

24  
1024



Universidad Nacional Autónoma  
de México

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL CADMIO SOBRE LA  
ENZIMA SUCCINATO  
DESHIDROGENASA

**T E S I S**

Que para Obtener el Título de:

**B I O L O G O**

P r e s e n t a :

David John Jay Gómez Farías



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Pág.
I.- Abreviaturas.....	1.
II.- Resumen.....	2.
III.- Introducción.....	3.
IV.- Material y Métodos.....	9.
V.- Resultados.....	15.
VI.- Figuras.....	19.
VII.- Discusión.....	28.
VIII.- Bibliografía.....	37.

## ABREVIATURAS

- 1.- ADP: Adenosin difosfato.
- 2.- ATP: Adenosin trifosfato.
- 3.- BAL: British Anti-Lewisite (2,3, dimercaptopropanol).
- 4.- CoQ: Coenzima Q oxidada.
- 5.- CoQH<sub>2</sub>: Coenzima Q reducida.
- 6.- DClP: 2,6- Dicloroindofenol de Sodio.
- 7.- DTT: Ditrotreitol.
- 8.- EDTA: Acido etilendiamina tetracético.
- 9.- FAD: Flavin-adenin-dinucleótido.
- 10.- FCCP: Carboxicianuro m- clorofenihidrazona.
- 11.- IDP: Inosin difosfato.
- 12.- K<sub>i</sub>: Constante de inhibición.
- 13.- K<sub>m</sub>: Constante de Michaelis-Menten.
- 14.- MOPS: Acido 3-[N-morfolino]-2-hidroxiopropanosulfónico.
- 15.- NSF: Metasulfato de fenazina.
- 16.- NAD: Dinucleótido de nicotinamida y adenina ó difosfo piridín nucleótido (DPN).
- 17.- PIPES: Piperazin-N,N'-bis[ácido 2-etensulfónico].
- 18.- PSM: Partículas submitocondriales.
- 19.- SH: Grupo sulfhidrilo.
- 20.- SD: Actividad de succinato deshidrogenasa.
- 21.- SDH: Enzima succinato deshidrogenasa ó deshidrogenasa succínica.
- 22.- TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano.

## RESUMEN

Se estudió el efecto del Cadmio sobre la deshidrogenasa succínica. La adición de este metal a partículas submitocondriales provocó una disminución de la velocidad máxima alcanzada por la enzima en la oxidación del succinato. Sin embargo, la  $K_m$  de la enzima no se vió alterada. Concentraciones de Cadmio próximas a  $1 \mu M$  causan una inhibición del 50% en la actividad de la enzima.

El efecto inhibitorio del catión metálico parece deberse a la unión de este a grupos sulfhidrilo de la enzima, puesto que el grado de inhibición aumenta a un pH próximo al del pKa de estos grupos. Además, la adición de ditroiteitol, el cual es un agente reductor de grupos sulfhidrilo, revierte la inhibición.

La acción de moduladores positivos sobre la enzima, como el ATP, el acetato, los radicales  $SO_4^{\equiv}$  y el fosfato, no evitan la acción inhibitoria del cadmio. No obstante, la presencia de oxaloacetato en el medio, el cual es un potente agente inactivador de la enzima, reduce el grado de inhibición provocado por este metal.

Lo anterior sugiere, que la acción inhibitoria del Cadmio sobre la deshidrogenasa succínica, es debida a la unión de este a grupos funcionales(-SH) esenciales para la actividad y que esta unión es preferencial en presencia de la enzima activa.

## INTRODUCCION.

El cadmio es un elemento que se encuentra en muy bajas concentraciones en la corteza terrestre (1,2). Sin embargo, en ciertas zonas su concentración ha alcanzado niveles que pueden ser considerados contaminantes, lo que se debe en gran parte al incremento del número de industrias que lo utilizan (3,4,5), así como a su uso creciente en fertilizantes y plaguicidas (6,7) y al mal manejo de las aguas de desperdicio (8).

El cadmio se localiza en el grupo IIB de la tabla periódica, entre el zinc y el mercurio, y tiene en la mayoría de los compuestos que forma, un estado de oxidación de Cd (II). A pesar de que el radio iónico del  $\text{Cd}^{2+}$  es similar al del  $\text{Ca}^{2+}$  (99 pm, Pauling), forma enlaces preferencialmente covalentes, sobre todo con los ligandos polarizables debido a su número relativamente grande de electrones y al efecto de pantalla que ofrece el orbital  $4d^{10}$  (9).

Este metal puede formar compuestos con el oxígeno y también reaccionar con los halógenos para dar los haluros correspondientes. Sin embargo, de mayor interés biológico resulta la alta afinidad del catión por los grupos carboxilo (10), imidazol (11) y sobre todo sulfhidrilo (11,12) que en muchas biomoléculas son esenciales para la expresión de la actividad fisiológica.

Debido a esta última característica se ha relacionado la intoxicación por Cd con la manifestación de diversos padecimientos en el hombre. Entre estos destacan: disturbios gastrointestinales agudos (13,14), deterioro en la función pulmonar (15,16,17), disfunciones renales (18,19,20,21,22), afecciones óseas (13,23), hipertensión (24,25,26), etc.

En cuanto a los efectos del Cd a nivel subcelular, la mitocondria parece ser el organelo blanco debido a que un gran número de sus enzimas dependen de grupos sulfhidrilo para su actividad catalítica. Observaciones de Saris y Jorvisalo (27) y de Chávez et al (28) sugieren que el cadmio puede ser acumulado en la mitocondria por un proceso dependiente de energía que presenta características similares al transporte de  $\text{Ca}^{++}$ , y que posiblemente utiliza al acarreador de este catión, pues su entrada es inhibida por el rojo de rutenio, el cual es un inhibidor del transporte de calcio. Así mismo, se puede impedir la captación de  $\text{Cd}^{2+}$  en presencia de FCCP un agente desacoplante.

Cuando se mide el consumo de oxígeno mitocondrial en un medio que contiene  $\text{K}^{+}$ , las bajas concentraciones de  $\text{Cd}^{2+}$  causan primero una estimulación en la respiración, seguida por la inhibición de esta. La interpretación que Harris y Zaba (29) dieron a estas observaciones es la siguiente: Una unión rápida inicial del cadmio a la mitocondria lleva a un incremento de la permeabilidad del potasio.

Cuando la mitocondria está energizada, el  $K^+$  penetra y si se encuentra en cantidad suficiente para causar daño mitocondrial, una segunda fase de acumulación de  $Cd^{++}$  se lleva a cabo. El cadmio, ahora, desplaza al  $K^+$  de los sitios funcionales e inhibe la respiración.

Este efecto del cadmio mediado por una alteración en la permeabilidad de la membrana hacia el  $K^+$ , y posiblemente también hacia otros cationes como el  $Mg^{2+}$ , no es el único que se observa. Jacabs et al (30) notaron que pequeñas concentraciones del metal desacoplan la fosforilación oxidativa. Con mitocondrias de hígado de conejo se obtiene un completo desacoplamiento a concentraciones de cadmio de 5  $\mu M$ ; estos autores mostraron que los sitios a los que se une el cadmio para producir el desacoplamiento, representan un porcentaje mínimo del total de grupos ditiolés ya que la adición de BAL para revertir este efecto sólo remueve un 3% del  $Cd^{++}$  unido a la mitocondria. A conclusiones similares llegaron Sanadi et al (31), Fletcher et al (32) y Fluharty y Sanadi (33). Estos últimos consideran que los sitios a los que se une el cadmio, para alterar las funciones mitocondriales, son distintos a los que se une para alterar la estructura. Fluharty y Sanadi han sugerido que la primera acción del cadmio en la mitocondria, con  $\beta$ -hidroxibutirato como sustrato y en ausencia de ADP, consiste en una pérdida del control respiratorio, que es debida al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa,



y se manifiesta por un incremento temporal de la respiración coincidente con la oxidación del NADH endógeno. Sothard et al (34) ha atribuido los cambios inducidos por el  $\text{Cd}^{++}$  en la función mitocondrial a la unión del metal a grupos sulfhidrilo críticos, localizados en proteínas intrínsecas de la membrana interna mitocondrial. Se considera que la alteración de estos sitios suprime cierta cantidad de funciones acopladas (fosforilación oxidativa, recambio de  $^{32}\text{P}_1\text{-ATP}$ ) al mismo tiempo que incrementa o induce otras (hidrolisis de ATP, transporte de  $\text{K}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ).

A concentraciones de cadmio mayores que las requeridas para inducir desacoplamiento, se produce una inhibición significativa en la utilización de sustratos (30). En preparaciones de mitocondrias obtenidas de pulmón de oveja, el  $\text{Cd}^{++}$  es un potente inhibidor del transporte electrónico y concentraciones de 50  $\mu\text{M}$  causan una completa inhibición de la oxidación de los sustratos ligada tanto a deshidrogenasas de flavina como asociados a piridinas (35). Mustafa y Cross han demostrado que este efecto no involucra a los citocromos y que más bien puede deberse a un bloqueo de las deshidrogenasas (35). A similares conclusiones han llegado Diamond y Kench (36) en mitocondrias de hígado, sin embargo la cantidad de Cd necesaria para obtener el mismo efecto inhibitorio fue mucho mayor, posiblemente porque las mitocondrias de pulmón en la primera preparación se encuentran más desacopladas que las de hígado. Diamond y Kench han reportado la alta sensibilidad de la succinato

deshidrogenasa a los metales pesados.

