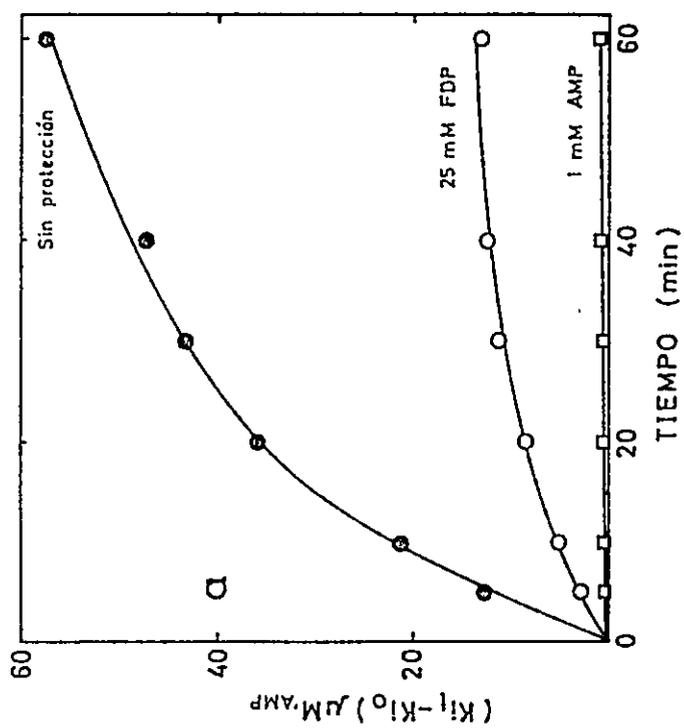
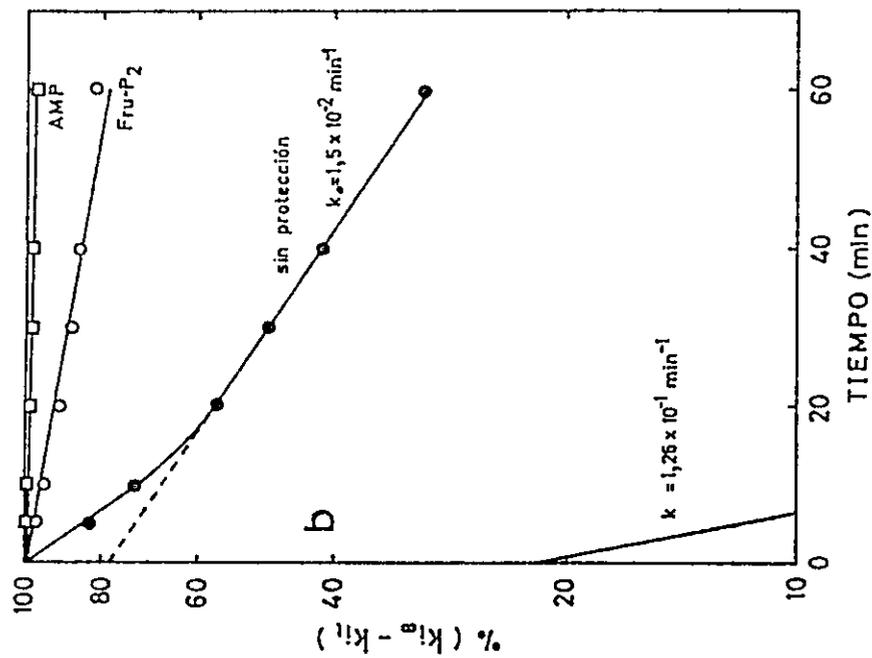


Figura 23. Leyenda en la siguiente página.

Figura 23. Efecto de ligandos de la enzima sobre la velocidad de modificación de la constante de inhibición para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa. La enzima fue incubada con Na₂CO₃ 50 mM en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM a 37° en la presencia de Fru-1,6-P₂, AMP o sin protección, a las concentraciones indicadas en la figura. A diferentes tiempos de iniciada la modificación se retiraron alícuotas (10 µl), se detuvo la reacción por dilución (1/100) y se ensayó la actividad en presencia de K⁺ 150 mM y de concentraciones variables de AMP (curva de inhibición por AMP). La actividad enzimática se determinó a través de la medición del fosfato inorgánico formado. Los valores graficados corresponden a aquellos calculados de acuerdo a Taketa y Pogell (1965), para cada una de estas curvas. K_{i0} representa de disminución de la afinidad de la enzima por AMP y se estimó determinando el incremento en el valor de K_i . b, los datos graficados fueron obtenidos de aquellos presentados en a. Se graficó en forma semilogarítmica la variación porcentual de la constante de inhibición en función del tiempo de modificación. Se asignó un 100% de variación a la diferencia entre K_i y K_{i0} . La constante de velocidad de primer orden para la modificación de los grupos amino que reaccionan lentamente en ausencia de ligando protector (fase lenta), se calculó de la parte lineal de la curva experimental. Para calcular el curso de la modificación de los grupos que reaccionan rápidamente en estas condiciones (fase rápida), se sustrajeron los valores de la línea extrapolada (--) de los valores correspondientes en la primera parte de la curva experimental. La pendiente de la recta así obtenida (línea inferior), corresponde a la constante de velocidad de primer orden para la fase rápida (Ray y Koshland, 1961; 1962). Otros detalles en Materiales y Métodos.

La velocidad de modificación de la constante de inhibición (K_i) para AMP sigue una cinética bifásica con una constante de primer orden aparente para la fase rápida igual a $1,3 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ y para la fase lenta igual a $1,5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, cuando la reacción se realiza sin protección (figura 23 b). Cuando la reacción de modificación se realiza en la presencia de Fru-1,6- P_2 o AMP, se obtiene un 85% y un 98% de protección, respectivamente. En este caso, la velocidad de modificación de la afinidad de la enzima por AMP sigue aparentemente una cinética monofásica.

La conducta bifásica de la velocidad de alteración de la constante de inhibición para AMP fue investigada teniendo como hipótesis de trabajo que el cambio en la velocidad de modificación de K_i era consecuencia de la influencia ejercida por la modificación simultánea de la cooperatividad, o de la activación por potasio.

Para realizar este estudio, se modificó la proteína haciéndola perder la interacción cooperativa entre sus subunidades, sin alterar la activación por potasio ni la inhibición por AMP (i.e. en presencia de Fru-1,6- P_2 25 mM). La enzima modificada tenía una razón de actividades (actividad medida en la presencia y ausencia de potasio) igual a 2,2; $n_H = 1,2$ y $K_i = 20 \mu\text{M}$. Posteriormente se siguió la cinética de cambio de K_i carbamilando la Fru- P_2 asa previamente modificada.

Los resultados obtenidos (figura 24 a,b) indican que la conducta bifásica de la velocidad de modificación de K_i era conse-

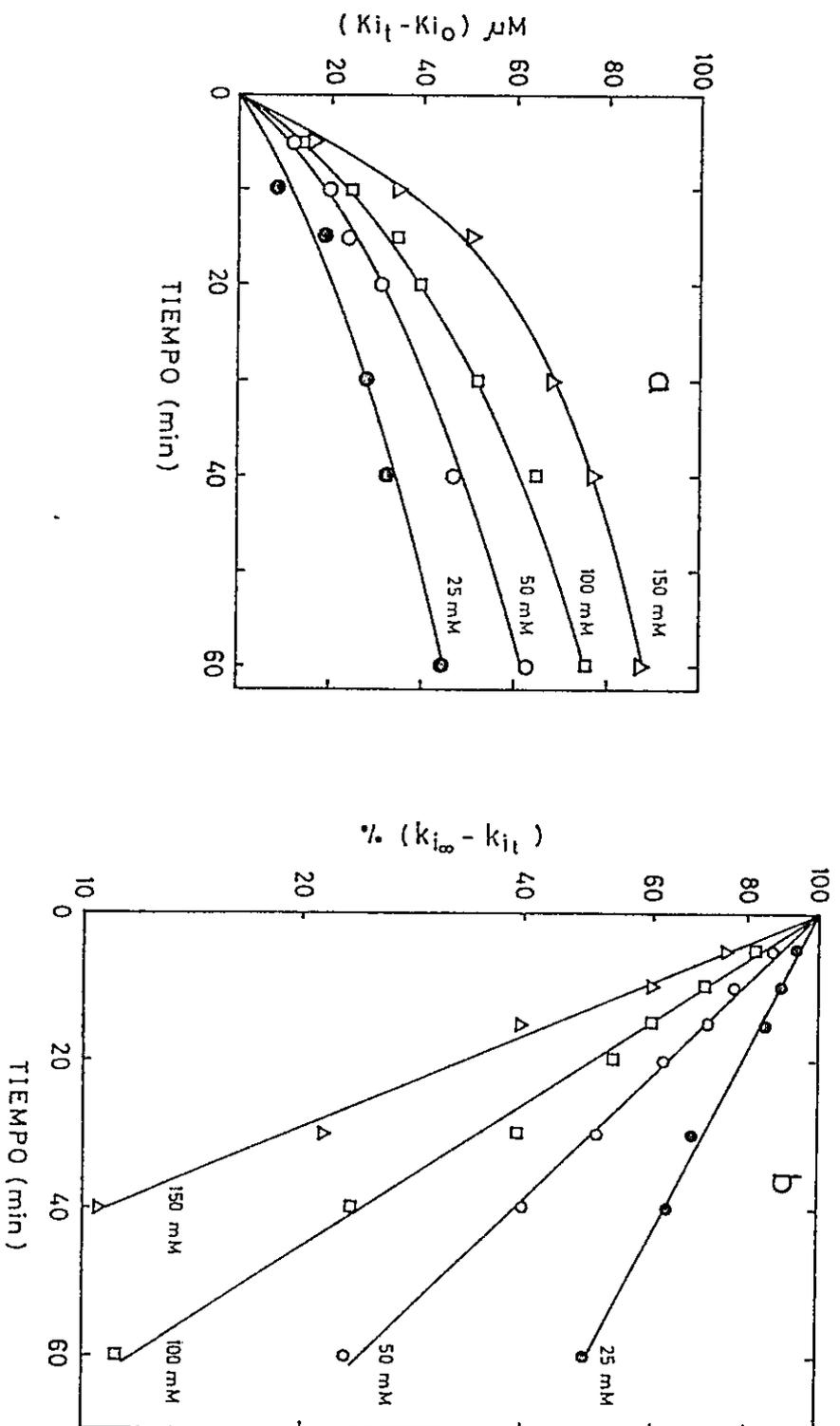


Figura 24. Leyenda en la siguiente página.

Figura 24. Cinética de Modificación de la constante de inhibición para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa con su cooperatividad alterada. a, La enzima (20 μ M) fue tratada con NaNCO 50 mM por 60 min en presencia de Fru-1,6-P₂ 25 mM con el objetivo de eliminar la cooperatividad de la enzima hacia AMP. Se detuvo la reacción por filtración en una columna de Sephadex G-50, como está descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente, se procedió a remodelar la proteína sin protección, a las concentraciones de cianato que se indican. La reacción de modificación se realizó según lo descrito en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados la reacción se detuvo por dilución y se determinó el valor de K_i como se describe en la leyenda de la figura 23a. b, los valores graficados fueron obtenidos de aquellos presentados en a. Se graficó en forma semilogarítmica la variación del valor de K_i en función del tiempo, en forma similar a la descrita en la figura 23b.

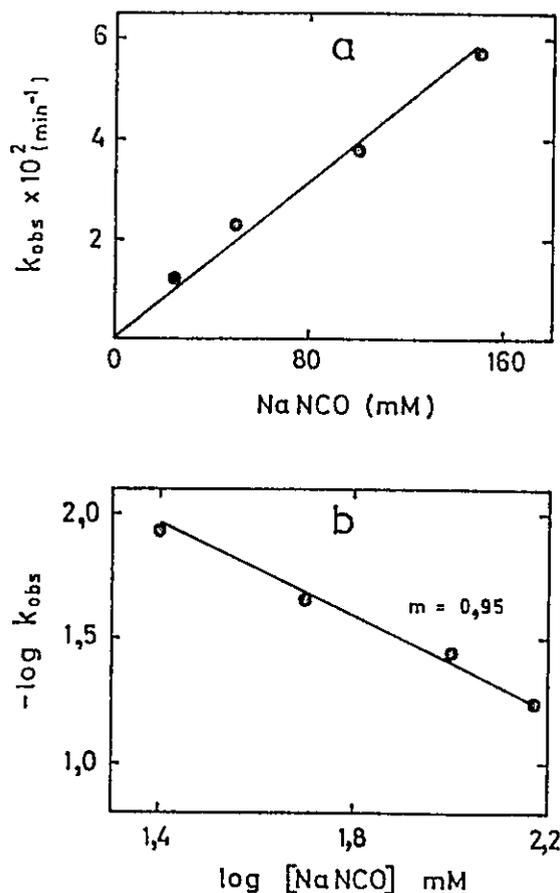


Figura 25. Características cinéticas de la reacción de modificación del K_i para AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa con su cooperatividad alterada. a, efecto de la concentración de cianato sobre la constante de velocidad de primer orden aparente para la modificación del K_i para AMP. Los valores fueron obtenidos de la figura 24b. b, orden cinético de la reacción de modificación de la constante de inhibición. Los valores fueron obtenidos de los datos presentados en a.

cuencia de la influencia ejercida por la modificación simultánea de la cooperatividad. Como la modificación de K_i en la enzima que no presenta cooperatividad sigue una cinética de primer orden aparente (figura 24 b), es posible calcular la constante de segundo orden y el orden cinético de la reacción con respecto al cianato. La constante de segundo orden encontrada fue de $4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (figura 25 a), y el orden cinético de la reacción fue de 0,92 (figura 25 b).

4. Efecto de la carbamilación sobre el dominio de unión del nucleótido en la enzima.

El grado de inhibición de la enzima nativa por AMP es altamente dependiente de la temperatura (Taketa y Pogell, 1965). Fue por lo tanto, importante saber si esta propiedad estaba también presente en la Fru- P_2 asa modificada con cianato. Esta dependencia de la temperatura podría estar alterada si la enzima ha sido modificada en su cooperatividad y en su afinidad por AMP. Por el contrario, la enzima que solamente ha perdido la interacción cooperativa entre sus subunidades debería responder en forma similar a la proteína nativa, indicando que la modificación no produce cambios significativos en las propiedades catalíticas de la enzima, especialmente en el sitio de unión de AMP.

La Figura 26 muestra el efecto de la temperatura sobre la inhibición por AMP de la enzima nativa y de la enzima modificada

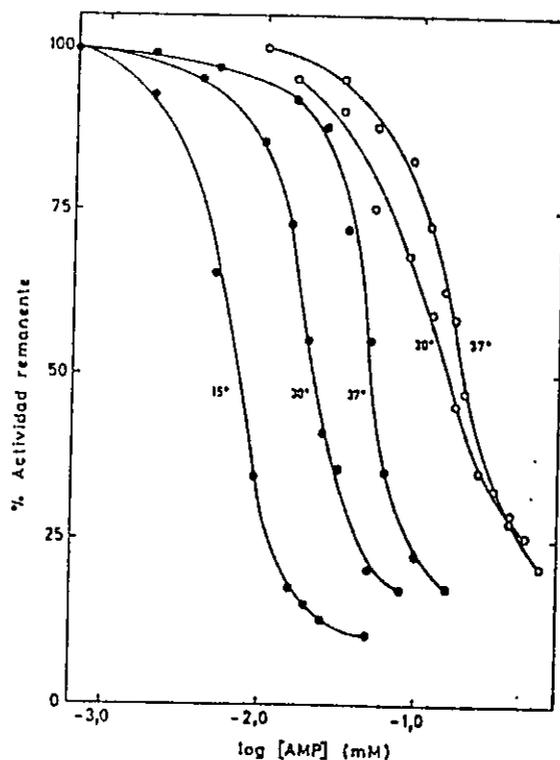


Figura 26. Efecto de AMP sobre la actividad de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y modificada en función de la temperatura. La enzima se modificó con cianato de sodio 150 mM por 20 min sin protección, como está descrito en Materiales y Métodos. Se detuvo la reacción por dilución (1/100) y se midió la inhibición por AMP a las temperaturas indicadas. La actividad enzimática se midió en presencia de K^+ 150 mM a través de la determinación del fosfato inorgánico formado. (●) enzima nativa, (○) enzima modificada sin protección.

TABLA 9

Parámetros de la inhibición por AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y modificada en función de la temperatura^a

Condiciones de modificación	Temperatura	K_i^b	K_i relativo ^c	n_H
	°C	μM		
Enzima nativa	15	6,7	1,0	2,00
	30	22,4	3,3	2,17
	37	58,2	8,7	2,04
Enzima modificada sin protección ^d	15	60,2	1,0	1,07
	30	158,0	2,6	1,10
	37	190,0	3,2	1,04
Enzima modificada con protección ^e	15	10,2	1,0	1,02
	30	35,0	3,4	1,20
	37	75,8	7,4	1,15

^a Los valores de K_i y n_H para las enzimas nativa y modificada sin protección (30 y 37^b), fueron obtenidos de los datos de la figura 26.

^b Los valores de K_i y n_H fueron calculados de acuerdo a Taketa y Pogell (1965).

^c Un valor relativo de 1,0 se asignó a los valores de K_i medidos a 15°.

^d Enzima modificada en las condiciones descritas en la figura 26.

^e Enzima modificada con NaClO 150 mM en presencia de Fru-1,6-P₂ 25 mM por 20 min, como se describe en Materiales y Métodos. Se detuvo la reacción por dilución (1/100) y se midió la inhibición por AMP como está descrito en la leyenda de la figura 26.

tanto en su cooperatividad como en su sensibilidad a AMP. La Fru-P₂asa modificada completamente responde en forma diferente a la enzima nativa. Por otro lado, la enzima modificada sólo en la cooperatividad muestra una dependencia de la temperatura similar a la enzima nativa (tabla 9). Los valores de K_i y n_H obtenidos de los datos de la Figura 26 están resumidos en la Tabla 9, la cual también incluye datos de la enzima modificada con protección y una medida de la dependencia del K_i con la temperatura (K_i relativo).

Por otro lado, se ha descrito que las Fru-P₂asas de hígado de pollo (Cruz y col., 1979) y de conejo (Kido y col., 1980; Xu y col., 1981) se unen a sefarosa azul y pueden ser eluidas específicamente con AMP, pero no por su sustrato Fru-1,6-P₂. Cruz y col. (1979) concluyeron que la sefarosa azul unía Fru-P₂asa específicamente en el sitio de unión de AMP y que las características estructurales de este sitio alostérico se parecían a las del pliegue para los dinucleótidos en otras enzimas (Stellwagen y col., 1975; Thompson y col., 1975). Así, la Fru-P₂asa de músculo de abejorro que no es inhibida por AMP, no se une a sefarosa azul (Leyton y col., 1980). Más aún, la modificación del sitio de unión de AMP con piridoxal-P, ha sido confirmada por su disminución en la sensibilidad al AMP y, también, por la inhabilidad de la enzima modificada a unirse a sefarosa azul (Cruz y col., 1979; Xu y col., 1981).

Se consideró por ello conveniente utilizar este criterio

para determinar el grado de alteración del sitio de unión del nucleótido, y la selectividad de la carbamilación de los residuos lisina involucrados en esta propiedad alostérica de la enzima. Si los residuos lisina de la Fru-P₂asa, relacionados con la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP, son responsables de su unión a la sefarosa azul, la modificación es pecífica de ellos debería alterar su comportamiento hacia la columna de afinidad.

El derivado Fru-P₂asa-cianato que solamente ha perdido la interacción cooperativa entre sus sitios de unión de AMP ($n_H = 1,2$; $K_i = 25 \mu\text{M}$; $R = 2,1$) fue completamente retenido en una columna de afinidad de sefarosa azul, en forma similar a la enzima nativa, y pudo ser recuperado (98%) por elución con el amortiguador conteniendo AMP 0,2 mM (figura 27 A). El derivado eluido mantuvo sus características originales ($n_H = 1,2$; $K_i = 24 \mu\text{M}$; $R = 2,1$). Por el contrario, cuando la enzima modificada tanto en su cooperatividad como en su sensibilidad a AMP ($n_H = 1,2$; $K_i = 104 \mu\text{M}$; $R = 1,1$) fue aplicada a la misma columna de afinidad, parte importante de la actividad de la preparación modificada emergió con el efluente (figura 27 B). La enzima no absorbida, la cual presumiblemente no contenía subunidades no modificadas, fue aún sensible a AMP, pero se requirieron concentraciones mayores para obtener una inhibición comparable (figura 28). La actividad retenida por la columna, aproximadamente 60% del total, fue eluida con AMP 0,2 mM (figura 27 B) y, posiblemente, representa te-

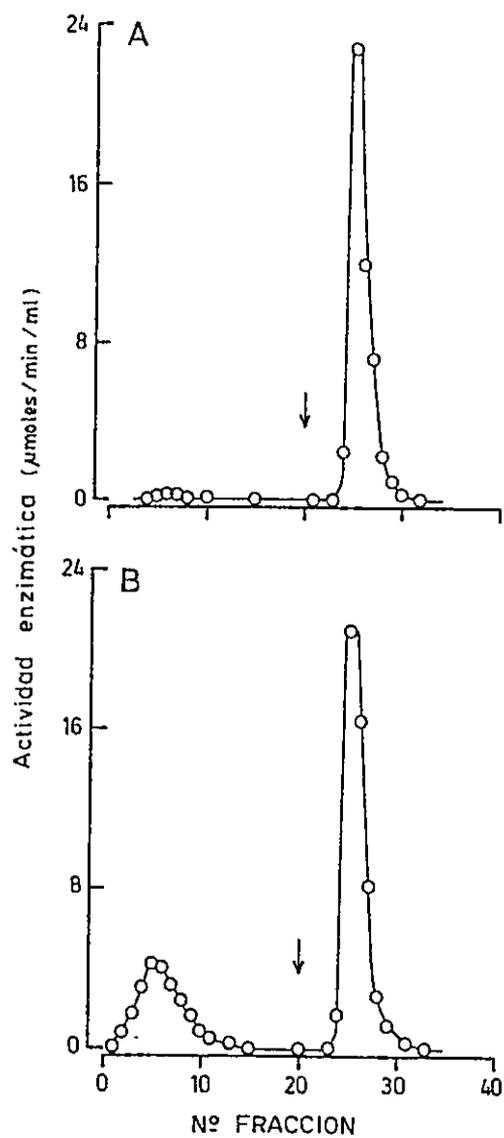


Figura 27. Leyenda en la página siguiente.

Figura 27. Cromatografía en sefarosa-azul del derivado Fru-P₂asa-cianato que no presenta cooperatividad entre los sitios de unión de AMP y de la Fru-P₂asa modificada en el sitio alostérico para el nucleótido. a, La enzima (44 μ M) fue incubada con NaNCO 100 mM en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM a 37° por 60 min, en presencia de Fru-1,6-P₂ 25 mM. Se detuvo la reacción por filtración en una columna de Sephadex G-25 (10 x 0,8 cm) equilibrada con el mismo amortiguador. Una solución (2,3 ml) de la enzima modificada (2 mg; $n_H=1,2$, $K_i=25 \mu$ M, $R=2,1$) se aplicó a una columna de sefarosa-azul (3,0 x 0,9 cm) equilibrada con el amortiguador antes mencionado. Se colectaron fracciones de 0,55 ml con un flujo de 20 ml/hora. La columna se lavó y en la fracción indicada por la flecha se conectó la elución de la enzima retenida por la resina con AMP 0,2 mM en el mismo amortiguador. La actividad enzimática se midió por el ensayo de formación de Pi, en presencia de K⁺ 150 mM. b, La enzima (40 μ M) fue modificada con NaNCO 150 mM en forma similar a la descrita en a, excepto por la presencia de Fru-1,6-P₂ 0,2 mM y fue filtrada en la columna de Sephadex G-25. Una muestra (2 ml) de la enzima carbamilada (3,2 mg; $n_H=1,2$, $K_i=104 \mu$ M, $R=1,1$) fue cromatografiada como se describió más arriba.

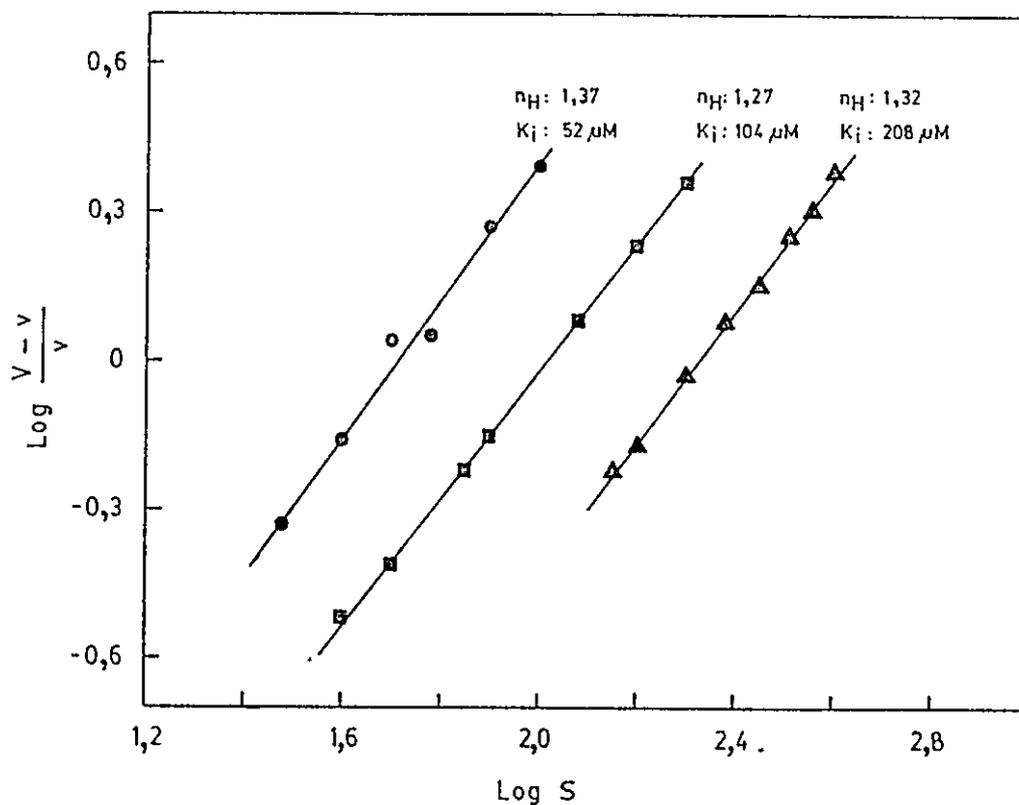


Figura 28. Gráficos de Hill para la inhibición por AMP de las diferentes fracciones de fructosa-1,6-bisfosfatasa modificada y separadas por cromatografía en sefarosa-azul. La modificación de la enzima (40 μM) fue llevada a cabo con NaNCO 150 mM por 60 min como se describe en la leyenda de la figura 27b. La inhibición por diferentes concentraciones de AMP se determinó con el ensayo fotocolorimétrico, en presencia de potasio. La fracción de enzima que se retuvo y fue eluida con AMP 0,2 mM se filtró a través de Sephadex G-25, como se describe en la figura 27a, para eliminar el AMP agregado durante la elución. Los símbolos representan: (■) enzima modificada antes de la cromatografía; (▲) enzima no retenida por la sefarosa-azul y, (●) enzima retenida por la resina y eluida con AMP 0,2 mM. Los parámetros cinéticos para la inhibición, obtenidos con cada fracción, aparecen en la figura.

trámeros conteniendo subunidades modificadas y nativas (figura 28).

5. Incorporación de [^{14}C]cianato a fructosa-1,6-bisfosfatasa.

Conociendo la radiactividad específica y la cantidad de proteína por ensayo, se hizo una estimación del número de moles de [^{14}C] KNCN unidos por mol de enzima en 60 min de modificación (tabla 6). De estos datos se sugirió que un residuo lisina estaría relacionado a la cooperatividad entre los sitios de AMP y otro, a la inhibición de la enzima por el nucleótido.

En los experimentos que se analizarán ahora, la reacción de modificación de la enzima se realizó con [^{14}C] NaNCN como se describió en Materiales y Métodos (pág. 43) y se determinaron, las pérdidas de cooperatividad entre sitios de AMP, de inhibición de Fru-P₂asa por AMP y la activación de la enzima por potasio.

En la Figura 29 se muestra la cinética de incorporación de [^{14}C] cianato en Fru-P₂asa, en presencia y ausencia de Fru-1,6-P₂. Como se observa, existe una rápida incorporación en los primeros 10 minutos de reacción, y posteriormente la velocidad de incorporación disminuye. Esta primera fase de incorporación corresponde a la modificación de los grupos involucrados en la activación por potasio. La fase más lenta corresponde a la reacción de grupos relacionados con la inhibición alostérica de Fru-P₂asa por

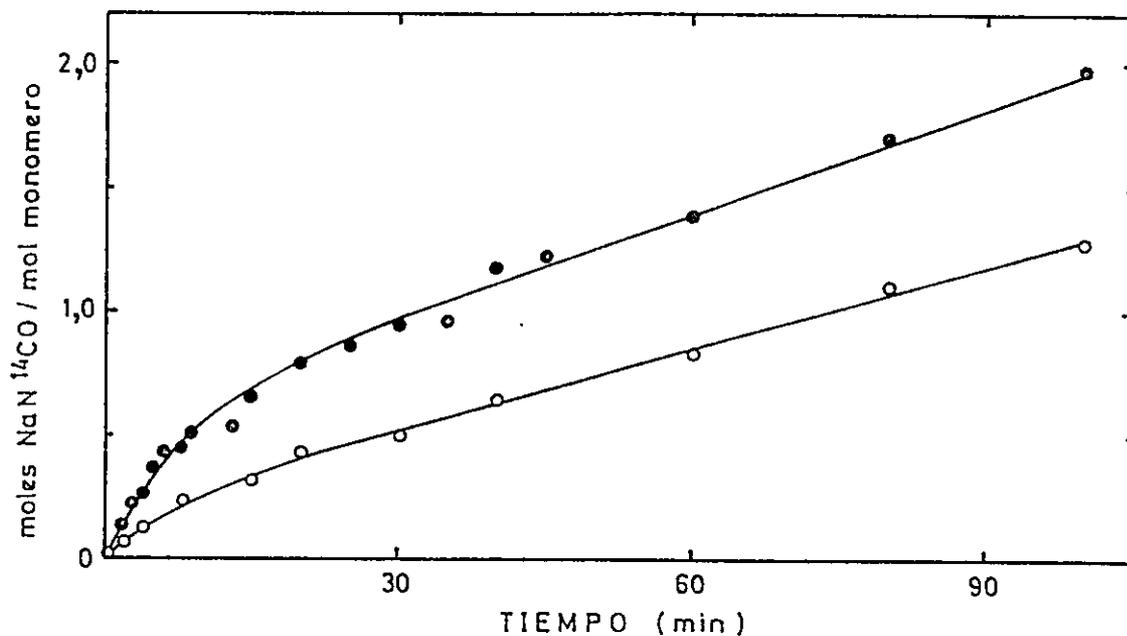


Figura 29. Incorporación de [¹⁴C] cianato en fructosa-1,6-bisfosfatasa. La enzima (10 μM) fue modificada con [¹⁴C] cianato de sodio 75 mM, en presencia (○) y en ausencia (●) de Fru-1,6-P₂ 25 mM. A los tiempos indicados se midió la radiactividad incorporada en la proteína. Detalles en Materiales y Métodos.

AMP (Herrera y col., 1981).

6. Determinación del número de residuos esenciales para la inhibición alostérica de Fru-P₂asa por AMP.

Con el propósito de correlacionar la pérdida de actividad con el número de residuos modificados en una determinada enzima, se han desarrollado métodos cinéticos y estequiométricos que otorgan información acerca del número y tipo de aminoácidos involucrados en la reacción de modificación, y que son esenciales para la mantención de la actividad de la enzima (Ray y Koshland, 1961; Tsou, 1962; Stevens y Colman, 1980; Horiike y col., 1984).

