

BIOSINTESIS DEL INOSITOL EN

NEUROSPORA CRASSA.

Tesis que presenta el M. C.

ENRIQUE PIÑA GARZA

para obtener el grado de

DOCTOR EN QUÍMICA.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Facultad de Química

MÉXICO D. F.

1969.



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 esta 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.

DEDICATORIA:

A dos Martas, mi esposa y mi hija; a dos Rosa Marías,
mi madre y mi hija.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo se inició en el Laboratorio de Bioquímica Genética del Dr. Edward L. Tatum en la Universidad Rockefeller en New York. De él fue la inquietud original en relación con el inositol, que gracias a su entusiasmo e interés muy pronto lo consideré mío. Le agradezco especialmente al Dr. Tatum la benevolencia y paciencia que me mostró al discutir conmigo las etapas iniciales del proyecto. Así mismo recuerdo con gusto la sencillez y la amistad con la que siempre nos distinguieron los Tatums durante nuestra estancia en Estados Unidos.

El mayor porcentaje del trabajo aquí reportado se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, mi actual sitio de trabajo. En él he encontrado siempre el ambiente de trabajo y compañerismo base de un continuo espíritu de superación. Agradezco a mis compañeros de trabajo sus críticas y opiniones. En particular estoy en deuda con Aurora Brunner, Yolanda Saldaña y Marta Zentella de Piña que realizaron muchos de los experimentos aquí descritos. De manera especial quisiera agradecer al Dr. José Laguna García todas las facilidades que de manera ilimitada siempre me proporcionó para la realización del trabajo; además a él le debo en gran parte el haberme iniciado en la investigación y el haberme hecho bioquímico; mi gratitud al maestro que enseña con el ejemplo, reprende con la indiferencia y estimula con el consejo.

Finalmente deseo agradecer a mi padre, el Lic. José Piña y Stein, su continuo interés por el desarrollo de mi trabajo

experimental, siempre me sirvió de estímulo y a él lo convirtió, seguramente, en el abogado con más conocimientos sobre el inositol.

El donativo TW-00266 del National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, fué proporcionado como ayuda para la consecución del trabajo.

ABREVIATURAS EMPLEADAS.

ADP	Adenosina 5' difosfato.
ATP	Adenosina 5' trifosfato.
CDP	Citidina 5' difosfato.
CMP	Citidina 5' monofosfato.
cpm	Cuentas por minuto.
DEAE	Diethyl-amino-etil.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
EDTA	Acido etilen-diamino-tetra-acético.
FAD	Flavin adenin dinucleótido.
g	Fuerza gravitacional.
glucosa-6-P	D-glucosa-6-fosfato.
GDP	Guanosina-5'difosfato.
GMP	Guanosina 5' monofosfato.
GTP	Guanosina 5' trifosfato.
inositol-1-P	D-mio-inositol-1-fosfato.
NAD ⁺	Nicotinamin adenin dinucleótido oxidado.
NADH	Nicotinamin adenin dinucleótido reducido.
NADP ⁺	Nicotinamin adenin dinucleótido fosfato oxidado.
NADPH	Nicotinamin adenin dinucleótido fosfato reducido.
P	Ortofosfato.
PP	Pirofosfato.
RNA	Acido ribonucleico.
rpm	Revoluciones por minuto.
Tris	Tris hidroxil metil amino metano ó 2 amino 2 hidroximetil 1,3 propanediol.
UDP	Uridina 5' difosfato.
UDPG	Uridina 5' difosfato de glucosa.

	Página
<u>INTRODUCCION.</u>	1
I QUIMICA DE LOS INOSITOLES.	1
II MIO INOSITOL.	3
1.- Distribución en la naturaleza.	3
2.- Compuestos de interés fisiológico.	4
3.- Aspectos metabólicos del mio inositol.	6
4.- Aspectos fisiológicos del mio inositol.	10
<u>MATERIAL Y METODOS.</u>	16
I MATERIAL.	17
II METODOS.	18
1.- Cultivo de la <u>Neurospora crassa</u> .	19
2.- Purificación de la D-glucosa-6-fosfa- to cicloaldolasa (NAD ⁺ dependiente).	19
3.- Medición de la actividad enzimática. Cuantificación del inositol formado.	
Otros métodos.	21
<u>RESULTADOS Y DISCUSION.</u>	24
1.- Una o varias enzimas.	25
2.- Purificación de la glucocicloaldolasa.	27
3.- Datos cinéticos de la reacción enzi- mática.	28
4.- Inhibidores.	30
5.- Algunas características de la enzima.	32
6.- Mecanismo de la reacción.	33
7.- Regulación <u>in vivo</u> de la síntesis de inositol.	40
<u>RESUMEN Y CONCLUSIONES.</u>	45
<u>REFERENCIAS.</u>	46

I N T R O D U C C I O N .

I QUÍMICA DE LOS INOSITOLIOS.

Desde el punto de vista biológico al hablar de el "inositol" se concreta uno al isómero denominado "mio" de los ciclohexanohexoles o inositoles. Algunos investigadores (Iohmar, 1957) se refieren indistintamente a los inositoles como ciclitolos mientras que otros aceptan (Angyal y Anderson, 1959) el término de ciclitol como más amplio dentro del que incluyen los inositoles, queracitoles (ciclohexanopentoles), inosaminas (ciclohexanopentoles aminorados), inosonas (pentahidroxiciclohexanonas) y sus derivados.

Teóricamente son nueve los posibles isómeros del ciclohexanohexol y aunque no todos se encuentran en la naturaleza se han sintetizado químicamente los nueve. En la figura 1 se incluyen las fórmulas de dichos isómeros, así como el nombre trivial con el que se identifican. Otra manera de identificarlos, además del uso del nombre común, es por medio de números que indiquen la disposición de los hidroxilos presentes hacia cada lado del anillo; por ejemplo, para el mio inositol sería 1,2,3,5/4,6 e indica que los grupos hidroxilo de los carbonos 1,2,3, y 5 están orientados hacia un lado del anillo, mientras que aquellos de los carbonos 4 y 6 están orientados en un sentido opuesto.

La configuración absoluta de cada uno de los carbonos de los inositoles se conoce perfectamente y se estableció degradando los inositoles a derivados conocidos de los carbohidratos. Es conveniente señalar la conformación de los inositoles ya que su estudio ha sido importante para entender algunos de las reacciones de los mismos. Se acepta que para cada inositol la con-

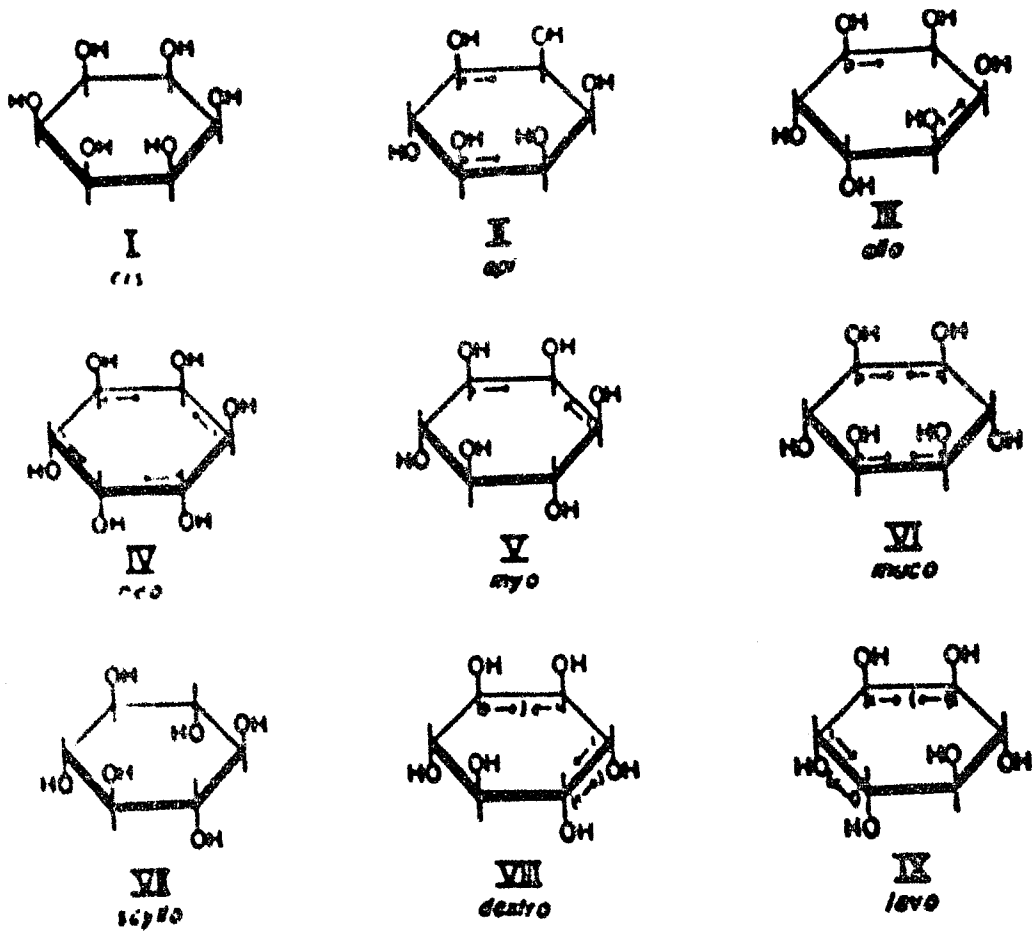


Figura 1.- Fórmulas de los nueve posibles isómeros del ciclohexanohexol.

formación más estable y por lo tanto la preponderante en la de ella con el menor número de hidroxilos axiales (figura 2). Estas conformaciones se han deducido de los principios generales de análisis conformacional aceptando que los grupos sustituyentes en un anillo de ciclohexano son más estables en posición ecuatorial que en axial, las conformaciones anotadas en la figura 2 están de acuerdo con las reacciones de deshidrogenación y formación de complejos con borato que presentan los inositoles (Angyal y Anderson, 1959).

Además se ha observado una correlación interesante entre la presencia en la naturaleza de los inositoles y ciclitolos con su estabilidad conformacional (Angyal y Mills, 1952). Inositoles con alta energía de interacción en su molécula debido a la presencia de dos grupos axiales del mismo lado del anillo nunca se han encontrado en la naturaleza, mientras que todos los demás inositoles y algunos de sus derivados, metílicos por ejemplo, que no tienen esa característica, se han aislado de los seres vivos. El más universalmente encontrado es el mio inositol y este es el motivo, por el cual en biología, al hablar de el inositol se refiere uno al mioinositol; sin embargo es conveniente insistir que varios otros isómeros también están presentes en el interior de las células (Hoffmann-Gatenhof, 1966) e incluso recientemente uno de ellos, el ciclo inositol, se ha aislado de tejidos de mamíferos (Sherman, Stewart, Simpson y Goodwin 1968). En el presente trabajo y continuando con la costumbre, el término inositol implicará específicamente el isómero mio, mientras que el resto de isómeros se identificarán con los nombres triviales con el que se les ha asignado.

En general los inositoles son compuestos cristalinos, solubles en agua, poseen un alto punto de fusión y sabor dulce.

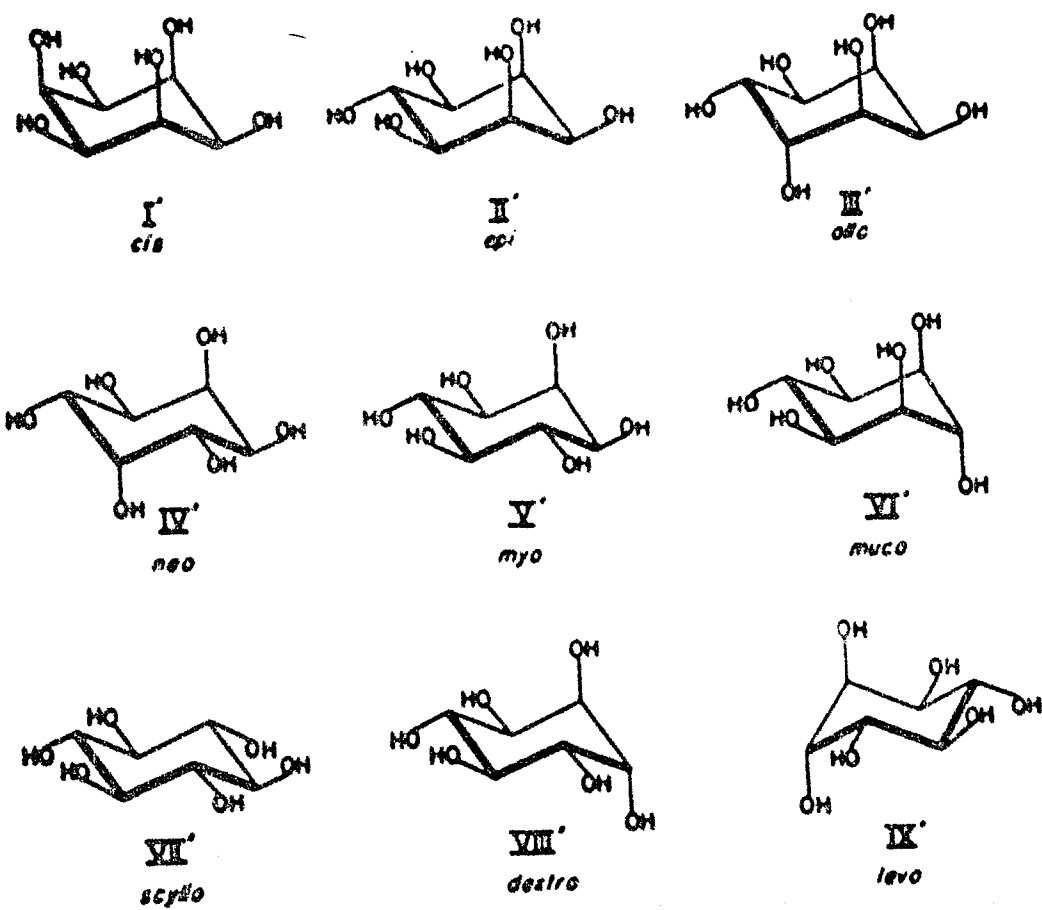


Figura 2.- Fórmulas conformacionales de los compuestos mostrados en la figura 1.

Presentan reacciones químicas similares a las de los polialcoholes acíclicos, pero habitualmente son más estables por el hecho de poseer un anillo en su estructura. No se verá con detalle la química de éstos compuestos por estar el tema un poco alejado del objeto de la presente tesis; basta citar que hay excelentes revisiones sobre la química de los inositolos y sus derivados (Iohmar, 1957; Angyal y Anderson, 1959).

II MIO INOSITOL.

Tiene un peso molecular de 180.2, la misma fórmula empírica de la glucosa $C_6H_{12}O_6$, punto de fusión de 225-227 °C, se disuelven 12.5 g en 100 ml de agua a 20 °C, es insoluble en alcohol y éter.

1.- Distribución en la naturaleza.

En 1850 Scherer aisló el mio inositol del tejido muscular; en un principio se le llamó meso inositol, nombre que se descartó ya que otros isómeros son ópticamente inactivos; el nombre de mio inositol fue sugerido (Fletcher, Anderson y Lardy, 1951) por haberse aislado del tejido muscular. También se le conoce como i-inositol, dambona o faseominita (Iohmar, 1957). Hasta 1928 Eastcot describió el significado nutritivo del compuesto al aislarlo de hojas de té e identificarlo con el factor Bios I que promovía el crecimiento de algunas levaduras. Como se mencionó anteriormente es un compuesto ampliamente distribuido en la naturaleza; de hecho se acepta que lo poseen todas las células a menos que se demuestre lo contrario; uno de éstos casos es el de la *Escherichia coli* (Woolley, 1942). En ciertas bacterias forma parte del polisacárido maninocitosa (Anderson, Iothrop y Creighton, 1938). Por otro lado llama la atención el dato de que el inositol representa cuando menos el 20 % de los sólidos de

las vesículas seminales de los jabalíes (Mann, 1954). En un porcentaje menor se encuentra en el líquido contenido en las vesículas seminales de prácticamente todos los mamíferos.

De las plantas se ha aislado en cantidades importantes como fitina, una sal de calcio y magnesio del ácido fítico que es el éster hexafosfórico del inositol; algunas vegetales como el maíz poseen cantidades tan grandes de fitina que el inositol se prepara industrialmente del ácido fítico proveniente de tales plantas.

Aunque no se usan en la industria se han descrito varios métodos químicos para la síntesis del inositol, de particular interés académicos el método en que se forma a partir de la D-gucosa y que ha servido para confirmar la posición en el espacio de cuando menos tres de los hidroxilos presentes en el inositol (Fohrer, 1957).

2.- Compuestos de interés fisiológico.

El inositol en el interior de las células que lo contienen, además de encontrarse libre, forma parte de otras moléculas de interés fisiológico entre las que podemos mencionar las siguientes:

Los ésteres fosfóricos del inositol. Ya se ha hecho mención al ácido fítico pero además existen ésteres penta, terta, tri, di y mono fosforilados; se ha indicado que pueden representar productos incompletos de hidrólisis del ácido fítico debido a la acción de la enzima fitasa (Anderson, 1945; Angyal y Russell 1966) o bien productos de descomposición por una inadecuada extracción del ácido fítico. Sin embargo existe evidencia experimental de que, cuando menos los derivados mono y di fosforilados, tienen un papel definido como tales en la fisiología celular y no solamente productos de degradación e descomposición (Fohrer,

1957). Conviene aclarar que la formación del éster fosfórico en la posición 1 puede dar origen a dos enantiómeros el D y el L (figura 3); el L parece ser el más abundante en las células (Rappaport y Norton, 1962), y el derivado D, o sea el D-mio inositol-1-fosfato es el producto de la reacción enzimática a partir de la D-glucosa-6-P (Fisenberg, 1967).

Fosfatidil inositol. Se trata de una molécula de ácido fosfatídico a la cual se le une el mio inositol por medio de una unión éster al fosfato. Se acepta que el inositol está unido a través del hidroxilo del carbono 1 y que la configuración del compuesto formado es L alfa (Hanahan y Brockerhoff, 1965). Se le considera como uno de los miembros de los denominados fosfolípidos o fosfoglicéridos y el compuesto unido es el más sencillo de toda una familia a los que se ha llamado genéricamente fosfoinosítidos y que representan quizá los fosfoglicéridos más intrigantes (Hanahan y Brockerhoff, 1965). Hasta ahora el único inositol reportado que forma parte de los fosfolípidos es el isómero mio (Ansell y Hawthorne, 1964) y por lo tanto al referirse a este tipo de moléculas no se especifica de que isómero se trata.

Existen lípidos más complejos que poseen inositol en su molécula y se encuentran en cantidades relativamente altas en el sistema nervioso (Folch, 1949; Dawson, 1966), ejemplos de ellas son el difosfoinosítido y el trifosfoinosítido, en que a la estructura del fosfatidil inositol se le unen por uniones éster un par de ácidos fosfóricos, uno en el hidroxilo del carbono 4 para el difosfoinosítido ; dos uno en el carbono 4 y otro en el hidroxilo del carbono 5 para el trifosfoinosítido (Dawson, 1966). En algunos microorganismos se ha descrito la presencia de una molécula al ácido fosfatídico, con varios los compuestos de

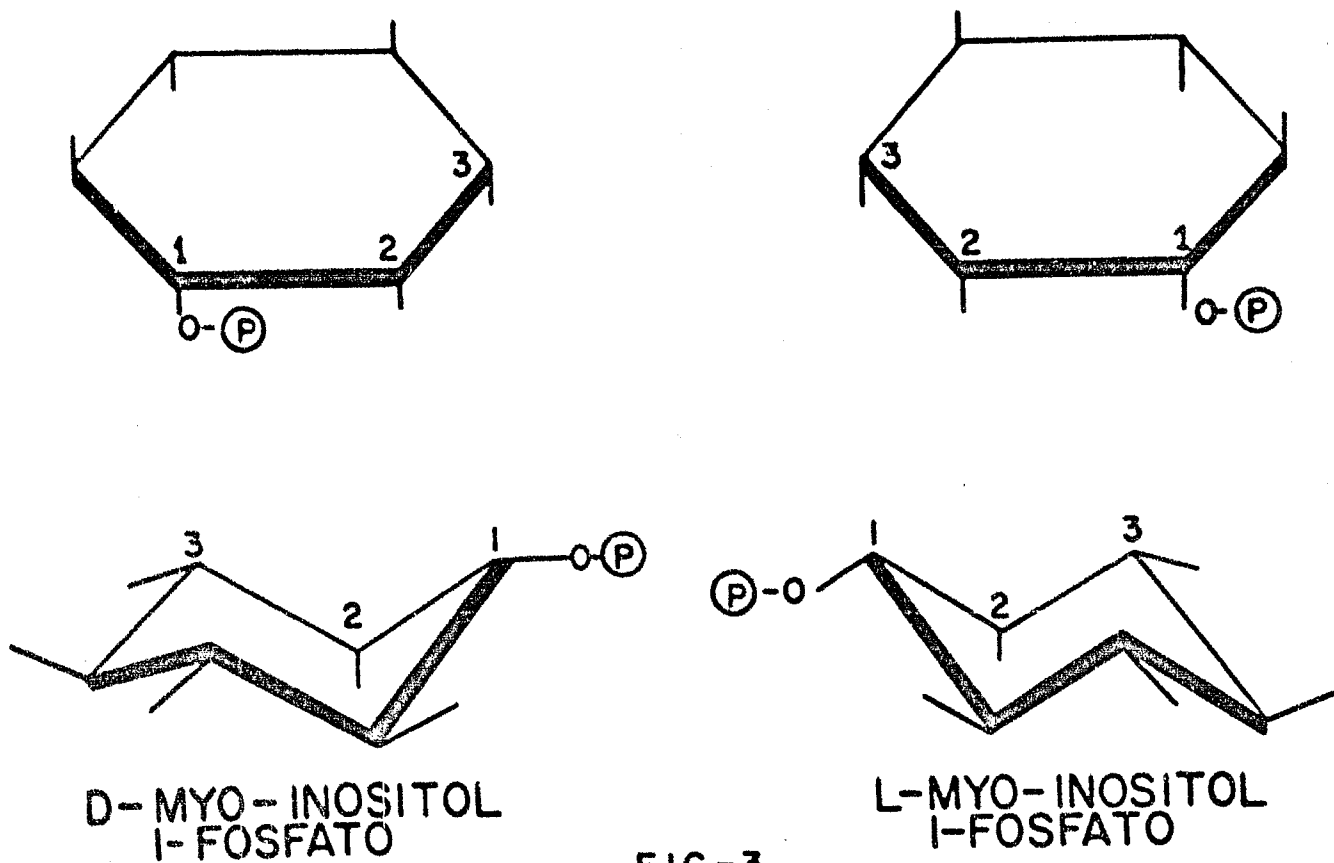


Figura 3.- Enantiómeros D y L del mio-inositol.

este tipo y la manosa: habitualmente se une por su carbón anomérico a los hidroxilos 2 y/o 6 del inositol (Ballou y Lee, 1966), a estos compuestos se les ha llamado manósidos de fosfatidil mioinositol.

3.- Aspectos metabólicos del mio inositol.

Las principales vías metabólicas en que participa el inositol quedan resumidas en la figura 4. En dicha figura se han incluido las reacciones en que participa éste ciclohexanohexol indistintamente del organismo donde originalmente se haya reportado la presencia de determinado paso metabólico, por lo tanto no en todas las células que poseen inositol pueden llevarse a cabo todas las reacciones anotadas. Específicamente la oxidación del inositol en las bacterias no se ha podido demostrar en los mamíferos, y la conversión del inositol en algunos de sus derivados metilados parece ser privativo de las plantas.

De la figura 4 solo se comentarán las reacciones marcadas con un número, el resto de las reacciones anotadas pueden consultarse en un texto de bioquímica y se han incluido para presentar un aspecto más integral del metabolismo intermedio del inositol.

Reacción:

1 Síntesis del inositol-1-P a partir de la glucosa-6-P. Paso catalizado por la D-glucosa-6-P cicloaldolasa (NAD⁺ dependiente), se considera el principal camino, si no el único, para la formación del inositol en células con capacidad de sintetizarlo. Se ha demostrado claramente la reacción en levaduras (Chen y Charalampous, 1964), testículo de rata (Eisenberg, 1967) y el hongo Neurospora crassa (Pisa y Tatum, 1967). El estudio de esta reacción es el objeto de la presente tesis.

2 Formación de inositol libre a partir del inositol-

1-P. Se hace con una fosfatasa que requiere Mg^{++} y que ha sido parcialmente caracterizada (Chen y Charalampous, 1966) demostrando una mayor afinidad para el inositol fosforilado que para otros azúcares fosforilados.

3 Formación de inositol fosfato a partir de inositol libre. Hoffmann-Gatenhof, Jungwirth y Dawid (1958) demostraron que esta reacción se puede realizar con hexocinasa comercial purificada siendo el donador de fosfatos y de energía el ATP. No se ha caracterizado el producto de la reacción, si es D o L inositol, ni el sitio donde está localizado el fosfato.

4 Formación de inositol difosforilado a partir del monofosforilado. Esta reacción junto con la anterior pueden considerarse etapas previas indispensables para la síntesis del ácido fólico; no se han aislado dentro de su camino de síntesis derivados del mio inositol con más de dos fosfatos en su molécula, y se ha postulado que para la formación del hexafosfato de mio inositol, el compuesto difosforilado se une a alguna otra molécula, posiblemente un nucleótido y así combinado sigue aceptando más fosfatos (Asada, Tanaka y Fusai, 1969).

5 Síntesis de fosfatidil inositol a partir de inositol y un CDP diglicérido. La reacción ha sido revisada con detalle por Kennedy (1961) y además de formar éste compuesto de gran importancia fisiológica es el paso previo para la formación de difosfoinosítidos y trifosfoinosítidos (Goldfine, 1968) así como de manósidos de fosfatidil inositol (Ballou y Lee, 1966).

6 Formación de inositol a partir de la 4 inososa. Esta reacción representa un camino lateral en Neurospora crassa para la a-intensa de inositol (Pina y Tatum, 1967); la importancia fisiológica de éste camino es dudosa en vista de la aparentemente imposibilidad de la célula para formar la 4 inososa.

7 Mas que una reacción enzimática representa uno de los posibles papeles fisiológicos que se le han asignado al inositol y que se revisarán con detalle mas adelante.

8 Formación del ácido D-glucurónico a partir del inositol. Es el principal camino de degradación del mio inositol en animales y plantas. Charalampou (1959) describió y caracterizó la enzima presente en el riñón de la rata; mas tarde se demostró que en los rumiferos el tejido renal es el único capaz de catalizar y convertir el inositol a CO_2 (Howard y Anderson, 1967). La misma reacción en las plantas ha sido extensivamente estudiada por Loewus y su grupo que propone este camino metabólico como de extraordinaria importancia en el reino vegetal, especialmente durante ciertas etapas de la vida de las plantas. Señalan que el almacén de carbohidratos en algunas semillas esta representado por el ácido fítico y que por medio del ácido glucurónico se van a formar varios compuestos de importancia para la vida de las plantas, entre otros, la pectina, la hemicelulosa, varias pentosas, el ácido ascórbico, derivados metilados del inositol como el nequoyitol, marcado con la reacción 16, y el D-borneositol, marcado con la reacción 17, y a partir de ellos derivados metilados de los ácidos urónicos y derivados metilados de las pentosas (Loewus, Kelly y Neufeld, 1962; Loewus, 1964; Loewus, 1965; Roberts Shuh y Loewus, 1966 y Loewus, 1969).

9 Formación de ésteres del inositol con el ácido indol 3 acético. Despues de sus trabajos sobre el ácido indol 3 acético, Banduraky y su grupo, han reportado el aislamiento, a partir de células vegetales, de varios ésteres que poseen tanto el ácido indol 3 acético como el inositol (Banduraky, Hada y Nicholls, 1969).

10 Formación de la 2 inosona a partir del inositol.

(A ésta inososa se le conoce también como mio, meso o alilo inososa). A pesar de que la reacción es reversible el equilibrio está desplazado fuertemente a la derecha (Iarner, Jackson, Graves y Stamer, 1956) originándose la inososa con abundante e importante desde el punto de vista fisiológico y metabolito de partida para varias vías metabólicas anotadas en el esquema. La reacción se ha demostrado en plantas superiores y mamíferos (Posternak, Shopfer, Kaufmann-Roetsch y Edwards, 1963) y en Aerobacter aerogenes (Berman y Magasanik, 1966).

