



21.182
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**AVANCES EN LA PURIFICACION DE LA DESCARBOXILASA
GLUTAMICA DE CEREBRO DE RATON**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O**

P R E S E N T A:

Martha Luz Ustarroz Cano

MEXICO, D. F.

1981



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.

I N D I C E

	PAGINA
Introducción	1
Materiales y Métodos	13
Resultados	25
Conclusiones	59
Bibliografía	67

AVANCES EN LA PURIFICACION DE LA DESCARBOXILASA GLUTAMICA DE CEREBRO DE RATON.

El ácido γ aminobutírico (GABA), es en la actualidad considerado como el principal neurotransmisor - - inhibidor en el sistema nervioso tanto de los invertebrados como de los vertebrados (8,44), y su participación en la regulación de prácticamente todas las funciones del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos, ya directamente o a través de su influencia sobre otros sistemas de neurotransmisores, es un hecho bien conocido.

El GABA, que ha sido encontrado casi exclusivamente en el SNC, es sintetizado por acción de la descarboxilasa glutámica (GAD) y degradado a través de las actividades sucesivas de la GABA transaminasa (GABA-T) y la deshidrogenasa del semialdehído succínico (SSA-DH).

Biosíntesis del GABA.

Como puede observarse en la figura 1, el GABA - es sintetizado por acción de la GAD a través de la α descarboxilación del ácido glutámico (41). Evidencias experimentales indican que esta enzima puede existir en más de una forma molecular. Así, en extractos crudos - de cerebro ha sido posible separar por cromatografía de filtración dos formas de GAD que aunque presentan propiedades cinéticas e inmunoquímicas iguales, difieren - en peso molecular (54,57). La primera forma posee un - peso molecular elevado y aparece en el volumen de exclu

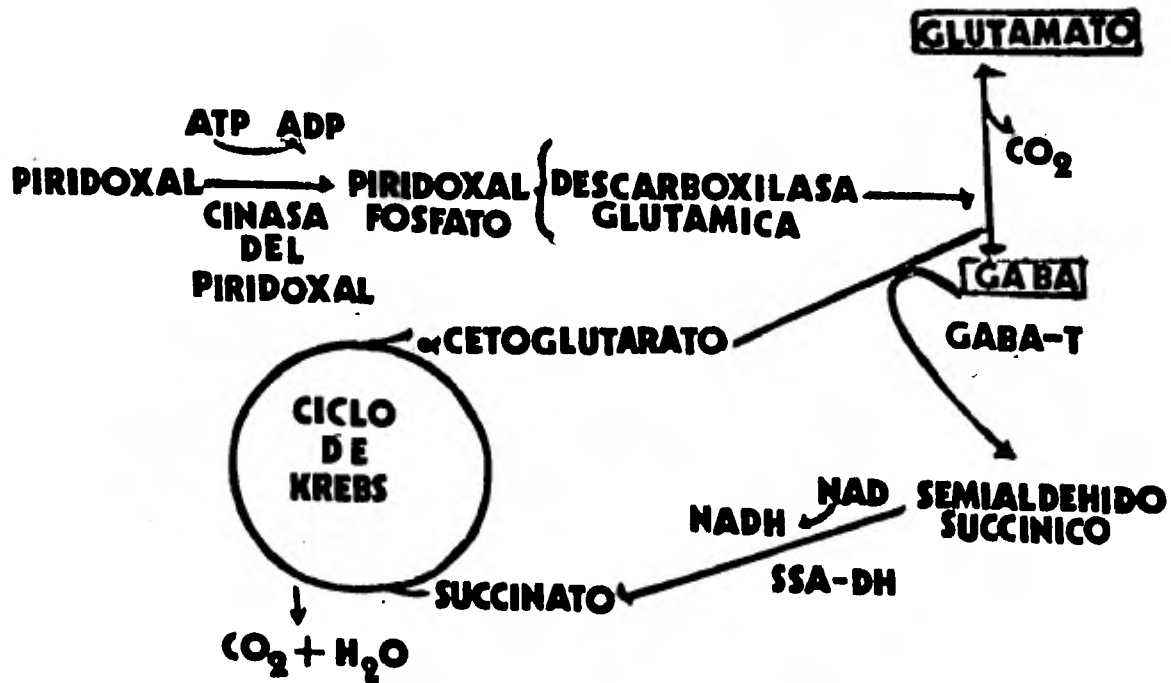


FIGURA 1
METABOLISMO DEL GABA EN EL SNC DE LOS MAMIFEROS.

si3n de columnas de filtraci3n, tales como Sephadex - - G-200, Bio-Gel 1.5 m y Ultrogel AcA-34, en tanto que la segunda forma es incluida en dichas columnas y posee un peso molecular de 85,000. Por otro lado los estudios - realizados en ratones durante su desarrollo (51-53), -- han mostrado que la GAD de los animales reci3n nacidos difiere de la de los adultos en varios aspectos, tales como su poca estabilidad bajo ciertas condiciones experimentales que incluyen la preincubaci3n a 37°C, la cen trifugaci3n, su solubilizaci3n mediante homogeneizaci3n en un medio hipot3nico o con triti3n X-100, as3 como su poca activaci3n por su cofactor, el fosfato de pirido-- xal (PALP). En base a estos resultados, se ha concluido que la GAD de los cerebros de ratones reci3n nacidos, es distinta de la que se entra en los cerebros adultos y que es sustituida por esta 3ltima durante la madura-- ci3n del cerebro. Finalmente es importante se3alar que en base a la interacci3n de la GAD con sustancias atrapadoras de grupos carbonilos o con aniones tales como - el $CL^{(-)}$, se ha sugerido (13,20-23), la existencia en los animales adultos de dos formas distintas de GAD denominadas GAD I y GAD II, sin embargo este punto se - encuentra en controversia (30).

El PALP que como se muestra en la Fig. 1 es el cofactor de la GAD y es esencial para su regulaci3n, se sintetiza a partir del piridoxal y ATP en una reacci3n catalizada por la enzima cinasa del piridoxal (31). Desde un punto de vista cin3tico (56), se ha encontrado -- que el pH 3ptimo para la actividad de la GAD, es cercano a 7.0 y que muestra un alto grado de especificidad por su sustrato, pues de numerosos posibles sustratos proba

dos, unicamente el L-aspartato fué descarboxilado, aunque en una proporción muy poco significativa. La actividad de la GAD es muy sensible a la oxidación, habiéndose reportado que incluso el oxígeno atmosférico es capaz de inhibir su actividad. Por otro lado protectores de grupos sulfhidrilos (-SH), tales como el ditioneitol y el bromuro de etil-isoturonio (AET) son capaces de proteger considerablemente su actividad, sugiriendo la existencia de grupos -SH en o cerca del sitio activo de la GAD. En apoyo de lo anterior, es interesante señalar que bloqueadores de grupos -SH, tales como el ácido 2,4 dinitrobenzoico o el α cloromeroburibenzoato inhiben competitivamente la actividad de la enzima. La actividad de la GAD es inhibida por una gran cantidad de sustancias químicas: los aniones inorgánicos del tipo del $\text{Cl}^{(-)}$, algunos cationes divalentes como el Zn^{2+} , atrapadores de grupos carbonilos, tales como el ácido amino-oxi-acético (AOA), varios metabolitos, intermedios de la glicólisis o del ciclo de Krebs (56).

Dentro de los agentes que pudieran regular la actividad de la GAD in vivo, el PALP parece ser uno de los mejores candidatos, pues cuando su concentración -- disminuye por efecto de la administración de drogas que interfieren con su producción o por deficiencias alimenticias de piridoxal, se han reportado (35,55), una disminución en la actividad de la GAD y la aparición correlativa de convulsiones. En base a estudios cinéticos (6,7,49), se ha postulado la presencia de al menos dos sitios de unión para el PALP. De acuerdo con estos estudios el PALP se uniría a estos sitios con diferente afinidad, pues en tanto que el PALP no se disociaría de

uno de ellos se estaría recambiando continuamente del - otro en un equilibrio que dependería de la concentra--- ción del PALP libre. La actividad de la GAD, entonces, sería notablemente modulada in vivo por la concentra--- ción de PALP libre que existiera en su vecindad. En co nexión con lo anterior, es interesante que algunos meta les pesados sean potentes inhibidores de la cinasa del piridoxal, ya que abre la posibilidad a que algunos de ellos tales como el Zn^{2+} , pudieran ser importantes en - la regulación de los niveles de GABA en las neuronas ga baérgicas.

Finalmente, es importante señalar que aunque el GABA pudiera ser sintetizado por otras enzimas a partir de sustratos tales como el hidroxibutirato (12), la pu trescina (26), o alguna poliamina (3,33), los estudios en relación a esto, han mostrado que estas posibilida-- des teóricas son más bien escasas, aceptándose en la ac tualidad en forma casi unánime, a la \searrow descarboxilila--- ción del ácido glutámico como la vfa primordial en la - biosíntesis del GABA.

Degradación del GABA.

Como se muestra en la Fig. 1, el GABA es metabo lizado a bióxido de carbono y agua vfa ciclo de Krebs, - después de su transformación en ácido succínico por la acción conjunta de la GABA-T y de la SSA-DH.

La GABA-T ha sido purificada hasta la homogenei dad (56), posee un peso molecular de 109,000 y requiere al igual que la GAD al PALP como su coenzima, aunque a

diferencia de lo que ocurre con la GAD, el PALP parece unirse estrechamente a un solo sitio en la GABA-T. La GABA-T muestra un requerimiento absoluto por el α ceto glutarato y una notable especificidad por el GABA (56). El semialdehído succínico producido por la GABA-T, es oxidado a ácido succínico por la acción de la SSA-DH. En virtud de que la constante de equilibrio de la reacción catalizada por la GABA-T es cercana a uno, la deshidrogenación del semialdehído succínico es el paso limitante en el catabolismo del GABA. Dado que para que la deshidrogenación del semialdehído succínico ocurra, se requiere de NAD, la oxigenación del tejido es un factor de primera importancia en la degradación del GABA, siendo bien conocido el hecho de que la anaerobiosis -- que ocurre a la muerte de un animal, es la responsable de la elevación de los niveles de GABA que se observa en el cerebro en condiciones post mortem (34).

Localización anatómica del sistema del GABA.

Aunque existen pequeñas cantidades del GABA y de la GAD, en algunos tejidos periféricos tales como el riñón y el hígado (23,59), la mayor parte del GABA y de la GAD se encuentran localizados en el SNC. Los numerosos estudios bioquímicos del sistema del GABA realizados en diversas especies de mamíferos (8,47), muestran un estrecho paralelismo entre la distribución del GABA y de la GAD en varias regiones del SNC, no habiéndose encontrado tal situación entre la distribución del GABA y la de sus enzimas degradativas (2.9.14.28.32.46.47). En tales estudios tanto el GABA como la GAD se han en--

contrado más concentrados en regiones tales, como la -
substancia nigra y el globus pallidus, existiendo una
concentración intermedia en el núcleo caudado, el hipo-
tálamo y en regiones del telencéfalo atravesadas por -
el fascículo medio del cerebro anterior. (18). Numero-
sas evidencias experimentales de diverso tipo muestran
que la GAD se encuentra localizada en las neuronas y -
preferentemente dentro de sus terminales nerviosas - -
(16,17,27), en donde sintetizaría al GABA que sería li-
berado al espacio sináptico. Más aún los estudios de
distribución celular realizados señalan que la GAD se
encuentra soluble en el sinaptoplasma de los sinaptoso-
mas, aunque pequeñas cantidades de ella podrían estar
contenidas dentro de las mitocondrias (15,45,60). El
hecho de que el Ca^{2+} favorezca la unión de la GAD a -
la membrana sináptica sugiere la posibilidad de que la
síntesis de GABA y su liberación al espacio sináptico
sea un fenómeno desencadenado para la entrada del Ca^{2+}
a las terminales nerviosas durante su depolarización -
(50).

Papel fisiológico del GABA.

Aunque la producción del GABA por acción de la
GAD puede tener una participación importante en el me-
tabolismo intermedio, como vfa colateral para la oxida-
ción del ácido glutámico, y por consiguiente para la -
obtención de energía, los estudios cuantitativos reali-
zados, indican que el flujo del glutamato a través de
esta vfa colateral, llegaría apenas a ser del 8% a los
sumo (24,34). Por el contrario, estudios de diversa -
índole apoyan fuertemente la participación del GABA en

la fisiología del SNC como un neurotransmisor de carácter inhibitor. En apoyo de lo anterior, cabe mencionar que se ha encontrado que la aplicación iontoforética -- del GABA a neuronas de diverso tipo es seguida de la -- aparición de potenciales inhibitorios postsinápticos en todo similar a los obtenidos después de la estimulación de diversos circuitos nerviosos inhibitorios (48). Más aún la aplicación previa de drogas tales como la picrotoxina o la bicuculina, que son capaces de impedir la -- aparición de los potenciales inhibitorios postsinápticos, se consideran como antagonistas del GABA (48). En sistemas neuronales tales como el del acocil o de la -- langosta, el GABA se encuentra localizado exclusivamente en neuronas inhibitorias de donde es liberado por estimulación eléctrica; una situación similar se ha encontrado en el SNC de los mamíferos, en donde dicho neurotransmisor y su enzima sintetizante, se han localizado en terminales nerviosas pertenecientes a neuronas inhibitorias tales como las de las células de Purkinje o en terminales de diverso tipo celular que en el cerebelo -- se han identificado como inhibitorias, tales como las -- células en canasta, las células estelares o las células Golgi (5,3B). De la misma manera que en los invertebrados, el GABA es liberado al líquido cefalorraquídeo, -- tras la estimulación de varias áreas del cerebelo (48).

Hay evidencias que indican que el ácido glutámico que originará al GABA, se encuentra compartimentalizado (4,10), dicha compartimentalización implica la -- existencia de dos principales compartimientos de glutamato relativamente independientes: uno grande localizado en las terminales nerviosas y otro pequeño, localizado en la glía. De acuerdo con este modelo, el GABA sin

tetizado en el compartimento grande de glutamato (terminales nerviosas), se liberaría como neurotransmisor. -- Del espacio sináptico el GABA liberado sería tomado por las células gliales que lo degradarían a bióxido de carbono y agua (Fig. 1). Durante esta degradación la transaminación del GABA con el α cetoglutarato daría lugar a una cantidad equivalente de glutamato, que sería transformado en glutamina. La glutamina así producida dejaría el compartimento glial y pasaría al sinaptosomal en donde sería transformada en el glutamato que utilizaría la GAD para producir nuevamente GABA.