Con el objeto de establecer el número de residuos esenciales para la interacción cooperativa entre las subunidades y la inhibición de la Fru-P₂asa por AMP, se estudió la pérdida de cooperatividad y de inhibición por el nucleótido en función del número de residuos modificados, empleando el método de Tsou Chen-Lu (Tsou, 1962; Peterson y Knowles, 1972; Hinrichs y Eyzaguirre, 1982). En este método se grafica la actividad remanente ("a") elevada a un exponente ($a^{1/i}$), en función del número de residuos modificados; *i* representa el número de residuos esenciales. De acuerdo al método de Tsou Chen-Lu (1962), cuando el valor "i" coincide con el valor verdadero de residuos esenciales, se obtiene una línea recta al graficar $a^{1/i}$ versus el número de residuos modificados. En nuestro caso, "a" correspondería a la fracción

remanente de la propiedad de la enzima en estudio, por ejemplo, cooperatividad.

Los resultados mostrados en la Figura 29 fueron graficados para la pérdida de cooperatividad de acuerdo a Tsou (1962), como se muestra en la Figura 30. Se usaron en los gráficos valores de $i=1$, $i=2$, $i=3$, $i=4$ e $i=5$. La mejor línea recta para cada gráfico fue calculada por regresión lineal, y los coeficientes de correlación obtenidos fueron los siguientes: a) en el caso en que la incorporación se realizó en ausencia de Fru-1,6-P₂ (figura 30 a), para $i=1$, 0,985; para $i=2$, 0,998; para $i=3$, 0,995 y para $i=4$, 0,992; b) en el caso en que la incorporación se realizó en presencia de Fru-1,6-P₂ (figura 30 b), para $i=1$, 0,965; para $i=2$, 0,992; para $i=3$, 0,995; para $i=4$, 0,997; para $i=5$, 0,995. Esto sugiere que la mejor línea recta es: en ausencia del sustrato, para $i=2$ y en presencia de Fru-1,6-P₂, para $i=4$. Una prueba superior para determinar la mejor línea es fijar los puntos a expresiones polinomiales (Paterson y Knowles, 1972). Las Tablas 10 y 11 muestran el ajuste de los datos de las Figuras 30a y 30 b, respectivamente, a expresiones lineales, binomiales y trinomiales. Se puede observar en estas tablas que el mejor ajuste para una línea recta es nuevamente para $i=2$ e $i=4$, las cuales tienen el menor valor para la suma de los cuadrados de los residuos. En la Tabla 10 se evidencia que para $i=1$, $i=3$ e $i=4$ hay un mejoramiento de nueve, dos y tres veces, respectivamente, en el ajuste de la mejor expre-

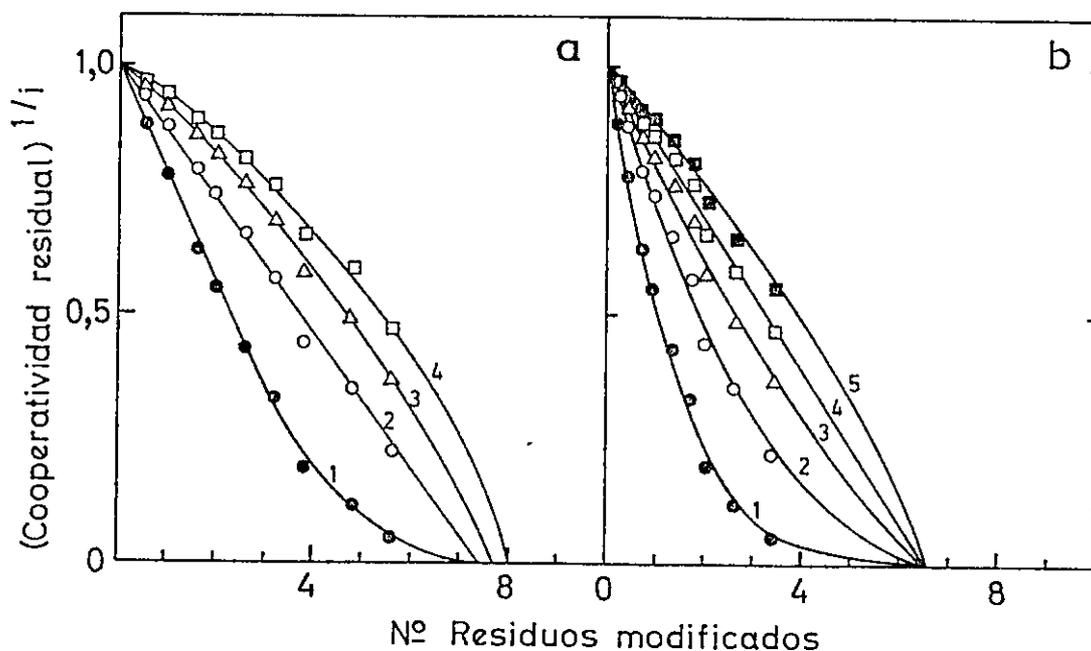


Figura 30. Gráfico de Tsou para la pérdida de cooperatividad hacia AMP de fructosa-1,6-bisfosfatasa modificada en presencia y ausencia de Fru-1,6- P_2 . El símbolo i representa el número de residuos esenciales para la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP a la enzima y los números corresponden a los valores de i utilizados. Los puntos corresponden a los valores experimentales obtenidos y las líneas sólidas a las curvas teóricas. Estas curvas son la representación gráfica de las ecuaciones binomiales para $i=1$, $i=2$, $i=3$, $i=4$ e $i=5$, respectivamente. El número de residuos modificados corresponde al número de residuos por mol de enzima. a, carbamilación en ausencia de Fru-1,6- P_2 . b, carbamilación en presencia de Fru-1,6- P_2 25 mM.

TABLA 10

Análisis estadístico de los datos obtenidos a partir
de los gráficos de Tseu en ausencia de Fru-1,6-P₂^a

Expresiones	Suma de los cuadrados de los residuos			
	i = 1	i = 2	i = 3	i = 4
linear	0,00359	0,00031	0,00046	0,00051
binomial	0,00041	0,00034	0,00021	0,00015
trinomial	0,00026	0,00029	0,00022	0,00017

	Parámetros para la mejor ecuación binomial			
	i = 1	i = 2	i = 3	i = 4
p	1,01999	1,01210	1,00593	1,00328
q	-0,27497	-0,13744	-0,08512	-0,05998
r	0,01788	-0,00076	-0,00514	-0,00612

^a Los datos obtenidos de los gráficos de Tsou para i=1, i=2, i=3 e i=4 (Figura 30a) se sometieron a un análisis de regresión polinomial, como se describe en Materiales y Métodos, Análisis de Resultados. Los parámetros p, q y r representan los coeficientes de la mejor ecuación binomial $a^{1/i} = p + qm + rm^2$ que se ajusta a los datos para i=1, 2, 3 y 4.

TABLA 11

Análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de los gráficos de Tsou en presencia de $Fru-1,6-P_2^a$

Expresiones	Suma de los cuadrados de los residuos.			
	i = 1	i = 2	i = 3	i = 4
linear	0,00838	0,00114	0,00042	0,00029
binomial	0,00102	0,00070	0,00046	0,00032
trinomial	0,00115	0,00078	0,00051	0,00035

	Parámetros para la mejor ecuación binomial			
	i = 1	i = 2	i = 3	i = 4
p	0,99359	1,00510	1,00379	1,00284
q	-0,53712	-0,30295	-0,20238	-0,15025
r	0,07655	0,02028	0,00333	-0,00267

^a Los datos obtenidos de los gráficos de Tsou para $i=1$, $i=2$, $i=3$ e $i=4$ (Figura 30b) se sometieron a un análisis de regresión polinomial como el descrito en la Tabla 10.

sión binomial sobre la expresión lineal, mientras no hay mejoramiento cuando $i=2$. En todos los casos, se observa poco mejoramiento cuando se ajusta a la expresión trinomial, obviando la necesidad de incluir polinomios mayores. Un análisis de los parámetros para la mejor ecuación binomial muestra que "r" es el menor (menos significativo) para $i=2$, apoyando también la aseveración que el mejor ajuste lineal es para $i=2$. A su vez un análisis similar de la Tabla 11 muestra que el menor mejoramiento en el ajuste a la expresión binomial y el menor valor de "r" se obtienen cuando $i=4$. Los resultados sugieren que la enzima posee un total de 7 a 8 residuos por tetrámero los cuales pueden reaccionar con cianato, en ausencia de Fru-1,6-P₂, siendo dos de ellos esenciales para la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP. En cambio en presencia del sustrato reaccionan entre 6 y 7 residuos/mol de enzima, siendo cuatro de ellos esenciales para la cooperatividad.

Con el objeto de establecer el número de residuos esenciales para la inhibición de la enzima por AMP, los datos se graficaron de acuerdo a Tsou Chen-Lu como se muestra en la Figura 31. Es evidente de la forma del gráfico que hay una modificación rápida de la proteína la cual no conduce a un cambio significativo de la inhibición por AMP. El número de moles de cianato/mol de proteína incorporados previo a una disminución apreciable de la afinidad de la enzima por AMP (< 5%) es cercano a dos. Esto implica que hay un número (presumiblemente entero) de grupos que

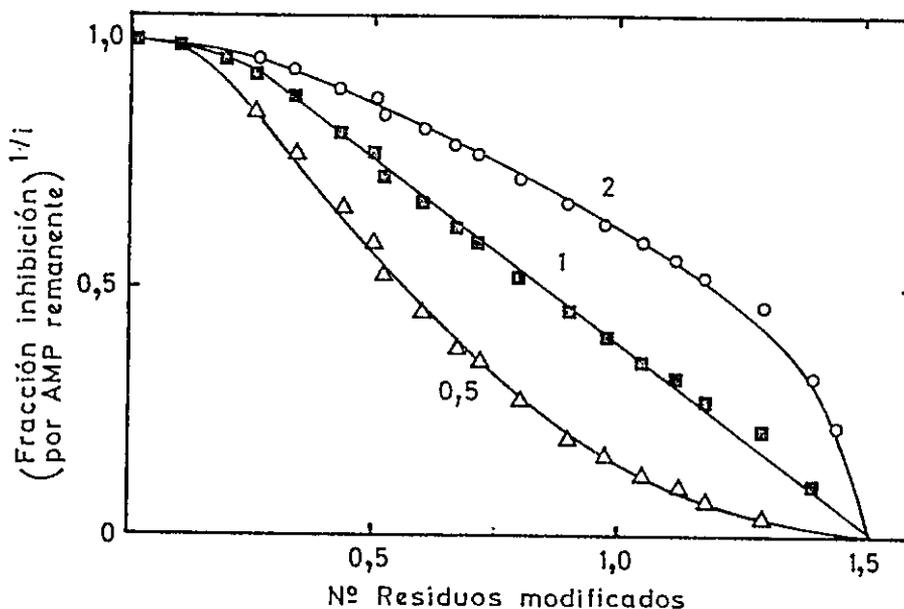


Figura 3.1. Gráfico de Tsou de la alteración de la afinidad de la enzima hacia AMP causada por modificación con cianato. Los datos de la figura corresponden a las determinaciones de incorporación de cianato de la enzima modificada en ausencia de Fru-1,6-P₂, presentados en la figura 29. El símbolo i representa el número de residuos esenciales para la inhibición de la enzima por AMP y los números corresponden a los valores de i empleados en el cálculo. Los puntos corresponden a los valores experimentales obtenidos y las líneas sólidas representan las mejores ecuaciones binomiales. El número de residuos modificados corresponde al número de residuos por mol de monómero.

reaccionan rápidamente los cuales no son esenciales, y que una modificación subsiguiente, de una segunda familia de grupos que reaccionan más lentamente, conduce a una pérdida de afinidad de la enzima por AMP. Un análisis estadístico de los datos, similar al realizado para la pérdida de cooperatividad, mostró que el mejor ajuste lineal era para $i=4$. Esto sugiere que la enzima posee alrededor de 6 residuos por tetrámero que pueden reaccionar con cianato en estas condiciones, y cuatro de ellos son esenciales para la inhibición de Fru-P₂-asa por AMP. Resultados similares se obtuvieron al utilizar los datos de incorporación obtenidos al remodelar con [¹⁴C] cianato un derivado Fru-P₂asa-cianato el cual presentaba similares características a la enzima nativa, con la excepción que no mostraba interacción entre los sitios de unión del nucleótido ($n_H=1,1$) (Slebe y col., 1983 a). En relación a los residuos que reaccionan rápidamente, éstos corresponden a la primera fase de la incorporación (primeros 10 minutos) y están relacionados a la pérdida de activación por K⁺ (Herrera y col., 1981). Como se verá en la sección Efecto del cianato de sodio sobre la activación de la Fru-P₂asa por potasio, a los 10 min de reacción con cianato de sodio (≥ 50 mM) queda una activación por K⁺ remanente inferior a 10%.

LOCALIZACION PRELIMINAR DE RESIDUOS LISINA DEL
SITIO ALOSTERICO PARA AMP

1. Análisis de péptidos producidos por digestión de los derivados [^{14}C]cianato-enzima con subtilisina.

Hemos demostrado que la carbamilación de la Fru- P_2 asa en presencia de Fru-1,6- P_2 conduce a la obtención de una enzima sensible al inhibidor AMP, pero la cual no muestra interacción entre los sitios del nucleótido y, además, que la remodelación de este derivado Fru- P_2 asa-cianato produce una disminución en la sensibilidad al AMP. Se usó este procedimiento para marcar la proteína y el derivado Fru- P_2 asa-cianato con [^{14}C]cianato.

Para localizar los residuos lisina de la región de la Fru- P_2 asa involucrada en la interacción cooperativa entre los sitios de AMP y del sitio de unión del nucleótido, los derivados [^{14}C]cianato-enzima obtenidos en las modificaciones selectivas fueron tratados con subtilisina, y los fragmentos de la hidrólisis se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Tres preparaciones de Fru- P_2 asa fueron examinadas, una modificada con [^{14}C]cianato en presencia de Fru-1,6- P_2 (marca en residuo relacionado a cooperatividad), la segunda obtenida por remodelación con [^{14}C]cianato de un derivado

Fru-P₂asa-cianato (marca en residuo relacionado a la afinidad por AMP), y la tercera modificada en presencia de Fru-1,6-P₂ y AMP (marca inespecífica). En esta última condición se incorporan alrededor de 2,5 moles de cianato por mol de enzima sin que se alteren los parámetros cinéticos que se miden (n_H y $R \geq 2,1$; $K_i \approx 25\mu M$). En la enzima modificada en presencia de Fru-1,6-P₂ (derivado I), se encontró que alrededor del 60% de la radiactividad estaba asociada a la proteína-S y el 40% al péptido-S (figura 32). En la enzima remodificada (derivado II), la marca en el péptido-S disminuyó a nivel basal (14%), mientras que en la proteína-S se encontró la mayor parte de la radiactividad (83%); similarmente, en presencia de Fru-1,6-P₂ y AMP se encontró radiactividad asociada sólo a la proteína-S (97%). De estos resultados se podría inferir que el péptido-S contiene un residuo lisina asociado con la interacción cooperativa entre los sitios de unión del AMP, mientras que la proteína-S contiene un residuo lisina asociado con el sitio de unión del nucleótido.

2. Aislamiento de los péptidos que contienen la marca del sitio alostérico y de la región relacionada a la cooperatividad.

Con el propósito de aislar péptidos de menor tamaño que incluyeran el sitio de unión de AMP y el residuo involucrado en la interacción cooperativa entre estos sitios, los derivados [¹⁴C]-cianato-enzima carboximetilados fueron digeridos con tripsina

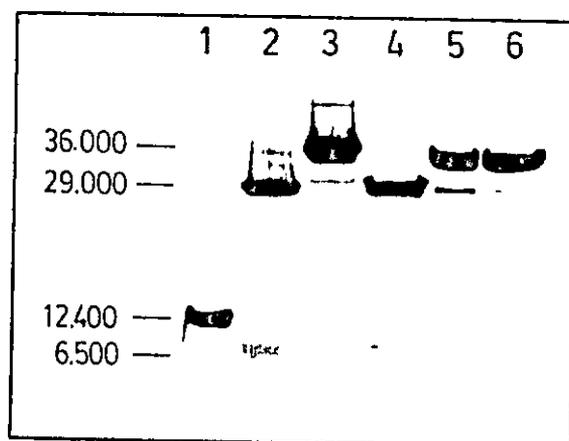
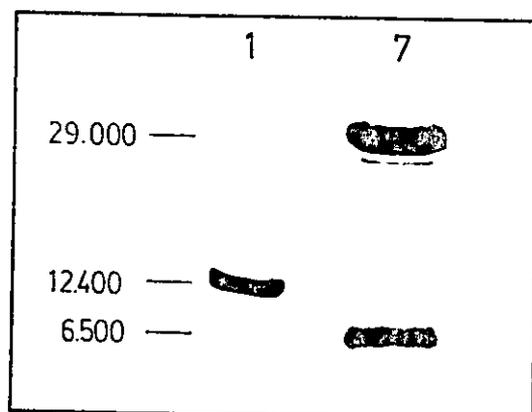
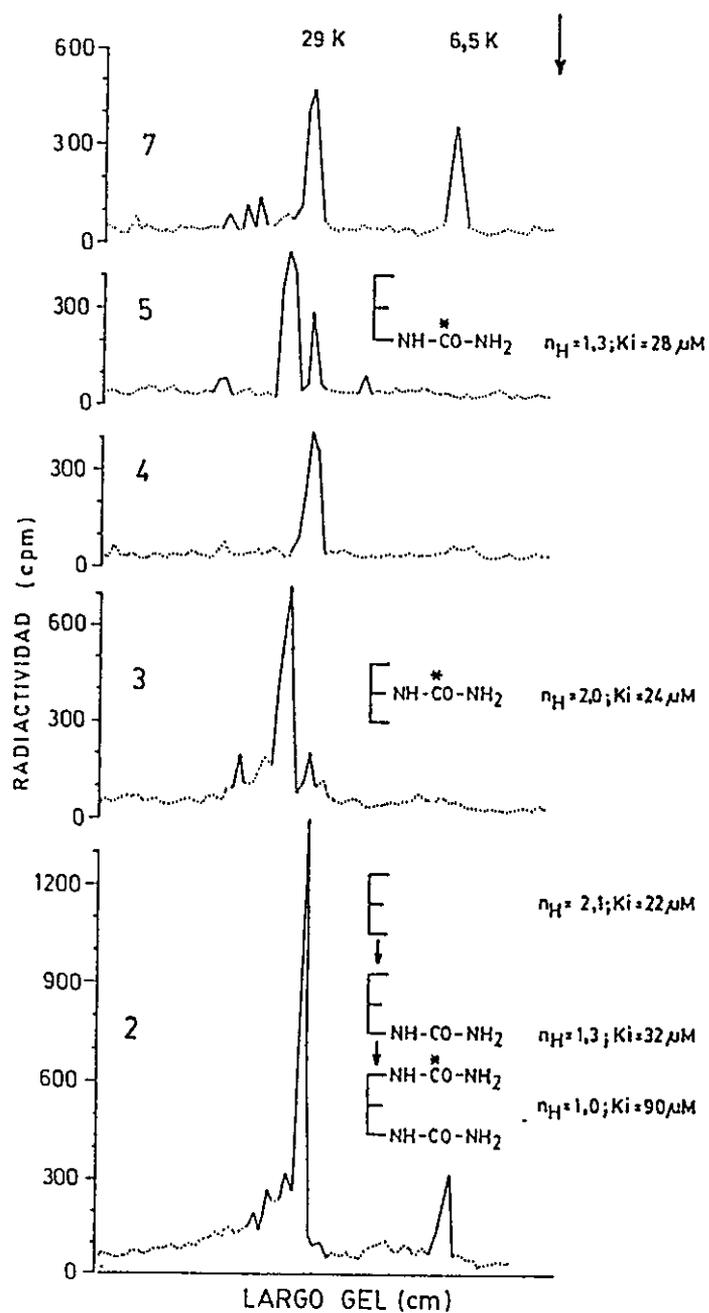


Figura 32. Leyenda en la página siguiente.

Figura 32. Efecto del tratamiento de los diferentes derivados [^{14}C]cianato-enzima con subtilisina. Los derivados [^{14}C]cianato-enzima (DI, DII) preparados como se describe en la leyenda de las figuras 33 y 37, fueron incubados con subtilisina (250 : 1) en acetato de amonio 0,1 M pH 6,5, EDTA 0,1 mM, por 3 h a 24°. La digestión se detuvo por adición de HCOOH 45% y las soluciones se liofilizaron. El derivado III (marca inespecífica) fue preparado y procesado en forma similar al derivado I, excepto que la mezcla de modificación contenía Fru-1,6-P₂ y además AMP 2 mM. **Lado derecho,** alícuotas de los derivados radiactivos fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en una placa con gradiente de acrilamida (10-20%) como se describió en Materiales y Métodos. Se indican los pesos moleculares de la Fru-P₂asa (subunidad), proteína-S, citocromo c y del péptido-S. Surco 1, citocromo c; surco 2, derivado II tratado con subtilisina; surco 3, derivado III; surco 4, derivado III tratado con subtilisina; surco 5, derivado I sin hidrolizar; surco 6, Fru-P₂asa sin modificar; surco 7, derivado I tratado con subtilisina. **Lado izquierdo,** los surcos radiactivos se cortaron transversalmente en segmentos de 2 mm y se les determinó la radiactividad presente. E, esquematiza a la enzima que forma los tres derivados radiactivos diferentes.

(ver Materiales y Métodos) y los fragmentos separados mediante dos procedimientos: a) cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-25) seguida de una cromatografía de intercambio iónico (SP-Sephadex C-25); b) cromatografía y recromatografía en una columna HPLC de fase reversa (detalles en Materiales y Métodos pags. 49-50).

La separación de los péptidos obtenidos a partir del derivado I en una columna de Sephadex G-25 mostró varios picos de proteína con la mayoría de la radiactividad en un componente principal (figura 33), el cual fue reunido (fracciones 120-140) y liofilizado. Cromatografía de este material en una columna de SP-Sephadex mostró que la mayor parte de la radiactividad estaba asociada con el componente (DI-SP \bar{V}) que eluyó a pH 5,0 (figura 34).

Por otro lado, los fragmentos trípticos del derivado I (DI) fueron separados por cromatografía líquida de alta presión (figura 35). El pico radiactivo principal era reunido, secado y recromatografiado en la misma columna, en el sistema TFA-acetonitrilo (Materiales y Métodos, pág.50). El perfil de elución (figura 36) mostró dos componentes peptídicos principales, uno de los cuales tenía asociada la radiactividad (DI-HPII).

Los fragmentos trípticos del derivado II (DII) fueron procesados en forma similar. Los resultados obtenidos con el procedimiento a) fueron comparables a los obtenidos con DI, mostrando la columna de SP-Sephadex que la mayor parte de la radiactividad

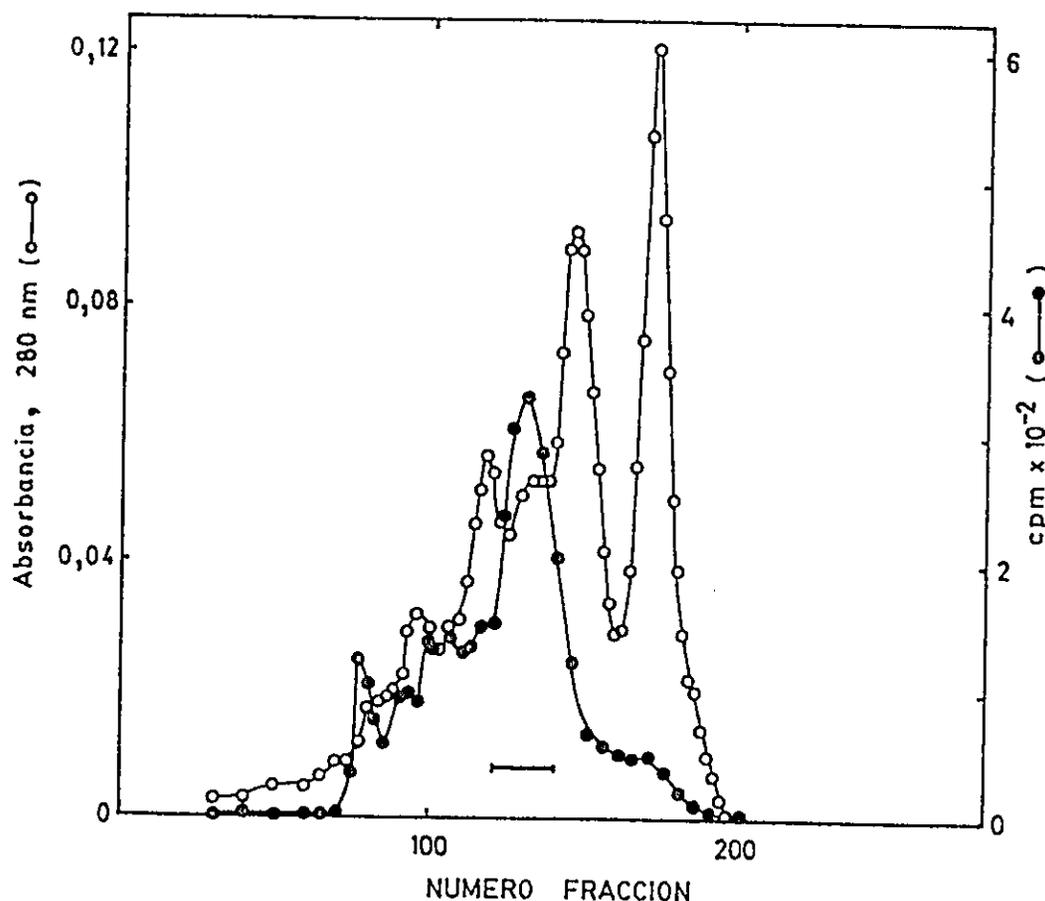


Figura 33. Cromatografía en Sephadex G-25 de los productos de la hidrólisis con tripsina de la enzima que no presenta cooperatividad entre los sitios de unión de AMP. La enzima (170 μM) se incubó con $[^{14}\text{C}]$ cianato de sodio 100 mM (0,26 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) en presencia de Fru-1,6-P₂ 25 mM por 60 min, al cabo de los cuales el derivado formado (derivado I) se separó de los demás componentes mediante filtración en una columna de Sephadex G-50 (25 x 1,2 cm) equilibrada con Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 0,1 mM. El derivado I radiactivo fue reducido, carboximetilado e hidrolizado con tripsina. Los péptidos radiactivos resuspendidos en urea 6 M, ác. acético 5%, fueron aplicados a una columna de Sephadex G-25 (100 x 1,8 cm) equilibrada y eluida con ácido acético 5%. Se colectaron fracciones de 2 ml a un flujo de 30 ml/h, en las cuales se midió absorbancia a 280 nm y radiactividad en alícuotas de 100 μl . La barra indica fracciones (120-140) reunidas y liofilizadas. Otros detalles en Materiales y Métodos.

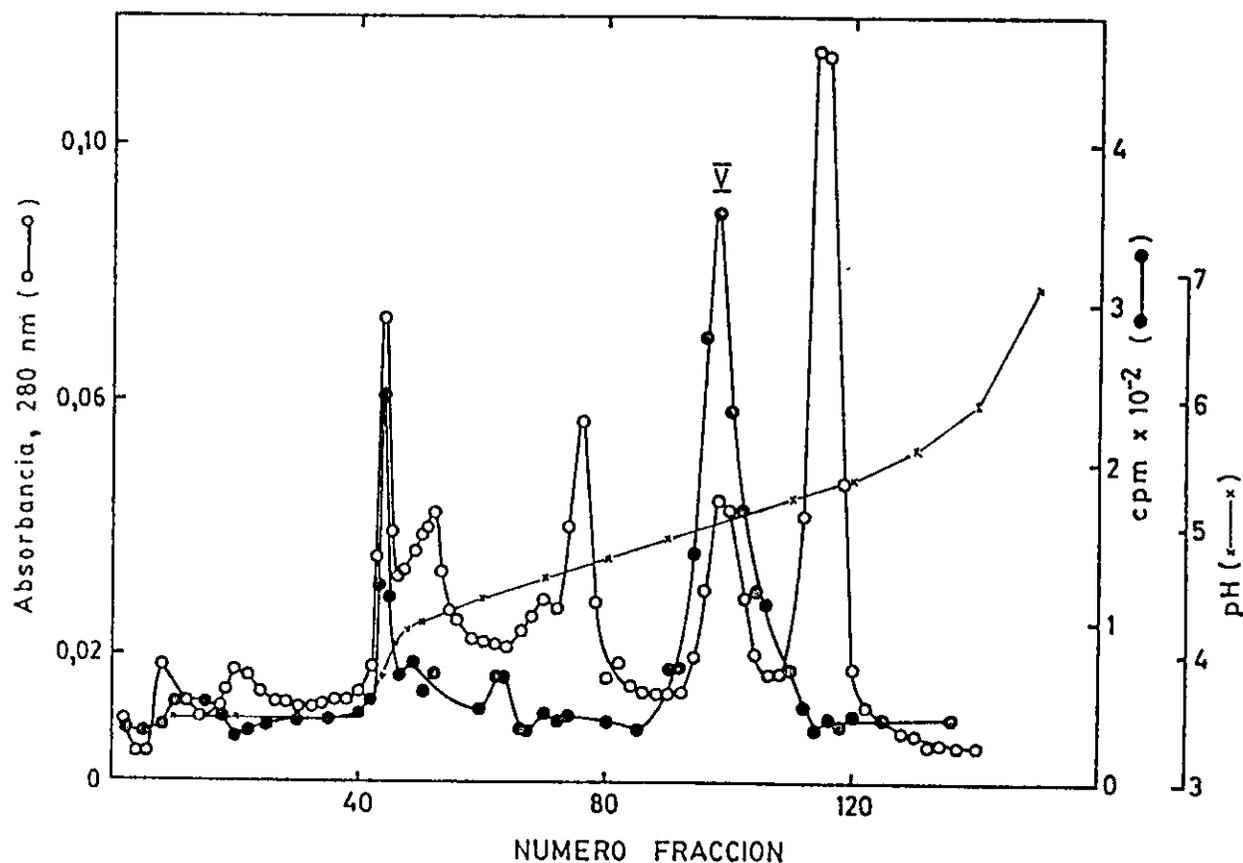


Figura 34. Cromatografía en SP-Sephadex de la fracción radiactiva proveniente de la columna de Sephadex G-25. Se utilizó una columna de 16 x 1,8 cm equilibrada con acetato de amonio 0,1 M pH 3,5. A ella se aplicó el liofilizado, resuspendido en el mismo amortiguador, proveniente de la etapa de Sephadex G-25. Una vez aplicada la muestra se lavó con 60 ml del mismo amortiguador y se eluyó con una gradiente de acetato de amonio desde 0,1 M pH 3,5 a 0,2 M pH 8,5 (150 ml de c/u). Se colectaron fracciones de 3 ml a un flujo de 48 ml/h. La radiactividad se midió en alícuotas de 100 μ l de las fracciones.