11 Formación de la mio inosamina a partir de la 2 - inososa. El producto final de ésta vía metabólica es la estreptidina una porción de la molécula de estreptomicina. Walker y Walker han realizado extensivo trabajo sobre éste aspecto (1967 a, 1967 b y 1969).

12 Formación de 2,3 diceto 4 deoxi epi-inositol a partir de la 2 inososa. Siguiente paso metabólico de la degradación del mio inositol en Aerobacter aerogenes (Berman y Magasanik, 1966) organismo que durante muchos años se usó clásicamente para la oxidación estereoespecífica y por ende la identificación de varios inositoles (Magasanik, Franzl y Chargaff, 1952).

13 Formación del silo inositol a partir de la 2 inososa. Reacción descrita en plantas superiores y mamíferos (Posternak, Shopfer, Kaufmann-Roetsch y Edwards, 1963). Parece que en algunas plantas es distinta la óxidorreductasa que cataliza ésta reacción a la que interviene en la formación del mio inositol a partir del mismo sustrato (Hoffmann-Ostenhof, 1966).

14, 15 y 16 Reacciones postuladas y parcialmente estudiadas por Hoffmann-Ostenhof (1966 y 1969) y por Kinnel (1969) en plantas superiores. Tienden a explicar la formación de derivados cetólicos de los inositoles presentes en dichas plantas.

17 Formación de uno de los derivados metilados del mio inositol extraíble de plantas superiores. La reacción ha sido postulada por Loewus (1965) para la formación posterior de derivados metilados de ácidos urónicos y pentosas para los fines comentados en la reacción 8 en relación con el metabolismo en ciertas plantas.

18 Formación de galactinol, estaquiosol y verbascosa a partir del mio inositol y UDP galactosa. Reacciones estudiadas parcialmente por Tanner (1969) que abren un nuevo campo de estudio del metabolismo del mio inositol.

19 Formación de ATP o GTP a partir de ADP o GDP y ácido fólico. Son reacciones en que no participa el inositol como tal sino uno de sus derivados, sin embargo se incluyen por la importancia potencial que tienen. Morton y Raison (1963) describieron la formación del ATP a partir de ADP y ácido fólico en plástidas del endospermo de trigo y Biswas y Biswas (1965) la formación de GTP a partir de GDP y ácido fólico en plantas de frijol en germinación.

4.- Aspectos fisiológicos del mio inositol.

Una vez anotadas las vías metabólicas que llevan a la formación del inositol y de los compuestos en que éste forma parte se comentará brevemente el papel fisiológico del inositol y de las moléculas que lo contienen. Se revisará:

La eliminación del inositol por la orina.

El papel del inositol como factor de crecimiento en algunos microorganismos.

El papel del inositol como vitamina y agente litotrópico en los animales.

El papel del inositol en la utilización de aminoácidos y nucleótidos.

El posible papel del inositol en el transporte de iones, en la secreción glandular, en la transmisión nerviosa, en la contracción mitocondrial y en la estabilización de macromoléculas.

Eliminación del inositol por la orina. Se conoce como inosituria y fue observada desde 1858 (Vohl). Se asocia normalmente con la glucosuria que presentan los enfermos diabéticos y se discutió durante bastante tiempo si estaba ligada a la glucosuria per se o a la poliuria también observada en los pacientes con dicha enfermedad. Finalmente se ha demostrado (Daughalay, Iarner y Houghton, 1954) que es el aumento de glucosa circulante lo que impide la reabsorción del mio inositol a nivel renal, y así sugiere una competencia entre la glucosa y el inositol por la fosforilación de ambos para que puedan ser reabsorbidos; vale la pena recordar que el inositol puede ser fosforilado con hexoquinasa y ATP (Hoffmann-Gatenhof, Jungwirth y David, 1956). Por otra parte Shatkin y Tatum (1961) demostraron en un sistema completamente diferente (*N. crassa*), que la utilización del mio inositol exógeno, en una mutante autótrofa al mismo, está inhibida en un 70 % por la presencia de glucosa en el medio de cultivo.

Papel del mio inositol como factor de crecimiento en algunos microorganismos. No obstante que se desconoce el nivel molecular al que interviene, es indudable que el inositol participa como un factor promotor del crecimiento en muchas levaduras y organismos afines. Schopfer (1951) ha hecho una lista de las especies y cepas que responden a éste compuesto.

Papel del inositol como vitamina y agente lipotrópico en los animales. El reporte de Tooley (1941) de que el inositol cura la alopecia observada en ratos e hamsters a una dieta experimental hizo que se colocara el inositol en la lista de vitaminas.

minas. Su inclusión quizá no está totalmente justificada ya que experimentos posteriores realizados después de la identificación de todos los componentes del complejo B, han probado que dietas ausentes de inositol no producen cuadros carenciales y que la adición de inositol a dietas completas en relación con el resto de sus componentes no produce ningún efecto benéfico extra (McCormick Harris y Anderson, 1954 y Reid, 1954). Específicamente en el hombre no se ha podido demostrar un cuadro por carencia de inositol en la dieta. Una razón más para no considerar al inositol como vitamina es que cuando menos algunos tejidos de los mamíferos lo pueden sintetizar (Eisenberg y Polden, 1963 y 1964). Quedarían en contra de la idea de suprimir al inositol como vitamina los experimentos de Eagle, Gyusa, Levy y Freeman (1957) quienes demostraron que para la propagación de 19 de 20 líneas de células (tejidos normales y malignos de hombre y de ratón) es indispensable el inositol en el medio de cultivo de dichas células; o sea que no lo pueden sintetizar. Una explicación que se ha dado a estos datos es que el inositol sea biosintetizado en unos tejidos y transportado a todo el organismo a aquellos tejidos que no lo pueden formar.

Respecto al hecho de que se considere al inositol como agente lipotrópico (Gavin y McHenry, 1941) es conveniente hacer varias aclaraciones. El inositol funciona, y no con absoluta eficiencia, como agente lipotrópico cuando se administra a animales con dietas libres de grasa y con un bajo contenido de otros agentes lipotrópicos; inclusive la colina es mejor agente lipotrópico con la cual el inositol tiene un efecto suplementario (Peat, Lucas, Patterson y Ridout, 1951). Aunque se desconoce el mecanismo íntimo de tal efecto del inositol se acepta que lo hace en forma de fosfatidil inositol.

Papel del inositol en la utilización de aminoácidos y nucleósidos. Charalampous y su grupo han realizado una serie de publicaciones sobre las funciones del inositol empleando como modelo experimental células FB con incapacidad de sintetizar inositol en las que estudian las alteraciones metabólicas que aparecen en dichas células al suprimir el inositol del medio de cultivo. En resumen sus conclusiones son las siguientes: las células deficientes de inositol no incorporan a una velocidad normal la adenosina y la guanosina del medio en sus ácidos nucleicos; se afecta más el metabolismo de la guanosina causando una disminución en el nivel de actividad de la GGT pirofosforilasa (Toukagoshi, Lembach y Charalampous, 1966). Hay cambios extensivos en la composición enzimática de las células deficientes en inositol (Lembach y Charalampous, 1966). La deficiencia de inositol en las células altera la concentración de los gradientes normales de glicina y serina a través de la membrana celular (Lembach y Charalampous, 1967 a). Finalmente dicen que la deficiencia del inositol bloquea el o los mecanismos responsables de la utilización y acumulación de aminoácidos por las células. (Lembach y Charalampous, 1967 b). En éste artículo sugieren que posiblemente la forma como el inositol participe sea como fosfatidil inositol, formando parte de la membrana celular y tal vez como porción integral de un "acarreador". Además hacen una serie de consideraciones sobre la posibilidad de que la deficiencia de inositol impida la síntesis de enlaces de alta energía que como consecuencia alterarían la acumulación y utilización de aminoácidos.

Possible papel del inositol en otras funciones celulares.

En la secreción glandular. Hokin (1969) ha demostra-

do un aumento en el recambio de fosfatidil inositol en una variedad de glándulas exócrinas y endócrinas cuando hay liberación, por estimulación hormonal, de los productos de secreción almacenados por las glándulas. Utilizando como modelo la secreción pancreática éste autor postula (Hokin, 1969) que el aumento del recambio del fosfatidil inositol en el páncreas está relacionado con la translocación de la secreción proteica a través de la membrana. Postula así mismo, que parte de la membrana pierde su localización durante el proceso de salida de proteínas y que el fosfatidil inositol vuelve a reensamblar las porciones deslocalizadas.

En la estabilización de macromoléculas, Webb (1960) ha desarrollado la hipótesis de que la muerte de células microbianas bajo determinadas condiciones experimentales (deseccación) es el resultado de algún cambio físico en alguna macromolécula esencial debido a la eliminación de agua "unida" a dicha molécula. Experimentalmente ha demostrado que el inositol es el más eficiente estabilizador contra la destrucción celular por desecación y que cuando el inositol estabiliza las células bacterianas la única función preservada es su habilidad para sintetizar proteínas (Webb, 1961 y 1963). Posteriormente sugirió que el inositol se une de alguna manera al RNA y parcialmente lo confirmó al encontrar que el inositol mantiene la infectividad del virus del sarcoma de Rous (un virus de RNA) cuando dicho virus se somete a la desecación (Webb, Bather y Holgen, 1963). Supone que el inositol estabiliza las macromoléculas al ocupar, los hidroxilos del inositol, los sitios ocupados por el agua que va siendo eliminada por la desecación (Webb, Cornack y Morrison, 1964). Los experimentos y resultados de Webb son ingeniosos y atractivos sin embargo, es difícil evaluar la importancia de los mismos en con-

diciones mas fisiológicas, donde no exista desecación.

En la contracción mitocondrial. Recientemente se ha puesto particular atención al papel desempeñado por algunos lípidos en la contracción mitocondrial inducida por ATP (Vignais y Vignais, 1966). Mitocondrias frescas de hígado de rata colocadas en un medio adecuado sufren un hinchamiento por la adición de determinadas sustancias como la tiroxina el calcio y los fosfatos; el ATP añadido posteriormente ocasiona una contracción de la mitocondria hinchada. Las mitocondrias envejecidas por varios días, en frío en solución isotónica de sacarosa, son capaces de hincharse pero no se contraen por la adición de ATP. La contracción es restaurada con pequeñas cantidades de fosfatidil inositol (Vignais, Vignais y Lehninger, 1964).

En la transmisión nerviosa. Se ha demostrado un aumento del recambio de fosfatidil inositol en tejidos sinápticos estimulados por acetil colina (Hokin, 1969). Además la acetil colina estimula significativamente la hidrólisis de fosfolípidos con inositol (Durell y Garland, 1969). Por otra parte se ha insistido en la presencia de cantidades importantes de polifosfoinosítidos en la mielina (Yai y Hawthorne, 1969; Dawson, 1969). La significación de estos datos es difícil de realizarse -- (Dawson, 1969).

En el transporte de cationes. Se ha especulado que los polifosfoinosítidos puedan ser la "bomba de sodio" en determinados sistemas celulares (Dawson, 1966). Los resultados experimentales mas bien descartan tal posibilidad (Hokin y Hokin, 1964 y Dawson, 1966) sin embargo es frecuente asociar el movimiento de cationes de un lado a otro de la membrana celular con el metabolismo de los polifosfoinosítidos (Yai y Hawthorne, 1969 y Dawson, 1969).

M A T E R I A L

Y

M E T O D O S .

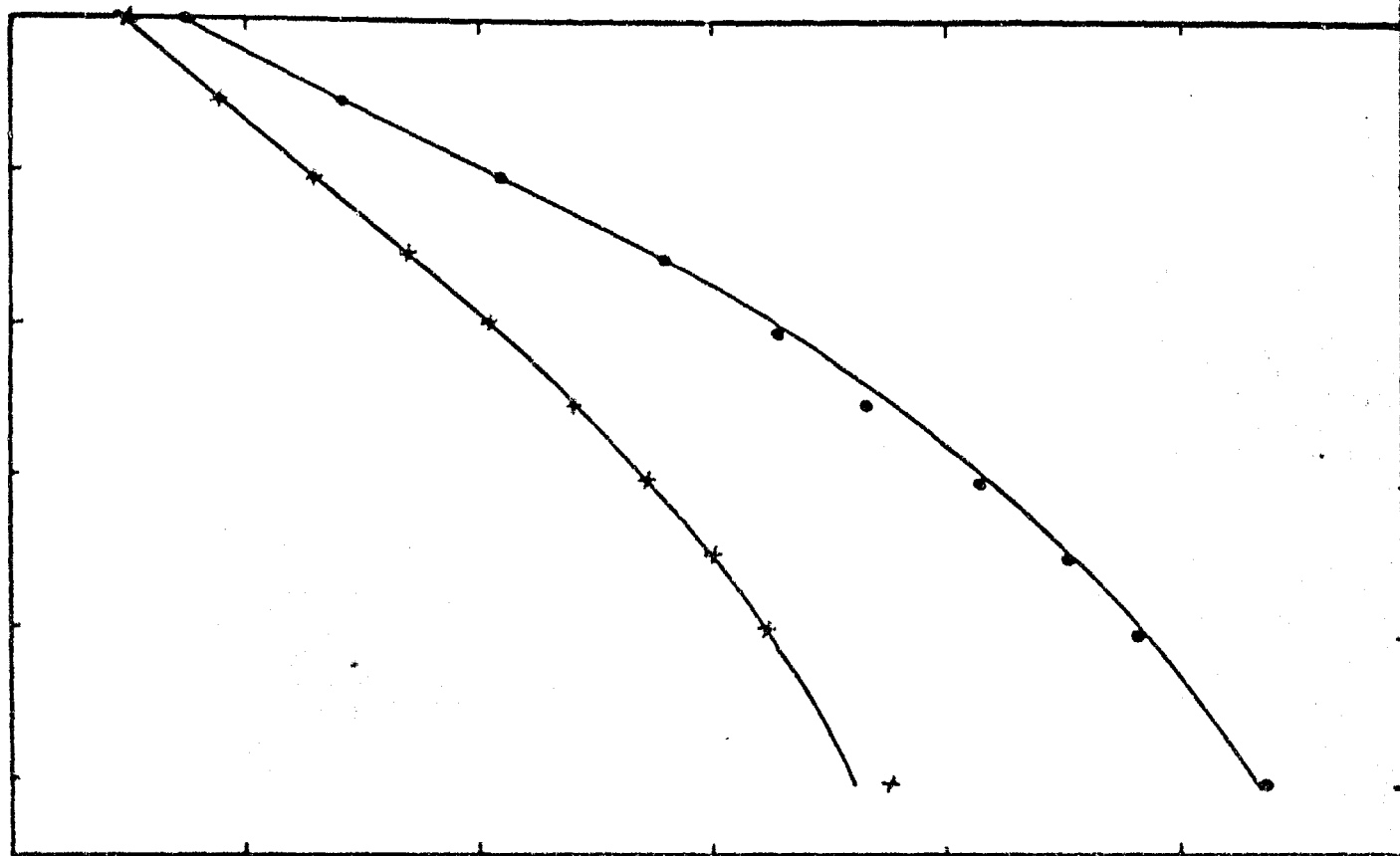
I MATERIAL.

La mayoría de las sustancias químicas empleadas se obtuvieron comercialmente; se anotan los métodos seguidos para aquellos compuestos que se prepararon en el laboratorio. La 2 inososa y la 4 inososa se obtuvieron por el método de Posternak (1954); la glucosona se preparó por el método de Bayne (1963) con pequeñas modificaciones dando un menor rendimiento pero mayor pureza del producto que inclusive llegó a cristalizar (punto de fusión 86-89 °C con descomposición, el derivado de fenilhidracina dió un punto de fusión de 207°C siendo el reportado de 209-210°C). La 2 inososa y la glucosona se usaron fosforiladas en algunos experimentos; Sols y cols. (1958) y Hoffmann-Ostenhof y cols. (1958) han demostrado que la hexocinasa de levadura en un medio adecuado puede fosforilar a la glucosona y al inositol respectivamente; en este antecedente se incubaron la glucosona y la 2 inososa en las siguientes condiciones: en un volumen final de 10 ml 2 inososa o glucosona 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, ATP 5 mM, fosfoenolpiruvato 10 mM, KCl 10 mM, hexocinasa comercial de levadura 5 mg y fosfoenolpiruvato cinasa comercial purificada 25 unidades. La mezcla se incubó varias horas a 30°C y como índice de la fosforilación de los sustratos se midió el piruvato formado en comparación con producido en condiciones idénticas pero sin glucosona ni 2 inososa. La glucosa-6- γ deuterada en posición 1 se preparó por el método de Topper (1957). Una manera indirecta de mostrar que un alto porcentaje del isótopo se encontraba en posición 1 fue estudiando el efecto del isótopo,

ya formando parte de la molécula de glucosa-6-P, en la velocidad de la reacción de la glucosa-6-P deshidrogenasa (figura 5). Rose* (1961) ha demostrado una reducción en la velocidad de la reacción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa cuando se incuba con glucosa-6-P deuterada en un 97 % en el carbono 1; sus resultados son prácticamente iguales a los ilustrados en la figura 5, y por analogía, nosotros podemos suponer que nuestro compuesto preparado en el laboratorio tiene un porcentaje similar del isótopo localizado precisamente en el carbón anomérico.

La dextrosa comercial se recristalizó en agua para la obtención de alfa glucosa y en piridina para la obtención de beta glucosa. Para la comprobación de la configuración de éstos azúcares también se emplearon métodos enzimáticos indirectos. Salas, Viñuela y Sols (1965) han demostrado que la hexocinasa posee una dependencia absoluta por el isómero beta; los datos incluidos en la figura 6 son idénticos a los reportados por éstos autores y confirman la esperada configuración de los carbohidratos cristalizados. Dos de los lotes de fosfatasa alcalina usados en el presente trabajo fueron preparados a partir de E. coli por el método de Garen y Levinthal (1960). La inositol oxigenasa se purificó y ensayó de acuerdo con la técnica descrita por Charalampous (1959). Las cepas silvestres de Neurospora crassa usadas fueron la RI 21a y la RL 3-8A y las mutantes inositol⁻ las siguientes: JH 2626A, JH 4103A, 46316a, 64001A y 69601A. Esta última mutante se utilizó para la determinación biológica del inositol. En algunos experimentos realizados con los piridin nucleótidos se usó la mutante morfológica "colonial-2" parcialmente caracterizada por Brody y Tatum (1966).

ABSORBANCIA A 340 m μ



ABSORBANCIA A 340 m μ

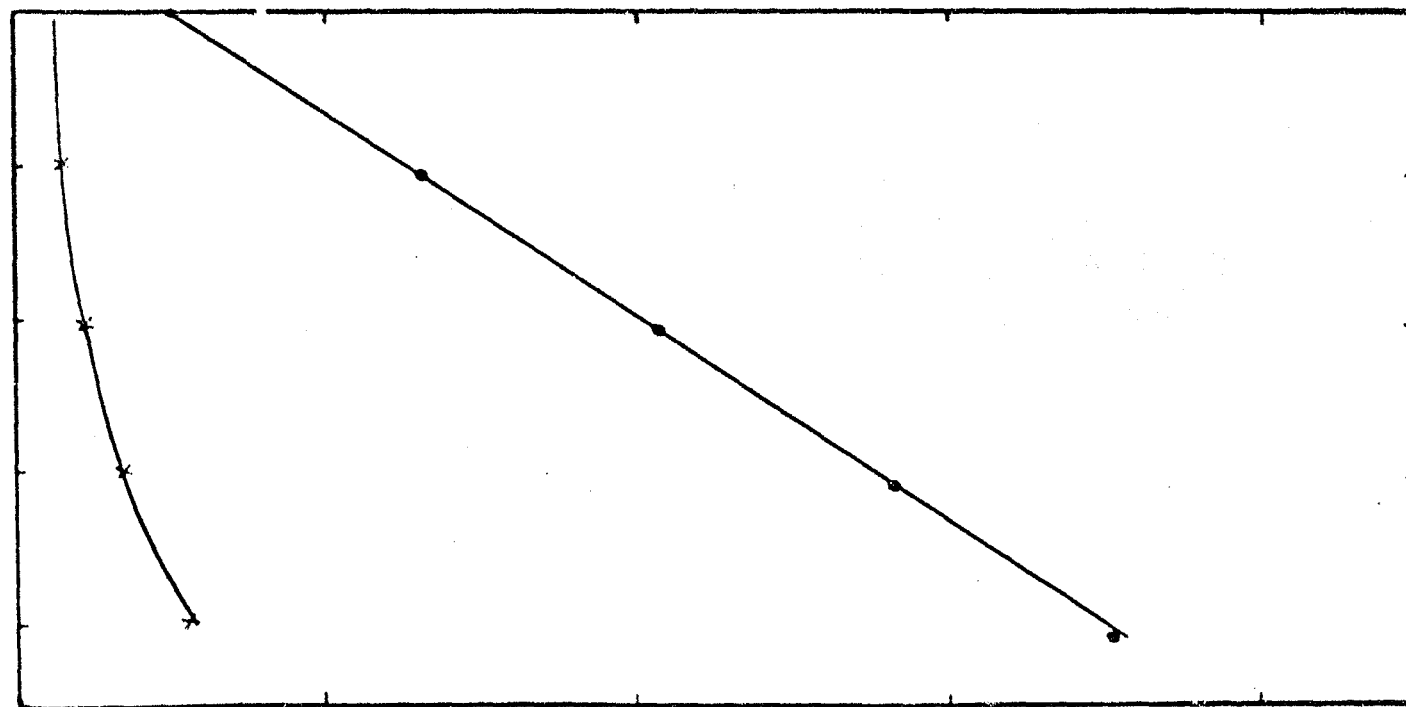


Figura 5.- Velocidad de reacción de la glucosa-6-P deshidrogenasa con glucosa-6-P normal (—•) y glucosa-6-P deuterado en el carbono 1 (—*—). La reacción se siguió a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II usando celdillas de 1 cm de paso de luz. La mezcla de incubación en un volumen final de 1 ml contenía: 100 μ moles de buffer Tris pH 7.7, 0.2 μ moles de NADP⁺, 0.1 μ g de glucosa-6-P deshidrogenasa (Boehringer) y 0.1 μ moles de glucosa-6-P que se omitió en las celdillas blancas.

Figura 6.- Velocidad de reacción de la glucosa-6-P deshidrogenasa con alfa (*—*) glucosa y con beta (—•) glucosa. La reacción se siguió a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II usando celdillas de 0.5 cm de paso de luz. La mezcla de incubación en un volumen final de 1 ml contenía: 200 μ moles de Tris pH 7.7, 0.25 μ moles de NADP⁺, 18 unidades de glucosa-6-P deshidrogenasa (Boehringer) y 100 μ moles de glucosa disuelta inmediatamente antes de usarse.

1.- Cultivo de la Neurospora crassa.

Tanto la cepa silvestre de N. crassa como las mutantes auxótrofas al inositol que se emplearon en éste trabajo fueron mantenidas en tubos inclinados de agar con medio completo de glicerol azucarosa (Tatum, Barratt, Fries y Bonner, 1950). Para la preparación de la enzima se inocularon conidias frescas, de 4 a 6 días, en frascos conteniendo de 10 a 20 litros de medio mínimo (Vogel, 1956) suplementados con sacarosa al 2 %; cuando se usaron las mutantes dependientes de inositol al medio se le añadió inositol a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$; los frascos se incubaron a 30°C durante 48 horas y con agitación vigorosa. En algunos experimentos se emplearon condiciones especiales para el cultivo del hongo y para la obtención de la enzima; los cambios específicos quedar anotados al describir éste tipo de experimentos en la sección de resultados.

Para la formación de heterodimeros se inocularon las cepas de N. crassa en medio mínimo (Vogel, 1956) con sacarosa al 2 % y agar al 2.5 %. Como algunas de las cepas auxótrofas al inositol que se usaron presentaron incompatibilidad protoplasmática (Garnjobst y Wilson, 1956) fue necesario cruzarlas hasta en dos ocasiones con alguna de las dos cepas silvestres usadas y aislarlas adecuadamente para trabajar con la progenie auxótrofa al inositol.

2.- Purificación de la D-glucosa-6-fosfato cicloaldolasa (NAD⁺ dependiente).¹

¹ Han sido varios los nombres propuestos para la enzima que convierte a la glucosa-6-P en inositol-1-P. Originalmente Chen y Charalampous (1966) le llamaron glucosa-6-P cicloalasa que después cambiaron por el de inositol-1-P aldolasa (Charalampous y Chen 1966). El término: sintera sintéticamente de inositol (NAD⁺ dependiente), se utilizó cuando se demostró que el enzimático de las enzimas responsables de la síntesis del inositol-1-P (Lien

El micelio crecido durante 48 horas fue cosechado por filtración y succión, lavado con agua destilada fría y enfriado en baños de hielo para posteriormente ser cortado con la mano en pequeñas porciones y usado inmediatamente o almacenado, incluívase durante varias semanas a -5°C . Se emplearon varios métodos para la ruptura de las células y la obtención de un homogenado crudo: mortero con la ayuda de arena, licuadora con pequeñas perlas de vidrio, licuadora con carborundum y licuadora con hielo seco. El último procedimiento fue el definitivamente aceptado ya que no es necesario incluir etapas posteriores para la eliminación del material que favoreció la ruptura celular, además, con mayor facilidad se mantienen bajas temperaturas sin tener en cuenta precauciones adicionales. En condiciones óptimas, cualquiera de los procedimientos anotados ocasiona un rompimiento del 75 al 80 % de las células, en base a la proteína que no precipita después de una centrifugación a $1000 \times g$ durante 5 minutos.

En la preparación del homogenado crudo se empleó - buffer 2 Na-HCl pH 7.7 en frío el que se añadió a las células junto con las perlas de vidrio o el carborundum, cuando éstos fueron los métodos usados, y se añadió después de haber roto las células con el mortero o con la ayuda del hielo seco, al trabajar con éstos otros métodos.

Para los fines de purificación al extracto crudo se le denomina fracción I. Han sido varios los métodos de purificación

y Tatum, 1967). Posteriormente se propuso el nombre de glucosa-6-P: inositol-1-P isomerasa (NAD⁺ dependiente) y para simplificación inositol isomerasa (Gill y cols., 1969). Finalmente a iniciativa de algunos de los miembros de la Comisión sobre la nomenclatura de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (Hoffmann-Grunwald, cuando aún personal) se propuso el nombre de D-glucosa-6-P cicloaldolasa (NAD⁺ dependiente). El nombre tiene la desventaja de implicar un mecanismo de reacción todavía no total y absolutamente determinado. En esta tesis se acepta el último nombre y por simplificación se lo usará como glucocicloaldolasa.

