

18
Zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"**

**ANALISIS INMUNOLOGICO DE LA
AUXOTROFIA A INOSITOL EN
Neurospora Crassa**

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:

ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

C O N T E N I D O

- RESUMEN.
- INTRODUCCION:
 - FUENTE BIOLÓGICA.
 - Ciclo Vital.
 - MIOINOSITOL 1-P SINTASA.
 - Mecanismos de Reacción.
 - Aldolasas: Tipos y características.
 - Dependencia a NAD.
 - AUXOTROFIA A INOSITOL.
 - Características generales de los auxótrofos que requieren inositol.
 - IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL INOSITOL.
 - ASPECTOS METABÓLICOS DEL INOSITOL.
- ANTECEDENTES.
- OBJETIVOS.
- MATERIAL Y MÉTODO:
 - CULTIVO Y SIEMBRA DE *M. CRASSA*.
 - OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS.
 - OBTENCIÓN DE MIPS A PARTIR DE *M. CRASSA*.
 - ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.
 - Determinación colorimétrica.
 - Determinación microbiológica.
 - PURIFICACIÓN DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA.
 - LOCALIZACIÓN EN GELES DE ACRILAMIDA DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA (ZIMOGRAFIA).
 - Electroforesis.
 - Electroenfoque.
 - INOCULACIÓN DE MIPS PARA OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS.
 - ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO.
 - Inmunodifusión.
 - Inmunotransferencia.
 - Inmunolectroforesis.
- RESULTADOS.
 - PURIFICACIÓN DE LAS DOS FORMAS MOLECULARES DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA.
 - EQUILIBRIO ENTRE LAS DOS FORMAS DE MIPS.
 - CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA.
 - ANÁLISIS DE LA AUXOTROFIA A INOSITOL EN *M. CRASSA*.
- DISCUSIÓN.
- CONCLUSIÓN.
- BIBLIOGRAFÍA.

A B R E V I A T U R A S

MIPS: MIOINOSITOL 1-FOSFATO SINTASA.
INOSITOL 1-P: INOSITOL 1-FOSFATO.
INOSITOL: MIOINOSITOL.
IAA: ACIDO 3-INDOL ACETICO.
G 6-P: D-GLUCOSA 6 FOSFATO.
FSA 20-35%: FRACCION PRECIPITADA AL 20-35% DE SATURACION CON SULFATO DE AMONIO.
NAD : NICOTINAMIN ADENIN DINUCLEOTIDO OXIDADO.
NADH: NICOTINAMIN ADENIN DINUCLEOTIDO REDUCIDO.
TRIS: TRIS HIDROXI-METIL AMINO METANO.
DEAE: DIETIL-AMINO ETIL
G: FUERZA GRAVITACIONAL.
E.C.: EXTRACTO CRUDO.
FII: FSA 55-70%.
FV: FRACCION PRECIPITADA CON SULFATO DE PROTAMINA
UG: FRACCION OBTENIDA DE COLUMNA DE ULTRGEL.

R.E.S.U.M.E.N

SE ESTUDIO LA BIOSINTESIS DE EXTRACTOS CELULARES SOLUBLES DE LA CEPA SILVESTRE DE *N. CRASSA* ENCONTRANDOSE QUE LAS DOS ACTIVIDADES DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA*(E.C.5.5.1.4) QUE SE RESUELVEN EN ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA, CORRESPONDEN A AGREGADOS OLIGOMERICOS DE LA ENZIMA Y NO A ISOENZIMAS.

SE OBTUVO UNA POBLACION DE ANTICUERPOS CON LA QUE SE CARACTERIZO INMUNOLOGICAMENTE UNA COLECCION DE CEPAS MUTANTESINOS DE *N. CRASSA* PROBANDO EN CADA UNA LA PRESENCIA DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA.

SE ENCONTRO ADEMAS QUE EN LA CEPA SILVESTRE LA PRESENCIA DE INOSITOL EN EL MEDIO DE CRECIMIENTO REPRIME LA SINTESIS DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA.

*
Enzima que cataliza la ciclización aldólica de G 6-P a Inositol 1-P.

< INTRODUCCION >

La manipulación de técnicas de la química de las proteínas está convirtiéndose en parte muy importante de la práctica enzimológica. A medida que un número mayor de enzimas son aisladas en estado puro, su caracterización en términos de constitución química y estructural es un paso necesario para un conocimiento más detallado de sus funciones.

Todas las enzimas exhiben diferentes características, que puede pensarse constituyen elementos de la regulación de su actividad en las células vivas. Todas ellas poseen un pH característico que hace posible la alteración de sus velocidades catalíticas con los cambios de pH intracelulares. Las velocidades de todas las reacciones enzimáticas dependen también de la concentración del sustrato y algunas más, precisan de iones metálicos, coenzimas ó cofactores.

Además de estas propiedades comunes a todas las enzimas, algunas de ellas presentan características especiales que les confieren papeles de control del metabolismo y se les llama enzimas reguladoras. Existen dos tipos principales: Las enzimas alostéricas, cuya actividad catalítica es modulada por la unión no covalente de un metabolito específico a un centro de la proteína diferente del centro catalítico y las enzimas moduladas por unión covalente, con formas activas e inactivas interconvertidas por la acción de otras enzimas. Resulta importante este tipo de modulación pues cualquier falla en la actividad, puede no denotar la pérdida de un gene estructural para la proteína en cuestión, ni aún la ausencia de la proteína misma sino la pérdida de la enzima "activante". (Segal, 1973).

Por otra parte, la mayoría de las enzimas que muestran conducta alostérica son oligoméricas, ó tienen pesos moleculares tan altos, que es probable lo sean.

Otro tipo de regulación metabólica está dada por las llamadas isoenzimas, formas múltiples de una enzima que pueden presentarse en una sola especie de organismo e inclusive en una sola célula, que se encuentran codificadas por genes diferentes y por tanto difieren estructuralmente.

Para el estudio de las rutas metabólicas ha resultado de valiosa ayuda, la utilización de microorganismos a los que se ha inducido mutación por radiación, los cuales carecen de una ruta determinada ó de una enzima particular. Así desde que en 1945, G.W. Beadle y E. L. Tatum postularon la relación "un gene, una enzima", en sus estudios de mutantes del hongo *Neurospora crassa*, se abrió un amplio campo para el análisis de las rutas metabólicas en diferentes organismos. Aquellos mutantes que carecen de una enzima que cataliza una reacción específica, pero que al serles suministrado el producto de tal reacción se desarrollan

normalmente, reciben el nombre de mutantes auxótrofos. Estas deficiencias génicas si no son letales provocan la acumulación y excreción del sustrato de la enzima que falla, por tanto, el intermediario no se acumulará en aquel organismo que haya sufrido mutación. (Lenhinger, 1982).

FUENTE BIOLÓGICA.

Neurospora es un género de hongos ampliamente utilizado en biología molecular. De hecho, gran parte de los conocimientos relativos a los aspectos biológicos de la genética se han obtenido a partir de ensayos con *N. crassa* y *N. sitophyla*. (Stagel, 1980)

Taxonómicamente se encuentra clasificado de la siguiente manera:

DIVISION: EUMICETES
CLASE: ASCOMICETES
Subclase: Euascomicetes
Serie: Plectomicetes
ORDEN: XILARIALES
GENERO: NEUROSPORA
ESPECIE: CRASSA

Las especies del género se encuentran en áreas tropicales ó subtropicales creciendo sobre arbustos, árboles y restos celulósicos de plantas.

El valor esencial de *N. crassa* en condiciones de laboratorio es que se trata de un hongo eucariótico, tan fácil de manejar como las bacterias y que puede utilizarse como base de comparación entre procariotes y eucariotes en biología molecular.

N. crassa como heterótrofo puede utilizar acetato, succinato, glicerol, glucosa y otros monosacáridos como fuentes de carbono. El nitrógeno lo obtiene a partir de nitritos, nitratos, amonio y aminoácidos. Además de carbono y nitrógeno, requiere de algunas sales simples, elementos traza y biotina, para un crecimiento vigoroso. (Davis, 1970)

Sus células contienen mitocondrias, retículo endoplasmático con ribosomas, núcleo con membranas típicas y nucleolos, además de varias inclusiones como cristales de ergosterol, gotas de aceite y cuerpos glicógenos. (Shatkin & Tatum, 1959)

Las células se encuentran rodeadas por una membrana doble plasmática y una pared celular formada por polímeros de glucosa, un complejo péptido-polisacárido, quitina y poligalactosamina.

El sistema vegetativo está compuesto por filamentos multinucleados ó hifas, segmentados por paredes transversales ó septos incompletos, con poros de aproximadamente 0.15µ de diámetro en el centro.

Los poros permiten que el citoplasma fluya a lo largo de la hifa, acarreado el núcleo, las mitocondrias y otras inclusiones durante cierta distancia, usualmente en

dirección del crecimiento. El sistema de hifas se conoce como micelio. (Wilson, 1961)

Los núcleos se dividen más activamente cerca de la punta de la hifa. En la mayoría de estas, existe más de un núcleo en cada célula, variando desde tres hasta cerca de cien en ciertas cepas poco comunes.

M. crassa presenta tres formas: dos asexuales (micro y macroconidios) y una sexual (ascosporas). En cultivos de agar, las hifas aéreas crecen a medida que el cultivo madura, dando como resultado grandes masas de macroconidios color naranja. Los macroconidios se utilizan para inocular cultivos de reproducción vegetativa, sirviendo como fertilizador masculino en cruces sexuales. Los microconidios son más pequeños, uninucleados y de muy poca viabilidad, se utilizan en algunos experimentos de mutaciones. Las ascosporas se forman al final del proceso sexual, tal proceso se lleva a cabo en condiciones opuestas a las del crecimiento vegetativo y requiere de la presencia de dos cepas de tipos apareables. (Davis, 1970)

Ciclo Vital.

La parte vegetativa del ciclo de vida de *M. crassa* es haploide y consiste de un micelio multicelular en el cual existen septos perforados, a través de los cuales los núcleos emigran libremente.

Las esporas asexuales son los macroconidios de 6-8 μ de diámetro (Fig. 1) con 1 ó más núcleos y los microconidios uninucleados, de 3-4 μ de diámetro.

Las cepas son morfológicamente hermafroditas y pueden funcionar como gameto femenino ó masculino en los cruces. El órgano sexual femenino es el ascogonio (Fig. 1b), que consiste de un rollo delgado de células oligonucleadas y que termina en una hifa ramificada (tricógina) para constituir un mesocarpo incipiente ó peritecium.

La plasmogamia es un proceso que tiene lugar a través del ataque de una ramificación de la tricógina al conidio (Fig. 1b) u otra célula vegetativa de tipo de apareamiento opuesto.

El núcleo de la célula masculina emigra a través de la tricógina y establece una condición dicariótica en el ascogonio (Fig. 1c), a partir de la cual la hifa ascógena dicariótica se desarrolla dentro de la pared del peritecium en formación. Antes de la fusión nuclear el núcleo parental se divide muchas veces, desarrollando un sistema hifal, al término de éste, dos núcleos se asocian en pares en el vértice del asca donde la fertilización ocurre. (Fig. 1d-g) El núcleo resultante se convierte inmediatamente en dos productos haploides por dos divisiones meióticas y ocho mitóticas, que tienen lugar en la elongación del vértice del asca. El producto final es un asca, con ocho ascosporas. (Fig. 1g-k) (Emerson, 1966)

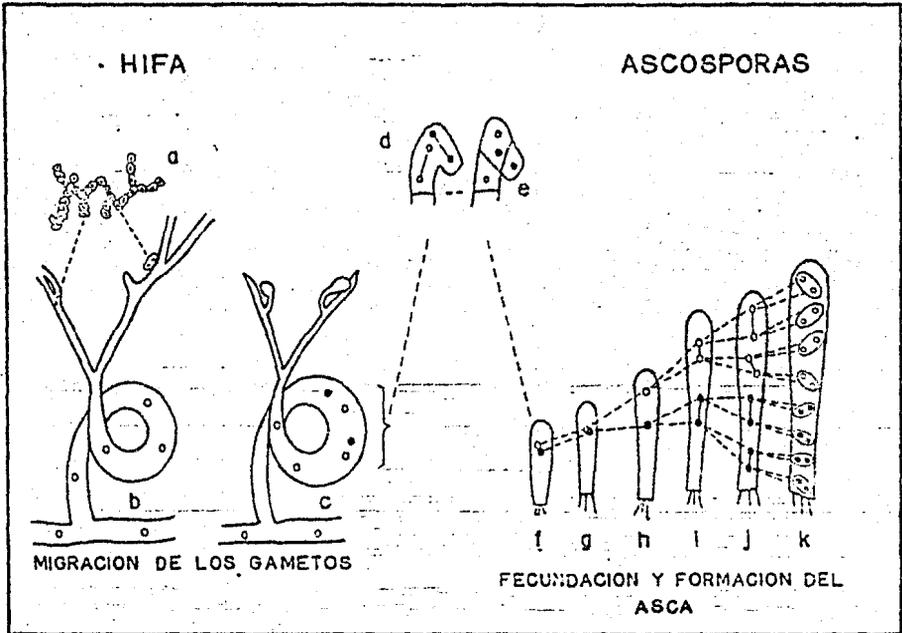


Fig. 1. Ciclo sexual en *Neurospora crassa*. Los puntos negros y blancos representan tipos diferentes de apareamiento. Explicación en el texto.

MIOINOSITOL 1-P SINTASA

TABLA 1. DATOS DE LA ENZIMA

E.C.5.5.1.4.

GLUCOSA 6-P -----> MIOINOSITOL 1-P + NADH

PESO MOLECULAR:

Fuente	Valor	Condiciones
Mucor	3.5×10^5	Centrifugación en gradiente de densidad en sacarosa, -- electroforesis, cromatografía.(Escamilla, 1982).
Glándula mamaria en rata	2.9×10^5	Cromatografía Sephadex G-200 pH 7.2 (Naccarato, 1974)
Testículo de rata	2.1×10^5	Cromatografía Sephadex, pH 7.4 (Barnett & Corina, 1973; Pittner, et al, 1974) Cromatografía Sephadex, electroforesis y sedimentación (Maeda & Eisenberg, 1970)

ACTIVIDAD ESPECIFICA (Unidades/mg proteina/min)

Levadura	2.6×10^{-5}	Tris-acetato pH 7.4 (Chen & Charalampous 1966)
Acer pseudoplatanus	8.8×10^{-5}	Tris-HCL pH 8.0 (Loewus & Loewus, 1971)
Oryza sativa	7.8×10^{-2}	Tris pH 8.0 (Funkhouser & Loewus, 1975)
Testículo de rata	9.7×10^{-2}	Tris-acetato pH 7.4 (Pittner et al, 1974)

ESPECIFICIDAD:

LA ENZIMA ES ESPECIFICA PARA D-GLUCOSA 6-P COMO SUSTRATO

TABLA 1(Cont.)