Las evidencias experimentales señalan que el GABA producido en las terminales nerviosas, más que ser almacenado en vesículas como sucede con otros neurotransmisores, es liberado en una forma dependiente de Ca^{2+} (50), para ir a ejercer sus acciones inhibitorias tanto en forma tónica como fásica, dependiendo del tipo de sistema neuronal involucrado. En apoyo a este idea destaca el hecho de que cualquier interferencia significativa -- con la actividad de la GAD y por consiguiente con la producción del GABA, dá lugar a la aparición de profundas alteraciones funcionales entre las que destacan la aparición de convulsiones (35). El GABA liberado por la depolarización de las terminales gabaérgicas, interactuaría con sus receptores específicos localizados en la membrana postsináptica, provocando cambios conformacionales en -- ella, responsables de un incremento en la conductancia -- al Cl^{-} que a su vez, condicionaría la hiperpolarización responsable de los efectos inhibitorios del GABA -- (48). La acción del GABA sería probablemente finalizada por su unión dependiente de Na^{+} a membranas celulares,

seguida de su transporte a sitios intracelulares, tales como la neurona postsináptica, la propia terminal presináptica, o como ya ha sido indicado a las células gliales vecinas.

Papel del GABA en la patología del SNC.

Dada la amplia distribución que tienen los sistemas gabaérgicos en el SNC (véase distribución anatómica del GABA) y debido a la enorme importancia que se le concede a los fenómenos inhibitorios dentro de la fisiología del SNC, no es de extrañar que cualquier interferencia con el funcionamiento de los sistemas gabaérgicos resulte de una alteración profunda del funcionamiento normal del SNC. Aunque se piensa que mecanismos gabaérgicos defectuosos pudieran estar implicados en la fisiopatología de numerosas enfermedades, la participación de este sistema se ha sugerido solidamente sobre bases experimentales, en sólo algunas de ellas, tales como, la epilepsia, la Corea de Huntington, la Enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia (19,25,37, 39,43).

En relación con la producción de convulsiones, dos líneas paralelas de investigación apoyan la existencia de un posible desarreglo en el funcionamiento de los sistemas gabaérgicos. La primera línea experimental se refiere a los efectos convulsivantes de drogas atrapadoras de grupos carbonilos tales como la hidrazina (8,35,55), la otra línea se basa en la presencia de convulsiones inducidas por deficiencias dietéticas en piridoxina, que como ya se mencionó es la pre-

cursora del PALP (55). En ambos casos, el común denominador es una disminución en la concentración del PALP, seguida de una disminución en la síntesis del GABA - - (35,50). En la enfermedad de Parkinson además del ya bien conocido decremento en los niveles de dopamina y de sus enzimas sintetizantes en el núcleo caudado, la sustancia nigra y el globus pallidus (25), se ha encontrado una disminución en la actividad de la GAD y un decremento en los niveles del GABA en las mismas regiones (25,43). Dadas las importantes relaciones funcionales existentes entre estos dos sistemas (1g), una alteración en el balance entre ellos y probablemente con ---- otros sistemas tales como el colinérgico (37), se han implicado en la fisiopatología de este padecimiento. De manera similar y también dentro del área motora, la disminución de la GAD, así como de los niveles del GABA en diversas regiones del SNC, se ha implicado en la etiología de la Corea de Huntington (39). Finalmente las evidencias farmacológicas sugieren que una disminución del control gabaérgico sobre ciertos sistemas dopaminérgicos, podría ser la responsable de la hiperfunción dopaminérgica que se observa en los pacientes esquizofrénicos, sugiriendo así la posible existencia de mecanismos gabaérgicos defectuosos en la esquizofrenia (19,43).

Objetivos del presente trabajo.

Dado que el sistema gabaérgico juega un papel fundamental en la fisiología del SNC y de que la actividad de las neuronas gabaérgicas, depende en forma fundamental de una síntesis continua de su neurotransmisor y por ende de la actividad de la GAD, el estudio de las propiedades, regulación y localización de esta enzima,

resulta en extremo importante para el entendimiento de la fisiología del SNC. En virtud de que dicho estudio se facilitaría considerablemente si se contara con anticuerpos dirigidos contra ella y debido a que a la fecha no existen métodos reproducibles para la obtención de GAD purificada que pueda usarse como antígeno, se decidió intentar estudiar condiciones que permitieran estabilizar la actividad de la GAD y elaborar un esquema reproducible de purificación que permitiera obtener cantidades suficientes de enzima para ser usadas como antígenos en la producción de anticuerpos. En el presente trabajo se reportan algunos de los esfuerzos realizados con este propósito.

MATERIALES Y METODOS

Medición de la actividad de la GAD.

La actividad de la GAD en todos los casos, con excepción de las mediciones en gel, se evaluó mediante el uso de un método radiométrico que permite cuantificar el $^{14}\text{CO}_2$ proveniente de la descarboxilación del --DL 1 $^{14}\text{CO}_2$ glutamato. La mezcla de incubación fué similar en composición y concentración a la descrita por Pérez de la Mora *et. al.*, pero utilizando 1/10 de su volumen. El aditamento utilizado (Fig. 2), fué similar al descrito por Albers y Brady (1), con algunas modificaciones.

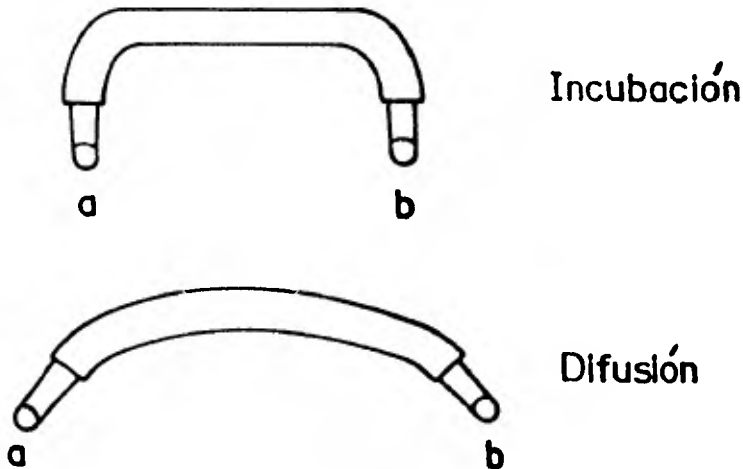


Fig. 2 - El aditamento para la medición de la actividad de la GAD consistió en dos microtubos de vidrio (25 X 4mm), unidos a través de un tubo de latex (10 X 0.5 cm) que se colocó dentro de un baño de incubación, al final de ésta, el aditamento se colocó horizontalmente en un horno a 37°C para facilitar la difusión.

La mezcla de incubación alojada en el microtubo (a), contenía 0.020ml de una mezcla de 1^{14}C ácido glutámico y PALP. La concentración final de L-glutámico fué de 33mM y la de PALP varió de 2×10^{-4} a 10^{-2} M, bajo cualquiera de estas condiciones la GAD se encontró saturada por su coenzima. El ácido L-glutámico contenía 1.55 μCuries de DL 1^{14}C ácido glutámico. La actividad específica final fué de 83,600 dpm/ μMol , la reacción enzimática se inició por la adición de 0.030ml de la preparación enzimática en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0, la concentración de ésta, fué variable para cada tipo de experimento. En la mayor parte de los experimentos la preparación contenía el agente reductor AET a una concentración final de 10^{-2} M. El $^{14}\text{CO}_2$ producido en la reacción se atrapó en el microtubo (b) por 0.5ml de hidróxido de Hyamina. Una vez iniciada la reacción, el aditamento se colocó en un baño con agitación, mantenido a 37°C por un período de 20 minutos. Al finalizar el período de incubación, la reacción se interrumpió por la adición de 0.050ml de ácido sulfúrico 3.6N. El aditamento se retiró del baño con agitación y se colocó dentro de una estufa de incubación, mantenida a 37°C por una hora en la posición que se muestra en la parte baja de la Fig. 2, para facilitar el paso del $^{14}\text{CO}_2$ de la mezcla de incubación al hidróxido de Hyamina. Al finalizar la difusión el microtubo (b) conteniendo el $^{14}\text{CO}_2$ atrapado en el hidróxido de Hyamina se depositó en 10.0 ml de un sistema de centelleo líquido hecho a base de tolueno (4.0g de PPO, 50. g de POPOP en un l de tolueno). La radioactividad se midió en un espectrómetro Beckman LS 100C con una --

eficiencia del 90%. La descarboxilación inespecífica se midió bajo condiciones similares a las descritas, pero en presencia de AOA a una concentración final de 10^{-3} M. El valor de este blanco se sustrajo a cada uno de los tubos experimentales antes de proceder a la realización de los cálculos de actividad.

Cuando la actividad de la GAD se evaluó en fragmentos de geles de poliacrilamida, las mediciones se hicieron con concentraciones similares a las descritas con anterioridad, pero usando matraces Erlenmeyer de 10.0ml, conteniendo un microtubo alojado en un pozo central y tapados con tapones serológicos a prueba de gas, el volumen de incubación fué de 1.0ml. Un fragmento de gel se depositó en el matraz que contenía 0.8ml de una mezcla de -- una solución amortiguadora de fosfatos 0.5M pH 6.4, PALP y AET 10^{-2} M y se dejó en el refrigerador durante la noche, para facilitar la difusión de la GAD. Al día siguiente la reacción se inició mediante la adición de --- 0.02ml de ácido L-glutámico $1 \text{ } ^{14}\text{C}$ con una actividad específica de 340,000 dpm/ μMol . Se introdujo el microtubo conteniendo 0.050ml de hidróxido de Hyamina, se taparon los matraces y se pusieron a incubar en un baño con agitación por 2 horas a 37°C . La reacción se interrumpió -- adicionando 2.0ml de ácido sulfúrico 3.6N y después de - dos horas de difusión la radioactividad del $^{14}\text{Co}_2$ contenida en el tubo de Hyamina se evaluó en la forma descrita anteriormente.

Determinación de proteínas.

Las proteínas se midieron por el método de ----

Lowry (29), utilizando como patrón, albúmina bovina. --
Cuando la medición de las proteínas se hizo en presen--
cia de AET y/o PALP a elevadas concentraciones, las pro--
teínas se precipitaron en cada tubo con 1.0ml de ácido
tricloroacético al 5%, para asegurar su precipitación --
total, los tubos permanecieron en el refrigerador a una
temperatura de 0.4°C por un período no menor de dos ho--
ras, al final del cual se centrifugaron a 1,000 rpm por
10 min. El precipitado se resuspendió en 0.2ml de hi--
dróxido de sodio 1.0N y las proteínas se midieron por --
el método de Lowry pero utilizando carbonato de sodio --
preparado en agua, en lugar de hidróxido de sodio.

Preparación de extractos crudos de GAD.

Para la preparación de extractos crudos, se --
utilizaron cerebros de ratón, los cuales se homogeneiza--
ron en 5 volúmenes de agua bidestilada, el homogeneiza--
do se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min., y el sobrena--
dante correspondiente se ajustó a pH de 7.0 adicionando
una pequeña cantidad de una solución amortiguadora de --
fosfatos 1M pH 7.0.

Experimentos tendientes a estabilizar la GAD.

Los extractos crudos de GAD, se dividieron en
pequeñas porciones y mediante soluciones concentradas --
de AET y/o PALP se ajustaron a dar las diversas concen--
traciones finales de estas sustancias que se señalan --
en la sección de resultados. Los diversos extractos --
crudos se depositaron en el refrigerador, midiéndose la
actividad de la GAD por triplicado en alícuotas de cada

uno de ellos retiradas los días 0, 2, 6 y 9.

Precipitación de la GAD POR pH.

Se realizaron dos tipos de experimentos. En el primer tipo y con objeto de encontrar un método adecuado para concentrar la GAD; los extractos crudos de esta enzima se ajustaron a una concentración de fosfatos, AET y PALP de $10^{-2}M$ y se llevaron a valores de pH dentro de un rango de 4.5 a 6.7, mediante la adición de cantidades variables de una solución amortiguadora de acetatos 250mM pH 3.6. Después de 15 min. de reposo en un baño de hielo, los sobrenadantes ajustados se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min., los precipitados se resuspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos $5 \times 10^{-3}M$ pH 7.0, AET y PALP $10^{-3}M$. Con el objeto de eliminar todo material no resuspendido los precipitados resuspendidos se volvieron a centrifugar. Los sobrenadantes se decantaron y los precipitados resultantes se resuspendieron en pequeñas cantidades de la solución amortiguadora. La actividad de la GAD se midió en alícuotas del sobrenadante y del precipitado obtenidos de esta última centrifugación.

En el segundo tipo de experimento, se evaluó la utilidad de la precipitación por pH como paso purificador. Para ello un extracto crudo de GAD se dividió en dos partes iguales que se llevaron a pH de 6.0 y 5.5 respectivamente. Después de 15 min. de reposo en un baño de hielo, los extractos se centrifugaron a 13,000 rpm por 20 min. Los precipitados respectivos se resuspendieron en una pequeña cantidad de una solución amor-

amortiguadora de fosfatos 50mM pH 7.0 y los sobrenadantes se ajustaron nuevamente a pH 7.0. La actividad de la GAD - se midió en alícuotas de los sobrenadantes y de los sobrenadantes y de los precipitados.

Experimentos tendientes a concentrar extractos crudos de GAD.

Para la concentración de extractos crudos de -- GAD, se probaron diversos procedimientos, los extractos crudos de GAD se ajustaron para dar una concentración de fosfatos y de AET de $2 \times 10^{-2} M$ y $10^{-2} M$, respectivamente.

- a) Para dar una saturación del 25%, se añadió sulfato de amonio sólido al extracto crudo, las proteínas precipitadas se eliminaron -- por centrifugación a 13,000 rpm por 15 min. El sobrenadante resultante se llevó a una - saturación del 70% mediante la adición de - una mayor cantidad de sulfato de amonio. -- Las proteínas precipitadas se colectaron -- por centrifugación, resuspendiéndose el precipitado resultante en 2.0ml de una solu--- ción amortiguadora de fosfatos $5 \times 10^{-2} M$ pH - 7.0. Durante la adición del sulfato de amonio el pH del extracto se mantuvo en 7.0 mediante la adición de pequeñas cantidades de hidróxido de amonio 2N.

- b) Una fracción del extracto crudo se precipitó mediante el mismo procedimiento anterior pero utilizando una solución saturada de --

sulfato de amonio ajustada a pH 7.0.

- c) El extracto crudo se dializó durante 24 horas en contra de una solución saturada de sulfato de amonio ajustada a pH 7.0. La cantidad de esta solución utilizada para la diálisis se ajustó de tal manera que al equilibrio se llegará a una saturación del 70%, tanto dentro como fuera del saco de diálisis que contenía el extracto crudo de GAD.
- d) El extracto crudo se concentró dentro de una bolsa de diálisis rodeada por una cantidad suficiente de polietilenglicol 5000, para extraer más del 100% del volumen líquido contenido en la bolsa de diálisis.
- e) Una fracción del extracto se congeló y se liofilizó. Al final del procedimiento, los componentes del extracto se resuspendieron en una pequeña cantidad de una solución amortiguadora de fosfatos 50mM pH 7.0.
- f) Después de los experimentos de precipitación por pH, las fracciones de GAD recuperadas con un contenido de proteínas de 1.8mg/ml, se concentraron por filtración en membranas de Amicón PM 30.