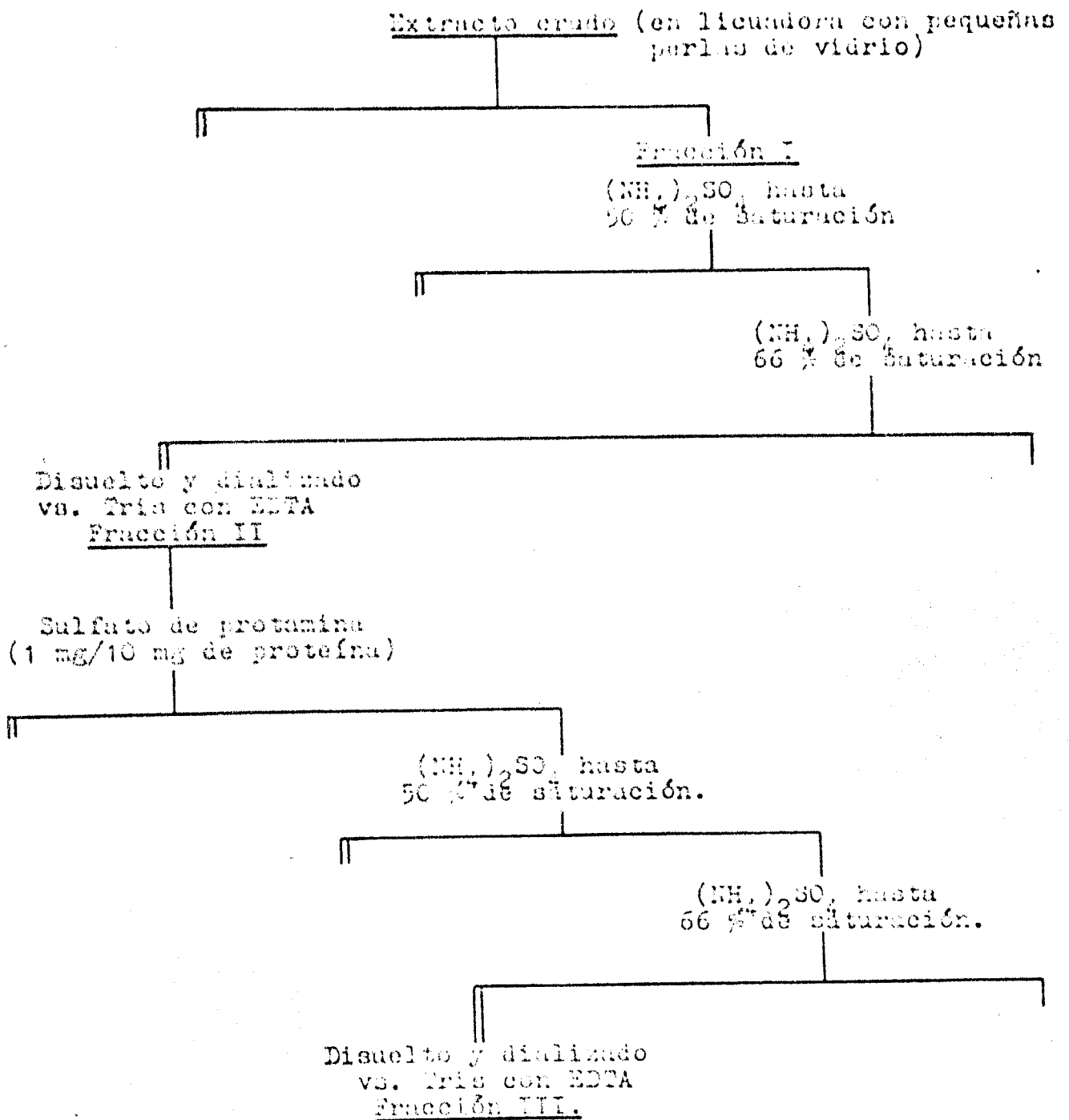


Figura 7.- Primer método de purificación empleado.

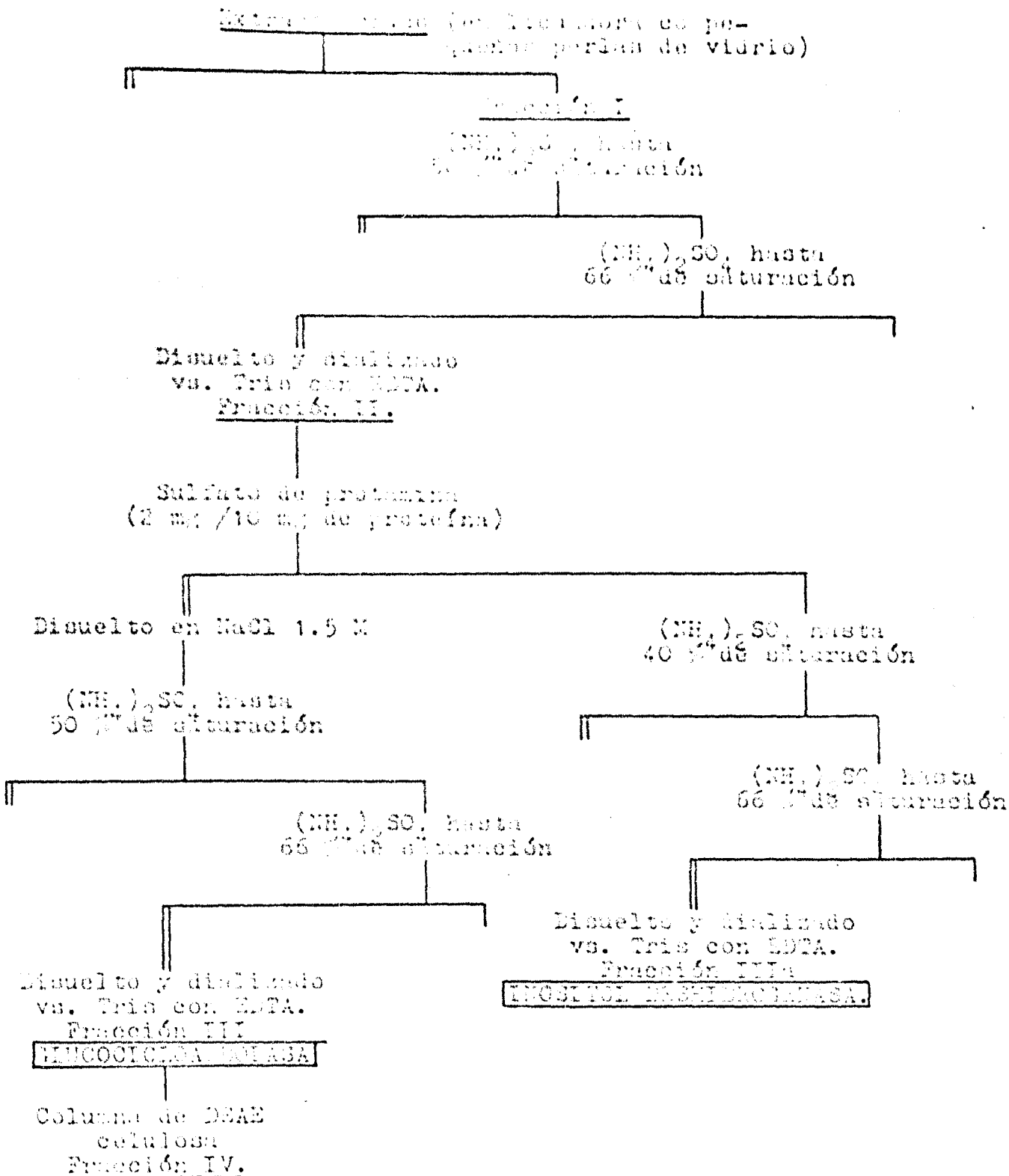


Figura 6.- Método de purificación desarrollada para la separación de la glucocicloaldolasa de la inositol deshidrogenasa.

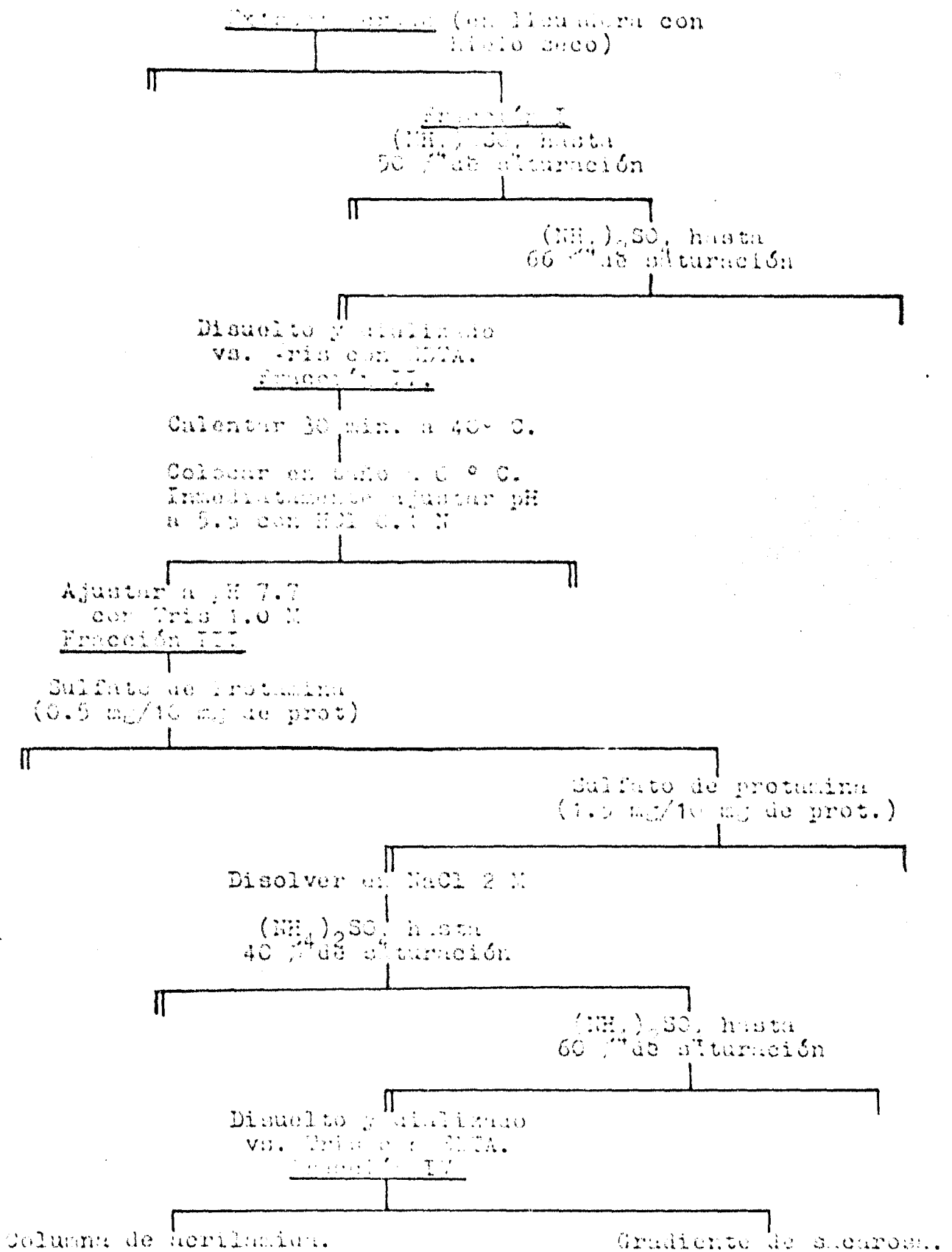


Figura 9.- Modificaciones al método de purificación anotado en la figura 8.

empleados hasta llegar al que actualmente se sigue. Con el primer método desarrollado (figura 7) se encontraban en la fracción III tanto la glucocicloaldolasa como una deshidrogenasa del inositol capaz de convertir la 4 inososa en inositol en presencia de NADP (Pina y Tutum, 1967). Se estableció un segundo esquema de purificación que permitió la separación de la glucocicloaldolasa de la deshidrogenasa (figura 8). Se continuó trabajando sobre el segundo esquema de purificación añadiéndosele algunos pasos que permitieran tener una enzima más pura. El resultado lo vemos en la figura 9 que resume el método de purificación seguido en la actualidad. La fracción IV obtenida de acuerdo con los lineamientos anotados en la figura 9 se pasó a través de un gel de acrilamida o bien se colocó en un gradiente de sacarosa de acuerdo con la técnica de Martin y Ames (1961) para obtener el peso molecular.

3.- Medición de la actividad enzimática. Cuantificación del inositol formado. Otros métodos.

La medición de la actividad de la glucocicloaldolasa se realizó por cuantificación del inositol libre formado y, a menos de que se anote lo contrario, el sistema de incubación consistió en lo siguiente: en un volumen final de 1 ml, 100 μ moles de buffer Tris-HCl pH 7.7; 10 μ moles de glucosa-6-P; 1 μ mola de NAD⁺; 14 μ moles de NH₄Cl y enzima; temperatura 30°C, tiempo de incubación 1 hora. Al final del período de incubación, la reacción se paró colocando los tubos durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo; se eliminaron las proteínas coaguladas por el calor por medio de centrifugación y el sobrenadante se usó para la determinación del inositol formado. Cuando se ensayaron los homogenizados crudos fue necesario incluir un blanco de reacción, el que se colocó en baño de agua hirviendo inmediatamente después de la adición de

la enzima, la cantidad de inositol encontrada en el blanco se restó de la detectada en el tubo experimental. El producto final de la glucocicloaldolasa es el inositol fosfato; en los homogenados crudos y en las preparaciones poco purificadas las fosfatasas contaminantes de la glucocicloaldolasa hidrolizan el éster fosfórico del inositol dando como producto final el ciclohexanohexol libre. A medida que la purificación de la enzima aumenta se van eliminando las fosfatasas y aparece como producto final real el inositol fosfato, que para su cuantificación posterior es hidrolizado con fosfatasa alcalina inespecífica de E. coli preparada por el método de Garen y Levinthal (1960) u obtenida comercialmente.

Para la cuantificación del inositol se siguieron dos técnicas diferentes que dieron resultados comparables con diferencias menores del 10 %. El procedimiento mas comunmente usado fue el ensayo biológico de acuerdo con la técnica de Beadle (1944). El otro procedimiento fue con el empleo de radioisótopos. Se determinó el inositol radioactivo formado a partir de glucosa-6-P uniformemente marcada con carbono 14; la mezcla de incubación contenía glucosa-6-P uniformemente marcada y el inositol radioactivo formado se valoró con los siguientes lineamientos: despues de la eliminación de proteínas tal como se indicó al finalizar la incubación con la enzima, el sobrenadante conteniendo el inositol se pasó a traves de una columna de Dowex 1 y otra de Dowex 50 para eliminar los iones presentes; el material eluido con agua se concentró en un rotavapor y se emplearon alícuotas, tanto para el ensayo biológico señalado como para cromatogramas en 2 sistemas (fenol-agua 80:20 v/v y etanol-piridina-agua 70:15:15 v/v) en los que se identificó el área del inositol, se recortó y se midió su radioactividad en un aparato de centelleo líquido.

El pirofosfato se determinó con la siguiente técnica desarrollada en el laboratorio: todo el procedimiento se realizó entre 0 y 4° C.; la Neurospora crassa se cosechó y rápidamente se homogenizó en un Ultra Turrax (Ika Werk, Alemania) en ácido perclórico 0.6 N, se eliminó el precipitado de proteínas por centrifugación y el sobrenadante se llevó a pH entre 4 y 5 con H_2CO_3 , el perclorato se eliminó por centrifugación y el sobrenadante se le añadió carbón activado que adsorbió los nucleótidos presentes en el extracto, el carbón también se quitó por centrifugación. El sobrenadante libre de nucleótidos se ajustó a pH 8.0 con NH_4OH y una alícuota se pasó por una columna (0.5 cm de diámetro y 5 cm de alto) de Dowex 1-K⁸ en forma de cloruros; el fosfato inorgánico se eluyó con HCl 0.025 N, el pirofosfato con HCl 0.1 N y los polifosfatos con HCl 1.0 N. El material eluido con HCl 0.1 N se sometió a hidrólisis con HCl 1.0 N durante 7 minutos y se cuantificó el fósforo inorgánico; los valores obtenidos se consideraron como de pirofosfato. Otros componentes celulares conteniendo fósforo y eluidos con HCl 0.1 N no se hidrolizaron y por lo tanto no dieron reacción de fosfato en las condiciones usadas; además, en varios experimentos el material eluido con HCl 0.1 N se concentró en un rotavapor y alícuotas del mismo se corrieron en electroforesis de alto voltaje; con mucho la principal mancha detectada, cuando se reveló para compuestos con grupos fosfato, correspondió a la de pirofosfato. La recuperación de todo el proceso, para el pirofosfato, varió de 96 a 103 %.

Otros métodos convencionales de laboratorio se usaron en las distintas fases del trabajo experimental, la proteína fue

cuantificada con el reactivo de Biuret (Gornal, Bardawil y David, 1949) y por el método de Lowry, Rosebrough, Farr y Randall (1951) el fosfato por el método de Sumner (1944); el lactato por el método de Hohorst (1965 a); el piruvato por el método de Bücher, Czok, Lamprecht y Jatzko (1965); la glucosa por el método descrito por Stein (1965); la glucosa-6-P por el método descrito por Hohorst (1965 b) y los piridín nucleótidos (NAD^+ , NADP^+ , NADH y NADPH) por los métodos descritos por Flisingberg (1965).

La obtención de fracciones subcelulares se realizó a partir de micelio joven de Neurospora (24 horas de crecimiento con aereación vigorosa) homogenizado en un homogenizador de tipo Potter-Elvehjem o en un Ultra Turrax y manejado de acuerdo con el esquema de la figura 10. Las distintas fracciones subcelulares se han rotulado entre comillas en el esquema 10 por no encontrarse en estado puro, especialmente la fracción denominada "núcleos" solo posee una pequeña proporción de los mismos; las fracciones restantes, aunque parcialmente contaminadas, realmente representan las fracciones subcelulares con que se les ha rotulado. Para investigar la presencia de núcleos se hicieron determinaciones de DNA (Webb y Levy 1955) aislado por la técnica de Schneider (1945); para mitocondrias se determinó la deshidrogenasa succínica con metasulfato de fenazina (King, 1967) y la NADH oxidasa (Mackler, 1967); para microsomas la aril sulfatasa (Metzenberg y Parson, 1966) y la glucosa-6-fosfatasa (Harper, 1965) y para el sobrenadante se valoró la actividad de la glucosa-6-P deshidrogenasa (Išhr y Waller, 1965).

Homogenizado en sacarosa.
0.25 M pH 7.3 filtrado
con succión a través de
cuatro capas de gasa.
(Homogenado libre de células)

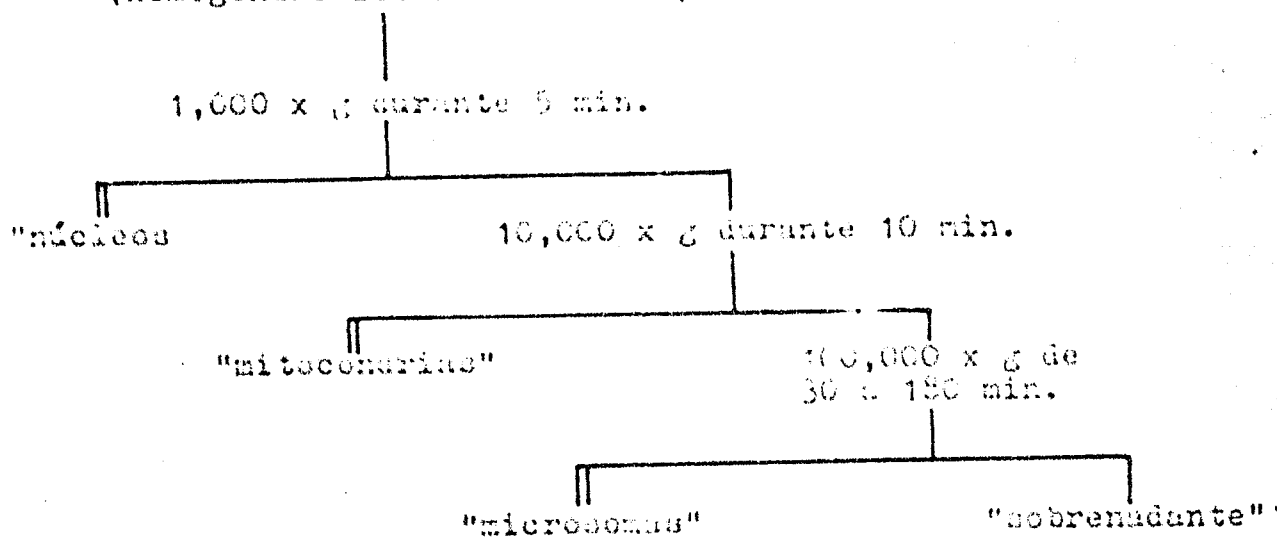


Figura 10.- Lineamientos seguidos y en la obtención de fracciones subcelulares.

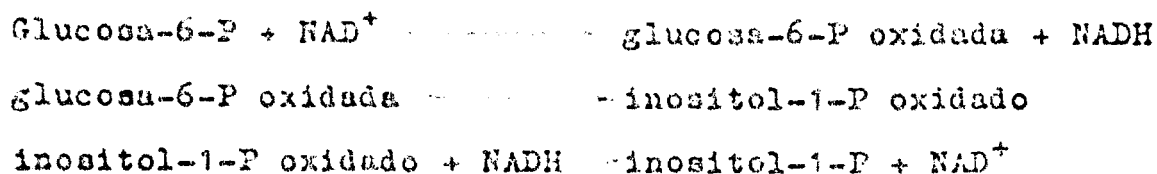
RESULTADOS

Y

DISCUSION

1.- Una o varias enzimas.

Desde el punto de vista químico la conversión de la glucosa-6-P en inositol-1-P con dependencia absoluta de NAD^+ implica cuando menos tres reacciones sucesivas:



El estudio de las reacciones anotadas en el esquema fué enfocado desde varios puntos de vista para investigar, si enzimáticamente, la síntesis del inositol-1-P se lleva a cabo de una manera similar, por medio de tres enzimas, que catalizaran cada uno de los pasos propuestos o por medio de una sola enzima capaz de catalizar íntegramente la reacción. De ser cierta la primera posibilidad se pensó que las mutantes de N. crassa incapaces de sintetizar inositol conservaran alguno (s) de los pasos enzimáticos y ayudaran al esclarecimiento del problema.

Después de haber demostrado que la cepa silvestre de N. crassa convierte la glucosa-6-P en inositol-1-P en presencia de NAD^+ , se incubaron homogenados de la mutante inositol⁻ 89601 con glucosa-6-P y NAD^+ , los probables productos de la reacción se incubaron entonces con homogenados de la cepa silvestre adicionados de NADH; en ningún caso se obtuvo síntesis de inositol. Una posibilidad para explicar los resultados negativos sería, que

la mutante careciera de la primera enzima del supuesto camino metabólico.

Para averiguar dicha posibilidad se tomaron otras mutantes inositol⁻ y en lugar de ensayarlas directamente para la formación de alguno de los intermediarios, tal como se realizó en el caso descrito, se orientó la investigación hacia la formación de heterokariones. Se siguieron las técnicas anotadas en la sección de material y métodos y se ensayaron todas las posibles combinaciones con las siguientes mutantes auxótrofas para el inositol: JH 2626A, JH 4103A, 37401A, 46316a, 46802a, 64001A y 89601A. Estas mutantes difieren de la cepa silvertre por mutación de un simple gene (Patridge y Giles, 1953). En caso de que se formara un heterokarion y creciera en un medio sin inositol, sugeriría inmediatamente, que eran varias las enzimas involucradas en la biosíntesis del inositol. Una de las mutantes formando el heterokarion tendría como defecto primario, la síntesis de una de las enzimas que podría ser formada por la otra mutante, la cual a su vez, carecería de otra de las enzimas responsables de la formación del inositol. Sin embargo en ningún caso fué posible obtener la formación de heterokariones que crecieran en ausencia del inositol. No es posible, con dichos resultados, descartar definitivamente la posibilidad de que todas las mutantes usadas tengan como defecto una alteración en la síntesis de la primera enzima del sistema, sin embargo, parece altamente improbable que así suceda; es más lógico concluir que es una sola la enzima involucrada en la totalidad del proceso. Los datos sobre la purificación de la enzima apoyan ésta conclusión, ya que al irse purificando la enzima no hay un paso en el que se pierda bruscamente su actividad y el ensayo sistemático de las distintas fracciones inactivas combinadas con la activa nunca aumen-

taron la actividad de la enzima.

2.- Purificación de la glucocicloaldolasa.

Cuando la enzima se purificó de acuerdo con el esquema anotado en la figura 8 de la sección de material y métodos, se obtuvieron los resultados resumidos en la tabla 1. Hasta la fracción III se observa que el método de purificación es sencillo, la pérdida de la enzima es pequeña y la purificación aceptable. Al continuar la purificación se incluyó un paso con una columna de DEAE celulosa. Los detalles del empleo de la columna quedan anotados al pie de la figura 11 en la que se ha incluido el perfil de elución de la mezcla de proteínas introducidas a la columna. Aunque el uso de la columna permite una purificación importante de la enzima, presenta el grave inconveniente de disminuir notablemente el rendimiento, razón por la cual no se ha continuado usando.

Con el esquema de trabajo resumido en la figura 9 es posible obtener purificaciones de la enzima comparables a las descritas con la columna de DEAE celulosa, pero sin el empleo, de la columna y con un rendimiento mucho mayor. En la tabla 2 se incluyen los resultados típicos de un experimento. Es conveniente hacer notar que a medida que la enzima se purifica aumenta su inestabilidad y la purificación posterior se ve dificultada por la pérdida gradual de tal actividad. Se ensayaron varias sustancias con la idea de mantener la estabilidad de la enzima: glucosa, glucosa-6-P, NAD^+ , DNA, RNA, albúmina, glicerol, protamina, inositol, mercapto etanol, ditiotreitól y EDTA. Ninguna mostró un definido efecto protector sobre la enzima. El hecho de que la recuperación de la enzima sea mayor del 100 % se ha interpretado como que en las fracciones crudas la glucocicloaldolasa compete desventajosamente con otras enzimas para la utilización del

ACTIVIDAD DE GLUCOCICLOALDOLASA DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS
DE ACUERDO CON EL ESQUEMA DE PURIFICACION DE LA FIGURA 8.

Fracción	Actividad específica [≠]	Actividad total ^{≠≠}	Recuperación en %	Purificación
I Sobrenadante crudo	3.3	944	100	1 x
II Precipitado entre 50 y 66 % de saturación con sulfato de amonio.	6.6	298	32	2 x
III Sulfato de protamina y 2a precipitación con sulfato de amonio	222	870	92	67 x
IV Columna de DEAE celulosa	1195	52	5.5	360 x

[≠] En micromolas de inositol formado/mg de proteína/hora.
^{≠≠} En micromolas de inositol/total de la fracción/hora.

La reacción se llevó a cabo con la mezcla de incubación y en las condiciones señaladas en la sección de material y métodos; a la mezcla de incubación se le añadió 1 uc de glucosa-6-P uniformemente marcada. El inositol radioactivo formado se cuantificó tal como se indica en la sección de material y métodos; en las fracciones III y IV el producto final fue inositol-1-P que se trató con fosfatasa alcalina antes de cuantificarlo.

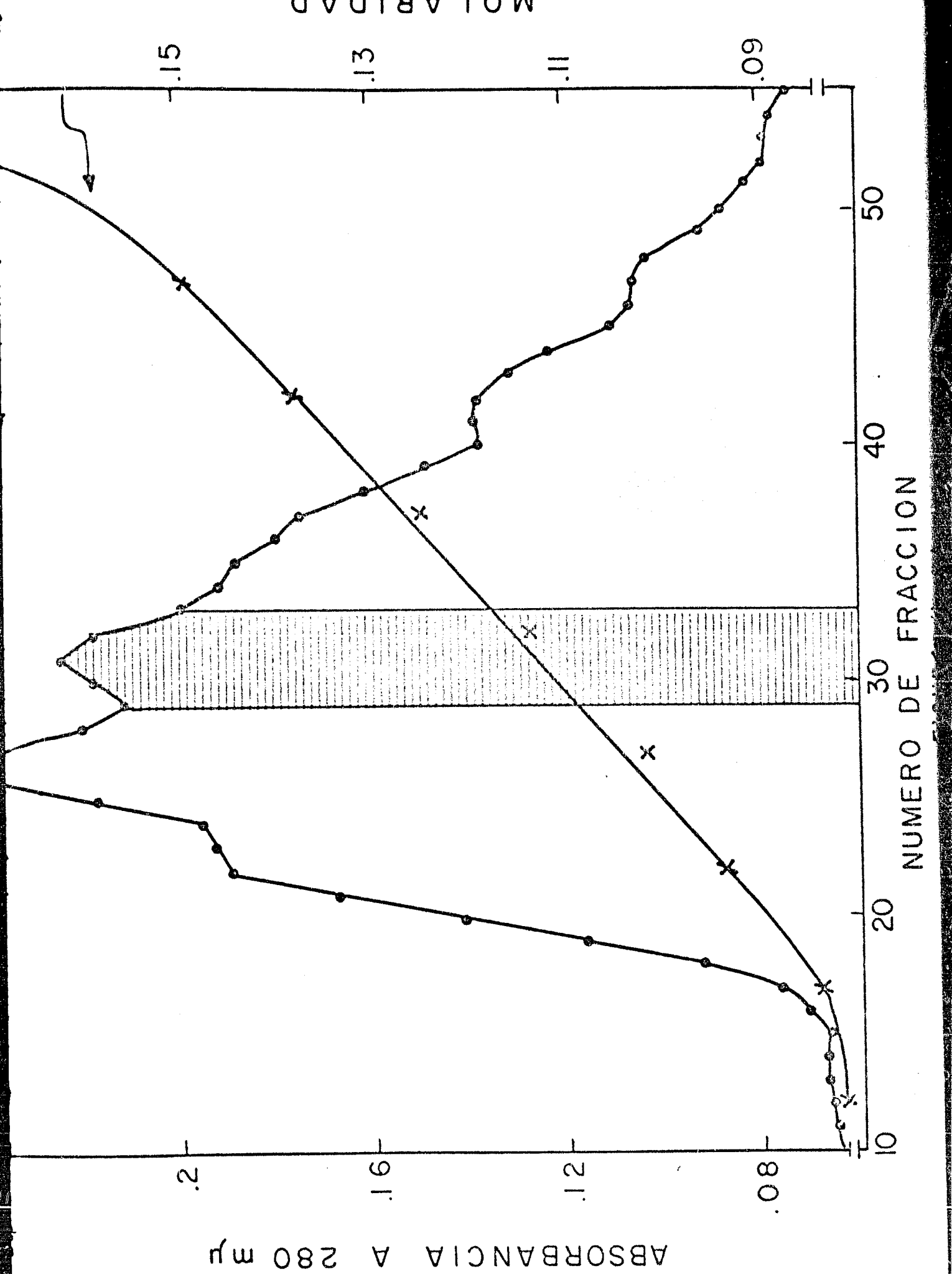


Figura 11.- Perfil de elución de la glucocicloaldolasa en columna de DEAE celulosa. Se usó una columna de 1.5 cm. de diámetro interno por 40 cm. de alto con un contenido de DEAE celulosa equivalente a 60 ml y se equilibró con 200 ml de Tris .005 M pH 7.7. Se colocaron 150 mg de proteína provenientes de la fracción III obtenida de acuerdo con el segundo método de purificación anotado (figura 8). Parte de la proteína sin actividad enzimática se eluyó con 200 ml de NaCl 0.1 M en Tris .005 M pH 7.7. Después se pasó un gradiente resultante de la mezcla paulatina de 150 ml de NaCl 0.3 M en Tris .005 M adicionado lentamente a 150 ml. de NaCl 0.1 M en Tris .005 M. Se pasaron 20 gotas por minuto y se recogieron 6 ml de eluyente en cada tubo. En la figura se incluye la absorbancia a 280 m μ de cada una de las fracciones obtenidas así como la molaridad presente en las mismas. La molaridad se obtuvo midiendo la conductancia de las fracciones y comparándola con una curva estándar. La zona sombreada corresponde a las fracciones que demostraron actividad de la glucocicloaldolasa.