CONSTANTES DE MICHAELIS:

FUENTE	SUSTRATO	K_M (M)	CONDICIONES
<i>A. pseudoplatanus</i>	D-Glucosa 6-P	1.7 x 10 ⁻³	[Sustrato 4.4 mM] pH 8.0 (Loewus & Loewus, 1975)
<i>O. sativa</i>	D-Glucosa 6-P	1.3 x 10 ⁻³	pH 8.0 (Funkhou - ser & Loewus, 1975)
Glándula mamaria en rata	D-Glucosa 6-P	5.0 x 10 ⁻⁴	pH 7.2 (Naccarato 1974)
Testículo de rata	D-Glucosa 6-P	7.5 x 10 ⁻⁴	[Sustrato= 0.4-8.0 mM] (Barnett & Corina, 1970)

INHIBIDORES

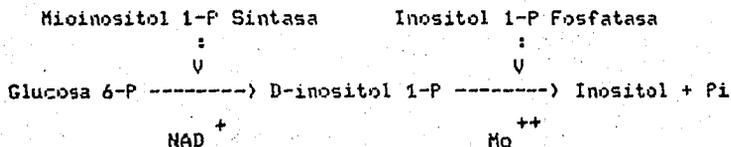
FUENTE	INHIBIDOR	K_I (M)	CONDICIONES
Testículo de rata	2-Deoxi-D G6-P	2 x 10 ⁻⁵	[0.1mM-1mM] pH 7.4 (Barnett & Corina, 1970)
<i>O. sativa</i>	P-GAT*	2 x 10 ⁻⁴	[0.22mM] pH 7.4 (Funkhou - ser & Loewus, 1975)

* P-GAT=6-fosfo N-(1H-1,2,4-triazol-3-il)-glucopiranosialamina

MIOINOSITOL 1-P SINTASA

La ruta metabólica a través de la cual se sintetiza mioinositol a partir de glucosa, así como el patrón que sigue tal conversión, se ha estudiado en sistemas biológicos tan variados como levaduras (Chen & Charalampous, 1966), *Neurospora* (Piña & Tatum, 1967), tejidos gonadales en mamíferos (Eisenberg & Bolden, 1967), plantas superiores (Loewus, 1971) y glándula mamaria en rata (Naccarato, 1974).

En los trabajos anteriores, se demostró que para la liberación de mioinositol, se requiere de la acción de dos enzimas, la primera de ellas toma como sustrato Glucosa 6-P y forma un producto intermediario: D-mioinositol 1-P, que a su vez es hidrolizado a mioinositol por la acción de una fosfatasa específica: La inositol 1-P fosfatasa (Chen & Charalampous, 1966). El aislamiento del intermediario y el requerimiento de dos cofactores (NAD^+ y Mg^{++}) en la reacción total ratificaron la existencia de las dos enzimas (Eisenberg, 1967)



La enzima responsable de la formación del ciclo de glucosa 6-P a mioinositol 1-P ha recibido un gran número de denominaciones: Chen & Charalampous se refieren a ella como Glucosa 6-P Ciclasa; Piña y colaboradores, Inositol 1-P Isomerasa; Barnett & Corina, en su determinación colorimétrica de monofosfatos de inositol, la llaman D-glucosa 6-P-1 Mioinositol 1-P Ciclasa; Loewus, al caracterizar la enzima en plantas superiores la nombra L-glucosa 6-P Cicloaldolasa. Finalmente el Comité de la Unión Internacional de Bioquímica le asignó un número de la Comisión Enzimática (E.C.S.5.1.4.) que corresponde a la enzima tema del presente trabajo y que denominaré Mioinositol 1-P Sintasa a lo largo del mismo.

Mecanismos de Reacción.

Muchos han sido los trabajos destinados a establecer un mecanismo de reacción para la enzima:

Una ciclación directa sin rearrreglo del esqueleto carbonado y con la retención de la configuración de cada átomo de carbono fué propuesta en base a experimentos de marcaje. (Eisenberg, Bolden & Loewus, 1974) Se comprobó además que la enzima utiliza NAD^+ como cofactor, lo que sugiere una oxidación en la que están implicados átomos de hidrógeno. (Eisenberg, 1967; Barnett & Corina, 1968)

Aún cuando los productos intermedios no se han aislado, existen evidencias de que la reacción se origina por la oxidación de D-glucosa 6-P a 5-ceto D-glucosa 6-P que forma, por una reacción de condensación aldólica, L-mioinososa-2,1-P, que se reduce al producto: mioinositol 1-P. (Sherman et al, 1971; Loewus & Kelly, 1962; Barnett & Corina, 1968; Chen & Charalampous, 1967) Fig. 2.

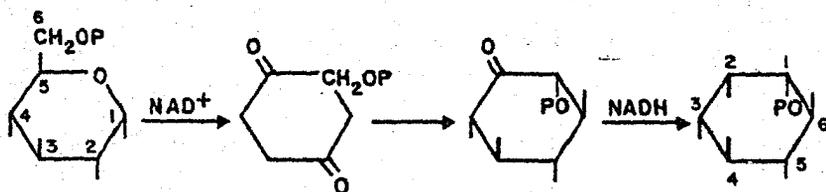


Fig. 2 Condensación aldólica: Aquí se muestra como el NAD^+ oxida la glucosa 6-P a 5-ceto D-glucosa 6-P, la cual da lugar a una condensación aldólica, que produce mioinososa-2,1-P que es reducida por NADH para formar mioinositol 1-P.

La naturaleza del fosfato de inositol formado por el cierre del anillo entre los carbonos terminales de la cadena de glucosa 6-P está determinada por las posiciones relativas asumidas en el espacio por el grupo fosfato y el hidroxilo formado en los carbonos 1 y 2 del anillo del inositol. (Eisenberg, 1967)

El azúcar intermediario y el NADH están fuertemente unidos a la enzima nativa, en un complejo ternario (Barnett & Corina, 1972), pero no se ha podido aún establecer la naturaleza de los puentes enzima-intermediario, ya que en el mecanismo de oxido-reducción, el hidrógeno eliminado durante la reacción es reubicado en el mismo átomo de carbono.

Tomando como base la opinión generalizada de que la formación del ciclo a partir de glucosa 6-P es vía una reacción aldólica, en la cual el intermediario que precede inmediatamente la formación de un enlace carbono-carbono entre el átomo número 1 y 6, es 5-ceto D-glucosa fosforilada, se cuestiona el tipo de aldolasa a la que pertenece la Mioinositol 1-P Sintasa.

Aldolasas: Tipos y características.

Las aldolasas se han dividido en dos grupos: I y II. Las del tipo I fijan su sustrato formando una Base de Schiff y las del tipo II muestran requerimientos metálicos, se piensa que el ión metálico en las aldolasas de este tipo cataliza la reacción formando un puente parcial con el grupo carbonilo del sustrato. Así el complejo ternario formado sería equivalente al intermediario en la Base de Schiff producido en las aldolasas clase I.

La clasificación de las aldolasas fue propuesta por Rutter, quien en 1964, confirmó que existen diferencias fundamentales entre las aldolasas de plantas superiores y animales y aquellas encontradas en hongos y bacterias, dividiéndolas en los grupos I y II respectivamente.

El mismo Rutter, para probar que las aldolasas Clase II no forman Base de Schiff, sugirió la utilización de O_2 en experimentos con enzimas de ambos tipos, en algunos casos el agua de reacción se perdía y tenía acceso a los intermediarios de las aldolasas formadoras de Base de Schiff. Las aldolasas Clase II, no pierden agua, ni intercambian oxígeno con el medio, a menos que la vida media de los intermediarios sea lo suficientemente larga para permitir la hidratación carbonílica.

Estudios de este tipo, permitieron a Sherman en 1977 postular que no hay utilización de O_2 por la Mioinositol 1-P Sintasa a partir del medio enriquecido con este isótopo, lo que combinado con la pérdida de sensibilidad de la enzima por acción de EDTA (Piña, 1978; Loewis, 1973) sugieren una respuesta de tipo II, además de otras propiedades como un realce en la actividad debida al NH_4^+ y un intervalo muy limitado de pH para actividad enzimática.

A pesar de tales estudios, la analogía entre las propiedades de la Mioinositol 1-P Sintasa y las aldolasas de las Clases I y II es sin duda materia de debate, llegándose a pensar que la enzima, no utiliza ninguno de los dos tipos de mecanismos propuestos.

Dependencia a NAD^+

Se han reportado niveles variables de actividad independiente de NAD^+ en extractos crudos y preparaciones parciales de Mioinositol 1-P Sintasa (Barnett, Brice & Corina, 1970; Naccarato, Ray & Wells, 1974; Pittner & Hoffman-Ostenhof, 1974). La enzima extraída de *N. crassa* (Piña & Tatum, 1967), muestra un absoluto requerimiento de NAD^+ , después de algunos pasos de purificación. Escamilla (1982) sugiere que la forma nativa tiene NAD^+ ligado, que se pierde durante la manipulación. Esta actividad "NAD-independiente" es preservada por la acción de sulfato de amonio ó por glicerol durante algunos pasos de la purificación enzimática. (Brunner et al, 1972)

El hecho de que el NAD^+ pueda unirse a la enzima de manera reversible dependiendo de las condiciones de tratamiento, sugiere la existencia de al menos dos formas alternativas de la enzima, las cuales pueden ser funcionales en la célula,

permitiendo así la regulación de su actividad. (Brunner et al, 1972) Una forma se mantiene unida firmemente y es estable, mientras que la otra tiene menor afinidad por el NAD⁺ y es inestable. (Naccarato, 1974)

AUXOTROFIA A INOSITOL

Los trabajos en *Neurospora* iniciados por Beadle & Tatum en 1945 dieron pie a una muy importante generalización: "La gran mayoría de los mutantes incapaces de crecer en un medio mínimo, pero capaces de crecer en un medio suplementado, requieren de una sustancia simple más, que la que necesita el tipo normal silvestre para hacerlo", es decir, son auxótrofos a tal sustancia; sobre ésta base, parece muy probable que la mayoría de las mutaciones afecten sólo un paso metabólico simple, teoría a la que se ha dado en llamar hipótesis de "un gen, una enzima".

Existen varias alternativas (Catcheside, 1966) que refinan la teoría de que un gen es el responsable por una enzima y que proveen de evidencias valiosas sobre la economía metabólica, además de posibles rutas de evolución genética y enzimática.

Esta evolución puede envolver la producción de una nueva actividad enzimática por: a) un diferente grado de agregación de una unidad proteínica ó b) la agregación de dos unidades proteínicas diferentes.

Características generales de los auxótrofos que requieren inositol.

Estos mutantes son incapaces de crecer a menos que el medio de cultivo se suplemente con inositol. En diferentes especies de la familia de los hongos este tipo de organismos exhiben "muerte por pérdida de inositol". (Holliday, 1962)

El hecho de que la "muerte por pérdida ó ausencia de inositol" se observe en variedad de hongos mutantes y cepas, sugiere que el fenómeno está relacionado con el papel del inositol y lípidos que lo contienen durante el crecimiento del hongo. (Donahue, 1978)

Una explicación a este fenómeno desarrollada por Shatkin & Tatum en 1961 basada en sus observaciones de mutantes que requieren inositol en *Neurospora* es que la ausencia de inositol provoca un desbalance entre la tasa de crecimiento de la membrana y la tasa de acumulación de otros constituyentes celulares.

IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL INOSITOL.

Los inositoles constituyen un importante grupo de alcoholes polihídricos presentes en la naturaleza y algunos isómeros de este grupo se encuentran comúnmente en la mayoría de las plantas. (Loewus, 1974)

El más universalmente conocido de los nueve isómeros posibles del ciclohexanoheptol ó inositol, es el mioinositol,

siendo éste el motivo por el cual en biología, al hablar de inositol, se hace referencia a este isómero, que está presente en la mayoría de los tipos celulares con algunas excepciones como *Escherichia coli* (Woolley, 1942).

Los nueve estereoisómeros de inositol consisten de siete formas meso y un par DL. (Fig. 3)

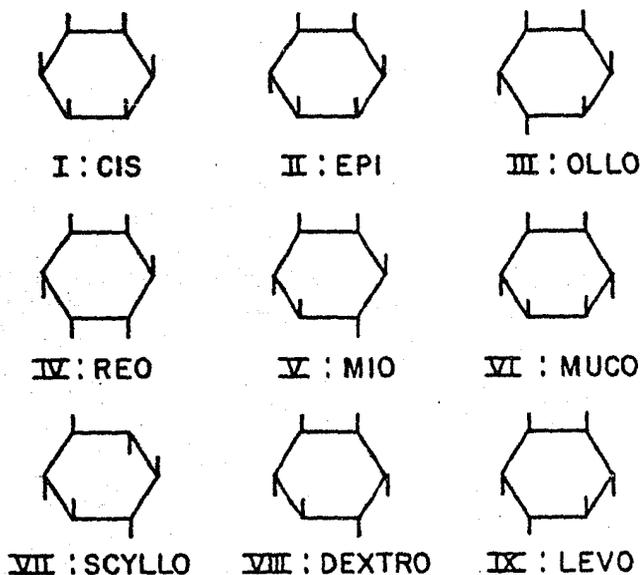


Fig. 3 Posibles estereoisómeros del ciclohexanohexol.

Se ha observado una correlación interesante entre la presencia en la naturaleza de los inositoles y ciclitolos con su estabilidad conformacional (Angyal & Mills, 1952): los 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 mioinositol ha sido reconocido como factor de crecimiento en ciertos organismos, como levaduras. Gavin & McHenry en 1941, sugieren que el inositol se comporta como un agente lipotrópico suplementario, cuando se administra a animales en una dieta libre de grasa y otros agentes lipotrópicos; se cree que el fosfatidilinositol es el agente causal de tal efecto. Al reportarse en 1941, que el inositol cura la alopecia en ratones sometidos a una dieta experimental, se pensó colocarlo dentro de las vitaminas, sin embargo McCormick, Harris & Anderson en 1954, efectuaron

experimentos que comprueban que dietas en las que no se encuentra presente el inositol producen cuadros carenciales y su adición a dietas completas no produce ningún efecto adicional.

En el hombre no se ha demostrado un cuadro de carencia en la dieta del inositol. El hecho de que el inositol no puede ser sintetizado por algunos tejidos animales, es un factor más que nos lleva a pensar que no es una vitamina. (Eisenberg & Bolden, 1965)

Estudios sobre las funciones del inositol, con respecto a la utilización de aminoácidos y nucleótidos (Charalampous et al, 1969) en células KB incapaces de sintetizar inositol, señalan que las células deficientes de inositol no son capaces de incorporar adenosina y guanosina del medio a los ácidos nucleicos, a una velocidad normal. Así mismo se alteran los mecanismos responsables de la acumulación y utilización de aminoácidos por las células. También se sugiere que el inositol interviene como fosfatidilinositol, integrando parte de la membrana celular y quizá como porción integral de un acarreador.

El mioinositol participa en diferentes rutas metabólicas, además de formar parte de otras moléculas de interés fisiológico, como los ésteres fosfóricos del inositol y el fosfatidilinositol.

Entre los ésteres fosfóricos del inositol, destaca el ácido fítico, (éster hexa-cis-ortofosfato de mioinositol) presente en plantas superiores y considerado como la fuente principal de fosfato en semillas maduras y latentes. (Angyal & Russell, 1969)

El fosfatidilinositol es una molécula de ácido fosfatídico a la cual se une el inositol por medio de un enlace éster fosfato. Se le considera como uno de los miembros de los compuestos denominados fosfolípidos ó fosfoglicéridos, su importancia en la membrana ha sido ya señalada.

