

Instituto «Jaime Ferrán» del C. S. I. C.
y
Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Farmacia
Barcelona

Determinación e identificación de un factor activante de la UDPG-glucán-transferasa en músculo de rata*

por

M. Rosell-Pérez y V. Villar-Palasi

(Recibido para publicar el 20 de julio de 1964)

La UDPG: α -1,4-glucán α ,4-glucosil-transferasa (transglucosilasa; C.E.: 2.4.1.11) fue descubierta recientemente (5). La misma escuela de LÉLOIR descubrió posteriormente (6), que el enzima era fuertemente activado por la glucosa-6-fosfato. ROBBINS y sus colaboradores (7), estudiando el enzima sintetizante en músculo pectoral de paloma, encontraron una activación del enzima por el líquido sobrenadante de $100.000 \times g$ que no identificaron, pero especificaron que no era dializable y sólo se recobraba luego de dializar si se añadía fosfato inorgánico. Los trabajos de ROSELL-PÉREZ y colaboradores (16) demostraron la existencia de dos formas de transglucosilasa en músculo esquelético de rata. Una, la forma I, es independiente de la presencia de glucosa-6-fosfato para su actividad (aunque es estimulada por ésta a bajas concentraciones de sustrato). La otra, forma D, es dependiente de la presencia

de glucosa-6-fosfato a cualquier concentración de sustrato utilizada. Posteriormente se demostró que en músculo esquelético de rana la fracción particulada de $100.000 \times g$ es únicamente forma D (10), mientras que en conejo (12), perro (13) y músculo humano (15) existen las dos formas y sus sistemas interconversión.

En el presente trabajo damos cuenta del aislamiento y caracterización de un factor activante inorgánico, obtenido del sobranante de $100.000 \times g$ de las preparaciones enzimáticas del músculo de rata. El factor dializable, ácido estable y termolabile es fosfato inorgánico que activa únicamente la forma I del enzima.

* Este trabajo ha sido subvencionado en parte por un Grant-in-aid de la Cleveland Diabetes Fund (Ohio, USA) y por Ayudas a Doctores e Investigación del Ministerio de Educación Nacional de España.

Material y métodos

Métodos analíticos. La glucosa-6-fosfato se midió enzimáticamente por medio de glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y NADP según el método descrito por LARNER y col. (2).

La actividad de la transglucosilasa se valoró midiendo la radiactividad incorporada en el glucógeno, partiendo de sustrato (UDPG) marcado uniformemente en la glucosa con C^{14} . El método es una modificación del originalmente descrito por SCHMID y col. (17) y fue ya descrito (19). Los reactivos en las mezclas para la reacción enzimática tenían las concentraciones siguientes: UDPG, $4,2 \times 10^{-3}$ M; glucógeno 0,46 %; mezcla amortiguadora Tris-Versene, pH 7,8 (0,05-0,005 M, respectivamente) y cuando se añadían glucosa-6-fosfato o $MgCl_2$ como activadores quedaban 1×10^{-2} y 8×10^{-3} M, respectivamente. Las incubaciones con el preparado enzimático se han llevado a cabo durante 5 ó 10 minutos en volúmenes totales de 0,25 a 0,35 ml.

Para los ensayos se utilizó el enzima particulado de músculo de rata (fracción particulada de $100.000 \times g$) según ha sido previamente descrito (16), suspendido en el sistema amortiguador mencionado en diluciones de 1/2 a 1/6 del volumen original a las que se hicieron las adiciones pertinentes.

Los sobrenadantes de la ultracentrifugación a $100.000 \times g$ sirvieron como tales, o mediante manipulaciones pertinentes descritas en los resultados para seguir la acción activante en ellos localizada.

La radiactividad se midió en un contador de flujo gaseoso.

Productos. Glucosa-6-fosfato fue suministrada por National Biochemicals Corporation. UDPG (Uridín-difosfato de glucosa) y Tris (Tris-hidroximetil-aminometano; S-121) proceden de Sigma, el mercaptoetanol de la Eastman Kodak

Company, y el Versene (sal disódica) de Fischer-Scientific Company. Las resinas cambiadoras fueron obtenidas de Calbiochem.

