

## Purificación y propiedades de purín nucleósido fosforilasas de hígado de ave

J. C. Manzanero, M. Mora y J. Bozal

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Química  
Universidad de Barcelona  
08028 Barcelona

(Recibido el 28 de febrero de 1985)

J. C. MANZANERO, M. MORA and J. BOZAL. *Chicken and Pigeon Liver PNPases*. Rev. esp. Fisiol., 42, 29-36. 1986.

Chicken and pigeon liver PNPases differ in their isoelectric points (5.40 and 5.15), in their molecular weights ( $125,000 \pm 5,000$ ;  $78,000 \pm 5,000$ , determined on Sephadex G-200) and in their subunit molecular weight ( $62,000 \pm 10\%$ ;  $75,000 \pm 10\%$ , determined by sodium dodecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). The related molecular weights show a dimeric structure for the chicken liver enzyme and a monomeric structure for the pigeon liver enzyme. Activation energies are similar but differ in  $\Delta H$  values. Both PNPases are irreversibly inactivated by p-chloromercuribenzoate and 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) when incubated with these reagents; inactivation can be reverted totally or partially by dithiothreitol and 2-mercaptoethanol.

**Key words:** Purine nucleoside phosphorylase, Structure, Subunits, Thiol groups.

La purín nucleósido fosforilasa cataliza, reversiblemente, la fosforólisis y la arsenólisis de los nucleósidos purínicos; puede intervenir, por ello, en las rutas de degradación y de recuperación de las purinas y determinar su nivel intracelular y el de metabolitos relacionados.

La PNPasa purificada de eritrocitos humanos (1, 11, 15) y las de hígado de

conejo (14) y de pollo (7, 18) difieren en magnitud molecular y en el número de subunidades; así, la de eritrocitos humanos se describe como un trímero con subunidades de peso molecular 30.000 (21, 26), mientras que la de enterobacterias (PM = 140.000) consta de seis subunidades de peso molecular 26.000 (8) y la de *Bacillus cereus* es un tetrámero (6).

La importancia de los grupos —SH en la actividad de la PNPasa de mamíferos ha sido indicada por diversos autores (2, 14, 22, 25). En la PNPasa cristalizada de eritrocitos humanos reaccionan 12 moles de PCMB o DTNB por

\* Abreviaturas: PNPasa, Purín nucleósido fosforilasa; 1-P-R, 1-Fosfato- $\alpha$ -D-ribosa;  $P_i$ , Fosfato inorgánico ( $H_2PO_4^-$ ); PCMB, p-Cloromercuribenzoato; DTNB, Acido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico); DTT, Ditiotreitól, 2-ME, 2-Mercaptoetanol.

mol de enzima y se consigue la inactivación total con 4-5 moles de PCMB (2, 22). La reacción con DTNB difiere de la indicada con PCMB; así, cuando el enzima nativo se incuba con DTNB sólo reaccionan 4-5 grupos —SH por mol de enzima, pero la PNPasa desnaturalizada con SDS al 1%, al reaccionar con DTNB, muestra 11-12 grupos —SH por mol de enzima (2). Por otra parte, la hipoxantina, la adenina y la inosina protegen parcialmente a los grupos —SH de la PNPasa de su reacción con DTNB, mientras que el 1-P-R y el P<sub>i</sub> son inefectivos (12).

En el presente trabajo se describe la purificación de las PNPasas de hígado de pollo y de pichón y se determinan algunas características fisicoquímicas y estructurales del enzima de ambas procedencias y su comportamiento con PCMB y con DTNB.

### Material y Métodos

Los sustratos de la PNPasa han sido: Inosina, Hipoxantina y 1-P-R (Boehringer) y dihidrogenofosfato de sodio (Merck). Como inhibidores, activadores y disgregantes se han utilizado PCMB (Fluka), DTNB (Calbiochem), 2-ME y SDS (Merck) y DTT (Sigma).

En las separaciones cromatográficas se han empleado DEAE-celulosa (Watman-DE-23) y DEAE-sephadex y Sephadex G-200 (Farmacia).

