

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

Estudios sobre la UDPG: α -glucán transferasa de músculo de rana *

por

M. Rosell-Pérez** y V. Villar-Palasi

(Recibido para publicar el 9 de septiembre de 1966)

En un trabajo anterior, ROSELL PÉREZ y LARNER (8) estudiaron las constantes cinéticas y algunas características de la forma enzimática de la UDPG: α -1,4-glucán α -4-glucosiltransferasa (transferasa C.E. 2, 4, 1, 11), obtenida a partir de músculo de rana (*Rana pipiens*). Las características especiales de este sistema enzimático aconsejaron hacer un estudio más a fondo del mismo que aclarara su forma de actuación, así como estudiar la posibilidad de obtener una forma I del enzima (7), independiente de la presencia de glucosa-6-fosfato para su actividad, para poder iniciar estudios sobre la acción de la insulina en este sistema.

Este trabajo presenta datos sobre la acción de iones y cationes, activadores e inhibidores, acción del ATP-Mg, etc., que caracterizan y definen a este enzima aportando nuevas ideas y aclarando el comportamiento de esta forma enzimática en relación con la biosíntesis de glucógeno y su regulación en esta especie.

Material y métodos

Métodos analíticos. La medida de la actividad enzimática ha sido descrita previamente (7, 12). Las concentraciones de los reactivos en las mezclas para la reacción enzimática son, con muy ligeras variaciones, las establecidas ya en otros trabajos anteriormente publicados (7, 10, 12). La adición de nuevos compuestos y su concentración se señala en el lugar oportuno. Cuando se agrega ATP y Mg, este último catión se encuentra en doble concentración que la del ATP. Las incubaciones para la reacción enzimática han sido realizadas siempre a 30° C, e igualmente las preincubaciones en presencia o ausencia de mercaptoetanol. Los tiempos

* Subvencionado por un PHS Grant (AM-10023) de E.E. U.U., y una ayuda a la Investigación, del Ministerio de Educación y Ciencia.

** Colaborador del Instituto «Jaime Ferrán», del C.S.I.C.

de incubación para el ensayo de actividad enzimática fueron de 5-10 minutos normalmente.

El preparado enzimático de músculo de rana (*R. pipiens* o *esculenta*) ya fue descrito (8). Se han utilizado los flúidos sobrenadantes de la baja centrifugación (preparados o extractos crudos) o la fracción particulada luego de centrifugación durante dos horas a $100.000 \times g$ (purificada unas cincuenta veces), dependiendo del tipo de experimentos. La radiactividad fue medida en contadores de ventana fina o sin ella, pero de flujo gaseoso.

Productos. La glucosa-6-fosfato (glucosa-6-P) y la 2-desoxi-glucosa-6-fosfato (2DG-6-P) proceden de la Nutritional Biochemicals Corporation. Tris S-121 (tris(hidroximetil)aminometano), UDPG (Uridín-difosfato de glucosa) y ATP (Adenosín trifosfato) fueron suministrados por Sigma Chemical Co. El mercaptoetanol procede de la Eastman Kodak Company. Versene (etilendiamino tetraacetato disódico) es de Fiescher Scientific Company. Las sales de Mg, Ca, K o los aniones PO_4^{3-} y SO_4^{2-} , en forma de sales disódicas, son reactivos puros Merk para análisis.

Resultados

La anormal activación e incremento de la forma D del enzima observada anteriormente (8) por la preincubación con mercaptoetanol, así como la extraordinaria activación de la forma D por el ion Mg^{++} (8) indujeron a nuevos estudios sobre los mecanismos de activación y formación de este enzima, por preincubación con o sin mercaptol. Se buscó y analizó la cinética de la activación por Mg^{++} en presencia de glucosa-6-P u otros compuestos fosforilados, las acciones activadoras o inhibidoras de aniones y cationes y los efectos del ATP, sólo o con Mg^{++} por su posible influencia en procesos de transformación.