La actividad de la GAD y la concentración de proteínas se midió en alícuotas de todos los concentra--

dos anteriores. En aquellos casos en los que se utilizó el sulfato de amonio como medio de concentración, previo a la medición de la GAD, los extractos ya concentrados se dializaron por toda la noche con dos cambios de buffer de fosfatos 50mM pH 7.0.

Purificación de la GAD.

Se llevaron a cabo varios intentos de purificación. En cada uno de ellos, se usaron 100 cerebros de ratón, teniendo cuidado de realizar todas las operaciones de 0 a 4°C. Para una purificación típica los cerebros se homogeneizaron en 5 volúmenes de agua bidestilada, conservándose una alícuota para la medición de la GAD y de las proteínas, que se ajustó a pH 7.0 y a una concentración de 5×10^{-2} M de fosfatos y de AET de 10^{-2} M, mediante la adición de una pequeña cantidad de una solución amortiguadora de fosfatos 1M pH 7.0 y AET 281mg/ml. El resto del homogeneizado se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min. El sobrenadante se decantó y el precipitado se resuspendió con una cantidad de agua bidestilada igual a la del sobrenadante decantando, centrifugándose nuevamente. Ambos sobrenadantes se combinaron y una alícuota de esta preparación se ajustó a pH, fosfatos y AET de la misma manera que el homogeneizado. El resto del sobrenadante se ajustó con fosfatos y AET para dar una concentración final de 10^{-2} M de fosfatos, 10^{-2} M de AET y pH 7.0. El sobrenadante ya ajustado se liofilizó, posteriormente se resuspendió en una pequeña cantidad de agua bidestilada y con el objeto de eliminar todo material particulado que pudiera existir, se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min. Una alícuota de este extracto se retiró

...20

para la medición de GAD y protefnas y el resto se proce
só por cromatografía de filtración en Ultrogel Aca 34.

Cromatografía de filtración en Ultrogel Aca 34.

Se utilizó una columna LKB de 2.5 por 90.0 cm empacada con Ultrogel Aca 34. La columna se equilibró durante 24 horas con una solución amortiguadora de fosfatos $2 \times 10^{-2} M$ pH 7.0 y AET $10^{-2} M$ (solución amortiguadora patrón). Se aplicaron a la columna 20ml del extracto anterior, a una velocidad de flujo cercana a 20ml/h. Una vez terminada de pasar la muestra, la columna se eluyó con la solución amortiguadora patrón. Se colectaron fracciones de 4.0ml durante todo el proceso, mediante la ayuda de un colector de fracciones ISCO - 1320. El efluente de la columna se monitoreó continuamente a 280 milimicras mediante el uso de un monitor de luz ultravioleta Uvicord S LKB 2138 y su señal se registró en transmitancia mediante un registrador Heath - SR-205 con el papel corriendo a una velocidad de 0.2mm/seg. La actividad de la GAD se midió en fracciones alternadas, guardando aquéllas en las que apareció la máxima actividad de la enzima. Se obtuvieron dos picos de actividad, el primero de ellos dentro del volumen excluido y el segundo en el volumen incluido. La purificación se continuó cromatografiando el segundo pico de GAD en una columna de DEAE-Celulosa.

Cromatografía en DEAE-Celulosa.

Se utilizó una columna de 1.5 por 30.0 cm., empacada con DEAE-Celulosa microgranular Whatman, bajo la

presión ejercida por nitrógeno gaseoso. La columna se equilibró por 48 horas con la solución amortiguadora patrón y la GAD proveniente del volumen excluido de la cromatografía en Ultrogel AcA 34, se introdujo en la columna a una velocidad de 20ml/h. Una vez terminada de pasar la muestra, la columna se lavó con la solución amortiguadora patrón hasta que la proteína se dejó de colectar en el efluente. La elución de la columna se hizo mediante un gradiente lineal de fosfatos (2×10^{-2} - 25×10^{-2} M pH 7.0). El perfil de absorbancia a 280 milimicras se registró como en la cromatografía anterior. La actividad de la GAD se midió en fracciones alternadas, combinando aquéllas que contenían GAD. Las fracciones combinadas se dializaron contra varios cambios de la solución amortiguadora patrón por 12 horas, se apartaron 5 ml para usos analíticos y el resto se continuó purificando por cromatografía en gel de fosfato de calcio.

Cromatografía en gel de fosfato de calcio.

Se utilizó una columna de 1.5 por 30.0cm., empacada con gel de fosfato de calcio Sigma. La columna se equilibró durante 24 horas con la solución amortiguadora patrón y la GAD obtenida de la cromatografía en DEAE-Celulosa se introdujo en la columna a una velocidad de flujo cercana a los 20ml/h. Una vez terminada de pasar la muestra, la columna se lavó con la solución amortiguadora patrón hasta que el registro a 280 milimicras llegó a su basal. La elución de la columna se realizó mediante un gradiente de fosfatos de (2 - 25×10^{-2} M - pH 7.0). Las fracciones conteniendo la máxima activi--

dad de la GAD se combinaron y se almacenaron bajo el rubro de "GAD purificada".

Tanto la GAD como las protefnas se midieron en cada una de las preparaciones obtenidas en cada etapa de purificación con el objeto de determinar su actividad específica. El grado de inactivación de la GAD durante la purificación, se evaluó midiendo la actividad de las preparaciones anteriores, tanto al ser obtenidas como al final de la purificación y comparando sus respectivas actividades.

Electroforesis en placa de gel de poliacrilamida.

El método de electroforesis en poliacrilamida utilizado, fué el sistema discontinuo para gel nativo de Davis (11), con un gel concentrador al 4.5% y uno para resolver al 10%. A todas las soluciones amortiguadoras usadas, se les adicionó AET a una concentración de 10^{-2} M, con el objeto de proteger la actividad de la GAD, durante la electroforesis. Para evitar que el persulfato de amonio residual utilizado en la polimerización del gel para resolver, pudiera oxidar e inactivar a la GAD, una vez polimerizado el gel, se corrió previamente por un mínimo de 12 horas. El gel concentrador se polimerizó con riboflavina y luz de gas neón para evitar la presencia de persulfato de amonio residual. Se analizaron las alícuotas de diferentes preparaciones de GAD de 0.050ml (conteniendo cerca de 0.050mg de protefna).

La electroforesis se realizó a 10 mAmperes durante la concentración de la muestra y a 25 mAmperes du

rante su resolución. Al final de la electroforesis los geles se fijaron y tiñeron en una mezcla de ácido acético al 10%, alcohol etílico al 25% y azul comassie (brilliant blue G) al 0.05%, por 12 horas a temperatura ambiente. Los geles se destiñeron con varios cambios de alcohol etílico al 25% y ácido acético al 10%. Una vez desteñidos los geles se hidrataron por 12 horas mediante dos cambios de agua y posteriormente se desecaron al vacío.

Cuando la actividad de la GAD se midió en fragmentos de gel, la electroforesis se realizó a una temperatura de 0 a 4°C. Al final de la electroforesis y antes de la fijación del gel, los carriles en los que corrió la preparación de GAD destinada a su medición, se aislaron de la placa de gel y se dividieron en fragmentos de 1.0cm. La actividad de la GAD se midió como se describió anteriormente, en cada uno de estos fragmentos. El patrón de proteínas de las preparaciones de GAD utilizadas para la medición de su actividad, se evaluó tiñendo algunos carriles electroforéticos vecinos de los utilizados para su determinación.

RESULTADOS

Estudios tendientes a estabilizar la actividad de la -- GAD.

En virtud de la gran inestabilidad que presenta la GAD, se consideró como requisito previo a su purificación, el lograr su estabilización. Dado que en la literatura se ha mencionado que tanto el AET como el -- PALP protegen a esta enzima (56), se decidió estudiar -- su posible efecto protector. Las figuras 3-7 resumen -- los resultados obtenidos en este experimento. Como pue -- de observarse en los controles de dichas figuras, la -- pérdida de actividad de la GAD es practicamente total a los 6 días de preincubación. En la Fig. 3 se observa -- que el PALP estabilizó a la GAD desde concentraciones -- de 10^{-4} M incrementándose esta protección conforme se au -- menta la concentración de PALP, existiendo una protec -- ción casi de 100% a concentraciones de PALP de 10^{-2} M. -- Con el AET (Fig. 4) no se observaron efectos protectores a concentraciones hasta de 10^{-3} M, pero sorprendentemen -- te a una concentración de 10^{-2} M la protección fué del -- orden del 100%. Las figuras 5, 6 y 7 muestran los efec -- tos protectores de la combinación de PALP más AET. Del -- exámen de estas figuras resulta claro que cuando el -- PALP ó el AET se encuentran a concentraciones de 10^{-2} M, la GAD es totalmente estabilizada, sin embargo cuando -- el PALP se encuentra por debajo de esta concentración -- óptima (Fig. 7) el AET a bajas concentraciones es inca -- paz de potenciar sus efectos protectores.

Medición de proteínas en presencia de PALP y AET.

Debido a que la cuantificación de proteínas es de primordial importancia en la purificación de una enzima por requerirsele para la obtención de actividades específicas, de las preparaciones de GAD obtenidas, en cada etapa de purificación; era necesario tener la seguridad de que no hubiera interferencia en su medición por el PALP o el AET. Como se muestra en la tabla 1, - el AET provoca la aparición de un color intenso en los blancos que impide utilizar el método de Lowry. En la Fig. 8 se muestran curvas de proteína patrón preparadas en presencia de AET y/o PALP, en las que la proteína se precipitó con ácido tricloroacético y se resuspendió en hidróxido de sodio. Como puede observarse las curvas - son lineales y la interferencia por el PALP y el AET es considerablemente minimizada aunque no totalmente eliminada. El hecho de que las curvas no salgan del origen muy probablemente refleja la interferencia residual de estas sustancias. La interferencia por el PALP fué mayor que la dada por el AET y resultó aditiva cuando los patrones de proteínas se prepararon en una solución con teniendo ambas sustancias. Sin embargo, como la tabla 2 muestra, a pesar de no haberse podido eliminar por com pleteo, la interferencia del PALP y AET, los valores de proteína endógena de extractos conteniendo AET, PALP ó AET más PALP son idénticos si se les cuantifica usando curvas patrón preparadas en las mismas condiciones de - concentración para estas sustancias. Si en cambio los valores se obtienen a partir de curva patrón preparada en ausencia de PALP y AET, el valor de la proteína endógena, resulta artefactualmente elevado.

Precipitación de la GAD por pH.

Dado que en los esquemas de purificación comúnmente se utiliza la cromatografía de filtración y ésta solo permite el uso de volúmenes pequeños de muestra, se decidió encontrar un método de concentración que diera la menor pérdida de actividad posible. Ya que en nuestro laboratorio se había observado que a valores bajos de pH, la GAD precipitaba y que el precipitado era posible solubilizarlo a pH de 7.0 con poca pérdida de su actividad, se decidió evaluar la precipitación de la GAD por pH como un método concentrador. En la tabla 3 se observa que la mayor parte de la GAD precipitada y solubilizada ocurre a valores de pH comprendidos entre 4.7 y 5.2, en tanto que poca GAD parece ser precipitada a un pH arriba de 5.2. Por debajo de 4.7, la GAD precipitada parece sufrir una considerable desnaturalización pues la cantidad de GAD recuperada es bajísima. A pesar de haberse podido resuspender la mayor parte de la GAD precipitada entre pH 4.7-5.2 la precipitación de la GAD se acompañó de una pérdida de actividad cercana al 50%. En virtud de que en los experimentos anteriores se observó que una cantidad considerable de protefina inespecífica se precipitó por arriba de pH 5.2 permaneciendo una gran cantidad de GAD en el sobrenadante, se decidió estudiar la posibilidad de usar este procedimiento como paso purificador. Como se observa en la tabla 4, el cambio en el pH de los extractos crudos de GAD de 7 a 6 ó 5 trae como consecuencia la precipitación de protefnas inespecíficas que se manifiesta en un incremento en la pureza de la GAD de 1.2 a 1.6 veces. Por desgracia la recuperación de la GAD fué baja particularmente cuando el pH de los extractos se baja hasta 5.0.

Experimentos tendientes a encontrar un método útil para la concentración de extractos crudos de GAD.

En la tabla 5 se resumen los resultados obtenidos mediante el empleo de diferentes procedimientos de concentración. Como puede observarse el mejor procedimiento encontrado fué la liofilización, lográndose concentrar los extractos hasta 10 veces con un 95% de recuperación de la actividad de la GAD. El empleo de sulfato de amonio en todas sus modalidades, aunque útil para la concentración de los extractos, dió como resultado una pérdida considerable de la actividad de la GAD, llegándose a recuperar tan solo el 60% de la actividad en el mejor de los procedimientos empleados: precipitación del extracto por diálisis al equilibrio. El uso de polietilenglicol como medio concentrador, fué en extremo dañino para la actividad de la GAD, llegándose a inactivar ésta en su totalidad. La concentración mediante el uso de membranas de Amicón PM 30 aunque imposible de ser usado para la concentración del extracto crudo, parecería ser una buena alternativa para la concentración de preparaciones semipurificadas de GAD, con bajo contenido porteico.

Medición de la actividad de la GAD en los geles de acrilamida usados para evaluar la pureza de las distintas preparaciones de GAD obtenidas, en el curso de una purificación; se determinó la actividad de la GAD en geles de poliacrilamida después de la electroforesis de una preparación semipurificada de GAD obtenida por cromatografía de filtración en Ultrogel AcA 34. Como se ve en la Fig. 9, la máxima actividad de la GAD se encontró en

...28

tre el primero y segundo centímetros del gel y particularmente en el segundo, sugiriéndose con esto que la banda de GAD debería esperarse en la frontera entre estos centímetros de los geles.

Purificación de la GAD.