Resultados

En la preparación del enzima particulado de músculo fresco de rata, según los métodos ya descritos (10, 13, 16) se observaba:

a) Una pérdida de alrededor de un 50 % en la actividad de la trasglucosilasa medida en ausencia de glucosa-6-fosfato (actividad I) cuando las partículas se resuspendían en el tampón 0,05 M Tris-0,005 M Versene-0,05 M mercaptoetanol.

b) Una recuperación prácticamente del 90-100 % de la actividad medida en presencia de glucosa-6-fosfato (actividad D) en las mismas condiciones.

c) Recuperación del 100 % de la actividad en el material particulado obtenido por supercentrifugación (2 horas a $100.000 \times g$), tanto la ensayada en ausencia como en presencia de glucosa-6-fosfato, si las partículas eran resuspendidas en su propio sobrenadante.

d) Ausencia casi total de actividad enzimática en el sobrenadante que no podía explicar el hecho anterior.

e) Idéntica recuperación del 100 % de la actividad cuando el enzima particulado era resuspendido en su propio sobrenadante que había sido previamente hervido durante 10 minutos a $100^\circ C$.

Todos estos datos indicaban la presencia de un factor no protéico, termolabile, en el sobrenadante de la centrifugación a $100.000 \times g$ de los extractos obtenidos luego de centrifugar a baja velocidad los homogenados de músculo (10, 13).

ANÁLISIS DEL FACTOR ACTIVANTE. — Los siguientes datos se obtuvieron tratando de averiguar la naturaleza del factor activante.

a) *Comportamiento frente a la hi-*

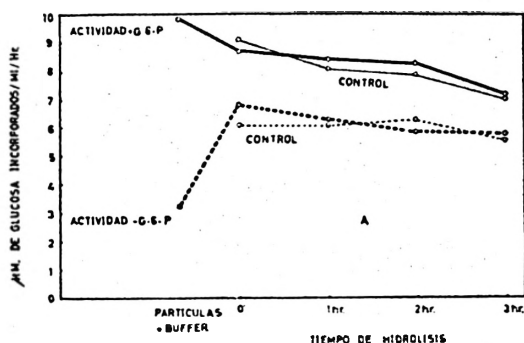


FIG. 1. Efecto de la hidrólisis ácida sobre el factor activante del sobrenadante de $100.000 \times g$. los dos primeros puntos de la gráfica (partículas + buffer) muestran la actividad obtenida por la fracción enzimática particulada cuando se suspende en el sistema amortiguador descrito en el texto para el ensayo de su actividad. En los siguientes puntos la fracción enzimática fue suspendida en volúmenes iguales al anterior, pero formados por partes iguales de amortiguador y sobrenadante tratado.

drólisis ácida. La figura 1 muestra el comportamiento frente a la hidrólisis ácida durante tres horas a $100^\circ C$. Para su realización se tomaron partes alícuotas de 7 ml. de sobrenadante hervido que se llevaron a concentración 1 N con ClH 10 N. Se llevaron cada uno de los tubos al baño maría hirviendo y al cabo de los tiempos anotados en la gráfica se retiró cada uno de ellos, se enfrió sobre hielo y se neutralizó a pH 7,5-7,8 con NaOH. El sobrenadante neutralizado se utilizó para las adiciones a la suspensión de partículas para ver su poder activante. Se hicieron controles paralelos mantenidos en el baño pero sin ácido.

Como se puede observar en la gráfica no hubo cambio significativo en el poder activante del sobrenadante durante las tres horas de hidrólisis ácida.

b) *Comportamiento a la hidrólisis alcalina.* Un experimento paralelo pero con hidrólisis alcalina puede observarse en la figura 2. Para el experimento se prepararon los tubos para la hidrólisis de

manera similar a la anterior pero llevándoles a concentración 1 N de NaOH con NaOH 10 N y luego del respectivo tiempo de hidrólisis neutralizadas a pH 7,5-7,8 con ClH. Se hicieron pruebas paralelas al anterior con sus correspondientes controles.

En la gráfica se observa un descenso paulatino de la capacidad activante del sobrenadante con el tiempo de hidrólisis. Disminuyen a la vez las actividades ensayadas en presencia y ausencia de glucosa-6-fosfato. La interpretación de este hecho recibirá atención en la discusión.

c) *Comportamiento frente a la diálisis.* La figura 3 muestra el comportamiento del sobrenadante de $100.000 \times g$, frente a la diálisis en agua destilada.