En base a estos resultados, decidimos estudiar de manera más íntima la interacción del cadmio con la succinato deshidrogenasa (SDH). En células estrictamente aeróbicas, la succinato deshidrogenasa (E.C. 1.3.99.1) es una enzima ligada a la membrana interna mitocondrial e integrada a los demás componentes de la cadena respiratoria. En este tipo de células su función primaria es catalizar la oxidación de succinato a fumarato con una alta conservación de energía. La SDH es una enzima dimérica compuesta por una subunidad de 27 000 daltones y otra de 70 000 daltones (37). Cada uno de sus componentes contiene 4 átomos gramo de hierro no hemático por 4 moles de azufre ácido lábil, además, la subunidad de mayor peso presenta flavina unida covalentemente en el sitio catalítico (38). La unión se da entre el grupo metilo en posición 8 de la riboflavina y el nitrógeno en posición 3 del anillo imidazólico de un resto de histidina de la proteína (39). En la mitocondria la SDH esta sujeta a un complicado mecanismo de regulación. La enzima puede existir bajo dos formas: un estado inactivo estabilizado con oxaloacetato, ADP y CoQ, y un estado activo que es estable en presencia del sustrato, inhibidores competitivos, ATP y CoQH<sub>2</sub>.

Con excepción de las poliaminas y el K<sup>+</sup> no se ha reportado el efecto de algún otro catión sobre la enzima (40).

Sanborn (41) ha reportado que la succinato deshidrogenasa cuando se encuentra en su conformación activa es mucho más sensible a la inhibición por N-etilmaleimida y bromopiruvato.

Debido a que el cadmio tiene un tamaño muy pequeño ( 0.99 Å) en comparación al de las maleimidias y además es capaz de penetrar a sitios hidrófobos con gran facilidad se planteó el siguiente objetivo.

Estudiar la interacción del cadmio con la succinato deshidrogenasa ya que este elemento puede ser una herramienta útil para conocer algunos de los mecanismos que intervienen durante la expresión de la actividad catalítica de la enzima, en especial durante el proceso de activación-inactivación.

## MATERIAL Y METODOS.

En todos los experimentos descritos en este trabajo se utilizaron partículas submitocondriales elaboradas a partir de mitocondrias de corazón de res.

### Preparación de las mitocondrias según la técnica de Polytron (40).

Los corazones de res fueron conseguidos del rastro municipal de Milpa Alta. El órgano se transportó en hielo al laboratorio para evitar el menor daño posible al tejido. Todas las operaciones que se describen a continuación se efectuaron manteniendo el material en hielo o con la centrifuga a 4°C.

- a) Se remueve el exceso de grasa y tejido conjuntivo del corazón.
- b) Se elimina la sangre del músculo cardíaco enjuagando el órgano en un medio de sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM ajustado con Tris a pH 7.3.
- c) El miocardio se fragmenta en pedazos pequeños los cuales se colocan en el mismo medio de sacarosa.
- d) Para iniciar la homogenización del tejido, los trozos obtenidos en el paso anterior son molidos en un molino de carne común.
- e) El último paso en la homogenización del tejido consiste en colocar una parte del músculo molido por dos partes del medio de sacarosa en un vaso de 500 ml dando un volumen final de 400 ml. El vástago de Polytron se sumerge

en esta mezcla y el Polytron es puesto a trabajar durante 20 a 30 segundos a 2500 rpm.

f) La preparación resultante se filtra con tela de gasa y se vacía en un recipiente.

Estos dos últimos pasos se repiten hasta tratar todo el tejido. El volumen resultante es de aproximadamente 8 l. En esta etapa es necesario volver a ajustar el pH con Tris a 7.3 debido a que este disminuye por la liberación del material de los lisosomas.

g) Ahora el homogenado se centrifuga a 800 g durante 10 minutos para eliminar el tejido residual y las células que no se rompieron.

h) El sobrenadante se precipita a 12000 g durante 10 min y el sedimento resultante se lava una vez más en el mismo medio de sacarosa.

Una vez preparadas, el total de mitocondrias se dividen en alícuotas de 10 ml conteniendo de 20 a 30 mg de proteína/ml para ser congeladas.

#### Preparación de las partículas submitocondriales.

Para cada experimento se descongeló una fracción de las mitocondrias para hacer PSM. Estas fueron preparadas de acuerdo al método descrito por Lee y Ernster (42), que en general consiste en los siguientes pasos:

a) De 2 a 5 mg de proteína se mitocondria se diluyen aproximadamente tres veces en el medio de sacarosa descrito anteriormente.

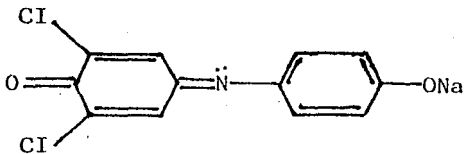
- b) El pH se ajusta con Tris a 8.5. La membrana mitocondrial externa expuesta a pH alcalino se vuelve vulnerable y más fácil de romper. Esto ocurre por un mecanismo que no está bien definido.
- c) Las mitocondrias son sonicadas (en un sonicador tipo Soniprep 150) dándoseles dos ciclos de sonicación de un minuto de duración cada uno y separados por un intervalo de un minuto.
- d) Esta preparación se centrifuga a 12 000 g durante 10 minutos para eliminar las mitocondrias que no se rompieron.
- e) El sobrenadante se centrifuga a 121 000 g durante 1 hora obteniéndose en el sedimento las PSM.
- f) Las PSM se resuspenden en sacarosa-Tris pH 7.3 sin EDTA, ya que este último es capaz de quelar al cadmio.

Este tipo de preparación consiste en fragmentos de membrana interna mitocondrial, que por la acción de la energía de sonicación, quedaron invertidos, de tal manera que la superficie que anteriormente estaba expuesta hacia la matriz mitocondrial ahora queda expuesta al medio de reacción. En este sistema, la medición de la actividad de succinato deshidrogenasa S.D. se facilita ya que no están presentes las barreras de permeabilidad que normalmente ofrece la membrana mitocondrial a los colorantes (DCIP y sobre todo NSF), además, la actividad específica se incrementa.

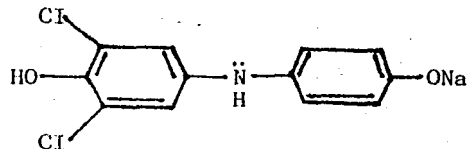
## Determinación de la actividad de la deshidrogenasa succínica.

La succinato deshidrogenasa cataliza la remoción de un par de electrones del succinato para rendir fumarato. En condiciones normales estos electrones fluyen a lo largo de la cadena respiratoria hasta llegar al oxígeno, reduciéndolo y produciendo  $H_2O$ . Para medir la actividad de D.S. es necesario interrumpir este flujo hacia el  $O_2$  de tal manera que los electrones provenientes del succinato puedan ser captados por un sistema de colorantes adecuado que indique la velocidad del flujo electrónico y por lo tanto la velocidad de catálisis.

En las condiciones experimentales que se describen en este trabajo, la interrupción del flujo de electrones se obtiene mediante la adición de cianuro (el cual es un inhibidor muy potente del citocromo  $a_3$ ) y de rotenona, la cual impide la fuga de electrones por el sitio I. El sistema de colorantes utilizado consiste en una mezcla de metasulfato de fenazina (MSF) y de 2,6-dicloro indofenol de sodio (DCIP). El primero funciona como un transportador de electrones desde la SDH hacia la DCIP. El MSF tiene dos sitios de acción, uno a nivel de la deshidrogenasa y otro en la coenzima Q, al unirse a ellos provoca la reoxidación de las formas reducidas por el succinato. Después los electrones son transportados del MSF hacia el DCIP. La forma oxidada del DCIP es azul oscuro y la forma reducida es incolora.



Forma oxidada  
(azul oscuro)



Forma reducida  
(incolora)

Esta pérdida de color puede ser seguida espectrofotométricamente a 623 nm de tal manera que el cambio en la absorbancia  $\Delta A$  durante un cierto intervalo de tiempo  $\Delta T$ , es decir  $\Delta A/\Delta T$ , esta en función directa de la velocidad de deshidrogenación del succinato. La forma en que se relaciona este cociente con la velocidad inicial  $V_0$  es la siguiente:

$$\frac{\Delta A}{\Delta T} \frac{24}{21} = V_0$$

La constante 24 representa el factor por el que hay que multiplicar la cantidad de proteína añadida al realizar la medición para estandarizarlo a 1 mg. En los experimentos representados en resultados, para medir la actividad de D.S. se agregaron 125  $\mu\text{g}$  de proteína a 3 ml de medio, es decir, 41.67  $\mu\text{g}/\text{ml}$  que al ser multiplicados por 24 dan 1 mg de proteína. El 21 es el valor de la constante de extinción molar del DCIP. De esta manera, el valor de velo-



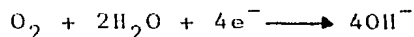
cidad inicial  $V_0$  equivale a nMoles de DCIP reducido/mg.min ó equivalentemente nMoles de succinato oxidado/mg.min.