ACCIÓN E INFLUENCIA DEL MERCAPTOETANOL

La figura 1 presenta la influencia que ejerce la presencia de mercaptoetanol (0,05 M) en el incremento de la actividad enzimática que se observa en presencia de glucosa-6-P, por la preincubación del enzima a $30^\circ C$. El preparado enzimático es un extracto crudo. El incremento de actividad D que se obtiene mediante la preincubación a $30^\circ C$ no depende de la presencia de mercaptoetanol (presencia de sustancias endógenas SH-protectoras), pero la presencia de este último compuesto, en concentración adecuada, incrementa el proceso de aparición de actividad glucosa-6-P dependiente (forma D). La ligera actividad I (probablemente debida a glucosa-6-P endógena) no presenta apenas variación.

La influencia protectora del mercaptoetanol puede observarse, en estos preparados, solamente en un estrecho margen de concentración (0,005 a 0,08 M),

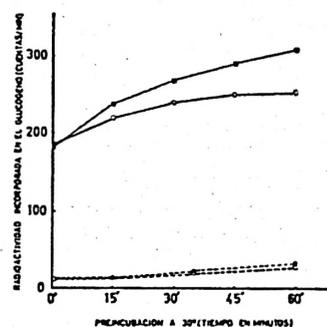


FIG. 1. Acción de la preincubación y presencia de mercaptoetanol sobre la actividad de la transferasa de músculo de rana. La preincubación a $30^\circ C$ hace aumentar la actividad en presencia de glucosa-6-P (líneas superiores). La línea entre cuadrados representa la adición de 0,05 M mercaptoetanol al enzima durante la preincubación. La línea entre círculos, en ausencia de mercaptol. Las líneas discontinuas inferiores, con el mismo significado, no llevaban glucosa-6-P al ensayar la actividad enzimática.

siendo 0,05 M la concentración óptima observada. La figura 2 muestra un experimento en que la concentración de mercaptoetanol se hizo 10 veces mayor (0,5 M). Se puede observar el efecto inhibidor de esta concentración durante la preincubación del enzima.

Este incremento de la actividad D por la preincubación del enzima a 30° C es observable solamente en extractos crudos. La purificación en la obtención del enzima particulado por ultracentrifugación a 100.000 × g durante dos horas le hace perder esta cualidad, aun resuspendiendo el enzima particulado en 0,05 M Tris-0,005 M Versene en presencia de 0,05 M mercaptoetanol.

ACCIÓN DE LOS ANIONES PO_4^{3-} Y SO_4^{2-}

La caracterización de la forma enzimática de la transferasa de músculo de rana como de tipo D (7) se logró por el estudio de la acción de dos típicos inhibidores de estas formas (11), es decir, los iones fosfato y sulfato.

La tabla I muestra la acción inhibidora de los iones SO_4^{2-} y PO_4^{3-} sobre los preparados crudos del enzima o sobre los más purificados de la fracción particulada.

La acción del ion SO_4^{2-} es menor en ambos casos, comparada con la ejercida por el ion PO_4^{3-} . En la fracción cruda, la inhibición por el ion sulfato es muy

TABLA I

Acción de los iones PO_4^{3-} y SO_4^{2-} sobre el enzima de músculo de rana. Actividad dada como radiactividad incorporada en el glucógeno en cuentas/minuto (1).

Preparación	Anión	O Control	Concentración del anión añadido M/l				
			5×10^{-4}	$1,5 \times 10^{-3}$	5×10^{-3}	1×10^{-2}	$1,5 \times 10^{-2}$
Extracto crudo (2)	SO_4^{2-}	185	181 (2 %)	175 (5 %)	172 (7 %)	162 (12 %)	164 (11,5 %)
	SO_4^{2-}	185	161 (13 %)	155 (16 %)	103 (44 %)	73 (60,5 %)	54 (71 %)
Fracción particu- lada (3)	PO_4^{3-}	124	114 (8 %)	109 (12 %)	111 (10 %)	63 (49 %)	53 (57 %)
	PO_4^{3-}	124	107 (14 %)	88 (29 %)	63 (49 %)	39 (69 %)	28 (77 %)

(1) Los ensayos de actividad fueron hechos en condiciones standard en presencia de 0,01 M glucosa-6-P. Las cifras dadas entre paréntesis indican el porcentaje de inhibición en cada caso.

(2) El extracto crudo es el sobrenadante de centrifugar a 3.000 × g el homogenado de músculo de rana 1 : 10 peso/volumen.