El sobrenadante hervido y centrifugado fue colocado en porciones de 2 ml. en sacos de colodión de 0,5 cm. de diámetro, que habían sido preparados con una noche de remojo en agua fría. Los sacos de colodión llenos y cerrados se introdujeron en cilindros de vidrio (alrededor de 2 litros de capacidad) con

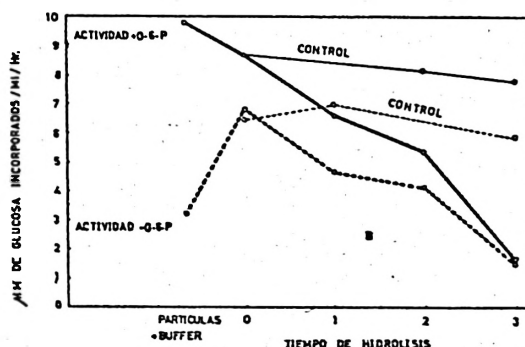


FIG. 2. Efecto de la hidrólisis alcalina sobre el poder de activación del factor localizado en el sobrenadante de $100.000 \times g$. Forma de ensayo como las señaladas en la figura anterior. Al cabo de tres horas de hidrólisis la actividad, tanto medida en ausencia como en presencia de glucosa-6-fosfato, ha descendido por debajo de la actividad original, lo que parece indicar que más que la destrucción de un activador, se formó un compuesto altamente inhibitor.

agua destilada, los cuales fueron sometidos a un movimiento lento de cabeceo mediante un motor adecuado.

En los tiempos señalados en la gráfica fueron separados los diversos sacos de colodión y el sobrenadante así dializado fue utilizado para las adiciones al enzima particulado y el ensayo de su actividad. En la gráfica se observa que a las tres horas de diálisis ha disminuido casi totalmente la capacidad de activación y luego de las seis horas prácticamente ha desaparecido. En presencia de glucosa-6-fosfato la actividad se mantiene constante.

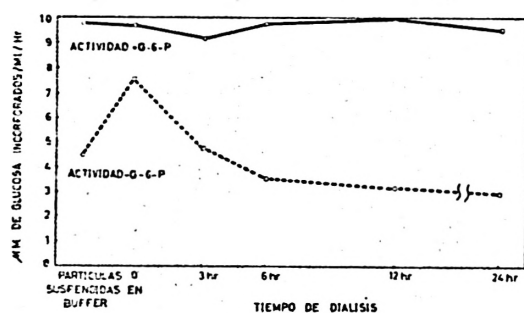


FIG. 3. Efecto del tiempo de diálisis sobre el poder activante del factor localizado en el sobrenadante de 100.000 $\times$ g. A las tres horas de diálisis ya ha desaparecido prácticamente el activador. Para los ensayos del poder de activación del sobrenadante, el enzima particulado fue resuspendido, según se indicó en la figura 1.

d) *Naturaleza iónica del factor activante.* Los experimentos encaminados a elucidar la naturaleza iónica del factor activante vienen resumidos en la figura 4. El tratamiento del sobrenadante hervido mediante resinas aniónicas (Dowex 50) o norita (Carbón activo) que absorbe los nucleótidos, no es capaz de eliminar la capacidad del sobrenadante, comparado con el efecto del mismo no tratado. El paso por resinas catiónicas (Dowex 2) le hace perder su capacidad de activación, indicando la naturaleza aniónica del factor activante.

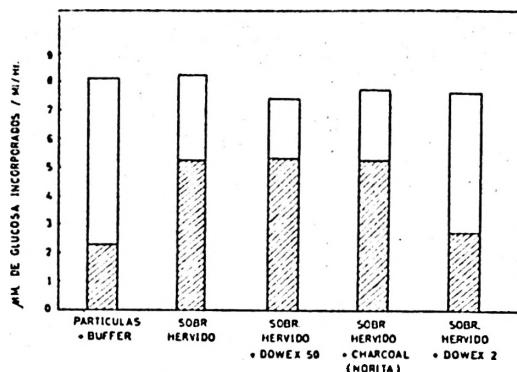


FIG. 4. Comportamiento del factor activante frente al tratamiento con resinas intercambiadoras. La columna de la izquierda representa el control, con la fracción enzimática resuspendida en el amortiguador ya mencionado. La siguiente, muestra la actividad en ausencia de glucosa-6-fosfato incrementada, cuando el enzima se suspende en buffer y sobrenadante hervido por partes iguales. Las tres siguientes muestran un proceso semejante, pero el sobrenadante hervido se trató previamente con distintas resinas intercambiadoras. El tratamiento con Dowex 2 retiene el factor.