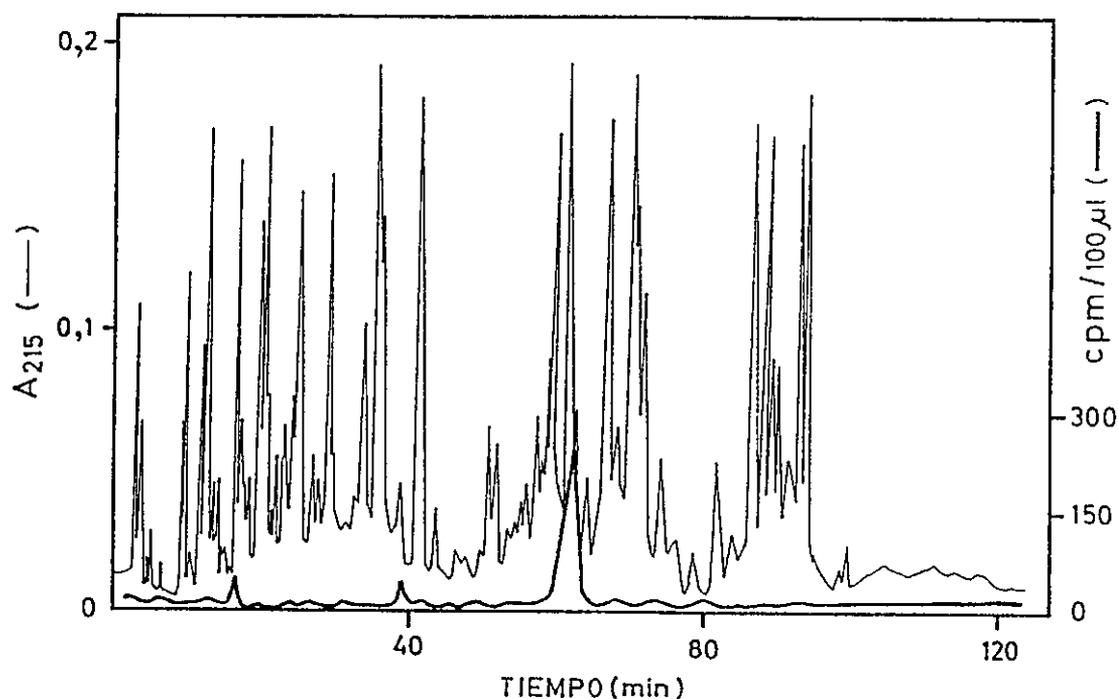


Figura 35. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los péptidos trípticos provenientes del derivado I que contiene [^{14}C]homocitrulina. El digerido tríptico del derivado I, obtenido en forma similar a la descrita en la leyenda de la figura 33, fue liofilizado y disuelto en 1,0 ml de fosfato de sodio 54,4 mM pH 2,85. Los péptidos fueron separados con una columna Liquid Pack C_{18} (5 μm , 25 x 0,4 cm) equilibrada en el mismo amortiguador. La elución se realizó con un gradiente de este amortiguador y acetonitrilo, recolectándose fracciones de 1 ml (1 min) en las cuales se determinó absorbancia a 215 nm y radiactividad. Otros detalles en Materiales y Métodos.

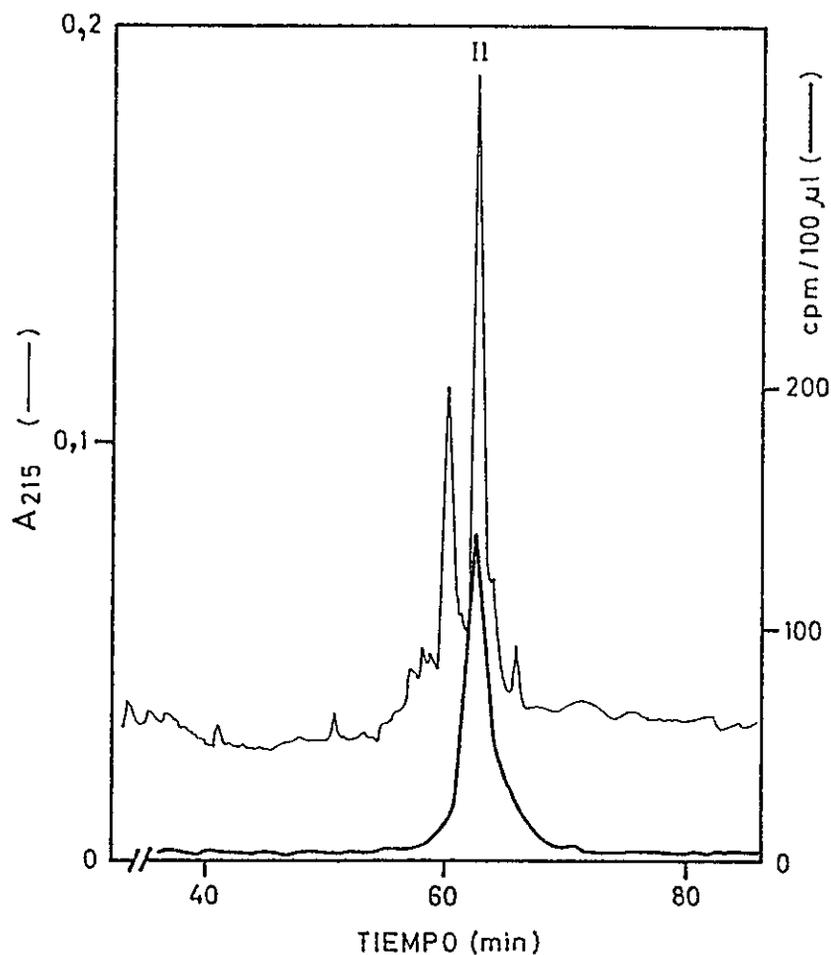


Figura 36. Recromatografía en HPLC de los péptidos que contienen [^{14}C]homocitrulina y que están relacionados con la cooperatividad hacia AMP. El material que contenía los péptidos parcialmente purificados (c.f. figura 35), secado en un evaporador rotatorio, fue disuelto en 0,5 ml de ácido trifluoroacético al 0,1% y sometido a una recromatografía en la misma columna descrita en la figura 35, pero equilibrada en ác. trifluoroacético 0,1%. La elución se realizó con un gradiente lineal de acetonitrilo 0 a 70% en ác. trifluoroacético 0,1%.

estaba asociada a un componente (DII-SPV) que eluía a pH 5,1 (Resultados que no se muestran). Los resultados del procedimiento b) se muestran en las Figuras 37 y 38. El perfil de la recromatografía (figura 38) mostró tres componentes peptídicos principales con la radiactividad asociada sólo a uno de ellos (DII-HPIII).

3. Evidencias de la reacción de cianato con residuos lisina.

La irreversibilidad tanto de la incorporación de [^{14}C] cianato a la Fru-P₂asa como de los efectos causados por la modificación sobre la inhibición alostérica de la enzima por AMP, fueron consistentes con la presencia de homocitrulina. La identificación de carbamillisina fue confirmada al someter a los hidrolizados ácidos de los derivados DI y DII a cromatografía en papel (Materiales y Métodos, pag.56). El cromatograma mostró varias manchas positivas a la tinción con ninhidrina, una de las cuales presentó radiactividad migrando con un R_f similar al de la homocitrulina usada como referencia (Resultados no mostrados), y en forma equivalente a lo previamente descrito (Slebe y Martínez-Carrión, 1976). Además, fue identificada en los análisis de amino ácidos por su tiempo de elución, al compararlo con una solución patrón de homocitrulina, y a que la radiactividad aparecía en las fracciones correspondientes al de este derivado. Finalmente, se corroboró en los análisis de secuencia que se describen subsiguientemente.

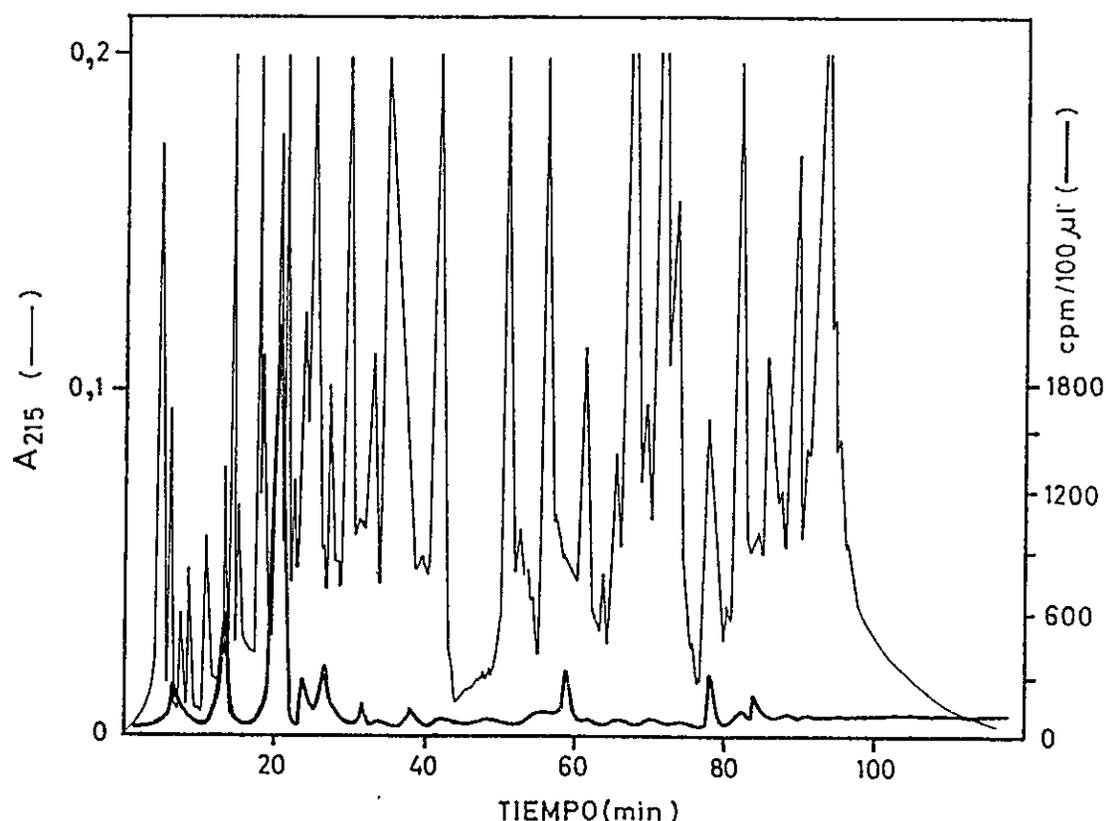


Figura 37. Purificación de los péptidos trípticos provenientes del derivado II que contienen [^{14}C] homocitrulina, por HPLC
 El derivado I (130 μM), obtenido como se describió en la leyenda de la figura 33, excepto que no se usó NaNCO radiactivo, se remodificó con [^{14}C] cianato 150 mM (0,26 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) en presencia de Fru-1,6- P_2 250 μM por 60 min a 37°, al cabo de los cuales el derivado formado (derivado II) se separó de los demás componentes mediante filtración en una columna de Sephadex G-50 (30 x 1,2 cm) equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM. El digerido tríptico del derivado II fue liofilizado y disuelto en 1,0 ml de fosfato de sodio 54,4 mM pH 2,85. Los péptidos fueron separados en forma similar a la descrita en la figura 35. Otros detalles en Materiales y Métodos.

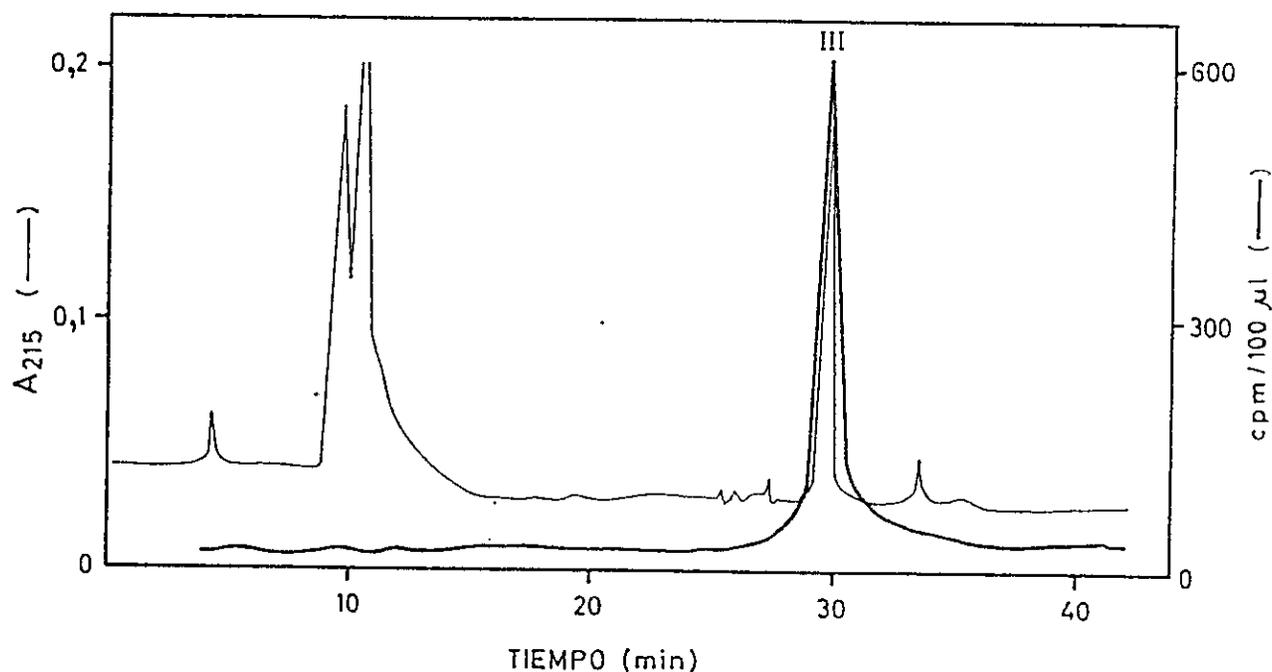
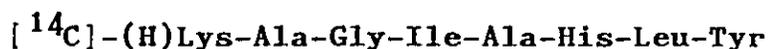


Figura 38. Recromatografía en HPLC de los péptidos que contienen [^{14}C]homocitrulina y que están relacionados con la inhibición por AMP. El material que contenía la mayor parte de la radiactividad (fracciones 18-22, c.f. figura 37), secado en un evaporador-concentrador rotatorio a baja presión, fue disuelto en 0,5 ml de ácido trifluoroacético 0,1% y recromatografiado en las mismas condiciones descritas en la figura 36. Otros detalles se dan en Materiales y Métodos.

4. Localización del residuo lisina relacionado a la cooperatividad.

La localización del residuo lisina involucrado en la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP se estableció preliminarmente durante el análisis de aminoácidos (composición y secuencia) del péptido radioactivo DI-HPII (Slebe y col., 1982). Su localización, basada inicialmente por su homología (tabla 12) con los péptidos T1c-CT2 de la enzima de hígado de conejo (Botelho y col., 1977) y Tc-5 de la enzima de riñón de cerdo (Marcus y col., 1981) descritos en los estudios de la estructura del péptido-S, fue corroborada por el análisis de secuencia (tabla 13). Ocho etapas de degradación manual de Edman mostraron que la radiactividad atribuida a homocitrulina apareció en el extracto de acetato de etilo-benceno, después del primer ciclo, y dió la secuencia:



En las etapas 9-11 no se obtuvo ningún PTH-amino ácido identificable. Análisis de los péptidos DI-SP $\bar{\text{V}}$ y DII-SP $\bar{\text{V}}$, en cuanto a aminoterminal, carboxilo terminal y dansil péptidos, revelaron que no estaban puros, por lo que fueron recromatografiados en HPLC con el sistema TFA-acetonitrilo (Resultados que no se muestran). La composición y secuencia del material radiactivo pro-

TABLA 12

Composición de aminoácidos de los péptidos radiactivos DI-SPV
y DI-HPII obtenidos por hidrólisis triptica ^a

Aminoácido	nmoles		N° residuos			
	DI-SPV	DI-HPII	DI-SPV ^b	DI-HPII ^b	T1c-cT2 ^c	Tc-5 ^d
Asp	27,6	1,09	0,8	0,7		
Thr	15,5	0,38	0,4	0,2		
Ser	28,1	0,85	0,8	0,6		
Glu	29,2	0,87	0,8	0,6		
Gly	33,8	1,82	1,0(1)	1,2(1)	1,2(1)	2,3(2)
Ala	53,3	2,47	1,5(2)	1,6(2)	1,6(2)	3,3(3)
[¹⁴ C]Lys	26,3	0,93	0,8	0,6		
Ile	37,4	1,32	1,1(1)	0,9(1)	0,9(1)	2,0(2)
Leu	34,6	1,56	1,0(1)	1,0(1)	1,2(1)	1,3(1)
Tyr	46,7	1,49	1,3(1)	1,0(1)	0,8(1)	1,0(1)
His	19,5	1,26	0,6(1)	0,8(1)	1,0(1)	1,0(1)
Lys ^e	29,3	1,04	0,9(1)	0,7(1)		0,3(1)

^a Valores no corregidos por pérdida durante la hidrólisis. En paréntesis valores enteros estimados, aquellos menores que 0,2 residuos se consideraron como cero.

^b Valores estimados en base a residuos leucina.

^c Botelho y col., 1977.

^d Marcus y col., 1981.

^e La recuperación de lisina a partir de homocitrulina varió entre un 20 a 30%.

TABLA 13

Identificación y cuantificación de las feniltiohidantoinas
removidas por degradación manual de Edman del péptido DI-HPII^a

Etapa	Aminoácido	Recuperación	Posición en la secuencia ^b
		nmoles	
1	[¹⁴ C]Lys	2,5	50
2	Ala	2,4	51
3	Gly	2,0	52
4	Ile	2,6	53
5	Ala	3,3	54
6	His	0,6	55
7	Leu	0,9	56
8	Tyr	0,8	57

^a El péptido se preparó como se describe en la leyenda de la figura 36. La cantidad de muestra sometida al análisis de secuencia fue de alrededor de 4 nmoles. El procedimiento se describe en Materiales y Métodos.

^b La posición en la secuencia está basada en homología con una región correspondiente en la enzima de riñon de cerdo (Marcus y col., 1981) y de hígado de conejo (Botelho y col., 1977). La identificación se realizó mediante HPLC. La degradación mas alla de la etapa 8 fue infructuosa.

veniente de la recromatografía del DI-SP \bar{V} (DI-SP \bar{V} -2), mostró resultados equivalentes a los obtenidos con el péptido DI-HPII.

Los resultados indican que la [^{14}C] homocitrulina correspondería al residuo lisina en posición 50 (Lys-50), y la región de la proteína comprometida en la interacción cooperativa entre los sitios de unión del AMP sería el extremo terminal (Lys-50-Ala-60) del péptido-S.

5. Localización del residuo lisina del sitio de unión de AMP.

La composición de aminoácidos del componente radiactivo de la Figura 38 (DII-HPIII) mostró una mezcla de dos péptidos en una razón de a lo menos 10:1 (tabla 14), lo que permitió asignarle un tamaño de 9 a 10 residuos y determinar su secuencia (Slebe y col., 1982 a). Degradación manual de aproximadamente 10 nmol de este material por 9 ciclos reveló que el residuo aminoterminal era alanina (tabla 15), y su secuencia mostró ser:



La radiactividad atribuida a homocitrulina apareció en los extractos de acetato de etilo-benceno después del segundo ciclo ($\sim 63\%$) y del tercer ciclo ($\sim 37\%$). Esto podría deberse a una remoción parcial de las feniltiohidantoínas en la degradación manual e indujo a postular (Slebe y col., 1982 a) en un inicio,

TABLA 14

Composición de aminoácidos del péptido radiactivo
DII-HPIII obtenido por hidrólisis trípica^a

Aminoácido	nmoles	Nº de residuos ^b
Asp	0,24	
Thr	3,72	2,1 (2)
Ser	0,30	
Glu	0,26	
Gly	3,43	2,3 (2)
Ala	4,07	2,2 (2)
[¹⁴ C]Lys	1,04	0,6 (1)
Ile	0,08	
Leu	1,80	1,0 (1)
Tyr	0,07	
Phe	0,02	
His	0,08	
Lys	1,70	0,94 (1)
Arg	0,04	

^a Valores no corregidos por pérdida durante hidrólisis.

^b Valores estimados en base a residuos leucina. En paréntesis se muestran los valores aproximados al entero más próximo y aquellos valores menores a 0,2 residuos se consideraron como cero. La recuperación de lisina a partir de homocitrulina varió entre un 20 y un 30%.

TABLA 15

Identificación y cuantificación de las feniltiohidantoinas
removidas por degradación manual de Edman del péptido DII-HPIII^a

Etapa	Aminoácido	Recuperación
		nmoles
1	Ala	9,7
2	[¹⁴ C]Lys	5,3
3	Gly	4,7
4	Leu	5,9
5	Ala	7,9
6	Thr	1,4
7	Thr	1,2
8	Gly	1,1
9	Lys	1,0

^a El péptido se preparó como se describe en la leyenda de la figura 38. La cantidad de muestra analizada fue de alrededor de 10 nmoles utilizando el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. La identificación se realizó mediante HPLC.

que habrían dos residuos lisina adyacentes carbamilados aproximadamente en un 50%. Cabe hacer notar que los tiempos de elución del PTH-homocitrulina y del PTH-glicina se correspondían, por lo que la asignación de homocitrulina se hacía fundamentalmente por la presencia de radiactividad en los extractos.

La secuencia descrita presenta una alta homología (ver figura 2, Apéndice) con la región comprendida entre los residuos -44 (alanina) y -36 (lisina) del fragmento carboxilo terminal de la Fru-P₂asa de hígado de conejo (Xu y Col., 1982), y casi completa identidad (ver figura 1, Apéndice) con el péptido Ala-291-Lys-299 de la secuencia recién descrita para la enzima de riñón de cerdo (Marcus y col., 1982), excepto por el reemplazo de la lisina que se carbamila por glicina.

Estos resultados indicaron que el fragmento aislado era diferente al relacionado con la cooperatividad y que se encontraba próximo a la región que contiene el sitio activo (Slebe y col., 1982 a; 1983 a).

EFFECTO DEL CIANATO DE SODIO SOBRE LA ACTIVACION DE
FRUCTOSA -1,6-BISFOSFATASA POR POTASIO

1. Pérdida de la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+ y su reactivación.

La Figura 39 a muestra el efecto que tiene la modificación de la enzima con NaNCO 25 mM. Como se esperaba, se observó una pérdida rápida y total de la activación de la enzima por K^+ . La razón de las actividades (R) medidas en presencia y ausencia de K^+ 150 mM disminuyó desde su valor inicial 2,4 a 1,1. Por el contrario, cuando la enzima se modificó con KNCO 25 mM, en las mismas condiciones, sólo hubo una pérdida parcial de la activación (R disminuye desde 2,4 a 1,7; figura 39 a). Este resultado fue interpretado como una competencia entre los iones potasio y cianato por el sitio de acción del cation monovalente. Se requirieron mayores concentraciones del reactivo (KNCO 0,6M, cf. figura 16) para producir una pérdida total de la activación por K^+ .

Se describió con anterioridad (págs. 97, 102) que la pérdida de activación por cationes monovalentes era reversible, ya que la enzima carbamilada recuperaba su activación por K^+ cuando era sometida a diálisis exhaustiva o a filtración en geles. La Figura 39 b ilustra el curso de la recuperación de la activación por cationes monovalentes. El derivado enzima-cianato aislado

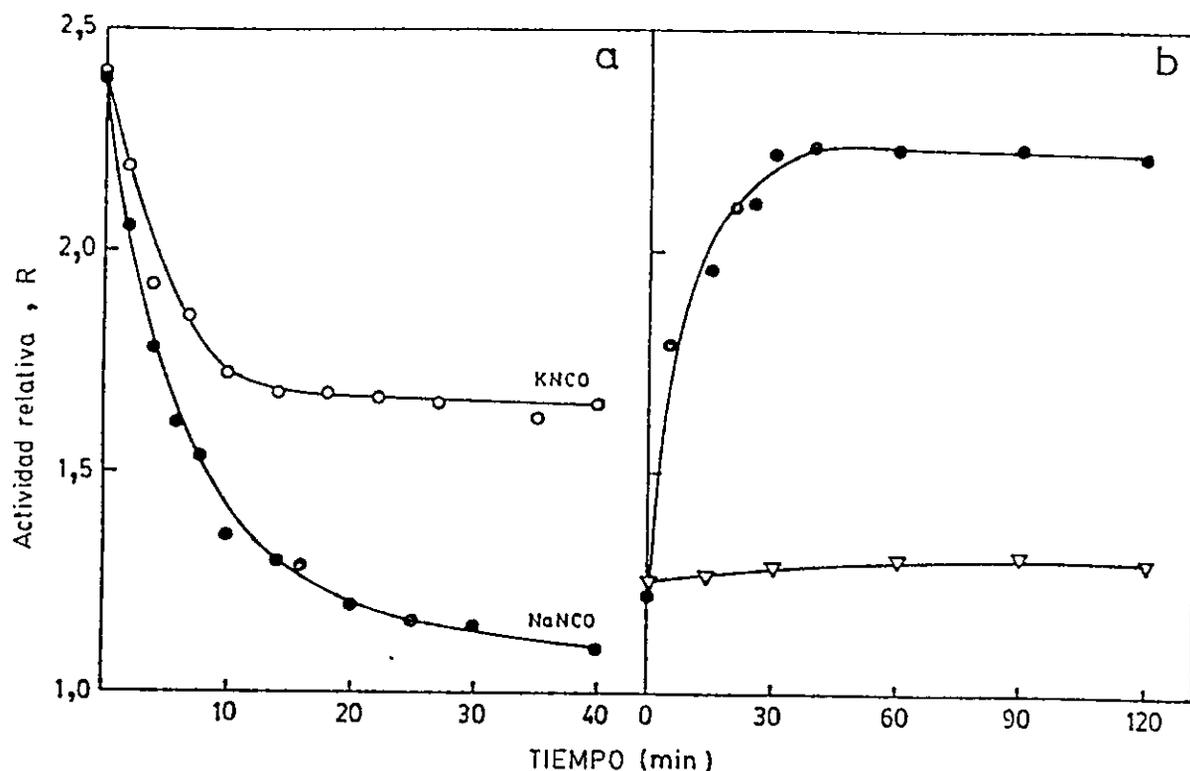


Figura 39. Efecto de la carbamilación de fructosa-1,6-bisfosfatasa sobre su activación por potasio. a, la enzima ($40 \mu\text{M}$) fue modificada con NaNCO ó KNCO 25 mM a 37° en Tris-HCl 20 mM pH $7,5$, EDTA $0,1 \text{ mM}$ (amortiguador A). A los tiempos señalados se tomaron alícuotas ($10 \mu\text{l}$) de la mezcla y la reacción se detuvo por dilución ($1/100$). La actividad enzimática se midió fotocolorimetricamente en presencia y ausencia de K^+ 150 mM . R, expresa la razón entre estas mediciones. Un valor de R de $1,0$ corresponde a la actividad específica ($11,5 \text{ U./mg}$) de la enzima nativa ensayada en ausencia de potasio. b, el complejo cianato-enzima, que no presenta activación por potasio, fue aislado como se describió en Materiales y Métodos. La reactivación del derivado se realizó por incubación del complejo ($25 \mu\text{M}$) en amortiguador A pero pH $8,0$ y a 37° (●). La actividad enzimática se midió como en a. Una muestra del derivado cianato-enzima fue mantenida a 4° en amortiguador A pero pH $7,0$ (▽).

que no era activado por K^+ , recobró su activación en 30 min de incubación a 37° y pH 8,0. Por otro lado, a 4° , pH 7,0 (figura 39 B, tabla 16) o pHs menores (Resultados que no se muestran), el complejo cianato-enzima fue estable. La velocidad de disociación del complejo depende, además, de la presencia en la mezcla de recuperación de ligandos y efectores de la enzima. En la Figura 40 se muestran los resultados obtenidos cuando la velocidad de disociación del complejo se determinó en presencia de Fru-1,6-P₂, AMP o KCl. Como se puede observar, estos compuestos hacen disminuir tanto la velocidad de disociación del complejo como su extensión.

Por lo tanto, es posible aislar un derivado de la enzima que no es activado por cationes monovalentes, en que la unión covalente formada puede descomponerse por incubación corta a 37° y pH levemente alcalino, lo cual sugiere que la reacción podría ocurrir con un residuo cisteína (Stark, 1964). Además, los datos indican que ninguno de los residuos lisina reactivos de Fru-P₂asa estaban comprometidos en la activación, pues la reacción con grupos amino debería conducir a la formación de un producto estable, como se ha demostrado con anterioridad.

2. Aislamiento de S-[¹⁴C]carbamilcisteína.

Evidencia directa de que la reacción de cianato con Fru-P₂asa era con un residuo cisteína, se obtuvo cuando se identificó

TABLA 16

Recuperación de la activación por potasio de fructosa
1,6-bisfosfatasa carbamilada^a

pH	T (°C)	R ^b
7,5	4	1,35
8,0	22	2,24

^a La carbamilación de la enzima (39 μ M) con NaNCO 25 mM se efectuó en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM a 37°. A los 30 min se aplicaron alícuotas (200 μ l) de la enzima carbamilada (R = 1,3) a columnas de Sephadex G-50 (30 x 1,2 cm) equilibradas en Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,1 mM a los pHs y temperaturas indicadas. Se recolectaron fracciones de 0,5 ml en las que se determinó actividad fotocolorimetricamente.

^b Razón entre las actividades medidas en presencia y ausencia de potasio.

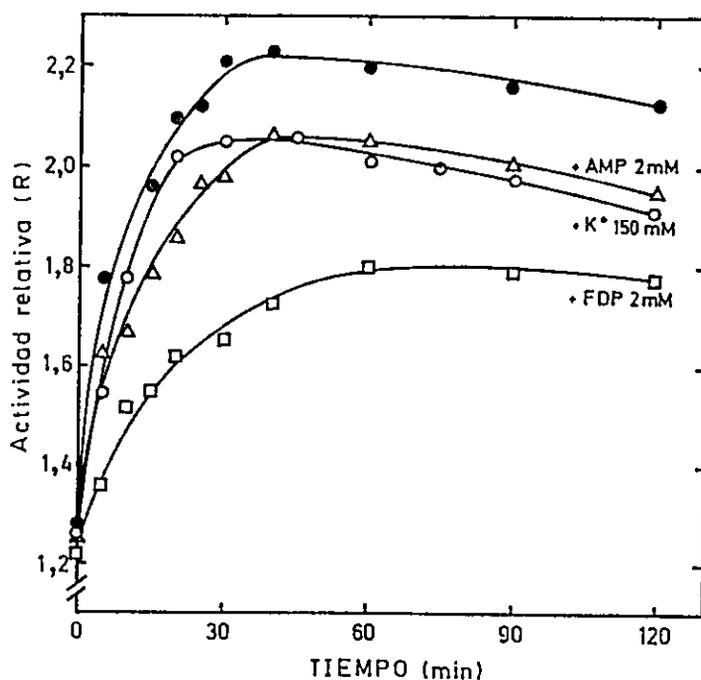


Figura 40. Efecto de ligandos de la enzima sobre la velocidad de disociación del complejo enzima-cianato que no presenta activación por K^+ . La enzima ($25 \mu\text{M}$) fue modificada con NaNCO 25 mM por 30 min , para eliminar la activación por potasio, como se describió en la figura 39. Se detuvo la reacción de carbamilación por filtración en una columna de Sephadex G-50 ($30 \times 1,2 \text{ cm}$), equilibrada y eluida con Tris-HCl 20 mM pH $7,5$, EDTA $0,1 \text{ mM}$ a 4° . La reactivación del derivado se realizó como se describe en la leyenda de la figura 39, excepto por la presencia de los ligandos que se indican. La actividad se determinó fotocolorimetricamente.

S- [^{14}C] carbamilcisteína en un hidrolizado del derivado [^{14}C] cianato-enzima con pronasa (Materiales y Métodos, págs. 47,48). La identificación preliminar se realizó mediante cromatografía en papel. Los resultados mostraron que la mayor parte de la radiactividad migró con un R_f de 0,17 cercano al R_f de S-carbamilcisteína (0,18) usada como referencia.

Para obtener una prueba definitiva de la presencia de S-carbamilcisteína en la enzima modificada, se digirieron 20 mg del derivado [^{14}C] cianato-enzima con pronasa, se evaporó a sequedad y se sometió a filtración en gel, en una columna de Biogel P-2 (figura 41). Se obtuvieron dos componentes radiactivos y ambos fueron analizados en un analizador de aminoácidos. El análisis de amino ácidos de la fracción II (figura 42) mostró un solo pico radiactivo, que correspondió al de S-carbamilcisteína con un tiempo de retención de 69 min, mientras que el análisis de la fracción I presentó solamente algunos picos no radiactivos (Resultados que no se muestran). La composición de la fracción I debería corresponder, principalmente, a una mezcla de oligopéptidos que no son eluidos del analizador de amino ácidos en las condiciones de corrida, lo que estaría de acuerdo al mayor peso molecular que mostraron en la columna de Biogel P-2 (figura 41).