ASPECTOS METABOLICOS DEL INOSITOL

Las principales vías metabólicas en que participa el inositol, aparecen en la Fig. 4 (a-h):

El principal camino, si no el único para la formación del inositol en las células con capacidad de sintetizarlo, es la síntesis de inositol 1-P a partir de glucosa 6-P, vía Mioinositol 1-P Sintasa, seguida por la formación de inositol libre, paso que cataliza una fosfatasa que requiere de magnesio (Fig. 4 a,b). Se ha reportado la síntesis de inositol fosfato a partir de inositol libre. (Hoffman-Ostenhof, 1958) (c).

La formación de inositol difosforilado a partir del monofosforilado, constituye junto con la reacción anterior, la etapa previa indispensable para la formación del ácido fítico (d). Por otro lado, la síntesis del fosfatidilinositol a partir de inositol y un GMP diglicérido, se considera como el paso anterior a la

formación de difosfoinosítidos y trifosfoinosítidos. (Ballou & Lee, 1966) (e)

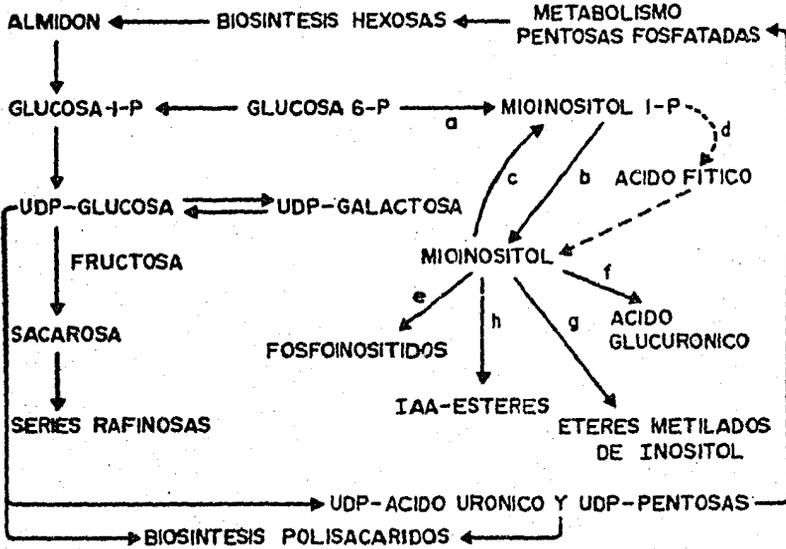


Fig. 4 Esquema de la biosíntesis del inositol y su metabolismo en plantas.

La formación del ácido D-glucurónico a partir de inositol (f), es el principal camino de degradación del mioinositol en animales y plantas.

Charalampous en 1959, describió y caracterizó la enzima presente en el riñón de rata, más tarde demostró que en los mamíferos, el tejido renal es el único capaz de catabolizar y convertir el inositol a dióxido de carbono. (Howard & Anderson, 1967) La misma reacción en plantas ha sido estudiada por Loewus y colaboradores. Señalan que el almacén de carbohidratos en algunas semillas está representado por el ácido fítico y que por medio del ácido glucurónico se forman varios compuestos de importancia para la vida de las plantas: pectina, hemicelulosa, ácido ascórbico y derivados metilados del inositol.

Los éteres del mioinositol y de otros inositoles son muy comunes en plantas. La sugerencia de que estos éteres proveen precursores monoméricos de polisacáridos metilados se debe al mismo Loewus en 1974 (g). Es posible como indica la Fig. 4, que esos productos sean reutilizados en la fuente de inositol por eventos fisiológicos durante el crecimiento de la planta y que en este proceso, los grupos metilo sean llevados para requerimientos biosintéticos en otras partes de la célula vegetal.

Por último, el mioinositol da lugar a los llamados éteres del ácido indol-3-acético (IAA-Inos), que se cree sirven

como fuente indirecta de hormona de crecimiento (IAA*) para la plántula, además de llevar a cabo un posible control sobre la homeostasis hormonal, ya que las enzimas que median la conversión de una forma a otra, pudieran determinar el crecimiento en los vegetales. (Muir, 1972) El IAA-Inos ha sido llamado "precursor" de la hormona de crecimiento (Bandurski, 1978), al detectársele en su migración de la semilla a los meristemas de la planta, esta conversión ha sido propuesta como un sistema de control del crecimiento, además de que la esterificación del IAA protege de la oxidación por proteínas vegetales.

* Acido 3-indol acético.

ANTECEDENTES

En el laboratorio a cargo de Dr. Escamilla y tomando como base los trabajos desarrollados por el Dr. Piña y colaboradores, se ha venido estudiando la biosíntesis del mioinositol en *Neurospora crassa*, estudios que han llevado a la purificación y caracterización de la enzima responsable de la síntesis de mioinositol 1-P (Escamilla, 1982). Se definió que la enzima es una proteína formada por seis subunidades aparentemente idénticas con un peso molecular total de 340,000.

Se encontró que la reacción que cataliza:

Glucosa 6-P -----> Mioinositol 1-P

tiene requerimiento absoluto por NAD^+ y es estimulada por K^+ y NH_4^+

Se cuenta con una colección de cepas mutantes auxótrofas a inositol, encontrándose que varias de ellas carecen de la Mioinositol 1-P Sintasa, mientras que otras, a pesar de contener buenos niveles de actividad muestran auxotrofia a inositol, por lo que se piensa sean mutantes que producen inositol, pero no lo pueden retener por defectos en la membrana*. Otra alternativa con fundamento en los trabajos de Williams, es que algunos auxótrofos para inositol contienen a la Sintasa, pero carecen de la Mioinositol 1-P Fosfatasa, enzima que cataliza la formación de mioinositol libre.

Recientemente y como antecedente directo al trabajo de tesis aquí expuesto, se encontró que al parecer existen dos formas de la Mioinositol 1-P Sintasa, pues en los extractos crudos de la cepa silvestre de *N. crassa* se resuelven en electroforesis en Gel de Poliacrilamida. Las "dos formas" de la enzima resultan claramente distintas en su peso molecular y por tanto surge la pregunta de si se trata de isoenzimas (misma actividad y diferente estructura molecular) ó se trata de agregados moleculares de la enzima que presentan actividad.

Se caracterizará inmunológicamente a la enzima, en base a estas dos especies aparentes en la cepa silvestre, lo mismo que en los mutantes auxótrofos a inositol.

* Mutantes "leaky"

O B J E T I V O S

- i) PURIFICAR LAS DOS FORMAS MOLECULARES DE LA MIOINOSITOL - 1-P SINTASA QUE SE RESUELVEN COMO ACTIVIDADES DIFERENTES EN ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

- ii) DEFINIR SI AMBAS FORMAS CORRESPONDEN A AGREGADOS - OLIGOMERICOS DE LA MISMA ENZIMA, O SI SE TRATA DE ISOENZIMAS.

- iii) CARACTERIZAR IMMUNOLOGICAMENTE UNA COLECCION DE CEPAS MUTANTES INOS^r DE N. CRASSA.

- iv) DETERMINAR EL PAPEL QUE JUEGA EL INOSITOL COMO POSIBLE REGULADOR EN LA SINTESIS DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA DE N. CRASSA.

ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGIA EMPLEADA DURANTE LA
PURIFICACION DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA
DE N. CRASSA

Cultivo en Medio de Vogel (Vogel, 1964)

Cosecha de micelio por filtración y secado por
liofilización

Ruptura mecánica del micelio (Molino 475-a,
A.H. Thomas Co., Scientific Aparatus.)

Extracción del soluble celular con amortiguador

FRACCIONAMIENTO EXTRACTO CRUDO:

- Precipitación con sulfato de amonio
- Precipitación con sulfato de protamina

PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA:

- Filtración molecular: Ultrogel AcA-34
- Intercambio iónico: DEAE-Celulosa
- Intercambio iónico: Hexamtilen-diamino
Sepharosa (ΔH Sepharosa)

PURIFICACION POR ELECTROFORESIS
ELECTROENFOQUE (pH 4-6) POLIACRILAMIDA

IDENTIFICACION Y RECUPERACION DE LA BANDA CORRESPONDIENTE
A MIPs POR ZIMOGRAFIA

INMUNIZACION DE CONEJOS

OBTENCION DE ANTISUEROS

CARACTERIZACION DEL ANTICUERPO

- Inmunodifusión
- Inmunotransferencia, (Towbin, 1979)
- Inmunolectroforesis, (Jurd, 1981)
Cruzada y formación de "cohetes"

CULTIVO Y SIEMBRA DE *NEUROSPORA CRASSA*

Para las determinaciones se utilizó la cepa silvestre - RL21a* y las cepas mutantes (*, alelo): (371, JH5652-a; 926, JER19-a; 3660, 37401-a; 3659, 37401-a; 2063, P4723-A; 669, 37102-A; 2258, 83201-a; 658, 64001-A; 871, JH2626-A; 2144, 37102-a; 2257, 83201-A; 497, 69501-A; 925, QR317-A y 1302, PL882-A) de *Neurospora crassa*, las siembras se realizaron tomando una azada de la cepa y suspendiendo en agua estéril, de la que se tomaron alícuotas que se sembraron en el medio de crecimiento:

200 ml de Medio Vogel 50X (Vogel, 1964)
200 g de sacarosa (azúcar refinada)

en un volumen final de 10 lt con agua destilada

Composición Medio Vogel 50X:

Citrato de sodio	131 g
KH_2PO_4	250 g
NH_4NO_3	100 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 g
Elementos traza	5 ml
Biotina (1 mg/ml EtOH 50%)	2.5 ml

Llevar a 1 litro + 3 ml de cloroformo de preservativo.

Solución Elementos traza:

Acido cítrico	5 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$	1 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
H_3BO_3	0.05 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05 g

Disueltos en 99.5 ml de agua destilada + 0.5 ml de cloroformo.

Una vez sembrados los garrafones, se incubaron con agitación y aereación forzada a 30°C durante 48 horas; las cepas mutantes se crecieron con 10 mg de inositol en el medio. Pasado este tiempo el micelio se cosechó filtrando a vacío y lavándolo con agua destilada, hasta obtener una pasta casi seca que se cortó en rebanadas, se congeló y liofilizó.

* No. de catálogo para el Fungal Genetics Stock Center.

OBTENCION DE EXTRACTOS CRUDOS

Para la obtención de extractos crudos, el micelio molido y seco fué suspendido en amortiguador de extracción (TRIS 0.1M pH 7.7 + EDTA 0.27 mM + β -Mercaptoetanol 5 mM) y centrifugado primero a 22,539 G durante 20 minutos (Sorvall RC-3B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments) y después a 110,000 G por una hora (Beckman L5-50B Ultracentrifuge), el sobrenadante se filtró en Millipore y se dializó vs TRIS 10 mM - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 mM (Amortiguador inicial), en membrana de diálisis Spectropor 4, 12,000-14,000; 10 mm x 100'.

OBTENCION DE INOSITOL SINTASA A PARTIR DE NEUROSPORA CRASSA.

Se extrajo la enzima suspendiendo aproximadamente 100 g de micelio molido y seco en 1 litro de amortiguador de extracción, se centrifugó a 22,539 G durante 20 minutos; el precipitado formado por restos celulares se desechó y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio en polvo hasta una saturación con un intervalo de 55-70% a 0°C (Data for Biochemical Research, 1968). Se permitió la completa precipitación dejando reposar por 10 min y se centrifugó a 19,708 G también por 10 min.

El precipitado se resuspendió con el amortiguador de extracción y se dializó contra el amortiguador inicial durante 20 horas a 4°C = FII.

A FII se le determinó concentración de proteína (Lowry, 1961) y se precipitó con sulfato de protamina 2%, pH 5.5 lentamente y con agitación (0.5 mg sulfato de protamina/ 10 mg de proteína), se centrifugó a 19,708 G durante 10 min. El precipitado se eliminó y el sobrenadante se precipitó con sulfato de protamina al 6% (3 mg de protamina/10 mg de proteína), después de centrifugar en las mismas condiciones, el precipitado se recuperó y resuspendió en NaCl 2M TRIS-HCl 0.1 M pH 7.7 = FIII

Esta FIII se precipitó con una solución saturada de sulfato de amonio hasta una concentración final de 45-70%. Finalmente se centrifugó igual que las fracciones anteriores, el precipitado se disolvió en agua fría y se dializó contra amortiguador inicial = FV.

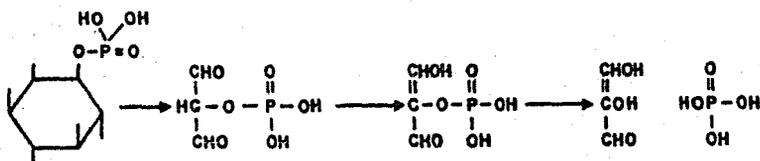
Se determinó concentración de proteína (Lowry, 1961) y actividad enzimática (Barnett & Corina, 1970).

ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se utilizaron dos métodos para la determinación de actividad, el colorimétrico, basado en la degradación selectiva del Mioinositol 1-P por peryodato, que provoca la liberación de fosfato inorgánico y da una medida indirecta de la acción enzimática, y el Microbiológico, que se basa en el crecimiento lineal (hasta cierta concentración) de la cepa STEM B de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de inositol. (Glick, 1959)

Determinación colorimétrica. (Barnett & Corina, 1970)

Método que se basa en la liberación de fosfato por el mioinositol 1-P, al ser degradado por el peryodato, de acuerdo con la siguiente reacción:



mientras que el sustrato (G 6-P) queda covalentemente unido a uno de los productos de la oxidación. El fosfato liberado es determinado colorimétricamente por medio de molibdato-ácido ascórbico en medio ácido.

La reacción se inició con 25 μ l de extracto enzimático, que se incubó durante 1 hora a 30°C con 0.125 ml de medio de reacción para Mioinositol 1-P Sintasa, que contenía G 6-P 0.1M + NAD⁺ 0.01M en NH₄Cl 0.07M-TRIS-HCl 0.5M pH 7.7. Pasado este tiempo se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 20%. Se dividió entonces el incubado, en dos series de 125 μ l.

SERIE MIPS: Se le adicionaron 125 μ l de peryodato de sodio 0.2M.

SERIE FOSFATASA: Se le adicionaron 125 μ l de peryodato e inmediatamente después 250 μ l de sulfito de sodio 1M (la fosfatasa puede generar fosfato a partir tanto del sustrato como del producto, por tanto la diferencia entre ambas series, es la actividad neta de la Mioinositol 1-P Sintasa).

Se incubaron durante 1 hora ambas series a 30°C. Se detuvo la reacción para la Serie MIPS agregando sulfito de sodio. Para determinar el fosfato liberado se agregó 0.5 ml de Reactivo de color fresco [molibdato de amonio 2.5%, ácido ascórbico 10%, ácido sulfúrico 3M y agua (1:1:1:2)], se agitó vigorosamente e incubó durante 1.5 horas a 30°C.

Para conocer la cantidad de fosfato generada durante el ensayo de MIPS (y fosfatasa) se preparó la siguiente curva de concentración de fosfato, a la que también se agregó peryodato, sulfito de sodio y reactivo de color.