e) *Determinación de los niveles de glucosa-6-fosfato.* La posibilidad de que fuese la glucosa-6-fosfato el factor activante fue considerada. Varios experimentos fueron realizados para comprobarlo. El análisis enzimático con glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y NADP dio valores analíticos constantemente inferiores a 2×10^{-5} M, concentraciones que son unas 30 veces inferiores a la K_m del enzima por el azúcar fosforilado, según las determinaciones de LELoir, también comprobadas por nosotros (16). Esto al parecer excluía a este compuesto como la causa de la activación que producía el sobrenadante. Otros detalles fueron comprobados más tarde.

f) *Fraccionamiento del factor adsorbido en resinas catiónicas.* Para obtener más detalles de la naturaleza iónica del factor contenido en el sobrenadante se llevaron a cabo una serie de experimentos de adsorción en columna median-

te Dowex 2 y elución a distintas concentraciones de ácidos.

En éstos se obtuvo el sobrenadante a partir de músculo fresco de rata (homogeneizado 1/10 peso/volumen, con el buffer 0,05 M Tris-0,005 M Versene de pH 8,2). El sobrenadante se hizo pasar a través de una resina catiónica Dowex 2, X 8, de malla 100-200, activada previamente con ClH. Sus características fueron: diámetro, 1,3 cm.; altura, 3 cm., es decir, con lecho o volumen activo de 4 ml.

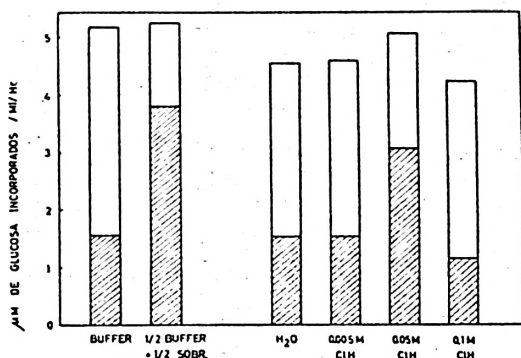


FIG. 5. Efecto de la elución con concentraciones de ClH de distinta fuerza iónica sobre el factor activante absorbido en una columna de Dowex 2. Las dos columnas de la izquierda son los controles de actividad de la fracción enzimática particulada, con y sin adición del sobrenadante. En las columnas de la derecha aparecen las actividades obtenidas utilizando las distintas fracciones eluidas de la columna, en la suspensión del enzima particulado (mitad de amortiguador y mitad de eluato previamente neutralizado).

Después de ser aplicados 20 ml. de sobrenadante, se lavó la columna con 10 veces su volumen (40 ml.) de agua destilada (Fracción I) y posteriormente con idénticos volúmenes de ClH 0,005 M (Fracción II), 0,05 M (Fracción III) y 0,1 M (Fracción IV). Se reguló el flujo de salida de la columna a 1 ml. por minuto en el lavado con agua y a 2 ml. por minuto en las eluciones con ClH. Se recogieron cada una de las fracciones en

matraces separados y se liofilizaron posteriormente durante siete horas.

Las cuatro fracciones liofilizadas fueron redisueltas en 2 ml. de mezcla amortiguadora diluida (0,0005 M Tris-0,005 M Versene-0,025 M mercaptoetanol) y todas ellas fueron neutralizadas hasta pH 7,2-7,4 con NaOH al 3 %. Las fracciones así preparadas fueron utilizadas para los ensayos de activación sobre el enzima particulado.

En la figura 5 se pueden apreciar los resultados de este tipo de experiencias. La activación conseguida, en ausencia de glucosa-6-fosfato, por la adición del sobrenadante sólo es recuperada al añadir la fracción III (ClH 0,05 M) obtenida por elución de la columna de Dowex 2.

g) *Identificación del factor eluido en la fracción III.* Uno de los aniones adsorbidos por las resinas catiónicas y que podría activar el enzima es la glucosa-6-fosfato, aunque ya estaba descrito que esta sustancia viene eluida por una concentración iónica más débil que la de la fracción III en una columna de estas condiciones (exactamente con ClH 0,005 M). Una doble comprobación nos eliminó la posibilidad de que el factor localizado en la fracción III fuera el azúcar fosforilado. A) El análisis enzimático demostró la presencia de cierta cantidad de glucosa-6-fosfato en la fracción de ClH 0,005 M ($1,2 \times 10^{-5}$ M) y no fue posible detectar nada en la fracción 0,05 M. B) La adición de glucosa-6-fosfato radiactivo (C^{14}) al sobrenadante, permitió recuperar la radioactividad, en una columna de condiciones idénticas a la anterior, también en la fracción II (ClH 0,005 M).