Estos datos establecen que en la activación de la Fru-P₂asa por cationes monovalentes participan residuos cisteína altamente reactivos. Aunque se ha demostrado que la modificación de grupos sulfhidrilo podría doblar la actividad enzimática (De Maine

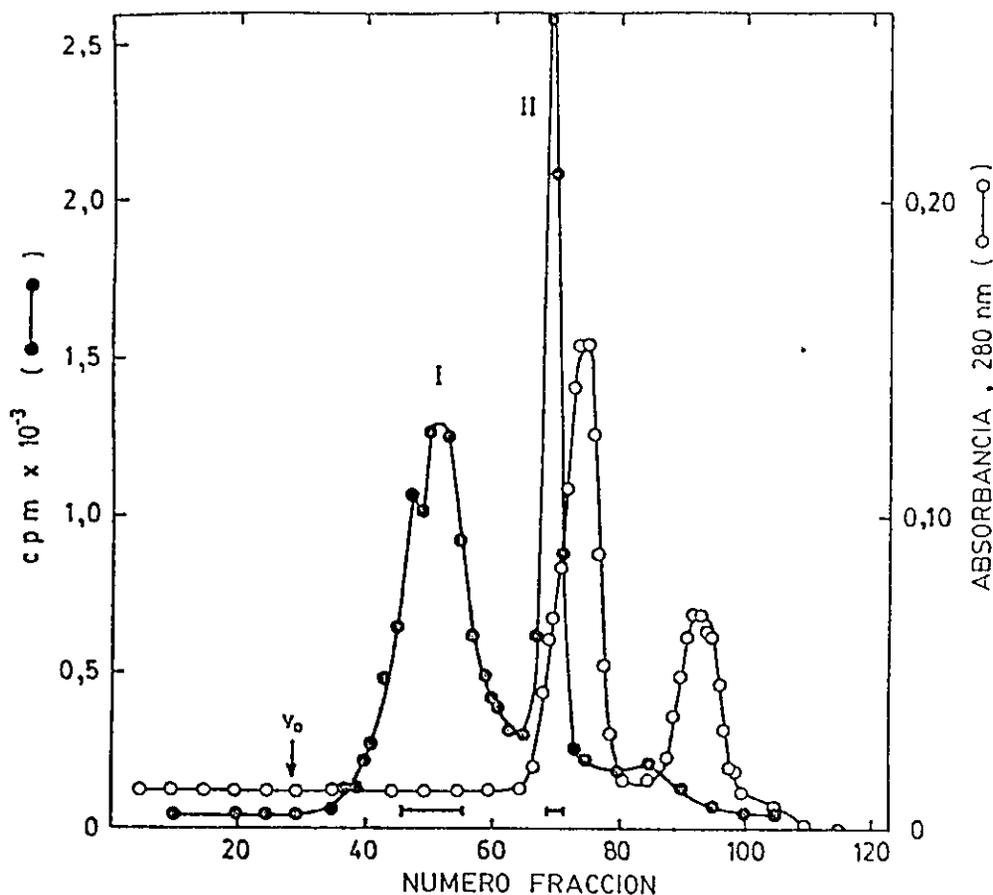


Figura 41. Separación en Biogel P-2, de los productos de digestión con Pronasa del derivado [¹⁴C]cianato-enzima. A una columna de Biogel P-2 (80 x 1,4 cm) equilibrada con amortiguador acetato de sodio 0,1 M pH 4,5, se aplicó una muestra (20 mg) de la mezcla de productos provenientes de un tratamiento con Pronasa por 14 h del complejo [¹⁴C]cianato-enzima que no presenta activación por potasio. Se colectaron fracciones de 1,2 ml y se tomaron alícuotas de 100 μ l para medir radiactividad. Las fracciones que contuvieron radiactividad, indicadas por las barras horizontales (45-55 y 68-71), fueron reunidas y liofilizadas. Otros detalles en Materiales y Métodos.

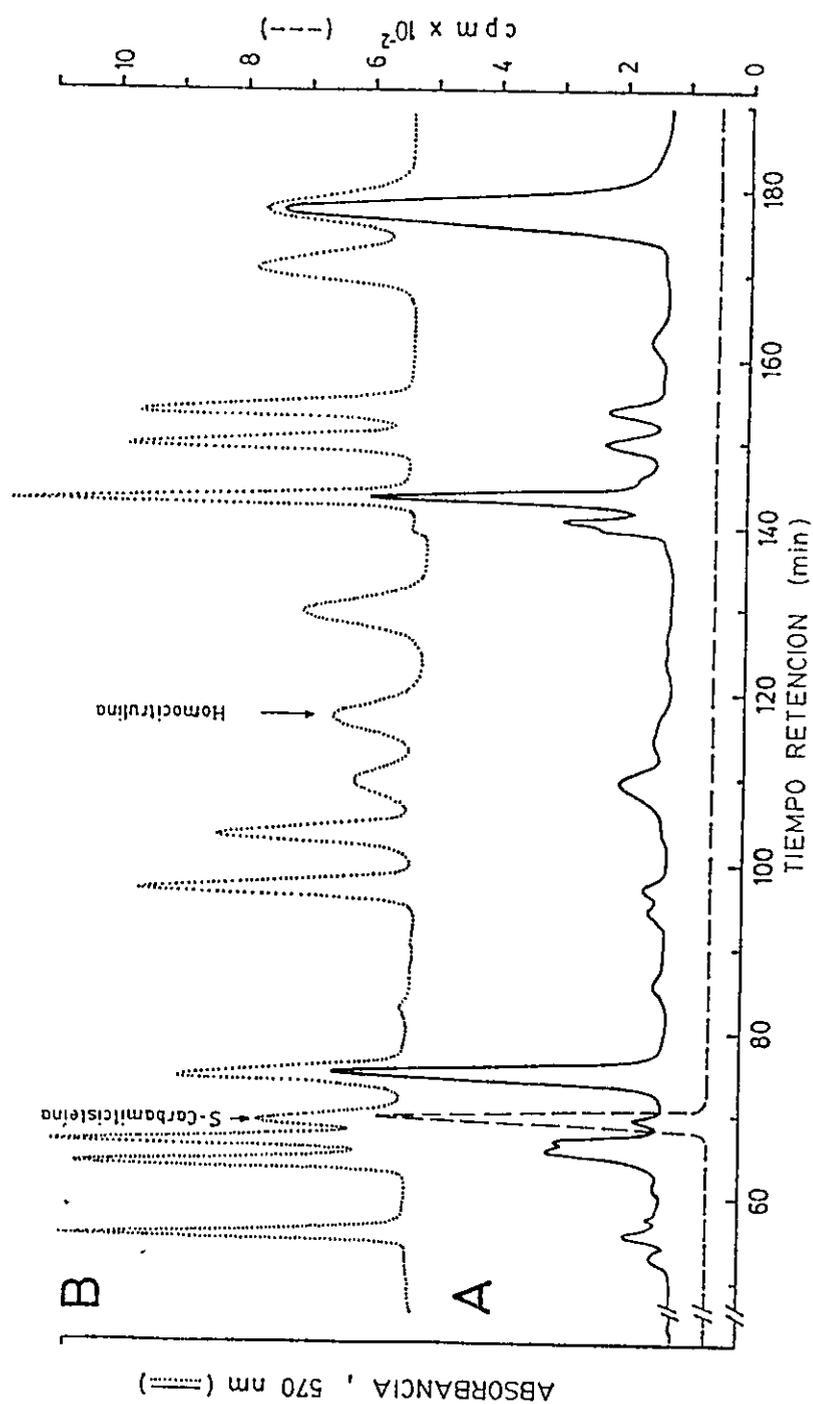


Figura 42. Identificación de S- ¹⁴C carbamilcisteína mediante análisis de aminoácidos A, Una muestra representativa del pico II de la figura 41 fue resuspendida en citrato de sodio 0,2 M pH 2,2 y aplicada al analizador de aminoácidos. Detalles aparecen en Materiales y Métodos. El efluente fue colectado y analizado para radiactividad. B, mezcla de calibración conteniendo 25 nmoles de cada aminoácido más S-carbamilcisteína y homocitrulina.

y Benkovic, 1980; para revisión, Benkovic y De Maine, 1982), ninguna relación se ha establecido con la activación de la enzima por cationes monovalentes.

3. Cinética de la pérdida de la activación por K^+ mediante carbamilación.

La pérdida de la activación por potasio de Fru- P_2 asa es dependiente de la concentración del agente modificador (figura 43 a). En el rango de concentraciones usado (5-75mM) la polimerización de cianato no es significativa (Stark, 1972). Como se observa en la Figura 43 a un aumento de la concentración de cianato se traduce en una mayor rapidez de pérdida de activación por potasio y se requiere, al menos, una concentración de cianato del orden de 25 mM para eliminar totalmente la activación por el catió n monovalente.

El gráfico semilogarítmico de la activación remanente en función del tiempo de modificación (figura 43 b) muestra que la cinética de pérdida de la activación observada es bifásica, y que cada fase es de pseudo primer orden con respecto a la concentración de enzima activa. La segunda fase es aproximadamente 4 veces más lenta que la primera y la tendencia es llegar a una pérdida total de la activación por potasio.

Este comportamiento bifásico podría deberse, entre otras, a alguna de las siguientes alternativas: a) existirían dos familias

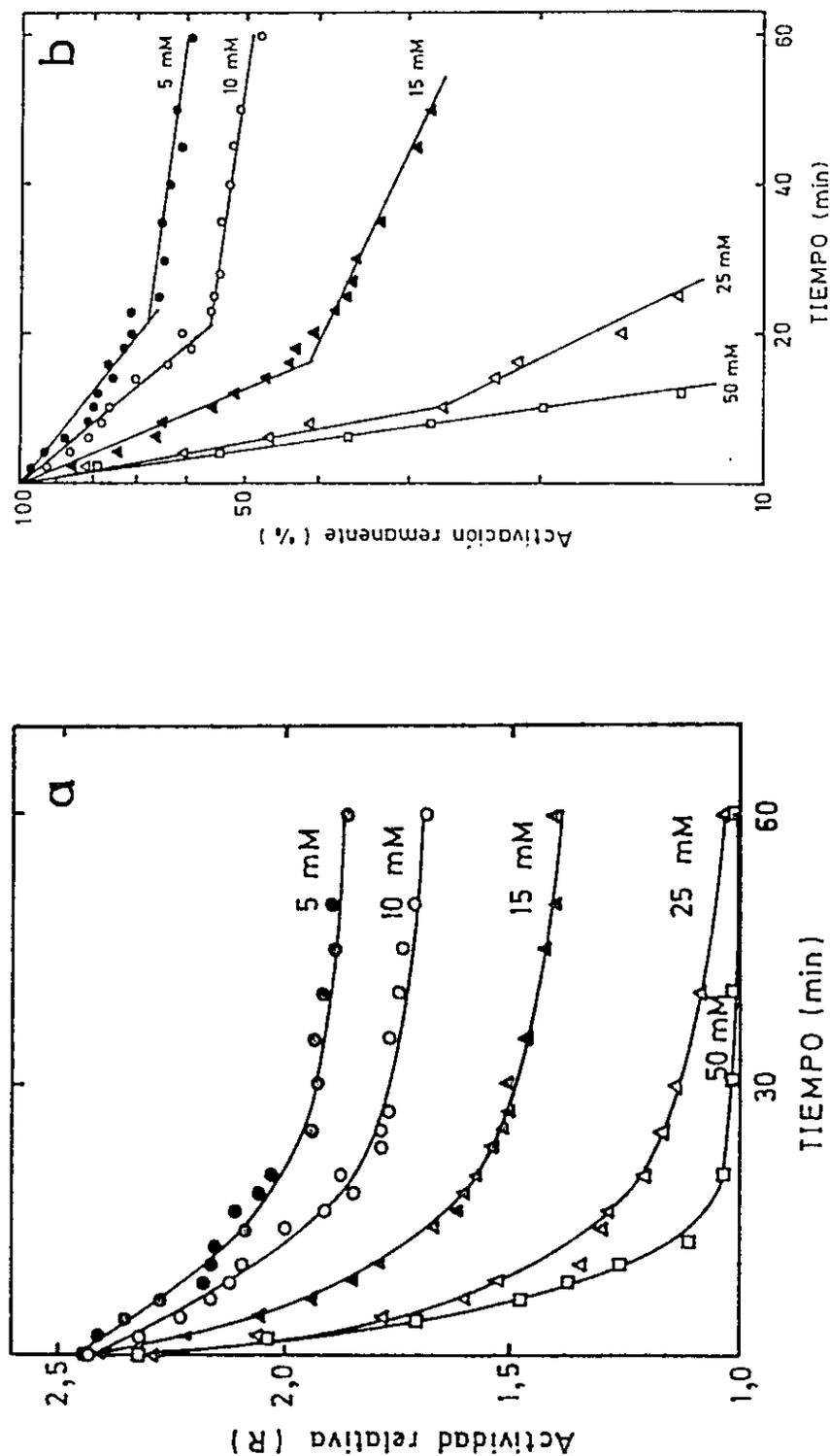


Figura 43. Efecto de la concentración de cianato de sodio sobre la velocidad de pérdida de la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+ . a, la enzima ($25 \mu M$) fue tratada con $NaCN$ como se describió en la leyenda de la figura 39 y en Materiales y Métodos, a las concentraciones de cianato que se indican. La fuerza iónica se mantuvo constante agregando $NaCl$. A los tiempos indicados se midió la actividad enzimática determinando fosfato inorgánico en presencia y ausencia de K^+ $150 mM$. R, expresa la razón entre estas mediciones. b, los datos graficados fueron obtenidos de aquellos de aquellos presentados en a. Para los cálculos del porcentaje de activación remanente se consideró la ausencia de activación igual a 1,0.

de grupos relacionados con la activación por K^+ de diferente reactividad; b) la modificación simultánea de la inhibición por exceso de sustrato influiría sobre la velocidad de modificación de la activación por cationes monovalentes; c) la modificación de la enzima se traduciría en un cambio conformacional que disminuiría la reactividad del grupo involucrado en la activación.

El cambio conformacional podría ser consecuencia de la modificación simultánea de la cooperatividad. Sin embargo, a las concentraciones de cianato utilizadas se produce una escasa alteración (20%) en la interacción entre las subunidades. Además, se ha demostrado que la velocidad de pérdida de la cooperatividad es independiente de la pérdida de la activación por potasio (figura 19).

Para demostrar que la conducta bifásica de la velocidad de la pérdida de la activación no era consecuencia de la modificación de la cooperatividad, se modificó la proteína haciéndola perder sólo la interacción cooperativa entre sus subunidades. La enzima modificada tenía valores de: $n_H = 1,2$; $R = 2,2$ y $K_i = 25 \mu M$. Posteriormente se siguió la cinética de pérdida de la activación carbamiloando, en presencia y ausencia de AMP 2 mM, la Fru- P_2 asa previamente modificada. Los resultados obtenidos mostraron que la conducta bifásica de la velocidad de modificación de la activación no es consecuencia de la influencia ejercida por la alteración simultánea de la cooperatividad y/o de la afinidad por AMP.

Las constantes de velocidad de pseudo primer orden observa-

das y corregidas por la fase lenta (k_{obs}), siguen una relación lineal con la concentración de cianato (figura 44 a). La Figura 44 b muestra que el orden cinético de la reacción con respecto al cianato es cercano a 1,0, calculado según lo descrito por Hollenberg y col. (1971).

4. Efecto de ligandos específicos de fructosa-1,6-bisfosfatasa sobre la modificación por cianato.

Se ha demostrado que las alteraciones de las propiedades regulatorias de Fru-P₂asa causadas por el tratamiento de la enzima con cianato, dependen de las condiciones en que se realiza la modificación química (tabla 8).

Si bien es cierto que la modificación de la enzima por cianato, en presencia de AMP, elimina la activación por K⁺ (tabla 8), a concentraciones menores del agente modificador (25 mM) se obtiene una protección parcial de la pérdida de la activación (figura 45). Se observa una rápida pérdida de la activación en los primeros 10 minutos (60-70%), con una velocidad de modificación muy similar a la obtenida en ausencia del nucleótido. Estos resultados podrían indicar que AMP produce un cambio conformacional que hace que la región de la proteína involucrada en la fase lenta esté menos expuesta, y apoyan la explicación dada para el efecto del potasio sobre la actividad de Fru-P₂asa (figura 17).

También se había propuesto que el K⁺, para ejercer su efecto, interactuaría en el sitio alostérico para el sustrato, y que

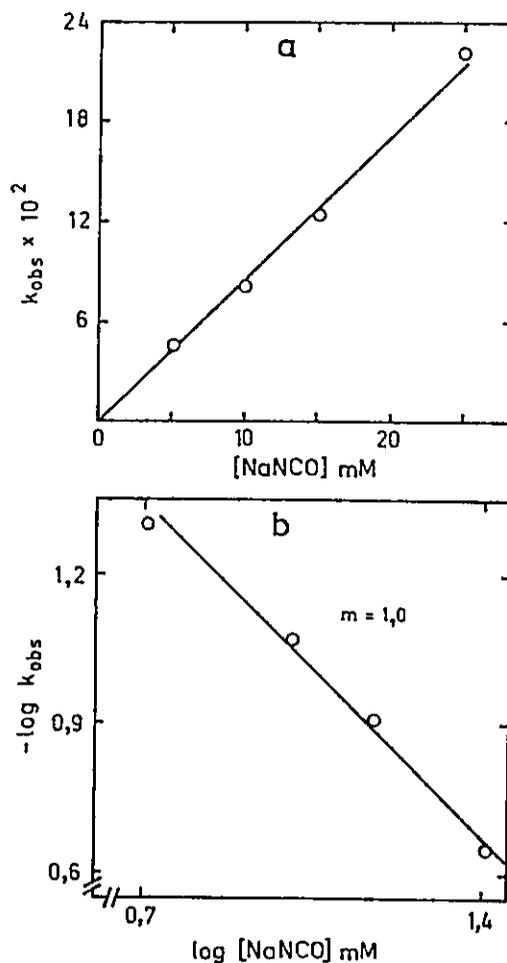


Figura 44. Características cinéticas de la reacción de modificación de la activación de fructosa 1,6-bisfosfatasa por K^+ . a, Efecto de la concentración de cianato sobre la constante de pseudo-primer orden para la primera fase (k_{obs}) de la modificación de la activación por potasio. Los valores de las constantes fueron obtenidos a partir de los datos de la figura 43. b, Orden cinético de la reacción de modificación de la activación por potasio. Los valores graficados fueron obtenidos de los datos presentados en a.

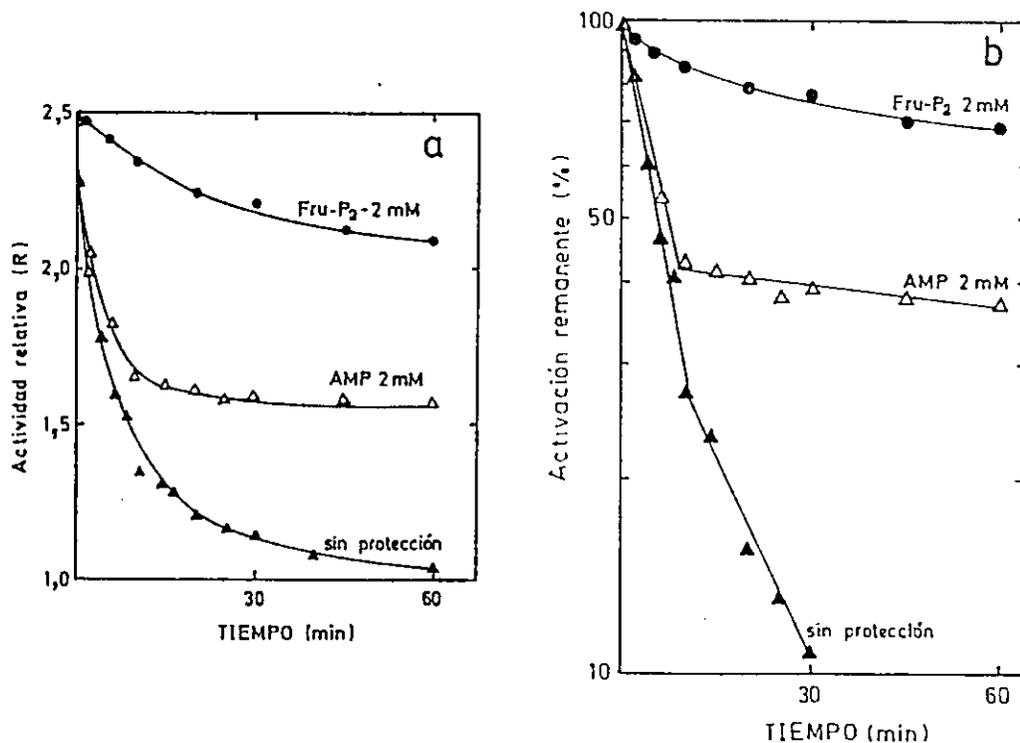


Figura 45. Efecto de ligandos de la enzima sobre la velocidad de pérdida de la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+ . a, La enzima ($25 \mu\text{M}$) se modificó con NaNCO 25 mM como se describió en la leyenda de la figura 39 y en Materiales y Métodos, en presencia de Fru-1,6- P_2 , AMP o sin protección, a las concentraciones indicadas en la figura. A diferentes tiempos de iniciada la carbamilación se retiraron alícuotas ($10 \mu\text{l}$), se diluyeron ($1/100$) y se midió fotocolorimétricamente la actividad enzimática en presencia y ausencia de K^+ 150 mM . b, Los datos presentados en a fueron graficados como se describió en la figura 43b.

el comportamiento bifásico de la velocidad de modificación de la activación por potasio (figura 43) se podría explicar por la modificación simultánea de la inhibición por exceso de sustrato. Así, con el objeto de resolver estas interrogantes y en base a los resultados obtenidos con los experimentos de protección, se buscaron las condiciones de modificación que permitieran alterar selectivamente la activación por cationes monovalentes o la inhibición por exceso de sustrato. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 17. Cuando la reacción de modificación se realizó en presencia de Fru-1,6-P₂ 0,15 mM se perdieron en distinto grado, la activación por K⁺ y la inhibición por altas concentraciones de sustrato. Cuando la modificación se hace en presencia de Fru-1,6-P₂ 0,05 mM, ambas propiedades se alteran. Estos resultados podrían indicar que la activación por potasio sería la resultante del efecto simultáneo sobre dos componentes, uno de los cuales es la inhibición por Fru-1,6-P₂. Luego, la concentración crítica de sustrato requerida para proteger selectivamente la pérdida de inhibición por sustrato es aquella que permite una saturación completa tanto del sitio catalítico como del sitio inhibitorio.

La Figura 46 muestra el resultado obtenido al estudiar la velocidad de modificación de la activación por potasio en presencia de Fru-1,6-P₂ 0,15 mM. La velocidad de modificación de la activación por potasio tuvo un comportamiento bifásico. Este resultado muestra que Fru-1,6-P₂ protege parcialmente, a través

TABLA 17

Efecto de Fru-1,6-P₂ sobre la modificación de fructosa 1,6-bisfosfatasa por NaNCO^a

Condiciones de modificación	Actividad específica	R ^b	% inhibición por Fru-1,6-P ₂
	U/mg		
Control	17,6	2,20	50
Protección con			
0,05 mM Fru-1,6-P ₂	13,3	1,00	17
0,10 mM Fru-1,6-P ₂	13,5	1,05	18
0,15 mM Fru-1,6-P ₂	13,4	1,20	45,5
0,20 mM Fru-1,6-P ₂	15,3	1,70	46,2
Sin protección	7,7	1,05	12,8

^a La modificación de la Fru-P₂asa (20 µM) se realizó con NaNCO 50 mM a 37° en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,5 durante 15 min.

^b La actividad de la enzima se midió espectrofotométricamente a una concentración de Fru-1,6-P₂ igual a 25 µM, en ausencia de potasio.

R es la razón entre las actividades medidas en presencia y ausencia de potasio.

La inhibición por exceso de sustrato se midió como se indicó en la Tabla 7.

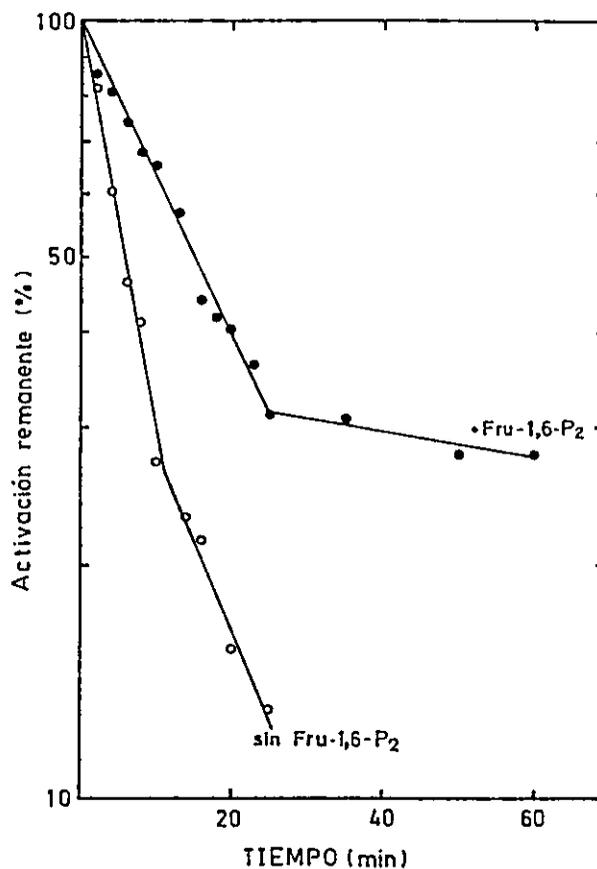


Figura 46. Cinética de modificación de la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+ . La reacción de modificación se realizó con NaNCO 25 mM en presencia de Fru-1,6- P_2 0,15 mM, como se describió en la figura 39. A los tiempos indicados se midió la actividad en presencia y ausencia de K^+ 150 mM a través de la determinación de fosfato inorgánico. Otros detalles en figura 39 y en Materiales y Métodos.

de un posible cambio conformacional, los grupos asociados a las fases rápida y lenta de la reacción de modificación. La obtención de esta curva bifásica, a pesar de tener protegida casi totalmente la inhibición por exceso de sustrato, indica nuevamente que el aumento de la actividad enzimática producido por los cationes monovalentes es resultado, en parte, de una pérdida de la inhibición por altas concentraciones del sustrato. Además, estos resultados están de acuerdo con los obtenidos al estudiar el efecto del AMP sobre la modificación de la enzima.

5. Determinación del número de residuos esenciales para la activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+ .

Con el objeto de establecer el número de residuos esenciales para la activación por K^+ , se estudió la pérdida de activación en función del número de residuos modificados, empleando el método de Tsou Chen-Lu, descrito con anterioridad.

Los resultados mostrados en la Figura 29 (curva en ausencia de Fru-1,6- P_2) fueron graficados para la pérdida de activación de la enzima por K^+ , de acuerdo a Tsou (1962), como se muestra en la Figura 47. Se usaron valores de $i=1$, $i=2$, $i=3$, $i=4$. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron para $i=1$, 0,982; para $i=2$, 0,998; para $i=3$, 0,995 y para $i=4$, 0,992. Esto sugiere que la mejor línea recta es para $i=2$. La Tabla 18 muestra el ajuste de los datos de la Figura 47 a expresiones linea-

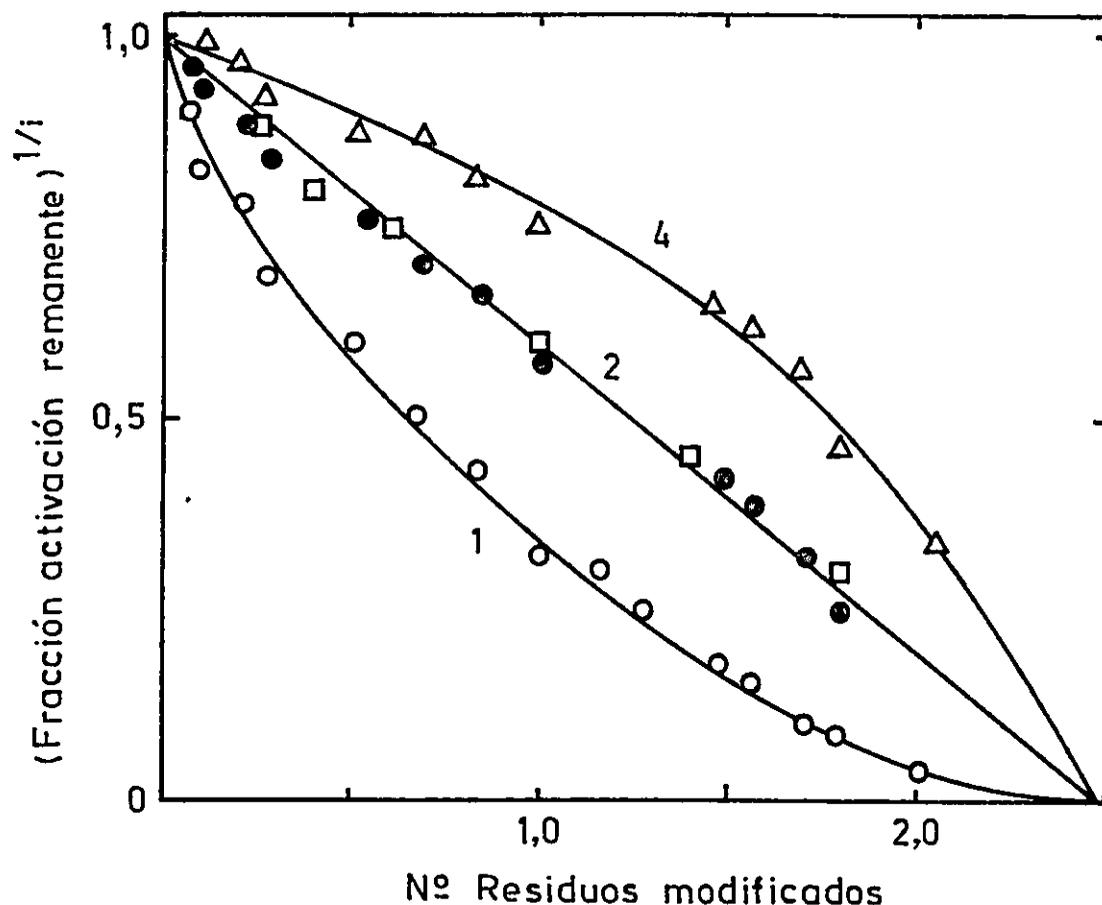


Figura 47. Gráfico de Tsou para la pérdida de activación de fructosa-1,6-bisfosfatasa por K^+ . Los datos graficados corresponden a las incorporaciones en ausencia de Fru-1,6- P_2 , presentados en la figura 29. El símbolo i representa el número de residuos esenciales para la activación de la Fru- P_2 asa por K^+ y los números corresponden a los valores de i utilizados. Los puntos corresponden a los valores experimentales obtenidos y las líneas sólidas a las curvas teóricas que representan a las mejores ecuaciones binomiales. El número de residuos modificados corresponde al número de residuos por mol de enzima. El símbolo (\square) se refiere a los datos de modificación del derivado enzima-cianato que no presenta cooperatividad (derivado I).

TABLA 18

Análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de los gráficos de Tsou Chen-Lu^a

Expresiones	Suma de los cuadrados de los residuos			
	i = 1	i = 2	i = 3	i = 4
lineal	0,00398	0,00034	0,00046	0,00051
binomial	0,00094	0,00037	0,00030	0,00022
trinomial	0,00071	0,00024	0,00014	0,00010

	Parámetros de la mejor ecuación binomial			
	i = 1	i = 2	i = 3	i = 4
p	0,93514	0,96451	0,97178	0,97607
q	-0,74584	-0,37144	-0,23268	-0,15772
r	0,15286	0,00190	-0,03681	-0,04838

^a Los datos obtenidos de los gráficos de Tsou para $i=1$, $i=2$, $i=3$ e $i=4$ (figura 47) se sometieron a un análisis de regresión polinomial como el descrito en la Tabla 10.

les, binomiales y trinomiales. Se muestra que el mejor ajuste es nuevamente para $i=2$, ya que tiene el menor valor para la suma de los cuadrados de los residuos. Además, se evidencia que no hay mejoramiento en el ajuste de la mejor expresión binomial sobre la expresión lineal cuando $i=2$; el menor valor de r es también para este valor de i . Los resultados sugieren que del total de 2 a 3 residuos por tetrámero que reaccionan con cianato en este tiempo de modificación (10 min), dos son esenciales para la activación de la enzima por cationes monovalentes. Este número se corresponde con el número de moles de cianato /mol de proteína incorporados previo a una disminución apreciable de la afinidad de la enzima por AMP (cf. figura 31).