Es importante hacer notar que el intervalo  $\Delta T$  considerado, varió de 1 a 3 minutos. Durante este lapso la variación en la absorbancia es proporcional a la variación en el tiempo, y por lo tanto la pendiente que se obtiene depende de la concentración de succinato añadido (velocidad inicial).

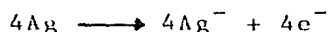
#### Consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se midió en un electrodo tipo Clark. La reacción que ocurre es la siguiente:

a) En el cátodo de platino (pt) el oxígeno es reducido.



b) En el ánodo (Ag):



La velocidad de reducción del  $O_2$  (la corriente medida en el electrodo) es proporcional a la actividad del oxígeno disuelto. Para la ciudad de México se considera que la cantidad de oxígeno disuelta en un medio similar al descrito en la Figura 4, es de 400 n átomos  $O_2$ /ml. La velocidad en el consumo de oxígeno dado por la PSM en estas condiciones se calcula a partir de la pendiente que da el trazo y se corrige para 1 mg de proteína, quedando n  $\mu$  O/mg.min. En todos los experimentos, la proteína se determinó de acuerdo al método de Lowry et al (43).

## RESULTADOS

La Figura 1 muestra el efecto que concentraciones crecientes de cadmio tienen sobre la velocidad de oxidación del succinato. En la Figura 1B está representado el inverso de la velocidad inicial en función de la concentración de cadmio (representación de Dixon) obteniéndose una constante de inhibición de 1.1  $\mu\text{M}$ . Tanto en este experimento como en el representado en la Figura 2, las PSM fueron activadas con 30 mM de fosfato durante 30 minutos a 37°C. Es conveniente mencionar aquí que antes de realizar este experimento se analizó la posibilidad de que la inhibición de la enzima por el cadmio fuera dependiente del tiempo de incubación. Sin embargo, entre 0 y 30 minutos el grado de inhibición permaneció constante (datos no mostrados).

En la Figura 2 se observa la inhibición no competitiva que induce el cadmio en la enzima. La presencia de cadmio en el medio provoca una disminución de la  $V_{\text{máx}}$  (267 nmoles de DCIP red/mg min) sin embargo, no altera la  $K_m$  (70  $\mu\text{M}$ ). Esto es evidencia de que el metal se está uniendo a un sitio distinto al de unión del sustrato.

Para conocer si la inhibición de la enzima se debía a la unión del cadmio a los grupos -SH presentes en ella, se utilizó un agente reductor de grupos sulfhidrilo, el ditiotreitól. En la Figura 3 se muestra la reversibilidad con DTT del efecto inhibitorio del cadmio. Las PSM que

fueron preincubadas con Cd y después con DTT (D) recuperaron un 81% de la actividad con respecto a su control tratado únicamente con DTT (C), en comparación con el 43% de actividad recuperada por las PSM que sólo fueron preincubadas con Cd (B) y comparados con su control sin DTT (A).

En la figura 4A está representado el consumo de oxígeno por PSM a distintos valores de pH, tanto en un medio sin cadmio (I) como en un medio con cadmio (II). En la figura 4B se puede apreciar que el máximo porcentaje de inhibición se obtiene a un pH de 8.5. Puesto que el pKa de los grupos sulfhidrilo es de 8.33, parece ser que la inhibición de la enzima está en función del grado en que estos grupos se encuentren ionizados.

Se sabe que el proceso de activación-inactivación de la enzima involucra cambios conformacionales debido a la gran cantidad de energía requerida para llevarla a cabo. En los siguientes experimentos se muestra el efecto de este proceso en la unión del cadmio a la enzima.

Si las PSM son incubadas en condiciones similares a las descritas en la Figura 1 pero añadiendo ATP, la enzima se activa y la cantidad de cadmio necesaria para dar un cierto porcentaje de inhibición se incrementa (resultados no mostrados). Sin embargo, en la Figura 5 se demuestra que ésto es simplemente un efecto de quelación y que la activación con ATP no evita que el cadmio inhiba; ya que

al añadir cadmio a partículas activadas con ATP, pero que ya no lo contienen en el medio (5D), la enzima resulta completamente inhibida (5E).

En la Figura 6 se observa el efecto de la activación con acetato sobre la inhibición de la actividad de SD. En cada uno de los trazos está representado el valor de velocidad alcanzado por la enzima bajo las distintas condiciones. Se ve que en ningún caso la activación con acetato evita la inhibición por cadmio.

En la Figura 7 se muestra que la activación con fosfato tampoco disminuye el grado de inhibición inducido por el cadmio; a lo largo de las dos curvas superiores (o,□), el porcentaje de inhibición se mantiene constante (40%) a pesar de que la enzima en presencia de cadmio (□) se activó 7 veces. Este proceso de activación como se discutirá posteriormente, puede ser interpretado como una acción de remoción del oxaloacetato debido al fosfato, durante la cual la cantidad de enzima activa se incrementa. A pesar de este incremento, el porcentaje de inhibición se mantiene constante. Esto, está de acuerdo con el resultado mostrado en la Figura 8, en donde al aumentar la concentración de proteína (activada), el porcentaje de inhibición permanece sin variación (49%).

Por último, en la Figura 9 se muestra que la inactivación de la enzima con oxaloacetato evita la unión del metal a la proteína. La preincubación de las PSM con oxaloacetato y Cd permite que se recupere un 87% de la actividad después de que las partículas son reactivadas para eliminar el

oxaloacetato. Sin embargo, cuando las partículas son preincubadas con cadmio y sin oxaloacetato sólo se obtiene un 29% de actividad después de ser reactivadas. La inactivación con oxaloacetato no es tan efectiva al prevenir la inhibición con cadmio y ortofenantrolina pues en este caso sólo se recupera un 49% de actividad comparado con el 31% recuperado en las partículas que no fueron inactivadas.

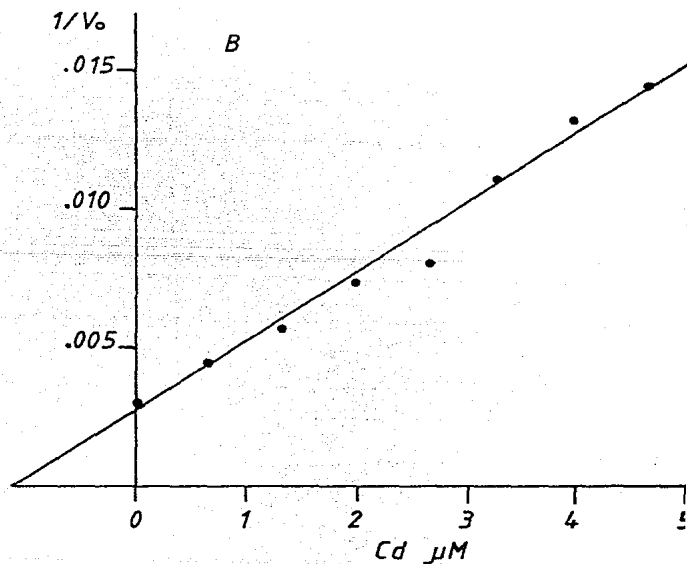
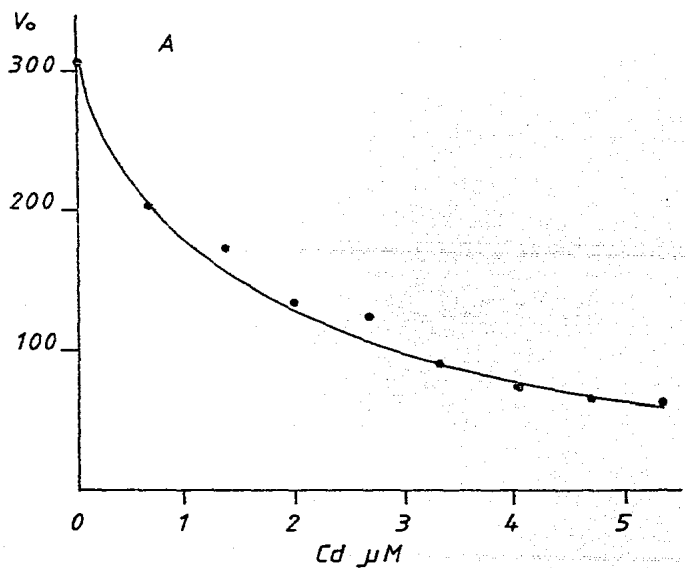


FIGURA 1.- INHIBICIÓN DE LA VELOCIDAD DE OXIDACIÓN DE SUCCINATO POR CONCENTRACIONES CRECIENTES DE CADMIO. 125 microgramos de proteína de PS, previamente activadas con fosfato se agregaron a 3 ml de un medio que contenía 10 mM de fosfato-tris; 10 mM de Tris-HCl pH 7.3; 200 mM de sacarosa, 8.5  $\mu M$  de rotenona; 1 ml de cianuro, 64  $\mu M$  de DCIP; 100  $\mu M$  de nictosulfato de fenazina y las concentraciones de  $CdCl_2$  indicadas a 22°C. En cada punto la reacción se inició con la adición de succinato 666.7  $\mu M$ .