La fracción III activante presentaba un máximo de adsorción al U. V. en la zona de los nucleótidos (Fig. 6), que hizo sospechar que pudiera ser uno de ellos la causa de la activación. Sin embargo, luego del tratamiento con carbón activo (Norita), desaparecida la adsorción de los

nucleótidos (Fig. 6), la fracción III mantuvo su poder de activación.

Para comprobar si el factor activante, de carácter fuertemente aniónico, era de naturaleza orgánica o mineral, se sometió una parte alícuota (2 ml.) a incineración. Previa desecación a 150° C en un crisol de porcelana, se mantuvo durante 18 horas en una mufla Lindberg a 600° Centígrados. El residuo fue redisoluto con 2 ml. del tampón diluido ya mencionado, neutralizado hasta pH 7,42 con ClH y ensayado con el enzima particulado para ver su poder de activación. Al mantener su poder de activación quedó demostrada la naturaleza inorgánica del factor activante.

Las cenizas se analizaron para determinar su contenido en sulfato, ion que ya conocíamos tenía un cierto poder activante (16). Los valores analíticos obtenidos, entre $3,42$ y $4,7 \times 10^{-4}$ M, eran demasiado bajos para dar activación alguna.

Se analizaron entonces los fosfatos. Las cenizas contenían una cantidad de fosfato inorgánico, que transformada en molaridad con respecto al volumen original, resultó ser de 1,5 mMolar. Se determinó entonces la curva de activación del enzima particulado por el ion fosfato que aparece en la figura 7. La concen-

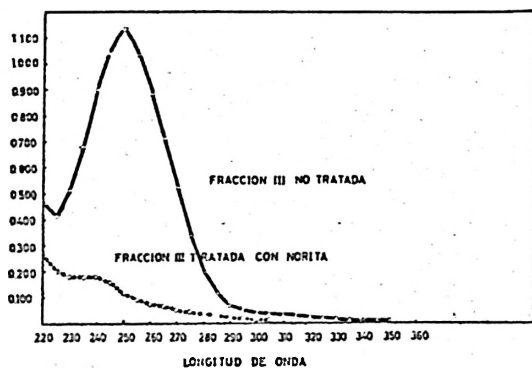


FIG. 6. Efecto del tratamiento con Norita (carbón activo), sobre el espectro de absorción ultravioleta, de la fracción activante obtenida por elución de la columna de Dowex 2.

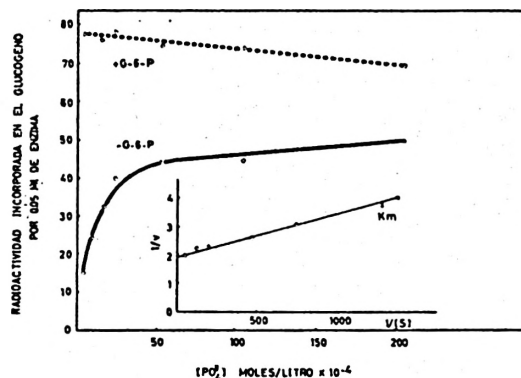


FIG. 7. Representación directa y recíproca de las curvas de actividad-concentración de fosfato obtenidas al añadir éste al sistema de ensayo. La actividad en presencia de glucosa-6-fosfato disminuye al incrementar la concentración de fosfato inorgánico.

tración de fosfato que producía una activación mitad de la máxima resultó ser 8×10^{-4} M. Calculada la concentración de fosfato a partir de los datos analíticos obtenidos en las cenizas, y corregi-

TABLA I

Valores comparativos de la activación del ion fosfato

Muestras	Concentraciones en Moles/l obtenidas por análisis (*)	Concentraciones teóricas en Moles/l dadas por la actividad sobre la curva de la fig. 7 (**)
A	$8,7 \times 10^{-4}$	$5,0 \times 10^{-4}$
B	$1,7 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$
C	$2,6 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$
D	$3,3 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-3}$

(*) Las concentraciones reseñadas vienen dadas por el análisis de fosfatos obtenidos en las cenizas conseguidas por la incineración a 600° C. y luego calculando su concentración final por las sucesivas diluciones realizadas expresamente para ver su poder de activación en los ensayos enzimáticos.