KH PO	PATRON FOSFATO (250 µg/ml P)	AGUA	AMORTIGUADOR TRIS-NH ₄ Cl
-	-	75 µl	50 µl
2.5 µg	10 µl	65 µl	50 µl
5.0 µg	20 µl	55 µl	50 µl
7.5 µg	30 µl	45 µl	50 µl
10.0 µg	40 µl	35 µl	50 µl
12.5 µg	50 µl	25 µl	50 µl
15.0 µg	60 µl	15 µl	50 µl

Se leyó a 660 nm en el espectrofotómetro (Bekman, Mod. 35) utilizándose el blanco para ajustar el aparato a Absorbancia 0.

Determinación Microbiológica. (Glick, 1959)

Se proveyó a la cepa STEM B de *Saccharomyces cerevisiae* de los nutrientes para su crecimiento en el siguiente medio de cultivo:

Sols. 1, 2, 3, 4, 5 y agua (10:2:1:1:2:4)

SOLUCION 1.

KH ₂ PO ₄	2.2 g
KCl	1.7 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5 g
MnSO ₄	0.01 g
FeCl ₃	0.01 g
Sacarosa	200.00 g

Para 1 litro.

SOLUCION 2.

Citrato de potasio	100.00 g
Acido cítrico H ₂ O	20.00 g

Para 1 litro.

SOLUCION 3.

Tiamina HCl	10 mg
Piridoxina HCl	10 mg
Pantotenato de calcio	100 mg
Biotina	1 mg
Cloruro de colina	600 mg

Para 100 ml

SOLUCION 4.

Sulfato de amonio 15%

SOLUCION 5.

Hidrolizado de caseína al 10%.

En matraces Erlenmeyer de 50 ml se adicionaron 5 ml del medio de cultivo, dos de ellos fueron utilizados como blancos agregándoles 5 ml de agua, se hizo además una curva de concentración con 2, 4, 6, 8 y 10 μ g de inositol (Myo-inositol U.S.P. CALBIOCHEM).

Las muestras a las cuales se quería determinar la cantidad de inositol presente se incubaron con G 6-P y NAD⁺ (mezcla de reacción) y se les adicionó fosfatasa alcalina (10 mg/ml) para completar la reacción y obtener mioinositol libre. Se agregó entonces al medio de cultivo y se completaron los volúmenes a 10 ml con agua destilada.

En seguida se esterilizaron a 15 lbs (T=120°C) durante 15 min.

Quando los matraces se enfriaron se inoculó cada uno con una suspensión de levadura (*Saccharomyces cerevisiae* 1 ml/matraz) y se incubaron a 30°C con agitación, durante 16 horas, el contenido de cada matraz se leyó en el espectrofotómetro a 600 nm, utilizándose los blancos para ajustar el aparato a Absorbancia 0.

PURIFICACION DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA.

A partir de la llamada FV (fracción V) con una concentración de aproximadamente 70 mg/ml (Ver OBTENCION DE MIOINOSITOL 1-P SINTASA), se continuó la purificación de la enzima utilizando:

- i) Columna Ultrogel AcA-34 (LKB Produkter AB, Sweden)
- ii) Columna DEAE-Celulosa (Whatman De52)
- iii) Columna Δ H Sepharosa (δ -hexil)

i) La columna de UltrageI ACA-34 (exclusión molecular) de 90 cm de largo x 2.5 de diámetro, se empacó por sedimentación a 4°C, según las instrucciones del fabricante; se equilibró con amortiguador inicial y se le aplicó la FV, usando una velocidad de flujo de 30 ml/hr (MultiStatic Pump, Buchler Inst.) en cromatografía ascendente. Se colectaron fracciones de 4.5 ml, obteniéndose el perfil de proteína mediante un sensor de U.V. (BIORAD Laboratories, Mod. 1300).

Las fracciones que contenían al menos un tercio de la actividad máxima, fueron combinadas y aplicadas a la siguiente columna.

ii) La columna DEAE-Celulosa, fué montada bajo presión (5-10 lbs/pg²) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se equilibró con 10 volúmenes de amortiguador inicial en relación a la cama de la columna (22 cm de largo x 2 cm de diámetro). Se adsorbió la proteína a una velocidad de 20 ml/hr (MultiStatic Pump, Buchler Inst.). El material no adsorbido se lavó con amortiguador inicial hasta su total eliminación. En seguida se recuperó la proteína haciendo pasar a través de la columna un gradiente lineal de 25-200 mM de sulfato de amonio. Se colectaron los tubos y se determinó actividad. Las fracciones que respondieron al ensayo de actividad se reunieron y dializaron vs amortiguador inicial durante 4 hrs a 4°C.

iii) La columna de Δ4 Sepharosa (sólo se utilizó para la purificación de algunos lotes) de 2 cm de diámetro x 22 cm de largo se empacó según las instrucciones del fabricante, se equilibró con amortiguador inicial, se aplicó la muestra, se lavó y eluyó con sulfato de amonio del mismo modo que la columna anterior, se dializó vs amortiguador inicial y se determinó actividad.

LOCALIZACION EN GELES DE ACRILAMIDA DE HIDINOSITOL 1-P SINTASA (ZIMOGRAFIA) EN NEUROSEDRA-CRASSA.

Para un gel de 1.5 mm de grosor por 12 cm de longitud se utilizaron como máximo 20 mg de proteína para extractos crudos y 150 µg de proteína purificada en el mínimo volumen posible.

Electroforesis.

Para gel nativo al 10% se utilizó el sistema discontinuo (Davis & Canalco, 1964) a pH 9.0.

Las placas se prepararon lavándolas perfectamente en Photo Flow al 0.05%, antes de montarlas con separadores de 1.5 mm y de sellarlas con agar noble al 1.5%.

Los geles de resolución (10%) y de concentración (4.5%) se prepararon de la siguiente forma:

	RESOLUCION (20 ml)	CONCENTRACION (10 ml)
Agua bidestilada	8.24 ml	6.0 ml
Persulfato de Amonio 10%	0.10 ml	0.10 ml
Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0.8%	6.66 ml	1.50 ml
TRIS-HCl 1.5M pH 8.9	5.00 ml	-
TRIS-HCl 0.5M pH 6.7	-	2.50 ml
N,N,N',N'-Tetratilendiamina (TEMED)	0.01 ml	0.005 ml

La proteína se mezcló con azul de bromofenol al 0.05% (en glicerol 50% con amortiguador TRIS-HCl 0.5M pH 6.7) en una relación 1:10. El amortiguador de electrodos fué TRIS-Glicina pH 8.3.

Se aplicó una corriente de 15 mAmps hasta que el frente del colorante rebasó el gel concentrador, entonces se aplicó una corriente de 30 mAmps hasta que terminó la corrida.

Electroenfoque.

Se utilizó el sistema Multiphor LKB2117 con un gradiente final de pH entre 4.5-6.0, las placas se montaron en el mismo sistema, con separadores de 1.5 mm. El gel se preparó con las siguientes soluciones:

Solución Stock Acrilamida 29.1%	10 ml
Solución Stock Bisacrilamida 0.9%	10 ml
Anfolinas 4-6	2.25 ml
Glicerol 87% v/v	7 ml
Agua destilada	30.75 ml
Persulfato de amonio al 10%	1.50 ml

Se corrieron dos placas cada vez, aplicando una corriente de 30 mAmps constante, hasta que el voltaje subió a 1500 volts, entonces se dejó correr tres horas más. Los amortiguadores para el cátodo y el ánodo fueron respectivamente β -alanina 0.1M y ácido glutámico 0.1M en ácido fosfórico 0.5M.

INOCULACION DE MIOINOSITOL 1-P SINTASA PARA OBTENCION DE ANTICUERPOS.

Las muestras corridas en electroenfoque se marcaron con fluorescamina (9.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) para su rápida localización, la banda fluorescente que mostró actividad se homogeneizó con solución salina pH 7.3 y se inyectó subcutáneamente en conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 3 kg de peso, el proceso se repitió cada semana durante 1 mes y después cada 15 días.

El primer sangrado se llevó a cabo quince días después de la inoculación y posteriormente cada ocho días hasta obtener un título alto.

PREFARACION DE ANTICUERPOS.

La sangre colectada de la vena marginal del conejo (20-30 ml) cada vez se dejó reposar durante 3 horas, tiempo en que se eliminó el coágulo y se centrifugó diez minutos a baja velocidad (1,000 RPM), el sobrenadante se centrifugó dos veces más y finalmente el suero así obtenido se guardó en alícuotas de 1 ml y se conservó congelado.

ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO (ANTIMIPS)

El anticuerpo se utilizó para comprobar su especificidad contra el antígeno por diferentes métodos:

a) Inmunodifusión.

Utilizamos 4 mg de anticuerpo vs 0.8 mg de antígeno (extracto crudo), en placas montadas con agarosa al 1% en amortiguador de Barbitol (2.76 g de ácido 5,5' dietilbarbitúrico, 15.4 g de 5,5' dietilbarbiturato de sodio, 0.15 g de tiomersal -----) 1 litro con agua destilada) pH 8.6 hasta una clara definición de las bandas de precipitación, las placas se secaron a 30°C, se tiñeron con Ámido Black 0.1% y se eliminó el exceso de colorante con ácido acético al 5%.

b) Inmunotransferencia. (Towbin, 1979)

La porción del gel que se corrió en electroforesis y que se quería transferir, se colocó sobre papel Sartorius (Acetato de Celulosa, Poro 0.45 μ), previamente remojado en ácido acético al 0.7%. Se colocó además, detrás de la nitrocelulosa papel filtro, para determinar que cantidad de proteína se escapaba durante la transferencia del papel. Se colocó dentro de la cámara (Gel Destainer Power Supply DPS, Pharmacia Fine Chemicals) y se aplicó una corriente de 36 V, durante 45 min.

Para la identificación se incubó el papel durante toda la noche en albúmina 3% en PBS-TWEEN 80 0.3% (PBS=NaCl 0.14M + Na_2PO_4 10 mM pH 7.0), se lavó cinco veces con PBS-TWEEN 80 y se incubó con el anticuerpo específico (ANTIMIPS 10 μl en 2 ml de albúmina 0.5% en PBS) durante 20 horas, entonces se lavó de nuevo y se incubó con un segundo anticuerpo [Antiperoxidasa IgG (1 μl en PBS)].

Se lavó con PBS y se reveló con cloronaftol 0.03% en metanol + 45 ml de PBS + 50 μl de H_2O_2 .

c) Inmunolectroforesis. (Jurd, 1981)

Utilizamos placas de vidrio que sirvieron como soporte para los geles de agarosa. 2 gramos de agarosa (BIORAD) se calentaron con 98 ml de amortiguador de Barbitol pH 8.2 (12 g de 5,5' dietilbarbiturato de sodio + 4 g de 5,5' ácido dietilbarbitúrico + 0.15 g de tiomarsal -----) 1 litro) en baño maría. El agar así preparado se dejó caer sobre la placa hasta formar una capa homogénea. Ya seca, se hizo un corte en forma de canal en paralelo a la dirección del campo eléctrico y a cada lado de éste un pequeño pozo, donde se colocó la(s) muestra(s). Las cámaras donde se ubican los electrodos se llenaron con amortiguador de Barbitol y se colocaron puentes con papel filtro, de la placa al amortiguador. Se aplicó una corriente de 15 mAmp por placa. Una vez terminada la electroforesis, se eliminó el gel en la parte del canal y se relleno con anticuerpo, las placas se dejaron reposar toda la noche en cámaras húmedas, hasta la formación de los arcos de precipitación. Se lavaron los geles con solución salina al 0.9%, se secaron y tiñeron como en el caso de la inmunodifusión.

Además de esta técnica, usamos el mismo principio modificado en forma de la llamada "inmunolectroforesis cohete" e "inmunolectroforesis cruzada" (Jurd, 1981), en éstas el anticuerpo forma parte del gel donde corren las proteínas y al formarse el complejo antígeno-anticuerpo se forman picos o "cohetes", según la cantidad de proteína presente. Se utilizaron a manera de titulaciones.

RESULTADOS

1) PURIFICACION DE LAS DOS FORMAS MOLECULARES DE LA MIOINOITOL 1-P SINTASA.

Teniendo como antecedente que en los extractos crudos de la cepa silvestre de *M. crassa* fraccionados en electroforesis en gel de poliacrilamida, se resuelven dos picos de actividad para MIPS, se intentó la purificación de ambas formas para definir si correspondían a agregados oligoméricos distintos de una misma enzima, ó se trataba de isoenzimas.

Como primer paso en la separación de ambas actividades, se utilizó el método de fraccionamiento por "salado" con sulfato de amonio, precipitando la proteína en diferentes fracciones del 0 al 80% de Saturación.

Al determinar la actividad total a cada una de las fracciones obtenidas, encontramos dos picos: el primero en la fracción 20-35% de Saturación y el segundo en la fracción 55-70% (Fig. 5) que representan respectivamente el 7.39% y el 58.38% de la actividad total obtenida para el extracto crudo (AI=541.2).

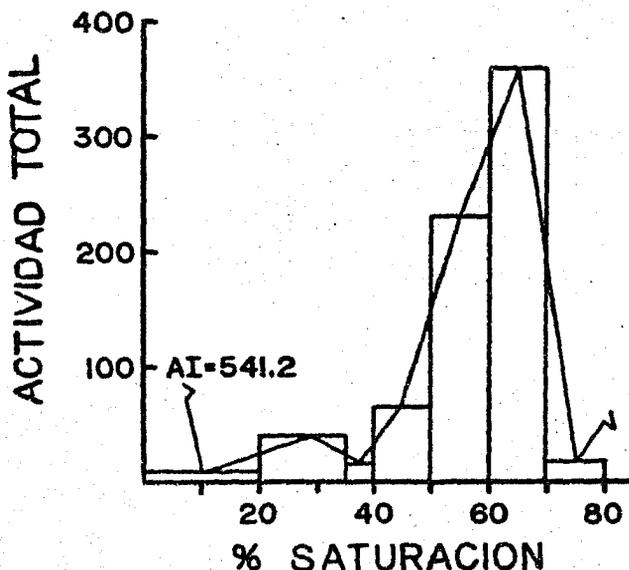


Fig. 5 Perfil de actividad para la Mioinositol 1-P Sintasa (600° nm) en las fracciones precipitadas con sulfato de amonio a partir del extracto crudo en la cepa silvestre de *M. crassa*. La actividad fue estimada por el método microbiológico descrito en métodos.

Antes de continuar con el tratamiento a cada una de estas actividades, se procedió a determinar la confiabilidad del análisis zimográfico, experimento base en cuanto a la detección de las bandas activas en el extracto crudo. Para hacerlo se corrieron dos geles, cada uno con 0.8 mg de proteína/cm de extractos crudos de la cepa silvestre y una mutante INOS⁻ en una placa de acrilamida al 10% (1.5 x 100 x 120 mm). Terminada la electroforesis el gel se cortó en bandas transversales de 2 mm. Cada rebanada se incubó en mezcla de reacción para MIPS durante 1 hora a 30°C y se determinó el inositol formado por el método colorimétrico y microbiológico (Fig. 6). Ya que cada cepa mutante sirve como control del ensayo de MIPS en el gel de acrilamida, podemos estar seguros de que los máximos encontrados en la cepa silvestre corresponden a actividad de MIPS.