La velocidad de incorporación de [^{14}C] - cianato de la fase rápida, luego de corregida por la contribución de la fase lenta, es $k = 0,2 \text{ min}^{-1}$, la cual es muy similar a la constante de velocidad de pseudo primer orden para la pérdida de la activación, $k = 0,17 \text{ min}^{-1}$, obtenida en condiciones experimentales idénticas.

6. Efecto del pH sobre la velocidad de pérdida de la activación por potasio.

El efecto del pH sobre la velocidad de pérdida de la activación por potasio fue estudiado modificando la enzima con NaNCO 15 mM, concentración a la cual las otras propiedades de la enzi-

ma (K_i , n_H) no se alteran significativamente. La reacción de modificación en estas condiciones muestra la misma conducta bifásica descrita anteriormente, en el rango de pH de modificación utilizado (6,25-8,1) (figura 48 a). Un gráfico de las constantes de velocidad observadas corregidas para la fase lenta (K_{obs}) en función del pH, es sigmoide con un punto de inflexión a pH 7,2. A partir de la cinética de modificación y usando la ecuación 9 descrita en Materiales y Métodos, se calculó el valor de la constante de segundo orden independiente del pH y el pK del grupo modificado. Graficando C_c/k_{obs} en función de K_c/H^+ (figura 48 b) se encontró un valor de $1041 \text{ M}^{-1}\text{seg}^{-1}$ para la constante de velocidad de segundo orden independiente del pH, para la carbamila - ción de un grupo con un pK de $7,16 \pm 0,04$.

Un tratamiento similar para las constantes de velocidad observadas para la fase lenta de la reacción permitió, en forma preliminar, determinar un valor aproximado de 35 M^{-1} para la constante de velocidad de segundo orden independiente de pH, para la carbamilación de un grupo con un pK de 5,7.

Los resultados descritos sugieren que en la enzima nativa habría dos tipos de grupos, denominados R o L, basado en su rápida o lenta velocidad de reacción con NaNCO . La correlación de las velocidades de pérdida de la activación con las velocidades para la reacción de los grupos tipo L, indicaría que estos grupos incluyen residuos necesarios para la inhibición por exceso de sustrato. Los residuos tipo R serían requeridos para la ac-

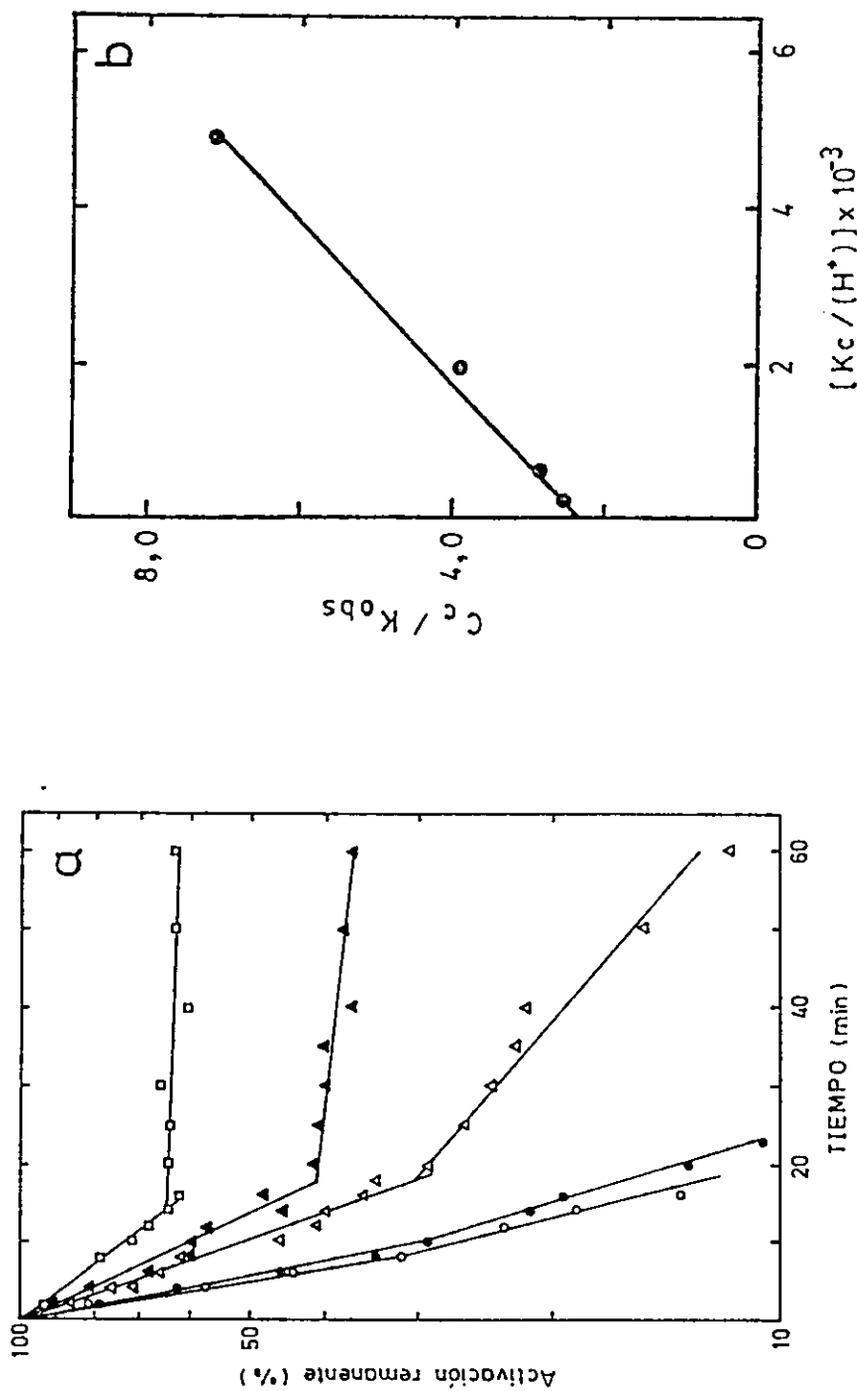


Figura 48. Efecto del pH sobre la pérdida de activación por potasio de fructosa-1,6-bisfosfatasa. a, La enzima (25 μ M) fue modificada con NaNCO 15 mM, como está descrito en Materiales y Métodos, a los siguientes valores de pH: 6,25 (○); 6,6 (●); 7,1 (△); 7,5 (▲) y, 8,0 (□). A los tiempos indicados se determinó la actividad fotocolorimétrica en presencia y ausencia de K^+ 150 mM. Los datos obtenidos se graficaron como en la figura 43b. b, Los valores de k_{obs} obtenidos de los datos de a, se graficaron de acuerdo a la ecuación 9 de Materiales y Métodos; Análisis de Resultados.

ción de K^+ sobre el segundo componente que participa en el efecto de activación por cationes monovalentes.

La pérdida de la activación de Fru- P_2 asa por K^+ dependiente del pH (figura 48 a) sugiere la carbamilación de grupos tioles con diferente reactividad.

7. Características cinéticas de fructosa - 1,6-bisfosfatasa carbamilada.

Cuando la reacción de modificación de Fru- P_2 asa se realiza con NaNCO 50 mM a pH 7,5, se obtiene una enzima que ha perdido la activación por potasio y la inhibición por exceso de sustrato. Al estudiar el efecto del sustrato sobre la enzima carbamilada en estas condiciones, en presencia y ausencia de K^+ 150 mM, se observa que no es modulada por potasio (figura 49), a diferencia de lo que ocurre en la enzima nativa. En la enzima carbamilada no se observa el requerimiento de mayor concentración de sustrato para máxima actividad en presencia de potasio. Además, la enzima pierde la inhibición por exceso de sustrato (medida a una concentración de 500 μ M). Estos resultados sugieren nuevamente que el sitio o región de la proteína que interactúa con el potasio podría estar estrechamente relacionado con el sitio alostérico para el sustrato.

Por otro lado, el efecto inhibitorio del potasio sobre el sitio activo de la enzima no es alterado, ya que a bajas concen

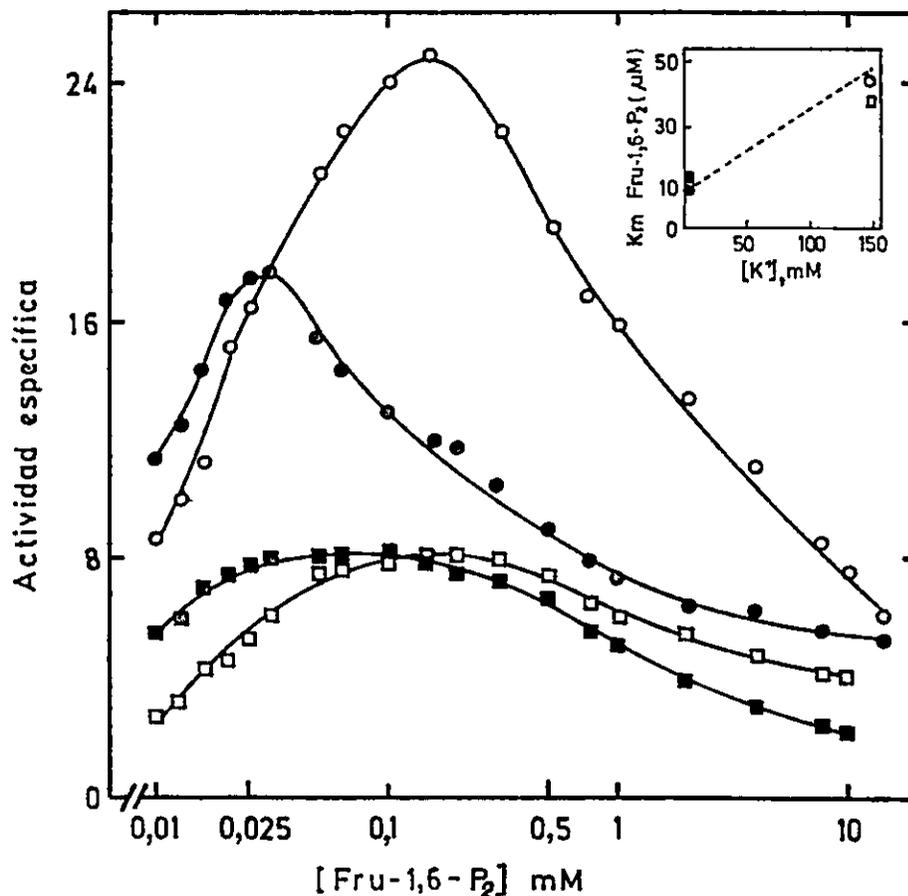


Figura 49. Efecto de la concentración de potasio sobre la saturación de fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y carbamylada. La enzima (25 μM) fue modificada con NaNCO 50 mM durante 15 min en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La actividad enzimática de la proteína nativa ($\circ\bullet$) y carbamylada ($\square\blacksquare$) fue determinada espectrofotométricamente en presencia (símbolos vacíos) o ausencia (símbolos llenos) de K^+ 150 mM, a las concentraciones de Fru-1,6- P_2 que se indican. El recuadro muestra la variación de la K_m para Fru-1,6- P_2 en función de la concentración de ión potasio. La línea discontinua fue trazada tomando en cuenta los valores mostrados en la figura 17.

traciones de Fru-1,6-P₂ (0,025 mM) la presencia de K⁺ 150 mM produce una marcada inhibición. Las constantes de Michaelis para Fru-1,6-P₂, de la enzima nativa y carbamilada, son similares y aumentan linealmente al incrementar la concentración del catión monovalente (figura 49, recuadro; cf. figura 17). Esto sugiere que la afinidad de la enzima por el sustrato no es afectada (Ojeda y col. 1980). Además, en la Figura 49 se observa una pérdida de la actividad catalítica (56%) similar a la descrita en la Tabla 16. Cuando la modificación se realizó en presencia de concentraciones saturantes del sitio catalítico (tabla 17), se obtuvo una pérdida parcial de la actividad catalítica. Esta pérdida no concuerda con los resultados descritos previamente (tabla 8 y figura 18) en que las mediciones de actividad se realizaron en presencia de Fru-1,6-P₂ 0,5 mM, con el método colorimétrico para determinar Pi (Materiales y Métodos, págs. 36, 37).

Los datos de la Figura 49 muestran que a la concentración de Fru-1,6-P₂ de 0,5 mM (inhibitoria), las actividades de la enzima nativa y carbamilada son levemente diferentes. Estos valores similares podrían deberse a que mientras la enzima nativa está inhibida por exceso de sustrato, la proteína carbamilada no lo está porque ha perdido su sensibilidad a altas concentraciones de Fru-1,6-P₂. De esta manera, la pérdida de actividad catalítica en la enzima modificada es compensada por un aumento en la actividad como resultado de la desinhibición. Esto no ocurre a concentraciones no inhibitorias del sustrato.

8. Efecto de Mg^{2+} sobre la fructosa-1,6-bisfosfatasa nativa y carbamilada. Efecto de Fru-1,6- P_2 sobre la carbamilación.

Magnesio es un cofactor esencial de la enzima y, a su vez, produce inhibición a altas concentraciones (Tashima y Yoshimura, 1975). Así, una concentración de Mg^{2+} de 5 mM, la cual es comunmente usada en los estudios de Fru- P_2 asa y en este trabajo, inhibe la actividad de la enzima.

Para determinar si la activación de la Fru- P_2 asa por cationes monovalentes es en parte debida a una eliminación de la inhibición por Mg^{2+} , se estudió el efecto del catión divalente sobre la actividad de la enzima nativa y carbamilada. No se observó inhibición de la actividad del derivado enzima-cianato por altas concentraciones de Mg^{2+} , cuando la enzima carbamilada se ensayó en ausencia de K^+ (figura 50 a). En efecto, Mg^{2+} 5 mM aumentó la actividad enzimática en alrededor de 50%. Sin embargo, el comportamiento de la enzima modificada, con potasio como activador en la mezcla de ensayo, es diferente (figura 50 b). Bajo estas condiciones experimentales ninguna de las dos preparaciones enzimáticas (nativa y modificada) mostró inhibición por exceso de Mg^{2+} . Además, la carbamilación redujo la actividad enzimática en 50-60% a las concentraciones de Mg^{2+} usadas. Como se puede observar al comparar las Figuras 50 a y 50 b, la enzima modificada no era activada por cationes monovalentes (a 5 mM Mg^{2+} , R=1,2; cf. figuras 39, 43).

Estos datos, junto con aquellos que apoyan que el K^+ disminu

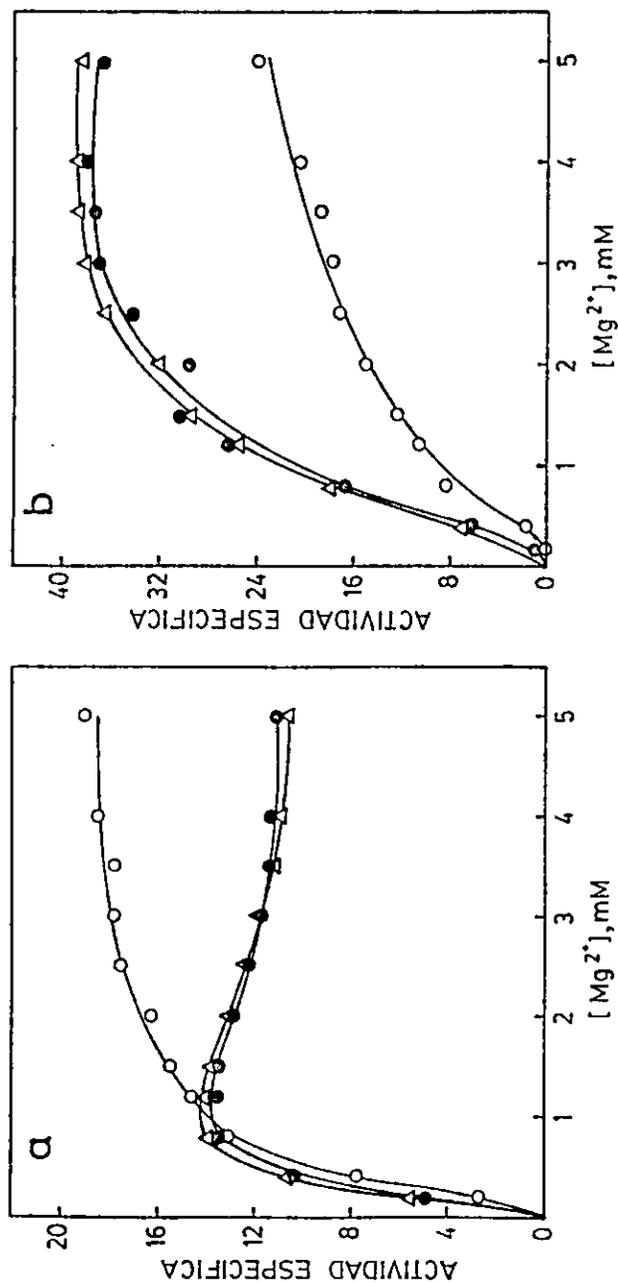


Figura 50. Efecto de la modificación con cianato sobre las curvas de saturación por Mg^{2+} de fructosa-1,6-bisfosfatasa, en presencia y ausencia de potasio. Una alícuota de enzima ($10 \mu M$) se incubó con $NaNO_2$ 25 mM como se indicó en Materiales y Métodos. A 0 y 30 min se tomaron alícuotas, se diluyeron ($1/100$) con amortiguador $Tris-HCl$ 20 mM pH $7,0$, $EDTA$ $0,1 \text{ mM}$ y se ensayó la actividad fotocolorimétrica con diferentes concentraciones de $MgSO_4$ en el medio de ensayo, en ausencia (a) y presencia (b) de K^+ 150 mM . (○) enzima control (tiempo 0 de modificación); (●) Fru- P_2 asa carbamílada (30 min); (△), Fru- P_2 asa incubada con cianato en las mismas condiciones excepto que se incluyó Fru- $2,6-P_2$ $50 \mu M$ en el medio de modificación.

ye la afinidad de Fru-P₂asa por Fru-1,6-P₂ en el sitio catalítico y en un sitio alostérico para el sustrato (figuras 17, 49 y tablas 7,8), indican que la activación de Fru-P₂asa de riñón de cerdo por cationes monovalentes es, al menos, parcialmente debido a la remoción de las inhibiciones por exceso de sustrato y de Mg²⁺.

El reciente descubrimiento del Fru-2,6-P₂ y su rol en la regulación del metabolismo de hidratos de carbono (para revisiones Hers y Van Schaftingen, 1982; Hers y Hue, 1983; Claus y col., 1984), y su descripción como un potente inhibidor de Fru-P₂asa (van Schaftingen y Hers, 1981; Pilkis y col. 1981), ofreció la posibilidad que el segundo sitio para el sustrato (sitio inhibitorio) correspondiera a un sitio alostérico para Fru-2,6-P₂. Esto nos incitó a estudiar el efecto de Fru-2,6-P₂ sobre la reactividad del grupo tiol relacionado con la activación por potasio.

Cuando Fru-2,6-P₂ se incluyó en el medio de modificación, produjo una protección total contra la pérdida de activación por potasio, producida por el tratamiento con el cianato (figuras 50, 51).

A diferencia del marcado efecto protector de Fru-2,6-P₂, la inclusión de Fru-1,6-P₂ (a concentraciones no inhibitorias) mostró sólo un efecto parcial, mientras que a una alta concentración (25 mM), protegió contra la pérdida de activación de la enzima por el catión monovalente (figura 51). Estas enzimas (pro-

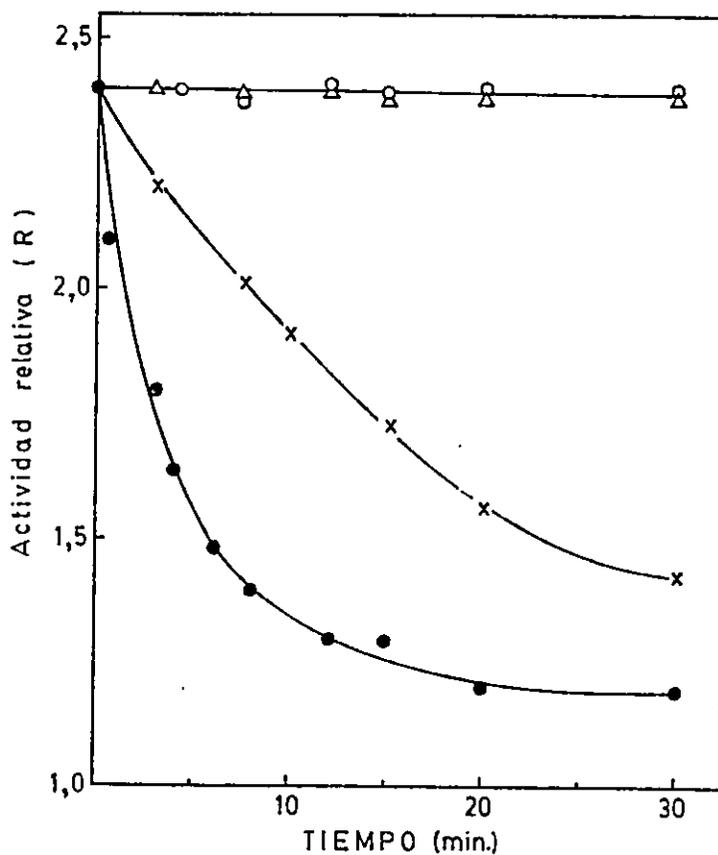


Figura 51. Modificación de la activación de fructosa 1,6-bisfosfatasa por K^+ y su protección por fructosa 2,6-bisfosfato. La enzima (40 μ M subunidad) fue incubada con Na₂CO₃ 25 mM como se describió en Materiales y Métodos, en ausencia (●) o presencia de diferentes adiciones: Fru-2,6-P₂ 100 μ M (○); Fru-1,6-P₂ 150 μ M (x), y Fru-1,6-P₂ 20 mM (Δ). La actividad enzimática fue medida a través de la determinación de fosfato inorgánico formado. R, expresa la razón de actividades medidas en presencia y ausencia de K^+ 150 mM.

tegidas por Fru-2,6-P₂ o Fru-1,6-P₂, 25 mM) se comportan como Fru-P₂asa nativa y retienen su inhibición por concentraciones altas de Mg²⁺.

Estos resultados muestran que el residuo altamente reactivo, involucrado en la activación por K⁺, está también relacionado a la inhibición por Fru-2,6-P₂, ya que este metabolito protege el sitio de acción del K⁺.

DISCUSION

El presente trabajo confirma que la fructosa-1,6-bisfosfatasa constituye un notable modelo para analizar la relación estructura-función de una proteína, y contribuye al conocimiento refinado de la topografía funcional de la enzima, así como de la función y propiedades de las cadenas laterales de los amino ácidos lisina y cisteína que son claves en su mecanismo catalítico.

En efecto, a través de un método ampliamente utilizado en el estudio de los mecanismos catalíticos de las enzimas, como lo es la modificación química selectiva de residuos de amino ácidos comprometidos en la acción enzimática (Glazer, 1970; Cohen, 1970; Shaw, 1970; Means y Feeney, 1971; Glazer y col., 1975; Sigman y Mooser, 1975), se caracterizaron y localizaron los residuos responsables de la inhibición alostérica de la enzima por AMP y en su activación por cationes monovalentes. Asimismo, se ha contribuido a esclarecer el mecanismo de cada una de estas propiedades regulatorias.

Modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa con AMP-dialdehído.

AMP-dialdehído y los derivados preparados por oxidación con peryodato de la ribosa de otros nucleótidos, representan un grupo

de compuestos muy útiles para realizar marcación de enzimas por afinidad. Estos derivados presentan varias ventajas, entre ellas, son fáciles de preparar y purificar, exhiben pequeños cambios estructurales con el nucleótido afín y son muy solubles en agua. Sin embargo, podrían mostrar algunas desventajas. No poseen la rigidez conformacional del nucleótido original pues tienen abierto el anillo de la ribosa, por lo que suelen mostrar una menor afinidad por los sitios activos o regulatorios de las enzimas. Por otra parte, la oxidación de la ribosa genera dos grupos aldehídos muy reactivos lo que hace que estos compuestos bifuncionales puedan reaccionar "no específicamente" con aminoácidos, por ejemplo residuos lisina, localizados en la superficie de la molécula de enzima (Evans y col., 1980; Hinrichs y Eyzaguirre, 1982).

AMP_{ox} puede considerarse como un marcador de afinidad de Fru-P₂asa a base de varios criterios generalmente aceptados (Wofsy y col., 1962; Singer, 1967; Shaw, 1970): a) el reactivo produce una alteración progresiva de la inhibición alostérica de la enzima por AMP, a una velocidad que depende de su concentración; b) el análogo del nucleótido forma un complejo reversible con la molécula de enzima; c) el AMP protege a la enzima contra su desensibilización por AMP-dialdehído; y d) el análogo oxidado no es inhibidor de la enzima, pero en mezcla con AMP hace que la enzima tenga menor afinidad por este último, lo que podría sugerir que ambos se están uniendo al mismo sitio.

El que AMP - dialdehído no inhiba a la enzima, a

pesar de tener el grupo fosfato, podría insinuar que para el inhibidor es esencial tener su ribosa intacta. Si es así, éste no sería el único requerimiento puesto que adenosina, ADP, ATP y GMP tampoco son inhibidores, lo que está de acuerdo con la alta especificidad descrita para el sitio de AMP (Taketa y Pogell, 1965).

Se ha demostrado que los derivados dialdehído-nucleótidos, cuando se usan como marcadores de afinidad, interactúan con residuos lisina (Easterbrook-Smith y col., 1976; Gregory y Kaiser, 1979). Por otro lado, en forma similar a lo descrito (Powell y Brew, 1976; Easterbrook-Smith y col., 1976; Raniere-Raggi y Raggi, 1976; Evans y col., 1980), la unión del AMP-dialdehído a la Fru- P_2 asa puede revertirse por dilución, diálisis exhaustiva o incubación con Tris y otras bases nitrogenadas, mientras puede estabilizarse por reducción con borohidruro de sodio. Esto ha permitido sugerir (Easterbrook-Smith y col., 1976; Powell y Brew, 1976; Evans y col., 1980) que se forma una base de Schiff entre el dialdehído y un residuo lisina de las diferentes enzimas. En nuestro caso aunque no se caracterizó el producto de marcación de Fru- P_2 asa, la prueba indirecta descrita, junto con el comportamiento similar al de piridoxal fosfato (Colombo y col., 1972; Colombo y Marcus, 1974), indica que un grupo aldehído del AMP_{ox} forma una base de Schiff con un grupo amino en la proteína. Puesto que el grupo amino terminal de esta enzima se encuentra acetilado (El-Dorry y col., 1977; Marcus y col., 1981; Fisher y

Thompson, 1983), se excluye el grupo α -NH₂ como sitio de interacción, el cual debe por lo tanto involucrar el grupo ϵ -NH₂ de una lisina.

La presencia de un grupo aldehído y un grupo fosfato en la estructura del AMP_{ox} predice una similitud a la interacción de piridoxal-P con la enzima. En efecto, la modificación de Fru-P₂asa por AMP-dialdehído produce consecuencias comparables a aquellas ocasionadas por el tratamiento con piridoxal-P (Colombo y col., 1972). En ambos casos se produce una pérdida de actividad y una alteración de la inhibición alostérica por AMP, lo que indica que interaccionan con residuos lisina de los sitios catalítico y alostérico. No obstante esta relativa "inespecificidad", la reacción es altamente específica ya que de un total de 100 residuos lisina presentes en Fru-P₂asa (Marcus y col., 1982) un número limitado de ellas reaccionan con AMP_{ox} (4,1 moles/mol enzima). Mayor selectividad se obtiene al realizar las modificaciones en presencia de los ligandos protectores, AMP para el sitio alostérico y Fru-1,6-P₂ (> 10mM) para el sitio catalítico.

El tratamiento de la enzima con AMP_{ox}, en presencia de Fru-1,6-P₂, mostró que es posible modificar selectivamente lisinas involucradas en la inhibición alostérica por AMP. En estas condiciones se incorporan 2 moles de [¹⁴C]-AMP_{ox} /mol de tetrámero, valor que está en el rango (2-4) de aquellos obtenidos de la incorporación de piridoxal-P (Colombo y col., 1972; Colombo y Marcus, 1974), δ -azido-AMP (Marcus y Haley, 1979) y 2-azido-AMP

(Riquelme y Czarnecki, 1983). Sin embargo, al igual que en los estudios realizados con estos otros derivados, el AMP_{ox} no resultó ser un real marcador de afinidad, debido probablemente a restricciones conformacionales para estos modificadores (Marcus y Haley, 1979; Riquelme y Czarnecki, 1983). Cabe hacer notar que ambos derivados azido producen, junto a la pérdida de afinidad por AMP, una inactivación completa de la enzima. Marcus y Haley (1979) postulan que la inactivación producida por el δ -azido-AMP podría deberse a un congelamiento de la subunidad modificada en la conformación subunidad-inhibidor inactiva. Sin embargo, debido a que la fotólisis se realizó en ausencia de sustrato, no se puede descartar una posible incorporación del δ -azido-AMP a nivel del sitio activo. Más aún, se ha demostrado (tablas 3 y 6) que es posible obtener un derivado con el sitio alostérico alterado, sin inactivar la enzima.

Por otro lado, hay una protección parcial de AMP o AMP+Fru-1,6-P₂ contra la pérdida de cooperatividad producida por AMP_{ox} (tabla 3). El efecto adicional de Fru-1,6-P₂ sobre la protección de AMP contra la pérdida de inhibición por el nucleótido, podría ser el resultado de un efecto sinérgico en la unión entre ambos ligandos. Como se muestra en la misma tabla, y será discutido posteriormente, el sustrato presenta un efecto protector de la afinidad de la enzima por AMP, pero no así sobre la pérdida de cooperatividad. Otra explicación para el efecto adicional del sustrato podría ser el requerimiento de éste para la unión de AMP.

Meek y Nimmo (1984) encuentran que AMP no se une a Fru-P₂asa en ausencia de Fru-1,6-P₂, y en su presencia, obtienen una unión de aproximadamente 2 moles de AMP por mol de tetrámero. Este valor concuerda con nuestros datos de incorporación de AMP_{ox} en presencia de sustrato. No obstante, AMP en ausencia de Fru-1,6-P₂ tiene un efecto protector contra la modificación por AMP_{ox}, lo que insinuaría que el nucleótido debe interactuar con la enzima, en ausencia del sustrato. En estas condiciones se unen 4 moles de AMP_{ox}/mol de tetrámero. La unión de AMP en ausencia del Fru-1,6-P₂ es apoyada también por resultados de carbamilación de la enzima (se discutirán posteriormente), por estudios de resonancia magnética nuclear de ³¹P-AMP (Slebe y col., 1984) y por estudios de modificación de la enzima con N-etilmaleimida (Reyes y col., 1984; 1985). Por otra parte, McGrane y col. (1983) muestran que AMP se puede unir a la enzima de hígado de rata en ausencia de Fru-1,6-P₂, con una estequiometría de 4 moléculas/tetrámero.

La diferente incorporación de AMP_{ox} en presencia y ausencia de Fru-1,6-P₂ se debería a que en esta última condición se produce, además, una alteración de la actividad catalítica, lo que indicaría que AMP_{ox} puede unirse covalentemente a un grupo amino del o cerca del sitio catalítico. La unión del AMP-dialdehído promueve un cambio conformacional pues la enzima modificada, en condiciones de no protección, presenta un menor número de grupos tioles expuestos, comparados con la enzima nativa.