(3) La fracción particulada es la preparación enzimática obtenida luego de centrifugar durante dos horas a 100.000 × g el extracto crudo. Esta fracción se suspendió, para el ensayo de actividad, en un volumen igual al original del amortiguador 0,05 M Tris-0,005 M Versene.

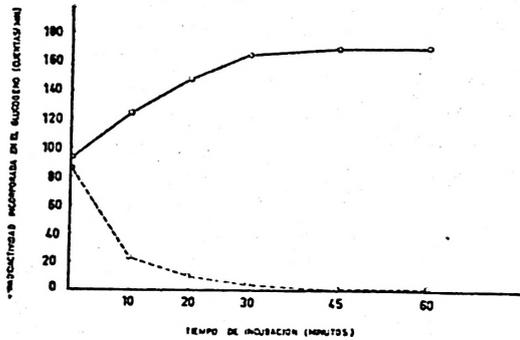


FIG. 2. Influencia del exceso de mercaptoetanol sobre la transferasa de músculo de rana durante la fase de preincubación. La línea continua representa aquí la actividad conseguida por la preincubación sin la adición de tiol. La línea discontinua muestra el efecto de la adición a la muestra que se incubaba de una concentración de mercaptoetanol 0,5 M. En ambos casos la actividad enzimática se midió en presencia de glucosa-6-P.

ligera y a concentraciones $1,5 \times 10^{-2}$ M sólo es del 11,5 %. En la fracción particulada la inhibición es algo mayor, y a concentraciones a nivel 10^{-2} M son ya bastante manifiestas (49 y 57 %). El ion $\text{PO}_4^{=}$ inhibe muy acentuadamente tanto las preparaciones crudas como las más purificadas obtenidas por ultracentrifugación del enzima a $100.000 \times g$ durante dos horas. En ambas preparaciones las inhibiciones obtenidas con las concentraciones más altas ensayadas superan el 70 %. El análisis cinético muestra que la inhibición que se produce es de tipo competidor con la glucosa-6-P. La K_i de inhibición para el ion fosfato es de alrededor de 5×10^{-3} M en la fracción particulada y ligeramente superior (7×10^{-3} M) en la fracción cruda. Para el ion $\text{SO}_4^{=}$ es, al menos de unas 5 a 10 veces superior en la fracción particulada. Las cenizas obtenidas en el análisis del factor activante de la transferasa I de músculo de rata (12), disueltas en el amortiguador antes mencionado, ensayadas frente a la preparación enzi-

mática de músculo de rana, en presencia de glucosa-6-P, presentaron un típico fenómeno de inhibición por competencia.

ACCIÓN DE ALGUNOS CATIONES. ACTIVACIÓN POR EL Mg^{++}

En el trabajo ya citado (8) describimos la gran activación de la glucosiltransferasa de músculo de rana en presencia de Mg^{++} . Nuevos experimentos fueron ideados para encontrar la explicación de este hecho, estudiándose asimismo la acción de otros cationes.

La figura 3 muestra los resultados de uno de los ensayos típicos. Frente al control (sin adiciones, excepto la presencia de glucosa-6-P) la adición de los iones Mg^{++} y Ca^{++} , en forma de cloruro, hasta una concentración de $1,5 \times 10^{-2}$ M produjo un aumento en la actividad del 65 y 66 %, respectivamente.

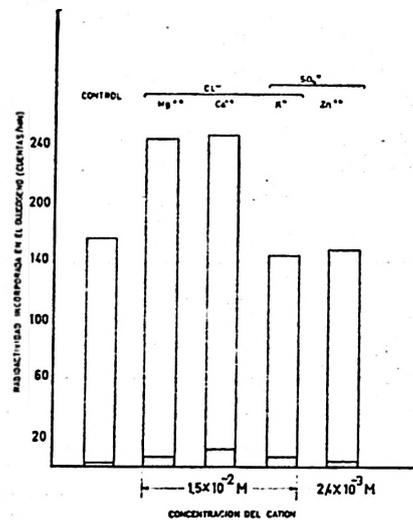


FIG. 3. Acción de algunos cationes sobre la actividad de la transferasa de músculo de rana. La altura de las barras representa la actividad. La altura total es la actividad medida en presencia de glucosa-6-P. La parte rayada la mínima actividad registrada en ausencia del activador. Las concentraciones utilizadas se encuentran indicadas en las abscisas.