Al analizar la actividad en el intervalo de saturación 20-35% encontramos serias dificultades para continuar con la purificación, por lo que para tratar de encontrar la correspondencia de esta actividad con alguno de los picos presentes en los extractos crudos, se fraccionó la proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida, se le determinó actividad por el método microbiológico y se comparó con el zimograma de la fracción 55-70% tratada del mismo modo (Fig. 7).

Este análisis reveló la presencia de las dos formas moleculares en la fracción 55-70%, aun cuando esperabamos solamente una; mientras que la misma determinación para la fracción 20-35% muestra un barrido completo sin definición de picos de actividad.

Se intentó purificar la 75A20-35%, sometiéndola a cromatografía en columna (Ultrogel AcA-34) a fin de encontrar una segunda forma enzimática; sin embargo, después de determinar actividad por microbiológico, encontramos que al igual que en el fraccionamiento por electroforesis, no existe una zona donde podamos localizar claramente la enzima.

Esto nos sugiere que la actividad que consideramos perteneciente a una segunda especie de MIPS, se pierde durante el fraccionamiento ó que los datos de actividad en esta fracción no corresponden a la presencia de la enzima, sino a un artefacto producido por alguna molécula que desconocemos y que podría estar sirviendo como fuente de inositol en la determinación microbiológica.

Ya que encontramos las dos formas de la enzima a partir de la fracción que precipita en el intervalo de 55-70% de Saturación con sulfato de amonio, se siguió trabajando con ésta, tratando de contestar la pregunta de si existe un estado de equilibrio entre ambas especies.

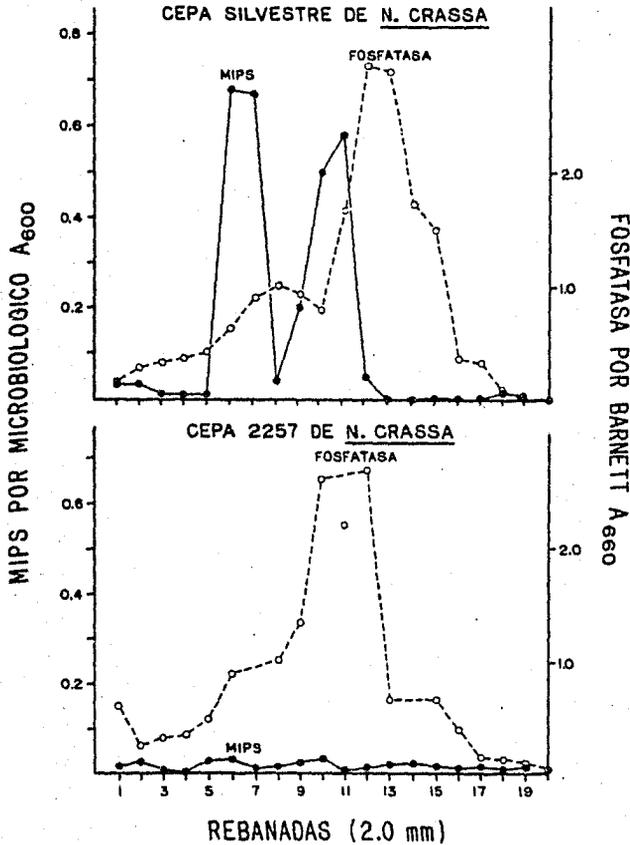


Fig. 6 Zimogramas de los extractos crudos de las cepas silvestre y 2257 (INOS⁻) de *N. crassa*, después de su fraccionamiento por electroforesis en gel de poliacrilamida. Se aplicaron 0.8 mg de proteína/cm a una placa de acrilamida al 10% (1.5 x 100 x 120 mm). Al término de la electroforesis el gel se cortó en rebanadas transversales de 2 mm. Cada rebanada se incubó en mezcla de reacción para MIPS durante 1 hora a 30°C y se determinaron los valores de actividad por el método microbiológico (600 nm) y colorimétrico [(660 nm) MIPS y Fosfatasa].

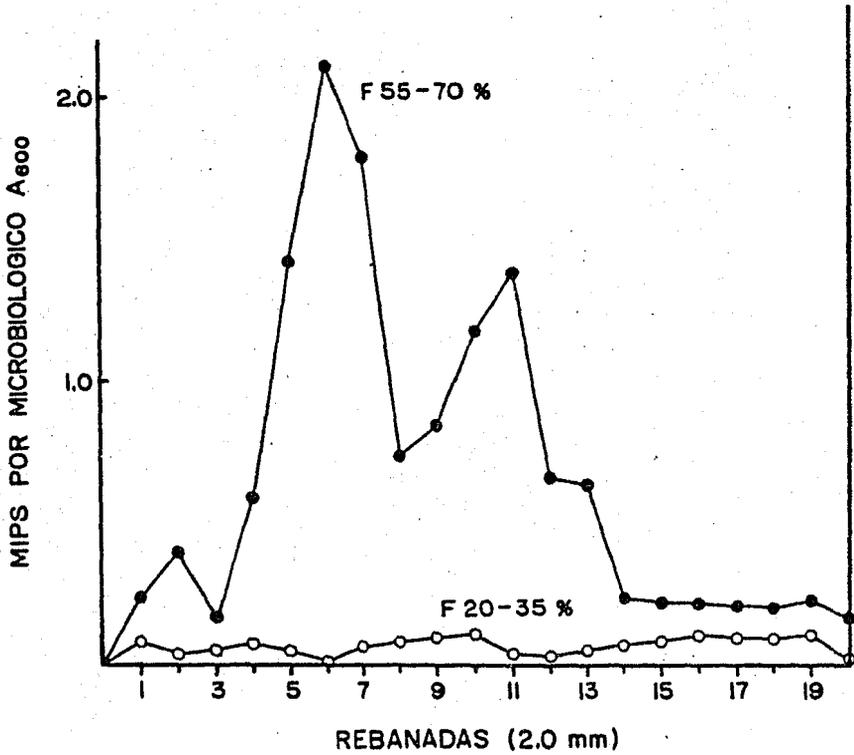


Fig. 7. Zimograma comparativo de la actividad encontrada en las fracciones 20-35% y 55-70% de la cepa silvestre de *M. crassa*. Este gel se corrió bajo las mismas condiciones que se refieren en la figura anterior.

...../

II) EQUILIBRIO ENTRE LAS DOS FORMAS DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA.

Al someter a electroforesis los extractos crudos y FII (FSA55-70%) de la cepa silvestre, encontramos las dos formas moleculares de la MIPS, ¿era ésta condición, resultado del procedimiento de extracción ó existe un equilibrio entre ambas especies?

Para responder a la primera pregunta se prepararon extractos crudos, en donde variamos la composición del amortiguador de extracción, utilizando todas las variables posibles:

- a) Amortiguador extracción normal.
(TRIS 0.1M + β -Mercaptoetanol 5mM + EDTA 0.29M)
- b) Amortiguador extracción s/EDTA
- c) Amortiguador extracción s/ β -Mercaptoetanol
- d) Amortiguador extracción TRIS 0.01M

Utilizamos las mismas concentraciones que en el Amortiguador Normal para el resto de los componentes. Los extractos así preparados se sometieron a electroforesis, encontrándose en cada uno de ellos el mismo patrón de actividad con dos máximos, aunque con variaciones en la proporción del segundo: (2.2 ± 0.2 cm).

Ya que durante la manipulación para la obtención de extractos crudos, al parecer no inducimos la disociación de la enzima se pensó que a concentraciones altas de proteína, la enzima tendería a formar "agregados" y que a mayor dilución se promovería la disociación.

Considerando que contamos con muestras que presentan dos actividades y que las técnicas de concentración que podríamos haber utilizado (secado y concentración con sacarosa), disminuyen la actividad de la enzima, se decidió tomarlas como patrón, tratando de producir una mayor disociación por dilución y provocar entonces un incremento en la magnitud del segundo pico, que corresponde a la especie de menor peso molecular.

A partir de un extracto crudo con 22.5 mg de proteína/ml, preparamos una muestra con la mitad de esta concentración y se corrieron ambas en electroforesis.

Los geles se cortaron cada 2 mm y se les determinó actividad por el método microbiológico. En la Fig. 8 se encuentran los datos encontrados para ambos extractos.

Las dos muestras revelan dos máximos de actividad de proporciones semejantes. Lo que podría indicar, a reserva de repetir el experimento a diluciones mayores que la utilizada, que ambas especies se presentan independientemente de la concentración de proteína.

Ya que al parecer las dos formas de MIPS no se encuentran influidas ni por las condiciones de extracción, ni por la concentración de proteína, se buscó un posible estado de equilibrio entre ambas.

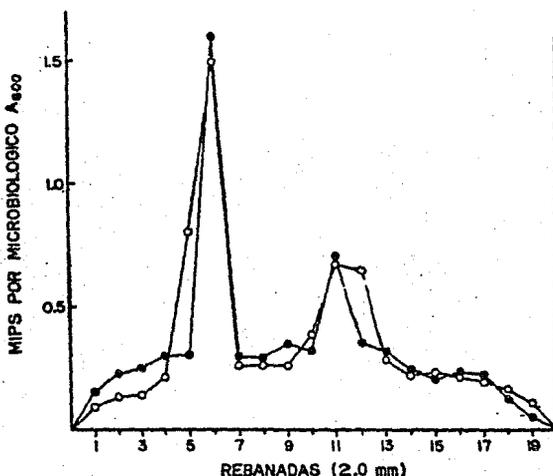


Fig. 8 Zimograma de la actividad de MIPS, en función de la concentración proteínica de extractos crudos de la cepa silvestre de *N. crassa*. Este gel se corrió bajo las mismas condiciones, que se refieren en la figura anterior.

Quedaba por saber si existe un estado de equilibrio entre las dos formas activas de la enzima en la cepa silvestre, de ser así eliminaríamos la hipótesis planteada de que pudieran ser isoenzimas; se corrió un gel de poliácridamida con extracto crudo de esta cepa y se cortó cada 2 mm, guardando una porción de cada rebanada para someter las bandas activas a una segunda electroforesis. Los datos de actividad para el primer gel corresponden al zimograma señalado en la figura 6 de la cepa silvestre.

Las porciones correspondientes a los máximos de actividad y que se resolvieron en los tubos 6, 7 y 10 se corrieron en una segunda electroforesis. En la fig. 9 aparece el bandeó de los fragmentos que presentan actividad de MIPS en el gel que se sometió a la primera electroforesis con extracto crudo de la cepa silvestre.

Los carriles marcados como 6, 7 y 10 se analizaron por duplicado, mientras que los señalados como 14, 17, 18 y 19 corresponden a los cortes finales del gel, donde se ubica la enzima fosfatasa, graficada en la figura 6. No se tomaron los tubos 11, 12 y 13 porque en esta zona las enzimas se traslapan.

En esta segunda electroforesis, encontramos que la primera banda (Tubos 6-7), que se resuelve a los 1.2 ± 0.2 cm permanece constante y que además da lugar a una segunda banda a los 2.2 ± 0.2 cm; mientras que la otra banda activa (Tubos 10-11) se mantiene, resolviéndose de nuevo a la misma distancia (2.2 ± 0.2 cm) más no forma una segunda especie.

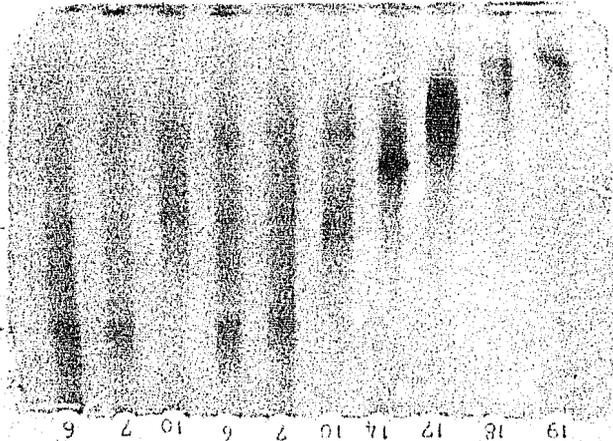


Fig. 9. Tinción con azul de Coomassie de la segunda electroforesis de los fragmentos activos para MIPS en extractos crudos de *M. crassa*. La distancia que ocupó cada rebanada en el primer gel es igual al número del tubo por 2 mm. Estas rebanadas fueron escogidas en base al criterio de actividad encontrada por zimografía en la cepa silvestre (Fig. 6).

En base a este experimento, observamos que la banda activa de alto peso molecular (que se resuelve a los 1.2 ± 0.2 cm) da lugar a una nueva forma, que probablemente corresponda a un oligómero de menor peso molecular, ya que en el segundo gel se ubica a la misma distancia que la forma activa de bajo peso molecular (2.2 ± 0.2 cm); sin embargo resultaría necesaria la comparación entre los zimogramas de ambos geles, pues en nuestro caso, sólo estamos comparando actividad contra tinción, por lo que no podemos afirmar que la segunda banda que aparece a partir de la especie de alto peso molecular presente actividad de MIPS.

....

CARACTERIZACION INMUNOLOGICA.

A fin de obtener una población de anticuerpos específicos contra la Miosinotol 1-P Sintasa, se llevaron a cabo una serie de purificaciones por el método descrito, hasta obtener después de la columna de DEAE-Celulosa, una banda doble que al someter a electroenfoque, resultó fácil de separar.

La enzima presentó una actividad específica promedio de 30 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$ al inyectarse a los conejos. Además de la actividad específica, se le determinó el punto isoelectrico a partir de la banda localizada en el electroenfoque. Como muestra la Fig. 10, el valor encontrado para el punto isoelectrico es de 5.40 en un gradiente de pH 4-6, valor muy cercano al reportado por Escamilla de 5.05, utilizando un gradiente de 3-9 en 1982.

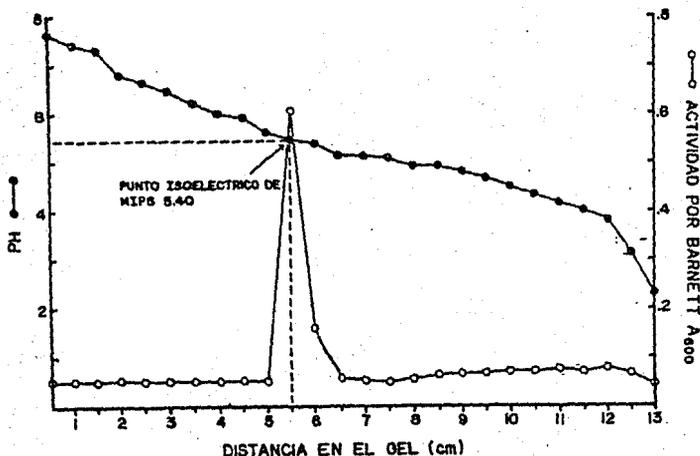


Fig. 10 Determinación del Punto isoelectrico de MIPS a partir de su fraccionamiento por electroenfoque. Se aplicaron 0.15 mg de proteína/cm de la muestra purificada (DEAE-Celulosa) marcada con fluorescamina 9.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, en una placa de acrilamida al 5% ($1.5 \times 190 \times 150 \text{ mm}$), utilizando el sistema Multiphor, con un gradiente final de pH de 4-6. Terminada la separación por electroenfoque, el gel se observó a U.V. y cortó cada cm, cuidando de conservar en una sola rebanada la banda fluorescente. Cada banda se mantuvo en agua durante 3 horas y se determinó pH. Pasado este tiempo las porciones del gel se incubaron 1 hora en mezcla de reacción para MIPS y se determinó actividad por Barnett (660 nm).