La conclusión más significativa que surge de los resultados con AMP_{ox} es que deberían existir en la enzima residuos lisina con reactividad diferencial, unos relacionados a la cooperatividad y otros, comprometidos en la sensibilidad de la enzima al AMP. El primer grupo de residuos lisina correspondería a elementos estructurales necesarios para la interacción cooperativa entre las subunidades; la cooperatividad es eliminada por su modificación con AMP_{ox}. En este sentido, la pérdida de cooperatividad producida por la modificación con piridoxal-P indujo a Colombo y col. (1972) a postular que como resultado de la pérdida de interacción entre las subunidades, se producía una disminución en la afinidad por AMP. Esta conclusión no parece válida puesto que los experimentos con AMP_{ox} insinúan que es posible alterar la interacción entre los sitios de AMP sin afectar significativamente el K_i para el nucleótido. Más aún, como discutiremos posteriormente, los experimentos de carbamilación muestran que estos dos efectos se pueden separar totalmente. Así, los residuos lisina que son elementos estructurales necesarios para la interacción cooperativa entre las subunidades, podrían encontrarse en o en estrecha proximidad al sitio de unión de AMP. La primera interpretación parece menos posible pues los resultados de protección de la inhibición por AMP muestran que aunque la cooperatividad esté alterada, el K_i para AMP de la enzima modificada es similar al obtenido para la enzima nativa.

La mayor facilidad en la modificación del grupo ϵ -NH₂ rela

cionada a la cooperatividad podría indicar que este residuo lisina se encuentra más expuesto al solvente, que aquel relacionado con la afinidad de la enzima para AMP. Esta diferente reactividad de los residuos lisina debe ser el resultado del microambiente en el cual cada residuo está localizado en la enzima.

La presencia de un grupo ϵ -amino en el sitio de unión de AMP no es sorprendente, ya que las interacciones electrostáticas entre el grupo fosfato del nucleótido y tal grupo básico de la proteína, podría ayudar a explicar la estrecha unión del AMP a la Fru-P₂asa. Un rol parecido ha sido propuesto para el residuo lisina en el sitio activo de creatina-quinasa (James y Cohn, 1974) y carboxilasa pirúvica (Easterbrook-Smith y col., 1976). Los autores proponen que el residuo lisina estaría involucrado en la unión del fosfato terminal de MgATP²⁻.

Como se discutió con anterioridad, el AMP_{ox} no es un inhibidor de la Fru-P₂asa. Este comportamiento se debe probablemente a una interacción alterada de AMP_{ox}, si se la compara con la interacción de AMP con la enzima, producida por la formación de una base de Schiff entre el AMP-dialdehído y un residuo lisina que se encuentra en o próximo al sitio de unión del AMP. Se ha descrito (Powell y Brew, 1976) que existe una tendencia en las enzimas a tener una menor especificidad por el anillo ribosa, que por las otras partes de la molécula del nucleótido. De ahí que es menos probable que una modificación en la ribosa del AMP afecte la unión del nucleótido, comparada con una modificación de la base

o el grupo fosfato.

Como se describió con anterioridad (Introducción, pags. 18, 19) la proteína-S posee una sensibilidad menor a la inhibición por AMP, lo que apoyó la idea que el sitio de unión del nucleótido estaría localizado en el péptido-S. Sin embargo, en forma similar a lo obtenido con piridoxal-P (Cruz y col., 1979; Marcus y col., 1981) y 8-azido-AMP (Marcus y col., 1981), la modificación química de Fru-P₂asa con AMP_{ox} resulta en la modificación de residuos de la proteína-S y no del péptido-S (figura 9).

Si bien los estudios de localización del péptido o de los péptidos que contienen [³H] AMP_{ox} no son concluyentes, los resultados dieron una visión general acerca de la composición y características de la región de unión del AMP-dialdehído (Slebe y col., 1981; Hubert y col., 1981). La composición de aminoácidos de la fracción B (tabla 4) mostró que es diferente al péptido-S de riñón de cerdo (Marcus y col., 1981), y de hígado de conejo (Traniello y col., 1972; Dzugaj y col., 1976; El-Dorry y col., 1977), de oveja (Zalitis, 1976; Fisher y Thompson, 1983) y de pollo (Cruz y col., 1979). El alto contenido de los aminoácidos glutámico y aspártico, junto a la posibilidad de que una proporción de ellos corresponda a residuos glutamina y asparragina, hacen atrayente la idea de que las fracciones que contienen AMP_{ox} se corresponden con la región, recientemente descrita (Marcus y col.,

1982), que contiene el postulado sitio alostérico para AMP. Si esto fuera así, la mezcla de péptidos obtenida podría derivar de una hidrólisis triptica incompleta, generando los fragmentos Lys-141-Lys-150 y Lys-141-Arg-157, y un péptido contaminante que contuviera aminoácidos apolares (Val, Ile, Leu). Estudios de velocidad de liberación del carboxilo terminal mediante hidrólisis con carboxipeptidasa (resultados no mostrados), apoyan esta hipótesis. Por el contrario, los pesos moleculares obtenidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida son mayores a los esperados para estos fragmentos. Sin embargo, se ha establecido que en péptidos pequeños hay desviaciones en la correlación entre el logaritmo del peso molecular y la distancia de migración en geles de poliacrilamida (Swank y Munkres, 1971). Así, la hormona adenocorticotrópica (ACTH) migra como un péptido de 6.500 en lugar de 4.500, glucagón migra como si tuviera 1.800 en lugar de 3.500, y polimixina migra como un péptido de 2.200 en lugar de 1.200. El motivo de desviación de algunos péptidos es que las cargas se hacen más importantes, mientras menor sea el peso molecular. Otras razones pueden ser las diferencias en forma y en la capacidad de unir SDS. La interacción del SDS con las proteínas es principalmente de tipo hidrofóbico (Reynolds y Tanford, 1970), de manera que es posible que péptidos con composiciones no habituales de aminoácidos, por ejemplo, muy cargados o hidrofóbicos, podrían tener una

afinidad para SDS no común. Las características especiales del fragmento que une AMP_{ox} podrían ser la causa de la reactividad anómala de los residuos lisina que se encuentran en esta región de la proteína.

Recientemente, se ha determinado la estructura primaria de Fru-P₂asa de riñón de cerdo y se han localizado los sitios presumiblemente catalítico, de fosforilación y alostérico para AMP (Marcus y col., 1982). Además, se conocen los péptidos que contienen el sitio catalítico y alostérico para AMP (Xu y col., 1981; Xu y col., 1982; Suda y col., 1982), provenientes de la enzima de hígado de conejo. Sin embargo, los péptidos correspondientes al sitio alostérico, provenientes de las enzimas de hígado de conejo y riñón de cerdo, muestran claras divergencias tanto en el número de lisinas como en su composición y secuencia. Cabe hacer notar que en ambos casos la marcación se efectuó con piridoxal-P. Una posible explicación para esta discrepancia sería el distinto origen de las enzimas estudiadas, aún cuando ellas muestran una alta homología de secuencia, y en algunos sitios como el catalítico completa identidad.

Los resultados descritos con AMP_{ox} insinúan que deberían encontrarse dos residuos lisina modificados por subunidad, relacionados con la inhibición alostérica por AMP. Puesto que el derivado [³H]AMP_{ox}-enzima, fragmentado en los estudios de localización del sitio, presentaba una alteración tanto en la cooperatividad como en la afinidad hacia el nucleótido, la obtención de

una mezcla de péptidos no es sorprendente. Por otra parte, las condiciones empleadas en la marcación con piridoxal-P (Colombo y col., 1972; Colombo y Marcus, 1974) tampoco garantizan la selectividad de la modificación, pues no se logra separar el efecto cooperativo de la inhibición por AMP, con la afinidad hacia el nucleótido. Además, los resultados de incorporación de piridoxal-P muestran que la mitad de los residuos lisina modificados no están involucrados en propiedades regulatorias de la enzima (modificación inespecífica). Estos hechos también podrían explicar las divergencias encontradas en cuanto a la caracterización del sitio alostérico para AMP.

Modificación de fructosa-1,6-bisfosfatasa con cianato.

La modificación química de proteínas realizada con cianato es relativamente inespecífica, pudiéndose modificar grupos sulfhidrilos, carboxilos, hidroxilos y aminos (ver Resultados, pág. 91). Sin embargo, solamente la reacción con grupos amino resulta en la formación de un compuesto estable ya que la reacción con los otros grupos es reversible a pH neutro (Stark , 1972). Por ejemplo, en la inactivación de pepsina por cianato (Sluyterman, 1967) la actividad catalítica se recupera lentamente después de diluir la mezcla de inactivación, ya que la pérdida de actividad se debe a la modificación de un residuo sulfhidrilo. Otro ejemplo lo constituye la modificación reversible de

carbamilfosfato-sintetasa, donde el grupo sulfhidrilo modificado pertenece al sitio de unión de glutamina (Anderson y Carlson, 1975). Similarmente, una pérdida reversible de la actividad proteolítica de pepsina fue atribuida a la carbamilación de residuos tirosina (Rimon y Perlmann, 1968). Por el contrario, una pérdida irreversible de la actividad catalítica se ha encontrado cuando el grupo responsable en la reacción corresponde a un residuo amino. Ejemplos de modificación irreversible son las inactivaciones de ribonucleasa pancreática (Stark y col., 1960), deshidrogenasa glutámica (Veronese y col., 1972), deshidrogenasa isocítrica (Shen y Colman, 1975) y transaminasa glutámico oxaloacética (Slebe y Martínez-Carrión, 1976).

La pérdida de la **cooperatividad de la Fru-P₂asa**, como también de la **inhibición por AMP** por el tratamiento con cianato, es el resultado de una reacción irreversible ya que ambas propiedades funcionales no se recuperaron cuando el complejo enzima-cianato se sometió a dilución, filtración en columnas de Sephadex o a una diálisis exhaustiva. Puesto que el grupo amino terminal de esta proteína se encuentra acetilado (Marcus y col., 1981), las reacciones de modificación que producen las consecuencias funcionales que se muestran en las Figuras 13 a 15, corresponden a la modificación de residuos lisina, específicamente grupos ϵ -amino de reactividad diferencial frente al agente modificador. La pérdida de la **activación por cationes monovalentes** es una reacción reversible (figuras 39, 40 y tablas 6, 16) y corresponde a la

modificación de grupos sulfhidrilos, como lo demostró la identificación de S-[^{14}C] carbamil-cisteína (figura 42).

La modificación de un grupo amino de una proteína por cianato requiere que la amina no esté protonada puesto que el mecanismo de la reacción involucra un ataque nucleofílico por parte de la amina (Stark, 1965). Así, las velocidades de reacción de las aminas con cianato son una función del pH del medio de reacción y del pK de la amina. Los grupos ϵ -amino de lisina en péptidos presentan un valor de pK promedio cercano a 10,5 (Stark, 1965). De ahí que debido a su bajo valor de pK (8,9), los grupos α -amino reaccionan a pH neutro alrededor de 100 veces más rápido que los grupos ϵ -amino normales.

La reacción de modificación realizada para eliminar la cooperatividad y la inhibición por AMP de la enzima se realizó a pH 7,5. El resultado sugiere que los grupos amino de las lisinas involucradas en la reacción tienen un valor de pK promedio menor que el de los grupos ϵ -amino de lisinas normales. Esto explicaría su alta reactividad con cianato. Se han descrito ejemplos de proteínas que tienen residuos de lisinas de reactividad desusual, con valores de pK anómalos que pueden llegar a 5,9 en la descarboxilasa acetoacética (Schmidt y Westheimer, 1971), 7,7 en la deshidrogenasa glutámica (Veronese y col., 1972), y 7,9 en la aspartato transaminasa (Slebe y Martínez-Carrión, 1976; 1978). Así, la selectividad de la modificación de los grupos reactivos en Fru-P₂asa se basó en la disimilitud de los valores

de pK de los diferentes grupos amino y, además, en la protección ejercida por el sustrato y el AMP.

De esta manera, la alta reactividad frente al cianato de los residuos lisina comprometidos tanto en la cooperatividad como en la inhibición por AMP y, la del grupo tiol que participa en la activación por potasio, dependen de la presencia de ligandos específicos de la enzima. La protección de la pérdida de la activación de la enzima por cationes monovalentes y de la inhibición por AMP, ejercida por Fru-1,6-P₂ a altas concentraciones (tabla 8, figura 23), se puede explicar en base a un cambio conformacional ejercido por el Fru-1,6-P₂ ya que éste no protege a la enzima de la pérdida de la cooperatividad (figuras 19, 45). Este cambio conformacional haría que la región de la proteína responsable de la inhibición por AMP esté menos expuesta al solvente que la región comprometida en la interacción entre las subunidades. En forma similar, Marcus (1975) explica el efecto protector de Fru-1,6-P₂ contra la pérdida de la activación por potasio e inhibición por AMP cuando se modifican residuos arginina en la enzima.

Cinética de modificación de la cooperatividad hacia AMP. Puesto que la cinética de modificación de la cooperatividad no se ve alterada por la presencia de Fru-1,6-P₂ en el medio de reacción, las constantes de modificación en presencia o ausencia de Fru-1,6-P₂ son iguales (figura 19 b). Esto indica que la pérdida de cooperatividad es independiente de la pérdida de la activación por potasio, y el cambio conformacional dado por el sustra-

to estaría restringido a una cierta parte de la proteína que no alcanza a alterar la orientación espacial, o el microambiente, de la región de la proteína comprometida en la interacción entre las subunidades. La independencia entre las alteraciones del coeficiente de Hill y la activación por potasio, se reflejan también en el hecho que la enzima nativa y la sin cooperatividad son moduladas en igual forma por el potasio y el Fru-1,6-P₂ (figura 20).

Las constantes de velocidad de pseudo primer orden observadas (k_{obs}) para la modificación de la interacción cooperativa entre las subunidades, siguen una relación lineal con la concentración de cianato (figura 22 a), lo cual sugiere que el mecanismo de modificación de la enzima no presenta una etapa de velocidad limitante, y no requiere un complejo intermediario.

La gráfica del log de las constantes de velocidad de modificación de la cooperatividad en función del log de la concentración de cianato, permite calcular el orden cinético de la reacción respecto al cianato. Un orden cinético igual a 1,0 indica que una molécula de inactivador es requerida por unidad funcional de enzima para formar un complejo enzima-inactivador inactivo (Hollenberg y col., 1971). Como el orden cinético para la pérdida de la cooperatividad es cercano a 1,0 (figura 22 b), la modificación de sólo un tipo de grupos ϵ -amino de lisinas serían los responsables de la pérdida de la cooperatividad.

Cinética de modificación de la inhibición por AMP. La pérdida de la inhibición por AMP tiene características

cinéticas diferentes a las características que presenta la pérdida de la cooperatividad. La inhibición por AMP es protegida por el sustrato, no así la cooperatividad. Además, la inhibición por AMP es protegida totalmente por el nucleótido cuando éste se usa como agente protector, pero éste protege sólo parcialmente la pérdida de la cooperatividad (figuras 13, 19, 23). Esto sugiere que la modificación de la inhibición ocurre en el sitio de unión de AMP.

Finalmente, la cinética de modificación de la cooperatividad en ausencia de protectores es monofásica, a diferencia de la cinética de modificación de la inhibición que es **bifásica**. Este último comportamiento se podría explicar al menos de tres maneras: a) existe más de una familia de grupos reaccionantes relacionados con la inhibición por AMP, b) la modificación simultánea de la cooperatividad ejerce una influencia sobre la velocidad de modificación de la inhibición, c) la pérdida simultánea de la activación por potasio afecta la reactividad del grupo, o la familia de grupos, relacionado con la inhibición por AMP.

Para dilucidar esta interrogante se procedió a modificar la interacción entre las subunidades de la enzima sin alterar la constante de inhibición para AMP ni la activación por potasio. Posteriormente se estudió el comportamiento cinético de la pérdida de la inhibición por AMP cuando se está modificando simultáneamente la activación por potasio, en la enzima que no presenta cooperatividad. A este respecto, cabe recordar que en la Fru-P₂asa

renal nativa el potasio no tiene ningún efecto sobre la constante de inhibición para AMP (Hubert y col., 1970; Nakashima y Tuboi, 1976).

El resultado mostrado en la Figura 24 apoya la hipótesis de que el comportamiento bifásico de la velocidad de alteración de la inhibición por AMP, se debe a la influencia ejercida por la modificación simultánea de la cooperatividad. Esta influencia podría ser ejercida a través de un cambio conformacional ya que la constante de velocidad, para una concentración de cianato igual a 50 mM, de la fase lenta de la modificación de K_i (figura 23) es muy similar a la constante de velocidad de modificación de K_i obtenida cuando la enzima no tenía cooperatividad. En este último caso, el supuesto cambio conformacional habría ocurrido a causa de la modificación de la cooperatividad. Es importante señalar que este cambio conformacional no altera la cinética de modificación del coeficiente de Hill.

Al igual que para la modificación de la cooperatividad, el orden cinético de la reacción de modificación de K_i respecto al cianato es cercano a 1,0 sugiriendo la participación de sólo un tipo de residuos lisina en esta reacción. Estos residuos lisina son diferentes a aquellos comprometidos en la interacción entre las subunidades.

Residuos lisina con reactividad diferenciada. Una prueba adicional que apoya la existencia de grupos ϵ -amino de residuos lisina implicados en la cooperatividad, diferentes a los que participan en la inhibición por AMP, es la

entregada por los experimentos sobre el efecto de la temperatura en la inhibición de la enzima por AMP (tabla 9), y en la interacción de los derivados cianato-enzima con la sefarosa azul (figuras 27, 28). La enzima que presenta alteración tanto en el K_i para AMP como en su cooperatividad muestra una inhibición por AMP en función de la temperatura, y una interacción con la sefarosa azul, muy diferentes a la enzima que sólo tiene modificada la cooperatividad. Esta última se comporta en forma similar a la proteína nativa, indicando que la modificación, en esas condiciones, sólo introduce un pequeño cambio en las propiedades catalíticas de la enzima, no afectando significativamente el sitio alostérico para AMP. La inhabilidad de la enzima modificada en el K_i por AMP de unirse a la sefarosa azul es consistente también con una modificación del sitio de unión del nucleótido. Sin embargo, los resultados de carbamilación indican que aún cuando la enzima está totalmente modificada y no se une a sefarosa azul, su sensibilidad al AMP no está totalmente eliminada, sugiriendo que la presencia del grupo carbamilo impide, pero no previene completamente, el acceso del AMP a este sitio.

Por otro lado, el residuo lisina relacionado a la cooperatividad debería ocupar una posición con un considerable grado de libertad en o cerca del sitio alostérico, donde la introducción del grupo carbamilo no perturbaría significativamente la unión del AMP. La cercanía de este residuo al sitio alostérico para AMP es apoyada también por los resultados con AMP_{ox}, pues éste

no fue capaz de modificar completamente la cooperatividad en la presencia de AMP.

Una posibilidad muy atrayente es que este residuo se encuentre en el péptido-S, de manera que al empaquetarse la proteína quede cerca del sitio de unión del AMP, el cual se encontraría en la proteína-S. Los experimentos de localización de los fragmentos que contienen los residuos reactivos (resultados que se discutirán más adelante, y los estudios de resonancia nuclear magnética de ^{31}P -AMP del derivado cianato-enzima que no presenta cooperatividad (Slebe y col., 1984), apoyan esta idea. Por otro lado, se podría sugerir que los grupos ϵ -amino responsables de la cooperatividad están localizados en la interfase de las subunidades, y son requerimiento esencial para la interacción cooperativa entre ellas. Si esto fuera así, sería análogo a lo que sucede en el caso del grupo sulfhidrilo 93 de la cadena β de la hemoglobina (Simon y col., 1971; Moffat y col., 1971). Los autores demostraron mediante modificación química que este grupo está comprometido en los cambios estructurales que acompañan a la cooperatividad de esta proteína.

Los resultados aquí descritos coinciden parcialmente con los informados previamente (Marcus y Hubert, 1968; Colombo y col., 1972; Colombo y Marcus, 1974). En estos trabajos, los autores demuestran que mediante modificación química se puede obtener una pérdida de la inhibición por AMP sin afectar la actividad catalítica de la Fru- P_2 asa. Sin embargo, en ninguno de estos tra-

bajos se ha postulado que la inhibición por AMP y la cooperatividad entre los sitios de unión de éste radiquen en residuos diferentes de la proteína. Así, la modificación de residuos de lisina con piridoxal-P produce una enzima que no es inhibida por AMP y que no presenta cooperatividad (Colombo y col., 1972). La modificación con cianato también produce una pérdida de la cooperatividad, pero a diferencia de la modificación realizada con piridoxal-P, no produce una pérdida de la inhibición por AMP. Esto permite distinguir dos clases de grupos ϵ -amino de lisinas con reactividad diferencial involucrados en la cooperatividad y en la inhibición por AMP.

Una posible explicación a esta discrepancia se puede dar aceptando la hipótesis que la región de la proteína que contiene el sitio de unión de AMP está cerca de la región relacionada con la cooperatividad. De esta forma, una modificación de una de las dos regiones con piridoxal-P, y en forma similar AMP_{ox} , produciría una gran distorsión en los microambientes comprometidos, a causa del gran volumen del reactivo modificador. Esto impediría separar la modificación de la cooperatividad de la alteración del sitio de unión de AMP. Por otro lado, el pequeño tamaño del cianato permite hacer la modificación sin introducir grandes cambios en la estructura de la proteína, haciendo posible modificar selectivamente la cooperatividad sin alterar el sitio de unión de AMP.

Los resultados de incorporación de cianato radiactivo (tabla 6 y figura 29) y los gráficos de Tsou (figuras 30, 31)

sugieren que la enzima posee dos grupos amino por subunidad los cuales se carbamilan y son esenciales para la inhibición alostérica de la enzima por AMP. Esto está de acuerdo con los datos cinéticos, los cuales muestran que sólo una molécula de reactivo debe unirse por subunidad para producir la pérdida de interacción cooperativa o la alteración de la inhibición de la enzima por AMP. La diferencia en el número de residuos esenciales para la cooperatividad, obtenidos en presencia y ausencia de Fru-1,6-P₂, podría estar de acuerdo con el efecto sinérgico en la unión de ambos ligandos y en el cambio formacional ocasionado por el sustrato. Utilizando espectroscopía diferencial UV, McGrane y col. (1983) han demostrado que el Fru-1,6-P₂ no sólo produce un cambio conformacional al interaccionar en el sitio catalítico, sino que también podría interaccionar con un sitio alostérico (inhibitorio) para el sustrato.

Ubicación de lisinas en estructura primaria. La localización preliminar de los residuos lisina relacionados a la inhibición por AMP, mostró (figura 32) que el residuo esencial para la afinidad de la enzima por el nucleótido se encuentra en la proteína-S y no en el fragmento correspondiente al péptido-S. Este resultado está de acuerdo con aquellos obtenidos con AMP_{ox} (este trabajo), 8-azido-AMP (Marcus y col., 1981) y piridoxal-P (Cruz y col., 1979; Marcus y col., 1981). No obstante, con la enzima de riñón de cerdo Marcus y col. (1981) informan que también se obtiene una pequeña (~ 10%) incorporación de piridoxal-P en el péptido-S, la que podría deberse a la pérdida de cooperatividad.

Por el contrario, cuando se analizó la incorporación de cianato en el derivado I (marca en el residuo relacionado a la cooperatividad) se encontró incorporación en la proteína-S y en el péptido-S. Puesto que el derivado III (marca inespecífica) mostró sólo incorporación en la proteína-S, se infirió que el péptido-S contiene el residuo lisina asociado con la interacción cooperativa entre los sitios de unión de AMP.

La localización definitiva de los residuos lisina asociados a la inhibición de la enzima por AMP se estableció por los análisis de composición y secuencia de los péptidos radiactivos provenientes de la fragmentación de los derivados I y II. La comparación (ver figura 5, Apéndice) de la secuencia obtenida para el péptido que contiene el residuo lisina relacionado a la cooperatividad, con la del extremo carboxilo terminal del péptido-S de la Fru-P₂asa de riñón de cerdo (Marcus y col., 1981), hígado de conejo (El-Dorry y col., 1977) e hígado de oveja (Fisher y Thompson, 1983) muestra absoluta identidad entre las posiciones Lys-50 a Tyr-57. Debido al bajo rendimiento en la degradación manual en las últimas etapas, no se detectaron los PTH-aminoácidos correspondientes a las posiciones subsiguientes. La identidad de las secuencias de los péptidos-S de estas tres enzimas, a partir de Lys-50, refleja el rol funcional que debe tener esta región de la enzima.

La localización de los residuos lisina asociados al **sitio de unión de AMP** tiene un cierto grado de incertidumbre. En efecto, la secuencia que se obtuvo difiere de la región Lys-141-Lys-150 que es el fragmento donde se une piridoxal-P (Marcus y col., 1982; Suda y col., 1982) y presumiblemente AMP_{ox} (ver figura 4, Apéndice). Por el contrario, muestra una alta homología (figura 2, Apéndice) con la región comprendida entre los residuos -44 a -36 del fragmento carboxilo terminal de la Fru-P₂asa de hígado de conejo (Xu y col., 1982) y casi completa identidad (figura 1, Apéndice) con el fragmento Ala-291-Lys-299 de la enzima de riñón de cerdo (Marcus y col., 1982) y el correspondiente en la enzima de oveja (Fisher y Thompson, 1983) (para comparación ver figura 6, Apéndice). Sin embargo, a pesar que la comparación de las secuencias del nonapéptido proveniente de las Fru-P₂asas de riñón de cerdo muestra una sola posición diferente, lamentablemente ésta corresponde a aquella del residuo marcado. La divergencia podría deberse a que Marcus y col. (1981) utilizan carbamilación de lisinas para obtener hidrólisis triptica sólo en residuos arginina. Puesto que el PTH-homocitrulina y PTH-glicina presentan tiempos de elución en HPLC similares, la lisina carbamilada (al no utilizarse [¹⁴C] cianato) podría aparecer como glicina. Por cierto que otra posibilidad podría ser que el péptido DII-HPIII, que presenta una pequeña contaminación, no contuviera [¹⁴C] homocitrulina y que ésta correspondiera al péptido contaminante. Sin embargo, debería darse la coincidencia que el fragmento contaminan

te tuviera, a su vez, la marca en el residuo correspondiente a la posición dos de su secuencia, pues al hacer la degradación de Edman la radiactividad aparece después del segundo ciclo. De acuerdo a la composición de aminoácidos, y especulando un poco, el contaminante podría corresponder al presumible sitio descrito para la unión de AMP (Suda y col., 1982; Marcus y col., 1982), pero si este fuera el caso, la marca debería de haber aparecido después del primer ciclo o bien después del primer y segundo ciclo. Los análisis de secuencia no dan cuenta de esta contaminación (figura 7, Apéndice).

Por otro lado, Marcus y col. (1982) encontraron que en la enzima de riñón de cerdo la secuencia alrededor de la Lys-141 (Tyr-Arg-Lys-Asn-Ser) es casi idéntica a la secuencia Tyr-Arg-Lys-Lys-Ser descrita por el grupo de Horecker (Suda y col., 1982). Sin embargo, un análisis de ambos resultados muestra que los péptidos trípticos correspondientes son diferentes (figura 4, Apéndice). Esto no es lo esperado para el fragmento que contiene el sitio alostérico para AMP, el que debería de presentar una alta homología y ser altamente conservado en fructosa-1,6-bisfosfatasas.

Activación por K^+ . La activación de Fru- P_2 asa por cationes monovalentes ha sido estudiada (Hubert y col., 1970; Marcus, 1975; Nakashima y Tuboi, 1976; Singh y col., 1980; Morikofer-Zweg, 1983), pero la naturaleza de la activación permanece incierta. Aunque un gran número de otras enzimas se han descrito que son también activadas por cationes monovalentes (Evans y Sorger,

1966; Suelter, 1974; Friedberg, 1974), el mecanismo mediante el cual se produce la activación no es bien conocido. Se ha propuesto como función general la inducción de un cambio conformacional en la enzima, para dar su forma activa (Evans y Sorger, 1966). Así, en la quinasa pirúvica, primera enzima en la que se demostró que se requerían cationes monovalentes para su actividad (para revisión, Nowak y Suelter, 1981), las investigaciones iniciales fueron consistentes con la proposición que los cationes monovalentes activadores inducían un cambio conformacional en la proteína para dar su forma activa (Suelter y col., 1966), pero posteriormente se estableció un papel más directo para los cationes monovalentes, implicando un sitio específico de interacción en la enzima (Nowak y Mildvan, 1972; Nowak, 1976).

En Fru-P₂asa se ha sugerido (Marcus, 1975) que el catión monovalente podría inducir un cambio conformacional en la proteína, actuando en un sitio distinto al sitio catalítico. Por otro lado, se ha propuesto también la presencia de dos sitios distintos para la acción de los cationes monovalentes (Nakashima y Tuboi, 1975). Uno es el sitio catalítico, en el cual el ión estaría promoviendo la catálisis enzimática, y el otro sería un sitio alostérico que estaría involucrado en la inducción de un cambio conformacional generalizado de la enzima.

Los resultados presentados en este trabajo indican que en la Fru-P₂asa de riñón de cerdo el K⁺ tendría un doble efecto sobre las curvas de saturación de la enzima por Fru-1,6-P₂ (figuras 16, 49). La inhibición de la enzima a bajas concentraciones

de sustrato ($< 25 \mu\text{M}$) está de acuerdo con el efecto sugerido para las enzimas de hígado de conejo (Nakashima y Tuboi, 1976) y de rata (Mörikofer-Zwez, 1983). La activación a concentraciones mayores de sustrato, inicialmente descrita para las enzimas de riñón de cerdo, hígado y músculo de conejo, e hígado de pescado (Raja chilensis, Genipterus chilensis) (Hubert y col., 1970), fue ratificada y ampliada para otras Fru- P_2 asa (Tejwani y col., 1976; Singh y col., 1980). Estos resultados nos indujeron a postular (Slebe y col., 1980; 1981) un modelo en el cual el K^+ actuaría disminuyendo la afinidad de la Fru- P_2 asa de riñón de cerdo por Fru-1,6- P_2 , tanto a nivel del sitio catalítico, como del postulado sitio alostérico para el sustrato (de Maine y Benkovic, 1972; Marcus y col., 1973; Nimmo y Tipton, 1975 a; Slebe y col., 1981; Meek y Nimmo, 1983).

Inhibición por sustrato. La inhibición de la enzima por sustrato ha sido observada en numerosos laboratorios (para revisiones ver Benkovic y de Maine, 1982; Tejwani, 1983), pero sólo con concentraciones relativamente altas de Fru-1,6- P_2 ($> 0,1 \text{ mM}$), lo cual produce dudas acerca de su rol como mecanismo regulatorio fisiológico. Los resultados mostrados en la figura 16 indican que Fru-1,6- P_2 es inhibidor a concentraciones micromolares y muy sensible a K^+ , de manera que a concentraciones de K^+ alrededor de su concentración intracelular, la inhibición por exceso de sustrato es eliminada. De esta manera, la activación por el catión monovalente se debe a una reversión de la inhibición por sustrato, ya sea por competencia directa por el segundo sitio

de unión para Fru-1,6-P₂, o a través de un sitio de unión independiente para el catión monovalente.

Un hecho que apoyaría la hipótesis de que el potasio actúa afectando la inhibición por exceso de sustrato es que la máxima activación por cationes monovalentes se obtiene a pH neutro (Hubert y col., 1970), y la máxima inhibición por exceso de sustrato (en ausencia de K⁺) también se observa a pH neutro (Taketa y Pogell, 1965). Así, a pH alcalino el potasio no activaría porque a ese pH no existe inhibición por exceso de sustrato.

Aunque se ha realizado un gran número de estudios de modificación química (para revisión, Benkovic y de Maine, 1982), sólo se ha implicado a residuos arginina en la activación de la Fru-P₂asa por cationes monovalentes (Marcus, 1975). Los datos sobre la naturaleza de la interacción de cianato con la Fru-P₂asa indican que, en forma similar a los reactivos específicos de grupos sulfhidrilos (Reyes y col., 1984; 1985), el cianato reacciona específicamente con un grupo tiol en el sitio de acción para el K⁺. A diferencia de otros bloqueadores, es decir N-etilmaleimida, la reacción es reversible. Esto establece que los residuos cisteína son esenciales para la activación por cationes monovalentes.