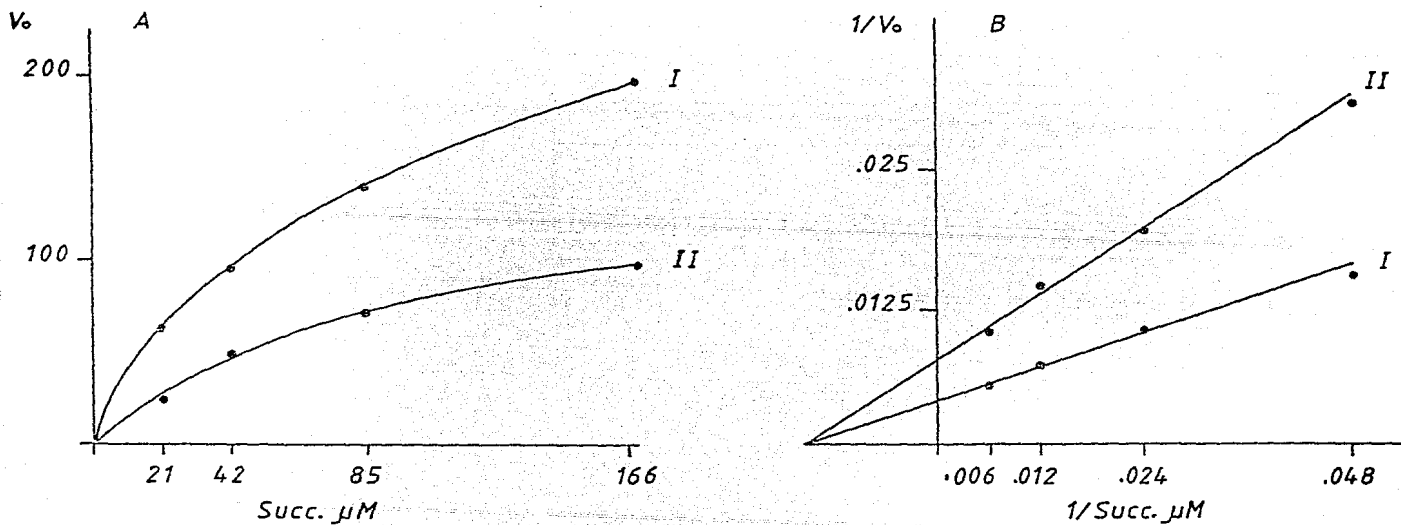


FIGURA 2.- REPRESENTACION DE LA INHIBICION NO COMPETITIVA. 125 microgramos de proteina de PSM activadas se añadieron a un medio similar al descrito en la Figura 1, salvo que en II se agregó 1.3  $\mu i$  de  $CdCl_2$ . En cada punto, la reacción se inició con las concentraciones indicadas de succinato.

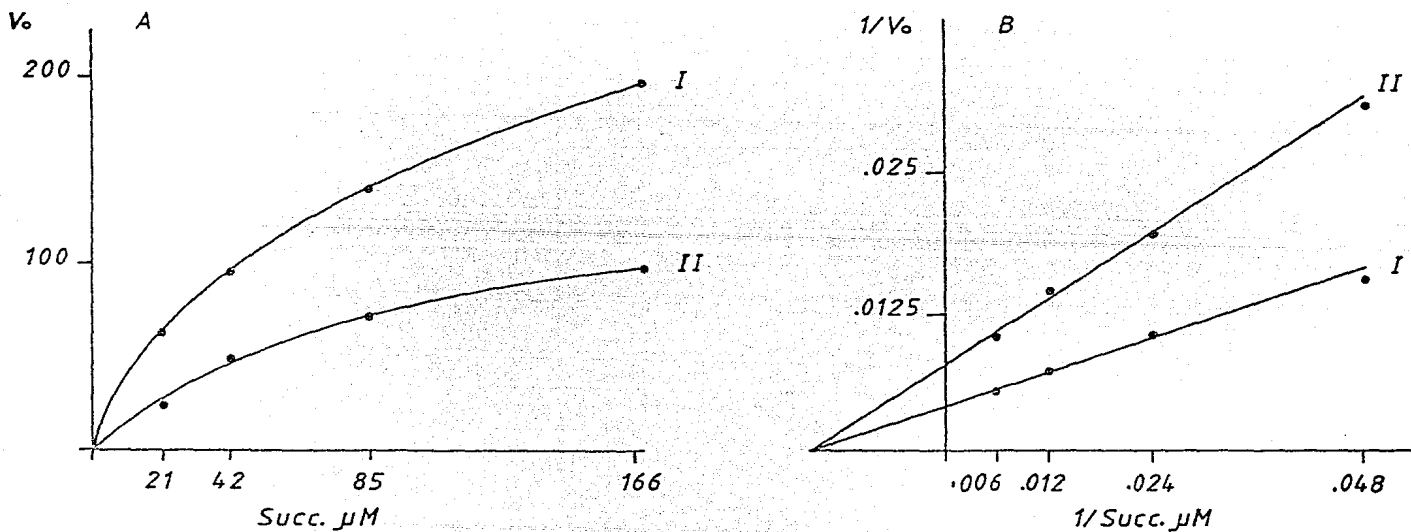


FIGURA 2.- REPRESENTACION DE LA INHIBICION NO COMPETITIVA. 125 microgramos de proteina de PSM activadas se añadieron a un medio similar al descrito en la Figura 1, salvo que en II se agregó 1.3  $\mu l$  de  $CdCl_2$ . En cada punto, la reaccion se inició con las concentraciones indicadas de succinato.



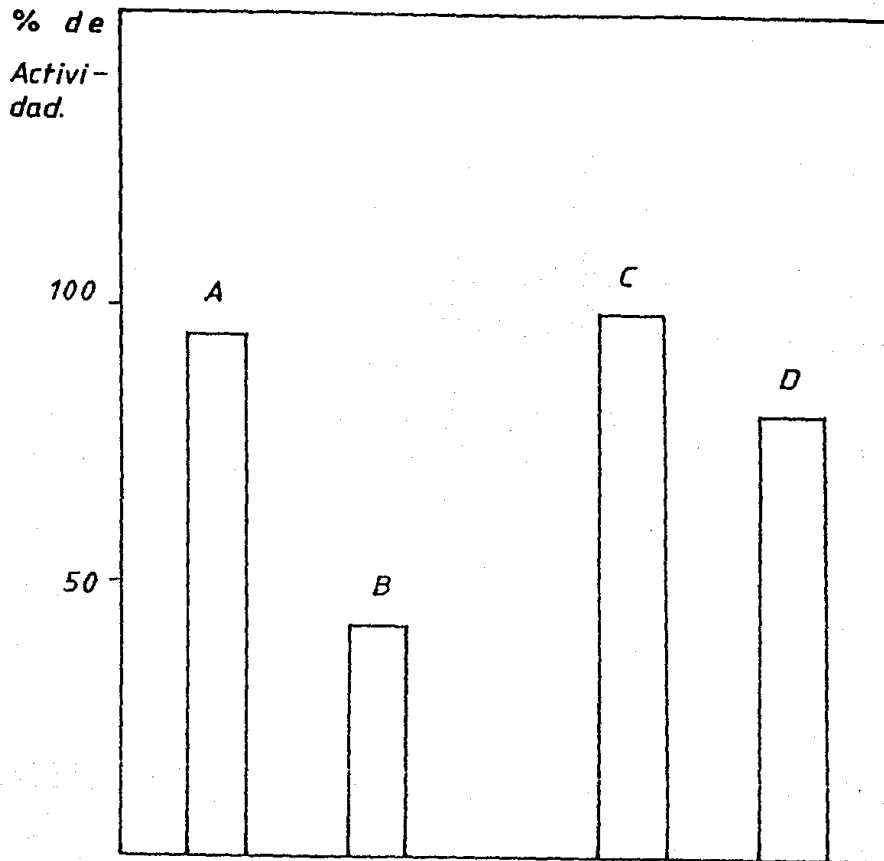
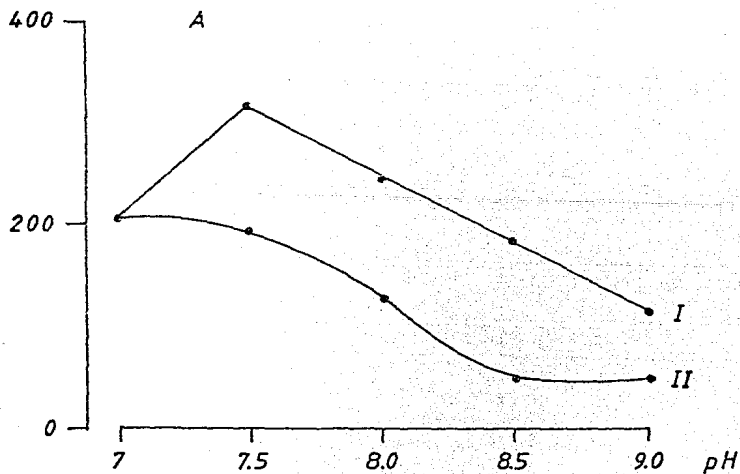