Los intentos de purificación realizados se llevaron a cabo mediante un esquema que involucraba cromatografía de filtración en Ultrogel AcA 34 y cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Celulosa y en gel de fosfato de calcio. Los resultados de una purificación típica se muestran en las figuras 10-13 y en la tabla 6. Como puede observarse en la Fig. 10, después de la cromatografía en Ultrogel AcA 34, se pudieron detectar dos picos de actividad. El primero apareció dentro del volumen excluido y el segundo de mayor tamaño dentro del volumen incluido. Cuando este último pico de GAD se procesó en una columna de DEAE-Celulosa (Fig. 11), la totalidad de la enzima fué retenida y eluida al inicio de un gradiente lineal de fosfatos ($2-25 \times 10^{-2} M$ pH 7.0) como un pico relativamente simétrico. El procesamiento de esta última preparación en una columna de gel de fosfato de calcio (Fig. 12) trajo como consecuencia la total captación de GAD por la columna y su elución al inicio de un gradiente lineal de fosfatos igual al anterior como un pico de actividad bien simétrico. La Fig. 13 muestra el patrón electroforético de preparaciones de GAD provenientes de las diferentes etapas de su purificación. Como puede observarse en el electroforetograma, las bandas de proteína localizadas entre el primer y segundo centímetros del gel se ven progresivamente en

riquecidas conforme el proceso de purificación avanza.- El exámen del carril electroforético de la preparación final de GAD muestra que aunque el esquema de purificación ha logrado eliminar una buena parte de las proteínas presentes en los extractos crudos de GAD, aún esta preparación contiene por lo menos dos contaminantes mayores. La tabla 6 resume cuantitativamente los resultados de esta purificación. Como puede observarse la máxima purificación de la GAD lograda mediante el empleo del presente esquema de purificación fué de 137 veces - con respecto al homogenado inicial con una recuperación final del 4%. Dentro de las etapas individuales de purificación, cabe destacar que en la cromatografía en -- Ultrogel AcA 34 se logró una purificación de 2.6 veces - sobre el sobrenadante, que la cromatografía en DEAE-Celulosa incrementó 5 veces la actividad específica de la preparación de GAD obtenida por Ultrogel AcA 34 y que - la cromatografía en gel de fosfato de calcio logró incrementar 4 veces la pureza de la GAD cromatografiada - en DEAE-Celulosa.

La pérdida de actividad de la GAD durante la - purificación, dependió de la preparación semipurificada evaluada. De esta manera el extracto crudo de GAD (sobre nadante), la GAD proveniente de las cromatografías de Ultrogel AcA-34 (U-II), de DEAE-Celulosa o gel de -- fosfato de calcio, conservaron al final de la purificación 97,82,81 y 80% de su actividad original.

FIGURA 3.

Efecto del PALP sobre la estabilidad de la GAD.

Los extractos crudos de GAD se preincubaron de 0 a 4°C con concentraciones crecientes de PALP y la actividad de la enzima se midió en alícuotas del extracto tomadas a diferentes períodos. En el eje de las "x" se muestran los días a los cuales la actividad de la GAD se midió y en el eje de las "y" la actividad correspondiente expresada como por ciento de la actividad al día 0. La actividad absoluta de la GAD fué de 1.67, 2.20, 1.76, 1.90 y 1.90 para las curvas de PALP 10-2-3-4 y-5 M, respectivamente.

EFFECTO DEL PALP SOBRE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS CRUDOS DE GAD

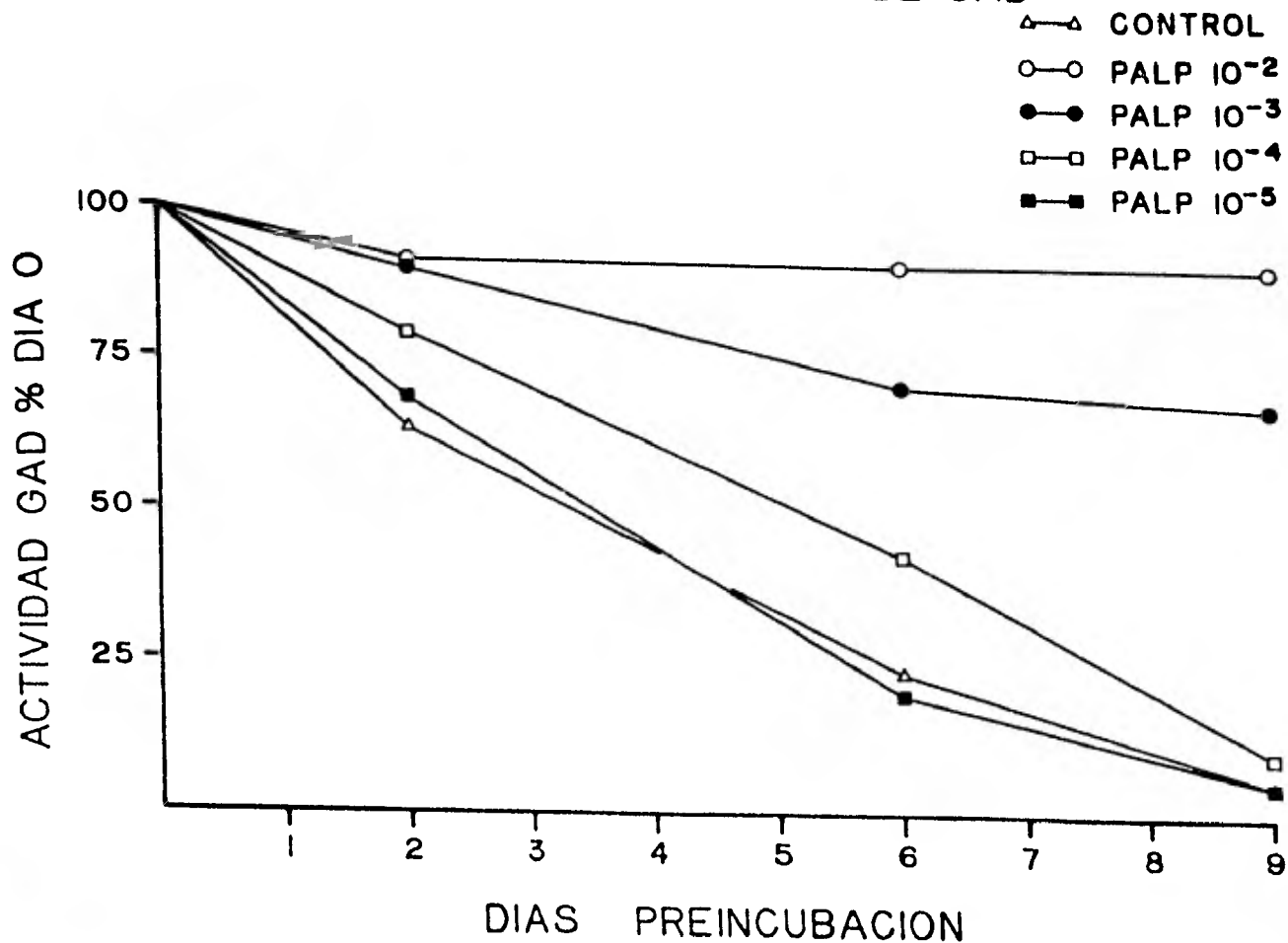


FIGURA 4.

Efecto del AET sobre la estabilidad de la GAD.

Los extractos crudos de GAD se preincubaron de 0 a 4°C con concentraciones crecientes de AET, la actividad de la enzima se midió en alícuotas del extracto - tomadas a diferentes períodos de tiempo. En el eje de las "x" se muestran los días a los cuales la actividad de la GAD se midió y en el eje de las "y" la actividad correspondiente expresada como por ciento de la actividad al día 0. La actividad absoluta de la GAD al día 0 fué de 1.67 μ Molas/h/ml de extracto para la curva control y de 2.26 2.23 y 1.77 para las curvas de AET 10-2 -3 y -4 respectivamente.

EFFECTO DEL AET SOBRE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS CRUDOS DE GAD

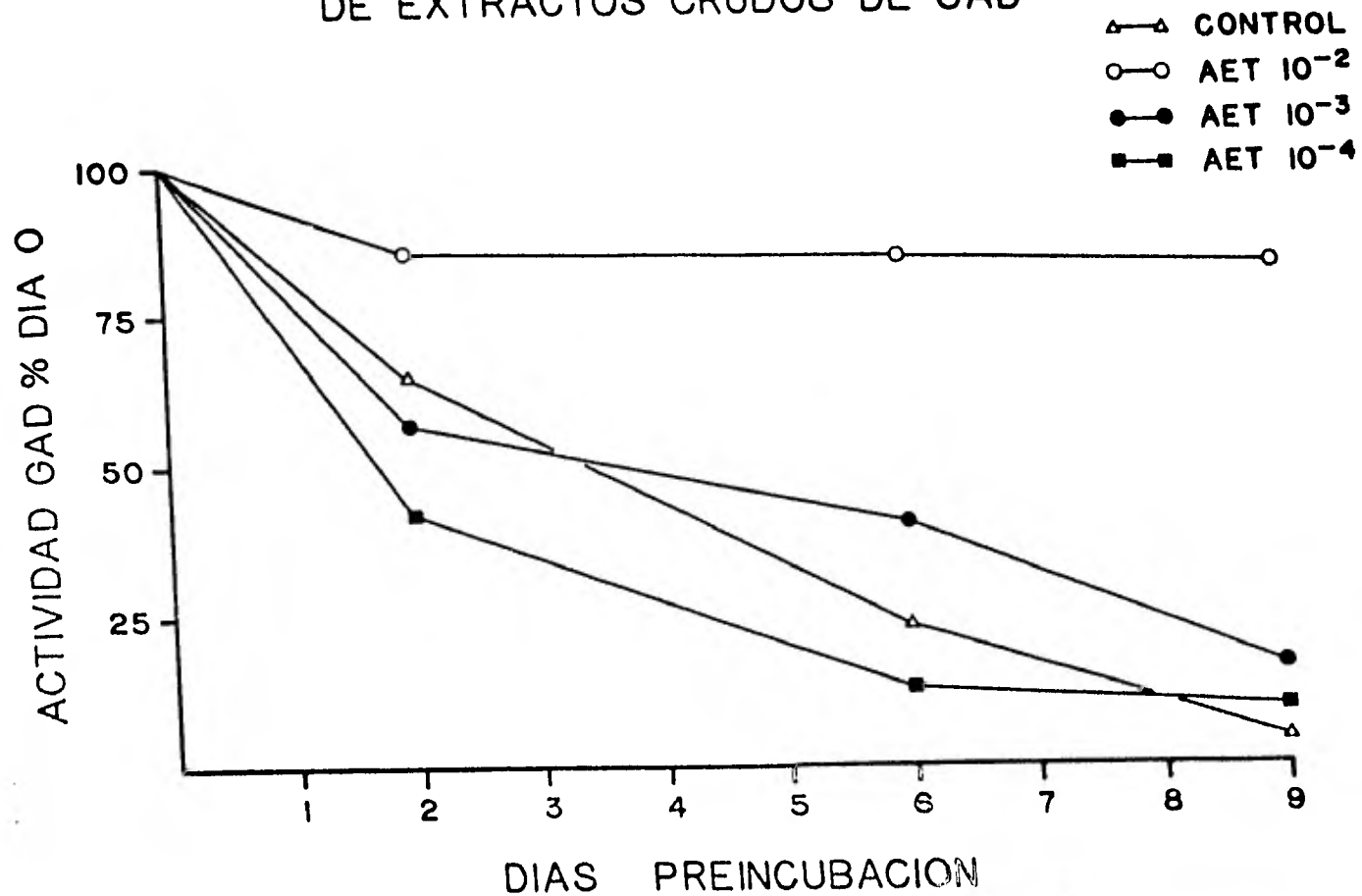


FIGURA 5.

Efecto del PALP y AET sobre la estabilidad de la GAD.

Los extractos crudos de GAD se preincubaron de 0 a 4°C con una concentración de 10^{-2} M de PALP combinada con concentraciones crecientes de AET, la actividad de la enzima se midió en alicuotas del extracto tomadas a diferentes períodos. En el eje de las "x" se muestran los días a los cuales la actividad de la GAD se midió y en el eje de las "y" la actividad correspondiente expresada como por ciento de la actividad al día 0 \pm error "standard" del promedio de las mediciones realizadas para aquellos casos en los que más de tres mediciones se realizaron. La actividad absoluta de la GAD fué de 2.11 ± 0.2 al día 0 para la curva control y de 2.2, 2.2, 1.85, 2.3 y 1.97 para las curvas de PALP 10^{-2} M combinadas con AET 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 3.3×10^{-4} y 10^{-5} M, respectivamente. Con el objeto de dar una mayor idea de la cinética de inactivación de la GAD no protegida, la curva control ha sido graficada tomando el promedio de 5 experimentos. Nótese que en ningún caso las curvas obtenidas de la GAD en presencia de protectores llegan a tocar la barra del error "standard" de la curva control.

EFFECTO DEL PALP Y EL AET SOBRE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS CRUDOS DE GAD

- CONTROL
- PALP 10^{-2} AET 10^{-2}
- PALP 10^{-2} AET 10^{-3}
- PALP 10^{-2} AET 10^{-4}
- ▲—▲ PALP 10^{-2} AET 3.3×10^{-4}
- △—△ PALP 10^{-2} AET 10^{-5}
- ◆—◆ PALP 10^{-2}

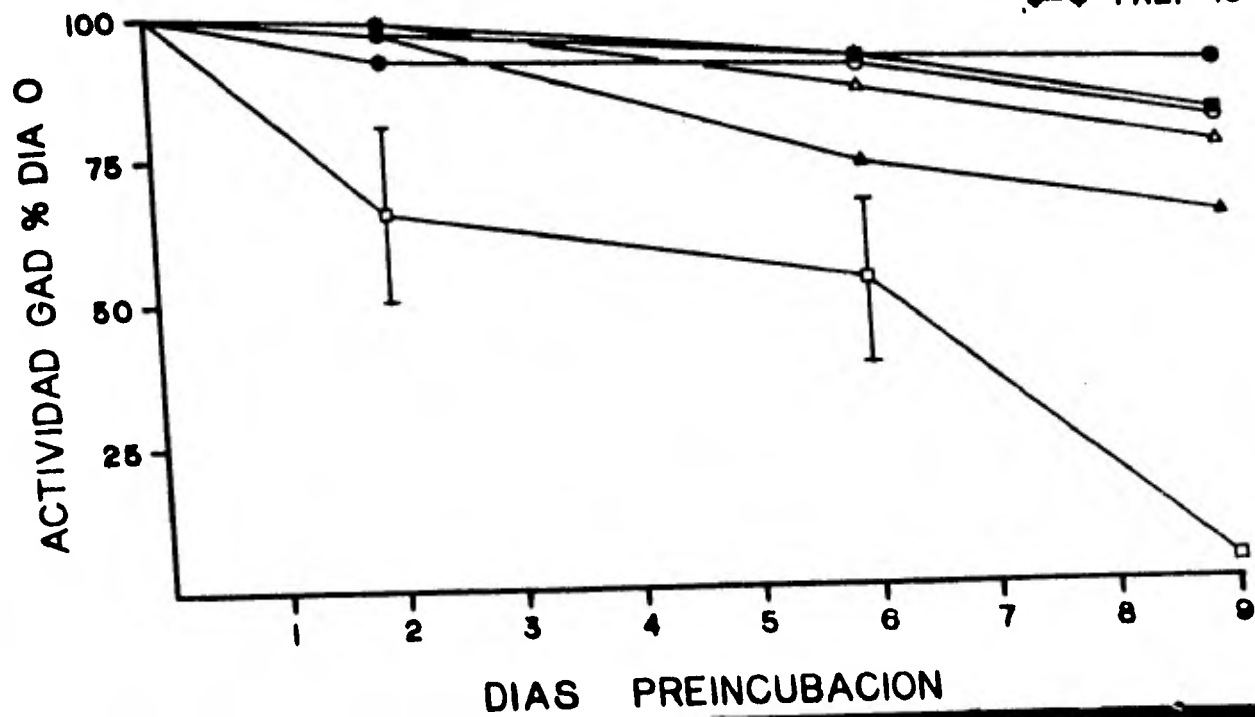


FIGURA 6.