En los estudios iniciales, por ejemplo Tabla 6, la presencia de K⁺ y Fru-1,6-P₂, incluidos en el sistema de modificación, previno la disminución en la actividad específica, interpretándose este resultado como que no habría habido modificación del sitio

catalítico. Sin embargo, al estudiar el efecto de la concentración de potasio sobre la función de saturación de fructosa 1,6-bisfosfatasa carbamilada (figura 49), se observó una pérdida de actividad catalítica similar a la descrita en la Tabla 16. Esta discrepancia se explica por una compensación de la pérdida de actividad en la enzima modificada, por un aumento en la actividad debido a la pérdida de inhibición por exceso de sustrato, situación que no ocurre a bajas concentraciones de sustrato. El efecto de K^+ a bajas concentraciones de Fru-1,6- P_2 (efecto inhibitorio) es similar en la enzima nativa y en la carbamilada, sugiriendo que el sitio catalítico no es afectado y que probablemente la enzima carbamilada corresponde a una inactivación parcial de todas las moléculas de enzima, más que a una mezcla de moléculas totalmente activas e inactivas (Means y Feeney, 1971). No obstante, la caída en la actividad enzimática es corregida puesto que la activación por K^+ se expresa como una razón entre las actividades medidas en presencia y ausencia del catión monovalente.

La pérdida y recuperación simultánea de la activación por K^+ e inhibición por exceso de sustrato, sugiere que los grupos cisteína comprometidos en estas propiedades tendrían reactividad similar y estarían localizados en forma próxima. Una posibilidad atrayente es que haya un solo grupo tiol implicado en ambas propiedades.

Como el orden cinético para la pérdida de activación por

potasio es cercano a 1,0 para la fase rápida, habría sólo una familia de grupos reaccionantes implicados en esta fase de la reacción, con un valor de pK igual a 7,2 (Slebe y col., 1984 a), valor que está dentro de los esperados para grupos sulfhidrilos de reactividad desusada (Stark, 1964; Means y Feeney, 1971). Sin embargo, los resultados obtenidos no nos dan claridad acerca del o los grupos comprometidos en la fase lenta de la reacción.

Por otro lado, los resultados de incorporación de cianato radiactivo (tabla 6 y figura 29) y los análisis de Tsou (figura 47) sugieren que la enzima posee dos grupos cisteína por tetrámero que son esenciales para la activación por cationes monovalentes. Estos resultados son apoyados por datos recientes de modificación de la activación por K^+ con N-etilmaleimida. En este caso hay una incorporación de 1 mol de NEM/mol monómero, siendo sólo dos residuos/tetrámero los esenciales para la activación (datos no publicados).

La protección parcial de la pérdida de activación de la enzima por cationes monovalentes ejercida por AMP (figura 45), se puede explicar a base de un cambio conformacional inducido por el nucleótido. Este haría que la región responsable de la activación por los cationes monovalentes esté menos expuesta al solvente y apoyarían la idea de que el inhibidor alostérico AMP interactúa con la enzima en ausencia de sustrato. Como se comentó anteriormente, hay desacuerdo acerca de la interacción de AMP con la enzima libre. Al respecto, Meek y Nimmo (1984) no encuentran unión de AMP a la enzima de hígado de rata en ausencia

de Fru-1,6-P₂. Para explicar la unión del nucleótido a la enzima libre, observada por McGrane y col. (1983), ellos han sugerido que algunas preparaciones enzimáticas pudieran contener fructosa-2,6-bisfosfato, lo que permitiría obtener unión de AMP en ausencia de ambos fructosa-bisfosfatos. En algunos experimentos preliminares de resonancia magnética nuclear con la enzima de riñón de cerdo, usando la sonda natural ³¹P-AMP, no se encontraron señales de resonancia correspondientes a estos azúcares fosfatos. Más aún, recientemente se ha demostrado que el AMP aumenta considerablemente la reactividad hacia NEM del residuo cisteína relacionado con la activación por K⁺, indicando que el nucleótido se uniría a la enzima en ausencia de Fru-1,6-P₂ (Reyes y col., 1985). El aumento de la reactividad del tiol, inducido por AMP puede interpretarse como un cambio conformacional en el sitio inhibitorio para el sustrato, producido por la unión de AMP a su sitio alostérico. El hecho que este efecto no sea tan marcado en los experimentos de carbamilación, no tiene una explicación evidente. Sin embargo, podría reflejar la diferente naturaleza de los reactivos modificadores empleados. Este efecto requerirá un estudio más refinado.

Efecto de Mg²⁺. Las Fru-P₂asas, en ausencia de K⁺, son inhibidas por altas concentraciones de Mg²⁺ (> 2 mM) (figura 50) (Tashima y Yoshimura, 1975). Un hecho notable es que la enzima carbamilada pierde la inhibición por el catión divalente, lo que se refleja en un incremento de la actividad enzimática a altas concentraciones de Mg²⁺. Este hecho, unido a que en presencia

de potasio se observa una disminución de la actividad en las mismas condiciones, insinúa que la activación de la enzima por K^+ puede deberse en parte al anulamiento de la inhibición de la Fru- P_2 asa por Mg^{2+} . Por otra parte, los resultados muestran que la carbamilación produce un aumento de la K_a para Mg^{2+} . Es interesante recordar que la activación por cationes monovalentes puede a su vez eliminarse por la modificación de residuos arginina con butanodiona (Marcus, 1975). Sin embargo, se desconoce si este tratamiento altera la afinidad de la enzima por el catión divalente, puesto que el pequeño cambio que se describe en el K_a para Mg^{2+} (de 0,35 a 0,41 mM) se obtuvo en ausencia de K^+ . Estos resultados establecen que el residuo cisteína reactivo comprometido en la activación por potasio, está también relacionado con las inhibiciones de la enzima por exceso de sustrato y Mg^{+2} .

Efecto de Fru-2,6- P_2 . La considerable protección ejercida por Fru-2,6- P_2 contra la modificación del grupo tiol reactivo, comparada con la que presenta el Fru-1,6- P_2 , indicaría que el residuo cisteína está ubicado en un sitio que presenta una alta afinidad de unión por el Fru-2,6- P_2 , que no es el sitio catalítico; eventualmente sería un sitio alostérico. Debido a la alta afinidad de la enzima por el sustrato ($K_m < 10 \mu M$), la protección parcial ejercida por Fru-1,6- P_2 a bajas concentraciones probablemente refleja un cambio conformacional inducido por la unión del sustrato al sitio catalítico. Sin embargo, una protección

total de la activación por K^+ se obtuvo en presencia de concentraciones inhibitorias de sustrato (figura 51), lo que refuerza la idea que la cisteína reactiva está relacionada con el sitio alostérico postulado para Fru-1,6-P₂, responsable de la inhibición por exceso de sustrato. La posibilidad surge ahora que este segundo sitio para Fru-1,6-P₂ realmente corresponda a un sitio alostérico para Fru-2,6-P₂, al cual también pudiera unirse el sustrato, pero con menor afinidad.

El mecanismo de la inhibición de la Fru-P₂asa por Fru-2,6-P₂ es incierto. Algunos autores (Van Schaftingen y Hers, 1981; François y col., 1983; Meek y Nimmo, 1983) han propuesto la existencia de un sitio alostérico para el Fru-2,6-P₂. Otros, sin embargo, postulan una interacción del Fru-2,6-P₂ sólo a nivel del sitio catalítico de la enzima (Pilkis y col., 1981; Gottschalk y col., 1982; Ganson y Fromm, 1982; Pontremoli y col., 1982; McGrane y col., 1983; Kitajima y Uyeda, 1983). Los datos presentados en este trabajo indican que el residuo cisteína altamente reactivo estaría en, o en estrecha relación con, un sitio alostérico para Fru-2,6-P₂.

Recientemente, Chatterjee y col. (1984) también caracterizaron un grupo tiol altamente reactivo en la Fru-P₂asa de riñón de cerdo, pero ellos no relacionaron este grupo reactivo (Cys 128) con la propiedad de la enzima de activarse por cationes monovalentes. Aunque la identificación de la Cys-128 se basó en modificación con yodoacetamida, parecería que el mismo re-

siduo reacciona específicamente con cianato y con N-etilmaleimida (Reyes y col., 1984; 1985), puesto que la enzima modificada con yodoacetamida, N-etilmaleimida o cianato muestra un comportamiento similar frente a cationes divalentes.

A pesar de que no es posible con los datos presentes establecer si el residuo cisteína reactivo se encuentra próximo, o es parte, del sitio alostérico para Fru-2,6-P₂, es interesante destacar que la región de la molécula de enzima que contiene a la Cys-128 está altamente conservada en la Fru-P₂asa de diferentes especies (Chatterjee y col., 1984). Es razonable postular entonces que esta región pudiera corresponder al sitio de unión de Fru-2,6-P₂ en la Fru-P₂asa.

Con todo, aun entre los autores que apoyan la existencia de un sitio específico para Fru-2,6-P₂ en la Fru-P₂asa existen desacuerdos en algunos puntos. François y col. (1983) concluyen que el Fru-2,6-P₂ interactúa sólo con el sitio alostérico en la Fru-P₂asa de hígado de rata, mientras que Meek y Nimmo (1983; 1984) sugieren que el azúcar-bisfosfato puede unirse tanto al sitio catalítico como al sitio alostérico. Aunque nuestros resultados con la enzima de riñón de cerdo favorecen la interacción del Fru-2,6-P₂ con el sitio alostérico específico, se requieren estudios adicionales para resolver la controversia.

Conclusiones finales y proyecciones.

Los resultados de este trabajo establecen la existencia de residuos lisina de reactividad diferencial relacionados con la inhibición por AMP. Mediante modificación química selectiva de estos residuos es posible separar el efecto cooperativo del inhibidor de la afinidad de la enzima hacia el nucleótido, lo que permitió caracterizar preliminarmente las regiones de la molécula relacionadas con estas dos propiedades. Esta modificación diferenciada abre perspectivas que hacen a este sistema un buen modelo para el estudio de los mecanismos moleculares de la cooperatividad en enzimas alostéricas. Por esta razón, es predecible que aparecerán estudios más concluyentes acerca de la naturaleza del sitio de unión de AMP, así como también de la caracterización fisicoquímica de los residuos comprometidos en la interacción del nucleótido con la enzima.

Por otra parte, se muestra que existen residuos cisteína que son esenciales para la activación de la enzima por cationes monovalentes. Asimismo, estas cisteínas reactivas estarían asociadas a un sitio alostérico para Fru-2,6-P₂, el cual puede unir Fru-1,6-P₂ con menor afinidad que el sitio catalítico. Estos hechos refuerzan la noción de que existe una estrecha relación entre los mecanismos de activación por K⁺ y de inhibición por exceso de sustrato.

Dado el significado funcional que tendría la existencia de un sitio alostérico para Fru-2,6-P₂ en fructosa-1,6-bisfosfata-

sas, ubicado probablemente en Cys-128 como se comentó, es esperable que se dirija un gran esfuerzo hacia el estudio de la naturaleza de este sitio. En este sentido, estudios de modificación química como los descritos serían de gran importancia.

Indudablemente estos estudios de modificación química deberán complementarse con otras técnicas dirigidas a analizar el microambiente de los sitios regulatorios de la enzima. Con este propósito, es atrayente la posibilidad de usar derivados fluorados de AMP y de los fructosa-bisfosfatos, como sondas de mayor sensibilidad en estudios de resonancia magnética nuclear.

Finalmente, teniendo en mente las nociones en boga acerca de la organización del citoplasma intracelular, en relación a que las enzimas se encontrarían formando complejos multiproteicos, ya sea con proteínas estructurales del citoesqueleto o con enzimas de su misma vía metabólica (Ureta, 1985), es de interés estudiar la interacción de Fru-P₂asa con otras macromoléculas. Este es un campo poco explorado y es concebible que las propiedades regulatorias de la enzima (activación por K⁺, inhibiciones por AMP y Fru-2,6-P₂) sean alteradas por estas interacciones putativas.

Parece así que el estudio de las propiedades regulatorias de la fructosa-1,6-bisfosfatasa continuará siendo un campo de muy activa investigación.

APENDICE

AcThr-Asp-Gln-Ala-Ala-Phe-Asp-Thr-Asn-Ile-Val-Thr-Leu-Thr-Arg-Phe-Val-Met-Glu-Gln-	10	20
Gly-Arg-Lys-Ala-Arg-Gly-Thr-Gly-Glu-Met-Thr-Gln-Leu-Leu-Asn-Ser-Leu-Cys-Thr-Ala-	30	40
Val-Lys-Ala-Ile-Ser-Thr-Ala-Val-Arg-Lys-Ala-Gly-Ile-Ala-His-Leu-Tyr-Gly-Ile-Ala-	50	60
Gly-Ser-Thr-Asn-Val-Thr-Gly-Asp-Gln-Val-Lys-Lys-Leu-Asp-Val-Leu-Ser-Asn-Asp-Leu-	70	80
Val-Ile-Asn-Val-Leu-Lys-Ser-Ser-Phe-Ala-Thr-Cys-Val-Leu-Val-Thr-Glu-Glu-Asp-Lys-	90	100
Asn-Ala-Ile-Ile-Val-Glu-Pro-Glu-Lys-Arg-Gly-Lys-Tyr-Val-Val-Cys-Phe-Asp-Pro-Leu-	110	120
Asp-Gly-Ser-Ser-Asn-Ile-Asp-Cys-Leu-Val-Ser-Ile-Gly-Thr-Ile-Phe-Gly-Ile-Tyr-Arg-	130	140
Lys-Asn-Ser-Thr-Asp-Glu-Pro-Ser-Glu-Lys-Asp-Ala-Leu-Gln-Pro-Glu-Arg-Asn-Leu-Val-	150	160
Ala-Ala-Gly-Tyr-Ala-Leu-Tyr-Gly-Ser-Ala-Thr-Met-Leu-Val-Leu-Ala-Met-Val-Asn-Gly-	170	180
Val-Asn-Cys-Phe-Met-Leu-Asp-Pro-Ala-Ile-Gly-Glu-Phe-Ile-Leu-Val-Asp-Arg-Asn-Val-	190	200
Lys-Ile-Lys-Lys-Lys-Gly-Ser-Ile-Tyr-Ser-Ile-Asn-Glu-Gly-Tyr-Ala-Lys-Glu-Phe-Asp-	210	220
Pro-Ala-Ile-Thr-Glu-Tyr-Ile-Glu-Arg-Lys-Lys-Phe-Pro-Pro-Asp-Asn-Ser-Ala-Pro-Tyr-	230	240
Gly-Ala-Arg-Tyr-Val-Gly-Ser-Met-Val-Ala-Asp-Val-His-Arg-Thr-Leu-Val-Tyr-Gly-Gly-	250	260
Ile-Phe-Met-Tyr-Pro-Ala-Asn-Lys-Lys-Ser-Pro-Lys-Gly-Lys-Leu-Arg-Leu-Leu-Tyr-Glu-	270	280
Cys-Asn-Pro-Met-Ala-Tyr-Val-Met-Glu-Lys-Ala-Gly-Gly-Leu-Ala-Thr-Thr-Gly-Lys-Glu-	290	300
Ala-Val-Leu-Asp-Ile-Val-Pro-Thr-Asp-Ile-His-Gln-Arg-Ala-Pro-Ile-Ile-Leu-Gly-Ser-	310	320
Pro-Glu-Asp-Val-Thr-Glu-Leu-Leu-Glu-Ile-Tyr-Gln-Lys-His-Ala	330	335

Figura 1A. Secuencia de aminoácidos del monómero de la fructosa 1,6-bisfosfatasa de riñón de cerdo. Tomada de Marcus y col. (1982).

Sitio Activo

Hígado de conejo:	²⁷¹ Pro-Asp-Gly-Lys*-Leu-Arg-Leu-Leu-Tyr-Glu-Cys ²⁸¹	(1)
Riñón de cerdo:	Pro-Lys-Gly-Lys*-Leu-Arg-Leu-Leu-Tyr-Glu-Cys	(2)
Hígado de oveja:	Pro-Ser-Gly-Lys-Leu-Arg-Leu-Leu-Tyr-Glu-Cys	(3)

Sitio Alostérico para AMP

Hígado de conejo:	¹⁴⁰ Arg-Lys*-Lys*-Ser-Thr-Asp-Ala-Leu-Gln-Gly-Arg ¹⁵⁰	(4)
Riñón de cerdo:	Arg-Lys*-Asn-Ser-Thr-Asp-Glu-Pro-Ser-Glu-Lys	(2)
Hígado de oveja:	Lys-Lys-Ile-Ser-Lys-Asp-Asp-Pro-Ser-Glu-Lys	(3)

Figura 4A. Secuencia de aminoácidos alrededor de las lisinas reactivas de diversas fructosa-1,6-bisfosfatasa. La identificación de las lisinas reactivas se realizó por modificación con piridoxal-fosfato, los residuos N⁶ (fosfopiridoxil)lisinas son indicados por los asteriscos. Las secuencias de la enzima de oveja se compatibilizaron por homología. Los números corresponden a la posición de los residuos dentro de la estructura primaria de la enzima de riñón de cerdo (Marcus y col., 1982). Datos de: 1, Xu y col. (1981), 2, Marcus y col. (1982); 3, Fisher y Thompson (1983) y, 4, Suda y col. (1982).

	50	57	
Esta tesis:	Lys [*] -Ala-Gly-Ile-Ala-His-Leu-Tyr		
Riñón de cerdo:	Lys-Ala-Gly-Ile-Ala-His-Leu-Tyr-Gly-Ile-Ala (1)		
Hígado de conejo:	Lys-Ala-Gly-Ile-Ala-His-Leu-Tyr-Gly-Ile-Ala (2)		
Hígado de oveja:	Lys-Ala-Gly-Ile-Ala-His-Leu-Tyr-Gly-Ile-Ala (3)		

Figura 5A. Comparación de las secuencias del extremo carboxilo-terminal del péptido-S de diferentes fructosa-1,6-bisfosfatasas con la responsable de la cooperatividad hacia AMP en la enzima de riñón de cerdo. Los números corresponden a la ubicación del residuo dentro de la estructura primaria de la enzima de riñón de cerdo. El asterisco muestra el residuo lisina que se modifica con cianato. Datos de: 1, Marcus y col. (1981); 2, El-Dorry y col. (1977); 3, Fisher y Thompson (1983).

	291	299	
Esta tesis:	Ala-Lys [*] -Gly-Leu-Ala-Thr-Thr-Gly-Lys		
Hígado de conejo:	Ala-Phe-Ile-Met/Ala-Thr-Thr-Gly-Lys (1)		
Riñón de cerdo:	Ala-Gly-Gly-Leu-Ala-Thr-Thr-Gly-Lys (2)		
Hígado de oveja:	Ala-Gly-Gly-Met-Ala-Thr-Thr-Gly-Lys (3)		

Figura 6A. Comparación de la secuencia supuestamente relacionada con el sitio de unión de AMP con secuencias complementarias de diferentes fructosa-1,6-bisfosfatasas. Los números corresponden a la ubicación del residuo dentro de la secuencia del tetrámero de la enzima de riñón de cerdo. El asterisco muestra el residuo lisina que se modifica con cianato. Datos de: 1, Xu y col. (1982); 2, Marcus y col. (1982) y, 3, Fisher y Thompson (1983).

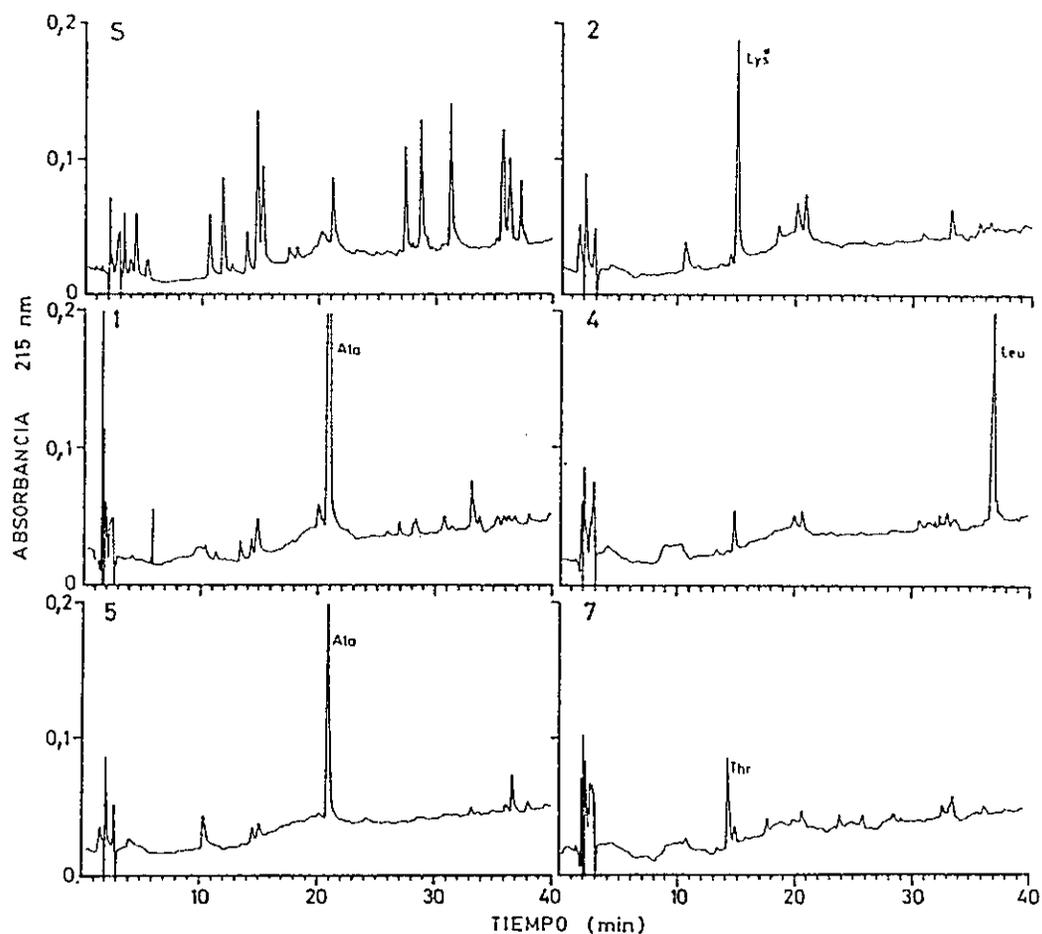


Figura 7A. Separación de PTH-aminoácidos por HPLC. S, corresponde a una mezcla de PTH-aminoácidos usados como patrones. Los números 1,2,4,5 y 7 corresponden a los ciclos de la degradación manual del fragmento DII-HPIII.

Arginina	2,3-butanodiona	No	12	-	+	+	+	nd	nd	nd	k
		Fru-1,6-P ₂	nd	-	±	+	+	nd	nd	nd	
		AMP	8, 2	-	+	-	+	nd	+	nd	
		Fru-1,6-P ₂ + AMP	4, 9	-	±	-	+	nd	nd	nd	
Cisteína	N-etilmaleimida	No	4, 8	+	+	+	-	nd	nd	nd	1
		Fru-1,6-P ₂	nd	+	-	+	nd	nd	nd	nd	
		AMP	nd	+	+	+	nd	nd	nd	nd	
		Fru-2,6-P ₂	nd	-	-	+	nd	nd	nd	nd	
Iodoacetamida		No	1, 2	+	nd	+	-	-	nd	nd	m
		AMP	3, 2	+	nd	+	-	-	nd	nd	
		No	4	+	nd	+	-	-	nd	nd	m
		AMP	4	+	nd	+	-	-	nd	nd	

^aSu consideran datos desde 1971. Los signos indican: -, no alteración; +, alteración; ±, alteración parcial; *, inactivación ($\geq 75\%$); nd, no determinado.

^bModificación con piridoxal-P y AMP_{ox} incluyen tratamiento con NaBH₄; 8-azido-AMP y 2-azido-AMP incluyen fotólisis.

^cSe modifican residuos lisina y cisteína.

^dCorresponden a S-carbamil-cisteína.

^eColombo y col., 1972; Colombo y Marcus, 1974. ^fMaccioni y col., 1979; Slebe y col., 1981. ^gEsta tesis. ^hMarcus y Haley, 1979; Riquelme y Czarnecki, 1983. ⁱSlebe y col., 1983. ^kMarcus, 1975, 1976. ^lReyes y col., 1985. ^mChatterjee y col., 1984.

REFERENCIAS

- Anderson, P.M. y Carlson, J.D. (1975). Reversible reaction of cyanate with a reactive sulfhydryl group at the glutamine binding site of carbamyl phosphate synthetase. *Biochemistry* 14, 3688-3694
- Ambler, R.P. (1972). Carboxypeptidases A and B. *Meth. Enzymol.* 25, 262-272
- Atkinson, D.E. (1970). Enzymes as control elements in metabolic regulation. En *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) vol. 1, 3^a ed., pp. 461-489, Academic Press, New York
- Babul, J. (1978). Phosphofructokinases from *Escherichia coli*. Purification and characterization of the non allosteric isozyme. *J. Biol. Chem.* 253, 4350-4355
- Babul, J. y Guixé, V. (1983). Fructose - bisphosphatase from *Escherichia coli*. Purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 944-949
- Behrisch, M.W. (1971). Temperature and the regulation of enzyme activity in poikilotherms. Regulatory properties of fructose diphosphatase from muscle of the alaskan king-crab. *Biochem. J.* 121, 399-409
- Benkovic, P.A., Caparelli, C.A., deMaine, M y Benkovic, S.J. (1978). Binding and kinetic data for rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase with Zn^{2+} as cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2185-2189
- Benkovic, S.J. y deMaine, M. (1982). Mechanism of action of fructose 1,6-bisphosphatase. *Adv. Enzymol.* 53, 45-82
- Black, W.J., Van Tol, A., Fernando, J. y Horecker, B.L. (1972). Isolation of a highly active fructose diphosphatase from rabbit muscle: Its subunit structure and activation by monovalent cations. *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 576-590

- Bloxham, D.P. y Lardy, H.A. (1973). Phosphofructokinase. En *The Enzymes* (Boyer, P., ed.), vol. 8, pp 240-278, Academic Press, New York
- Bloxham, D.P., Clark, M.G., Holland, P.C. y Lardy, H.A. (1973). A model study of the fructose diphosphatase-phosphofructokinase substrate cycle. *Biochem. J.* 134, 581-587
- Boehringer, C.F. y Soehne GmbH (1968). *Biochemica Catalogue*. Boehringer Mannheim Corp. USA
- Botelho, L.H., El-Dorry, H.A., Crivellaro, O., Chu, D.K., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1977). Digestion of rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase with subtilisin: Sites of cleavage and activity of the modified enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 184, 535-545
- Braunstein, A.E. (1973). Amino group transfer. En *The Enzymes* (Boyer, P., ed.), vol. 9, pp 379-481, Academic Press, New York
- Buchanan, B., Schürmann, P. y Kalberer, P. (1971). Ferredoxin activated fructose diphosphatase of spinach chloroplast. Resolution of the system, properties of the alkaline fructose diphosphatase component, and the physiological significance of the ferredoxin-linked-activation. *J. Biol. Chem.* 246, 5952-5959
- Byrne, W., Rajagolapan, G., Griffin, L., Ellis, E., Harris, T., Hochachka, P., Reid, L. y Geller, A. (1971). Bovine hepatic fructose 1,6-diphosphatase: Purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 118-133
- Cantor, C.R. y Schimmel, P.R. (1980). *Biophysical Chemistry*, part III: The behavior of biological macromolecules, pp 863, W.H. Freeman & Co., San Francisco, USA
- Cárdenas, M.L. (1982). Glucoquinasa, una enzima monomérica con cinética cooperativa. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1979). Kinetic cooperativity of glucokinase with glucose. *Arch. Biol. Med. Exp.* 12, 571-580
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1984). Suppression of kinetic cooperativity of hexokinase D (glucokinase) by competitive inhibitors. A slow transition model. *Eur. J. Biochem.* 145, 163-171
- Catálogo Bio-Rad (1976). Chromatography, electrophoresis and membrane filtration.
- Catálogo Pharmacia Fine Chemicals (1979). Gel filtration, theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals Co., Uppsala, Suecia
- Catálogo Whatman. Advanced ion exchange celluloses. Folleto Whatman IL-2
- Claus, T.H., El-Maghrabi, M.R., Regen, D.M., Stewart, H.B., McGrane, M., Kountz, P.D., Nyfeler, F., Pilkis, J. y Pilkis, S.J. (1984). The role of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of carbohydrate metabolism. *Curr. Top. Cell. Reg.* 23, 57-86
- Cohen, L.A. (1970). Chemical modification as a probe of structure and function. En *The Enzymes* (Boyer, P., ed.), vol. 1, pp 147-211, Academic Press, New York
- Colombo, G. y Marcus, F. (1973). Activation of fructose 1,6-diphosphatase by potassium ions. Loss upon conversion of neutral to alkaline form. *J. Biol. Chem.* 248, 2743-2745
- Colombo, G. y Marcus, F. (1974). Modification of fructose 1,6-diphosphatase with pyridoxal 5'-phosphate. Evidence for the participation of lysyl residues at the active site. *Biochemistry* 13, 3085-3091

- Colombo, G., Hubert, E. y Marcus, F. (1972). Selective alteration of the regulatory properties of fructose 1,6-diphosphatase by modification with pyridoxal 5'-phosphate. *Biochemistry* 11, 1798-1803
- Cornish-Bowden, A. (1979). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, pp 8-9, Butterworths Co., London
- Crestfield, A.M., Moore, S. y Stein, W.H. (1963). The preparation and enzymatic hidrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.* 238, 622-627
- Cruz, Z., Tanizaki, M.M., El-Dorry, H.A. y Bacila, M. (1979). On the nucleotide binding domain of fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 198, 424-433
- Cunningham, B.A., Raushel, F.M., Villafranca, J.J. y Benkovic, S.J. (1981). Distances between structural metal ion, substrates, and allosteric modifier of fructose bisphosphatase. *Biochemistry* 20, 359-362
- Chatterjee, T., Edelstein, I., Marcus, F., Eby, J., Reardon, I. y Henrikson, R. (1984). Identification of the highly reactive sulfhydryl group of pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase at cysteine 128. *J. Biol. Chem.* 259, 3834-3837
- Chou, A. y Wilson, J. (1974). A study of the sulfhydryl groups of rat brain hexokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 163, 191-199
- Daldal, F. y Fraenkel, D. (1983). Assessment of a futile cycle involving reconversion of fructose 6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate during gluconeogenic growth of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 153, 390-394

- Davis, B. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427
- Dayhoff, M. (ed.) (1969). *Atlas of Protein Sequence and Structure*, vol. 4, National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland
- deMaine, M.M. y Benkovic, S.J. (1972). On the mechanism of alkaline and neutral fructose 1,6-diphosphatase: Inhibition by substrate analogs at neutral pH. *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 272-279
- deMaine, M.M. y Benkovic, S.J. (1980). Selective modification of rabbit liver fructose biphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 205, 308-314
- Dzugaj, A., Chu, D., El-Dorry, A., Horecker, B.L. y Pontremoli, S. (1976). Isolation of the S-peptide formed on digestion of fructose 1,6-diphosphatase with subtilisin and its non-covalent association with the enzyme protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 638-646
- Easterbrook-Smith, S., Wallace, J. y Keech, D. (1976). Pyruvate carboxylase: Affinity labelling of the magnesium adenosine triphosphate binding site. *Eur. J. Biochem.* 62, 125-130
- Edman, P. y Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1, 80-91
- El-Dorry, H.A., Chu, D.K., Dzugaj, A., Botelho, L.H., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1977). Primary structure of the S-peptide formed by digestion of rabbit liver fructose biphosphatase with subtilisin. *Arch. Biochem. Biophys.* 182, 763-773

- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77
- Evans, G.T., Goss, N.H. y Harland, G.W. (1980). Pyruvate phosphate dikinase: Affinity labeling of the adenosine 5'-triphosphate-adenosine 5'-monophosphate site. *Biochemistry* 19, 5809-5814
- Evans, H.G. y Sorger, G.J. (1966). Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17, 47-76
- Fernando, J., Horecker, B.L. y Pontremoli, S. (1970). Fructose diphosphatase from rabbit muscle. III. Isolation of enzyme-substrate and enzyme-adenosine monophosphate complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 515-521
- Fisher, C.H. y Thompson, E.O.P. (1983). Amino acid sequence studies on sheep liver fructose-bisphosphatase. II. The complete sequence. *Aust. J. Biol. Sci.* 36, 235-250
- Fiske, C.H. y SubbaRow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375-400
- François, J., Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1983). On the mechanism of inhibition of neutral liver fructose 1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 134, 269-273
- Freidberg, F. (1974). Effects of metal binding on protein structure. *Quart. Rev. Biophys.* 7, 1-33
- Ganson, N.J. y Fromm, H.J. (1982). The effect of fructose 2,6-bisphosphate on the reverse reaction kinetics of fructose 1,6-bisphosphatase from bovine liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 233-239