Una vez comprobado que la banda localizada en electroforesis correspondía a la enzima, se homogeneizó con solución salina y se inyectó a los conejos. De acuerdo con la metodología de inmunización descrita en el capítulo correspondiente y al cabo de tres semanas de la primera administración de antígeno se procedió a la caracterización del antisuero. Las pruebas de inmunodifusión muestran (Fig. 11) un título alto de anticuerpo. En esta figura se ilustra la aparición de un precipitado blanco entre las celdillas del antisuero y el antígeno, lo que indica la presencia del anticuerpo activo en el suero.

El grupo I corresponde al suero obtenido tres semanas después de la aplicación del antígeno contra las FV, UG Y DEAE en las celdillas 2, 4; 1, 3 y 5 respectivamente.

El grupo III corresponde al suero obtenido cuatro semanas después de la aplicación del antígeno contra las mismas fracciones que el grupo anterior. La celdilla 6 de ambos grupos no contenía antígeno.

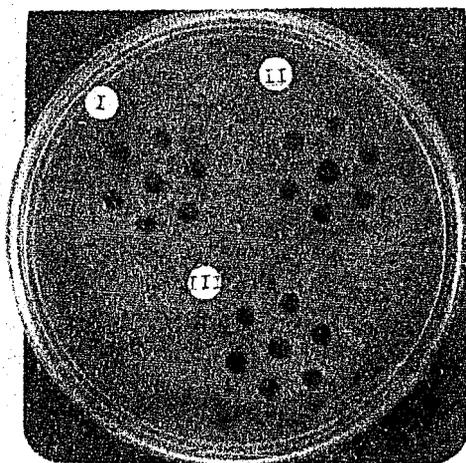


Fig. 11 Inmunodifusión de los antisueros obtenidos después de tres y cuatro semanas de la aplicación del antígeno a los conejos, contra diferentes fracciones de la purificación de MIPS en la cepa silvestre de *N. crassa*. En los grupos I y III se aplicaron 2 mg de antígeno: celdas 1, 3 = UG; 2, 4 = FV y 5 = DEAE-Celulosa. En el grupo II se titularon los antisueros I y III contra extracto crudo, utilizando las siguientes diluciones: Celdas 1, 4 Antisueros I y III respectivamente sin diluir, celdas 2, 5 dilución 1:1 y celdas 3, 6 dilución 1:5. Se mantuvieron en cámara húmeda durante 24 horas tiempo en que precipitó el complejo antígeno-anticuerpo.

.....

En el grupo II se utilizó extracto crudo en la celdilla central contra diferentes diluciones de los antisueros anteriores, a manera de titulación obteniendo respuesta en las celdas 1 y 4 correspondientes a los antisueros sin diluir, siguiendo la dirección de las manecillas del reloj las celdillas contenían diluciones de 1:1 y 1:5, en las que no hubo respuesta.

Para definir la especificidad del anticuerpo obtenido se llevaron a cabo pruebas de inmunotransferencia e inmunolectroforesis.

En el caso de la inmunolectrotransferencia, se corrieron geles con 0.8 mg de proteína/cm y se transfirieron durante 45 min. Como se explica en material y métodos, se colocó papel filtro detrás del papel de nitrocelulosa para determinar la cantidad de proteína que se escapa de la electrotransferencia. (Fig. 12a); el papel adsorbente se saturó con albúmina bovina para bloquear toda la capacidad

3659 3660 658 S 925 3659 3660 658 S 925

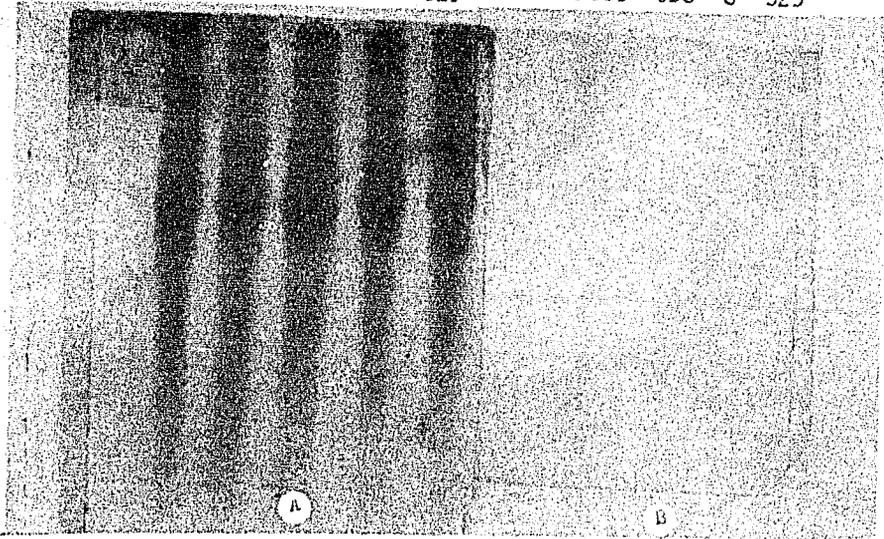


Fig. 12 Tinción de la electrotransferencia de extractos crudos de la cepa silvestre (S) y mutantes INOS⁻ (3659, 3660, 658 y 925) de *N. crassa* e identificación de la banda correspondiente a MIPS por medio de su antisuero.

Se corrió un gel de acrilamida al 10% con 0.8 mg de proteína/cm de cada una de las cepas y se sometió a electrotransferencia durante 45 min.

A) Tinción con Amido Black de la proteína que se fija durante la transferencia.

B) Identificación de las bandas correspondientes a MIPS, una vez incubadas con antisuero específico y antiperoxidasa, reveladas por la reacción colorida del cloronaftol.

....!

de enlace adicional sobre la nitrocelulosa e inmovilizar el antígeno (Towbin, 1979), entonces el anticuerpo específico se unió y se detectó por un segundo anticuerpo (Antiperoxidasa) dirigida contra las inmunoglobulinas del primer suero, finalmente se reveló con cloronaftol (Fig. 12b)

En estos ensayos, los resultados fueron muy variables y por tanto poco confiables, debido a la poca definición de las bandas en algunas de las cepas mutantes y en ocasiones de la propia cepa silvestre; pensamos que la mala definición de las bandas fuera un problema de la saturación con albúmina, que no estuviese eliminando los enlaces adicionales sobre el adsorbente y por tanto se estuviese traduciendo en un "barrido" que nos impedía localizar la banda correspondiente a MIPS, variamos los tratamientos tomando como patrón lo obtenido en la cepa silvestre y utilizamos PBS-TWEEN 80 como se describe en la metodología para eliminar el "fondo" que se teñía en el papel; aunque logramos eliminar este "barrido", no fué posible obtener bandas mejor definidas (Fig. 12b) por lo que quizá la dificultad en la identificación de las bandas se presente a nivel de la reacción con peroxidasa, sabiendo que el suero presentaba un título alto.

Ya que aún para la cepa silvestre resultaba difícil ubicar una banda antígeno-anticuerpo, se utilizaron las técnicas de inmunoelectroforesis simple, cruzada y "cohetes" para caracterizar los mutantes.

Al hacer las pruebas de inmunoelectroforesis simple a diferentes muestras de extractos crudos y parcialmente purificados de la cepa silvestre, encontramos que en los primeros, aún cuando esperábamos la aparición de una sola banda, se evidenciaba un arco principal acompañado de "espolones" que en las muestras purificadas no aparecieron (Fig. 13).

La presencia de espolones múltiples en la inmunoelectroforesis (Fig. 13) del extracto crudo de la cepa silvestre, podría ser explicada de dos maneras, ya que el número de arcos ó líneas de precipitación en una inmunoelectroforesis es un indicador del número de constituyentes inmunoreactivos en el material de prueba (Ouchterlony, 1979):

- 1.- Que la preparación purificada de MIPS utilizada para inducir el suero, no fuera todo lo pura que sugería su análisis por electroenfoque, entonces la presencia de contaminantes menores podría ser responsable de la aparente falta de especificidad del suero obtenido.
- 2.- Que en el extracto crudo existan diversas proteínas ó agregados proteínicos que comportan determinantes antígenicos con MIPS y por tanto, aunque el suero fué inducido específicamente contra la enzima pura, va a presentar reacción cruzada con otras proteínas que posean los mismos determinantes antígenicos.

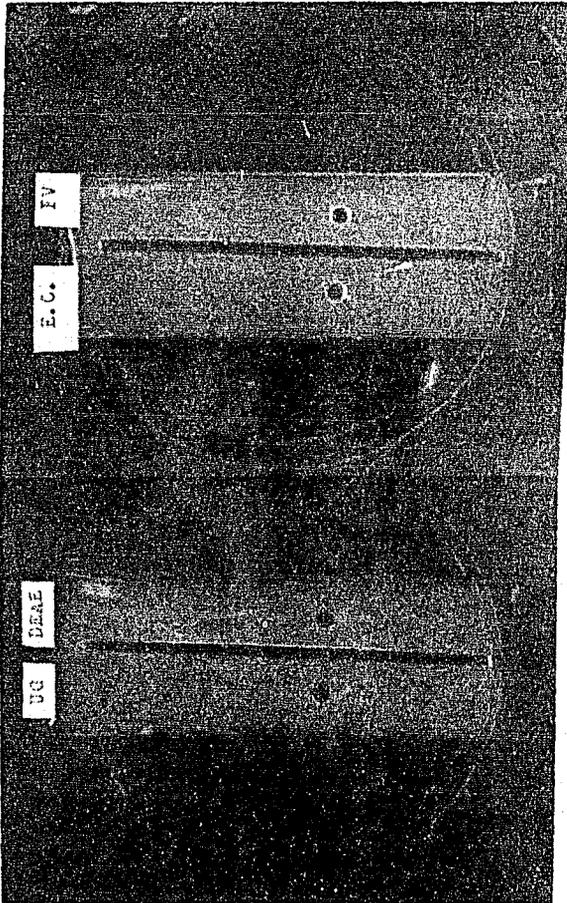


Fig. 13 Inmunolectroforesis del antisuero específico contra diferentes fracciones de purificación de MIPS en la cepa silvestre (E.C.=Extracto Crudo, FV=Fracción Precipitada con sulfato de protamina, UG=Fracción Semipurificada obtenida a partir de la columna de Ultrogel ACA-34 y DEAE=Fracción obtenida a partir de la columna DEAE-Celulosa). Se aplicaron 0.04 mg de cada muestra en una placa de agarosa al 2% y se corrió una electroforesis simple durante 3 horas, se rellenó el canal central con antisuero y se dejó reposar en cámara húmeda hasta la formación de los arcos de precipitación.

..../

Para analizar con mayor exactitud la magnitud de la respuesta múltiple, se utilizó la técnica de inmunolectroforesis cruzada, que ofrece una mayor resolución y simplifica la identificación al separar las respuestas múltiples. Se compararon las figuras obtenidas por este método, del extracto crudo y purificado (DEAE) de la cepa silvestre y del extracto crudo de una cepa mutante: la 925, reportada como INOS⁻ (Del Arenal, en preparación) Fig. 14.

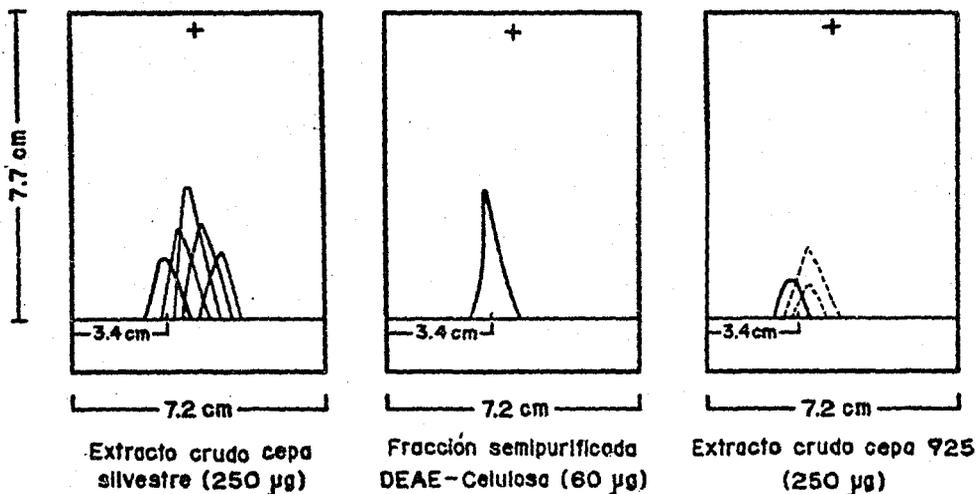


Fig. 14 Esquema de las figuras obtenidas en ensayos de inmunolectroforesis cruzada para:

- Extracto crudo cepa silvestre.
- Muestra semipurificada (DEAE) de la cepa silvestre.
- Extracto crudo de la cepa mutante INOS⁻: 925.

Se corrió una inmunolectroforesis simple con 250 µg de proteína para los extractos crudos y 60 µg de DEAE, en placas de agarosa al 1% en amortiguador de Barbitol. Terminada la electroforesis se desplazó el gel a una placa mayor montada con agarosa al 2% + antisuero diluido 5 veces, en una proporción de 2:1.

Se aplicó el campo eléctrico de manera que las bandas separadas en la primera electroforesis corrieran ahora en sentido perpendicular a aquella. Se aplicó un voltaje de 50 volts y 30 mAmps durante 18 horas a 4°C y pH 8.2. Se lavó exhaustivamente con solución salina al 0.9% y se tiñó con Amido Black.

El pico principal de la cepa silvestre y de la cepa 925, al igual que el pico único de la muestra semipurificada se resuelve a los 3.6 ± 0.2 cm del gel preparado con anticuerpo. Esperabamos que en la cepa mutante no hubiera respuesta, sin embargo se forma un pico que sugiere que la enzima está presente, pero es inactiva.

Podemos afirmar, que este pico común que se resuelve a los 3.6 ± 0.2 cm, es el que corresponde a la Mioinositol 1-P Sintasa, en base a otros experimentos, donde pudimos eliminar la respuesta cruzada, utilizando extractos parcialmente purificados de la cepa silvestre, extractos que fueron sometidos a precipitación con sulfato de amonio (FSA 55-70%), primer paso de purificación en nuestro esquema descrito en métodos.

Como puede verse en la Fig. 15, los picos que se tiñen en el extracto crudo, desaparecen al utilizar la FII (Fracción obtenida después de precipitar el extracto crudo de la cepa silvestre con sulfato de amonio a un 55-70% de saturación con cantidades semejantes de proteína.