Los geles de poliacrilamida utilizados en las electroforesis se han preparado con acrilamida y N,N'-metilbisacrilamida (Eatsman-Kodak), dimetilamino-propionitrilo (Fluka) y ferricianuro de potasio y persulfato de amonio (UCB).

La tinción de los geles de poliacrilamida se efectúa con Comassie Brilliant Blue (Sigma), para el revelado general de proteínas (24) y con INT (Sigma) para el revelado específico de la PNPasa. El revelador específico contiene: 21,5 mg

de inosina, 25 mg de *p*-iodonitrotetrazolium (INT), 0,25 ml de xantin oxidasa de leche (Boehringer) y tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, en un volumen de 25 ml.

La actividad enzimática se determina por el método de KALCKAR (9), que utiliza xantin oxidasa de leche como enzima acoplado (0,02 U.I.) y que lee a 293 nm los incrementos de absorbancia debidos a la formación de ácido úrico. Una unidad de PNPasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la fosforólisis de 1  $\mu$ mol de inosina en 1 min, a 37 °C y pH 7,4.

En presencia de inhibidores de la xantin oxidasa, la actividad de la PNPasa se ha determinado por lectura de los descensos de absorbancia a 280 nm, debidos a la desaparición de inosina (19).

Los pesos moleculares de las PNPasas de hígado de pollo y de pichón se han determinado por el método de ANDREWS (3). El cálculo del número de subunidades en que se disocia el enzima de ambas procedencias y el peso molecular de las mismas se han determinado por el método de DUNKER y RUECKERT (5); las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida con SDS al 1% (4).

Las actividades de la fosfatasa alcalina, adenosin desaminasa, inhibidor trípico de la soja y ribonucleasa se han determinado por los métodos propuestos por MALAMY y HORECKER (17), KALCKAR (10), SCHWERT y TAKENAKA (20) y KUNITZ (13), respectivamente. La concentración de proteína se determinó por lectura directa de la absorbancia a 280 nm (23).

### Resultados y Discusión

#### PURIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS

Todas las operaciones se han realizado entre 0 y 4 °C. Antes de efectuar las separaciones cromatográficas de inter-

cambio iónico, las disoluciones enzimáticas se han dializado frente al tampón de elución, en presencia de carbón activo, durante 24 horas. Las etapas de centrifugación se han realizado a 10.000 g excepto las de separación de las fracciones citosolubles (24.000 g), durante 30 minutos.

*Purín nucleósido fosforilasa de hígado de pollo.* — Se suspenden 100 g de hígado de pollo en 900 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, y se trituran en un homogeneizador de cuchillas. Se centrifuga y al sobrenadante activo se le adiciona gel de fosfato cálcico (1 g de gel : 10 ml de disolución); la suspensión se mantiene en agitación 30 min. y se centrifuga. El residuo activo se suspende en tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 7,4, se agita 30 min. y se centrifuga de nuevo.

Al sobrenadante activo se le adiciona  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta el 40 % de saturación. Al cabo de 60 min se centrifuga y se separa el residuo. El sobrenadante se lleva al 60 % de saturación en la sal; se centrifuga y se recoge el residuo con actividad PNPasa. El precipitado se disuelve en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4 (1 g por cada 5 ml de tampón) y se dializa.

La disolución enzimática se vierte sobre una suspensión de hidroxilapatito (1 ml por cada 20 ml de suspensión) y el conjunto se agita durante 3 h; se centrifuga y se recoge un residuo con actividad PNPasa que se suspende en tam-

pón de fosfato de sodio 200 mM (1 g de residuo : 9 ml de tampón); se agita durante 2 h y se centrifuga. Al sobrenadante se le adiciona  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta el 65 % de saturación.

El residuo activo, separado por centrifugación, se disuelve en un pequeño volumen de tampón de fosfato de sodio 50 mM y se dializa. La disolución se aplica en una columna de DEAE-celulosa ( $3 \times 70$  cm). Se inicia la elución con 150 ml del mismo tampón y se establece, a continuación, un gradiente lineal con volúmenes iguales de tampón de fosfato de sodio 200 mM y del mismo tampón que es, a la vez, 100 mM en KCl. Se recogen fracciones de 10 ml con una velocidad de elución de 20 ml/h. Se reúnen las fracciones activas (de la 22 a la 31) y se llevan al 80 % de saturación en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . La tabla I resume los resultados del proceso de purificación.