TABLA 2

ACTIVIDAD DE GLUCOCICLOALDOLASA DE LAS DISTINTAS FRACCIONES OBTENIDAS DE ACUERDO CON EL ESQUEMA DE PURIFICACION DE LA FIGURA 9.

Fracción	Volumen (en ml)	Prot mg/ml	Inositol ug/ml/hr	Act. Esp. ug inos/ug prot./hr	Recuperación en %	Purificación.
I Fracción cruda	373	14	24	1.7	100	1 x
II Precipitado entre 50 y 66 % de sa- turación con sul- fato de amonio	53	32.5	295	9.2	174	5.3 x
III Sobrenad. de pre- cipitación a pH 5.5	48	7.75	353	45.4	189	26.4 x
IV 2° precipitado con sulfato de amonio	6.1	4.0	2500	625.0	170	364 x

La actividad enzimática se ensayó en las condiciones experimentales anotadas en la sección de material y métodos. El inositol se valoró biológicamente. El producto de las fracciones III y IV se trató con fosfatasa alcalina antes de proceder a cuantificarlo.

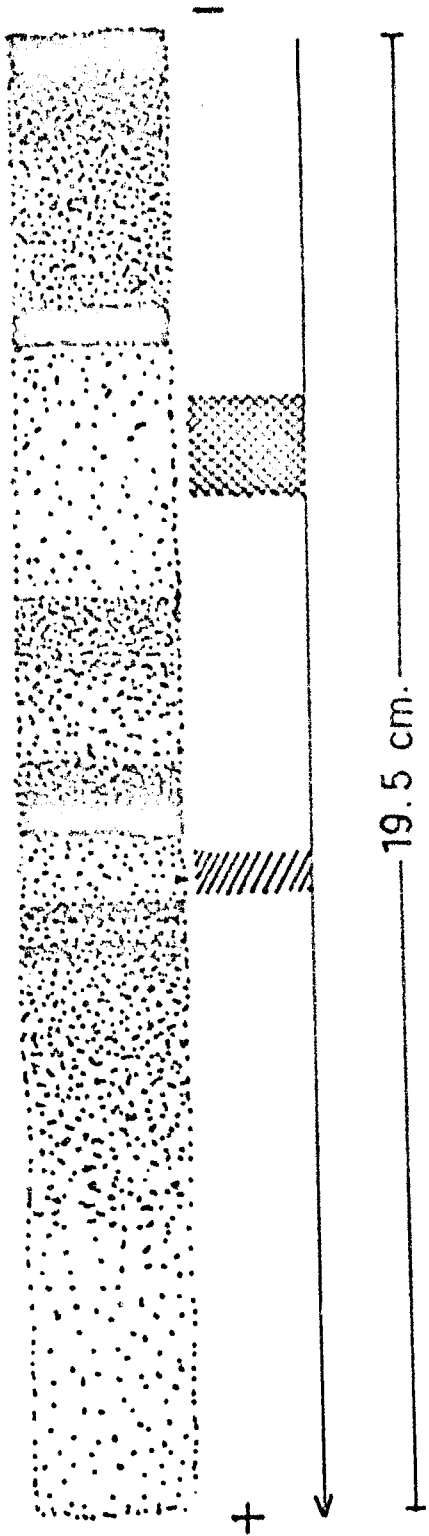
sustrato y la coenzima, ambos utilizables fácilmente por otros sistemas de la maquinaria metabólica; al ir quitando, durante el proceso de la purificación, las enzimas que utilizan sustrato y coenzima la glucocicloaldolasa trabaja con mayor eficiencia y su actividad aparente es mayor.

Se ha incluido una etapa posterior de purificación con el uso del gel de acrilamida (figura 12). La tecnología no es muy complicada, la purificación es excelente la recuperación aceptable pero por factores todavía no controlados la reproducibilidad del método es muy pobre. En caso de que sea posible hacer reproducible el método se estará muy cerca de tener la enzima altamente purificada y solo con pequeño porcentaje de contaminaciones.

3.- Datos cinéticos de la reacción enzimática.

La glucocicloaldolasa de N. crassa presenta un pH óptimo de 7.7 con diferentes sistemas buffer ensayados como Tris, fosfatos, histidina, trietanolamina y glicina. El buffer de fosfatos no se utilizó por su papel inhibitor de la actividad enzimática; rutinariamente se usó el Tris por que con él la enzima mostró una mayor actividad. No se estudió con detalle si el Tris produce una activación de la enzima. El pH óptimo para la glucocicloaldolasa de levadura es de 7.7 (Chen y Charalampous, 1966) y para la enzima aislada de testículo de rata es de 7.4 (Eisenberg, 1967).

Usando la enzima purificada hasta la fracción IV, de acuerdo con el esquema de la figura 9, la formación de inositol-1-P es lineal con el tiempo por lo menos durante 4 horas. Este hecho sugiere que la afinidad de la glucocicloaldolasa por el producto de la reacción es baja, ya que el producto no inhibe



TRIS-BORATOS
0.2 M pH 9
E.D.T.A. 0.25mM
 β -SH-CH₂-CH₂-OH 0.01M
20mA. , 18 HORAS

Figura 12.- Cromatografía de la glucocicloaldolasa en gel de acrilamida. Se empleó una columna, provista de una camisa de refrigeración, de 2.1 cm de diámetro interno por 25 cm de alto, en la cual se polimerizó la acrilamida en cantidad suficiente para dar columnas de gel de 19 a 20 cm de largo. La polimerización se llevó a cabo con las siguientes sustancias: 100 partes de monómero, 1 parte de TEMED y 1 parte de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$; el monómero contenía por cada 100 ml de buffer (Tris 0.2 M, EDTA 0.0084 M y ácido bórico 0.03 M) 4.75 g de acrilamida y 0.25 g de NN Metileno-bisacrilamida. TEMED es la abreviatura de N,N,N',N' tetrametil etilen diamina. A la columna polimerizada y enfriada se le colocó en la parte superior de la misma y con mucho cuidado 20 mg de proteína proveniente de la fracción IV del tercer método de purificación anotado (figura 9), a la proteína se le añadió sacarosa para aumentar la densidad de la solución y facilitar su manejo. Para la separación de las proteínas se siguieron las condiciones anotadas en la figura. Al terminar el paso de la corriente se separó con cuidado el gel de la columna, una sección longitudinal del mismo se tiñó con amido negro para la detección de proteínas y el resto se cortó transversalmente en secciones de 0.5 cm de las que se homogenizaron en un volumen apropiado de buffer Tris 0.1 M pH 7.7 para la extracción de proteínas y medición de la actividad de la glucocicloaldolasa y la glucosa-6-P deshidrogenasa. La figura representa un gel con los resultados en la forma siguiente: las zonas puntuadas en el gel se refieren a las proteínas teñidas con amido negro; a la derecha del gel, el área cuadrículada, muestra la zona del gel con actividad de deshidrogenasa de la glucosa-6-P y el área con diagonales la zona con actividad de glucocicloaldolasa.

fácilmente la reacción enzimática.

Chen y Charalampous (1964) describieron una activación de la glucocicloaldolasa de levadura por los iones NH_4^+ , el K^+ es menos activo y el Na^+ no desempeña ningún papel como activador. Con la enzima aislada de N. crassa el NH_4^+ estimula 4 veces su actividad (tabla 3) y no puede ser sustituido por algunas aminas metiladas; el Na^+ y el K^+ a concentraciones hasta de 9×10^{-2} M y el Mn^{++} hasta 5×10^{-3} M no tuvieron efecto, a ésta última concentración el Mg^{++} mostró una activación del 30 %.

En la figura 13 aparecen los resultados obtenidos al buscar la energía de activación del sistema enzimático; un valor de 14,000 calorías $\times \text{mol}^{-1}$ se calculó al graficar el logaritmo de la velocidad inicial contra el recíproco de la temperatura absoluta. El valor obtenido está dentro del rango encontrado por otros investigadores para diferentes sistemas enzimáticos.

Los resultados del estudio de la influencia de la concentración del sustrato en la velocidad de la enzima se consignan en la figura 14. Se nota que la enzima se comporta de acuerdo con la cinética clásica de Michaelis y no parece estar formada por subunidades ni sujeta a una modulación alostérica. A una concentración fija de coenzima, de 1 mM, la constante de Michaelis aparente para el sustrato, la glucosa-6-P, dió un valor de 1.9 mM, semejante al valor de 1.5 mM reportado para la enzima de levadura (Chen y Charalampous, 1966), la velocidad óptima experimental se obtienen con concentraciones de glucosa-6-P de 10 mM.

Hasta el momento presenta el único sustrato que se ha encontrado para la glucocicloaldolasa es la glucosa-6-P. A concentraciones de 10 mM los ésteros fosfóricos en posición 6 de la fructosa, galactosa, manosa y ácido glucónico no son convertidos

TABLA 3

INFLUENCIA DE LOS IONES NH_4^+ Y ALGUNAS AMINAS SUBSTITUIDAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOCICLOALDOLASA DE NEUROSPORA CRASSA

Substancia	Concentración final	Inositol sintetizado (en por ciento)
Ninguna	-----	100
NH_4Cl	14 mM	410
$\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$	14 mM	105
$(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2\text{Cl}$	14 mM	94
$(\text{CH}_3)_3\text{NHCl}$	14 mM	104
$\text{HO-NH}_3\text{Cl}$	20 mM	39

Condiciones experimentales iguales a las descritas en la sección de material y métodos, excepto para el activador que se añadió a las concentraciones indicadas en la tabla. La enzima usada provino de la fracción IV del tercer método de purificación descrito (figura 9).

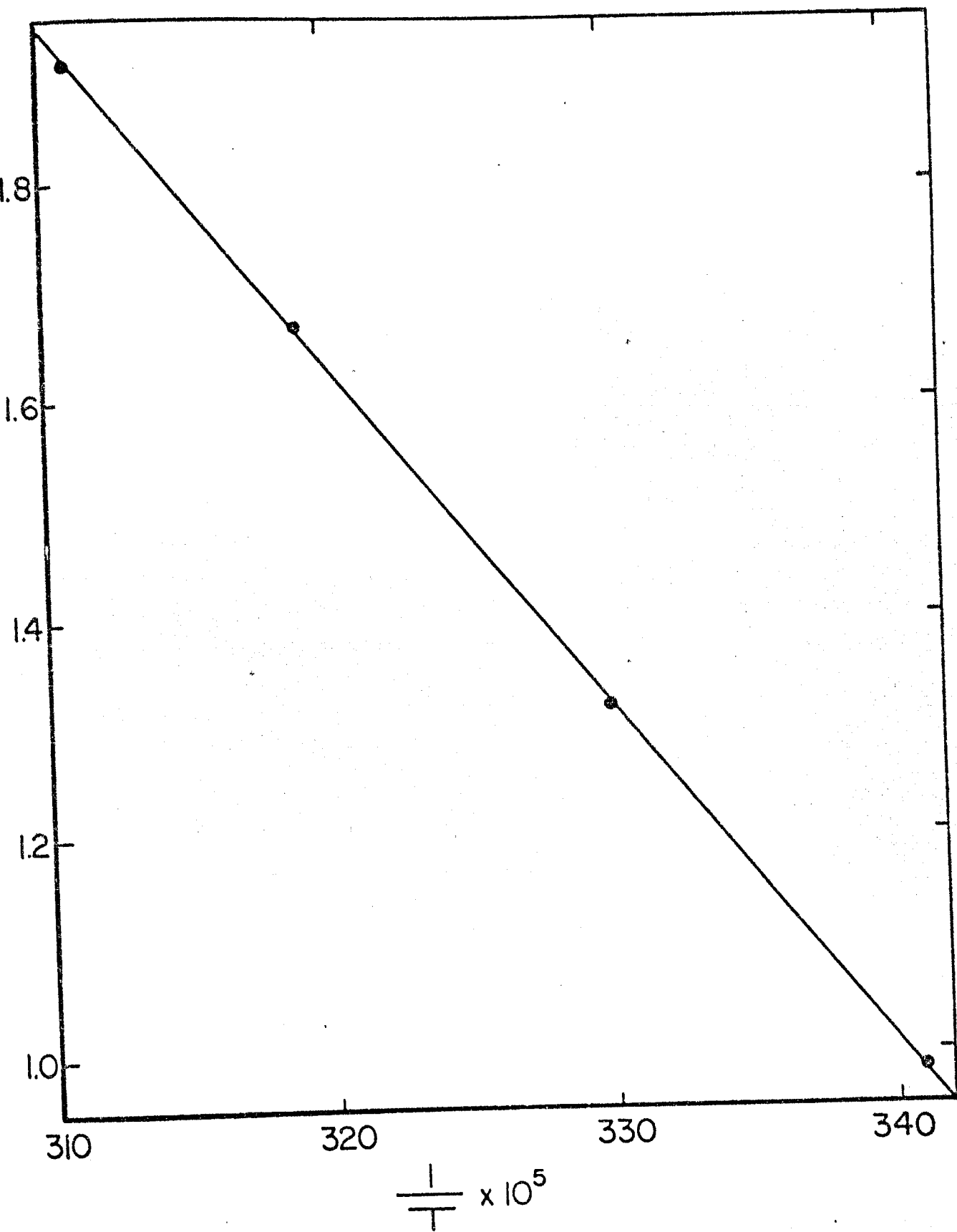


FIGURA 13

Figura 13.- Gráfica para la obtención de la energía de activación de la glucocicloaldolasa. Excepto por la temperatura se usaron las condiciones anotadas en la sección de material y métodos y ensayo de la fracción IV de acuerdo con el tercer método de purificación (Figura 9).

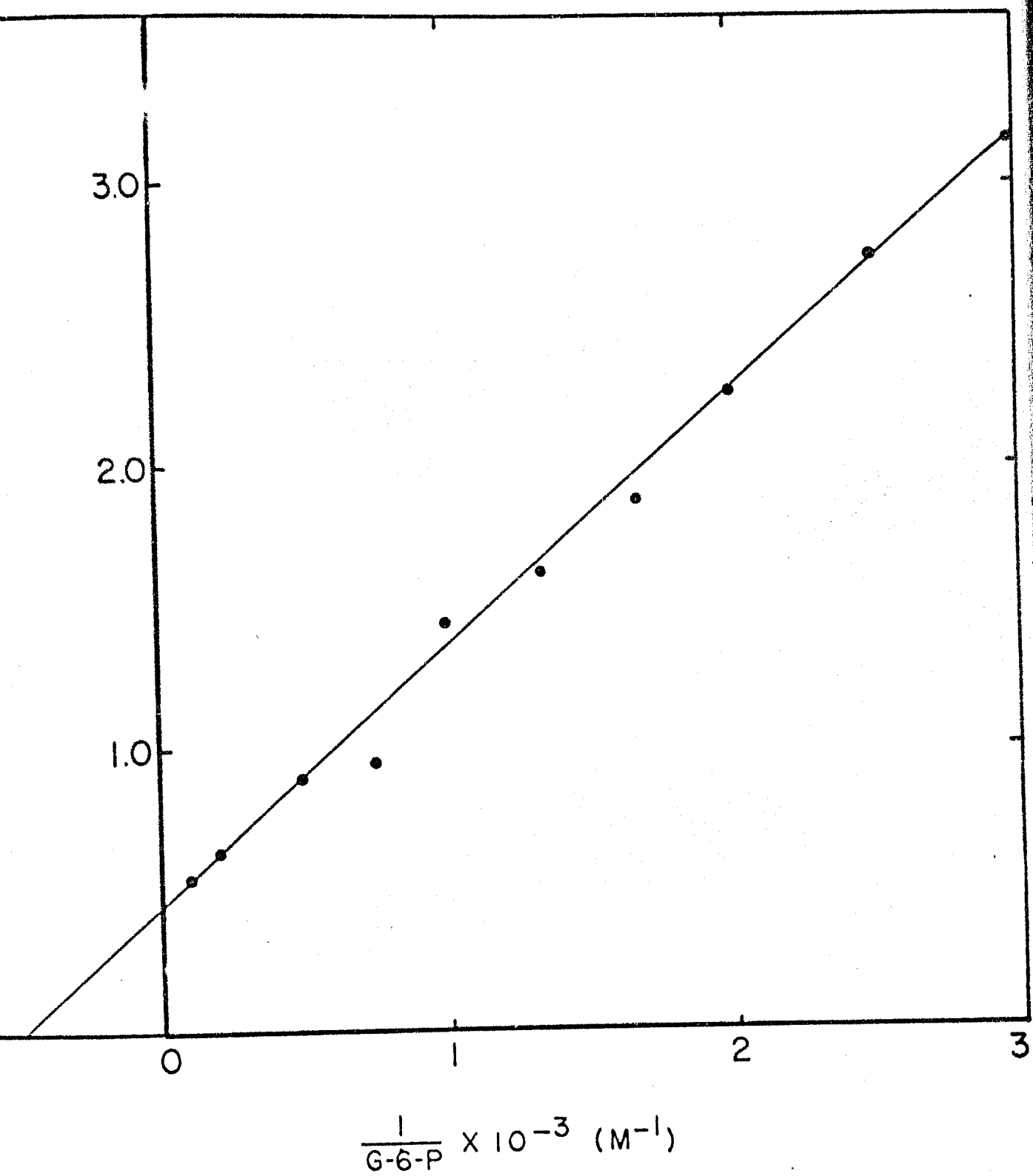


FIGURA 14

Figura 14.- Curva de Lineweaver-Burk para el sustrato. Se usó enzima de la fracción IV del tercer método de purificación (figura 9). Cada punto representa un promedio de cuando menos 4 experimentos individuales. La concentración del sustrato se verificó espectrofotométricamente con glucosa-6-P deshidrogenasa.

en inositol-P por la enzima semipurificada de N. crassa. La glucosa libre a concentraciones de 0.2 M no se utiliza como sustrato para formar inositol libre.

La glucocicloaldolasa requiere en forma absoluta del NAD^+ para catalizar la formación del inositol-P. El hecho es interesante y sobre el se insistirá mas adelante ya que el sustrato, la glucosa-6-P, y el producto, el inositol-1-P, tienen el mismo número de hidrógenos y electrones. Trabajando con la enzima semipurificada (fracción IV de la figura 9) no es posible detectar, en el curso de la formación del inositol-P, la presencia de NADH con el empleo del espectrofotómetro o del fluorómetro. No hubo síntesis del inositol-1-P ni cambio en la absorbancia durante la reacción cuando el NAD^+ fue sustituido en la mezcla de incubación por algunos de sus análogos (tabla 4).

En la figura 15 se observa el comportamiento de la enzima cuando, manteniendo constante la concentración del sustrato (10 mM), se varió la concentración de la coenzima. Se calculó una constante de Michaelis aparente de 2.3×10^{-6} M para el NAD^+ .

4.- Inhibidores.

Si bien el estudio de los inhibidores de una enzima se incluye habitualmente dentro del capítulo general de cinética, en el presente trabajo se menciona aparte por haberse estudiado con detalle el efecto de dos inhibidores, el pirofosfato y el NADH, sobre la actividad de la glucocicloaldolasa. La atención se concretó en éste par de inhibidores por su posible papel como reguladores fisiológicos de la actividad de la enzima.

a.- Pirofosfato.- Es un poderoso inhibidor de la reacción enzimática y un metabolito normal de la fisiología celular. Un estudio pormenorizado reveló que el pirofosfato actúa como, inhibidor competitivo del sustrato con una constante de

TABLA 4

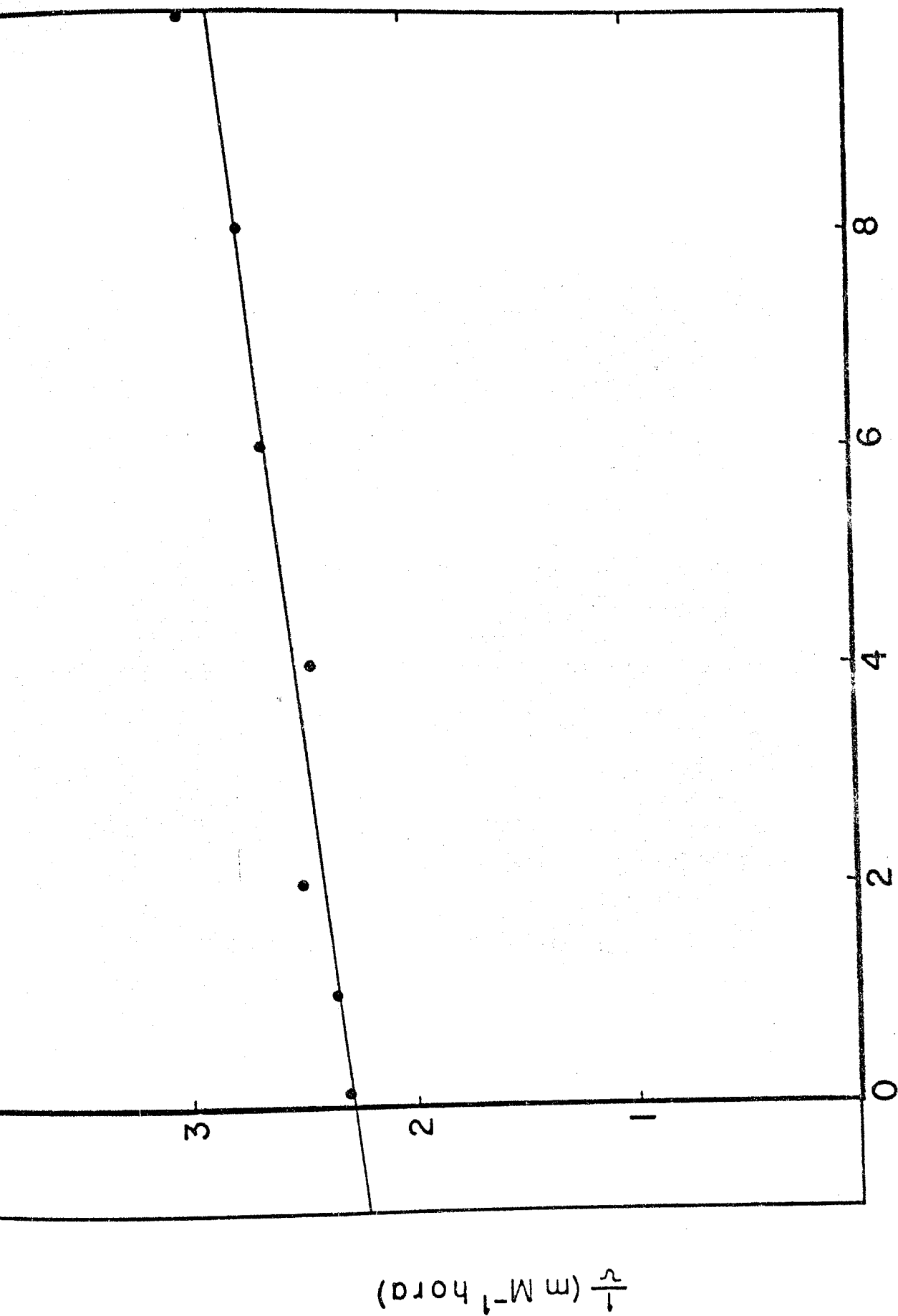
PAPEL DEL NAD⁺ Y ALGUNOS DE SUS ANALOGOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOCICLOALDOLASA DE NEUROSPORA CRASSA.

Coenzima o Análogo	Cambio en absorbancia en 60 min, *	Inositol sintetizado (en por ciento)
NAD ⁺ (beta) ≠	0.002	100
NAD ⁺ (alfa) ≠	0.000	0
NADH	- 0.004	0
NAD ⁺ (beta) + NADH	0.003	20
NADP ⁺	3.00	0
FAD	0.006	0
Deamino NAD ⁺	0.008	0
Nicotin adenin mononucleótido	0.002	0
3 Acetil piridina NAD ⁺	0.009	0

* El cambio en absorbancia se registró usando celdillas de 1 cm de paso de luz y a la longitud de onda en que el compuesto reducido muestra máxima absorción.

≠ Isomerismo alfa y beta en el enlace piridín-N-ribósido.

Condiciones experimentales descritas en material y métodos excepto la concentración de la coenzima o el análogo que se usaron a una concentración final de 1 mM. Enzima de la fracción IV del tercer método de purificación (figura 9). El experimento se realizó a temperatura ambiente 22 ° C.



$\frac{1}{NAD^+} \times 10^{-4}$ (M⁻¹)

FIGURA 15

Figura 15.- Curva de Lineweaver-Burk para la coenzima. Condiciones experimentales como en la figura 14 excepto que la concentración de la coenzima se verificó espectrofotométricamente con el coeficiente de extinción molecular del NAD^+ .

inhibición aparente de 4.5×10^{-6} M (figura 16). La inhibición producida por el pirofosfato es reversible por dialisis y por la adición de cationes divalentes (Mn^{++} o Mg^{++}) al medio de incubación. Esta reactivación, como la llaman Dixon y Webb (1964), se observa aun en el caso de que la concentración del metal divalente sea ligeramente menor que la de pirofosfato. En la tabla 5 se ve el papel de cada uno de los componentes de la mezcla de incubación en la inhibición por pirofosfato. La inhibición enzimática no varía cuando se modificaron las concentraciones de NAD^+ , NH_4^+ y enzima; el Tris parece tener un efecto protector de la enzima en presencia del pirofosfato: un aumento en la concentración del buffer hace que el pirofosfato solo produzca una pequeña inhibición de la enzima, mientras que una disminución en la concentración del buffer ocasiona que la inhibición por el pirofosfato sea mas notable. Estos resultados no parecen deberse a cambios en la fuerza iónica que son concomitantes al modificar la concentración de Tris en la mezcla de incubación; la sustitución del Tris eliminado de la mezcla por cantidades equimoleculares de NaCl o de KCl no alteran los resultados anotados.