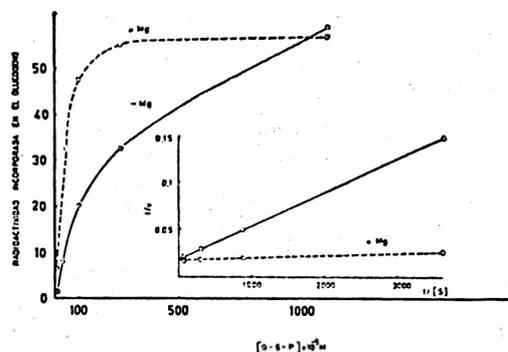


FIG. 4. Cinética de la activación de la transferasa de músculo de rana por el ion Mg^{++} . Representación directa y por el método de Lineweaver-Burk de las curvas actividad-concentración de glucosa-6-P con o sin la presencia de $0,008\text{ M}$ de $MgCl_2$. La K_a aumenta y por ello la afinidad del enzima por el activador, con la presencia del catión.

El ion K^+ , a la misma concentración de los anteriores, y el ion Zn^{++} a concentración $2,4 \times 10^{-3}\text{ M}$, ambos como sulfatos, no produjeron activación alguna. Estos dos últimos cationes en forma de cloruros tampoco dieron resultado alguno. La radiactividad incorporada en ausencia de glucosa-6-P, unas cinco cuentas por minuto sobre la básica, no es significativa.

Para averiguar el mecanismo de activación por el Mg^{++} se realizó un análisis cinético de la activación por la glucosa-6-P en ausencia y presencia de este ion. La figura 4 muestra las curvas actividad-concentración de activador en la representación directa y en la inversa de Lineweaver-Burk.

De los resultados presentados en esta gráfica, los valores obtenidos para la constante de activación (K_a) de la glucosa-6-P para este enzima son de $2 \times 10^{-3}\text{ M}$ sin ion Mg^{++} y $2 \times 10^{-4}\text{ M}$ en presencia del catión. Es decir, la afinidad del enzima por el activador glucídico fosforilado es incrementada unas 10 veces en presencia del ion Mg^{++} . Las implicaciones de este comportamiento con

las grandes activaciones observadas serán discutidas posteriormente. La actividad drástica debida a los iones Mg^{++} o Ca^{++} se observa mucho más claramente en la fracción particulada.

ACCIÓN DE LA 2-DESOXI-GLUCOSA-6-FOSFATO

ROSELL PÉREZ y LARNER (11) demostraron que la 2-desoxi-glucosa-6-fosfato (2-DG-6-P) era un inhibidor de tipo competidor con la glucosa-6-P para la forma D del enzima de músculo de perro, y que podía actuar también como un activador débil en ausencia de glucosa-6-P. Experimentos con este desoxiazúcar, utilizado como activador o inhibidor, han sido realizados para caracterizar también la forma de la UDPG-glucán transferasa de músculo de rana.

La figura 5 muestra, en la presentación gráfica de los recíprocos, la acción inhibidora, por competencia con la glucosa-6-P, de diferentes concentraciones de 2-DG-6-P. La competencia se establece tanto si hay como si no hay Mg^{++} presente.

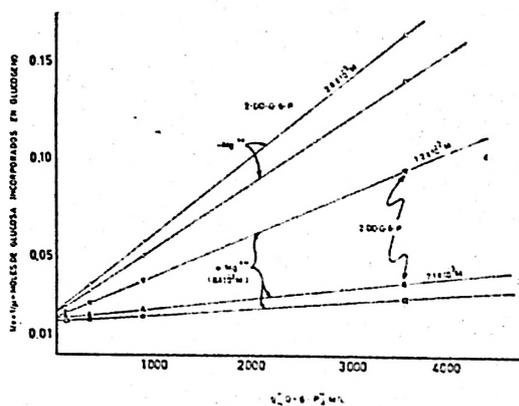


FIG. 5. Acción de la 2-DG-6-P como inhibidor por competencia con la glucosa-6-P. Representación de Lineweaver-Burk de varias curvas de actividad-concentración de activador frente a varias concentraciones de inhibidor y varias condiciones. Se señalan también las curvas sin inhibidor, con o sin la presencia de Mg^{++} .