*Purín nucleósido fosforilasa de hígado de pichón.* — La fracción citoplasmática, con actividad PNPasa, se separa por centrifugación del homogeneizado obtenido al triturar 100 g de hígado de pichón con un triturador de cuchilla, en un medio de tampón de fosfato de sodio 50 mM de pH 7,4.

El sobrenadante se lleva al 25 % de saturación en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y se separa por centrifugación el residuo inactivo. El sobrenadante se lleva al 50 % de saturación en la sal; se centrifuga al cabo de 1 h y se recoge el precipitado. El residuo se disuelve en el menor volumen posible

Tabla I. Purificación de la PNPasa de hígado de pollo.

Fracción	Unidades	Proteína (mg)	A.E.	G.P.	RTO (%)
Citoplasmática	2.184	29.912	0,07	1	100
Gel fosfato cálcico	1.654	3.621	0,45	6,7	75,6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40-60 %)	852	566	1,50	20,6	51,5
Hidroxilapatito	412	73,6	5,60	75	48,3
DEAE-celulosa	195	29,1	6,70	90	47,3

Tabla II. Purificación de la PNPasa de hígado de pichón.

Fracción	Unidades	Proteína (mg)	A.E.	G.P.	RTO (%)
Citoplasmática	7.238	21.313	0,34	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (25-50 %)	6.108	1.302	4,68	13,7	87,3
DEAE-celulosa	4.778	870	5,50	16,1	78,2
DEAE-sephadex	2.768	167	16,50	48,5	58

de tampón de fosfato de sodio 50 mM y se dializa.

La disolución enzimática se aplica a una columna de DEAE-celulosa (3×70 cm). La elución se inicia haciendo fluir 100 ml del tampón mencionado y, a continuación, se establece un gradiente con 250 ml del tampón 200 mM y 750 ml del mismo que es, a la vez, 100 mM en KCl. Se recogen fracciones de 10 ml con una velocidad de elución de 20 ml/h.

Las fracciones activas se llevan al 65 % de saturación en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El residuo activo se recoge por centrifugación y se disuelve en la mínima cantidad de tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4 y se dializa.

La disolución de PNPasa se aplica en una columna de DEAE-sephadex (3 × 70 cm) equilibrada con el tampón mencionado. Se hacen fluir 150 ml del tampón y se establece un gradiente con 150 ml de tampón de fosfato de sodio 100 mM y 750 ml de 200 mM. La velocidad de elución es de 20 ml/h y se recogen fracciones de 10 ml. Los eluidos activos se reúnen y se llevan al 65 % de saturación en sulfato amónico; por centrifugación se separa un precipitado cuya actividad específica es 49 veces superior a la de la fracción soluble inicial. Los resultados del proceso de purificación se resumen en la tabla II.

No ha sido posible aplicar los tratamientos con adsorbentes al proceso de purificación de la PNPasa de hígado de pichón por la importante pérdida de actividad que se producía: el rendimiento, después de la adsorción de la fracción citoplasmática en gel de fosfato cálcico, fue del 10 % y la adsorción sobre hidroxilapatito sólo permitía recuperar un 20 % de la actividad.

Los métodos propuestos permiten obtener el enzima de ambas procedencias purificado con un rendimiento aceptable.

El comportamiento electroforético del enzima de hígado de pollo y de pichón aparece en la figura 1. En el revelado

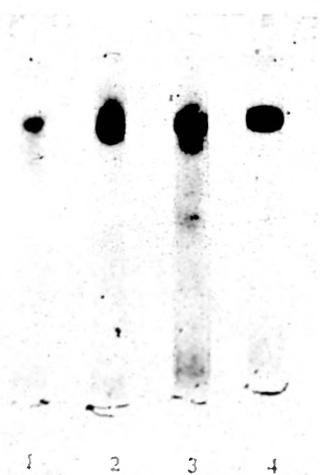


Fig. 1. Electroforesis en geles de poliacrilamida de las PNPasas de hígado de pollo y de pichón después de la última etapa del proceso de purificación.