- Garner, M.H., Bogardt, R.A.Jr. y Gurd, R.N. (1975). Determination of the pK values for the α -amino groups of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 250, 4398-4404
- Geller, A.M., Rajagopalan, G.T., Ellis, E.H. y Byrne, W.L. (1971). Modification of hepatic fructose 1,6-diphosphatase activity by proteolytic enzymes and sulfhydryl reagents. *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 134-143
- Gerhart, J.C. y Pardee, A.B. (1962). The enzymology of control by feedback inhibition. *J. Biol. Chem.* 237, 891-896
- Gerhart, J.C. y Schachman, H.K. (1965). Distinct subunits for the regulation and catalytic activity of aspartate transcarbamylase. *Biochemistry* 4, 1054-1062
- Ginsburg, A. (1969). Conformational changes in glutamine synthetase from *Escherichia coli*. Some characteristics of the equilibrium binding of feedback inhibitors to the enzyme. *Biochemistry* 8, 1726-1740
- Glazer, A.N. (1970). Specific chemical modification of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 39, 101-130
- Glazer, A.N., Delange, R.J. y Sigman, D.S. (1975). *Chemical Modification of Proteins*, pp 113-126. North-Holland Publishing Co., 1^a ed., Amsterdam, Holanda
- Gomori, G. (1943). Hexosediphosphatase. *J. Biol. Chem.* 148, 139-149
- González, A.M., González, F., Sighart, G. y Marcus, F. (1972). Fish liver fructose 1,6-diphosphatase. I. Purification of the enzyme from *Genypterus chilensis* and studies on adenosine 5'-monophosphate inhibition. *J. Biol. Chem.* 247, 6067-6070
- Gottschalk, M.E., Chatterjee, T., Edelstein, I. y Marcus, F. (1982). Studies on the mechanism of interaction of fructose 2,6-bisphosphate with fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 257, 8016-8020

- Gregory, M.R. y Kaiser, E.T. (1979). Inactivation of phosphofructokinase by dialdehyde-ATP. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 199-208
- Gutfreund, H. (1972). *Enzymes: Physical Principles*, pp 117-120. Wiley-Interscience, New York
- Hartley, B.S. (1970). Strategy and tactics in protein chemistry. *Biochem. J.* 119, 805-822
- Hathaway, J.A. y Atkinson, D.E. (1963). The effect of adenylic acid on yeast nicotinamide dinucleotide isocitrate dehydrogenase, a possible metabolic control mechanism. *J. Biol. Chem.* 238, 2875-2881
- Herrera, R., Ojeda, A. y Slebe, J.C. (1981). Aspectos cinéticos y estequiométricos de la carbamilación de la fructosa 1,6-bisfosfatasa. *Arch. Biol. Med. Exp.* 14, 200 (Resumen)
- Hers, H.G. y Hue, L. (1983). Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 617-653
- Hers, H.G. y Van Schaftingen, E. (1982). Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* 206, 1-12
- Hers, H.G., Hue, L. y Van Schaftingen, E. (1981). The fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle. *Curr. Top. Cell. Reg.* 18, 199-210
- Hinrichs, M.V. y Eyzaguirre, J. (1982). Affinity labeling of rabbit muscle pyruvate kinase with dialdehyde-AMP. *Biochim. Biophys. Acta* 704, 177-185
- Hochachka, P.W. (1972). The functional significance of variants of fructose 1,6-diphosphatase in the gill and hypodermis of a marine crustacean. A kinetic study. *Biochem. J.* 127, 781-793
- Hollenberg, P.F., Flashner, M. y Coon, M. (1971). Role of lysyl ϵ -amino groups in adenosine diphosphate binding and catalytic activity of pyruvate kinase. *J. Biol. Chem.* 246, 946-953

- Horecker, B.L. y Kornberg, A. (1948). The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175, 385-390
- Horecker, B.L., Melloni, E. y Pontremoli, S. (1975). Fructose 1,6-bisphosphatase: Properties of the neutral enzyme and its modification by proteolytic enzymes. *Adv. Enzymol.* 42, 193-226
- Horecker, B.L., Lazo, P.S., Tsolas, O., Sun, S.C. y Pontremoli, S. (1978). Modification of fructose 1,6-bisphosphatase by lysosomal proteinases. En *Protein Turnover and Lysosome Function* (Segal, H.L. y Doyle, D.J., eds.), pp 333-351, Academic Press, New York
- Horecker, B.L., McGregor, J.S., Singh, V.N., Tsolas, O., Sun, S. C., Crivellano, O. y Pontremoli, S. (1980). En *FEBS Enzyme Regulation and Mechanism of Action* (Mildner, P. y Reis, B., eds.), vol. 60, pp 3-14, Pergamon Press, New York
- Horiike, K., Tojo, H., Yamano, T. y Nozaki, M. (1984). Chemical modification of proteins: Plotting of the remaining activity against the number of residues modified. *J. Biochem.* 95, 605-609
- Hosey, M.M. y Marcus, F. (1981). Fructose-bisphosphatase as a substrate of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 91-94
- Hubert, E., Maccioni, R. y Slebe, J.C. (1979). Aislamiento y caracterización del sitio de unión de AMP en fructosa 1,6-bisfosfatasa. *Arch. Biol. Med. Exp.* 12, 272 (Resumen)
- Hubert, E., Maccioni, R. y Slebe, J.C. (1981). Affinity labeling of fructose 1,6-bisphosphatase with adenosine 5'-monophosphate 2'3'-dialdehyde. *Arch. Biol. Med. Exp.* 14, 157-161
- Hubert, E., Villanueva, J., González, A.M. y Marcus, F. (1970). Univalent cation activation of fructose 1,6-diphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 590-597

- Hue, L. (1981). The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in the liver. *Adv. Enzymol.* 52, 247-331
- Hunkapiller, M.W. y Hood, L.E. (1978). Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a non-protein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography. *Biochemistry* 17, 2124-2133
- James, T.L. y Cohn, M. (1974). The role of the lysyl residue at the active site of creatine kinase. Nuclear overhauser effect studies. *J. Biol. Chem.* 249, 2599-2604
- Jencks, W.P. (1969). *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, pp 562-564, McGraw-Hill Series in Advanced Chemistry, McGraw-Hill Book Co., New York
- Katz, J. y Rognstad, R. (1975). Futile cycles in the metabolism of glucose. *Curr. Top. Cell. Reg.* 10, 237-289
- Kido, H., Vita, A. y Horecker, B.L. (1980). A one-step procedure for the isolation of fructose 1,6-bisphosphatase and fructose 1,6-bisphosphate aldolase from rabbit liver. *Anal. Biochem.* 106, 450-454
- Kirtley, M. y McKay, M. (1977). Fructose 1,6-bisphosphate, a regulator of metabolism. *Mol. Cell. Biochem.* 18, 141-150
- Kitajima, S. y Uyeda, K. (1983). A binding study of the interaction of -D-fructose 2,6-bisphosphate with phosphofructokinase and fructose 1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 258, 7352-7357
- Koshland, D.E.Jr (1970). The molecular basis for enzyme regulation. En *The Enzymes* (Boyer, P., ed.), vol. 1, pp 341-396. Academic Press, New york
- Koshland, D.E.Jr y Neet, K.E. (1968). the catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 37, 359-410

- Koshland, D.E.Jr., Némethy, G. y Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5, 365-385
- Kratowich, N. y Mendicino, J. (1974). Role of enzyme interactions in the regulation of gluconeogenesis. Modification of the binding properties of fructose 1,6-diphosphatase by adenosine monophosphate, adenosine triphosphate, and fructose 1,6-diphosphate. *J. Biol. Chem.* 249, 5485-5494
- Krulwich, T.; Enser, M. y Horecker, B.L. (1969). The effects of pyridoxal phosphate on rabbit liver and kidney fructose 1,6-diphosphatases. *Arch. Biochem. Biophys.* 132, 331-337
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Leyton, J.F., Chinelatto, A.M., El-Dorry, H.A. y Bacila, M. (1980). Correlation of inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by AMP and the presence of the nucleotide binding domain. *Arch. Biochem. Biophys.* 202, 168-171
- Little, C., Sanner, T. y Phil, A. (1969). Stimulation of fructose 1,6-diphosphatase by sulfhydryl reagents and interaction between the different enzymic sites in the molecule. *Eur. J. Biochem.* 8, 229-236
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Maccioni, R., Hubert, E. y Slebe, J.C. (1979). Selective modification of fructose 1,6-bisphosphatase by periodate oxidized AMP. *FEBS Lett.* 102, 29-32
- Marcus, C., Geller, A.M. y Byrne, W. (1973). Studies on bovine hepatic fructose 1,6-diphosphatase. Substrate inhibition and the kinetic mechanism. *J. Biol. Chem.* 248, 8567-8573

- Marcus, F. (1967). Kidney fructose 1,6-diphosphatase. Purification and studies on desensitization to adenosine 5'-monophosphate inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 393-399
- Marcus, F. (1968). Desensitization of kidney fructose-1,6-diphosphatase by acetic anhydride. *Biochim. Biophys. Acta* 141, 312-315
- Marcus, F. (1975). Functional consequences of modifying highly reactive arginyl residues of fructose 1,6-bisphosphatase: Loss of monovalent cation activation. *Biochemistry* 14, 3916-3921
- Marcus, F. (1976). Essential arginyl residues in fructose 1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* 15, 3505-3509
- Marcus, F. (1981). Structure and regulation of fructose 1,6-bisphosphatase. En *The Regulation of Carbohydrate Formation and Utilization in Mammals* (Veneziale, C.M., ed.), pp 269-290, University Park Press, Baltimore
- Marcus, F. y Haley, B.E. (1979). Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by the photoaffinity AMP analog, 8'-azido-adenosine 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 254, 259-261
- Marcus, F. y Hubert, E. (1968). Functional consequences of modification of kidney fructose 1,6-diphosphatase by pyridoxal 5'-phosphate. *J. Biol. Chem.* 243, 4923-4925
- Marcus, F., Edelstein, I., Saidel, L.J., Keim, P.S. y Henrikson, R.L. (1981). The covalent structure of pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase: Sequence of the 60-residue NH₂-terminal peptide produced by digestion with subtilisin. *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 687-696
- Marcus, F., Edelstein, I., Reardon, I. y Henrikson, R.L. (1982). Complete amino acid sequence of pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7161-7166

- McClard, R.W. y Atkinson, D.E. (1979). Effects of fructose 6-phosphate and adenylates on the activities of rabbit liver fructose biphosphatase and phosphofructokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 194, 236-243
- McGrane, M.M., El-Maghrabi, M.R. y Pilkis, S.J. (1983). The interaction of fructose 2,6-bisphosphate and AMP with rat hepatic fructose 1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 258, 10445-10454
- Means, G.E. y Feeney, R.E. (1971). *Chemical Modification of Proteins*. Holden-Day Inc., San Francisco
- Meek, D.W. y Nimmo, H.G. (1983). The interaction of fructose 2,6-bisphosphate with an allosteric site of rat liver fructose 1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* 160, 105-109
- Meek, D.W. y Nimmo, H.G. (1984). The allosteric properties of rat liver fructose 1,6-bisphosphatase. *Biochem. J.* 222, 131-138
- Mendicino, J. y Vasarhely, F. (1963). Renal D-fructose 1,6-diphosphatase. *J. Biol. Chem.* 238, 3528-3534
- Miller, G.L. (1959). Protein determination for large numbers of samples. *Anal. Chem.* 31, 964
- Moffat, J.K., Simon, S.R. y Konigsberg, W.H. (1971). Structure and functional properties of chemically modified horse hemoglobin. III. Functional consequences of structural alterations and their implications for the molecular basis of co-operativity. *J. Mol. Biol.* 58, 89-101
- Mokrasch, L.C., Davidson, W.D. y McGilvery, R.W. (1956). The response to glucogenic stress of fructose 1,6-diphosphatase in rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 222, 179-184
- Monod, J., Changeaux, J.P. y Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6, 306-329

- Monod, J., Wyman, J. y Changeaux, J.P. (1965). On the nature of allosteric interactions: A plausible model. *J. Mol. Biol.* 12, 88-118
- Mörikofer-Zwez, S. (1983). Fructose 1,6-bisphosphatase in rat liver cytosol: Interactions between the effects of K^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} , and fructose 2,6-bisphosphate as measured in a steady-state assay. *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 572-583
- Murphy, T.A. y Wyatt, G.R. (1965). The enzymes of glycogen and trehalose synthesis in silk moth fat body. *J. Biol. Chem.* 240, 1500-1508
- Nakashima, K. y Horecker, B.L. (1971). Modification of the catalytic properties of rabbit liver fructose diphosphatase by a particulate fraction from liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 153-160
- Nakashima, K. y Tuboi, S. (1976). Size-dependent allosteric effects of monovalent cations on rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 251, 4315-4321
- Neet, K.E. (1980). Cooperativity in enzyme function: Equilibrium and kinetic aspects. *Meth. Enzymol.* 64, 139-192
- Newsholme, E.A. y Gevers, W. (1967). Control of glycolysis and gluconeogenesis in liver and kidney cortex. *Vitam. Horm.* 25, 1-87
- Newsholme, E.A., Crabtree, B., Higgins, S.J., Thornton, S.D. y Start, C. (1972). The activities of fructose diphosphatase in flight muscles from the bumble-bee and the role of this enzyme in heat generation. *Biochem. J.* 128, 89-97
- Nimmo, H.G. y Tipton, K.F. (1975). The allosteric properties of beef-liver fructose bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 58, 575-585

- Nimmo, H.G. y Tipton, K.F. (1975a). The effect of pH on the kinetics of beef-liver fructose bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 58, 567-574
- Nowak, T. (1976). Conformational changes required for pyruvate kinase activity as modulated by monovalent cations. *J. Biol. Chem.* 251, 73-78
- Nowak, T. y Mildvan, A.S. (1972). Nuclear magnetic resonance studies of the function of potassium in the mechanism of pyruvate kinase. *Biochemistry* 11, 2819-2828
- Nowak, T. y Suelter, C. (1981). Pyruvate kinase: Activation by and catalytic role of the monovalent and divalent cations. *Mol. Cell. Biochem.* 35, 65-75
- Opie, L.H. y Newsholme, E.A. (1967). The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem. J.* 103, 391-399
- Ojeda, A., Herrera, R., Maccioni, R. y Slebe, J.C. (1980). Relación entre inhibición por exceso de sustrato y activación por potasio en fructosa 1,6-bisfosfatasa. *Arch. Biol. Med. Exp.* 13, 93 (Resumen)
- Passoneau, J.V. y Lowry, O.H. (1962). Phosphofructokinase (PFK) and the Pasteur effect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 10-15
- Passoneau, J.V. y Lowry, O.H. (1964). The role of phosphofructokinase in metabolic regulation. *Adv. Enzyme Reg.* 2, 265-292
- Paterson, A.K. y Knowles, J.R. (1972). The number of catalytically essential carboxyl groups in pepsin. Modification of the enzyme by trimethyloxonium fluoroborate. *Eur. J. Biochem.* 31, 510-517
- Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J. y Claus, T.H. (1981). Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 256, 3619-3622

- Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., McGrane, M.M., Pilkis, J. y Claus, T.H. (1981a). The role of fructose 2,6-bisphosphate in regulation of fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 256, 11489-11495
- Pontremoli, S. (1966). Fructose-1,6-diphosphatase. I. Rabbit liver (crystalline). *Meth. Enzymol.* 9, 625-631
- Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1971). Fructose-1,6-diphosphatases. En *The Enzymes* (Boyer, P., ed.), vol. 4, 3^a ed., pp 611-646, Academic Press, New York
- Pontremoli, S., Grazi, E. y Accorsi, A. (1966). Fructose 1,6-diphosphatase from rabbit liver. VI. Functional tyrosyl residues in the active center. *Biochemistry* 5, 3072-3078
- Pontremoli, S., Grazi, E. y Accorsi, A. (1966a). Fructose 1,6-diphosphatase from rabbit liver. VII. Tyrosine residues and adenosine monophosphate inhibition. *Biochemistry* 5, 3568-3574
- Pontremoli, S., Grazi, E. y Accorsi, A. (1968). Fructose diphosphatase from rabbit liver. X. Isolation and kinetic properties of the enzyme-adenosine monophosphate complex. *Biochemistry* 7, 3628-3633
- Pontremoli, S., Grazi, E. y Accorsi, A. (1969). Fructose 1,6-diphosphatase from rabbit liver. XIII. The number of Mn^{++} binding sites measured with $^{54}Mn^{++}$. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 597-602
- Pontremoli, S., Melloni, E., De Flora, A. y Horecker, B.L. (1973). Cooperative interactions between native and modified subunits of rabbit liver fructose 1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 156, 255-260
- Pontremoli, S., Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Sparatore, B. y Horecker, B.L. (1982). On the mechanism of inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 609-613

- Powell, J.T. y Brew, K. (1976). Affinity labeling of bovine colostrum galactosyltransferase with a uridine 5'-diphosphate derivative. *Biochemistry* 15, 3499-3505
- Ramaiah, A., Hathaway, J.A. y Atkinson, D.E. (1964). Adenylate as a metabolic regulator. Effect on yeast phosphofructokinase kinetics. *J. Biol. Chem.* 239, 3619-3622
- Ranieri-Raggi, M. y Raggi, A. (1976). Specific modification of the GTP binding site of rat 5'-adenylic acid aminohyrolase by periodate-oxidized GTP. *Biochim. Biophys. Acta* 445, 223-233
- Ray, W.J. y Koshland, D.E.Jr (1961). A method for characterizing the type and numbers of groups involved in enzyme action. *J. Biol. Chem.* 236, 1973-1979
- Ray, W.J. y Koshland, D.E.Jr (1962). Identification of amino acids involved in phosphoglucomutase action. *J. Biol. Chem.* 237, 2493-2505
- Reyes, A., Hubert, E. y Slebe, J.C. (1984). Evidence for an allosteric site for fructose 2,6-bisphosphate in fructose 1,6-bisphosphatase. Relationship with potassium activation. *Libro de Resúmenes IV Congreso PAABS, R-588, Buenos Aires, Argentina*
- Reyes, A., Hubert, E. y Slebe, J.C. (1985). The reactive cysteine residue of pig kidney fructose 1,6-bisphosphatase is related to a fructose 2,6-bisphosphate allosteric site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 373-379
- Reynolds, J.A. y Tanford, C. (1970). Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 1002-1007
- Ricard, J., Meunier, J.C. y Buc, J. (1974). Regulatory behavior of monomeric enzymes. I. The mnemonical enzyme concept. *Eur. J. Biochem.* 49, 195-208

- Rimon, S. y Perlmann, G. (1968). Carbamylation of pepsinogen and pepsin. *J. Biol. Chem.* 243, 3566-3572
- Riquelme, P.T. y Czarnecki, J.J. (1983). Conformational and allosteric changes in fructose 1,6-bisphosphatase upon photoaffinity labeling with 2-azidoadenosine monophosphate. *J. Biol. Chem.* 258, 8240-8245
- Rittenhouse, J., Chatterjee, T., Marcus, F., Reardon, I. y Heinrikson, L. (1983). Amino acid sequence of the COOH-terminal region of fructose 1,6-bisphosphatases in relation to cyclic AMP-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 258, 7648-7652
- Schmidt, D.E.Jr y Westheimer, F.H. (1971). pK of the lysine amino group at the active site of acetoacetate decarboxylase. *Biochemistry* 10, 1249-1253
- Schroeder, W.M., Shelton, J.B., Shelton, J.R. y Powars, D. (1979). Separation of peptides by high-pressure liquid chromatography for the identification of a hemoglobin variant. *J. Chromatogr.* 174, 385-392
- Scrutton, M.C. y Utter, M.F. (1968). The regulation glycolysis and gluconeogenesis in animal tissues. *Annu. Rev. Biochem.* 37, 249-302
- Shaw, E. (1970). Chemical modification by active-site-directed reagents. En *The Enzymes* (Boyer, P., ed.), vol. 1, pp 91-146, Academic Press, New York
- Shen, W.C. y Colman, R. (1975). Cyanate modification of essential lysyl residues of the diphosphopyridine nucleotide-specific isocitrate dehydrogenase of pig heart. *J. Biol. Chem.* 250, 2973-2978

- Sigman, D.S. y Mooser, G. (1975). Chemical studies of enzyme active sites. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 889-931
- Simon, S.R., Arndt, D.J. y Konigsberg, W.H. (1971). Structure and functional properties of chemically modified horse hemoglobin. I. Determination of the functional properties. *J. Mol. Biol.* 58, 69-77
- Singer, S.J. (1967). Covalent labeling of active sites. *Adv. Protein Chem.* 22, 1-54
- Singh, V.N., MacGregor, J.S., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1980). Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by excess substrate and its reversal by monovalent cations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 1140-1144
- Slebe, J.C. y Martínez-Carrión, M. (1976). Carbamylation of aspartate transaminase and the pK value of the active site lysyl residue. *J. Biol. Chem.* 251, 5663-5669
- Slebe, J.C. y Martínez-Carrión, M. (1978). Selective chemical modification and ^{19}F -NMR in the assignment of a pK value to the active site lysyl residue in aspartate transaminase. *J. Biol. Chem.* 253, 2093-2097
- Slebe, J.C., Herrera, R. y Peterson, D. (1982a). Localización de residuos lisina del sitio de unión de AMP de fructosa 1,6-bisfosfatasa. *Arch. Biol. Med. Exp.* 15, R-155
- Slebe, J.C., Hubert, E. y Maccioni, R. (1978). Modificación de lisinas de fructosa 1,6-bifosfatasa renal. *Arch. Biol. Med. Exp.* 11, 241 (Resumen)
- Slebe, J.C., Reyes, A. y Hubert, E. (1984a). Chemical modification of the allosteric sites of fructose 1,6-bisphosphatase. *Arch. Biol. Med. Exp.* 17, R53-R54 (Resumen Simposio)

- Slebe, J.C., Ojeda, A., Hubert, E. y Maccioni, R. (1979). Regulatory properties of fructose 1,6-bisphosphatase: Lysyl residues modifications. *Arch. Biol. Med. Exp.* 12, 475-476 (Resumen Simposio)
- Slebe, J.C., Herrera, R., Ojeda, A., Hubert, E. y Maccioni, R. (1980). Chemical modification studies of the functional properties of fructose 1,6-bisphosphatase. Libro de resúmenes, Simposio Internacional: Modificación Química de Enzimas, pp 11-12, Santiago
- Slebe, J.C., Herrera, R., Ojeda, A. y Maccioni, R. (1980). Reacción de cianato con grupos funcionales de fructosa 1,6-bisfosfatasa. *Arch. Biol. Med. Exp.* 13, 468 (Resumen)
- Slebe, J.C., Ojeda, A., Hubert, E. y Maccioni, R. (1981). Fructose 1,6-bisphosphatase: A model for studies on structure-function relationships in a regulatory enzyme. En *Molecular Approaches to Gene Expression and Protein Structure* (Siddiqui, M.A.Q., Krauskopf, M. y Weissbach, H., eds.), pp 329-363, Academic Press, New York
- Slebe, J.C., Herrera, R., Hubert, E., Peterson, D. y Martínez-Carrión, M. (1982). Estudio estructural de la región involucrada en la cooperatividad hacia AMP de la fructosa 1,6-bisfosfatasa. *Arch. Biol. Med. Exp.* 15, R-70
- Slebe, J.C., Herrera, R., Hubert, E., Ojeda, A. y Maccioni, R. (1983). Fructose 1,6-bisphosphatase: Dissociation of AMP cooperativity and AMP inhibition by carbamylation. *J. Prot. Chem.* 2, 437-443
- Slebe, J.C., Herrera, R., Hubert, E., Peterson, D. y Martínez-Carrión, M. (1983a). Estudio de la relación estructura-función en fructosa 1,6-bisfosfatasa mediante modificación química. *Arch. Biol. Med. Exp.* 16, 378-379 (Resumen Simposio)

- Slebe, J.C., Hubert, E., Reyes, A. y Martínez-Carrión, M. (1984). ^{31}P -AMP nuclear magnetic resonance of fructose 1,6-bisphosphatase. Libro de resúmenes, IV Congreso PAABS, R-589, Buenos Aires, Argentina
- Sluyterman, L.A. (1967). Reversible inactivation of papain by cyanate. *Biochim. Biophys. Acta* 135, 439-449
- Smyth, D.G. (1967). Carbamylation of amino and tyrosine hydroxyl groups. Preparation of an inhibitor of oxytocin with no intrinsic activity on the isolated uterus. *J. Biol. Chem.* 242, 1579-1591
- Spackman, D.H., Stein, W.H. y Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30, 1190-1206
- Stadtman, E.R. (1970). Mechanism of enzyme regulation in metabolism. En *The Enzymes* (Boyer, P., ed.), vol. 1, pp 397-459, Academic Press, New York
- Stadtman, E.R., Cohen, G.N., LeBras, G. y de Robichon-Szulmajster, H. (1961). Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* 236, 2033-2038
- Stark, G.R. (1964). On the reversible reaction of cyanate with sulfhydryl groups and the determination of NH_2 -terminal cysteine and cystine in proteins. *J. Biol. Chem.* 239, 1411-1414
- Stark, G.R. (1965). Reactions of cyanate with functional groups of proteins. III. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry* 4, 1030-1036
- Stark, G.R. (1972). Modification of proteins with cyanate. *Meth. Enzymol.* 25, 579-584

- Stark, G.R., Stein, W.H. y Moore, S. (1960). Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins. *J. Biol. Chem.* 235, 3177-3181
- Stellwagen, E., Cass, R., Thompson, S.T. y Woody, M. (1975). Predicted distribution of NAD domain among glycolytic enzymes. *Nature* 257, 716-717
- Stevens, E. y Colman, R. (1980). Chemical modification of enzymes: Critical evaluation of the graphical correlation between residual enzyme activity and number of groups modified. *Bull. Math. Biol.* 42, 239-255
- Stone, S.R. y Fromm, H.J. (1980). Studies on the mechanism of adenosine 5'-monophosphate inhibition of bovine liver fructose 1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* 19, 620-625
- Suda, H., Xu, G.J., Kutny, R.M., Natalini, P., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1982). Location of lysyl residues at the allosteric site of fructose 1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 10-14
- Suelter, C.H. (1974). Monovalent cation-activated enzymes. En *Metal Ions in Biological Systems* (Sigel, H., ed.), vol. 3, pp 201-251, Marcel Dekker, New York
- Suelter, C.H., Singleton, R.Jr., Kayne, F.J., Arrington, S., Glass, J. y Mildvan, A.S. (1966). Studies on the interaction of substrate and monovalent and divalent cations with pyruvate kinase. *Biochemistry* 5, 131-138
- Summers, M.R., Smythers, G.W. y Orozlan, S. (1973). Thin-layer chromatography of sub-nanomole amounts of phenylthiohydantoin (PTH) amino acids on poliamine sheets. *Anal. Biochem.* 53, 624-628

- Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrilamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* 39, 462-477
- Taketa, K. y Pogell, B.M. (1963). Reversible inactivation and inhibition of liver fructose 1,6-diphosphatase by adenosine nucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 229-235
- Taketa, K. y Pogell, B.M. (1965). Allosteric inhibition of rat liver fructose 1,6-diphosphatase by adenosine 5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 240, 651-662
- Tarr, G.E. (1975). A general procedure for the manual sequencing of small quantities of peptides. *Anal. Biochem.* 63, 361-370
- Tarr, G.E. (1977). Improved manual sequencing methods. *Meth. Enzymol.* 47, 335-357
- Tashima, Y. y Yoshimura, N. (1975). Control of rabbit liver fructose-1,6-diphosphatase activity by magnesium ions. *J. Biochem.* 78, 1161-1169
- Tashima, Y, Tholey, G., Drummond, G., Bertrand, H., Rosenberg, J.S. y Horecker, B.L. (1972). Purification and properties of a rabbit kidney fructose diphosphatase with neutral pH optimum. *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 118-126
- Tejwani, G.A. (1983). Regulation of fructose-bisphosphatase activity. *Adv. Enzymol.* 54, 121-194
- Tejwani, G.A., Pedrosa, F., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1976). The purification and properties of rat liver fructose 1,6-bisphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 253-264
- Tejwani, G.A., Pedrosa, F., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1976a). Dual role of Zn^{2+} as inhibitor and activator of fructose 1,6-bisphosphatase of rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2692-2695

- Thompson, S.T., Cass, K.H. y Stellwagen, E. (1975). Blue dextran-sepharose: An affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 669-672
- Traniello, S., Pontremoli, S., Tashima, Y. y Horecker, B.L. (1971). Fructose 1,6-diphosphatase from liver: Isolation of the native form with optimal activity at neutral pH. *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 161-166
- Traniello, S., Melloni, E., Pontremoli, S., Sia, C.L. y Horecker, B.L. (1972). Rabbit liver fructose 1,6-diphosphatase. Properties of the native enzyme and their modification by subtilisin. *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 222-231
- Tsou, C.L. (1962). Relation between modification of functional groups of proteins and their biological activity. I. A graphical method for the determination of the number and type of essential groups. *Scientia Sinica* 11, 1535-1558
- Umbarger, H.E. (1956). Evidence for a negative-feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine. *Science* 123, 848
- Umbarger, H.E. (1959). Regulation of amino acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 38, 323-370
- Underwood, A.H. y Newsholme, E.A. (1965). Some properties of fructose 1,6-diphosphatase of rat liver and their relation to the control of gluconeogenesis. *Biochem. J.* 95, 767-774
- Underwood, A.H. y Newsholme, E.A. (1967). Control of glycolysis and gluconeogenesis in rat kidney cortex slices. *Biochem. J.* 104, 300-305
- Ureta, T. (1985). Organización del metabolismo: Localización subcelular de enzimas glicolíticas. *Arch. Biol. Med. Exp.* 18, 9-32
- Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1981). Inhibition of fructose 1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2861-2863

- Van Tol, A. (1974). Regulatory sulfhydryl groups, conformational change, and allosteric inhibition in rabbit muscle fructose diphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 238-247
- Vera, J.C., Cornejo, R. y Burzio, L. (1981). A simple and rapid method to prepare gradients. *IRCS Med. Sci.* 9, 450
- Veronese, F., Piszkiwicz, D. y Smith, E.L. (1972). Inactivation of bovine glutamate dehydrogenase by carbamyl phosphate and cyanate. *J. Biol. Chem.* 247, 754-759
- Villanueva, J. y Marcus, F. (1974). Fish liver fructose 1,6-diphosphatase. III. The effect of temperature on the regulatory properties of the carp (*Cyprinus carpio*) liver enzyme. *J. Biol. Chem.* 249, 745-749
- Wofsy, L., Metzger, H. y Singer, S.J. (1962). Affinity labeling. A general method for labeling the active sites of antibody and enzyme molecules. *Biochemistry* 1, 1031-1039
- Wold, F. (1971). **Macromolecules: Structure and Function.** Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey
- Wood, D.C., Hodges, C.T., Howell, S.M., Clary, L.G. y Harrison, J.H. (1981). The N-ethylmaleimide-sensitive cysteine residue in the pH-dependent subunit interactions of malate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 256, 9895-9900
- Xu, G.J., Datta, A.G., Singh, V.N., Suda, H., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1981). Rabbit liver fructose 1,6-bisphosphatase: Labeling of the active and allosteric sites with pyridoxal 5'-phosphate and sequence of a nonapeptide from the active site. *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 98-103
- Xu, G.J., Natalini, P., Suda, H., Tsolas, O., Dzugaj, A., Sun, S.C., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1982). Rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase: Location of an active site lysyl residue in the COOH-terminal fragment generated by a lysosomal proteinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 688-694

- Yount, R.G. (1975). ATP analogs. *Adv. Enzymol.* 43, 1-56
- Zalitis, J. (1976). Modification of native sheep liver fructose-1,6-bisphosphatase by subtilisin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 323-330
- Zimmerman, C.L. y Pisano, J.J. (1977). High-performance liquid chromatography of amino acids derivatives. *Meth. Enzymol.* 47, 45-51