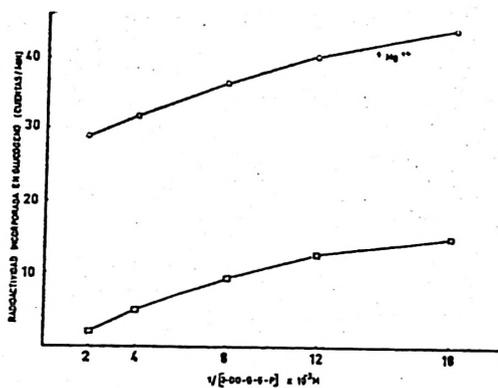
La constante de inhibición (K_i) obtenida según la fórmula:

$$K_i = \frac{(I) \times K_m}{\text{Pendiente} \times V_m - K_m}$$

es del orden de 5×10^{-3} M.

Como ocurre para la forma D del enzima de músculo de perro (11), la 2-DG-6-P actúa como un débil activador del enzima de músculo de rana, en ausencia de glucosa-6-P. En la figura 6 vienen representadas, en forma directa y por recíprocos, las curvas de actividad-concentración de 2-DG-6-P.

a)



b)

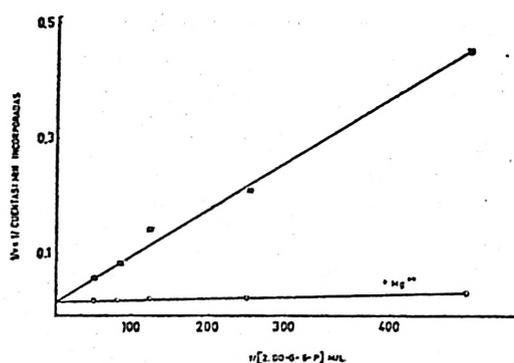


FIG. 6. Representaciones gráficas directa (a) y por el método de Lineweaver-Burk (b) de las curvas actividad-concentración de activador, utilizando 2-DG-6-P como activador. Se observa la débil actividad que produce este derivado, y la definitiva influencia de la presencia de Mg^{++} ($0,01$ M). Las incubaciones para la actividad del enzima fueron de 10 minutos.

Podemos de nuevo observar en esta figura la gran influencia que tiene el Mg^{++} para la acción de la molécula activadora. Su presencia produce un aumento de actividad que oscila desde unas 20 veces, a bajas concentraciones de activador hasta unas 3 veces las mayores concentraciones utilizadas. Las constantes de activación obtenidas (K_a), al igual que ocurre para el verdadero activador glucosa-6-P, sufren una variación, esta vez de unas 30 veces, por la presencia del Mg^{++} . La K_a sin Mg^{++} es del orden de 3×10^{-2} M, y en presencia de este catión se hace 1×10^{-3} M.

ACCIÓN DEL ATP-Mg

La adición de ATP-Mg a preparaciones crudas de transferasa de músculo de rata, conejo o perro transforma la forma I del enzima (independiente de la presencia de glucosa-6-P) en la forma D (dependiente del azúcar fosforilado para su actividad) (3, 10). Se quiso ver qué acción podía tener el Mg y ATP en las preparaciones de músculo de rana. La figura 7 muestra dos típicos experimentos.

En la parte (a) se observa el efecto de la preincubación del enzima en un preparado crudo. A los 30 minutos de la preincubación se añadió a la muestra preincubada ATP y Mg hasta unas concentraciones $0,005$ y $0,01$ M, respectivamente, continuándose la preincubación a 30° C. Se ensayó la actividad enzimática a los 6 y 10 minutos posteriores a la adición. Separadamente se añadió a otra parte alícuota de la muestra $MgCl_2$ solamente hasta concentración $1,5 \times 10^{-2}$ M y se ensayó la actividad a los 10 minutos de la adición. Una parte alícuota se siguió incubando sin adiciones para que sirviese de control.