Los experimentos de inhibición se repitieron a bajas concentraciones de Tris, verificando que el pH permaneciera constante durante la reacción. Los datos en la figura 17 vuelven a mostrar claramente la inhibición competitiva del pirofosfato, se obtuvo una constante de inhibición aparente del mismo orden de magnitud (2.9×10^{-6} M) que la calculada para concentraciones 10 veces mayores de Tris. Al sustituir el Tris por un buffer de histidina, al mismo pH, se vuelve a observar la misma tendencia con una constante de inhibición aparente de 1.1×10^{-6} M (figura 18).

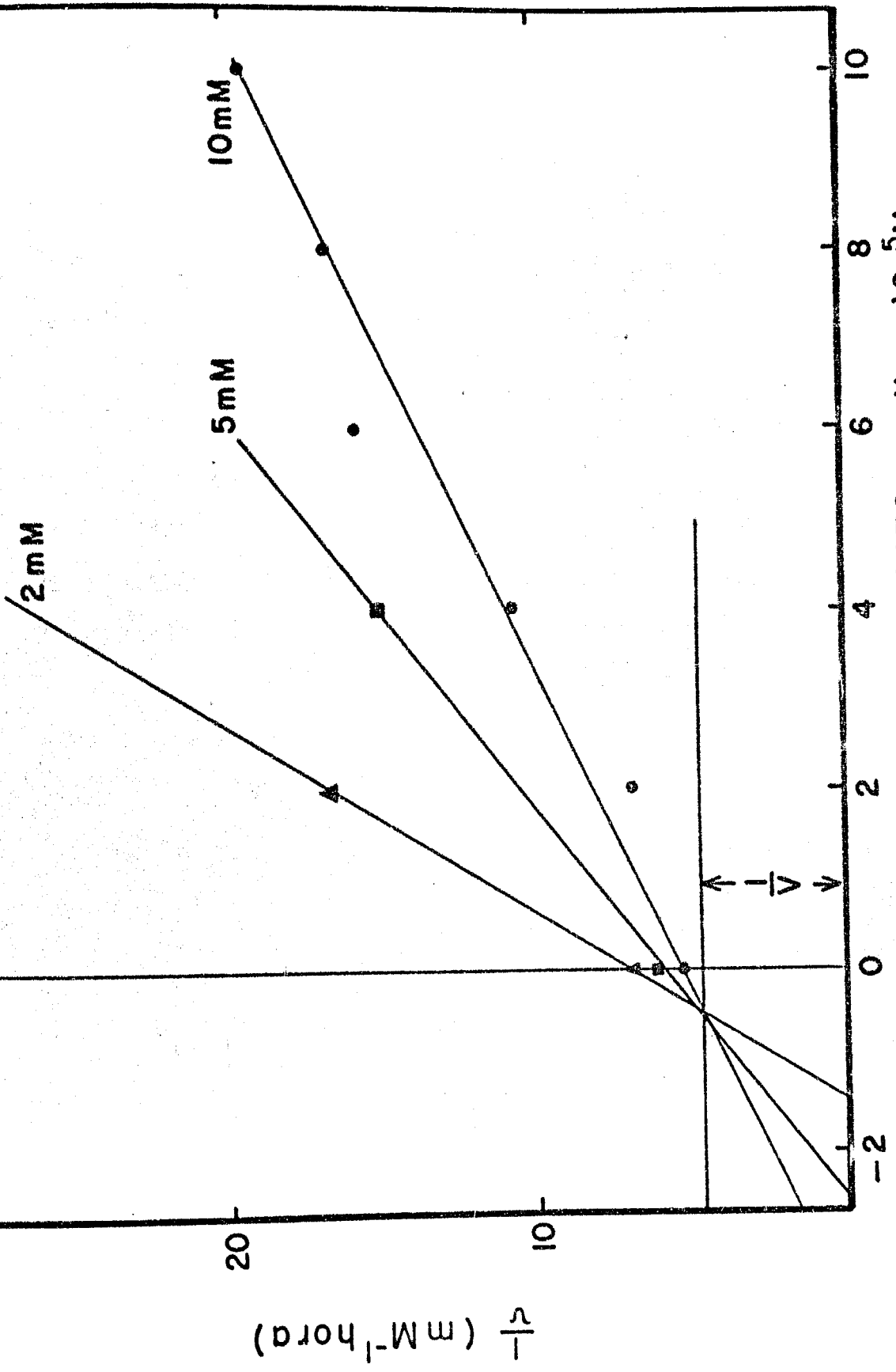
Al graficar $1/v$ contra $1/(s)$ tal como se muestra en la parte izquierda de las figuras 17 y 18 se obtuvieron líneas

TABLA 5

INFLUENCIA DE LA VARIACION DE LOS COMPONENTES DE LA MEZCLA DE INCUBACION EN LA INHIBICION POR PIROFOSFATO .

NAD ⁺	Inhibición en %	Tris	Inhibición en %	NH ₄ Cl	Inhibición en %	Enzima [≠]	Inhibición en %
1 x 10 ⁻⁵ M	50	1 x 10 ⁻² M	100	1.4 x 10 ⁻³ M	35	0.16	47
5 x 10 ⁻⁵ M	44	5 x 10 ⁻² M	55	7.0 x 10 ⁻³ M	37	0.24	37
1 x 10 ⁻⁴ M	47	1 x 10 ⁻¹ M	47	14.0 x 10 ⁻³ M	47	0.32	51
5 x 10 ⁻⁴ M	43	2 x 10 ⁻¹ M	27	28.0 x 10 ⁻³ M	37	0.40	47
1 x 10 ⁻³ M	47						

≠ en mg de proteína/ml de mezcla de incubación. La enzima usada fué de la fracción IV del tercer método de purificación (figura 9).
Cada parámetro se modificó individualmente manteniendo constante la concentración del resto de los reactivos en las cifras indicadas en material y métodos. El pirofosfato se añadió a una concentración final de 5 x 10⁻⁵ M.



PIROFOSFATO X 10^{-5}M

FIGURA 16

Figura 16.- Gráfica para evaluar la constante de inhibición del pirofosfato. Condiciones experimentales descritas en material y métodos. Enzima de la fracción IV del tercer método de purificación (figura 9). La concentración final del Tris fue 0.1 M. Se usaron las tres concentraciones de glucosa-6-P que se indican en la figura. El recíproco de la velocidad máxima ($1/V$) se tomó de la figura 14.

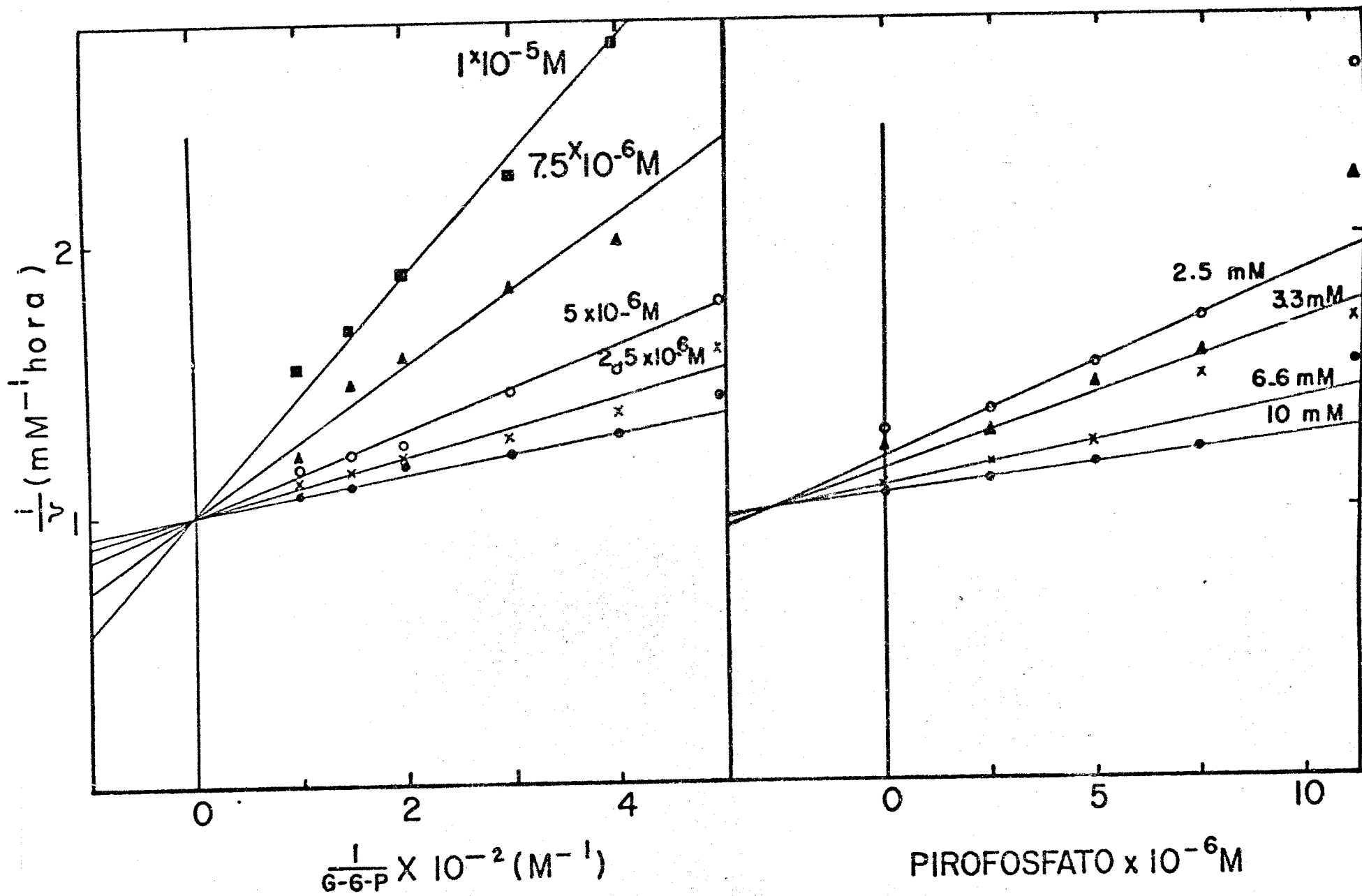
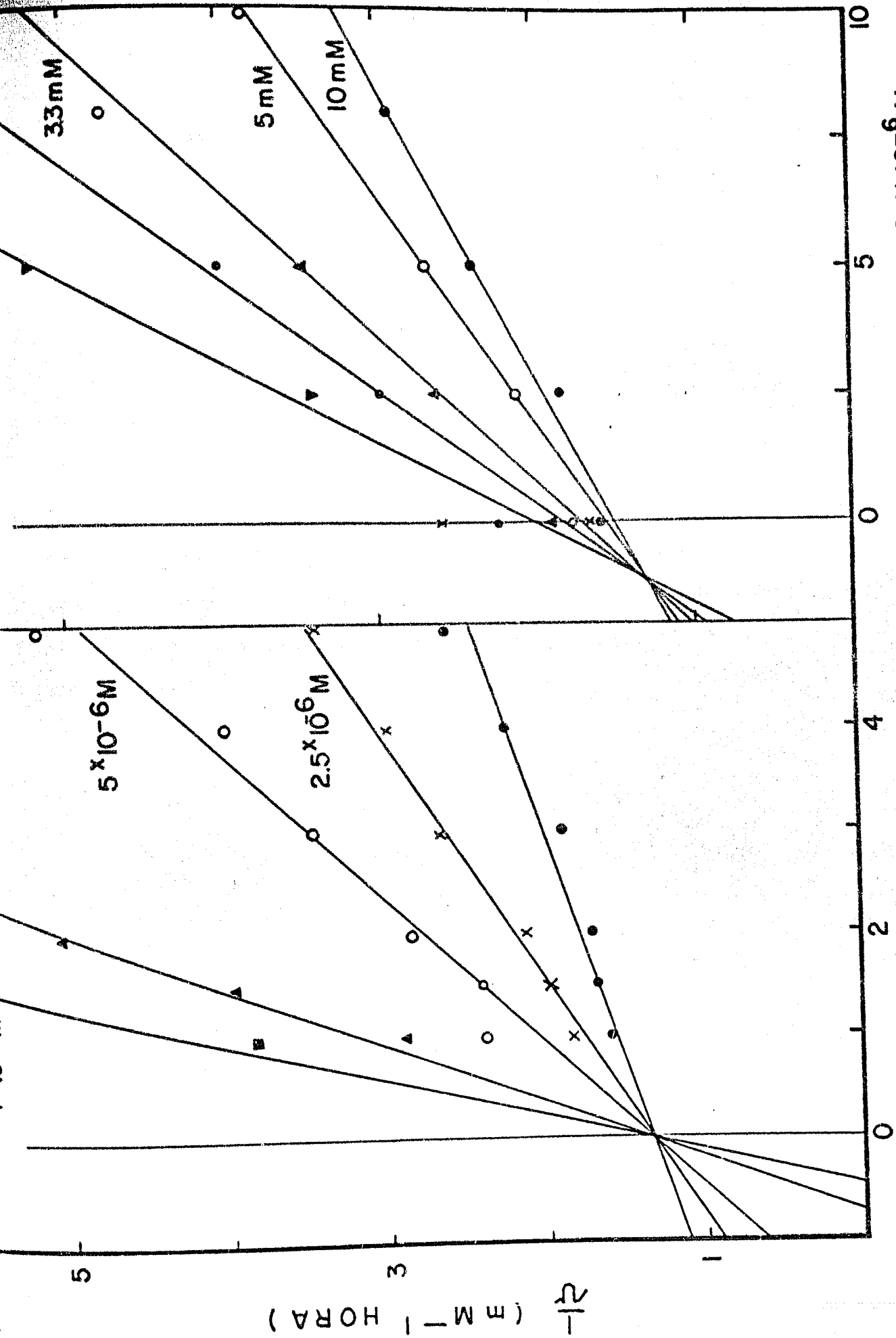


FIGURA 17

Figura 17.- Izquierda. Curva de Lineweaver-Burk para la glucosa-6-P sin pirofosfato y con las cuatro concentraciones de pirofosfato indicadas en la figura. Se usó Tris a una concentración final de 10 mM, el resto de las condiciones experimentales idénticas a las de la figura 16. Derecha. Gráfica para valorar la constante de inhibición del pirofosfato del experimento mostrado en la parte izquierda de la figura. Se usaron las cuatro concentraciones de glucosa-6-P indicadas en la figura.



PIROFOSFATO X 10^{-6} M

$\frac{1}{G \cdot P} \times 10^{-2} \text{ (M}^{-1}\text{)}$

FIGURA 18

Figura 18.- Izquierda. Experimento igual al de la figura 17 en que se sustituyó el Tris por un buffer de histidina a una concentración final de 10 mM. Derecha. Evaluación de la constante de inhibición del pirofosfato tomando los datos de la parte izquierda de la figura.

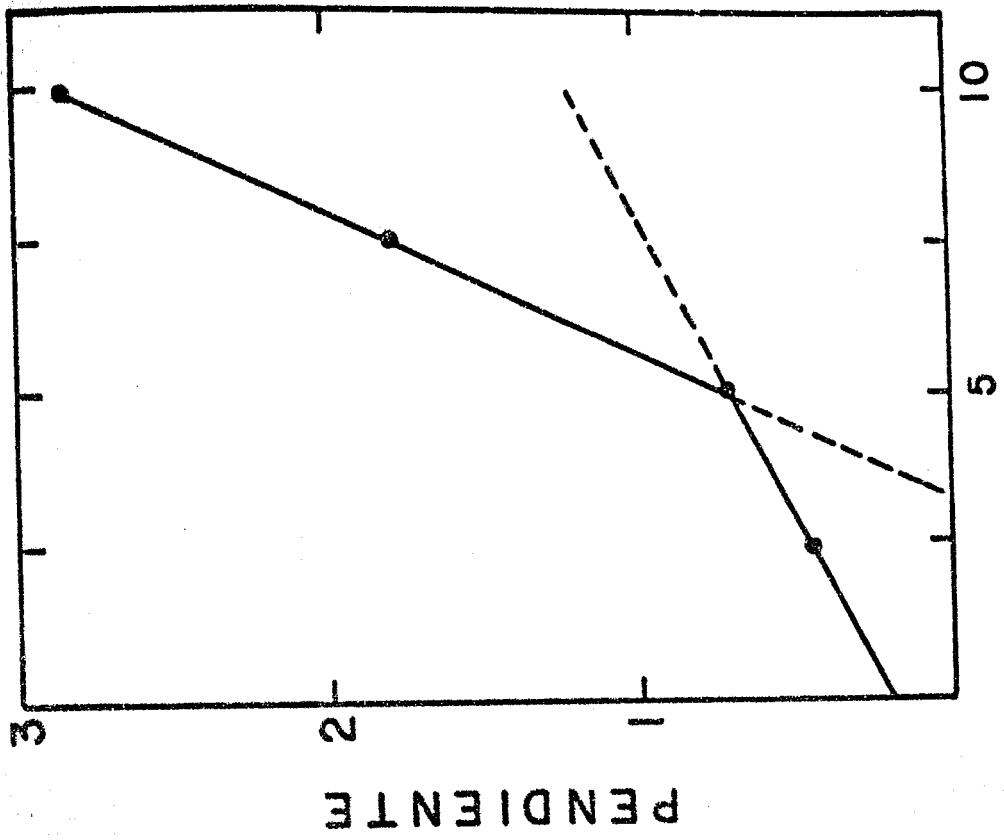
rectas con diferente pendiente dada por la concentración del inhibidor. Cuando se grafica la pendiente de cada una de dichas rectas contra la concentración del inhibidor lo habitual, para otros sistemas enzimáticos, es obtener líneas rectas que permiten sacar la constante de inhibición real de un inhibidor dado. En nuestro caso las gráficas de pendiente contra la concentración del inhibidor dieron los resultados mostrados en la figura 19. Estos resultados, diferentes a los comunmente reportados, se necesitan estudiar con mayor detalle para hacer una interpretación adecuada de los mismos.

b.- Nicotin adenin dinucleótido reducido.- Al estudiar los análogos del NAD^+ en la reacción enzimática se observó que el NADH , no solo no podía sustituir al NAD^+ , sino que era un inhibidor de la enzima. El NADH resultó ser un inhibidor competitivo para el NAD^+ (figura 20) y se obtuvo una constante aparente de inhibición de 4.0×10^{-6} M.

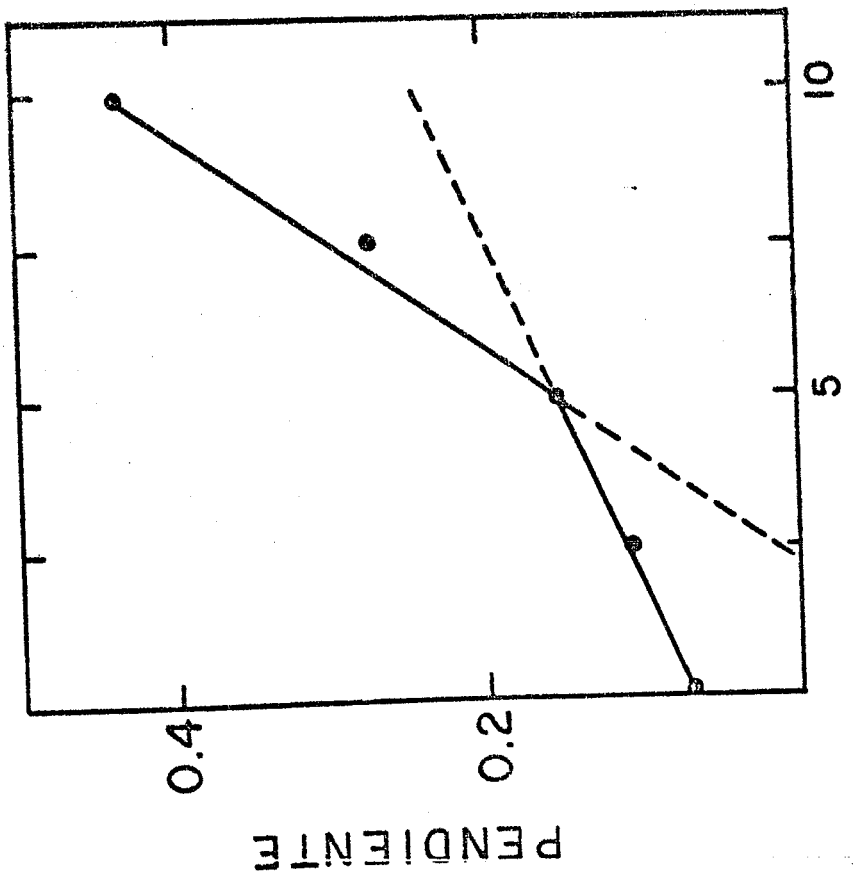
c.- Otros inhibidores.- En contraste con el definido papel del pirofosfato como inhibidor del sistema enzimático ninguno de los nucleótidos ensayados produjeron alguna inhibición (tabla 6). En la tabla 7 se anotan los resultados obtenidos con otra serie de posibles inhibidores de la glucocicloaldolasa. Es interesante notar que los isómeros del gamexano o lindano ensayados a la concentración de 3.5×10^{-4} M no inhibieron la reacción enzimática, resultados que podían esperarse de acuerdo con los datos de Fuller, Barratt y Tatum (1950).

5.- Algunas características de la enzima.

Como se indicó en la sección de material y métodos se valoró el peso molecular de la enzima utilizando la técnica de Martin y Ames (1961), en un gradiente de sacarosa y empleando albúmina sérica de bovino como índice del peso molecular, (fi-



PIROFOSFATO x (10⁻⁶ M)

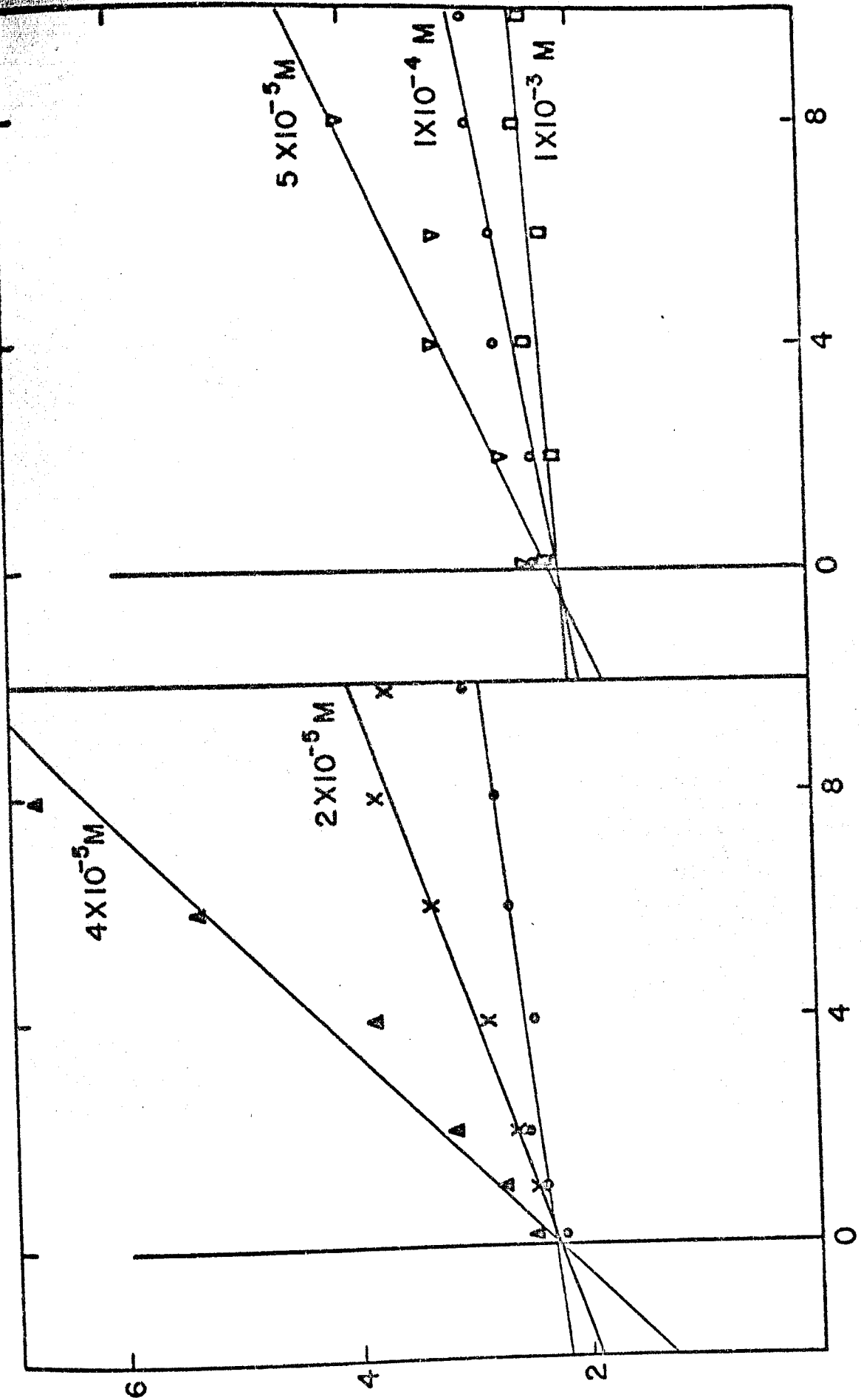


PIROFOSFATO x (10⁻⁶ M)

FIGURA 19

Figura 19.- Izquierda. Las pendientes de las líneas de la gráfica del lado izquierdo de la figura 17 se graficaron contra la concentración de inhibidor empleada. Derecha. Datos tomados de la gráfica de la izquierda de la figura 18: pendiente de cada una de las líneas contra la concentración usada de pirofosfato.

$\frac{1}{v} \text{ (M}^{-1} \text{ HORA)}$



$\text{NADH} \times 10^{-5} \text{ M}$

$\frac{1}{\text{NAD}^+} \times 10^{-4} \text{ (M}^{-1})$

FIGURA 20

Figura 20.- Izquierda. Gráfica de Lineweaver-Burk para el NAD^+ solo y con dos concentraciones, indicadas en la figura, de NADH. Condiciones experimentales como en la figura 16. Derecha. Gráfica de la concentración del inhibidor contra el recíproco de la velocidad. Datos tomados de la parte izquierda de la figura. Se emplearon las tres concentraciones anotadas de NAD^+ .

TABLA 6

EFFECTO DE ALGUNOS NUCLEOTIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE GLUCOCICLO-
ALDOLASA DE NEUROSPORA CRASSA.

Nucleótido	Inositol formado (en por ciento)	
	Sin Mg ⁺⁺	Con Mg ⁺⁺
Ninguno (control)	100	100
Adenosina 5' monofosfato	103	101
Adenosina 5' difosfato	93	94
Adenosina 5' trifosfato	102	104
Adenosina 3'5' monofosfato (cíclico)	93	--
Guanosina 5' monofosfato	96	98
Guanosina 5' difosfato	96	100
Guanosina 5' trifosfato	103	100
Inosina 5' monofosfato	97	102
Inosina 5' difosfato	99	98
Inosina 5' trifosfato	104	104
Citidina 5' monofosfato	97	96
Citidina 5' difosfato	99	103
Citidina 5' trifosfato	96	106
Timidina 5' monofosfato	102	103
Timidina 5' difosfato	99	95
Timidina 5' trifosfato	93	92
Uridina 5' monofosfato	98	86
Uridina 5' difosfato	104	98
Uridina 5' trifosfato	99	106
Uridina difosfato de glucosa	96	--
Pirofosfato	9	103

Condiciones experimentales descritas en material y métodos.
Enzima de la fracción IV del tercer método de purificación
(figura 9). El Mg⁺⁺ se usó a una concentración final de 10
mM y los nucleótidos o el pirofosfato a una concentración
final de 0.1 mM.

TABLA 7

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOCICLOALDOLASA POR VARIOS COMPUESTOS.

Inhibidor	Concentración final	Inositol formado (en por ciento)
Ninguno		100
1,2,3,4,5,6,Hexaclorociclohexano(alfa)	0.35 mM	110
1,2,3,4,5,6,Hexaclorociclohexano(beta)	0.35 mM	126
1,2,3,4,5,6,Hexaclorociclohexano(gama)	0.35 mM	108
1,2,3,4,5,6,Hexaclorociclohexano(delta)	0.35 mM	106
N-bromosuccinimida	10. mM	0
NaHSO ₃	2. mM	100
Timarosal	0.25 mM	0
Fluoruro	0.1 mM	96
Arsenato	0.1 mM	104
Malonato	0.1 mM	96
Succinato	10. mM	90
Citrato	10. mM	99
Fosfato	5. mM	62
Pirofosfato	0.05 mM	50
Fosfato de piridoxamina	2. mM	105
Sorbosa	10 mM	98
Acido ribonucleico ≠	100 ug/ml	88
Acido desoxiribonucleico ≠	100 ug/ml	91

Condiciones experimentales descritas en material y métodos. Enzima de la fracción IV del tercer método de purificación (figura 9). Los aniones ensayados se añadieron como sales de sodio a pH neutro.