(**) Estos valores vienen dados por la concentración correspondiente al llevar sobre la gráfica de la figura 7 los valores de la activación medida como radioactividad en ordenadas, para conseguir el valor de la concentración en las abscisas.

dos para las diluciones utilizadas al preparar las mezclas para el ensayo enzimático, la dilución menor que daba la mayor activación resultó tener una concentración de fosfato de $3,3 \times 10^{-3}$ M. En la curva construida experimentalmente el valor máximo de la activación correspondía a una concentración de molaridad $2,6 \times 10^{-3}$.

En la tabla I se presentan varios valores calculados mediante el análisis directo de los fosfatos, teniendo en cuenta las diluciones realizadas, comparados con los correspondientes teóricos obtenidos al computar en la curva de la figura 7, las activaciones conseguidas con dichas diluciones de las cenizas obtenidas. Se comprobará la estrecha concordancia que aparece entre los mismos, hecho que demuestra de forma clara la naturaleza del factor activante.

Discusión

El trabajo de ROBBINS y cols. (7) sobre la UDPG-glucán-transferasa de músculo de palomo señalaba una estimulación del sobrenadante de 100.000 X *g* sobre la actividad de la fracción enzimática particulada. Ellos achacaron este estímulo a una fracción no dializable localizada en dicho sobrenadante, que había de completarse con Mg^{++} y fosfato inorgánico. Cuando LELOIR y col. (6) descubrieron la activación del enzima por glucosa-6-fosfato, se asumió que la activación observada era debida a esta sustancia (17).

BASU y BACHHAWAT (1), describieron para el enzima de cerebro de cordero una inhibición de la actividad de la transferasa por la adición de fosfato inorgánico al medio, inhibición que era contrarrestada por la adición de doble cantidad de glucosa-6-fosfato. En una nota final, añadida en pruebas, indican que cuando la transferasa quedaba libre de fosforilasa por purificación, ya no aparecía el efecto inhibidor del fosfato. Se leía in-

plícitamente que el fosfato sería el sustrato para la fosforilasa de efecto contrario a la transferasa.

LARNER y col. (2, 3) habían demostrado que la insulina aumentaba la formación de glucógeno en el diafragma de rata en presencia de concentraciones de fosfato inorgánico, que, en condiciones fisiológicas, deberían favorecer la demolición del glucógeno por vía de la fosforilasa, resultando al parecer contradictorio al de BASU y BACHHAWAT.

Nosotros (9, 16) demostramos la existencia de las dos formas del enzima de músculo de rata, postuladas en los trabajos de VILLAR PALASÍ y LARNER (18, 19). La forma I, — independiente de la presencia de glucosa-6-fosfato para su actuación — es activada por Mg^{++} , y la forma D, — que requiere la presencia de glucosa-6-fosfato para su actuación — no es activada por el Mg^{++} solo, pero a veces, en ciertas condiciones, este catión puede activar en presencia de la hexosa fosforilada (12, 13).

ROSELL-PÉREZ (8) demostró que el ion fosfato era activador de las formas I del enzima e inhibidor de las formas D. En el trabajo de ROSELL PÉREZ y LARNER (14) se demuestra que en la transferasa D, de músculo de perro la inhibición del ion fosfato se realiza de forma competitiva en el lugar de la activación de la glucosa-6-fosfato.

Los datos experimentales que aportamos en el presente trabajo establecen, en el conjunto de los anteriores comentarios, una base para la mejor comprensión de los mecanismos de regulación de la actividad de la UDPG-glucán-transferasa en particular y del metabolismo del glucógeno en general.

El ion activador para la transferasa de músculo de rata, aislado del sobrenadante obtenido después de dos horas de alta centrifugación, resultó ser fosfato inorgánico. Eso parece indicar que el activador obtenido por ROBBINS y col. (7) en el sobrenadante de los extractos

de músculo de palomo debería ser el mismo, ya que por diálisis sólo recuperaba su poder de activación por la adición de este compuesto. La presencia de ion Mg era también necesaria para activación máxima, lo que sugiere que estaban trabajando con una forma I de transferasa principalmente.