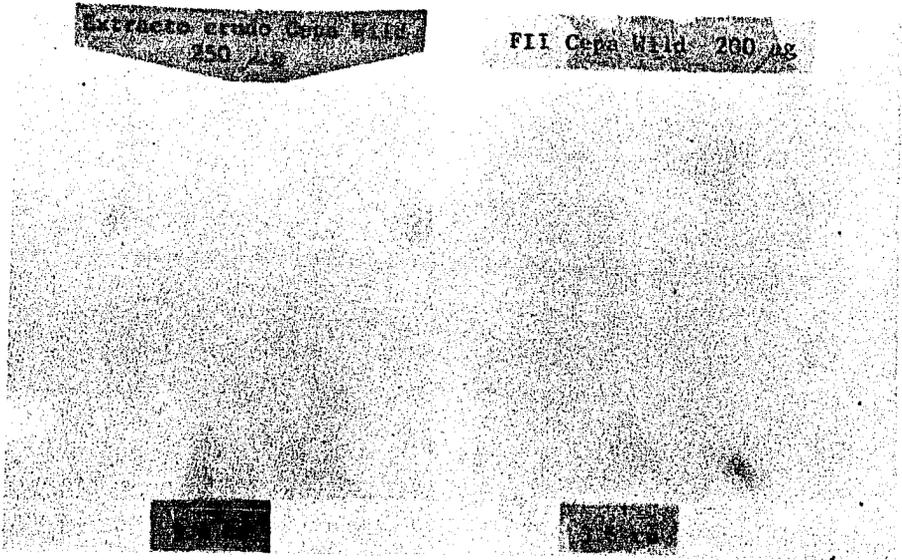


Fig. 15 Inmunolectroforesis cruzada del extracto crudo y la FII de la cepa silvestre de *N. crassa*.

Se corrieron bajo las condiciones referidas en la Fig. 14, 250 µg de proteína para extracto crudo y 200 µg para la fracción obtenida después de precipitar con sulfato de amonio a un intervalo de saturación de 55-70%. El lavado y tinción se mencionan en la misma figura.

..../

En base a lo obtenido en las figuras 13, 14 y 15 podemos concluir que contamos con una población de anticuerpos específicos contra MIPS y que la respuesta cruzada que observamos en los extractos crudos, se debe a proteínas que comparten determinantes antigénicos con la enzima y que son eliminadas durante el primer paso de la purificación de la misma.

Consideramos importante definir si las bandas de inmunoprecipitación formadas por el complejo MIPS-anticuerpo en los ensayos de inmunodifusión, inmunolectroforesis simple, cruzada y "línea cruzada" (Jurd, 1981) retienen actividad enzimática; para esto se procedió a cortar las bandas de precipitación correspondientes e incubarlas para el ensayo de actividad, tal como se hizo con los zimogramas. En ningún caso se pudo detectar actividad, lo que nos sugiere:

- 1.- Que el complejo antígeno-anticuerpo es inactivo ó,
- 2.- Que el complejo es activo pero pierde la actividad durante el prolongado tiempo de manipulación que exigen las técnicas utilizadas.

Para dar base a alguna de estas dos alternativas, se probó el ensayo de actividad después de la inmunoprecipitación, utilizando 250 µg de enzima purificada (DEAE-Celulosa) contra cantidades crecientes de anticuerpo.

Para determinar la actividad basal de la enzima utilizamos solución salina contra la muestra de DEAE y para medir la interferencia que el suero pudiera tener sobre la misma, usamos salina contra suero preinmune. Encontramos que el complejo antígeno-anticuerpo, recuperado por centrifugación e incubado con la mezcla de reacción, si es activo y conserva aproximadamente el 30% de la actividad total de la enzima libre.

IV. ANALISIS INMUNOLOGICO DE LAS CEPAS SILVESTRE Y MUTANTES INOS DE *N. CRASSA*.

Durante la caracterización del suero ANTI-MIPS, descrita en la sección precedente, se definió que la simple precipitación de los extractos crudos con sulfato de amonio (FS455-70X) eliminaba las reacciones cruzadas con otras proteínas ó complejos presentes en los extractos crudos, por tanto se decidió utilizar en adelante sólo las fracciones 55-70% de saturación con sulfato de amonio en la caracterización inmunológica de las cepas mutantes INOS.

Para ello, se llevó a cabo un análisis comparativo por inmunolectroforesis "en cohete", técnica cuantitativa en que los picos se forman a partir de las celdillas circulares. El frente del pico del precipitado es desplazado hacia el electrodo y se hace estacionario cuando ya no existe antígeno libre. Para una concentración de anticuerpo

dadá, la relación entre la distancia recorrida por un precipitado y la concentración del antígeno es lineal (Düchterlony, 1979). En base a esto podemos definir además de la presencia de MIPS en los mutantes, la cantidad relativa en cada uno.

Para cada una de las cepas utilizamos 250 µg de la FII (FSA55-70%), encontrando como se aprecia en la Fig. 16, que las cepas 3660, 497 y 871 presentan un pico semejante en proporción al de la cepa silvestre; la magnitud del pico es menor en las cepas 669, 671, 926, 2258 y 3659; muy pequeño en las cepas 1302, 925, 2066 y 2144 y no detectable en las cepas 2257 y 658.

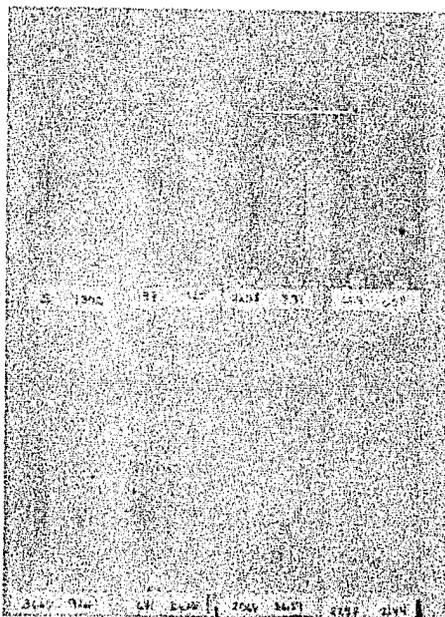


Fig. 16 Inmunolectroforesis "en cohete" de las llamadas FII de las cepas silvestre y mutantes INOS de *M. crassa*. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: Silvestre, 1302, 497, 925, 2258, 871, 669, 658, 3660, 926, 671, enzima semipurificada DEAE-Celulosa, 2066, 3659, 2257 y 2144. Se corrieron 200 µg por muestra a excepción de DEAE (60 µg) en placas de agarosa al 2% montadas con anticuerpo diluido 10 veces en una relación de 2:1. Se aplicó un voltaje de 50 volts y 45 mAmps a 4°C y pH 8.2 durante 3.5 horas. Terminada la electroforesis se lavó en solución salina al 0.9% y se tiñó con Amido Black. Las placas se fotografiaron una vez secas a 30°C.

...../

A fin de completar el análisis de estos mutantes, se compararon los resultados obtenidos con la clasificación por actividad de las mismas (Del Arrenal, en preparación):

HIPOPRODUCTORAS:

{Cepas 658, 497, 2144, 3660, 3659, 1302, 2258 y 926 con actividades del 10-25% de la obtenida en la cepa silvestre}

ACTIVIDAD NO DETECTABLE DE MIPS:

{Cepas 2066, 669, 871, 671, 2257 y 925}

En base a la Fig. 16 encontramos que sólo en las cepas 2257 y 658 no existe respuesta de la enzima al anticuerpo; en la cepa 2257 estos resultados corresponden con la clasificación de actividad antes señalada; por el contrario la cepa 658 está reportada como mutante hipoprodutora con casi un 25% de actividad (en este caso habría que hacer notar que lo reportado se refiere a estudios sobre la actividad de la enzima "in situ" y nosotros trabajamos con fracciones semipurificadas.

Las cepas restantes con respuesta limitada al anticuerpo, muestran bajos niveles de actividad en diferente medida, producto quizá de una síntesis limitada de la enzima, ó como en el caso de las cepas 871, 669 y 671 que aunque presentan respuesta positiva al anticuerpo, contienen a una MIPS inactiva.

Considerando que el crecimiento de las cepas mutantes se realizó en presencia de mioinositol 0.05 mM en el medio de cultivo (10 mg/lit), quedaba por definir de que manera afectaba a la síntesis de MIPS en la cepa silvestre ésta y otras concentraciones de inositol en el medio de crecimiento, por tanto se creció la cepa silvestre en condiciones "normales" (sin inositol) y en las mismas condiciones que las mutantes, esto es con 10 mg de inositol/litro de medio de crecimiento. Se obtuvieron los extractos semicrudos de ambas (FII) y se corrieron en inmunoelectroforesis "en cohete", encontrándose que la enzima (Fig. 17) se reprime en presencia de dicha concentración en el medio de crecimiento.

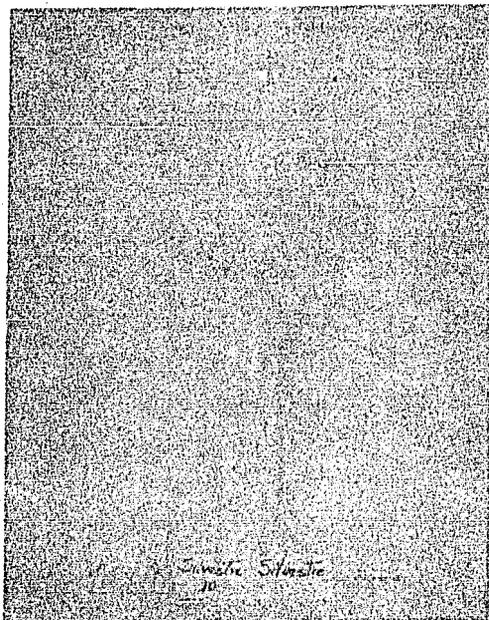


Fig. 17 Inmunolectroforesis "en cohete" de las FII's de la cepa silvestre de *M. crassa*, crecida bajo condiciones normales (sin inositol) y con 10 mg inositol/lit de medio de cultivo.

Una vez obtenidos los micelios crecidos bajo las condiciones señaladas, se extrajo la enzima y se precipitó hasta la FII (FSA55-70X). 200 μ g de proteína de esta fracción se corrieron en inmunolectroforesis bajo las mismas especificaciones que se refieren en la figura anterior.

En el siguiente experimento se decidió definir si existía una correlación directa entre la concentración de inositol y el grado de represión de MIPS.

Trabajamos con concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg/lit de medio de crecimiento y obtuvimos las FIIs correspondientes en la cepa silvestre, en una cepa hipoprodutora (3660) y en otra cepa con actividad de MIPS no detectable (671). Los micelios de las cepas mutantes crecieron normalmente en todas las concentraciones utilizadas (2-10 mg/lit).

En la cepa silvestre (Fig. 18), encontramos que la represión enzimática comienza desde concentraciones tan bajas como los 2 mg Inositol/lit de medio y continúa de manera casi lineal hasta la concentración a la que crecemos las cepas mutantes. Al hacer determinaciones de actividad encontramos que se podía relacionar la magnitud del "cohete" con los niveles de actividad.

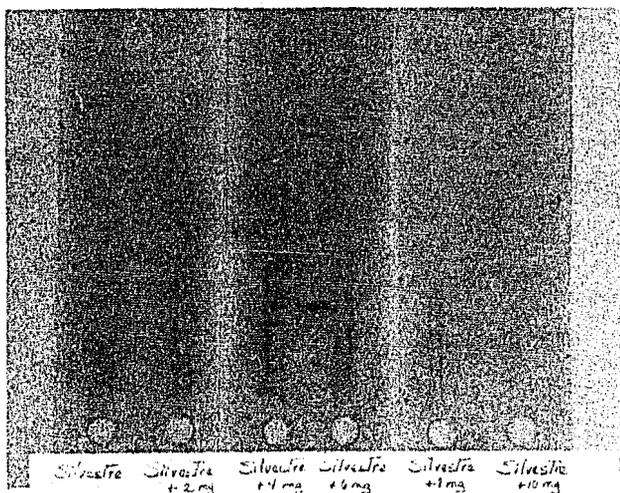


Fig. 18 Inmuno-electroforesis "en cohete" de las FIIs de la cepa silvestre de *M. crassa*, crecidas bajo condiciones crecientes de inositol. De izquierda a derecha: Sin Inositol, + 2 mg, + 4 mg, + 6 mg, + 8 mg y + 10 mg Inositol/lit de medio de cultivo.

Se crecieron los micelios bajo las condiciones descritas, se obtuvieron las FIIs (FSAS5-70X) y se utilizaron 200 µg de cada una para el ensayo de inmuno-electroforesis, cuyas condiciones de corrimiento, tinción y secado se han señalado en la figura 16.

....

De acuerdo con las figuras obtenidas para las cepas 3660 y 671 (Fig. 19) observamos que a una concentración de 10 mg/lit de inositol en el medio de cultivo, presentan una respuesta positiva en presencia del anticuerpo de proporciones semejantes a la cepa silvestre no reprimida. Los "cohetes" formados a concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 mg de Inositol siguen un comportamiento curioso, y es que no existe definición de un pico de precipitación hasta los 8-10 mg de Inositol.

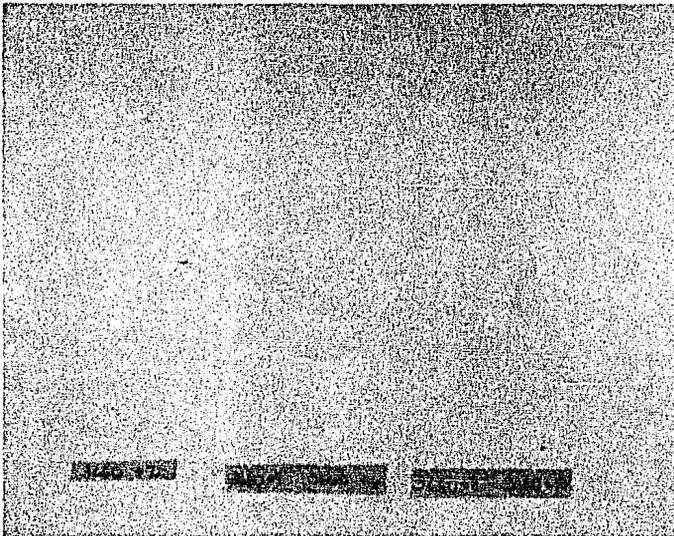


Fig. 19 Inmunolectroforesis "en cohete" de las FIIs de las cepas 3660 y 671, crecidas bajo condiciones crecientes de Inositol (2-10 mg/lit de medio de cultivo). Cada una se creció bajo las condiciones señaladas y una vez obtenidas las FIIs de las mismas se corrieron en inmunolectroforesis, bajo las especificaciones mencionadas en las figura 16.

D I S C U S I O N

Nuestros resultados confirman la presencia de dos actividades de la Mioinositol 1-P Sintasa en los extractos crudos y aún en la llamada FII de la cepa silvestre de *M. crassa*, actividades encontradas por Escamilla en 1982 al fraccionar el extracto crudo de este hongo por electroforesis en gel de acrilamida; encontramos que la presencia de estas dos actividades no está influida por las condiciones de extracción ó de concentración y que existe un estado de equilibrio entre ambas: la especie de mayor peso molecular se disocia dando lugar a un oligómero, que al parecer presenta el mismo peso molecular que el segundo oligómero activo, pero del que no sabemos si conserva ó no actividad de MIPS. Suponemos que esta transición no es reversible, pues a partir de la forma de bajo peso molecular no encontramos evidencia de agregación de la enzima.