Puede observarse que la adición de ATP-Mg produce un descenso en la actividad del enzima. La adición de Mg^{++} solamente no tiene este efecto, sino que su acción estimuladora de la actividad

enzimática se manifiesta inmediatamente. La poca actividad medible en ausencia de glucosa-6-P reproduce fielmente lo que ocurre en la actividad enzimática medida en presencia de este azúcar fosfato, lo que parece clara indicación de que, en este caso, era debida a la glucosa-6-P endógena de la preparación. Este comportamiento frente al ATP-Mg es diferente al de otras preparaciones de origen distinto e insistiremos un poco más sobre él en la discusión.

La parte (b) de la gráfica muestra otro

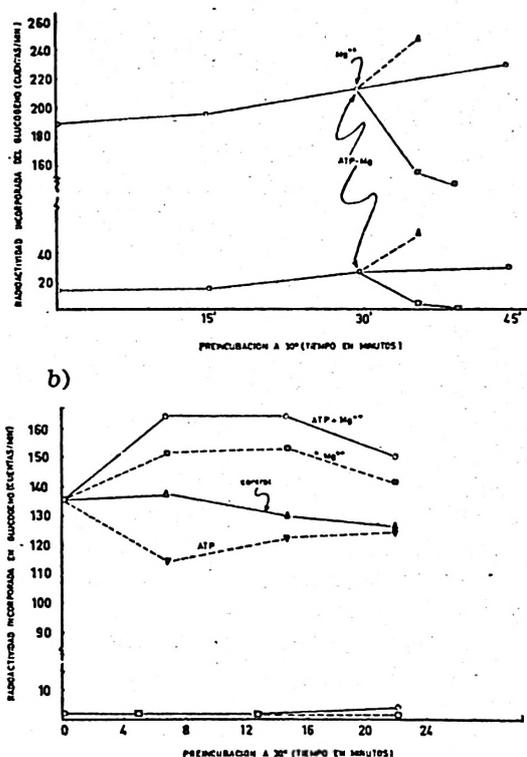


FIG. 7. Acción del ATP-Mg sobre la transferasa de músculo de rana. La parte (a) de la gráfica muestra la adición de estos compuestos a una preparación cruda. En la parte (b) se muestra la adición de los mismos compuestos al enzima purificado por ultracentrifugación. Las líneas superiores de ambas gráficas representan la actividad medida en presencia de glucosa-6-P y las inferiores la medida en ausencia del mismo.

tipo de experimentos. Esta vez la adición del ATP-Mg se realizó sobre la preparación del enzima particulado, obtenido luego de centrifugar el extracto crudo durante dos horas a $100.000 \times g$. La adición del ATP-Mg incrementa la actividad y también lo hace el Mg⁺⁺ solo, aunque un poco menos. El ATP solo no tiene acción; más bien resulta algo inhibitorio en los primeros momentos, pero a los 22 minutos de incubación se ha igualado con la actividad que presenta el control sin adiciones, probablemente por destrucción de ATP.

Discusión

En este trabajo se aportan datos que contribuyen a ampliar el conocimiento de los mecanismos enzimáticos que colaboran en la biosíntesis de glucógeno. El sistema de la UDPG- α -glucán transferasa de músculo de rana difiere de los hallados en músculo de varias especies animales en varios aspectos, aunque las características de la forma enzimática presente coinciden con las formas D generalmente estudiadas.

La activación descrita por ROSELL PÉREZ y LARNER (8) al incubar el enzima con mercaptoetanol, habiendo glucosa-6-P presente cuando se ensaya la actividad enzimática, difiere del resto de los enzimas estudiados. En este trabajo citado se señalaba que el incremento de actividad observada quizá fuera consecuencia de la activación o transformación de un precursor o precursores inactivos. Como insistiremos más adelante, hay otros datos en este trabajo que parecen señalar hacia la presencia de precursores inactivos de la forma D de este enzima.

Tal y como señalábamos (10) para el sistema enzimático de músculo de perro, la transformación de la forma D en la forma I de la transferasa, por preincubación del enzima a 30° , era acelerada gradualmente por la presencia de mercaptoetanol. Éste no era requerimiento exclusivo, ya que en su ausencia tam-

bién tenía lugar la transformación, debido probablemente a los compuestos SH-protectores endógenos. En el enzima estudiado en este trabajo, según se observa en la figura 1, la activación conseguida por la preincubación tampoco depende del tiol, aunque la acción de éste es bien manifiesta y se consiguen activaciones mayores en su presencia. La eliminación de los compuestos endógenos SH-protectores, por ultracentrifugación del enzima muestra que no son éstos solamente la causa de la reactivación, ya que la fracción particulada en presencia del mercaptoetanol protector ya no exhibe estas propiedades. Por la centrifugación se separa o destruye un factor necesario para que esto ocurra.