Concentración de acrilamida: 7,5 %. Tampón tris-glicina 0,217 mM, pH 8,6. Tiempo de electroforesis: 45 min. (1) Enzima de hígado de pollo, (2) enzima de hígado de pichón, (3) enzima de hígado de pollo con SDS 1 %, (4) enzima de hígado de pichón con SDS 1 %.

específico de los ferogramas de ambos enzimas aparece una banda coloreada que coincide con la banda de proteína; por tanto, las PNPasas mencionadas exhiben homogeneidad electroforética y son adecuadas como material de partida para el estudio de sus propiedades.

#### PROPIEDADES DE LAS PNPASAS

**Punto isoeléctrico.** — Se ha determinado por medida de la movilidad electroforética de ambas enzimas sobre tiras de poliacetato de celulosa en medio de tampón de fosfato de sodio 50 mM y valores de pH comprendidos entre 5,7 y 8. La tinción de las tiras se realiza con el revelador específico de la PNPasa. La representación gráfica del promedio de los recorridos electroforéticos, medidos a los distintos valores de pH, proporciona unos valores de pI de  $5,40 \pm 0,05$  para el enzima de hígado de pollo y de  $5,15 \pm 0,05$  para el de hígado de pichón.

**Peso molecular y número de subunidades.** — El peso molecular de los enzimas purificados se determinó por el método de ANDREWS (3) de filtración en gel (fig. 2). Los pesos moleculares, obtenidos por interpolación en la recta de calibrado, para las PNPasas de hígado de pollo y de pichón fueron de  $125.000 \pm 5000$  y de  $70.000 \pm 5000$  respectivamente.

El peso molecular de las subunidades se ha determinado por electroforesis en gels de poliacrilamida, en presencia de SDS al 1 %. Los gels se prepararon mezclando las siguientes disoluciones: 10 ml solución acrilamida-N,N'-metilbisacrilamida al 7,5 % (proporción monómero:dímero, 37:1 en peso), 0,045 ml de NNN'N'tetrametilendiamina (TEMED), 1,5 ml de persulfato de amonio al 1,5 % y 18,5 ml de tampón de fosfato de sodio 100 mM de pH 7,4 (0,2 % SDS).

En los ferogramas de ambos enzimas aparece una sola banda (fig. 1). Por medida de la movilidad con respecto a las

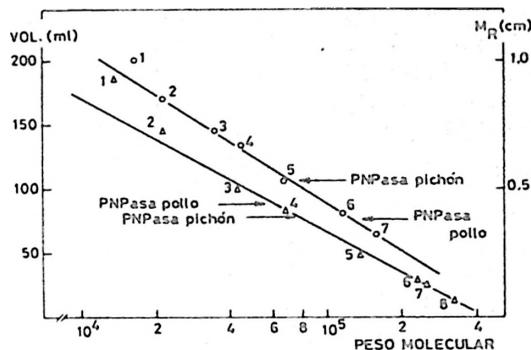


Fig. 2. Determinación de los pesos moleculares de las PNPasas de hígado de pollo y de pichón y de las subunidades.

(○) Filtración en Sephadex G-200: Columna (3 × 70 cm) equilibrada con tampón tris-HCl 50 mM (KCl 100 mM) de pH 7,4. Velocidad de elución: 15 ml/h. Volumen de fracción: 3 ml. Calibrado con: 1, ribonucleasa; 2, inhibidor triptico de la soja; 3, adenosin desaminasa; 4, ovoalbúmina; 5, seroalbúmina; 6, fosfatasa alcalina, y 7,  $\gamma$ -globulina. Las proteínas utilizadas se determinaron espectrofotométricamente, por su absorbancia a 230 nm o enzimáticamente. (Δ) Electroforesis en poliacrilamida con SDS 1 %: Tampón de electroforesis: fosfato de sodio 50 mM de pH 7,4. Tiempo de electroforesis: 2 h 45 min. Patrones: 1, hemoglobina; 2, inhibidor triptico de la soja; 3, ovoalbúmina; 4, seroalbúmina M; 5, seroalbúmina D; 6, catalasa; 7, glutamatodeshidrogenasa, y 8  $\gamma$ -globulina. Se aplicaron 20  $\mu$ g de cada patrón sobre gels de 6 cm de longitud. Revelado general de proteínas con Comassie Brilliant Blue.

proteínas de referencia se obtiene un peso molecular de  $62.000 \pm 10 \%$  para la PNPasa de hígado de pollo y  $75.000 \pm 10 \%$  para la de hígado de pichón (fig. 2).