Efecto del AET y PALP sobre la estabilidad de -
la GAD.

Los extractos crudos de GAD se preincubaron de 0 a 4°C con una concentración de 10^{-7} M de AET combinada con concentraciones crecientes de PALP, la actividad de la enzima se midió en alícuotas del extracto tomadas a diferentes períodos, en el eje de las "x" se muestran -- los días a los cuales la actividad de la GAD se midió y en el eje de las "y" la actividad correspondiente expresada como por ciento de la actividad al día 0 \pm error -- "standard" del promedio de las mediciones realizadas para aquellos casos en los que más de tres mediciones se realizaron. La actividad absoluta de la GAD al día 0 -- fué de 2.1 ± 0.2 para la curva control y de 2.2 ± 0.13 , 2.36 ± 0.26 , 2.25 ± 0.16 y 2.19 ± 0 para las curvas de AET 10^{-7} M combinadas con PALP 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , y 10^{-5} M respectivamente. Las curvas en las cuales los errores "standards" se han graficado representan el promedio de por lo menos tres experimentos independientes.

EFFECTO DEL AET Y EL PALP SOBRE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS CRUDOS DE GAD

- CONTROL
- AET 10⁻² PALP 10⁻²
- ▲—▲ AET 10⁻² PALP 10⁻³
- △—△ AET 10⁻² PALP 10⁻⁴
- AET 10⁻² PALP 10⁻⁵
- AET 10⁻²

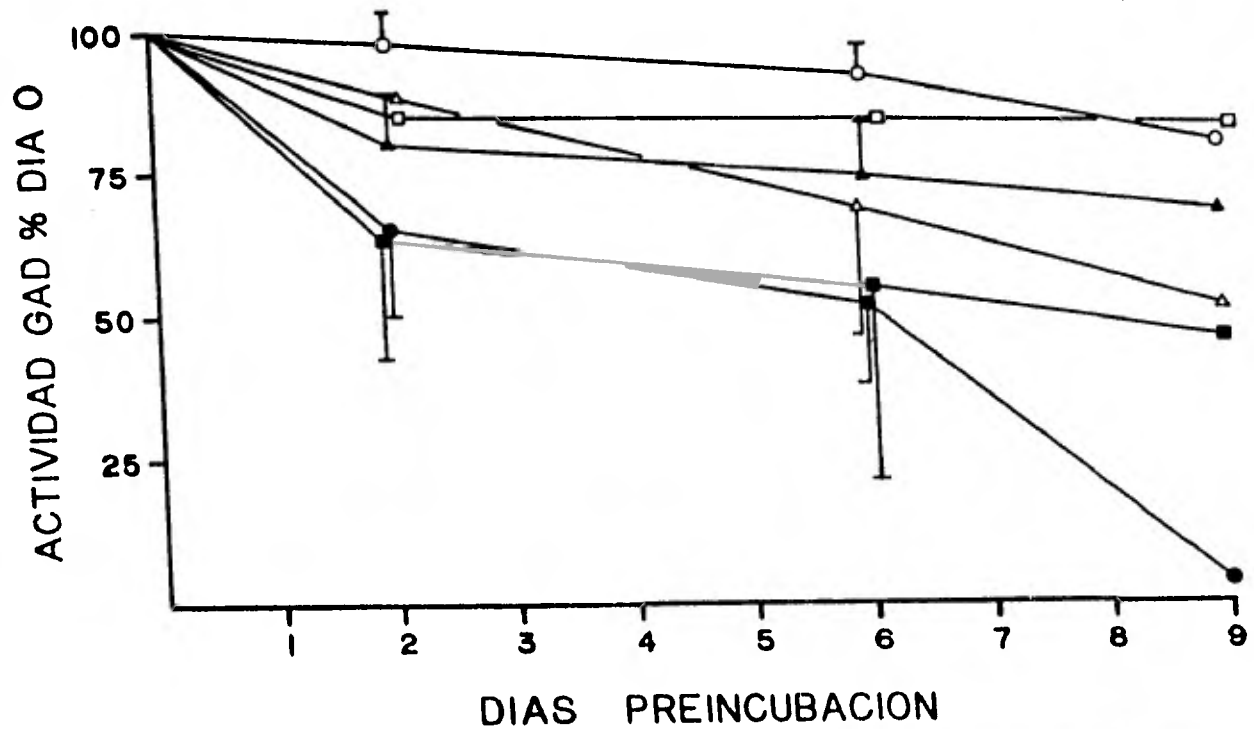


FIGURA 7

Efecto del AET y PALP sobre la estabilidad de la GAD.

Los extractos crudos de GAD se preincubaron de 0 a 4°C con una concentración de 10^{-2} M de AET combinada con concentraciones crecientes de PALP, la actividad de la enzima se midió en alícuotas del extracto tomadas a diferentes períodos. En el eje de las "x" se muestran los días a los cuales la actividad de la GAD se midió y en el eje de las "y" la actividad correspondiente expresada como por ciento de la actividad al día 0 \pm error -- "standard" del promedio de las mediciones realizadas para aquellos casos en los que más de tres mediciones se realizaron. La actividad absoluta de la GAD al día 0 -- fué de 2.11 ± 0.2 para la curva control y de 2.22 ± 0.13 , 2.3, 2.0, 2.0 y 2.23, para las curvas de AET 10^{-2} M de AET combinadas con PALP 10^{-2} , $3 \cdot 10^{-2}$, $4 \cdot 10^{-2}$ y $5 \cdot 10^{-2}$ M, respectivamente. Las curvas en las cuales los errores "standards" se han graficado representan el promedio de por lo menos -- tres experimentos independientes.

EFFECTO DEL AET Y PALP SOBRE LA ESTABILIDAD DE EXTRACTOS CRUDOS DE GAD

- CONTROL
- AET 10⁻³ PALP 10⁻²
- AET 10⁻³ PALP 10⁻³
- AET 10⁻³ PALP 10⁻⁴
- △— AET 10⁻³ PALP 10⁻⁵
- AET 10⁻³

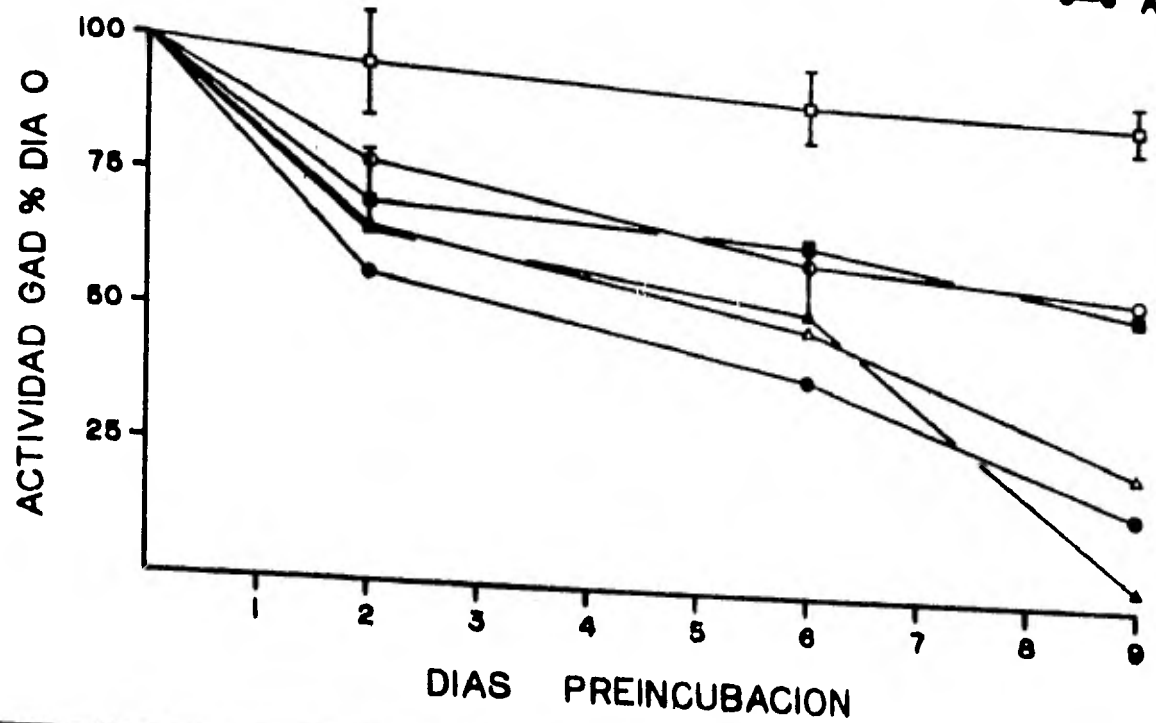


TABLA 1.

Interferencia del AET en la medición de protefnas por el método de Lowry

	Densidad óptica
10^{-2} M AET	
Blanco	>2.0
25 μ g	>2.0
50 μ g	>2.0
100 μ g	>2.0
3.3×10^{-2} M AET	
Blanco	1.8
25 μ g	1.9
50 μ g	1.7
100 μ g	1.9

Se prepararon curvas patrón de proteínas, conteniendo de 24 a 100 μ g, en soluciones amortiguadoras de fosfatos 50mM pH 7.0, conteniendo AET a concentraciones de 10^{-2} M y 3.3×10^{-2} M. Las lecturas de la curva patrón expresadas en densidad óptica, se obtuvieron leyendo las curvas patrón contra un blanco hecho con la solución --- amortiguadora expresamente.

FIGURA 8.

Curvas patrón de proteínas preparadas en soluciones de AET y PALP

Se prepararon curvas patrón de albúmina bovina, conteniendo los microgramos que se muestran en el eje de las "x"; en una solución amortiguadora de fosfatos, 50mM - pH 7.0 sola o conteniendo PALP y/o AET a las concentraciones indicadas en la figura. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético como se describe en la sección de métodos, se resuspendieron en hidróxido de sodio y se midieron por el método de Lowry usándose un blanco que contenía hidróxido de sodio 2 N, exclusivamente.

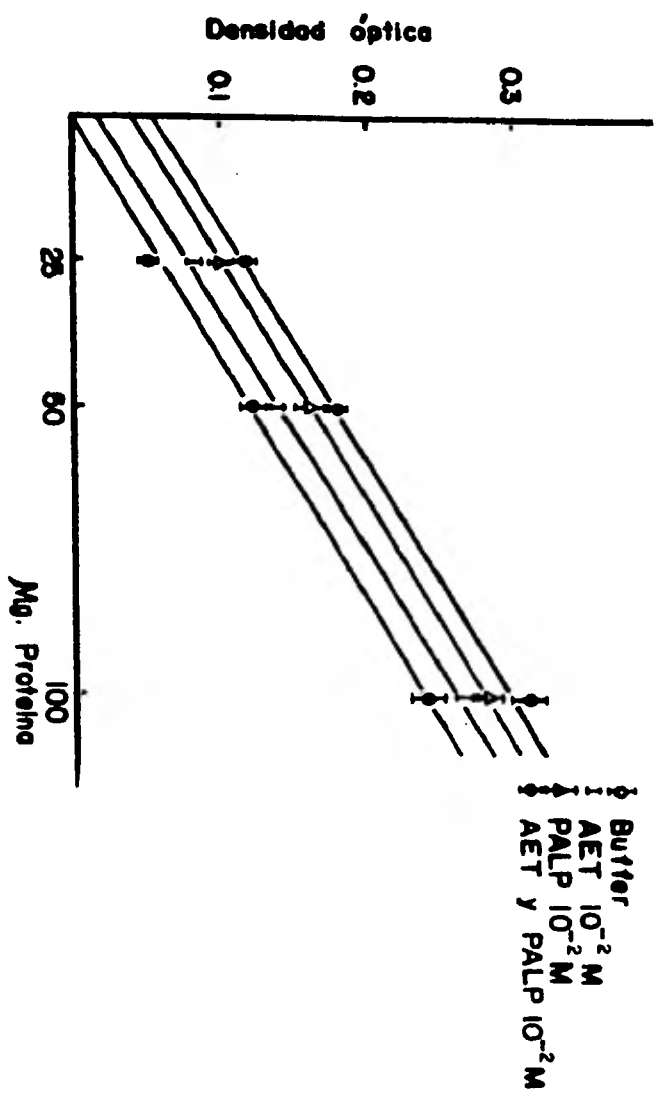


TABLA 2.

Efecto del PALP y del AET en la medición de proteína endógena por el método de Lowry (precipitando con TCA 5%).

CONDICION	PROTEINA ENDOGENA (mg/ml)	INTERFERENCIA (%)
Buffer fosfatos 50mM pH 7.	4.8	0
AET 10^{-2} M	4.8	34
PALP 10^{-2} M	4.9	60
PALP y AET 10^{-2} M	4.95	83

A extractos crudos de cerebro de ratón convenientemente diluidos, preparados en las condiciones indicadas en la tabla, se les determinó su contenido en proteínas. Tanto los extractos crudos como sus respectivos patrones de albúmina bovina se prepararon con las mismas concentraciones de AET y/o PALP y se precipitaron con TCA al 5%. El contenido de proteína para cada extracto se determinó utilizando la curva correspondiente medida contra un blanco conteniendo hidróxido de sodio 2N. Cuando los valores de proteína endógena se obtuvieron utilizando como patrón la curva preparada exclusivamente en la solución amortiguadora, la interferencia por el AET y el PALP residual se hizo presente. En la tabla, bajo el título de % de interferencia se indica el incremento porcentual para los valores de proteína endógena obtenidos en los extractos conteniendo AET, PALP y AET más PALP.

TABLA 3.

Precipitación de la GAD en extractos crudos de cerebro de ratón a distintos valores de pH y su solubilización posterior a pH 7.0

pH	GAD μMolas/h/ml solubilizada=s, residual=r.	% de GAD pre- sente en el - extracto cru- do.	% GAD solubi- lizada+ % GAD residual.
4.5	s 0.47 r 0.04	20 2	22
4.61	s 0.61 r 0.03	27 2	29
4.7	s 1.05 r 0.02	46 0.8	46.8
4.75	s 1.02 r 0.008	45 0.03	45.03
4.8	s 2.07 r 0.45	48 10	58
4.9	s 0.93 r 0.007	40 0.03	40.03
5.2	s 1.93 r 0.42	45 9	54
5.46	s 0.53 r 0.19	12 4	16
5.53	s 0.43 r 0.073	10 1	11
5.78	s 0.19 r 0.029	4 0.6	4.6
6.25	s 0.16 r 0.006	3 0.1	3.1
6.7	s 0.1 r -	0.2 -	0.2

1.5 ml de extractos crudos de GAD ajustados mediante el uso de soluciones concentradas a 10^{-2} M de fosfatos PALP y AET se llevaron a los valores de pH indicados mediante la adición de diversas cantidades de una solución amortiguadora de acetatos 250mM pH 3.6. Después de su centrifugación, los precipitados se resuspendieron en una solución amortiguadora de fosfatos PALP y AET 10^{-2} M pH 7.0 y nuevamente se centrifugaron y resuspendieron. La GAD se midió en alícuotas del sobrenadante ("GAD solubilizada") y del precipitado ("GAD residual"), de esta última centrifugación.