Los resultados de BASU y BACHHAWAT más bien parecen indicar que estuvieran trabajando con una forma D, aunque la aclaración final de la falta de inhibición por la purificación y separación de fosforilasa no parece convincente a la luz de los resultados de LARNER y col. ya mencionados.

La acción del ion fosfato, el activador localizado en el sobrenadante e identificado en este trabajo, se ejerce solamente sobre las formas I del enzima, puesto que sobre las formas D (cuando puras) no tiene efecto activante por sí solo, y ejerce acción inhibidora en presencia de glucosa-6-fosfato. Si observamos la figura 7, notaremos que en presencia de glucosa-6-fosfato (formas I + D) la actividad va disminuyendo a medida que incrementamos la concentración de fosfato, mientras que, por el contrario, va aumentando la actividad I, medida en ausencia del azúcar fosforilado. Resultados similares se pueden observar en el enzima de músculo de conejo (12, Tabla VI). En el músculo de perro, donde se puede obtener una forma D muy pura del enzima (13), el ion fosfato no tiene acción activante en ausencia de glucosa-6-fosfato, y en presencia de este necesario activador ejerce una acción inhibidora por competencia con el azúcar fosforilado (14). Las activaciones observables en las formas D en el trabajo anterior mencionado del enzima en músculo de conejo, deben achacarse a la presencia de cierta cantidad de forma I que acompaña a la forma D del enzima.

Los sobrenadantes obtenidos de músculo de conejo, rana o rata, son capaces de activar la fracción enzimática

particulada de la transferasa de músculo de conejo o rata indistintamente, sin embargo, ninguno de ellos, ni el suyo propio es capaz de producir activación alguna en el enzima particulado del músculo de rana (ROSELL-PÉREZ, datos experimentales e inéditos). Este dato tiene un doble valor demostrativo, si se recuerda que el enzima particulado de rana es un forma D absoluta (10). En primer lugar, que el ion fosfato no activa las formas D y en segundo lugar, apoyando las demostraciones experimentales del presente trabajo, que el factor activante localizado en el sobrenadante no puede ser la glucosa-6-fosfato que activaría las formas D.

El experimento de la hidrólisis alcalina que muestra la figura 2, vuelve a acentuar la imposibilidad de que sea la glucosa-6-fosfato el activador. Si fuera este compuesto, la actividad D (actividad + G-6-P) no debería disminuir con el tiempo de hidrólisis puesto que esta actividad enzimática se ensaya con cantidad suficiente de glucosa-6-fosfato para activación plena. La interpretación de este experimento no parece ser posible sino por la formación de un compuesto inhibidor durante el período de hidrólisis.

El papel fisiológico que puede ejercer el ion fosfato respecto al metabolismo del glucógeno en la célula, se ve ampliado con los datos aportados en el presente trabajo. Como sustrato de la fosforilasa, la actividad de ésta se ve en parte regulada por el equilibrio P. inorgánico/glucosa-1-P. Por otra parte, los niveles de fosfato inorgánico pueden mantener y estimular un cierto nivel de actividad de la forma I de la transferasa que sintetiza el glucógeno. Cuando parte del fosfato desaparece por excesiva glucogenólisis, la glucosa-6-fosfato formada (vía fosforilasa-mutasa), siendo mejor activador puede tomar el papel del fosfato e incluso, si los niveles son suficientes, podrá activar la forma D, que actuará en

tanto en cuanto tenga suficiente activador. La actividad de esta segunda forma del enzima (forma de reserva y emergencia) vendrá de nuevo frenada y contrarregulada, cuando por glucólisis y utilización del exceso de hexosa-fosfato formados, los niveles de fosfato inorgánico vuelvan a su cauce fisiológico. Esto es una muestra más de los mecanismos de regulación y contrarregulación que además de los hormonales (4, 8) posee la célula a nivel de los metabolitos intermedios (Regulación alostérica).