La comparación de ambos valores con los pesos moleculares de los enzimas, determinados por filtración en Sephadex G-200, permite concluir que la molécula de PNPasa de hígado de pollo se encuentra en forma de un dímero, cuyas subunidades poseen igual peso molecular ( $M = 62.000$  daltones). Por su parte, la

PNPasa de hígado de pichón sólo consta de una subunidad, cuyo peso molecular es 75.000 daltones. Estos resultados están en contraposición con los obtenidos por MURAKAMI y TSUSHIMA (18), quienes postulan se trata de un trímero.

*Variación de  $K_m$  y  $V_{max}$  con la temperatura. Cálculo de la energía de activación y de la entalpía de reacción.* — Se ha estudiado la influencia de la temperatura en el sistema Inosina-PNPasa- $P_i$  catalizado por las PNPasas de hígado de pollo y de pichón. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  se han calculado representando  $1/v$  frente a  $1/[S]$  (16), manteniendo la concentración de  $P_i$  constante (50 mM) y variable la de inosina (0,03 a 0,2 mM). Se ha experimentado en el intervalo de temperatura entre 24 y 46 °C.

Al representar los valores de  $pK_m$  frente a  $1/T$  (fig. 3 a), para la PNPasa de hígado de pichón, se obtiene una recta cuya pendiente proporciona el valor de

la entalpía de reacción ( $\Delta H = -7948,3$  Julios). En la representación de la PNPasa de hígado de pollo aparecen dos tramos rectos, de distinta pendiente, cuya intersección ocurre alrededor de los 30°C (fig. 3 b). Los valores de la entalpía de reacción son  $-6.275$  J y  $-17.151,6$  J (por encima y por debajo de 30 °C, respectivamente).

El significado de dichas constantes termodinámicas es complejo, ya que la  $K_m$  (inosina) es una relación de todas las constantes de velocidad que intervienen en la secuencia de reacción a la que se adapta la PNPasa. Debe considerarse, por tanto, que el valor « $\Delta H$ » es aparente y depende de los calores de reacción de cada una de las etapas de la secuencia mecanística.

Mediante la representación de Arrhenius se obtienen, para el enzima de ambas procedencias, rectas de cuyas pendientes se deducen los valores de la ener-

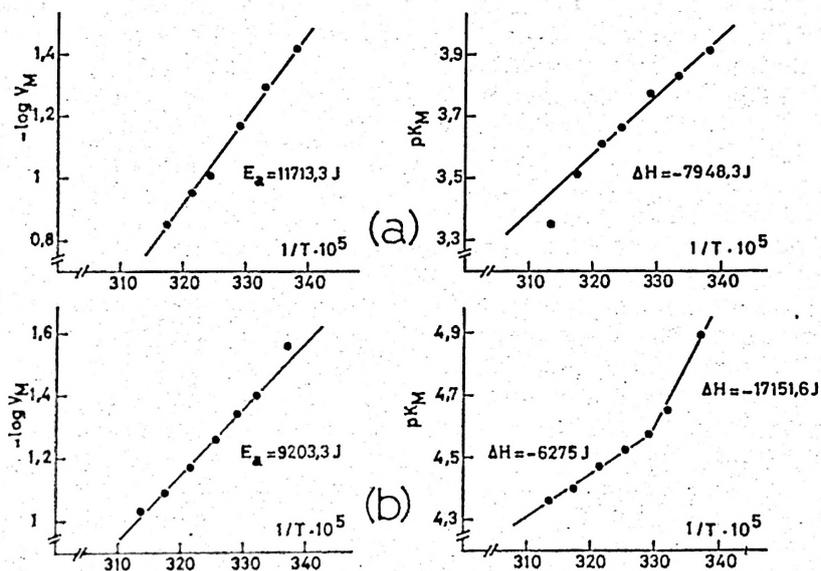


Fig. 3. Variación de  $K_m$  y  $V_{max}$  con la temperatura. Entalpía de reacción y energía de activación de la PNPasa.