TABLA 4.

Fraccionación de extractos crudos de GAD mediante transiciones en el pH.

Fracción	GAD μ Molas /ml	% Sobrena- dante.	% Recupe- ración	Actividad Específica μ Molas/h/mg proteína	Veces de purifi- cación respecto al sobrenadante
Sobrenadante	12.3	100		2.42	
Sobrenadante Ph 6	8.55	76	78	3.80	1.58
Pellet pH 6	1.70	2			
Sobrenandante pH 5	4.5	36	51	3.11	1.28
Pellet pH 5	12.6	15			

Los extractos crudos de GAD protegidos como se menciona en la sección de métodos, se trataron mediante la adición de una solución amortiguadora acetatos $25 \times 10^{-2}M$ pH 3.6 hasta alcanzar los valores de pH indicados. El extracto se centrifugó y el pH tanto del sobrenadante como del precipitado se llevó nuevamente a 7.0. La actividad de la GAD y de la proteína se midió tanto en los precipitados como en los sobrenadantes.

FIGURA 9.

Actividad de la GAD en geles de Poliacrilamida

Los extractos crudos de GAD (sobrenadante), antes o después de su precipitación con sulfato de amonio sólido o su semipurificación mediante el uso de cromatografía de filtración en Ultrogel Aca 34 (UII), se procesaron por electroforesis en gel de poliacrilamida y la GAD se midió en fragmentos de un cm del gel. La actividad de la GAD en cpm obtenida en cada fragmento del gel se muestra en forma gráfica. El patrón de las bandas de proteína presente en cada fragmento utilizado para la medición de la GAD se observa en el electroforetograma correspondiente. La albúmina bovina se utilizó como patrón electroforético.

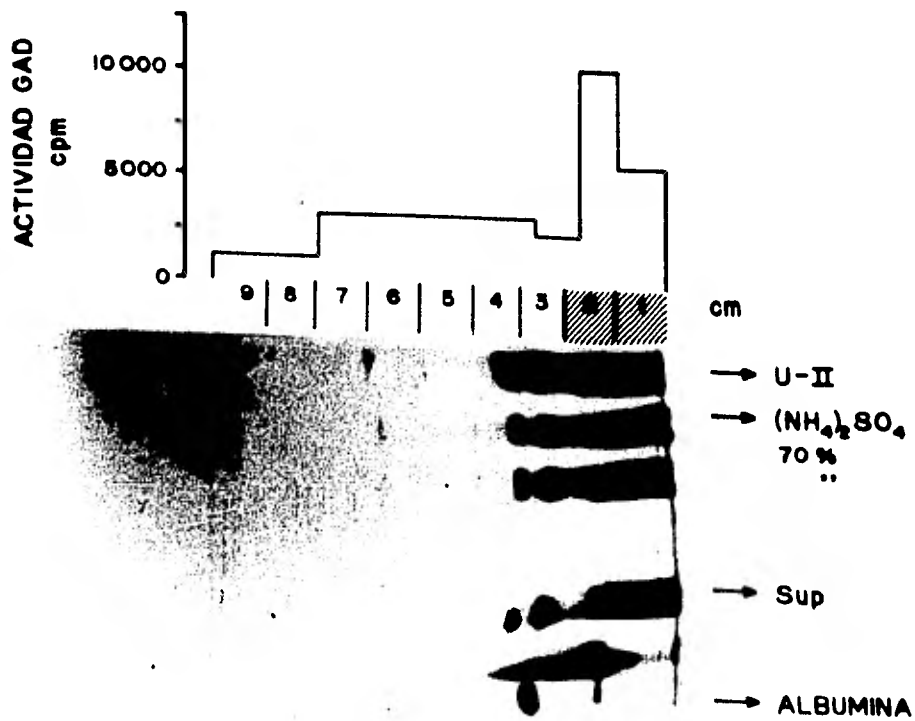


FIGURA 10.

Cromatografía de filtración en Ultrogel AcA 34.

Se procesaron los extractos crudos de GAD mediante el uso de columnas de Ultrogel AcA 34. Los detalles de la cromatografía se describen en la sección de métodos. En el eje de las "x" se muestra el número de fracción y en el eje de las "y" tanto la actividad de la GAD como el contenido de proteínas de las fracciones determinado en transmitancia.

CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN ULTROGEL AcA34

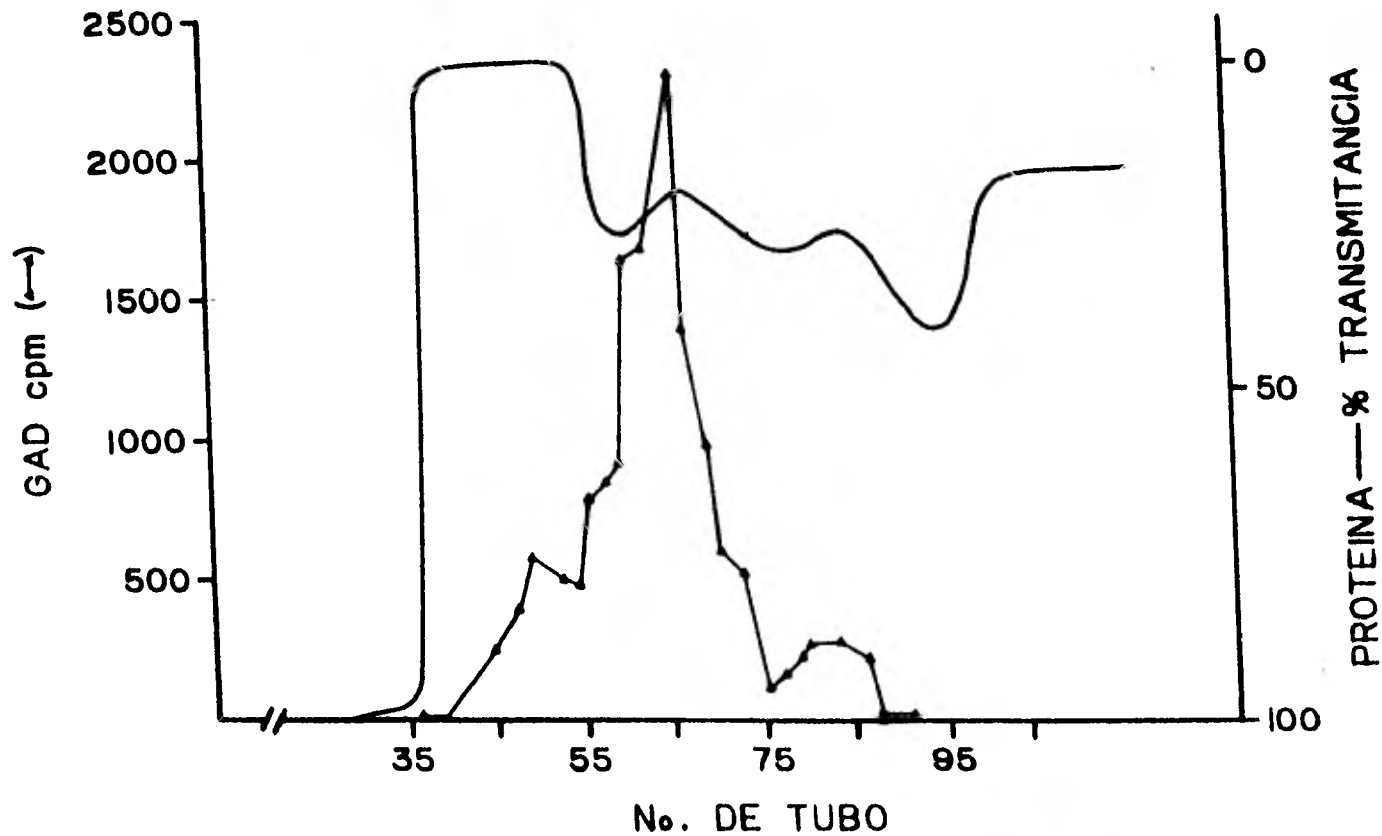


FIGURA 11.

Cromatografía de la GAD en DEAE-Celulosa.

Una preparación de GAD proveniente del volumen incluido de la cromatografía de filtración en Ultrogel AcA 34, se cromatografió en columnas de DEAE-Celulosa en la forma señalada en la sección de métodos. En el eje de las "x" se muestra el número de fracción y en el eje de las "y" la actividad de la GAD y el contenido de proteínas de cada fracción.

CROMATOGRAFIA EN DEAE CELULOSA

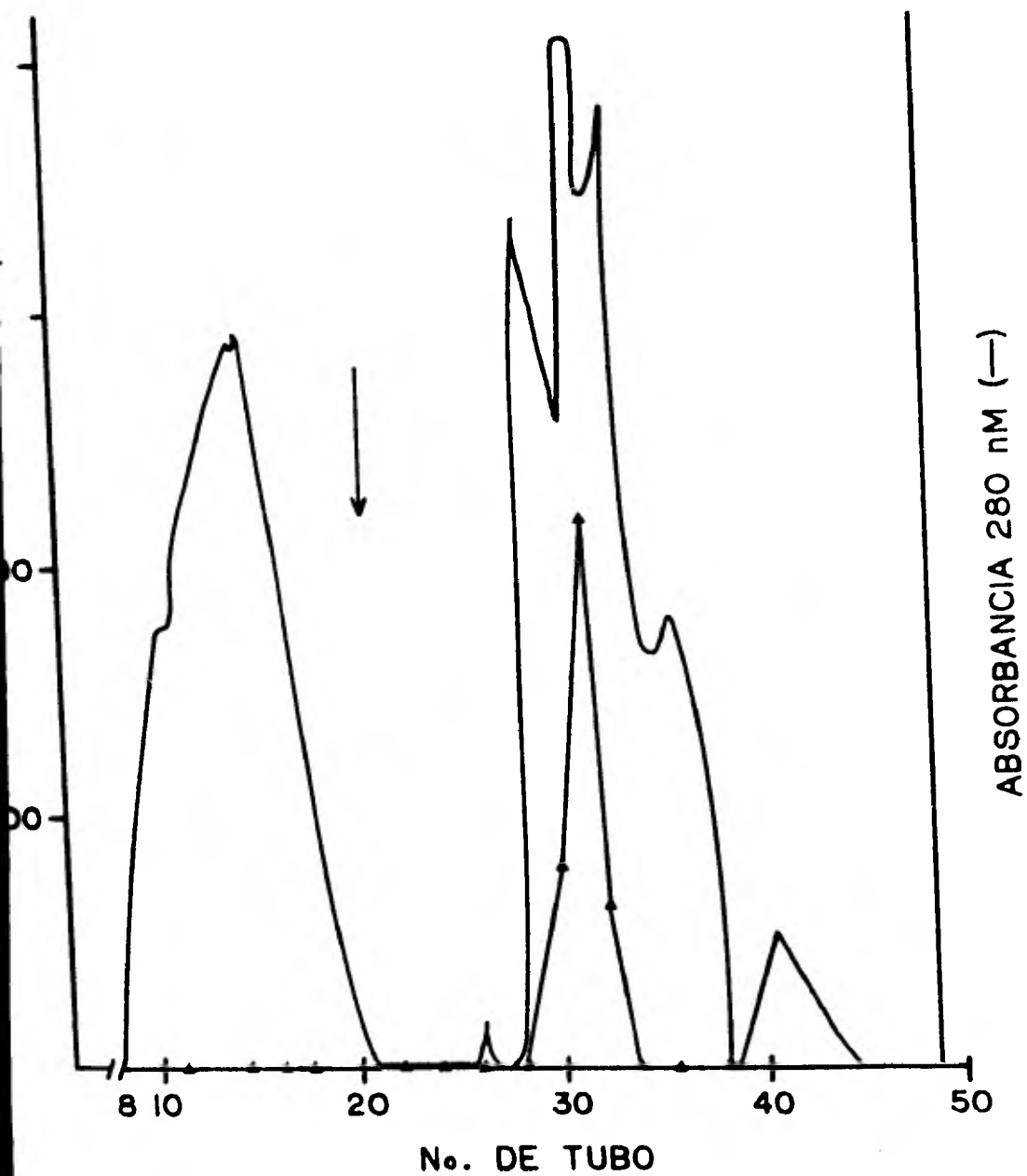


FIGURA 12.

Cromatografía en Gel de Fosfato de Calcio.

Una preparación proveniente de la cromatografía en DEAE-Celulosa, se cromatografió en columnas de gel de fosfato de calcio en la forma descrita en la sección de métodos. En el eje de las "x" se señala el número de fracción y en el eje de las "y" el contenido de proteína así como la actividad de la GAD de las fracciones obtenidas.