El exceso de mercaptoetanol puede resultar inhibidor. Solamente concentraciones 10 veces superiores a las óptimas son capaces de inducir una total inhibición de la actividad por preincubación a 30° C (fig. 2). Esta inactivación es dependiente del tiempo. A tiempo 0 no existe tal inhibición, que se va haciendo más manifiesta a medida que transcurre el tiempo de preincubación. El exceso de grupos SH debe producir reacciones internas y destrucciones de algunos puentes disulfuro en la molécula enzimática que deben ser necesarios para su actividad.

La forma de transferasa de músculo de rana se comporta como una auténtica forma D, es decir, de las descritas como dependientes de la presencia de glucosa-6-P para su actividad (8, 9, 10).

Como ocurre en la forma D del músculo de conejo (9) o perro (11), el enzima de músculo de rana es inhibido por los iones $\text{SO}_4^{=}$ y PO_4^{\equiv} de manera competitiva con el activador glucosa-6-P. El sobrenadante de 100.000 \times g de las preparaciones enzimáticas de músculo de rata tiene un factor activador de las formas I (12) que resultó ser ion PO_4^{\equiv} . Las cenizas en donde se identificó ese factor, resuspendidas en el amortigua-

dor Tris-Versene comúnmente utilizado, mostraron inhibición competitiva, en presencia de glucosa-6-P, sobre la forma D de músculo de rana, nueva prueba de la naturaleza de aquel activador.

Mientras que el ion sulfato no tiene gran significado biológico a las concentraciones inhibitorias estudiadas, el ion PO_4^{\equiv} juega un importante papel, y se demuestra aquí una vez más su importancia como regulador alostérico en el metabolismo del glucógeno, al ser a la vez sustrato de la fosforilasa y activador e inhibidor, respectivamente, de las formas I y D de la transferasa. En el músculo de rana su papel se acentúa, ya que, al parecer, la única forma enzimática presente es la D. Cuando los niveles de glucosa-6-P sean abundantes, por su buena alimentación, este mismo metabolito estimulará la biosíntesis de glucógeno, al mismo tiempo que frena la glucogenolisis. En períodos de penuria alimenticia, y por ende energética, el consumo de ATP celular incrementará el fosfato inorgánico, que servirá a su vez para frenar la poca síntesis de glucógeno, haciendo que los hexosafosfatos deriven hacia glucólisis. Al mismo tiempo el fosfato servirá como sustrato para la formación de hexosafosfatos procedentes del almacén glucogénico vía fosforilasa. Éste habrá de ser el mecanismo regulador que probablemente funcione en los leucocitos humanos (13).

La acción estimulante del Mg^{++} , señalada aquí también para el Ca^{++} , era otra de las aparentes anomalías del enzima en esta especie. Nosotros habíamos descrito la activación por Mg^{++} de las formas I de músculo de rata (7), conejo (9) y perro (10), pero las formas D resultan poco o nada activadas por este catión. Por el análisis cinético realizado aquí queda demostrado que el ion Mg^{++} incrementa grandemente la afinidad del enzima por la molécula del activador glucosa-6-P. Esto se observa tanto en las preparaciones crudas como en las purifi-

cadadas por ultracentrifugación, aunque en estas últimas es mucho más aparente. Como la K_a de la glucosa-6-P resulta bastante más alta (2×10^{-3} M) que la determinada para los enzimas de otras especies, resulta que las concentraciones de activador utilizadas en las mezclas de ensayo no eran saturantes. La presencia del ion Mg^{++} , rebajando unas 10 veces la K_a , es suficiente para hacer las concentraciones de glucosa-6-P saturantes, y por ello duplicar la actividad. Este dato aquí analizado tiene considerable interés, puesto que, siendo el ion Mg^{++} típicamente intracelular, hace que las concentraciones de glucosa-6-P y sus variaciones resulten, aun a los bajos niveles biológicos, altamente significativas y de gran importancia en la regulación del metabolismo del glucógeno en esta especie. En leucocitos humanos existe una situación similar (13), por lo que las concentraciones y presencia de Mg^{++} han de jugar un importante papel en la biorregulación de la síntesis de glucógeno en ciertas especies, o incluso en ciertas células del organismo, en conjunción con la presencia de azúcares fosforilados.