Resumen

En el presente trabajo se demuestra la existencia de un factor activante de la UDPG-glucán-transferasa de músculo de rata. Este factor activador, de tipo inorgánico, resultó ser el ion fosfato. Este compuesto se aísla del sobrenadante en la alta centrifugación ($100.000 \times g$) al preparar el enzima particulado. La identificación se ha llevado a cabo mediante una serie de etapas en las que se incluyen, la hidrólisis ácida y alcalina, diálisis, tratamiento mediante resinas intercambiadoras, separación por cromatografía de columna catiónica (Dowex 2) e incineración del factor separado mediante elución con ClH 0.05 M . Las cenizas obtenidas resuspendidas en el sistema amortiguador utilizado rutinariamente mantienen el nivel de activación. El análisis de estas cenizas demostró que tenían una buena cantidad de fosfato inorgánico. Mediante una curva de activación con fosfato monosódico se demostró la identidad de la activación producida por el factor inorgánico localizado en las cenizas y el anion fosfato utilizado para dicha curva. La activación de la transferasa por el ion fosfato aquí demostrada (forma I) y la inhibición que el mismo factor produce sobre las formas glucosa-6-fosfato dependientes (formas D) del enzima, indican que el ion fosfato juega un papel definitivo en los mecanismos de regulación alostérica de la biosíntesis de glucógeno.

Summary

Determination and identification of an activating factor of UDPG-glucan-transferase in rat muscle

The present paper demonstrates the

existence of and identifies an activating factor for the UDPG-glucan-transferase from rat muscle. This factor of inorganic nature is inorganic phosphate. This compound was isolated from the $100.000 \times g$ supernatant when preparing the particulate enzyme from rat skeletal muscle. The identification of the factor was carried out by steps including, acid and alkaline hydrolysis, dialysis, ionic interchange treatment, column chromatography separation (Dowex 2) and ashing of the active fraction obtained by 0.05 M HCl elution from the column. Chemical analysis of the ashes demonstrated the presence of substantial amounts of inorganic phosphate. A curve activity-concentration was produced with inorganic monosodium phosphate which revealed the identity of the inorganic factor localized in the ashes. The positive activation of the transferase by inorganic phosphate (I form) and the inhibition that the same factor produces on the glucose-6-phosphate dependent forms of the enzyme (D forms) indicate that inorganic phosphate plays a positive role in allosteric regulation of glycogen synthesis.

Bibliografía

- (1) BASU, D. K. and BACHHAWAT, B. K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 123, 1961.
- (2) LARNER, J., VILLAR PALASÍ, C. and RICHMANN D. J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **82**, 345, 1959.
- (3) LARNER, J., VILLAR PALASÍ, C. and RICHMANN, D. J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **86**, 56, 1960.
- (4) LARNER, J., ROSELL PÉREZ, M., FRIEDMAN, D. L. and CRAIG, J.: *Biochem. J.*, **89**, 1, 36 p, 1963.
- (5) LELOIR, L. F. and CARDINI, C. E.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 6340, 1957.
- (6) LELOIR, L. F., OLAVARRÍA, J. M., GOLDBERG, S. H. and CARMINATTI, H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **81**, 508, 1959.
- (7) ROBBINS, P. W., TRAUT, R. R. and LIPPMAN, F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **45**, 6, 1959.
- (8) ROSELL PÉREZ, M.: *Fed. Proc.*, **21**, 206, 1962.

- (9) ROSELL PÉREZ, M. and LARNER, J. : *Fed. Proc.*, **20**, 193, 1961.
- (10) ROSELL PÉREZ, M. and LARNER, J. : *Biochemistry*, **1**, 769, 1962.
- (11) ROSELL PÉREZ, M. : *Resúmenes II Reunión Bioquímicos Españoles*, pág. 9, 1963.
- (12) ROSELL PÉREZ, M. and LARNER, J. : *Biochem.*, **3**, 75, 1964a.
- (13) ROSELL PÉREZ, M. and LARNER, J. : *Biochem.*, **3**, 81, 1964b.
- (14) ROSELL PÉREZ, M. and LARNER, J. : *Biochem.*, **3**, 773, 1964c.
- (15) ROSELL PÉREZ, M. and LARNER, J. : *Abstr. Papers, VI Intern. Congr. Biochem., New York*, VI-98, 595, 1964d.
- (16) ROSELL PÉREZ, M., VILLAR-PALASÍ, C. and LARNER, J. : *Biochem.*, **1**, 763, 1962.
- (17) SCHMID, R., ROBBINS, P. W. and TRAUT, R. R. : *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, **45**, 1236, 1959.
- (18) VILLAR PALASÍ, C. and LARNER, J. : *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 171, 1960.
- (19) VILLAR PALASÍ, C. and LARNER, J. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 436, 1961.