CROMATOGRAFIA EN GEL DE FOSFATO DE CALCIO

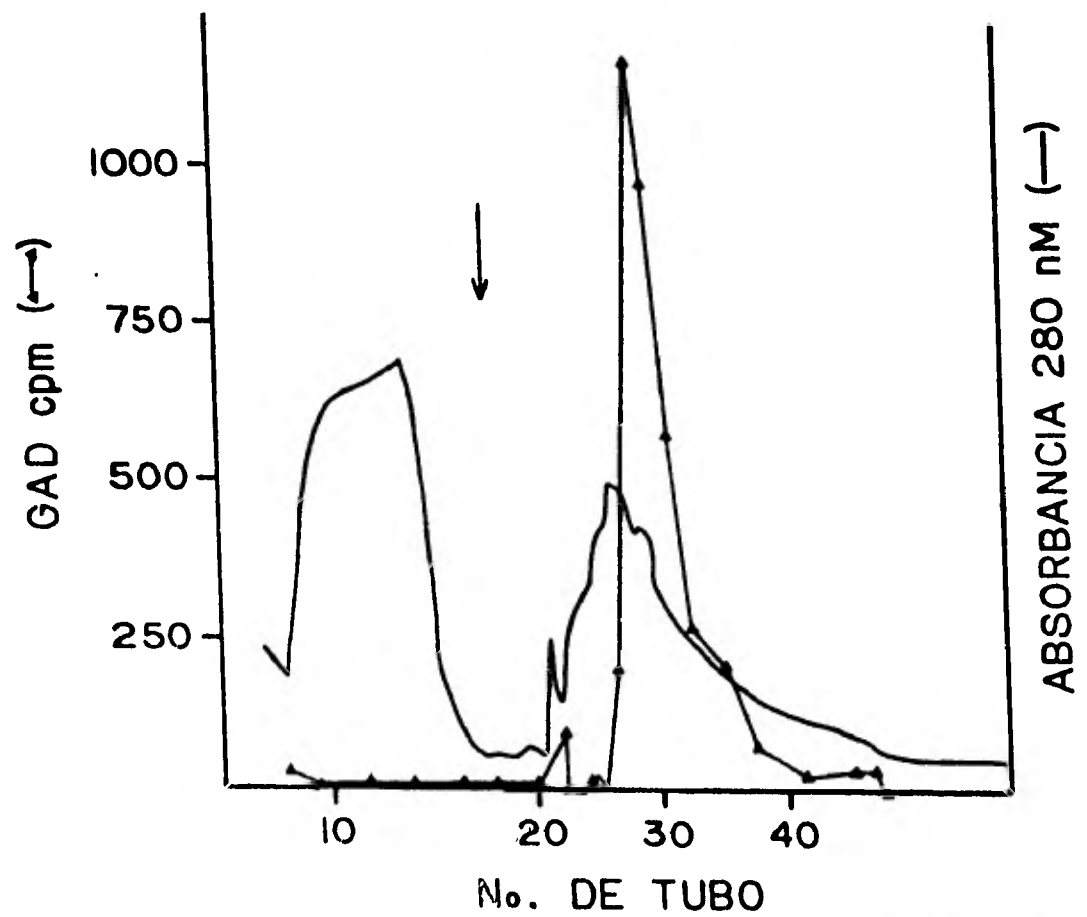


FIGURA 13.

Patrón electroforético de diferentes preparaciones de -
GAD durante su purificación.

Los detalles de la electroforesis se describen ampliamente en la sección de métodos. Abreviaturas: al**u**mína bovina = (ALB), sobrenadante = (Sup), sobrenadante liofilizado = (Sup. Liof.), Ultrogel AcA 34 = (UII), DEAE-Celulosa = (DEAE), fosfato de Calcio = (CaP).

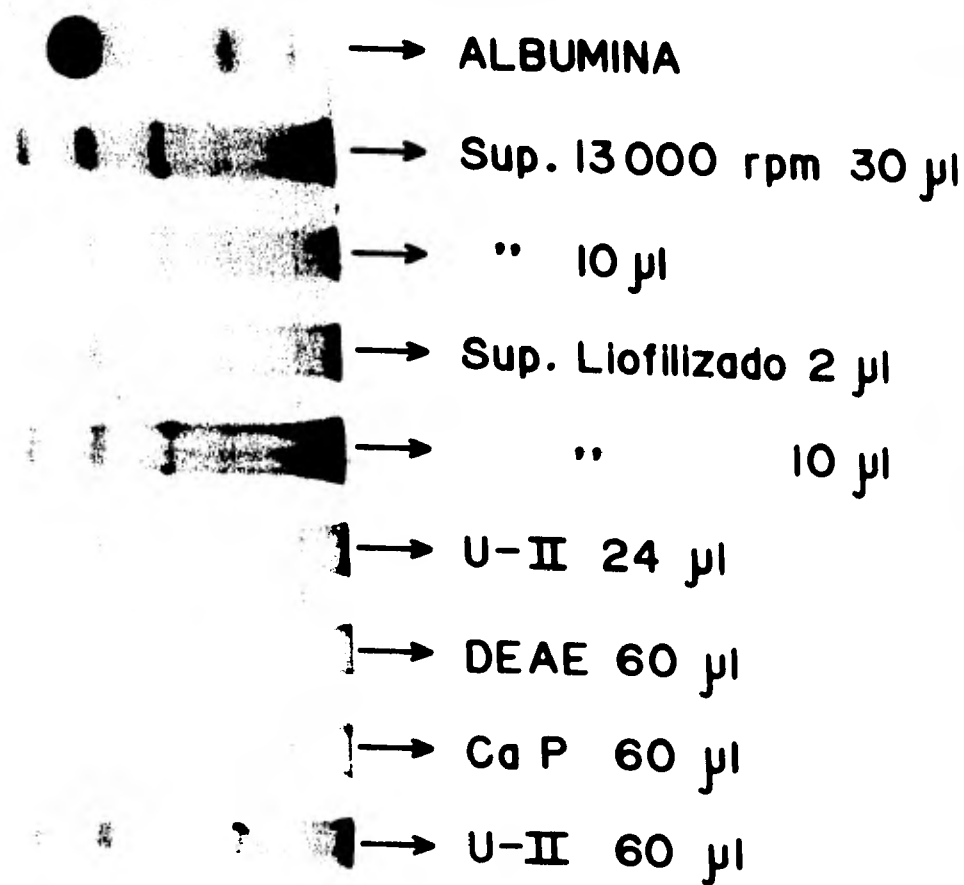


TABLA 6.

Purificación de la GAD de cerebro de ratón

Muestra	Volumen (ml)	GAD total (μ Moles/h)	Proteína total mg	Rendimiento GAD % del Homogenado	Actividad específica μ Moles/h/mg Prot.	Veces Purificación
Homogenado	250	1012	5862	100	0.17	1
Sobrenadante 13,000 rpm	223	602	1405	60	0.43	2.6
Cromatografía en Ultrogel Aca 34	45	152	131	15	1.2	6.8
Cromatografía en DEAE celulosa	35	92	16	9	5.8	34
Cromatografía en Gel de fosfato de Ca	17.5	38	1.5	4	23.6	137

La purificación anterior fue realizada en los cerebros de 100 ratones. Una concentración de AET de $10^{-2}M$ fue usada durante toda la purificación.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Como se ha mencionado en la introducción de esta tesis, el sistema del GABA juega un papel fundamental en el funcionamiento del SNC, pues los sistemas neuronales que lo utilizan como neurotransmisor se encuentran ampliamente distribuidos, pudiéndose considerar -- que no hay región del SNC que no esté sujeta a la acción regulatoria de este sistema inhibitor (5,38,44). No es sorprendente por tanto que en algunos de los modelos que intentan explicar el funcionamiento del SNC, la participación de las neuronas gabaérgicas, ejerciendo efectos regulatorios desde el procesamiento de la información recibida hasta la integración de una respuesta, haya sido involucrada (43).

Dado que la actividad de las neuronas gabaérgicas parece ser sumamente dependiente de la síntesis continua de su neurotransmisor, el GABA, y por consiguiente de la actividad de su enzima sintetizante, la GAD, -- (35,50,55), numerosos investigadores han considerado -- que un estudio detallado de las propiedades de esta enzima, así como de las influencias que son capaces de modificar su actividad tanto in vivo como in vitro, es -- fundamental para el entendimiento de la fisiología de -- las neuronas gabaérgicas (36,43,50). No es sorprendente por tanto que en numerosos laboratorios se halla intentado la purificación de esta enzima, con el propósito de hacer estudios cinéticos y de obtener anticuerpos, que permitan localizar y mapear a los sistemas gabaérgicos en el SNC y estudiar las propiedades regulatorias de esta enzima.

Los enfoques utilizados para la purificación de la GAD van desde el uso de procedimientos de purificación convencionales (54,56), hasta el empleo de las más modernas técnicas de cromatografía de afinidad (40,61). Sin embargo, a pesar de estos datos, la mayor parte de los laboratorios que han intentado reproducir sus purificaciones han fracasado en su intento. El principal problema involucrado en la purificación de la GAD así como la falta de reproducibilidad de los procedimientos de purificación, publicados, radica en la enorme inestabilidad que posee esta enzima (40,54). y a pesar de los esfuerzos encaminados a estabilizarla, no existe a la fecha reporte alguno en el que explícitamente se detalle un método de estabilización, suficientemente apropiado que facilite su purificación.

En el laboratorio donde esta tesis se realizó, fué posible mediante el uso de los procedimientos de cromatografía de afinidad descritos por Possani et. al. (40) la obtención de GAD purificada, con la que se obtuvieron anticuerpos que sirvieron para realizar estudios de mapeo de los sistemas gabaérgicos en el SNC de la rata. Los resultados de este mapeo (38), que estuvieron de acuerdo con estudios interdisciplinarios realizados en torno a la distribución de los sistemas gabaérgicos y de confirmar los resultados obtenidos por Roberts y colaboradores (42); podrían estar, sin embargo, sujetos a errores considerables, dada la pobre caracterización obtenida en el antígeno que se utilizó para la formación de estos anticuerpos. En consecuencia, con el objeto de evaluar la certeza de nuestros anteriores hallazgos en torno a la distribución del sistema del GABA en

el SNC y de profundizar en estos estudios, se decidió - buscar un nuevo procedimiento de purificación para la - GAD que resultara más reproducible y con un mayor rendi miento que los reportados. La estrategia seguida en es te trabajo, dado que el principal problema de la purifi ca ción de la GAD, es su inestabilidad, fué:

- a) buscar aquellas condiciones experimentales - que favorecieran su estabilidad, al menos en extractos crudos, con el objeto de poder di señar un procedimiento de purificación que - proporcionara enzima razonablemente purifica da para ser utilizada en la obtención de an ti cueros,
- b) encontrar condiciones metodológicas útiles - que facilitaran su purificación tales como - procedimientos que permitieran concentrar di versas preparaciones de GAD ó el diseño de - modificaciones que permitiesen la cuantifica ción de protefnas en ausencia de interferen cia s por los agentes estabilizantes y
- c) plantear un procedimiento inicial de purifi ca ción que pudiera ser implementado poste --- riormente.

La principal contribución de este trabajo de te sis radica en el hallazgo de condiciones estabilizantes que permitan mantener la actividad de la GAD estable -- hasta por 9 días como máxima. En efecto como se mues --- tra en las figuras 3-7 tanto el PALP como el AET sólo

o en combinación son capaces de preservar la actividad de la GAD de extractos crudos casi en su totalidad. El efecto estabilizante del PALP fué dependiente de su concentración, siendo visibles desde 10^{-4} M y alcanzando -- sus niveles máximos a 10^{-2} M. En contraste con esto la concentración de AET requerida para la estabilización de la GAD resultó estar dentro de un rango sumamente estrecho y cercano a 10^{-2} M. Cabe señalar a este respecto que en la mayoría de los trabajos reportados, la concentración de AET utilizada es siempre del orden de 10^{-2} M muy por debajo de la concentración óptima encontrada -- por nosotros para la estabilización de la GAD, en consecuencia los supuestos efectos estabilizadores encontrados por estos autores parecerían debido exclusivamente a la presencia del PALP usado. Aunque es posible que el PALP pudiera potenciar los efectos protectores del AET, la posibilidad resulta poco probable en vista de -- que en nuestros experimentos los efectos protectores -- que se obtienen con la combinación AET 10^{-2} M + PALP -- 10^{-3} M fueron de la misma magnitud que los encontrados -- con el PALP solo (véase Fig. 3 y 7). Aunque no es posible indicar con precisión la causa de los efectos estabilizadores de PALP ó del AET, dichos efectos para el -- caso del PALP podrían ser explicados a través de la estabilización de una conformación tal que resultara inadecuada para su degradación por enzimas proteolíticas. -- Los efectos protectores del AET en cambio podrían estar relacionados con una acción protectora de esta sustancia sobre la oxidación de grupos -SH vitales para la actividad de la GAD. Las concentraciones tan altas requeridas por esta sustancia para proteger a la GAD, así como el rango tan estrecho en el que se manifiesta su ac-

ción, pueden sugerir alternativamente que el AET pudiera como el PALP favorecer una conformación tal, que resultara inaccesible la acción degradativa de las enzimas proteolíticas.

El esquema de purificación adoptado en el presente trabajo se basa en la obtención de un extracto -- crudo de GAD seguido de su fraccionamiento mediante el uso sucesivo de cromatografía de filtración y de intercambio iónico en DEAE-Celulosa y gel de fosfato de calcio. A pesar de haberse usado en este laboratorio esquemas de purificación basadas en el uso de técnicas de cromatografía de afinidad (40) y de haber sido reportado purificaciones considerables de la GAD por el uso de columnas de afinidad tales como la reportada por Yamaguchi et. al. (61), en el presente trabajo se evitó el -- uso de dichas técnicas debido al bajo rendimiento de -- GAD que es posible obtener en forma libre mediante el -- uso del sistema de cromatografía de afinidad de Possani et. al. (40) y debido a que no fué posible reproducir -- los resultados de Yamaguchi et. al. (61). Dentro de -- los experimentos control realizados, la liofilización -- resultó el procedimiento de elección para la purifica-- ción de la GAD, pues es posible obtener un buen factor de concentración y no dañar su actividad.

Al final de la concentración con polietilengli-- col se encontró un aumento considerable en la densidad del extracto concentrado de manera que, la pérdida total de la actividad producida por este procedimiento, podría ser debida al paso de monómeros y oligómeros de esta sustancia al interior del tubo de diálisis utili--

zado para la concentración de la GAD. La pérdida de actividad consecutiva a su precipitación por sulfato de amonio puede ser explicada tanto por efectos inhibitorios del ion amonio, como por efectos desnaturalizantes debidos a transiciones bruscas en el pH de la preparación, producidas por la adición del sulfato de amonio. En apoyo de lo anterior, está el hecho de que cuando la precipitación de la GAD se hace por diálisis al equilibrio, que al hacer gradual el incremento en la concentración de sulfato de amonio, minimiza los cambios en el pH, la pérdida de la actividad fué menor.

La GAD precipitada al cambiar el pH de los extractos de 7 a 4.5 podía ser solubilizada en su totalidad al regresar el pH a 7.

Por lo que se refiere a la purificación y de acuerdo con los resultados obtenidos por Wu, et. al. (57), fué posible detectar la presencia de dos formas moleculares de la GAD, después de procesar los extractos crudos de cerebro de ratón por cromatografía de filtración. Una de las formas moleculares apareció en el volumen de exclusión de la columna de Ultrogel AcA 34 y por consiguiente su peso molecular excede de los 350,000 ya que este es el límite de exclusión de la columna utilizada. La otra forma molecular apareció dentro del volumen incluido y mostró un peso molecular de 89,000 (datos no publicados del laboratorio) que coincide con el de 85,000 encontrado por Wu, et. al. (57), para la enzima purificada. Es interesante señalar que cuando los extractos crudos se concentraron mediante el uso de membranas de Amicón bajo presiones considerables

la forma de alto peso molecular de la GAD no fué detectada. Aunque no se conoce la relación que puede existir entre estas dos formas moleculares de la GAD, la forma de alto peso molecular como ha sido sugerido por Wu et. al. (57), podría representar un agregado constituido por diversas moléculas de GAD de bajo peso molecular. De ser este el caso la desaparición de la GAD de elevado peso molecular tras la aplicación de presiones elevadas, podría sugerir que en el supuesto agregado -- las diversas moléculas de GAD se encuentran asociadas a través de fuerzas que en su mayor parte son de baja -- energía. Dado el poco conocimiento que se tiene de la forma de alto peso molecular de la GAD, así como el mayor rendimiento obtenido para la forma de bajo peso molecular, los pasos de purificación subsecuentes se realizaron utilizando exclusivamente la forma de bajo peso molecular.