≠ Altamente polimerizado.

gura 21); para la glucocicloaldolasa se calculó un peso molecular de 150,000 que está de acuerdo con el comportamiento de la enzima en columnas de Sephadex G 100.

Aunque no está terminado el estudio de la localización subcelular de la glucocicloaldolasa en el micelio de N. crassa se tienen los siguientes datos: un 60 % de la actividad enzimática se recupera en el sobrenadante de una centrifugación a 10,000 x g durante 10 minutos; la enzima que se recupera en el precipitado, o sea en la fracción mitocondrial, se desprende de las mitocondrias al lavar éstas dos o tres veces con sacarosa 0.25 M. El comportamiento de la enzima recuperada en el sobrenadante de 10,000 x g queda resumido en la tabla 5, de donde se concluye, por el momento, que la glucocicloaldolasa no se encuentra en una fracción particulada. Inclusive, la preincubación del homogenado libre de núcleos con EDTA (2 mM), Mg^{++} (5 mM) y fosfato (5 mM) a las concentraciones finales indicadas, no ocasionan una fijación de la enzima a ninguna de las fracciones subcelulares. Los datos sobre la localización de la enzima son de interés para la interpretación de los datos sobre la regulación in vivo de la actividad de la glucocicloaldolasa.

6.- Mecanismo de la reacción.

Aun siendo una sola la enzima responsable de la biosíntesis del inositol persiste el hecho de que ésta enzima tenga que realizar las propuestas reacciones descritas a partir de la glucosa-6-P con el NAD^+ para dar inositol-1-P y NAD^+ (véase la página 25).

a.- Formas oxidadas de la glucosa y el inositol. Inositol dehidrogenasa.- Se investigó la potencialidad de conversión al inositol, por medio de la glucocicloaldolasa, de formas oxidadas de la glucosa y el inositol; de la glucosa la glucosona

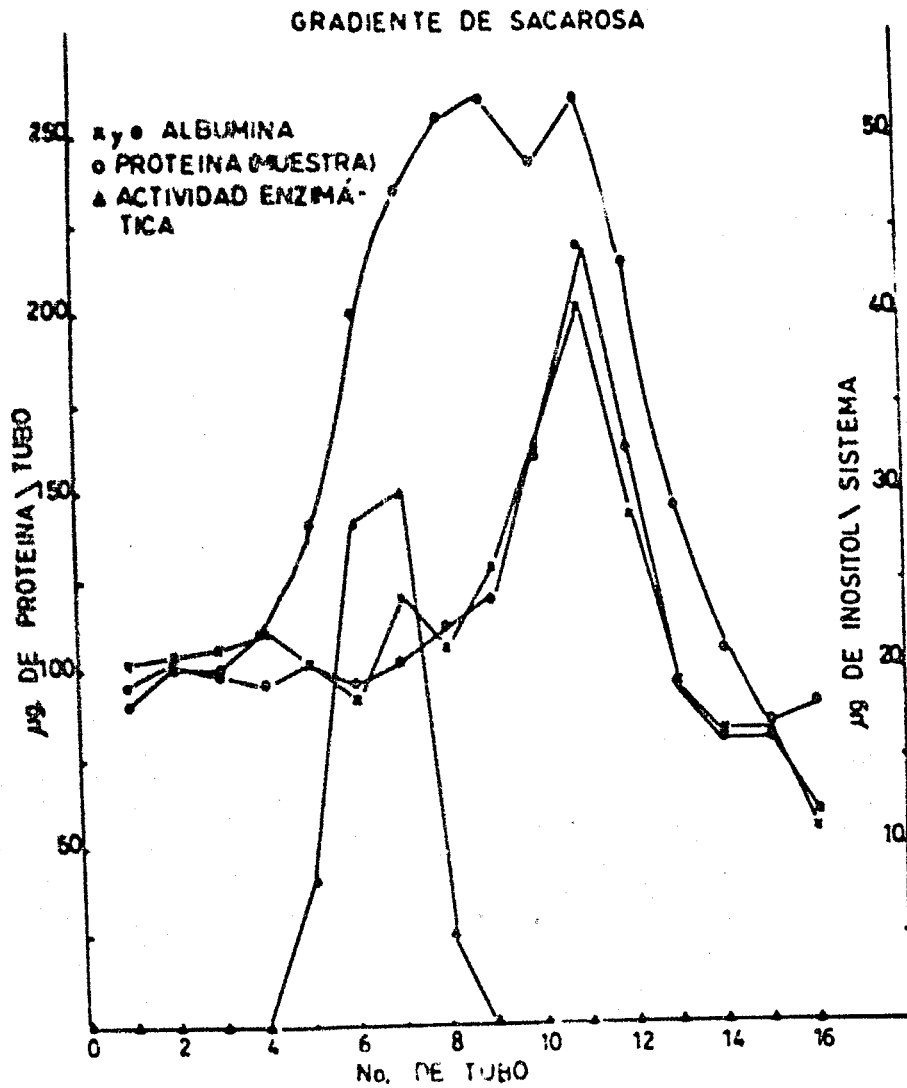


Figura 21.- Resultados de un gradiente de sacarosa preparado y manejado de acuerdo con la técnica de Martín y Ames (1960). Se utilizó glucocicloaldolasa de la fracción IV del tercer método de purificación (figura 9) y se centrifugó a 35,000 rpm durante 15 horas en una centrifuga Spinco con el rotor SW 39.

TABLA 8

ACTIVIDAD DE LA GLUCOCICLOALDOLASA EN DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES DE NEUROSPORA CRASSA.

Fracción	NADH Oxidasa	Gluc-6-Pasa	Gluc/6-P deshidrogenasa	Glucocicloaldolasa
Homogenado libre de células	100	100	100	100
"Mitocondrias"	69	8	1	5
"Microsomas"	7	65	2	10
Sobrenadante	8	12	81	70
Recuperación	84	85	84	85

La actividad de las distintas enzimas esta indicada en por ciento de la actividad del homogenado total que se tomó como 100 %. La obtención de las distintas fracciones subcelulares se llevó a cabo de acuerdo con el esquema de la figura 10. Las enzimas se determinaron por las técnicas descritas en material y métodos.

y del inositol la 2-inososa y la 4-inososa. Con las tres sustancias anotadas se realizaron experimentos como el resumido en la tabla 9 en los que se examinó la habilidad de los compuestos para "diluir" la cantidad de inositol radioactivo formado a partir de glucosa-6-P uniformemente marcada. Solo la 4-inososa demostró actividad de "dilución" en las condiciones descritas, ni la 2-inososa ni la glucosona se convirtieron en inositol en tales condiciones. El hecho de que la 4-inososa sin estar fosforilada se convierta en inositol, y sobre todo el dato encontrado posteriormente de que la mutante inositol⁻ 89601 también puede convertir la 4-inososa en inositol sugirieron que otra enzima, y no la glucocicloaldolasa, era la responsable de la síntesis del inositol a partir de la 4-inososa. El esquema de purificación anotado en la figura 8 permitió separar ambas enzimas.

En la tabla 10 se incluyen los datos de la purificación de la enzima que convierte la 4-inososa en inositol y que puede llamarse inositol deshidrogenasa. Los datos de ésta tabla representan los resultados de purificación de la inositol deshidrogenasa aislada de la mutante inositol⁻ 89601, idénticos datos se obtuvieron con la cepa silvestre. En la tabla 11 se ve que el NADPH es mejor coenzima que el NADH y que hay estequiometría entre la oxidación del NADPH seguida en el espectrofotómetro y la cantidad de inositol detectada en el ensayo biológico. La falta de estequiometría usando NADH parece deberse a una reducción enzimática del NAD⁺ que no ocurre con el NADP⁺. Vale la pena hacer notar que el total de la 4-inososa reducida enzimáticamente se convierte en mio-inositol y no hay formación del otro posible isómero que también se obtiene por la reducción química de ésta inososa.

TABLA 9

DILUCION DEL INOSITOL RADIOACTIVO FORMADO A PARTIR DE GLUCOSA-6-P C-14 UNIFORMEMENTE MARCADA EN PRESENCIA DE LA 4-INOSOSA.

Condiciones de incubación	Inositol encontrado \neq	
	Método radioactivo	Método biológico
Mezcla de incubación completa \neq	115	119
Mezcla completa + 4-inososa	100	121
Mezcla completa + NADH + ATP + Mg ⁺⁺	49	39
Mezcla completa + 4-inososa + NADH + ATP + Mg ⁺⁺	36	110
Mezcla completa + 4-inososa + NADH + ATP + Mg ⁺⁺ + sin glucosa-6-P --	--	60
Mezcla completa + 4-inososa + NADH + ATP + Mg ⁺⁺ + sin glucosa-6-P y sin enzima --	--	0

\neq En micromol/mg de proteína/hora.

\neq La mezcla de incubación completa como se describe en material y métodos a la cual se le añadió 1 ucurie de glucosa-6-P uniformemente marcada.

Enzima de la fracción III del primer método de purificación descrito (figura 7).

TABLA 10

ACTIVIDAD DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE INOSITOL DESHIDROGENASA.

Fracción	Actividad específica [†]		Purificación		Actividad total ^{††}	Recuperación en %
	v ⁺	v ⁺⁺	v	V	V	V
I Sobrenadante crudo	0.013	0.05	1 x	1 x	1190	100
II 1a precipitación con sulfato de amonio	0.038	0.15	3.2 x	3.0 x	470	40
III Ste de sulfato de protamina y 2a precipitación con sulfato de amonio	0.100	0.42	8.0 x	8.4 x	394	33

[†] Cambio en densidad óptica a 340 mμ/min/mg de proteína

^{††} Cambio en densidad óptica a 340 mμ/min/fracción total

* v Velocidad de la reacción usando 20 umolas de epi 6 4 inososa.

++ V Velocidad de la reacción obtenida por extrapolación.

Condiciones experimentales para el ensayo de la actividad enzimática: en un volumen final de 1 ml: 100 umolas de Tris pH 7.9; 6.26 umolas de EDTA; 0.06 umolas de NADPH; 2.5 a 4.0 mg de proteína; 4 a 20 umolas de 4 inososa. Temperatura 22 ° C.

TABLA 11

CONVERSION DE LA 4-INOSOSA EN INOSITOL POR LA INOSITOL DESHIDROGENASA DE NUEROSPORA CRASSA LIBRE DE GLUCOCICLOALDOLASA.

Concentración del sustrato (en umolas)	Concentración de la coenzima (en umolas)		Inositol formado [∗] Basado en la oxidación de la coenzima.	Cuantificado en el ensayo biológico.
50	---	---	--	0
50	NADH	1.0	0	60
50	NADPH	0.3	1230	1200
50	NADPH	0.3 (sin enzima)	0	0
5	NADPH	0.3	303	347
0.5	NADPH	0.3	30	0

∗ En umolas de inositol formado/mg de proteína/hora.

Condiciones experimentales como en la tabla 10 excepto para las concentraciones de sustrato y coenzima que se usaron a las concentraciones indicadas en ésta tabla. Enzima 2.5 mg de proteína de la fracción IIIa del segundo método de purificación (figura 8). Temperatura 22 ° C. Al final del período de incubación la reacción se paró con 0.1 ml de NaOH 1 M y se colocó en agua hirviendo por 15 minutos. Con éste tratamiento se eliminó la actividad biológica de la 4-inososa como sustituto del inositol en las mutantes auxótrofas al mismo. Se neutralizaron las muestras antes de tomar alícuotas para la determinación del inositol por ensayo biológico.

Algunas otras características de la inositol deshidrogenasa son las siguientes: la constante de Michaelis para el sustrato (figura 22) es de 7.7×10^{-2} M y de 6.3×10^{-2} M para la enzima de la cepa silvestre y para la aislada de la mutante 89601 respectivamente. Ambas preparaciones demostraron una mejor capacidad para la síntesis de inositol en presencia de EDTA, la actividad es lineal por lo menos durante tres minutos, en períodos cortos de incubación la cantidad de inositol formado es lineal con respecto a la cantidad de proteína añadida al sistema, hay una zona amplia de pH óptimo de 6.8 a 8.8 (buffer de maleato de 6.8 a 7.2 y Tris de 7.2 a 8.8), la actividad disminuye mas allá de éste rango. La reacción parece ser reversible, cuando se incuba la enzima con NADP^+ e inositol se detecta la formación de NADPH en el espectrofotómetro y aparece un compuesto que da reacción en frío con la fenilhidrazona tal como lo hace la 4-inososa. Si se sustituye la 4-inososa por 2-inososa o glucosona en el medio de incubación se forma NADP^+ a una velocidad 10 veces mayor pero no se forma mio-inositol.

De los experimentos descritos se puede concluir que la 4-inososa no es un intermediario en el camino de la biosíntesis del inositol a partir de la glucosa-6-P y por medio de la glucocicloaldolasa en base a los siguientes hechos: 1) la adición de 4-inososa y NADPH a la glucocicloaldolasa dependiente de NAD^+ no resulta en la formación de inositol; 2) En el sistema de la glucocicloaldolasa el sustrato y el producto están fosforilados mientras que la 4-inososa no lo está y la adición de ATP no aumenta la formación de inositol; 3) los requerimientos de coenzimas son diferentes la 4-inososa utiliza NADPH y la glucosa-6-P NAD^+ ; 4) la mutante inositol⁻ usada (89601) solo es capaz de for-

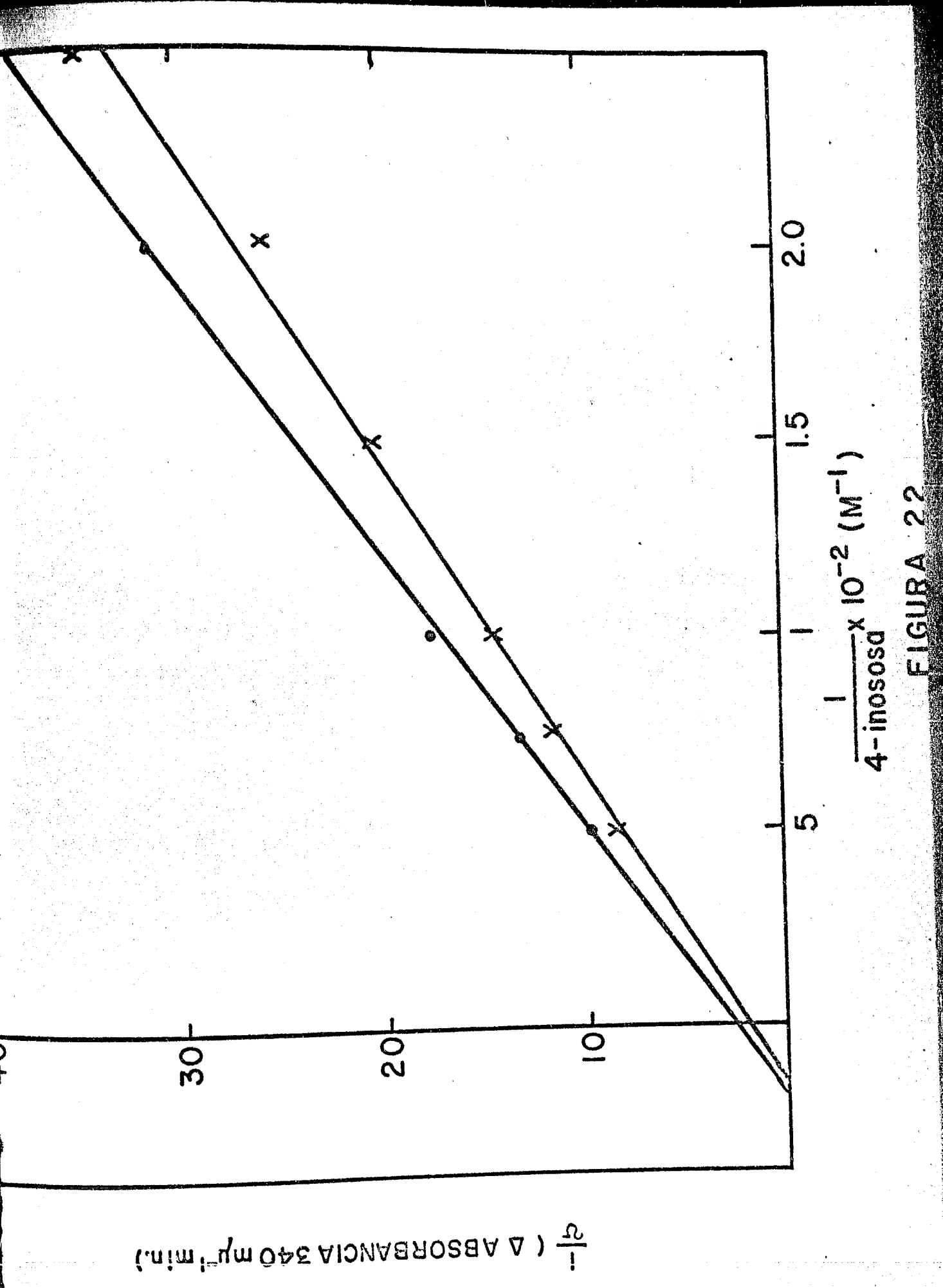


FIGURA 22

Figura 22.- Gráfica de Lineweaver-Burk con la 4-inososa y la inositol deshidrogenasa de la cepa silvestre (x—x) y de la mutante inositol⁻ 89601 (—).

nar inositol cuando al medio de incubación se le añade 4-inososa; ya que la mutante y la cepa silvestre difieren por un simple gene (Patridge y Giles, 1953) seguramente involucrado en la conversión de glucosa-6-P en inositol-1-P, parece por lo tanto que la 4-inososa no es normalmente sintetizada por ninguna cepa de Neurospora; 5) la 4-inososa no parece ser el sustrato normal de la inositol deshidrogenasa ya que la constante de Michaelis para la 4-inososa es muy alta en comparación con el promedio de constantes de Michaelis para sustratos naturales de deshidrogenasas bien caracterizadas. Todos estos hechos hacen difícil adscribirle un papel fisiológico a la inositol deshidrogenasa descrita; es posible que ésta enzima participe normalmente en algún otro camino metabólico y que su sustrato normal sea otro y sin embargo reduzca inespecíficamente a la 4-inososa.

Una vez descartada la 4-inososa como componente del sistema de la glucocicloaldolasa se repitieron los experimentos de "dilución" con la 2-inososa y la glucosona habiendo fosforilado ambos compuestos. La fosforilación de los mismos se hizo tal como se describió en la sección de material y métodos, nunca se investigó el sitio de fosforilación de la 2-inososa. Los resultados volvieron a ser negativos, ninguno de los compuestos "diluyeron" la formación de inositol radioactivo a partir de la glucosa marcada, tampoco formaron inositol en presencia de la glucocicloaldolasa y piridín nucleótidos reducidos.

b.- Aislamiento de posibles intermediarios de la reacción.- Otro enfoque para averiguar el mecanismo de la reacción fué el de atrapar algún intermediario formado durante la síntesis del inositol. Ya se hizo notar, pero conviene insistir, que con la enzima purificada no es posible detectar la formación de NADH.

En la figura 23 se presentan los resultados. Cuando se usa glucocicloaldolasa poco purificada y altas concentraciones de NAD^+ (15 mM) aparece NADH en el curso de la reacción; resultados similares fueron reportados por Chen y Charalampous (1965) con la enzima de levadura. Con una enzima más pura y con menores concentraciones de NAD^+ , que dan por resultado un mejor rendimiento en la formación del inositol-1-P, no es posible obtener cambios en absorbancia a 340 m μ ni fluctuaciones en la fluorescencia (365-460 m μ) durante el tiempo de incubación. En concordancia con estos resultados la síntesis enzimática de inositol-1-P no se inhibe por agentes que en otros sistemas, a concentraciones de 1 mM, inhiben la oxidación de NADH, tales como riboflavina, rotenona, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, CN^- y amital. Al mismo tiempo estas sustancias no promueven la acumulación de la coenzima reducida mientras la reacción se está llevando a cabo. Además, la síntesis enzimática del inositol-1-P tampoco es modificada cuando la reacción se acopla a un exceso de deshidrogenasa alcohólica, láctica o glutámica y cantidades adecuadas de sustratos oxidados; los datos obtenidos con las últimas dos enzimas confirman los resultados de Chen y Charalampous (1967) usando enzima de levadura. Todos los enfoques utilizados fueron congruentes en impedir el aislamiento de algún intermediario de la reacción; y los resultados sugieren que si el NADH y alguna forma oxidada de la glucosa-6-P se forman en el curso de la reacción enzimática ambos deben permanecer íntimamente unidos a la enzima.

c.- Mecanismo íntimo de la ciclización.- Con la enzima de levadura otros laboratorios han demostrado (Kindl, Biedl-Neubacher y Hoffmann-Ostenhof, 1965; Chen y Charalampous, 1965) que la molécula íntegra de la glucosa-6-P, sin sufrir ninguna fragmentación,

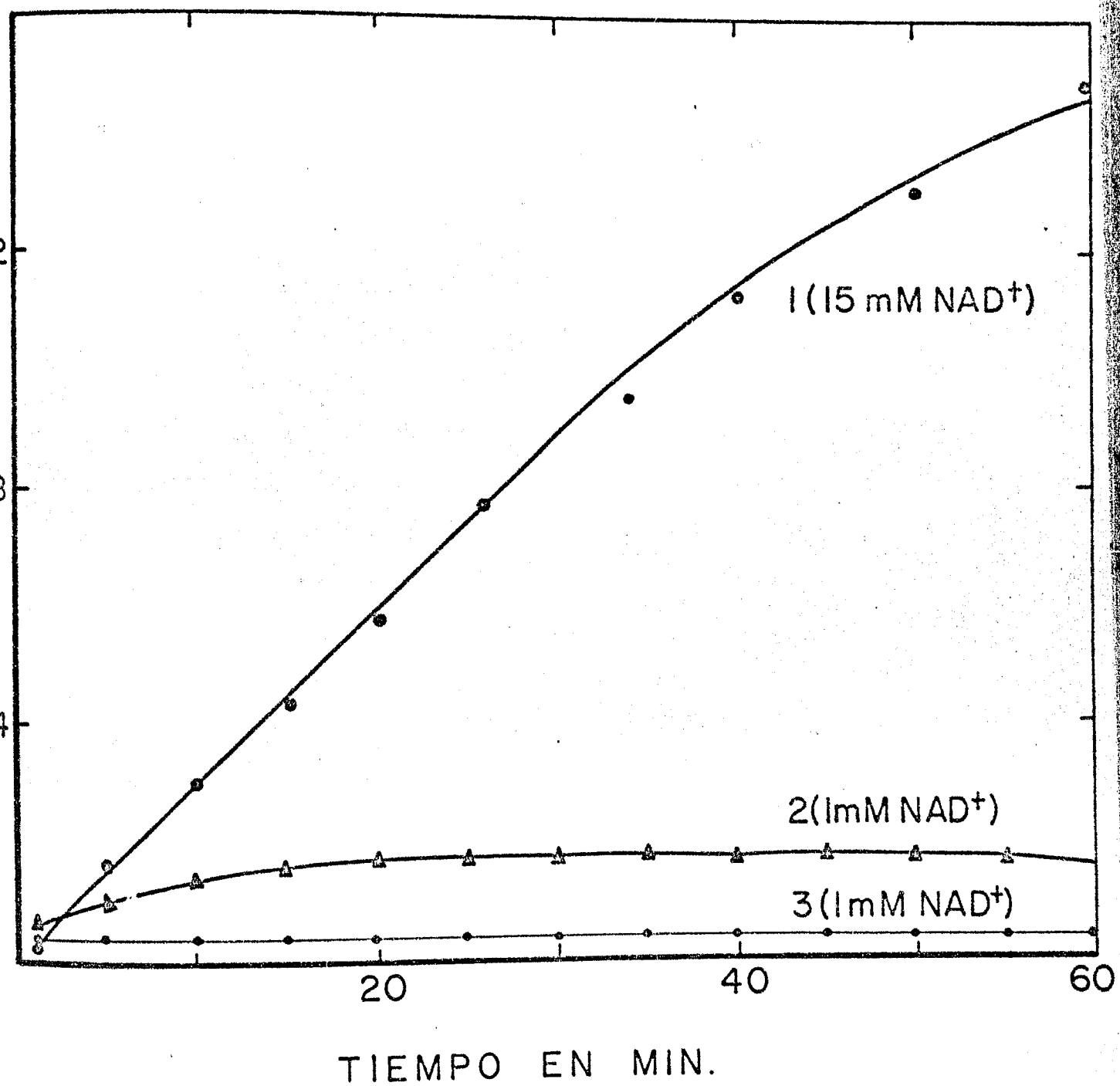


FIGURA 23

Figura 23.- Reducción del NAD^+ por diferentes preparaciones de la glucocicloaldolasa. Las reacciones se siguieron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Zeiss PMQ II usando celdillas de 1 cm de paso de luz. Se emplearon las concentraciones de NAD^+ indicadas en la figura y el resto de la mezcla de incubación tenía la composición señalada en material y métodos. A los tubos 1 y 2 se les añadió 2.0 mg de proteína con actividad de glucocicloaldolasa proveniente de la fracción III del primer método de purificación descrito (figura 7); al tubo 3 se le añadieron 0.3 mg de proteína con actividad de glucocicloaldolasa y eluida de un gel de acrilamida (figura 12). La cantidad de inositol sintetizado fue de 19, 58 y 900 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína/hora respectivamente en los tubos 1, 2 y 3. Se corrieron reacciones paralelas sin glucosa-6-P que se usaron como blancos.

se cicliza para formar el inositol-1-P; además, los carbonos 1, 2, 5 y 6 de la glucosa vienen a quedar como los carbonos 6, 5, 2 y 1 del inositol. Dada la similitud tan grande entre la glucocicloaldolasa de levadura y la de Neurospora es razonable aceptar que el mismo mecanismo opera en el hongo. Por otro lado trabajando con la enzima de levadura Chen y Charalampous (1967) demostraron que al usar como sustrato de la glucocicloaldolasa la glucosa-6-P doblemente tritiada en el carbono 6, por cada molécula de inositol formado, un átomo de tritio pasa al medio acuoso. También pensando en el mismo mecanismo en la Neurospora todos los datos hacen suponer que se trata de una ciclización directa entre el carbono 1 de la glucosa-6-P y el carbono 6 de la misma y que el enlace covalente entre ambos se lleva a cabo por la pérdida de un hidrógeno del carbono 6.

Desde el punto de vista teórico existen al menos dos posibles mecanismos para la reacción que sean congruentes con los datos de que se dispone. Uno de ellos implica una reacción de tipo de aldolización y el otro una condensación del tipo de la escloína. Se hicieron experimentos para estudiar la segunda posibilidad.