FIGURA 3.- REVERSIBILIDAD CON DITIOUREITOL DEL EFECTO INHIBITORIO DEL CADMIO. En cada punto, 8.8  $\mu$ l de proteína de BSM se resuspendieron en 1.5 ml de sacarosa 0.25 M, en B y D se añadieron 0.144  $\mu$ moles de  $\text{CdCl}_2$  /  $\mu$ g de proteína. Las mezclas se incubaron durante 10 min a 22°C. Después de la incubación a C y D se les añadió 0.268  $\mu$ moles de DTT /  $\mu$ g de proteína. Todas las mezclas se centrifugaron y a cada una se le midió actividad en condiciones similares a las descritas en la figura 1.

nA O/min/mg



% inhibicion

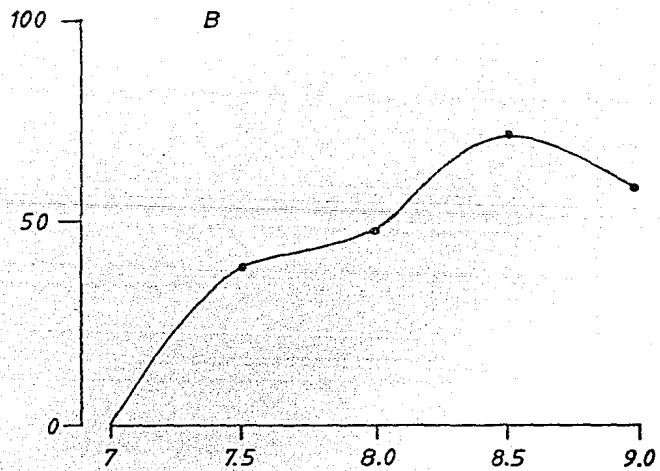


FIGURA 4.- DEPENDENCIA DEL pH EN LA INHIBICION DEL CADMIO SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO.

1.82 mg de proteína de PSM se añadieron a 3 ml de un medio que contenía 10 mM de fosfato; 10 mM de succinato, 233 mM de sacarosa y 50 mM de los siguientes amortiguadores: PIPES-NaOH pH 7.0; MOPS-NaOH pH 7.5; tris-HCl pH 8.0 y 8.5; borato-HCl pH 9. En II se añadió 0.15 moles de  $CdCl_2/\mu g$  de proteína.

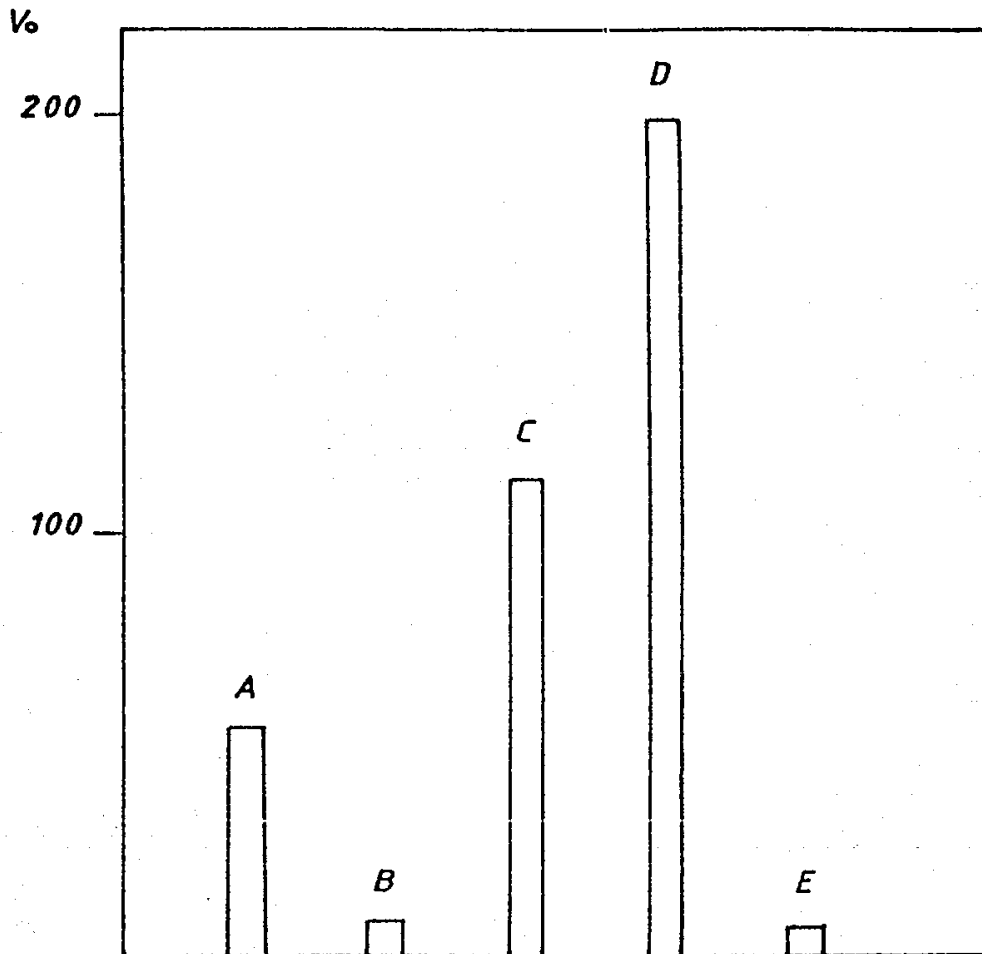


FIGURA 5.- EFECTO DE LA ACTIVACION CON ATP SOBRE LA INHIBICION DEL CAMINO. En A, C y D 4.1  $\mu$ g de proteína de PNH se resuspendieron en 2 ml de sacarosa 0.25 N. En C y D se añadió 5  $\mu$ l de ATP y las mezclas se dejaron incubar durante 10 minutos a 22°C. Después de la incubación, a C se le agregaron 0.2 moles (415  $\mu$ M) de  $\text{GdCl}_3$ /  $\mu$ g de proteína. Las tres mezclas se centrifugaron y se les midió actividad. Alícuotas de 125  $\mu$ g de proteína se tomaron de A y D para medirles actividad en un medio que contenía 0.2 moles de  $\text{GdCl}_3$ /  $\mu$ g de proteína dando los valores de B y E respectivamente.

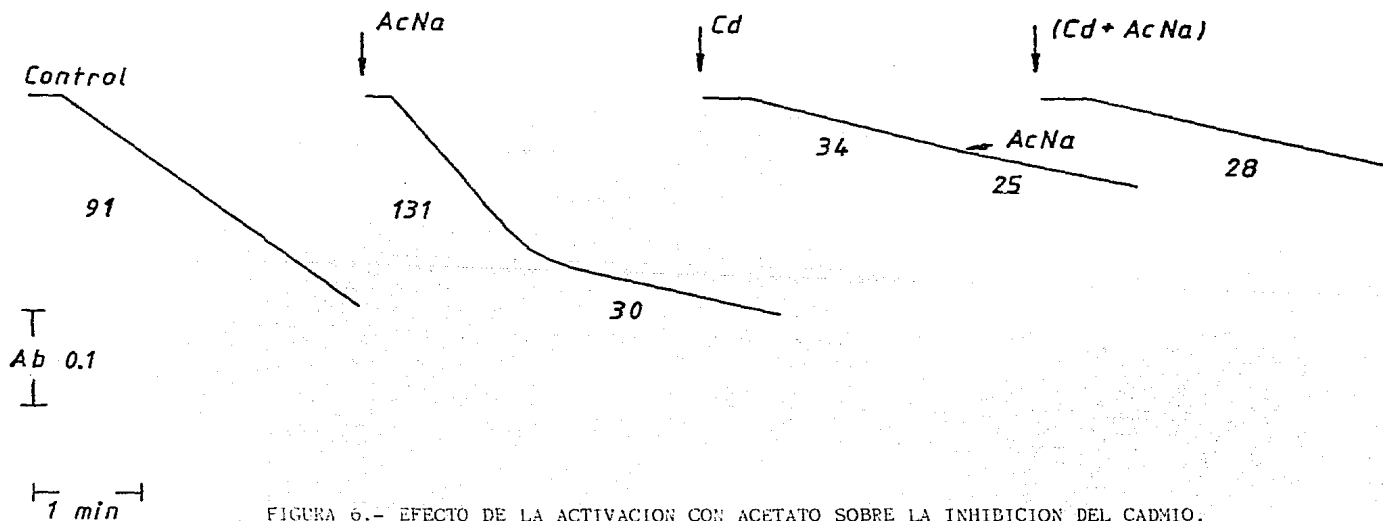


FIGURA 6.- EFECTO DE LA ACTIVACION CON ACETATO SOBRE LA INHIBICION DEL CADMIO. 125  $\mu$ g de proteina se agregaron a un medio como el que se describe en la Figura 1. Donde se indica se agregó: 1.67 mM de acetato de sodio (AcNa) y 6.25  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>. La reaccion se inició con la adición de succinato 416.7  $\mu$ M. Bajo cada curva se indican los valores correspondientes de velocidad inicial.