Como se mencionó en la sección de resultados, -- la purificación obtenida para la GAD fué del orden de -- 137 veces; sin embargo corrigiendo conservadoramente -- por las pérdidas de actividad experimentadas por la GAD obtenida después de la fraccionamiento en DEAE-Celulosa, se podría asegurar que el grado de purificación es mayor de 180 veces, aunque podría ser más elevado. En apoyo de lo anterior puede observarse que los geles de poliacrilamida realizados con diversas preparaciones obtenidas durante la purificación de la GAD, señalan la -- desaparición en la preparación final de GAD obtenida -- después de la cromatografía de fosfato de calcio, de numerosas bandas de proteína presentes en los extractos -- crudos, así como el enriquecimiento considerable de una

banda que aparece en la región del gel en el que se encuentra la GAD. Es claro, sin embargo, que se requiere más trabajo experimental, para lograr una preparación de GAD suficientemente pura, como para poder generar anticuerpos que específicamente se encuentren dirigidos contra esta enzima. El hecho de haber encontrado condiciones que permiten estabilizar a la GAD abre la posibilidad de implementar el presente procedimiento de purificación con nuevos pasos cromatográficos que permitan la obtención de una proteína homogénea.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Albers, R.W., y Brady, R.O., (1959): The distribution of glutamate decarboxylase in the nervous system of the rhesus monkey, J. Biol. Chem., 234:926--928.
- 2.- Awapara, J.m Landua, A.J., Fuerst, R., y Seale, B. (1950): Free Gammaaminobutyric acid in brain. J. -- Biol. Chem., 187:35-39.
- 3.- Bachrach, U. (1960): Metabolism of amines 3. The degradation and synthesis of γ aminobutyric acid by Pseudo monas aeruginosa. Biochem. J., 77: 417-421.
- 4.- Balázs, R., y Cremer, J.D. (Eds.) (1972): Metabolic Compartamentation in the brain. 383 pp. John Wiley and Sons, New York.
- 5.- Barber, R., y Saito, K. (1976): Light microscopic - visualization of GAD and GABA-T in immunocytochemical preparations of rodent CNS, en GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N., y Tower, D.B., eds.) pp. 112-132. Raven Press, New York.
- 6.- Bayón, A., Possani, L.D., y Tapia, R. (1977): Kinetics of brain glutamate decarboxylase. Inhibition studies with N-(5'-phosphopyridoxil) amino acids, J. Neurochem., 29:513-517.
- 7.- Bayón, A., Possani, L.D., Tapia, M., y Tapia, R. -- (1977); Kinetics of brain glutamate decarboxylase.

In teractions with glutamate pyridoxal 5'-phosphate and glutamate pyridoxal 5'-phosphate schiff base. J. Neurochem., 29:519-525.

- 8.- Baxter, C.F. (1970): The nature of γ aminobutyric acid. In: Handbook of Neurochemistry, 3, edited by A. Lajtha, pp. 289-353. Plenum Press, New York.
- 9.- Baxter, C.F. y Roberts, E., (1959): Elevation of γ -gama-aminobutyric acid in rat brain with hidroxyamine, Proc. Soc. Exp. Biol., 101:811-815.
- 10.- Berl, S., Clarke, D.D., y Scheider, D. (Eds) (1975): Metabolic Compartamentation and Neuro-Transmission: Relation to Structure and Function in Brain. Plenum Press, New York (en prensa).
- 11.- Davis, B.J. (1964): Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. NY. Acad. Sci., 121:404-427.
- 12.- Della Pietra, G., Illiano, G., Cpano, V., y Rava. - (1966): In vivo conversion of γ hydroxybutyrate-into. γ aminobutyrate. Nature, 210/733-734.
- 13.- Drummond, R.J., y Phillips, A.T. (1974): L-glutamic acid decarboxilase in non-neuronal tissues of the - mouse. J. Neurochem., 23:1207-1213.
- 14.- Fahn, S. (1976): Regional distribution studies of - GABA and other putative neurotransmitters and their enzymes, en GABA in Nervous System Function (Roberts,

E., Chase, T.N., y Tower, D.B., eds.) pp.169-186. - Raven Press, New York.

- 15.- Fonnum, F. (1968): The distribution of glutamate de carboxylase and aspartate transaminase in subcelular fractions of rat and guinea-pig brain, Biochem. J., 106:401-411.
- 16.- Fonnum, F., Storm-Mathisen, J., y Walberg, F. (1970): Glutamate decarboxylase in inhibitory neurons. A -- study of the enzyme in purkinge cell axons and bou- tons in the cat. Brain. Res., 20:259-275.
- 17.- Fonnum, F., Grofová, I. Rinvik, E., Storm-Mathisen, J. y Walberg, F. (1974): Origin and distribution of glutamate decarboxilase in substantia nigra of the cat, Brain. Res., 71:77-92.
- 18.- Fonnum, F., Walaas, I., y Iversen, E. (1977): Loca- lization of gabaergic, cholinergic and aminergic -- structures in the mesolymbic system. J. Neurochem., 29:221-230.
- 19.- Fuxe, K., Pérez de la Mora, M., Hokfelt, T., Agna- ti, L., Ljungdahl, Å., y Johansson, O. (1977): GABA- DA Interactions and their possible relation to schi- zophrenia, en Psychopatology and Brain Dysfunction (Shagass, C., Gershon, S., y Friedhoff, A. J., eds.) pp.97-110. Raven Press, New York.
- 20.- Haber, B., Kuriyama, J., y Roberts, E. (1969): Decar- boxylation of glutamate by tissues other than brain. Non-identity with CNS GAD. Fed. Proc. 28:577.

- 21.- Haber, B., Kuriyama, K., y Roberts, E. (1970): Mitochondrial localization of a new L-glutamic acid de carboxylase in mouse and human brain. Brain. Res., 22:105-112.
- 22.- Haber, B., Kuriyama, K., y Roberts, E. (1970): L--- Glutamic acid decarboxilase: A new Type in glial ce lles an human brain gliomas. Science, 168:598-599.
- 23.- Haber, B., Kuriyama, K., y Roberts, E. (1970): An - anion stimulates L-glutamic acid decarboxylase in - non neurol tissues. Biochem. Pharmacol., - - - - - 19:1119-1136.
- 24.- Haslam, R.J. y Krebs, H.A. (1963): The metabolism - of glutamate in homogenates and slices of brain cor tex. Biochem. J. 88:566-577.
- 25.- Hornykiewicz, O. (1972): Neurochemis try of parkin- sonims en Handbook of Neurochemistry, Vol. 7 A. Laj- tha, pp. 465-501. Plenum Press, New York.
- 26.- Kim, K., y Tcheu, T.T. (1962): Putrescine- α keto-- glutarate transaminase in E. coli. Biochem. Biophys. Res. commun., 9:99-102.
- 27.- Kuriyama, K. (1976): Subcellular localization of -- the GABA system in brain, en GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N., y Tower, D.B., eds.) pp. 187-196. Raven Press, New York.

- 28.- Lowe, I.P., Robins, E., y Eyerman G.S. (1958): The fluorometric measurement of glutamic decarboxilase and its distribution in brain. J. Neurochem. - - - 3:8-18.
- 29.- Lowry. O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the -- folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 30.- Martin, D. y Miller, L. (1976): Comment on the evidence for GAD II, en GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.H., y Tower, D.F., --- eds.) pp. 57-58. Raven Press, New York.
- 31.- McCormick, D.B., Gregory, M.E., y Snell, E.E. (1961): Pyridoxal phosphokinasa. I. Assay, distribution, -- purification and properties. J. Biol. Chem., - - - 236:2076-2084.
- 32.- Muller, P.B., y Langemann, H. (1962): Distribution of glutamic acid de carboxilase activity in human - brain. J. Neurochem., 9:399-401.
- 33.- Nakajima, T., Kakimoto, Y., Tsuji, M., Konishi, H., y Sano, Y. (1974): Metabolism of polyamines in mammals: Metabolic Pathways of putrescine. Bull. Jap. Neurochem. Soc., 13:174-177.
- 34.- Patel, A.J., Balázs, R., y Richter, D. (1970): Contribution of the GABA bypath to glucose oxidation, and development of compartmentation in the brain. - Nature., 226:1160-1161.

- 35.- Pérez de la Mora, M., Feria-Velasco, A., y Tapia, R. (1973): Pyridoxal phosphate and glutamate decarboxilase in subcelular particles of mouse brain and their relationship to convulsions, J. Neurochem., - 20:1575-1587.
- 36.- Pérez de la Mora, M., Fuxe, K., Hokfelt, T., y - - - Ljungdahl, Å. (1978): Establecimiento de circuitos neuronales en el sistema nervioso central de la rat. Enfoque bioquímico, farmacológico e histoquímico, en temas bioquímicos de actualidad (Piña, E., Peña, A. Chagoya de Sánchez, V., y Martuscelli, T. -- eds.) pp.239-256. U.N.A.M., México, D.F.
- 37.- Pérez de la Mora, M., Fuxe, K., Hokfelt, T., Andersson, K., Possani, L. y Tapia, R. (1980): The gammaergic synapses: distribution and interaction with other neurotransmitter systems in the brain, en --- Simposium: Regulatory Mechanisms of Synaptic Transmission. México City (en prensa).
- 38.- Pérez de la Mora, M., Possani, L.D., Tapia, R., Teran, L., Palacios, R., Fuxe, K., Hokfelt, T., - - - Ljungdahl, Å. (1980): Demonstration of central GABA nerve terminals by means of antibodies against glutamate decarboxilase. Neuroscience., (en prensa).
- 39.- Perry, T.L., Hansen, S., y Kloster, M. (1973): Huntington's chorea, deficiency of γ aminobutyric --- acid in brain. N. Engl. J. Med., 288:337-342.

- 40.- Possani, L.D., Bayón. A., y Tapia, R. (1977): Synthesis of affinity chromatography resins for the purification of brain glutamate decarboxylase. Neurochemical Research. 2:51-57'
- 41.- Roberts, E., y Frankel, S. (1950): γ Aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid. J. Biol. Chem., 23:2637-2649.
- 42.- roberts, E. (Ed.) (1960): Inhibition in Nervous System and Gamma-Aminobutyric Acid 3-591pp Pergamon Press, New York.
- 43.- Roberts, E. (1976): Disinhibition as an organizing principle in the Nervous System. The role of the GABA system. Application to neurologic and psychiatric disorders, en GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N. y Tower, D.B., eds.) - - pp.516-539. Raven Press, New York.
- 44.- Roberts, E., Chase, T.N. y Tower, D.B.(eds.) (1976): GABA in Nervous System Function, 3-539p.p. Raven Press, New York.
- 45.- Salganicoff, L., y De Robertis, E. (1965): Subcellular distribution of the enzymes of the glutamic acid, glutamine and γ aminobutyric acid cycle in rat brain. J. Neurochem., 12:287-309.
- 46.- Sheridan, J.J., Sims, K.L., y Pitts, F.N., Jr.(1967): Brain gamma-amino-butyric-alpha-oxoglutarate transaminase. III. Activities in 24 regions of human brain. J. Neurochem., 14:571-578.

- 47.- Singh, S.I., y Malhotra, C.L. (1962): Amino acid -- content of monkey brain. I. General pattern and --- quantitative value of glutamic acid/glutamine, ga-- mma-aminobutyric acid and aspartic acid. J. Neuro-- chem., 9:37-42.
- 48.- Takeuchi, A. (1976): Studies of inhibitory effects - of GABA in invertebrate nervous systems, en GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N., y Tower, D.B., eds.) pp. 255-268. Raven Press, New York.
- 49.- Tapia, R. y Sandoval, M.E. (1971): Study on the - - inhibition of brain glutamate decarboxylase by pyri- doxal phosphate oxime - o - acetic acid. J. Neurochem., 18:2051-2059.
- 50.- Tapia, R. (1974): The role of aminobutyric acid me- tabolism in the regulation of cerebral excitability In Neurohumoral Coding of Brain Function, edited by R. D. Myers and R.R. Drucker-Colin, pp.3-26. Plenum Press, New York.
- 51.- Tapia, R., y Meza-Rufz, G. (1975): Differences in - some properties of new born and adult brain glutama- te decarboxylase. J. Neurobiol. 6:171-181.
- 52.- Tapia, R., Pasantes-Morales, H., Taborda, E., y Pé- rez de la Mora, M. (1975): Seizure susceptibility - in the developing mouse and its relationship to glu- tamate decarboxylase and pyridoxal phosphate in --- brain. J. Neurobiol. 6:159-170.

- 53.- Tapia, R. y Meza-Ruiz, G. (1976): Changes in some - properties of glutamate decarboxilase activity during the maturation of the brain. Neurochem. Res., 1:133-140.
- 54.- Thomas Su Y., Wu. J. -Y., y Lam M.L., (1979): Purification of L-glutamic acid decarboxilase from catfish brain. J. Neurochem., 33:169-179.
- 55.- Tower, D.B. (1976): GABA and seizures: clinical correlates in man, en GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N., y Tower, D.B., eds.) pp. 461-475. Raven Press, New York.
- 56.- Wu, J.-Y. (1976): Purification, characterization, - and kinetic studies of GAD and GABA-T from mouse -- brain, en GABA in Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N. y Tower, D.B., eds.) pp.7-55. Raven Press, New York.
- 57.- Wu, J.-Y., Wong. E., Saito, K., Roberts, E., y - - Schousboe. (1976): Properties of L-glutamate decarboxilase from brains of adult and newborn mice. J. Neurochem., 27:633-659.
- 58.- Wu, J.-Y. (1977): A comparative study of L-Glutamate decarboxilase from mouse brain and bovine heart with purified preparations. J. Neurochem. - - - - 28:1359-1367.
- 59.- Wu, J.-Y., Chude, O., Wein, J., Roberts, E., Saito, K., y Wong, E. (1978): Distribution and tissue spe-
- ...75

cificity of glutamate decarboxylase. J. Neurochem.,
30:849-857.

- 60.- Wood, J.G., McLaughlin, B.J. y Vaughn, J. E. (1976):
Immonocytochemical localization of GAD in electron
microscopic preparations of rodent CNS, en GABA in
Nervous System Function (Roberts, E., Chase, T.N. y
Tower, D.B., eds.) pp.154-161. Raven Press, New ---
York.
- 61.- Yamaguchi, T., y Mat sumura, Y. (1977): Purifica---
tion of L-glutamate decarboxylase by affinity chro-
matography. Biochimica et Biophysica Acta. - - - -
481:706-711.