(a) PNPasa de hígado de pichón, (b) PNPasa de hígado de pollo. Temperatura variable desde 24 hasta 46 °C. Concentración de inosina variable desde 0,03 hasta 0,2 mM. Concentración de  $P_i$  constante 50 mM.

gía de activación del complejo responsable de la etapa limitante de la velocidad. Estos valores son  $9.203,3 \pm 10\%$  J y  $11.713,3 \pm 10\%$  para las PNPasas de hígado de pollo y de pichón, respectivamente (fig. 3).

#### ACCIÓN DE LOS REACTIVOS DE GRUPOS —SH

El PCMB es inhibidor irreversible de ambas PNPasas, tanto si el enzima se incuba con el reactivo antes de medir su actividad (45 min), como si no se establece contacto previo entre ambos (figura 4 a, b). Por el contrario, el DTNB se comporta como inhibidor reversible cuando no se incuba previamente con los enzimas, pero si se establece un contacto previo con los mismos (15 min) la inhibición que provoca es irreversible, manteniendo constantes las demás condiciones experimentales (fig. 4 c, d). Los resultados obtenidos para la PNPasa de hígado de pollo, son análogos a los correspondientes al enzima de hígado de pichón (fig. 4 b, d).

En presencia de DTT 0,5 mM ó 2-ME 5 mM, el PCMB ( $0,5 \times 10^{-6}$ — $3 \times 10^{-6}$  M) y el DTNB ( $0,6 \times 10^{-5}$ — $6 \times 10^{-5}$  M) no inhiben a las PNPasas con las que se ha experimentado. Además, cuando estas últimas se preincuban 5 min con DTNB  $6 \times 10^{-5}$  M y 20 min con PCMB  $3 \times 10^{-6}$  M, la adición de cualquiera de los dos reactivos tiólicos, en las concentraciones mencionadas, anula la inhibición por DTNB y el 70 % de la inducida por PCMB.

La inhibición que ejercen los reactivos de grupos —SH, PCMB y DTNB, sobre la PNPasa de hígado de pollo y de pichón pone de relieve el importante papel de estos grupos en la actividad del enzima. Los porcentajes de inhibición provocados por ambos reactivos son muy elevados y se comportan como inhibi-

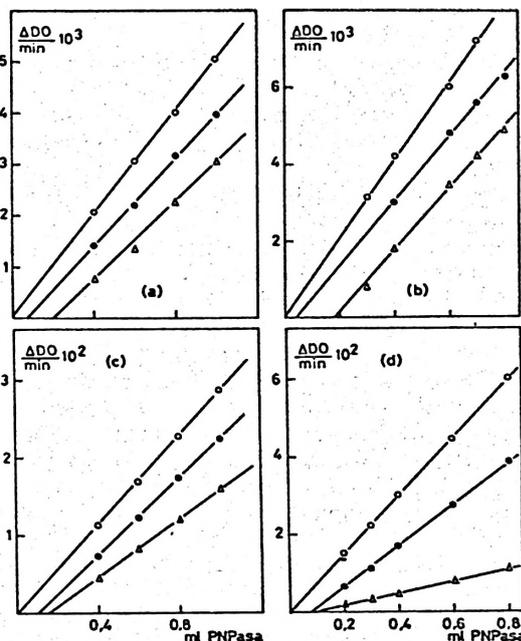


Fig. 4. Inhibición de las PNPasas de hígado de pollo y de pichón por PCMB y por DTNB. Concentración enzima hígado de pollo, 11 U por ml; concentración enzima hígado de pichón, 27 U/ml; tiempo incubación con PCMB, 45 min; tiempo incubación con DTNB, 15 min. (a)  $[\text{PCMB}] \text{M} \times 10^7$ : 0, 6,6, 16; (b)  $[\text{PCMB}] \text{M} \times 10^7$ : 0, 1, 3; (c)  $[\text{DTNB}] \text{M} \times 10^5$ : 0, 2,2, 11; (d)  $[\text{DTNB}] \text{M} \times 10^5$ : 0, 2, 8. Concentraciones de los inhibidores de arriba abajo de la figura. (a) y (c), PNPasa de hígado de pollo; (b) y (d), PNPasa de hígado de pichón.

dores irreversibles cuando se preincuban con ambas PNPasas. En ausencia de incubación previa con los enzimas, la inhibición por PCMB continúa siendo irreversible, pero la provocada por DTNB es reversible.