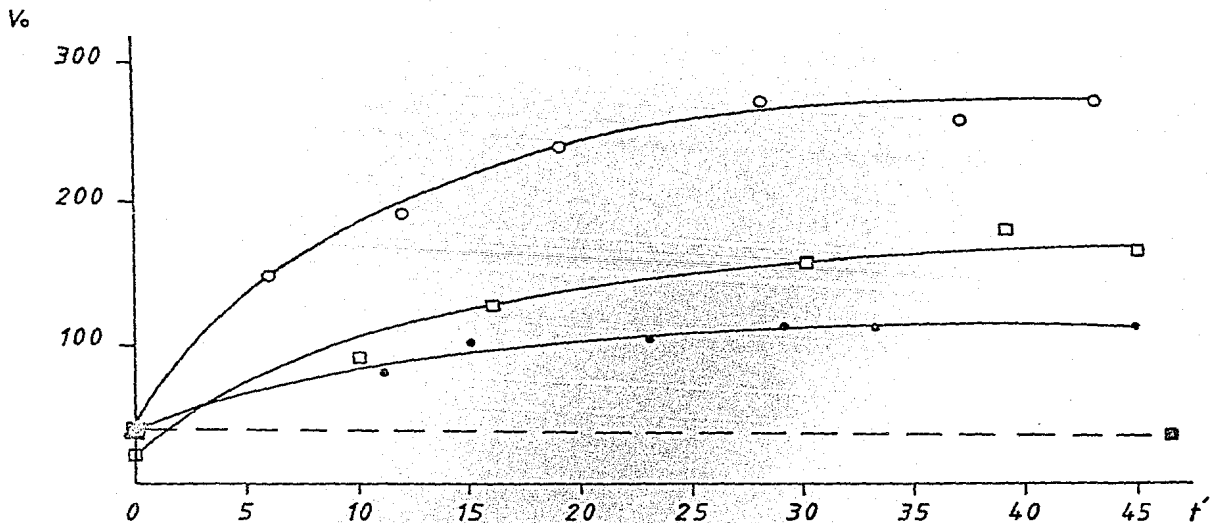


FIGURA 7.- EFECTO DE LA ACTIVACION CON FOSFATO SOBRE LA INHIBICION DEL CADMIO. Aliquotas de 125  $\mu$ g de proteína fueron retiradas de tres fracciones de PSM a los tiempos indicados para medirles actividad. En la primera fracción (■) las PSM permanecieron en hielo y solo se tomaron muestras al principio y al final del experimento. La segunda fracción (●) fue incubada a 37°C y a la tercera se le agregó 30 ml de fosfato y también se incubó a 37°C, en este caso las alícuotas se añadieron a un medio con 1.3  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub> (□) o a un medio sin CdCl<sub>2</sub> (○).

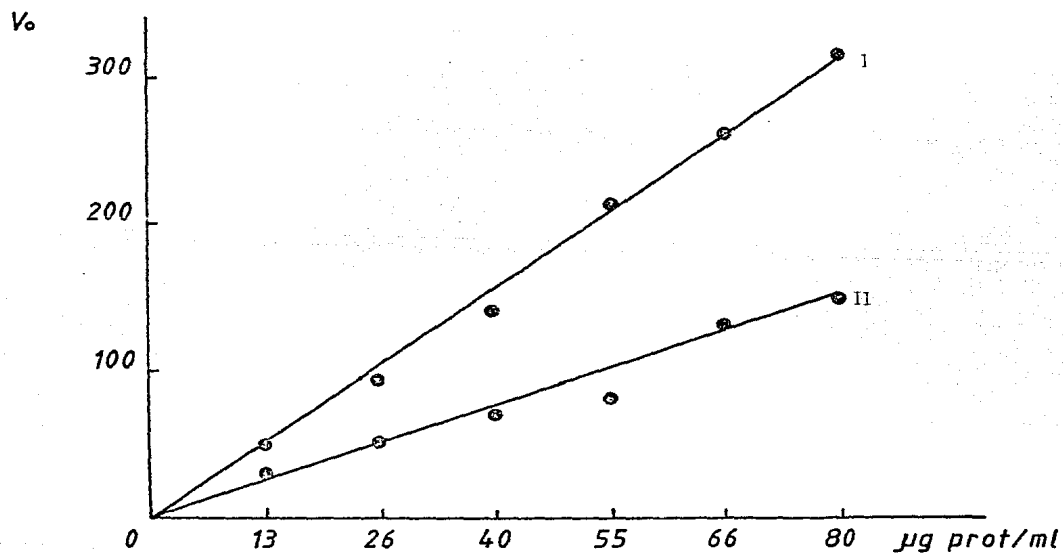


FIGURA 8.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA SOBRE EL PORCENTAJE DE INHIBICION PS<sub>1</sub> fueron activadas con fosfato 30 mM durante 30 min. a 37°C. Después de esto, las cantidades indicadas de proteína fueron retiradas para medirles actividad en un medio similar al descrito en la figura 1. En II se agregó 2 µM de CdCl<sub>2</sub>.

%  
Actividad

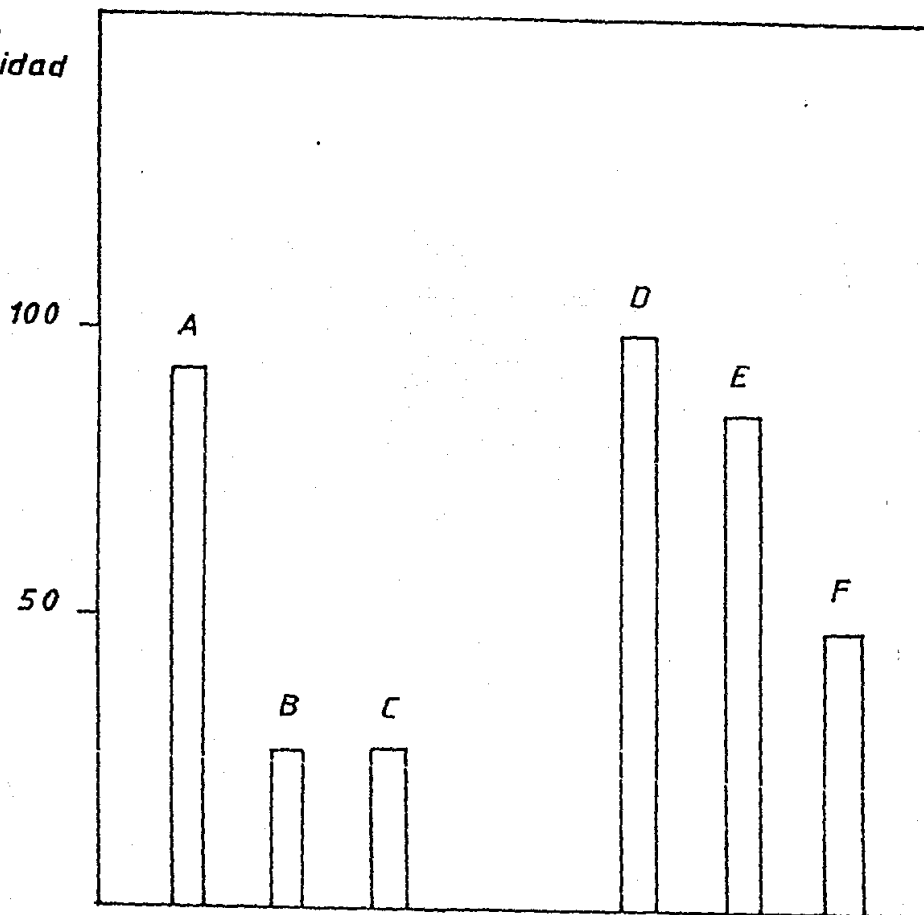


FIGURA 9.- EFECTO DE LA INACTIVACION CON OXALOACETATO SOBRE LA INHIBICION DEL CALBIO Y DEL CALBIO MAS ORTOFENAMIDOLINA.

En cada punto se agregaron 4.2  $\mu$ g de proteína. En D, E y F se añadió 1 ml de oxaloacetato y todas las muestras se dejaron incubar durante 15 min a 22°C. Después de la incubación, en B, C, E y F se añadieron 0.45  $\mu$ moles de  $\text{CaCl}_2$ /1  $\mu$ g de proteína y en C y F se añadió además, 0.45  $\mu$ moles de ortofenamidolina/1  $\mu$ g de proteína. Todas las muestras se centrifugaron y se reactivaron con 70 ml de fosfato + 25 ml de succinato; de cada una se tomaron 125  $\mu$ g de proteína para medirles actividad.

## DISCUSION.

Tanto en los experimentos representados en la Figura 1 como en la 2, las PSM fueron previamente activadas con fosfato. Esto se hizo con el fin de obtener una mezcla homogénea de proteínas en la cual la mayor parte de ellas se encontrara en su conformación activa. Con las enzimas activadas de esta manera, el valor obtenido para la constante de inhibición no se altera con respecto al encontrado en partículas no activadas; sin embargo, los experimentos se vuelven más reproducibles y los parámetros cinéticos más constantes, sobretodo la  $V_{m\acute{a}x}$  que se eleva permaneciendo alrededor de 300 nMoles de DCIPred/mg min.

En todos los experimentos en donde se calculó la velocidad inicial en condiciones similares a las descritas en la Figura 1, la concentración de cadmio se expresa en términos de molaridad. En estos casos la concentración de proteína es muy baja (125  $\mu\text{g}/3\text{ ml}$ ) y la velocidad de catálisis disminuye en respuesta a pequeños aumentos en la concentración de cadmio. En los demás experimentos la concentración de proteína utilizada, que fue incubada con cadmio, es dos órdenes de magnitud mayor. De esta manera, la cantidad de cadmio añadida para conservar cierto grado de inhibición se hizo respetando la relación nmolas de Cd/ $\mu\text{g}$  de proteína, tomando en cuenta un valor de  $K_i$  de 0.024 nmolar Cd/ $\mu\text{g}$  de proteína.