Se sabe que el enlace covalente para la formación enzimática del inositol se establecerá entre los carbonos 1 y 6 de la glucosa-6-P. También se sabe que el carbono 6 de la glucosa pierde un protón y que por lo tanto va a dar origen a un exceso de electrones en dicho carbono. Una manera de facilitar el enlace covalente podría ser la aparición de una deficiencia de electrones en el carbono 1 de la glucosa-6-P por la aceptación por parte del NAD^+ de un hidruro proveniente precisamente del carbono 1 (figura 24). Una vez creado el desequilibrio electrónico (II en la fi-

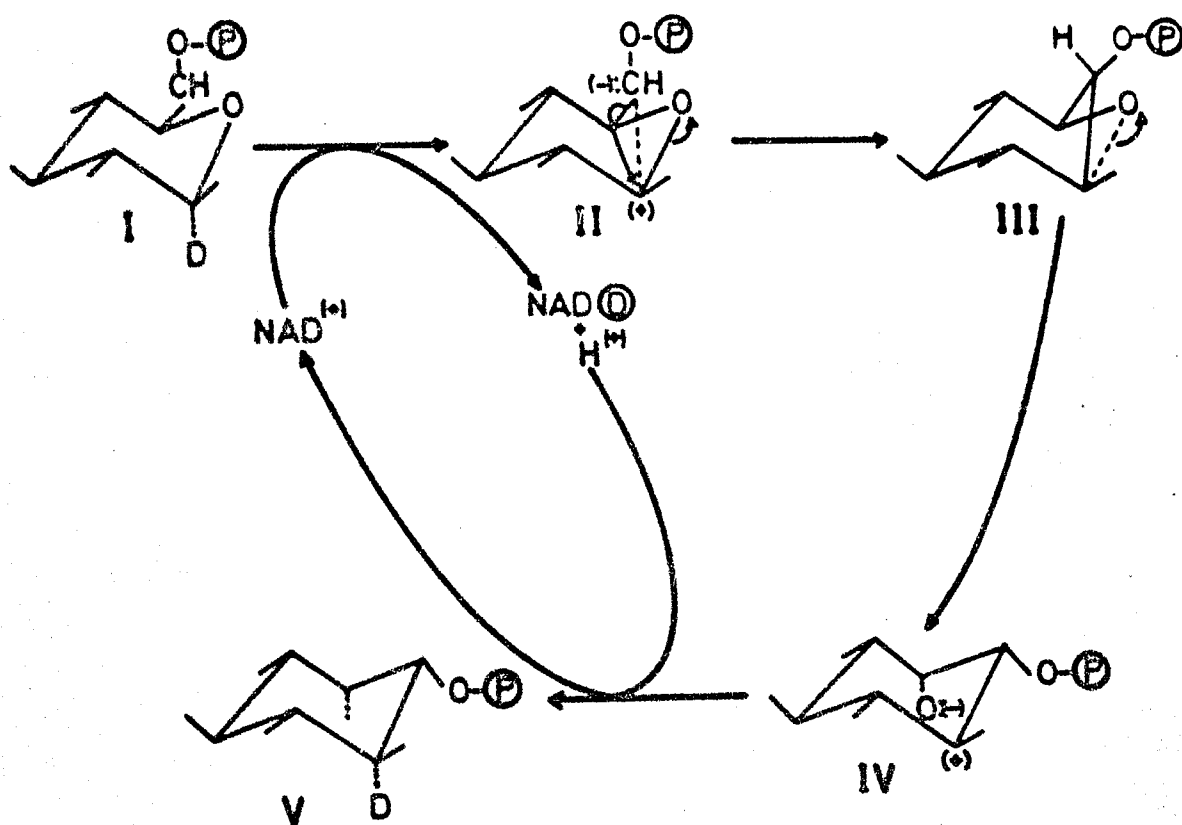
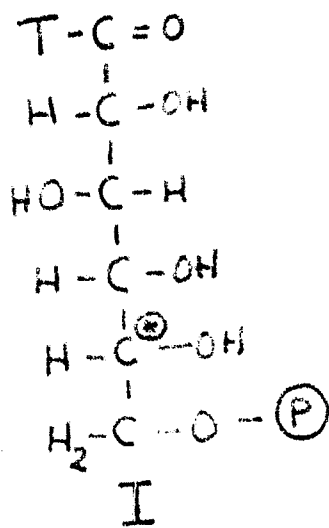


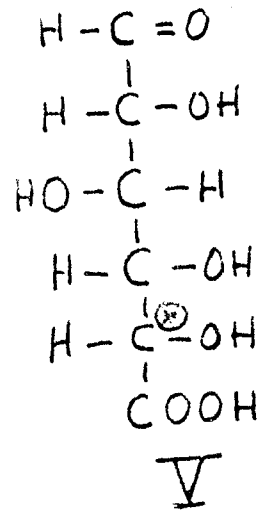
Figura 24.- Representación esquemática de la ciclización de la glucosa-6-P con un mecanismo del tipo de la acilofina. El hidrógeno unido al carbono 1 en la glucosa-6-P se ha representado como deuterio. Para mas detalles léase el texto.

gura 24) se formaría el enlace covalente carbono 1 carbono 6 (III y IV en la misma figura) y el hidruro del NADH regresaría al carbono de donde había salido (V en la figura 24). Para probar este mecanismo de reacción se usó glucosa-6-P deuterada en el carbono 1 y la velocidad de la reacción se comparó, en condiciones idénticas, con la velocidad obtenida con la glucosa-6-P normal. Se siguió éste enfoque por que el uso de isótopos del hidrógeno ha demostrado ser un instrumento útil en el mecanismo de acción de algunas enzimas (Mahler y Douglas, 1957; Rose, 1961; Bright y Gibson, 1967) debido al hecho, de que una etapa enzimática asociada con el rompimiento de una ligadura conteniendo el isótopo, es habitualmente la limitante de la velocidad de la reacción total.

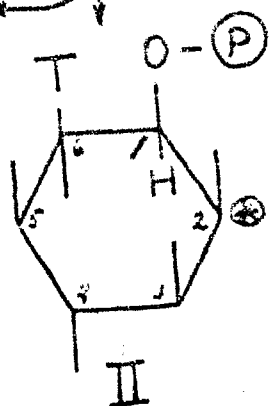
Antes de realizar los experimentos con glucosa deuterada se demostró, con glucosa tritiada en el carbono 1, que por cada molécula de inositol formada 1.04 átomos de tritio se encontraron en dicho inositol (figura 25). Como ya quedó anotado, el carbono 1 de la glucosa corresponde al 6 del inositol. El inositol-1-P tritiado (II en la figura 25) formado a partir de la glucosa-6-P tritiada en el carbono 1 (I en la figura 25) se degradó con fosfatasa alcalina e inositol oxigenasa preparada de riñón de rata tal como se asentó en la sección de material y métodos. La fosfatasa alcalina eliminó el fosfato del inositol-1-P tritiado y originó el inositol libre (III en la figura 25) que la inositol oxigenasa lo convirtió en ácido glucurónico (IV en la figura 25). La radioactividad estuvo ausente en el ácido glucurónico y se recuperó en el agua (reacción de III a IV en la figura 25), por consiguiente el tritio estaba presente en los carbonos 1 o 6 del inositol. Por lo que se sabe de la reacción de la glucociclo-



1
2
3
4
5
6



NAD^+
 NAD^+
 GLUCOCICLO-ALDOLASA



P
 FOSFATASA ALCALINA

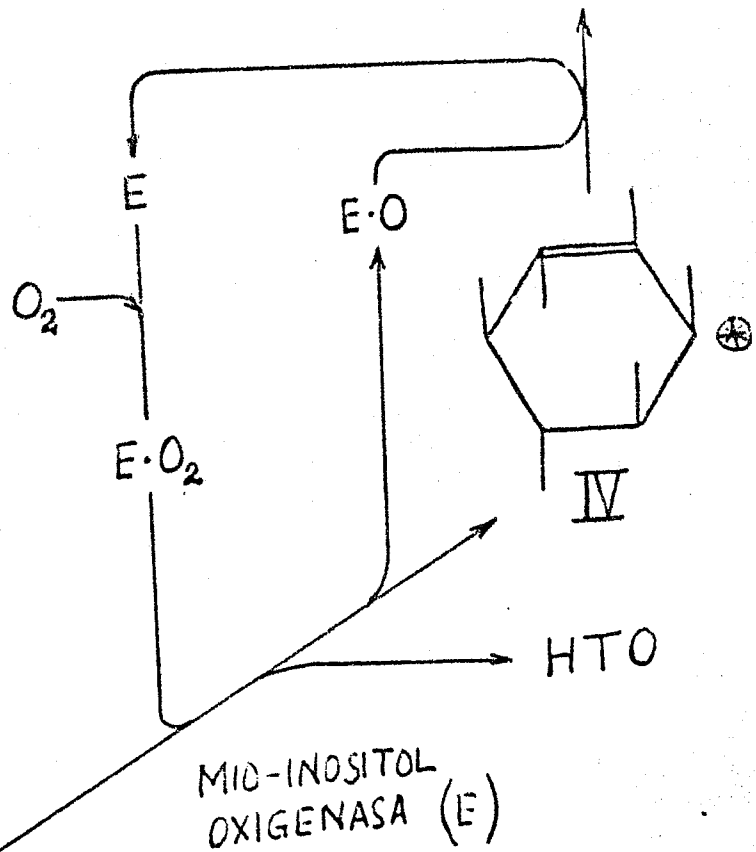
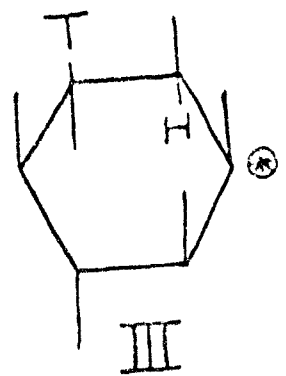


FIGURA 25

Figura 25.- Recuperación del tritio a partir de inositol tritiado y degradado por la inositol oxigenasa de riñón de rata. Se incubaron con la inositol oxigenasa purificada, en las condiciones descritas por Charalampous (1959) 0.35 umolas (9.5 x 10⁶ cpm) de inositol tritiado; 0.09 umolas (25.6 %) se convirtieron en ácido glucurónico no radioactivo y dieron origen simultáneamente a la aparición, en el medio acuoso, de 2.6 x 10⁵ cpm (27.4 % de la radioactividad original del inositol). La radioactividad en el agua permaneció constante después de destilarla. Para mas detalles véase el texto.

aldolasa lo mas probable es que el tritio se encontrara en el carbon 6 del inositol y asi el mecanismo de ciclozación descrito tendria parte de validez ya que se conserva en el sitio adecuado el hidrógeno que temporalmente sería transferido al NAD^+ .

No obstante, los resultados con glucosa-6-P deuterada (figura 26) no apoyan nuestro punto de vista sobre la transferencia de un hidruro del carbono 1 de la glucosa-6-P al NAD^+ . La figura muestra una gráfica de Lineweaver-Burk con glucosa-6-P normal y glucosa-6-P deuterada en el carbono 1. Cuando se usó esta última como sustrato se observó una disminución en la velocidad máxima de la reacción que fue paralelo a una disminución en la constante de Michaelis (tabla 12). La disminución en la velocidad máxima estaría de acuerdo con nuestra hipótesis; sin embargo, al disminuir la cantidad de sustrato deuterado en la mezcla de incubación no aparece una disminución proporcional en la formación del inositol-1-P (figura 26), en otras palabras, con los valores extrapolados de velocidad máxima hay un 40 % de disminución en la síntesis del inositol a partir de la glucosa deuterada en comparación con la normal; pero solo hay un 5 % menos del inositol sintetizado con las concentraciones mas bajas de sustrato ensayadas. Para apoyar totalmente nuestra hipótesis de trabajo debería observarse, la misma reducción en la formación del inositol-1-P, a partir del compuesto deuterado, independientemente de la cantidad de sustrato ensayado.

Ya que éstos resultados descartan una participación directa del hidrógeno 1 de la glucosa-6-P durante la formación del inositol-1-P, se apoya la idea de una condensación aldólica entre los carbonos 1 y 6 de la glucosa-6-P (Kindl, 1966; Chen y Charalampous, 1967; Barnett y Corina, 1968 y Eisenberg, 1969).

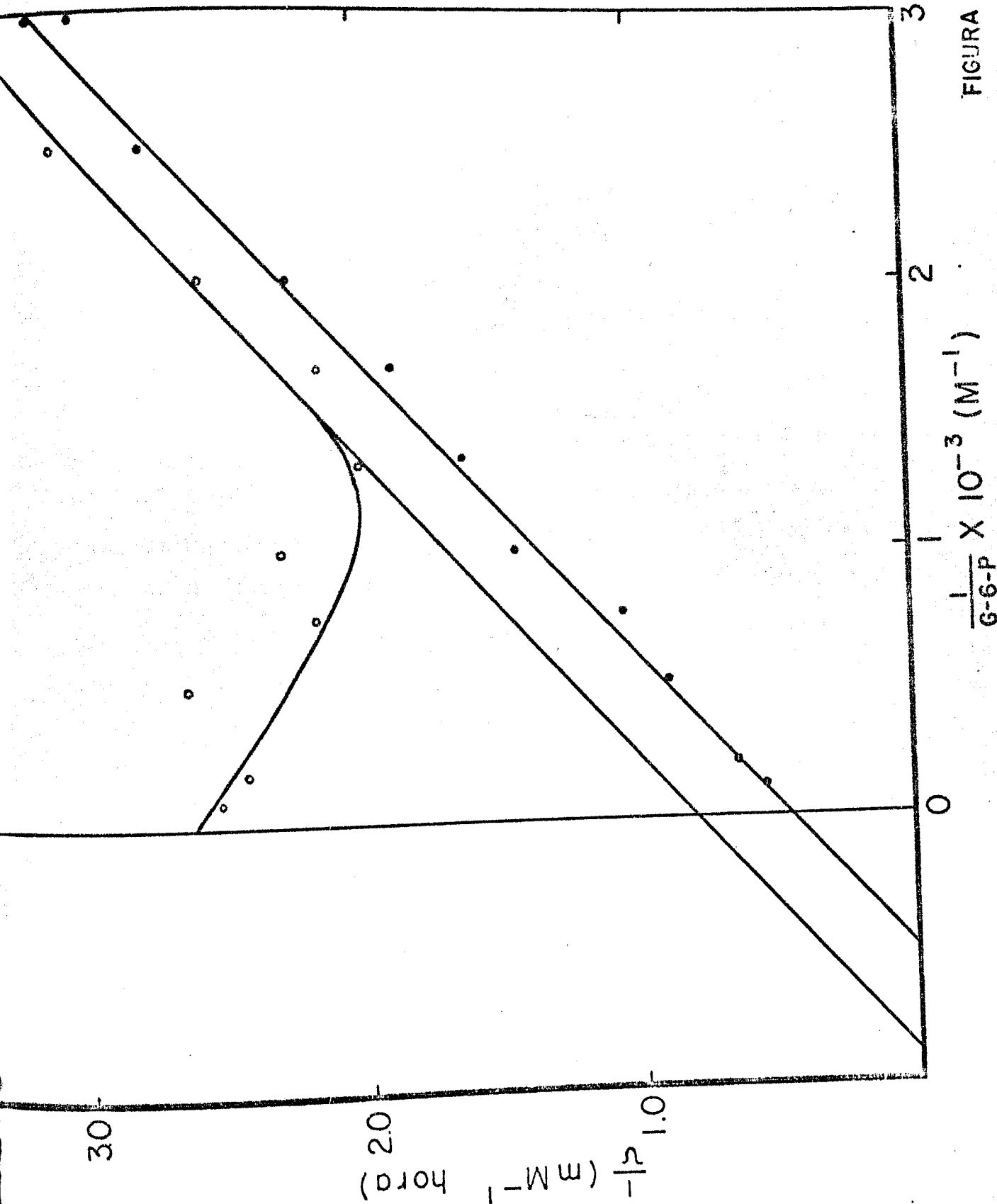


FIGURA 26

Figura 26.- Curva de Lineweaver -Burk para glucosa-6-P normal (•—•) y deuterada (o—o). Cada punto representa un promedio de cuando menos 4 determinaciones individuales. Con la ayuda de la glucosa-6-P deshidrogenasa se comprobó espectrofotométricamente la concentración de sustrato empleada en cada caso.

TABLA 12

COMPARACION DE LOS VALORES OBTENIDOS EN LA FIGURA 26

	Glucosa-6-P normal	Glucosa-6-P deuterada.
Velocidad máxima	$V_H = 2.18 \text{ mM/hora}$	$V_D = 1.27 \text{ mM/hora}$
Constante de Michaelis (aparente)	$K_{mH} = 1.94 \text{ mM}$	$K_{mD} = 1.14 \text{ mM}$

Relaciones

$$\frac{V_H}{V_D} = 1.71$$

$$\frac{V_D}{V_H} = 0.58$$

$$\frac{K_{mH}}{K_{mD}} = 1.69$$

$$\frac{K_{mD}}{K_{mH}} = 0.59$$

Estos autores proponen la siguiente secuencia de reacciones:



Sin embargo, Eisenberg (1969), usando enzima aislada de testículo de rata, no pudo demostrar "dilución" del inositol formado a partir de glucosa-6-P radioactiva cuando incluyó en la mezcla de incubación 5-ceto-glucosa-6-P sintetizada químicamente.

d.- Alfa y beta glucosa.- En otra serie de experimentos se intentó ver si la glucocicloaldolasa tenía alguna preferencia por las formas anoméricas alfa o beta de la glucosa-6-P. La metodología usada fue similar a la descrita por Salas Viñuela y Solé (1965) que les permitió demostrar la dependencia de la glucosa-6-P deshidrogenasa por la configuración beta. No se obtuvieron resultados claros con la glucocicloaldolasa, probablemente debido al hecho de que la enzima actúa sobre la forma abierta lineal de la glucosa-6-P, que puede ser un mejor sustrato para su oxidación en el carbono 5 dando origen a la molécula postulada la 5-ceto-glucosa-6-P.

7.- Regulación in vivo de la síntesis de inositol.

Entre las sustancias ensayadas con capacidad inhibitoria para la glucocicloaldolasa, los dos inhibidores mas potentes resultaron ser el NADH y el pirofosfato, ambos metabolitos normales de la célula. Tales resultados hacen altamente atractivo suponer que éste par de sustancias puedan tener un papel importante en la regulación in vivo de la actividad de la glucocicloaldolasa, y por ende, en la poza metabólica del inositol.

La Neurospora parece ser un microorganismo adecuado pa-

ra el estudio in vivo de la regulación de la biosíntesis del inositol. Como quedó demostrado con anterioridad, el único camino fisiológico normal para la biosíntesis del inositol es por medio de la glucocicloaldolasa. Para los fines prácticos descritos en esta sección de resultados, se puede aceptar, que el producto final de nuestra enzima es el inositol libre ya que la fosfatasa que cataliza la formación del mismo a partir del inositol-1-P no parece ser limitante; cuando se aísla el inositol soluble en agua a partir del micelio de N. crassa más del 95 % se encuentra en forma no fosforilada; además, cuando se incuban extractos crudos o poco purificados de la glucocicloaldolasa, en condiciones apropiadas para la síntesis de inositol-1-P, todo el producto formado es cuantitativamente convertido en su forma no esterificada (no se descarta la posibilidad de que puedan ser varias las fosfatasas que intervengan en la hidrólisis del inositol-1-P). En Neurospora el inositol formado no es utilizado como fuente de carbono, ni promueve el crecimiento del hongo, como puede concluirse de los datos presentados en la tabla 13. De acuerdo con los datos de Fuller y Tatum (1956) el principal destino metabólico que tiene el inositol en éste hongo, es hacia la formación de un fosfolípido. Si aceptamos que modificaciones en las pozas metabólicas del NADH y del pirofosfato no van a influir sustancialmente en la incorporación del inositol en los fosfolípidos, entonces, los cambios detectados en la poza del inositol libre, por modificación de los niveles intracelulares del NADH o del pirofosfato, serán un reflejo de la actividad in vivo de la glucocicloaldolasa. Esta aseveración es apoyada, cuando menos para el caso del pirofosfato, por los datos presentados en la tabla 14: la incorporación de inositol (concentraciones limitantes para el crecimiento) en fosfolí-

TABLA 13

INOSITOL, 2-INOSOSA Y 4-INOSOSA COMO FUENTE DE CARBONO EN EL CRECIMIENTO DE LA NEUROSPORA CRASSA.

Concentración de nutrientes en el medio mínimo (en por ciento)				Crecimiento en mg de peso seco	Diferencia con control respectivo
Glucosa	4-inososa	2-inososa	inositol		
(Cepa silvestre)					
0.1	---	---	---	1.5	---
0.9	---	---	---	12.6	---
1.0	---	---	---	16.9	---
0.1	0.9	---	---	4.0	+ 2.5
0.9	0.1	---	---	14.0	+ 1.4
0.1	---	0.9	---	2.1	+ 0.6
0.9	---	0.1	---	15.8	+ 3.2
---	---	---	1.0	0	---
0.1	---	---	0.9	1.4	- 0.1
0.9	---	---	0.1	12.7	+ 0.1
(Mutante 89601)					
0.1	---	---	20 ug	2.2	---
0.9	---	---	20 ug	16.1	---
1.0	---	---	20 ug	12.0	---
0.1	0.9	---	---	3.3	+ 1.1
0.9	0.1	---	---	12.0	- 4.1
0.1	0.9	---	20 ug	3.8	+ 1.6
0.9	0.1	---	20 ug	16.3	+ 0.2
0.1	---	0.9	---	2.0	- 0.2
0.9	---	0.1	---	13.2	- 2.9
0.1	---	0.9	20 ug	2.2	0
0.9	---	0.1	20 ug	13.4	- 2.7
---	---	---	1.0	0	---
0.1	---	---	0.9	3.0	+ 0.8
0.9	---	---	0.1	14.8	- 1.3

Se usaron matraces de 25 ml con 5 ml de medio de cultivo. El hongo creció por 72 horas o sea hasta la fase estacionaria. La fuente de carbono en el medio mínimo fué la indicada en la tabla en por ciento (p/v) del medio de cultivo. El crecimiento no aumenta si la fuente de carbono en el medio es mayor del 1 por ciento.

TABLA 14

RESPUESTA AL INOSITOL DE UNA MUTANTE DE N. CRASSA AUXOTROFA AL
CRECIDA EN UN MEDIO DE CULTIVO CON POCO FOSFATO.

Inositol ug/matraz	Medio mínimo normal	Peso seco (mg) Medio mínimo sin fosfatos al que se le añadieron los fos- fatos como solución aparte.	Medio mínimo sin. fosfatos al que se se le añadió 1/100 de la concentración normal de fosfatos
5	1.6	2.2	2.2
10	4.1	3.8	3.7
15	6.6	9.0	8.5
20	12.0	15.7	20.4
30	25.8	26.1	29.2
40	34.9	28.9	30.2

Se incubó la mutante 89601A en matraces de 125 ml con 20 ml del medio indicado suplementado de sacarosa al 2 %, durante 72 horas; sin agitación y a 29° C. Al final la Neurospora se cosechó por filtración y succión y se colocó en un horno a 90-100° C durante toda la noche. Cada valor representa un promedio de 4 determinaciones individuales.

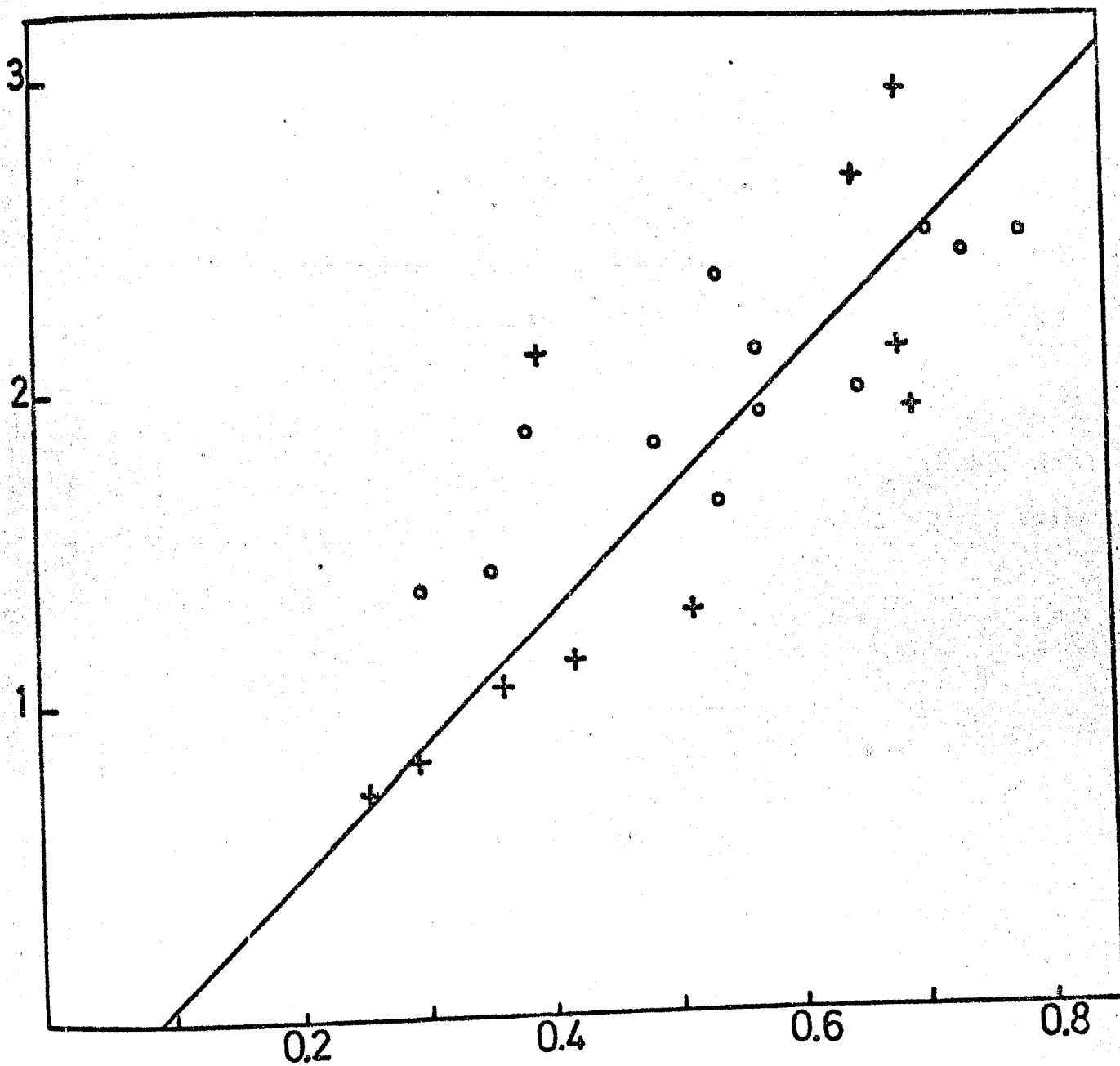
pidos, no se modifica al bajar 100 veces la concentración de fosfato en el medio de cultivo de la N. crassa. Shatkin y Tatum (1961) Han demostrado que el inositol, dado en concentración limitante para el crecimiento de una mutante auxótrofa al mismo, es incorporado casi cuantitativamente a fosfolípidos.

a.- Por NADH.- Para el caso del papel regulador de la actividad de nuestra enzima por el NADH in vivo, nos pareció en un principio mas adecuado referirnos a la influencia que pudiera tener la relación $NAD^+/NADH$ y no la concentración aislada del NADH. Holzer, Holzer y Schultz (1955); Holtzer, Schultz y Lynen (1956) y Bücher y Kleingenberg (1958) han demostrado que la relación sustrato oxidado/sustrato reducido multiplicado por la constante de equilibrio de la enzima correspondiente es igual a la relación $NAD^+/NADH$ libre (no unidos a proteína) presente en la fracción subcelular donde se localiza la deshidrogenasa con cuyos sustratos se esté trabajando. Al pretender aplicar tales conceptos a la Neurospora nos encontramos con que no posee deshidrogenasa láctica piridín nucleótido dependiente, que sería la enzima de elección para el estudio de la relación $NAD^+/NADH$ en el sobrenadante de 105,000 x g, lugar de localización de la glucocicloaldolasa. También se ensayó la actividad de la deshidrogenasa alcohólica y la alfa glicerofosfato deshidrogenasa, en ambas fue muy baja. Por lo tanto no se tuvo una enzima, presente en el sobrenadante de 105,000 x g, que tuviera una elevada actividad como deshidrogenasa piridín nucleótido dependiente y que permitiera obtener la relación $NAD^+/NADH$. Aunque se encuentra al margen de la presente tesis, es necesario hacer incapié en el desconocimiento del metabolismo de la Neurospora crassa en relación con la reoxidación del NADH localizado en la porción soluble de la célula.

Al no poderse determinar indirectamente los valores de la relación $NAD^+/NADH$ se realizó la determinación directa de los distintos piridín nucleótidos celulares y con la idea de modificar su relación oxidados/reducidos en el micelio de N. crassa se utilizó la mutante colonial 2 (col-2). En esta una mutante morfológica de N. crassa que ha sido estudiada y parcialmente caracterizada por Brody y Tatum (1966), en su opinión posee una mutación en un solo gene, el responsable de la formación de la glucosa-6-P dehidrogenasa. Nosotros al estudiar la mutante encontramos que presenta alteraciones discretas en los niveles de piridín nucleótidos oxidados y reducidos.