La explicación de la presencia de una segunda banda en base a una posible disociación de la enzima, se confirmó al observar que a partir de una banda única de actividad en el zimograma de la muestra purificada, fué posible detectar después de períodos de congelamiento una segunda banda con menor peso molecular (No ilustrado).

Por tanto, la hipótesis considerada en un principio de que estas dos actividades pudieran deberse a isoenzimas, ha sido descartada y en su lugar planteamos la existencia en los extractos crudos de la cepa silvestre, de diferentes grados de asociación oligomérica de la Mioinositol 1-P Sintasa, ésto es apoyado por el hecho de que se ha demostrado genéticamente que es una sola enzima la involucrada en la ciclización de G 6-P a Mioinositol 1-P (Piña, 1969).

Para la caracterización inmunológica de la MIPS en la cepa silvestre y mutantes INOS⁻ de *M. crassa*, se consiguió obtener una población de anticuerpos específicos contra la enzima.

Durante esta caracterización, encontramos que la mayor parte de los compuestos que comparten determinantes antigénicos con nuestra enzima y que provocan una respuesta cruzada, son eliminados durante el primer paso de la purificación de la enzima (Fig. 15).

Tomando estos resultados, se analizaron inmunológicamente las cepas mutantes.

Contamos con una colección de mutantes INOS⁻ de *M. crassa* que son incapaces de crecer en ausencia de Inositol y en ninguno de los casos se había definido claramente la razón de su fenotipo.

La incapacidad para crecer en ausencia de Inositol, puede deberse a cuando menos tres razones:

- 1) El mutante carece ó produce cantidades muy limitadas de MIPS activa y por tanto es incapaz de sintetizar Inositol 1-P en cantidades suficientes.
- 2) El mutante carece de la Fosfatasa para formar Inositol libre a partir de Inositol 1-P.
- 3) El mutante tiene problemas en la retención del Inositol debido a fallas en la permeabilidad de su membrana.

De acuerdo a experimentos previos, se determinó la actividad de los mutantes fenotipo INOS⁻ "in situ" (Del Arenal, en preparación) por el método microbiológico (Ver Métodos), en relación con la actividad presente en la cepa silvestre. Con este criterio se han clasificado como Hipoproductoras y mutantes con Actividad de MIPS no Detectable.

De acuerdo con nuestros resultados (Fig. 16) tenemos cepas que dan respuesta positiva al antisuero y que además presentan actividad: (Cepas 497 con el 18.5%, 2258 con el 13.1%, 3660 con el 15.6% y la 3659 con el 14.2% en relación con la actividad encontrada en la cepa silvestre); en base a lo anterior son MIPS⁺ y la razón de su fenotipo INOS⁻ no puede explicarse en función de una producción limitada de la enzima, ni a la carencia de la Fosfatasa (enzima que completa la reacción) ya que se ha sugerido que esta última existe en todas las cepas mutantes en cantidades fisiológicas suficientes (Flores, en preparación). Por tanto, la respuesta a la auxotrofia en las mutantes mencionadas puede relacionarse con fallas en la permeabilidad de su membrana.

Encontramos cepas que dan respuesta limitada al antisuero, por lo que su clasificación también como hipoproductoras, parece estar relacionada con la síntesis igualmente limitada de la enzima activa; por tanto, en las cepas 2066, 2144, 1302, 926 y 658 con niveles de actividad del 5.3%, 17.9%, 10.4%, 9.3% y 24.5% respectivamente (en comparación con la cepa silvestre), hayamos el genotipo MIPS⁺.

En el caso específico de la cepa 658, que se reporta como hipoproductora (Del Arenal, en preparación) con casi la cuarta parte de la actividad encontrada en la cepa silvestre, no existe ninguna respuesta antigénica al ensayo inmunológico, por lo que suponemos que la actividad reportada pudiera deberse a algún compuesto que se comporta como el Mioinositol en la determinación microbiológica, pero no a actividad real de MIPS; por tanto, resultaría adecuado verificar los resultados obtenidos, trabajando con extractos semipurificados de esta mutante.

De las cepas reportadas con actividad de MIPS no detectable y en base a los ensayos inmunológicos, podemos distinguir dos grupos:

a) Cepas con respuesta antigénica positiva, semejantes a los niveles de enzima detectados en la cepa silvestre y,

b) Cepas con respuesta negativa al antisuero.

Las cepas 871, 669, 671 y 925 corresponden al primer grupo, es decir presentan genotipo MIPS+, pero la enzima no es activa.

En el segundo grupo encontramos las cepas que no son positivas al ensayo con antisuero (Cepas 2257 y 658, de ésta última ya se ha discutido una posible explicación a su auxotrofia a inositol) y cuya actividad ha sido reportada de 0% en relación con la cepa silvestre; por lo que su genotipo sería MIPS⁻.

Por otra parte, se ha reportado que el Inositol actúa como regulador de su propia biosíntesis, mediante la represión de la síntesis enzimática cuando se encuentra en el medio de cultivo (Culbertson, 1979).

En *Neurospora* existen reportes que sugieren que la enzima es reprimida en razón cuantitativa directa de la concentración de inositol libre presente en el medio de cultivo (Zsindely, 1974); según nuestros resultados, la represión por Inositol de la síntesis de proteína aparece desde concentraciones de 0.01 mM en el medio de cultivo y continúa de manera casi lineal hasta concentraciones de 0.05 mM.

Finalmente se intentó comparar la respuesta inmunológica de la cepa silvestre, con una hipoprodutora y una con actividad de MIPS no detectable crecidas bajo diferentes concentraciones de Inositol en el medio de cultivo; sin embargo, como se ilustra en la Fig. 19, los resultados no nos permiten llegar a conclusión alguna pues el título del antisuero decayó ostensiblemente y ya no fue posible obtener una nueva población de anticuerpos. Por tanto, es deseable conseguir un nuevo antisuero con el cual repetir los experimentos mencionados y llegar a una respuesta en cuanto al papel del Inositol en las cepas mutantes, para la síntesis de la Mioinositol 1-P Sintasa.

C O N C L U S I O N E S

- I.- LAS DOS ACTIVIDADES DE LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA PRESENTES EN LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LA CEPA SILVESTRE SE DEBEN A DIFERENTES GRADOS DE ASOCIACION OLIGOMERICA DE LA ENZIMA Y NO A ISOENZIMAS.

- II.- CONTAMOS CON UNA POBLACION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS CONTRA MIPS, YA QUE OBTENEMOS SOLO UNA RESPUESTA POSITIVA CON UN ANTIGENO SEMIPURIFICADO, UTILIZANDO DIFERENTES TECNICAS INMUNOLOGICAS.

- III.- EL ANALISIS DE LA ACTIVIDAD DE MIPS EN MUTANTES INOS⁻, NOS LLEVA A LA CONCLUSION DE QUE EL FENOTIPO NO PUEDE SER ASOCIADO EN TODOS LOS CASOS CON LA AUSENCIA DE LA ENZIMA.

- IV.- LA MIOINOSITOL 1-P SINTASA EN LA CEPA SILVESTRE SE REPRIME EN PRESENCIA DE INOSITOL EN EL MEDIO DE CULTIVO DE MANERA LINEAL DESDE CONCENTRACION DE 0.01 mM HASTA 0.05 mM.

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

- Angyal, S. J. & Gilham, P.T. (1957), J. Chem. Soc., 3691.
- Angyal, S. J. & Russell, F., (1969), Cyclitols. XXVII. Methyl Ester of Inositol Phosphates, the structure of Phytic acid. Aust. J. Chem. 22, 383.
- Barnett, J. E. & Corina, D. L. (1969), The mechanism of Glucose 6-Phosphate-D-Myo-Inositol 1-Phosphate Cyclase of Rat Testis. Biochem. J. 108, 125-129.
- Barnett, J. E., Brice, R. E. & Corina, D. L. (1970), A colorimetric determination of Inositol Monophosphates as an Assay for D-Glucose 6-Phosphate-1L-Myoinositol 1-P Cyclase. Biochem. J. 119, 183-186.
- Barnett, J. E., & Corina, D. L. (1972), Partial Reactions of D-Glucose 6-Phosphate 1L-Myoinositol 1-P Cyclase. Biochem. J. 131, 21-30.
- Ballow, C. E. & Lee, Y. C. (1966), Cyclitols and Phosphoinositides. Pergamon Press, Oxford, p. 41.
- Beadle, G. W. & Tatum, E. L. (1945), Neurospora II. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. Am. J. Botany 32, 678-686.
- Brunner, A., Piña, M. Z., Chagoya, V., Piña, E., (1972), Effect of $(NH_4)_2SO_4$ and Glycerol on the preservation of the "NAD + -Independent" activity of D-Glucose 6-Phosphate L-Myo-inositol-1-P cycloaldolase from Neurospora crassa. Arch. Biochim. Biophys. 150, 32-37.
- Catcheside, D. G. (1966) From The Fungi Gene Action., Vol. I., Ed. by Ainsworth. Sussman, 663-666.
- Chen, I. W. & Charalampous, F. (1966), Biochemical Studies of Inositol: X. Partial Purification of Yeast Inositol 1-Phosphate and its separation from Glucose 6-P Cyclase. Arch. Biochim. Biophys. 117, 154-157.
- Chen, I. W. & Charalampous, F., (1967) Biochim. Biophys. Acta, 136, 568-570.
- Culbertson, M. R., Donahue, I. F., Henry, S. A., (1976) Control of inositol biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: Properties of Repressible Enzyme System in extracts of Wild Type (INOS+) cells., J. of Bacteriol. 126, No. 1, 232-242.

- Culbertson, M. R., Donahue, T. F., Henry, S. A., (1976) Control of inositol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Inositol Phosphate Synthase mutants. *J. of Bacteriol.* Vol. 125, No. 1, 243-250.
- Davis, H. R. & De Serres, F., From *Methods in Enzymology: Genetics and Microbiological Research Techniques for M. crassa*, Vol. XVII, 115.
- Donahue, T., (1978) *Cyclitols and Ebsopbinoitides*. Ed. by W. Wells & F. Eisenberg Jr., 342.
- Eisenberg, F., (1967), D-Myoinositol 1-Phosphate as a Product of Cyclization of G-6-P and Substrate for a Specific Phosphatase in Rat Testis. *J. Biol. Chem.* 242, No. 7, 1375-1382.
- Eisenberg, F. Jr., & Bolden, A. H. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21, 100.
- Emerson, S., (1966) From *The Eugli. Mechanisms of Inheritance*. Vol. II, Ed. by Ainsworth, Sussman, 513-518.
- Escamilla, J. E., Contreras, M. Z., Martinez, A., Zentella-Piña, (1982), L-Myoinositol-1-P Synthase from *Neurospora crassa*: Purification to Homogeneity and Partial Characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 218, No. 1, 275-285.
- Funkhouser, (1975) Purification of Myo-Inositol 1-P Synthase from Rice Cells Culture by Affinity Chromatography. *Plant Physiol.* 56, 786-790.
- Gavin, G., Mc Henry, E. E. (1941) *J. Biol. Chem.* 139, 1705.
- Glick, D. (1959) *Methods of Biochemical Analysis*, Ed. by D. W. Interscience Publishers Inc., New York, 115
- Holliday, R. (1962) *Microbiol. Gen. Bull.* 13, 28-30.
- Howard, C. F. Jr. & Anderson, L. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 332.
- Jurd, C. F. (1981) *Immunoelectrophoresis. In Gel Electrophoresis of proteins. A practical approach*. Ed. by D. Hames & D) Rickwood. IRL PRESS, 211-238.
- Lenhinger, A., *Bioquímica*, 2a. ed., 1980, Ed. Omega, Barcelona, Espana, 576-583.
- Loewus, F. A. & Kelly, S., (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 204-208.

- Loewus, M. W. & Loewus, F., (1971) The Isolation and Characterization of D-G 6-P Cycloaldolase (NAD+dep.) from *Acer pseudoplatanus*. *Plant-Physiol.* 48, 255-260.
- Loewus, M. W. & Loewus, F., (1973) *Plant-Physiol.* 51, 263-266.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1961) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Magyoros, M., Brunner, A., Piña, E., (1972), Behaviour of Cycloaldolase from *Neurospora crassa* towards substrate analogs and aldolase. *Biochim. Biophys. Acta.* 289, 420-427.
- Naccarato, W. F., Ray, R. E., Wells, W. W., (1974), Biosynthesis of Myo-Inositol in rat mamary gland. Isolation and properties of enzymes. *Arch. Biochim. Biophys.* 164, 194-201.
- Ouchterlony, O. & Nilsson, L. A. From Handbook of Experimental Immunology: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. (1979), Ed. by Blackwell Scientific Publishers, G. B., Cap. XIX., p. 17-32.
- Panagou, S. (1972), A monomeric, Allosteric Enzyme with a Single Polipeptide Chain. *Biochem.* 11, 2378-2388.
- Piña, M. Z., Castañedo, E., Escamilla, E., Piña, E., (1978) From *Cyclitols* and *Phosphoinositides*: Further Characterization of the Myo-Inositol-1-Phosphate Synthase from *Neurospora crassa*. Ed. by William W. Wells & Frank Eisenberg Jr., 453-457.
- Piña, E., & Tatum, E. (1967), Inositol Biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta.* 136, 265-271.
- Piña, E., *Biosíntesis de inositol en Neurospora crassa*. Tesis de Doctorado en Bioquímica. UNAM, Facultad de Medicina.
- Pittner, F., Fried, W., Hoffman-Ostenhof O., (1974) Purification of Myo-Inositol-1-Phosphate Synthase of Rat Testis to Homogeneity by affinity chromatography of NAD-Sepharose. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 222-224.
- Scagal, R. F., Bandony, R. J., Rouse, G. E., Shofield, W. B., Stain, J. R. & Taylor, T. M. C., *El Reino Vegetal. Los grupos de plantas y sus relaciones evolutivas*. (1980) 3a. ed., Ed. Omega, Barcelona, España, 283-285.
- Segal, H. L., (1973), Enzymatic Interconversion of Active and Inactive forms of Enzymes. *Science* 180, 35-42.

- Shatkin & Tatum, (1959) *J. Biophys. Cyt.* 6, 423.
- Shatkin & Tatum, (1961) *Amer. J. Botany* 48, 760-771.
- Sherman, W. R., Rasheed, A., Mauce, L. A. & Wiecko, J., (1977), Incubations of testis Myo-Inositol-1-Phosphate Synthase with D-C5- O3 Glucose 6-Phosphate and with H₂O show no evidence of Schiff Base formations. *J. Biol. Chem.* 252, No. 16, 5672-5676.
- Towbin, H., (1979) Electroforectic Transfer of Proteins from Polyacrilamide Gels to Nitrocellulose Paper. *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 6, No. 9.
- Wilson, A. J., (1961) *J. Botany* 48, 46.
- Vogel, H. J., (1964) *Am. Naturalist* 98, 435.
- Zindely, A., Szalbalos, N., Kawai, M., Schablik, M., Acadi, J., Szabó, G., (1979), *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 30, 141-149.