Por otro lado, en el experimento representado en la Figura 3 se puede apreciar que la cantidad de DTT añadido para revertir la inhibición fue el doble que la de cadmio; esto se debe a que el cadmio es un metal divalente que reacciona preferentemente con grupos SH vecinales y por lo tanto para desplazarlo se requiere romper la unión en ambos sitios. En la Figura 4 se muestra que la inhibición en el consumo de oxígeno se incrementa a valores de pH alcalinos, teniendo un máximo a 8.5. Esto descartó la posibilidad de que el cadmio se esté uniendo a reactivos que no sean sulfhidrilo (pKa 8.33) como podrían ser imidazol (pKa 6.01)  $\phi$ -carboxilo (pKa 3.9),  $\alpha$ -carboxilo (pKa 4.3) ó  $\xi$ -amino (pKa 10.5).

De la Figura 5 a la 9 se muestra el efecto que la activación con ATP, fosfato y acetato, y la inactivación con oxaloacetato, tienen sobre la inhibición de la enzima por cadmio. Antes de discutir estos resultados conviene recordar el papel que esta función tiene en el metabolismo mitocondrial. A pesar de que durante mucho tiempo se consideró la posibilidad de que el proceso de activación-inactivación de la enzima fuera de importancia en la regulación de la velocidad del ciclo de Krebs, actualmente esto ha quedado descartado y en su lugar, se acepta un cuadro distinto para el tipo de control que esta enzima realiza (40, 44). En resumen se puede decir lo siguiente: en la mitocondria la cantidad de enzima que se encuentra en su conforma-

ción activa se incrementa al aumentar la relación  $\text{CoQ.H}_2/\text{CoQ}$ . Esta razón, puede disminuir hasta 10 veces durante la transición del estado basal 4 al 3 ó con la adición de agentes desacoplantes (45). De esta manera la estimulación de la respiración con ADP inactiva a la enzima, pues oxida completamente a la CoQ. Durante esta etapa la concentración de succinato se incrementa (46,47). Además, se sabe (48,49) que la presencia de ATP incrementa la velocidad de oxidación de succinato. La activación por ATP involucra un mecanismo no mediado por la reducción de la CoQ o de la remoción de oxaloacetato; pues al medir la oxidación de succinato en presencia de glutamato (que remueve al oxaloacetato por transaminación) y piericidina (la cual evita la reducción del  $\text{NAD}^+$  y por lo tanto de la CoQ así como la formación de oxaloacetato), esta permanece inalterada (50).

El hecho de que la activación de la succinato deshidrogenasa por la  $\text{CoQH}_2$  y por el ATP sea aditiva (49), muestra que la acción de estos dos tipos de moduladores es independiente. Sin embargo, su acción combinada es necesaria para brindar un control compatible con los requerimientos fisiológicos. Para reunir estos hechos en un solo esquema, es necesario mencionar las observaciones de Wu y Tsou (51) y de Singer P.T. et al (52) de que los sustratos de varias flavoproteínas unidas a la cadena respiratoria (DPNH, succinato, colina,  $\alpha$ -glicerolfosfato) interfieren mutuamente con la oxidación de los demás. Esto quiere decir, por ejem-

plo que durante la oxidación del succinato, la reoxidación del NADH se ve restringida; lo cual resulta importante si se toma en cuenta que la oxidación de 1 mol de succinato rinde 2 moles de ATP, mientras que la presencia de 3 sitios de oxidación de NADH produce colectivamente 9 moles de ATP.

En general se tiene el siguiente esquema: cuando la razón ATP/ADP es baja, la deshidrogenasa es inactivada, lo cual ocurre por la disminución en la concentración de ATP y de  $\text{CoQH}_2$  (estado 3). Esto permite un incremento en la oxidación de NADH y durante esta etapa (estado 3) el succinato se puede acumular. Cuando la razón ATP/ADP alcanza un nivel alto (estado 4), la succinato deshidrogenasa se activa por el succinato, la elevada relación  $\text{CoQH}_2/\text{CoQ}$  y el aumento en la concentración de ATP, resultando en la oxidación del succinato acumulado (40,44).

En la figura 5 se observa que la activación con ATP incrementó casi 4 veces (D) la velocidad de oxidación de succinato con respecto al control (A). Sin embargo, la activación por ATP de la succinato deshidrogenasa en PSM requiere 10Kcal/mol más que en las mitocondrias intactas, además, en estas últimas la velocidad requerida para llevarla a cabo es menor, por lo que se ha sugerido que el paso limitante en la velocidad de activación se ve facilitado en el ambiente mitocondrial (53). A pesar de esto, no hay

razón para suponer que en las PSM, el ATP active mediante la eliminación de oxaloacetato, fenómeno que tampoco ocurre en las mitocondrias, como se mencionó arriba. Nosotros suponemos que la actividad medida en las partículas activadas (D) corresponde a la que dan las enzimas que no contienen oxaloacetato y que la unión del ATP (a un sitio distinto al de la unión del succinato u oxaloacetato) acarrea un cambio conformacional (lo cual es compatible con la alta energía requerida en el proceso (53), que de alguna manera aumenta la afinidad por el sustrato en el sitio activo).

A pesar de que la diferencia en energía de activación sugiere un mecanismo diferente para la activación mediada por ATP en mitocondrias y en PSM, el cambio conformacional que lo acompaña en estas últimas no impide que el cadmio reaccione con los grupos sulfhidrilo de la proteína.

Se ha descrito otro tipo de activación en la cual la enzima cambia de una conformación inactiva a otra activa en un medio ligeramente ácido. Este desplazamiento del equilibrio hacia la forma activa se estabiliza en presencia de ciertos aniones inorgánicos, monovalentes, como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{B}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , ó algunos aniones orgánicos como el acetato y formato. A concentraciones adecuadas de estos aniones la activación procede aún a pH neutro o ligeramente alcalino (54).

El valor encontrado para la energía de activación

en estas condiciones es de 25 Kcal/mol mientras que para la activación con succinato, malonato o  $\text{CoQH}_2$  es de 31 a 33 Kcal/mol (55). a pesar de esta diferencia, la cantidad de energía requerida para la activación por aniones es lo suficientemente elevada para ser compatible con un cambio conformacional. Kearney et al (56) reportaron que durante la activación, se libera oxaloacetato de la enzima.

Bajo las condiciones experimentales representadas en la Figura 6, la activación con acetato incrementó en un 44% la velocidad de oxidación de succinato. En el segundo trazo de la figura se muestra que este incremento en la actividad es incapaz de evitar la inhibición por cadmio. Así mismo, en PSM que se encuentran inhibidas por el metal y a las cuales se les agrega acetato, este es incapaz de revertir la inhibición activando a la enzima (tercer trazo). En el último trazo se observa que la adición de cadmio y acetato juntos no evita la inhibición. Es posible concluir de este experimento, que el cambio conformacional que acompaña a la activación con acetato no es tal que evite la unión del cadmio.

Cuando se mide la actividad de la succinato deshidrogenasa en PSM, hasta un 80% ó 90% de la enzima puede estar inactiva, Singer T.P. et al (57) reportaron que estas preparaciones contienen oxaloacetato firmemente unido, el cual puede ser removido por activación completa de la enzima

con Br 6 IDP.

En la Figura 7 se muestra el curso temporal de la activación de la enzima con fosfato. La activación con fosfato no puede ser vista simplemente como la causada por un anión debido a que esta, al igual que la activación inducida por succinato o malonato, no es dependiente del pH. La acción del fosfato es más bien debida a su conocida habilidad para combinarse con el centro activo de la enzima y desplazar posiblemente al oxaloacetato (55). A lo largo de las curvas superiores de la Figura 7 se aprecia que el porcentaje de inhibición inducido por el cadmio permanece constante (40%). Esto es comparable a la observación mencionada anteriormente de que la  $K_i$  calculada en PSM inactivadas es la misma que la encontrada en partículas activadas.

La interpretación de este resultado debe considerarse dos puntos de vista. En el primero se puede suponer, simplemente, que como la cantidad de cadmio y enzima añadida en cada punto es constante, el porcentaje de inhibición también lo es. Esto implicaría que el cadmio se une indistintamente a las enzimas que contienen oxaloacetato o que no lo contienen y que la activación con fosfato (ya sea que elimine o no al oxaloacetato) no altera la proporción de enzimas que tienen unido al metal. La otra posibilidad es que durante el proceso de activación con fosfato el oxaloacetato sea eliminado y el cadmio se una solamente a las enzimas activas que ya no lo contienen. La comproba-

ción de esta suposición requiere que ocurran dos hechos:

- a) Que al aumentar la concentración de enzima (activa) el porcentaje de inhibición se mantenga constante.
- b) Que la inactivación de la enzima por oxaloacetato impida la unión del cadmio.

En la figura 8 se muestra que al aumentar la concentración de proteína, dentro del rango de  $\mu\text{g}$ , la inhibición por cadmio permanece constante (49%).