Los resultados los vemos en las figuras 27 y 28. En la figura 27 se ha trazado la gráfica de la poza de inositol contra la poza de NADH; en contra de lo que podría esperarse "a priori" se obtiene una relación directa, a mayor poza de inositol mas altos valores de la poza de NADH. Sin embargo, al graficarse en la figura 28, la poza de inositol contra la relación $NAD^+ + NADP^+ / NADH + NADPH$ que, como se sabe, da una idea mas real del potencial redox de la célula en el momento de su medición, notamos que la poza de inositol es menor al aumentar la proporción de piridín nucleótidos reducidos que actúan como inhibidores de la glucocicloaldolasa (se presentaron datos de la inhibición con el NADH, recientemente se ha encontrado que el NADPH también actúa como inhibidor de la enzima en estudio). En resumen, el potencial redox de la célula presenta una relación lineal directa con la poza de inositol, dato que junto con el anterior de la inhibición competitiva de la glucocicloaldolasa por el NADH nos permiten proponer que el potencial redox de la célula participa en la regulación de la biosíntesis del inositol in vivo.

b.- Por pirofosfato.- En relación con el pirofosfato



μ molas DPNH / g peso seco

- + 72 horas
- o 96 horas

FIGURA 27

Figura 27.- Correlación entre la poza de inositol y la de NADH. La determinación de ambos metabolitos se llevó a cabo en las mismas muestras y con los métodos descritos en la sección de material y métodos. La Neurospora, la cepa silvestre o la mutante col-2 se crecieron en medio mínimo, suplementado de sacarosa al 2 %, con agitación continua a 27 ° C durante el tiempo anotado en la gráfica.

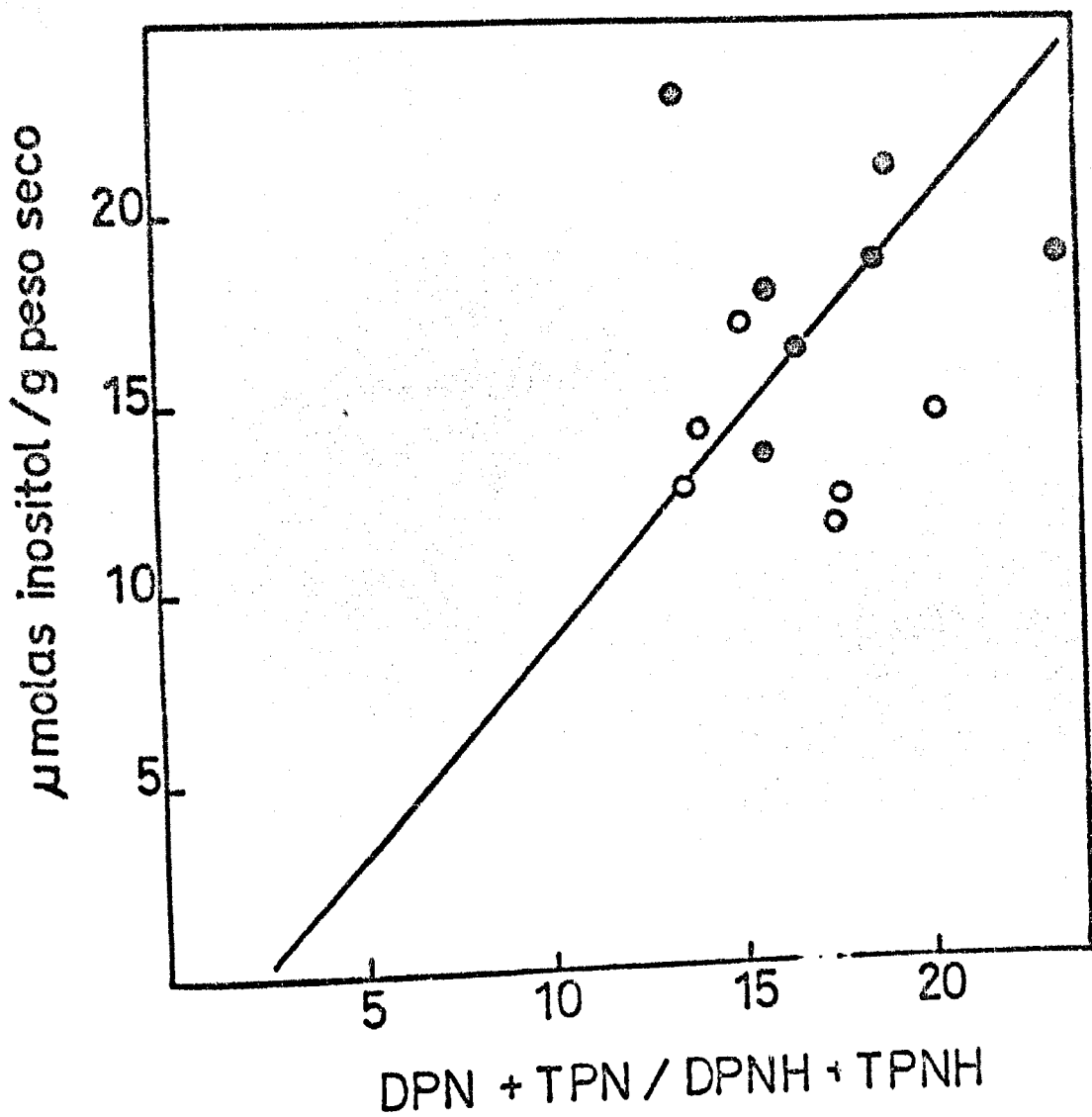


FIGURA 28

Figura 28.- Correlación entre la poza de inositol y el potencial redox de la célula. Los distintos metabolitos se determinaron como se indica en la sección de material y métodos. La Neurospora se manejó en la forma descrita al pie de la figura 27. Los círculos llenos se refieren a la cepa silvestre y los círculos vacíos a la mutante col-2.

recordemos que la constante de inhibición aparente frente a la glucocicloaldolasa es del orden de 10^{-6} M, mientras que la constante de Michaelis para la glucosa-6-P es del orden de 10^{-3} M.

Para variar la concentración intracelular de pirofosfato se hizo crecer la Neurospora en un medio con 1/100 de la concentración normal de fosfato inorgánico. Los resultados sobre varios parámetros seleccionados aparecen en la tabla 15. Al disminuir la concentración de fosfato en el medio de cultivo de la Neurospora el crecimiento disminuye un 45 % pero la poza de pirofosfato baja 4 veces mientras que la de glucosa-6-P solo decrece en un 29 %; ante estos cambios observamos que la poza de inositol sube, 35 %, y paradójicamente la actividad de la glucocicloaldolasa disminuye 2.7 veces. Aceptando que la actividad de la enzima in vitro, ensayada en condiciones óptimas, representa la "cantidad" de la enzima in vivo, entonces, una interpretación que está de acuerdo con los datos experimentales es la siguiente: con la concentración alta, la normal, de fósforo inorgánico, una mayor cantidad de enzima, al estar inhibida por el pirofosfato, nos da una poza menor de inositol, mientras que, al disminuir el pirofosfato, una menor cantidad de enzima, menos inhibida, produce una mayor poza de inositol.

Esta interpretación se ve apoyada por los datos de la figura 29 en que se tienen los valores de la poza de inositol contra la actividad de la glucocicloaldolasa; dan un coeficiente de correlación de 0.81 con una $p < 0.001$. La relación entre los dos parámetros escogidos es inversa, a menor poza de inositol se obtiene una más alta actividad de la enzima, cuantificada in vitro en condiciones óptimas, mismas en las que no ocurre la acumulación de pirofosfato; simultáneamente, los valores menores de actividad

TABLA 15

MODIFICACION DE VARIOS PARAMETROS AL CRECER NEUROSPORA CRASSA
 CON UNA CONCENTRACION LIMITANTE DE FOSFATO EN EL
 MEDIO.

Concentración de fosfato en el medio (mM)	36.8	0.368
Crecimiento (mg peso seco)	78.5	43.3
Poza de inositol (umolas/g de prot.)	8.90 ± .61 (9)	12.00 ± .44 (10)
Actividad de la glucocicloaldolasa (umolas/g de prot/hora)	4.36 ± .67 (9)	1.60 ± .08 (9)
Poza de Gluc-6-P (umolas/g de peso seco)	2.14 ± .05 (8)	1.52 ± .10 (12)
Poza de pirofosfato (umolas/g de peso seco)	6.08 ± 1.08 (8)	1.49 ± .31 (5)

El micelio crecido durante 48 horas con agitación continua en medio mínimo suplementado de sacarosa al 2 % y con las concentraciones de fosfato indicadas en la tabla se cosechó por filtración y succión. Se usaron muestras diferentes para cuantificar los distintos parámetros anotados. Para medir la actividad de la glucocicloaldolasa el micelio se homogenizó en un homogenizador de tipo Potter-Elvehjem con Tris 0.1 M pH 7.7; se centrifugó a 10,000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se usó para la determinación de proteína y como fuente de enzima que se ensayó en las condiciones descritas en material y métodos. La mezcla de incubación con enzima en que la actividad se para al tiempo 0, por calentamiento en baño de agua a ebullición, se usó para cuantificar la poza metabólica de inositol. Para las determinaciones de glucosa-6-P y pirofosfato el micelio se homogenizó rápidamente en frío con ácido perclórico 0.6 N en un Ultra-Turrax y se procedió tal como se indicó en material y métodos. Los resultados se dan en promedio ± error estándar; entre paréntesis está el número de determinaciones. En todos los casos las diferencias entre las dos concentraciones de fosfato dieron una $p < .001$.

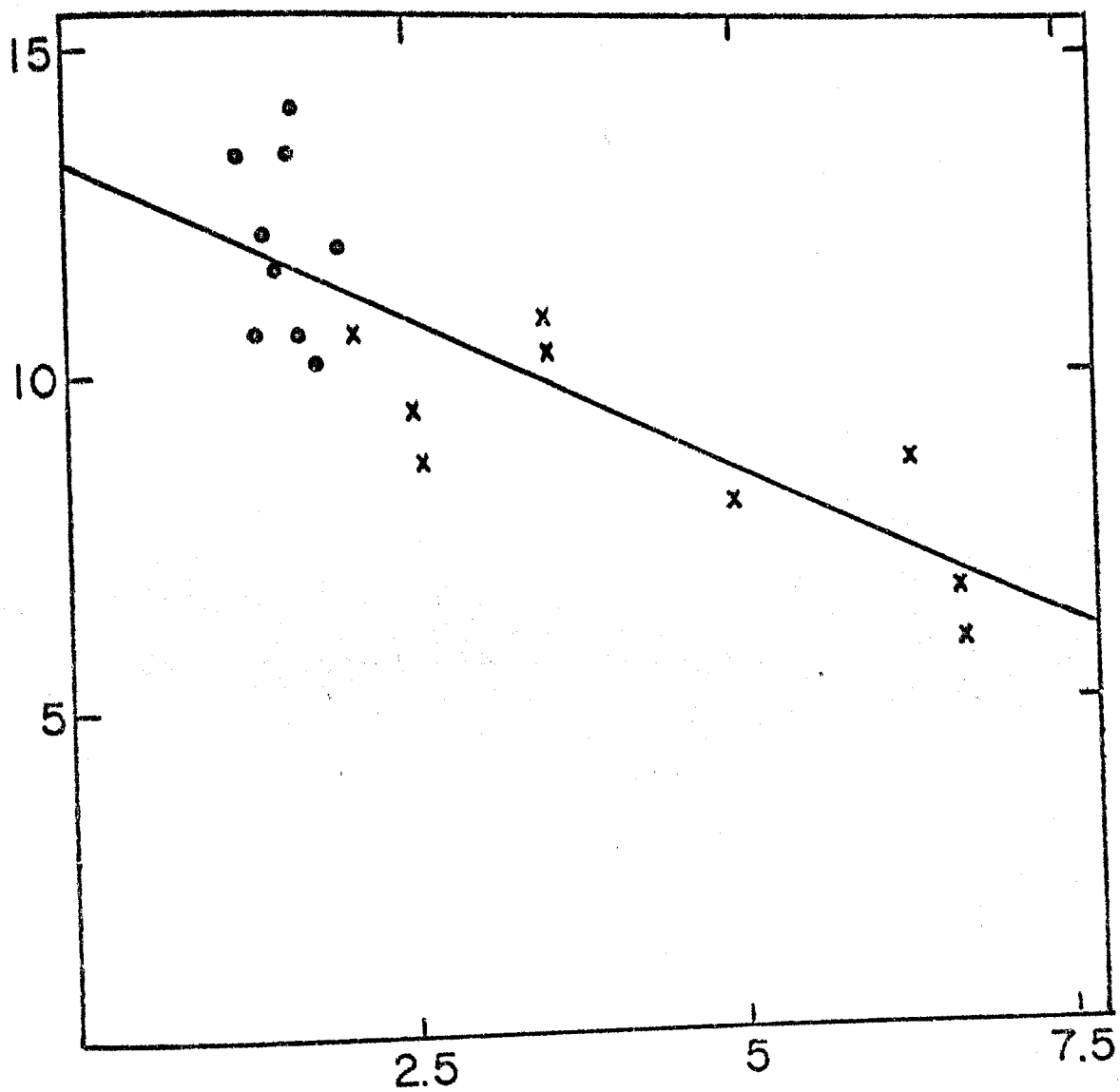


Figura 29.- Correlación entre los niveles basales de inositol y la actividad de la glucocicloaldolasa en preparaciones de N. crassa crecida a dos niveles de concentración de fosfato en el medio de cultivo: "(•) concentración normal y (x) 1/100 de la concentración normal. Cuando los fosfatos eliminados del medio se sustituyen por una cantidad equimolecular de KCl se obtienen idénticos resultados. Los datos presentados en la figura corresponden a las determinaciones individuales de los promedios anotados en la tabla 15.

de la glucocicloaldolosa se registraron cuando la poza de inositol existente fue mayor.

RESUMEN .
Y
CONCLUSIONES .

El mio inositol es el mas abundante de los inositoles en la naturaleza y se encuentra distribuido en forma casi universal. En las células que lo poseen existe tanto en su forma libre como constituyendo parte de varias moléculas de interés fisiológico como la fitina, el fosfatidilinositol, los polifosfoinosítidos, etc. El mio inositol participa en varias vías metabólicas que se han resumido en la figura 4. Aunque no se sabe con certeza el (los) papel (es) fisiológico (s) del mio inositol se le ha relacionado con los siguientes aspectos: factor de crecimiento en algunos microorganismos, vitamina, agente lipotrópico, utilización y transporte de aminoácidos, síntesis de nucleótidos, transporte de cationes, secreción glandular, transmisión nerviosa, contracción mitocondrial, estabilización de macromoléculas, etc.

En éste trabajo se demuestra que el mio inositol se sintetiza en Neurospora crassa por una sola enzima, la glucocicloaldolasa, que lo forma a partir de la glucosa-6-fosfato.

La enzima se purificó parcialmente y posee la siguientes características: absoluta dependencia por NAD^+ que no se pudo detectar en forma reducida en el curso de la reacción; pH óptimo de 7.7; linealidad en su actividad con la concentración de proteína; linealidad en su actividad con el tiempo hasta por 4 horas; es activada 4 veces por el NH_4 ; la energía de activación es de 14,000 calorías $\times \text{mol}^{-1}$; la constante de Michaelis aparente para la glucosa-6-fosfato es de 1.9 mM y para el NAD^+ es de

2.3×10^{-6} M; posee un peso molecular aproximado de 150,000; no actúa sobre los siguientes compuestos galactosa-6-fosfato, manosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato ácido 6-fosfogluconico, glucosona-6 fosfato, 2-ceto inososa fosforilada, glucosa, glucosona, 2 ceto inososa y 4 ceto inososa; entre los inhibidores ensayados sobresalen el NADH, inhibidor competitivo del NAD^+ con una constante de inhibición aparente de 4.0×10^{-6} M y el pirofosfato, inhibidor competitivo de la glucosa-6-fosfato con una constante de inhibición aparente de 1,1 a 4.5×10^{-6} M; no es posible aislar intermediarios de la reacción que parece llevarse a cabo por una ciclización directa por medio de una condensación de tipo aldólico.

La enzima está localizada en el sobrenadante después de sedimentar los microsomas a 105,000 x gravedad. Los datos experimentales demuestran que in vivo la regulación de la actividad de la glucocicloaldolasa está influida por el potencial redox de la célula (relación $\text{NAD}^+ + \text{NADP}^+ / \text{NADH} + \text{NADPH}$) así como por la concentración de pirofosfato localizado en el micelio de la Neurospora: una mas alta relación $\text{NAD}^+ + \text{NADP}^+ / \text{NADH} + \text{NADPH}$ nos muestra una mayor poza de inositol que también se detecta al provocar una disminución en la poza de pirofosfato.

REFERENCIAS .

- Anderson R. J. (1915) J. Biol. Chem. 20; 475.
- Anderson R. J., Lothrop W. C. y Creighton M. M. (1938) J. Biol. Chem. 125; 299.
- Angyal S. J. y Anderson L. (1959) Advances in Carbohydrate Chem. 14; 135.
- Angyal S. J. y Mills J. A. (1952) Revs. Pure and Appl. Chem. 2; 105.
- Angyal S. J. y Russell A. F. (1968) Aust. J. Chem. 21; 383.
- Ansell G. B. y Hawthorne J. N. (1964) Phospholipids. Chemistry, Metabolism and Function. B. B. A. Library. Volumen 3. Elsevier Publishing Company. Amsterdam,
- Asada K., Tanaka K. y Kasai Z. (1969) Proc. N. Y. Acad. Sci. En prensa.
- Ballou C. E. y Lee Y. C. (1966) en Cyclitols and Phosphoinositides editado por H. Kindl. Pergamon Press. Oxford. p. 41.
- Bandursky R. S., Ueda M y Nichols P. B. (1969) Proc. N. Y. Acad. Sci. En prensa.
- Barnett J. E. G. y Corina D. L. (1968) Biochem J. 108; 125.
- Bayne S. (1963) en Methods in Carbohydrate Chemistry. Vol. 2. Editado por R. L. Whistler y M. L. Wolfrom. Academic Press Inc. New York. p. 421.
- Beadle G. W. (1944) J. Biol. Chem. 156; 683.
- Berman T. y Magasanik B. (1966) J. Biol. Chem. 241; 800.
- Best C. H., Lucas C. C., Patterson J. M. y Ridout J. H. (1951) Biochem J. 48; 448 y 452.
- Biswas S. y Biswas B. B. (1965) Biochim. Biophys. Acta 108; 710.

- Bright H. J. y Gibson Q. H. (1967) *J. Biol. Chem.* 242; 994.
- Bücher Th., Czok R., Lamprecht W. y Lutzko E. (1965) en *Methods of Enzymatic Analysis*. Editado por H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinheim. 2a edición. p. 253.
- Bücher Th. y Klingenberg M. (1958) *Angew. Chem.* 70; 552.
- Charalampous F. C. (1959) *J. Biol. Chem.* 234; 220.
- Charalampous F. C. y Chen I. W. (1966) en *Methods in Enzymology*. Volumen IX. Editado por W. A. Wood. Academic Press. New York. p. 698.
- Chen I. W. y Charalampous F. C. (1964) *J. Biol. Chem.* 239; 1905.
- Chen I. W. y Charalampous F. C. (1965) *J. Biol. Chem.* 240; 3507.
- Chen I. W. y Charalampous F. C. (1966) *Arch. Biochem Biophys.* 118; 332.
- Chen I. W. y Charalampous F. C. (1967) *Biochim. Biophys Acta* 136; 568.
- Daughaday W. H., Larner J. y Houghton E. (1954) *J. Clin. Invest.* 33; 326 y 1057.
- Dawson R. M. C. (1966) en *Cyclitols and Phosphoinositides*. Editado por H. Kindl. Pergamon Press. Oxford. p. 57.
- Dawson R. M. C. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- Dixon M. y Webb E. C. (1964) *Enzymes*. Academic Press. New York.
- Durell J. y Garland J. T. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- Eastcott E. V. (1928) *J. Phys. Chem.* 32; 1094.
- Eisenberg F. y Bolden A. H. (1963) *Biochem. Biophys. res. Comm.* 12; 72.
- Eisenberg F. y Bolden A. H. (1964) *Nature* 202; 599.
- Eisenberg F. (1967) *J. Biol. Chem.* 242; 1375.
- Eisenberg F. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- Fletcher H. G. Jr., Anderson L. y Lardy H. A. (1951) *J. Org. Chem.*

- Polch P. J. (1949) *J. Biol. Chem.* 177; 505.
- Fuller R. C. y Tutum E. L. (1956) *Am J. Botany* 43; 361.
- Garen A. y Levinthal C. (1960) *Biochim. Biophys Acta* 38; 470.
- Garnjobst L. y Wilson J. P. (1956) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 42; 613.
- Gavin G. y McHenry E. W. (1941) *J. Biol. Chem.* 139; 485.
- Goldfine H. (1968) *Ann. Rev. Biochem.* 37; 303.
- Cornal A. G., Bardawill C. S. y David M. M. (1949) *J. Biol. Chem.* 177; 751.
- Hanahan D. J. y Brockerhoff H. (1965) en *Comprehensive Biochemistry* Vol. 6. Editado por M. Florkin y E. H. Stotz. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. p. 107.
- Harper A. E. (1965) en *Methods of Enzymatic Analysis*. Editado por H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinheim. 2a edición. p. 788.
- Hoffmann-Ostenhof O., Junjwirt C. y Dawid I. B. (1958) *Naturwissenschaften* 45; 265.
- Hoffmann-Ostenhof O. (1966) en *Cyclitols and Phosphoinositides*. Editado por H. Kindl. Pergamon Press. Oxford. p. 23.
- Hoffmann-Ostenhof O. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- Hohorst H. J. (1965 a) En *Methods of Enzymatic Analysis*. Editado por H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinheim. 2a edición p. 266.
- Hohorst H. J. (1965 b) En *Methods of Enzymatic Analysis*. Editado por H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinheim. 2a edición. p. 134.
- Hokin L. E. y Hokin M. R. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 84; 563.
- Hokin L. E. (1968) *Int. Rev. Cytol.* 23; 187.
- Hokin L. E. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- Holzer H., Holzer E. y Schultz G. (1955) *Biochem Z.* 326; 385.

- Holzer H., Schultz G. y Lynen F. (1956) *Biochem Z.* 328; 252.
- Hornstein I. (1955) *Science* 121; 206.
- Howard C. F. Jr. y Anderson L. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 118; 332.
- Jenks W. P. (1962) En *Methods in Enzymology*. Volumen V. Editado por S. P. Colowick y N. O. Kaplan. Academic Press. New York. p. 467.
- Kai M. y Hawthorne J. R. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- Kennedy E. P. (1961) *Fed Proc.* 20; 934.
- Kindl H., Biedl-Neubacher J. y Hoffmann-Ostenhof O. (1965) *Biochem Z.* 341; 157.
- Kindl H. (1966) en *Cyclitols and Phosphoinositides*. Editado por H. Kindl. Pergamon Press. Oxford. p. 15.
- Kindl H. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- King T. E. (1967) En *Methods in Enzymology*. Vol. X. Editado por R. W. Estabrook y M. E. Pullman. Academic Press. New York. p. 324.
- Larner J., Jackson W. T., Graves D. J. y Stamer J. R. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* 60; 352.
- Lembach K. y Charalampous F. C. (1966) *J. Biol. Chem.* 241; 395.
- Lembach K. y Charalampous F. C. (1967 a) *J. Biol. Chem.* 242; 2599.
- Lembach K. y Charalampous F. C. (1967 b) *J. Biol. Chem.* 242; 2606.
- Loewus F. A., Kelly S. y Neufeld E. F. (1962) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 48; 421.
- Loewus F. A. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 105; 590.
- Loewus F. A. (1965) *Fed. Proc.* 24; 855.
- Loewus F. A. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- Lohmar R. L. (1957) en *The Carbohydrates*. Editado por W. Pigman. Academic Press. New York. p. 268.

- Löhr G. W. y Waller H. D. (1965) En *Methods of Enzymatic Analysis*. Editado por H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinheim. 2a Edición. p. 744.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193; 265.
- Mackler B. (1967) En *Methods in Enzymology*. Vol. X. Editado por R. W. Estabrook y M. E. Pullman. Academic Press. New York. p. 261.
- Magasanik B., Franzl R. E. y Chargaff E. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* 74; 2618.
- Mahler H. R. y Douglas J. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79; 1159.
- Mann T. (1954) *Proc. Roy. Soc. B.* 142; 21.
- Martin R. G. y Ames B. N. (1961) *J. Biol. Chem.* 236; 1372.
- McCormick M. H., Harris P. N. y Anderson C. A. (1954) *J. Nutrition.* 52; 337.
- Metzenberg R. L. y Parson J. W. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 55; 629.
- Morton R. K. y Raison J. K. (1963) *Nature* 200; 429.
- Piña E. y Tatum E. L. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 136; 265.
- Piña E., Saldaña Y., Brunner A. y Chagoya V. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- Posternak T. (1954) *Biochem Prepn.* 2; 57.
- Posternak T., Schopfer W. H., Kaufmann-Boetsch B. y Edwards S. (1963) *Helv. Chim Acta* 46; 2676.
- Rapport M. M. y Norton W. T. (1962) *Ann. Rev. Biochem.* 31; 122.
- Reid M. E. (1954) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85; 547.
- Roberts R. M., Shah R. y Loewus F. A. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 119; 590.
- Rose I. A. (1961) *J. Biol. Chem.* 236; 603.

- Salas M., Viñuela E. y Sols A. (1965) *J. Biol. Chem.* 240; 561.
- Schere J. (1850) *Ann.* 73; 322.
- Schneider W. C. (1945) *J. Biol. Chem.* 161; 293.
- Shatkin A. J. y Tatum E. L. (1961) *Am J. Bot.* 48; 760.
- Sherman R. W. Stewart M. A., Simpson P. C. y Goodwin S. L. (1968) *Biochemistry* 7; 819.
- Shopfer W. H. (1951) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33; 1113.
- Slein M. W. (1965) En *Methods of Enzymatic Analysis*. Editado por H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinheim. 2a Edición. p. 117.
- Sols A., de la Fuente G., Villar-Palasi C. y Asensio C. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* 30; 92.
- Sumner J. B. (1944) *Science* 100; 413.
- Tanner W. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.
- Tatum E. L., Barratt R. W., Fries K. y Bonner D. (1950) *Am J. Bot.* 37; 38.
- Topper Y. J. (1957) *J. Biol. Chem.* 225; 417.
- Teukagoshi S., Lembach K. y Charalampous F. C. (1966) *J. Biol. Chem.* 241; 388.
- Vignais P. M., Vignais A. L. y Lehninger A. L. (1964) *J. Biol. Chem.* 239; 2002 y 2011.
- Vignais P. Y. y Vignais P. M. (1966) En *Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria*. Editado por J. M. Quagliariello y E. C. Slater. Elsevier Publishing Company. Amsterdam. p. 368.
- Vogel H. J. (1956) *Microbial Genet. Bull.* 13; 42.
- Vohl H. (1858) *Arch. Physiol. Heilk.* 17; 410.
- Walker J. B. y Walker M. S. (1967 b) *Biochem. Biophys Res. Comm.* 26; 278.
- Walker M. S. y Walker J. B. (1967 a) *Biochim. Biophys. Acta* 136; 272.
- Walker J. B. (1969) *Proc. N. Y. Acad. Sci.* En prensa.

- Webb J. M. y Levy H. B. (1955) J. Biol. Chem. 213; 107.
- Webb S. J. (1960) Canad. J. Microbiol. 6; 89.
- Webb S. J. (1961) Canad. J. Microbiol. 7; 621.
- Webb S. J. (1963) Canad. J. Biochem Physiol. 41; 868.
- Webb S. J., Bather R. y Hodges R. (1963) Canad. J. Microbiol. 9; 87.
- Webb S. J., Cormack D. V. y Morrison H. G. (1964) Nature 201; 1103.
- Woolley D. W. (1941) J. Biol. Chem. 139; 29.
- Woolley D. W. (1942) J. Exptl. Med. 75; 277.
- Brody S. y Tatum E. I. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. 56; 1290.
- Klingerberg M. (1965) En Methods of Enzymatic Analysis. Editado por H. U. Bergmeyer. Verlag Chemie, Weinheim. 2a Edición. páginas 529, 531, 535 y 537.