Las inhibiciones descritas pueden evitarse o anularse por completo por la presencia de DTT ó 2-ME. Estos hechos sugieren que el bloqueo de los grupos —SH por los reactivos tiólicos no altera sensiblemente la estructura espacial de las PNPasas estudiadas.

### Resumen

Las PNPasas de hígado de pollo y de pichón difieren en punto isoeléctrico (5,40 y 5,15), en masa molecular ( $125.000 \pm 5.000$  y  $78.000 \pm 5.000$ , determinada en Sephadex G-200) y en la masa molecular de las subunidades ( $62.000 \pm 10\%$  y  $75.000 \pm 10\%$ , determinada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS). Los valores de peso molecular indican que la PNPasa de hígado de pollo es un dímero y la de hígado de pichón un monómero. Las energías de activación son semejantes y difieren en el valor de  $\Delta H$ . Ambas PNPasas se inactivan irreversiblemente por p-cloromercuribenzoato y por ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), cuando se mantienen en contacto con los reactivos; la inactivación puede anularse total o parcialmente por ditioneitol y 2-mercaptoetanol.

### Bibliografía

1. Agarwal, R. P. y Parks, R. E., Jr.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 644-647, 1969.
2. Agarwal, R. P. y Parks, R. E., Jr.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 3763-3768, 1971.
3. Andrews, P.: *Biochem. J.*, **96**, 595-606, 1965.
4. Colowick, S. P.: *Methods in Enzymology*, **1**, 90-98, 1955.
5. Dunker, A. K. y Rueckert, R. R.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 5074-5080, 1969.
6. Engelbrecht, H. L. y Sadoff, H. L.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6228-6232, 1969.
7. Fuste, R. y Bozal, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **32**, 199-204, 1976.
8. Jensen, K. F. y Nygaard, P.: *Eur. J. Biochem.*, **51**, 253-265, 1975.
9. Kalckar, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 429-443, 1947.
10. Kalckar, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 461-475, 1947.
11. Kim, B. K., Cha, S. y Parks, R. E., Jr.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1763-1770, 1968.
12. Kim, B. K., Cha, S. y Parks, R. E., Jr.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1771-1776, 1968.
13. Kunitz, M.: *J. Gene. Phys.*, **24**, 15-32, 1940.
14. Lewis, A. S. y Glantz, M. D.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 407-413, 1976.
15. Lewis, A. S. y Lowy, B. A.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 9927-9932, 1979.
16. Lineweaver, H. y Burk, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658-666, 1934.
17. Malamy, M. H. y Horecker, B. L.: *Biochemistry*, **3**, 1893-1897, 1964.
18. Murakami, K. y Tsushima, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **384**, 390-398, 1975.
19. Serra, M. C., Falcome, G., Cercignani, G. e Ipata, P. L.: *FEBS Letters*, **18**, 335-338, 1971.
20. Schwert, G. W. y Takenaka, J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 570-575, 1955.
21. Stoeckler, J. D., Agarwal, R. P., Agarwal, K. C., Schmid, K. y Parks, R. E., Jr.: *Biochemistry*, **17**, 278-283, 1978.
22. Umemura, S., Nishino, T., Murakami, K. y Tsushima, K.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **75B**, 233-236, 1983.
23. Warburg, O. y Christian, W.: *Biochem. Z.*, **310**, 384-421, 1942.
24. Weber, K. y Osborn, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412, 1969.
25. Yamada, E. W.: *J. Biol. Chem.*, **236**, 3043-3046, 1961.
26. Zannis, V., Doyle, D. y Martin, D. W., Jr.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 504-510, 1978.