En la Figura 9 se muestra que la preincubación de la PSM con oxaloacetato evita la unión del metal. En este punto hay que mencionar que la concentración de cadmio añadido fue casi del doble que la de oxaloacetato y equivalía a un valor de 19 veces la  $K_i$ ; esto junto con el hecho de que las sales de los ácidos orgánicos del tipo del oxaloacetato se encuentran altamente ionizadas a pH fisiológicos, descarta un efecto de quelación.

La inactivación con oxaloacetato no es tan efectiva al evitar la inhibición del cadmio y orto-fenantrolina juntos. Esto puede deberse a que la acción combinada de estos dos agentes involucra un fenómeno más complejo que la simple unión a los grupos sulfhidrilo y cuya naturaleza no se puede aclarar en este momento. Nótese que las partículas que fueron preincubadas con oxaloacetato (Fig. 9D) recuperaron una actividad igual a las del control (Fig. 9A) después de haber sido reactivadas con fosfato y succina-

to, lo cual significa que el oxaloacetato si es desplazado por la acción semejante de estos moduladores.

Otra posibilidad durante la activación con fosfato sería que este anión además incremente la afinidad por el succinato de las enzimas que no contienen oxaloacetato y que el cadmio se una a este tipo de proteínas modificadas. Esto, obviamente, no invalida la hipótesis de que el cadmio no se una a las enzimas inactivadas por oxaloacetato.

En conclusión podemos decir que durante el proceso de activación de la succinato deshidrogenasa se llevan a cabo cambios conformacionales que, sin importar el camino seguido para llegar a ellos, desenmascaran a los grupos sulfhidrilo. Mientras que si la enzima se encuentra inactiva estos grupos no están accesibles al cadmio. Además, el ocultamiento de estos grupos debe ser acompañado por cambios íntimos en la estructura terciaria de la proteína, ya que si éstos involucraran simplemente una interacción mayor de los grupos -SH con algún sitio hidrófobo, el cadmio seguiría siendo capaz de inhibir a la enzima.



## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Weast, C. (Ed.) (1969) Handbook of chemistry and physics. 50<sup>th</sup> ed., Cleveland, Ohio, Chemical Rubber Co.
- 2.- Fleischer, M., A.F. Sarofim, D.W. Fassett, P. Hammond, H.T. Shacklette, I.C.T. Nisbet & S. Epstein (1974) Environ. Health Perspect. 7, 253-323.
- 3.- Holmes, R. (1976) The regional distribution of cadmium in England and Wales. Unpubl. Ph. D. thesis, University of London.
- 4.- Buchaver, M.J. (1973) Environ. Sci. Technol. 7, 131-135.
- 5.- Little, P. and M.H. Martin (1971) Environ. Pollut. 6, 1-19.
- 6.- Schroeder, H.A. and J.J. Balassa (1963) Science 140, 819-820.
- 7.- Schroeder, A.A., A.P. Nason, I.H. Tripton, J.J. Balassa (1967) J. Chron. Dis. 20, 179-210.
- 8.- Furr, A.K., A.W. Lawrence, S.S.C. Tony, M.C. Grandolfo, R.A. Hofstader, C.A. Bache, W.H. Gutenmann, O.H. Lisk (1976) Environ. Sci. Technol. 10, 683-687.
- 9.- Pearson, R.G. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85, 3533.
- 10.- Perkins, D.J. (1961) Biochem. J. 80, 668-672.
- 11.- Valle, B.L. & D.D. Ulmer (1972) Ann. Rev. Biochem. 41, 91-128.

- 12.- Percoraro, V.L., J.D. Hermes, and W.W. Cleland (1984) Biochemistry 23, 5262-5271.
- 13.-Fiberg, L., M. Piscator, G.F. Nordberg & T. Klellstrom (1974) Cadmium in the environment, 2<sup>nd</sup> ed., Cleveland, CRC Press Inc., p. 128.
- 14.- Hise, E.C. & W. fulkerson (1973) In: Cadmium, the dissipated element (W. Fulkerson & H.E. Goelher eds.) Oak Ridge National Library, pp. 203-278.
- 15.- Friberg, L. (1950) Acta Med. Scand. 138, Suppl. 240.
- 16.- Baader, E.W. (1951) Dtsch. Med. Wochnschr. 76, 484-487.
- 17.- Bonnel, J.A. (1955) Br J. Ind. Med. 12, 181-195.
- 18.- Nordberg, G.F. (ed.) (1976) Effects and dose-response relationships of toxic metals. Amsterdam, Elsevier. pp. 64-72.
- 19.- Friberg, L. (1948) J. Ind. Hyg. Toxicol. 30, 32-36.
- 20.- Smith, J.C., A.R. Wells & J.E. Kench (1961) Br. J. Ind. Med. 18, 70-78.
- 21.- Lauwerys, R., J.P. Buchet, H.A. Roels, J. Bronwers & D. Stanescu (1974) Arch. Environ. Health 28, 145-148.
- 22.- Lauwerys, R., J.P. Buchet & H. Roels (1976) Int. Arch. Occup. Environ. Health 36, 275-285.
- 23.- Nogawa, K., A. Ischazaki, M. Fukushima, I. Shibata & N. Hagino (1975) Environ. Res. 10, 280-307.
- 24.- Schroeder, H.A. (1965) J. Chron. Dis. 18, 647-656.

- 25.- Thind, G.S. (1972) J. Air Poll. Cont. Assoc. 22, 267-270
- 26.- Mertz, D.P., R. Koschnick & G. Wilk (1972) Klin. Chem. Klin. Biochem. 10, 21-24.
- 27.- Saris, N.E. & J. Järvisalo (1977) Clin. Chem. tox. Metals pp. 109-112.
- 28.- Chávez, E., R. Briones, B. Michel, C. Bravo & D. Jay (1985) Arch. Biochem. Biophys. 242, 493-497.
- 29.- Zaba, B.N. & E.J. Harris (1976) Biochem. J. 160, 708-714
- 30.- Jacobs, E.E., M. Jacob, O.R. Sanadi & L.B. Bradley (1956) J. Biol. Chem. 223, 147-156.
- 31.- Sanadi, D.F., M. Langley & F. White (1959) J. Biol. Chem. 234, 183-187.
- 32.- Fletcher, M.J., A.L. Fluharty & D.F. Sanadi (1962) Biochem. Biophys. Acta 60, 425-427.
- 33.- Fluharty, A.L. & D.R. Sanadi (1963) Biochemistry 2, 519-522.
- 34.- Southard, J., P. nitiswojo & D.E. Green (1974) Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 33, 2147-2153.
- 35.- Mustafa, M.G. & C.E. Cross (1971) Biochemistry 16, 4176-4185.
- 36.- Diamond, E.M. & J.E. Kench (1974) Environ. Physiol. Biochem. 4, 280-283.
- 37.- Davis, K.A., & Y. Hatefi (1971) Biochemistry 10, 2509-2516.

- 38.- Lusty, C.J., J.M. Machinist & T.P. Singer (1965) Biol. Chem. 240, 1804.
- 39.- Walker, W.H. & T.P. Singer (1970) Biol. Chem. 245, 4244.
- 40.- Chávez, E., C. Bravo & D. Jay (1986) J. Bioenerg. Biomemb. (en prensa).
- 41.- Sanborn, B.M., N.T. Feldberg & T.C. Hollocher (1971) Biochem. Biophys. Acta 227, 210.
- 42.- Lee, C.P. & L. Ernster (1965) in Symposium on the regulation of metabolic processes in mitochondria (Tager, J.M, S.Papa, E. quagliariello, & E.C. Slater eds.) Vol. 7, pp 218-234, Elsevier, North-Holland, New York.
- 43.- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr & R.J. Randal (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 44.- Singer, T.P., E.B. Kearney & Kenney (1973) Adv. Enzym. 5, 239-242.
- 45.- Klingenberg, M., (1968) in Biological Oxidations. Singer, T.P. Ed. Wiley, New York, pág. 3.
- 46.- La Nove K., W.J. Nicklas & J.R. Williamson (1970) J. Biol. Chem. 245, 102.
- 47.- Von Korff, R.W. (1967) Nature 214, 23.
- 48.- Gregolin. C. & P. Scallela (1965) Biochem. Biophys. Acta 99, 185.
- 49.- Gutman, M., E.B. Kearney & T.P. Singer (1971) Biochemistry 10, 4763.

- 50.- Singer, T.P., E.B. Kearney & Kenney (1973) Adv. Enzym. 5, 224-229.
- 51.- Wu, C.Y. & C.L. Tsun (1955) Scientia Sinica (Peking) 4, 137.
- 52.- Ringler, R.L. & T.P. Singer (1959) J. Biol. Chem. 234, 2211.
- 53.- Singer, T.P., E.B. Kearney & M. Gutman (1972) in Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells. E. Kun & S. Grisolia, Eds. Wiley, New York. P. 27.
- 54.- Kearney, E.B., A.C. Brian, M.M. Ackrell & T.P. Singer (1974) J. Biol. Chem. 249, 2016-2020.
- 55.- Kearney E.B. (1957) J. Biol. Chem. 229, 363-375.
- 56.- Kearney, E.B., B.A.C. Ackrell, & M. Mayr (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1115-1121.
- 57.- Singer, T.P. E.B. Kearney & Kenney (1973) Adv. Enzym. 5, 238-239.