Esta forma de actuación del ion Mg^{++} viene corroborada de nuevo en los estudios con 2-DG-6-P utilizado como activador. Aunque la K_a de esta molécula es muy pobre, la afinidad del enzima por la misma se ve incrementada unas 30 veces por la presencia del Mg^{++} . Esto es una indicación clara de que el catión divalente actúa como nexo de unión entre la molécula activadora y el centro de activación del enzima. Es probable que ésta sea también la explicación de la activación observada para las formas I en presencia de Mg^{++} . En este caso debe ser el sustrato UDPG el que sea mejor ligado al enzima por la presencia del catión, ya que medimos la actividad de estas formas en ausencia de glucosa-6-P.

La acción del ATP-Mg observada en este sistema también difiere de la estudiada en los sistemas enzimáticos de

otras especies. En los sistemas enzimáticos de músculo esquelético de rata (3) y perro (10) la adición del Mg^{++} y ATP a las preparaciones crudas tiene la propiedad de convertir la forma I en la forma D del enzima. Esto se manifiesta por una disminución de la actividad medida en ausencia de glucosa-6-fosfato (I), mientras que la medida en presencia de este activador (D) no sufre cambio significativo.

El sistema de la transferasa de músculo de rana se comporta de manera bien diferente. La forma I no aparece, y al añadir el ATP-Mg (fig. 7), es la forma D la que desaparece o disminuye. La inferencia de este tipo de reacción es de que se está formando una especie molecular inactiva, que lógicamente debe ser más fosforilada que la forma D. El que la poca actividad medible en ausencia de glucosa-6-P siga una curva paralela a la actividad D es indicación clara de que la actividad medida era debida a la glucosa-6-P endógena presente y no una leve actividad I. En la fracción particulada ha desaparecido este fenómeno de la transformación. En el sobrenadante se ha perdido algún factor (probablemente una quinasa) responsable de la acción del ATP-Mg. Ahora sólo podemos observar la acción estimulante del Mg^{++} tanto con o sin ATP. La activación superior observada en presencia de ATP debe explicarse porque las concentraciones de Mg^{++} son críticas para la activación, dependiendo del tipo de preparación. La presencia del ATP complejando parte del Mg^{++} haría su concentración efectiva más óptima.

Estos experimentos sobre la acción del ATP-Mg en el sistema de la UDPG- α -glucán transferasa de músculo de rana vuelven a llamar la atención sobre el problema de la existencia de un compuesto o compuestos intermedios inactivos. La activación de la forma D por la incubación en presencia de mercaptoetanol así lo parecía indicar (8) y ahora los

datos presentados acerca de la acción del ATP-Mg parecen confirmar este supuesto. Aunque los experimentos en el sistema enzimático de músculo de perro (10) parecen indicar que en aquel sistema se podría formar una especie molecular inactiva menos fosforilada que la forma D, en el sistema aquí estudiado la situación parece ser diferente. La forma inactiva en este sistema sería más fosforilada, y una fosfatasa (6) actuando durante la preincubación, con la protección de los tioles, podría pasar la forma inactiva a la activa D.

La situación no es anómala, pues las características de los sistemas enzimáticos varían de especie a especie, y aún más dentro de la especie, de órgano a órgano. La transglucosilasa de músculo de rata es completamente diferente de la de hígado (4, 16). Mientras que STEINER y colaboradores (16) no encuentran el sistema de transformación de la forma D a la I, influido por los tioles, ni el de la I a la D, ATP-Mg dependiente, HIZUKURI y LARNER (4) encuentran la posibilidad de transformar la actividad D hepática en una actividad I mediante el tratamiento con Mg^{++} y SO_3Na_2 . En cualquier caso parece evidente la formación de un compuesto inactivo, que STEINER (16) explica por cambios estructurales debidos a inactivación térmica de la molécula, y reversibles por la adición de glucosa-6-P, fluoruro o ambos a la vez.

En músculo la situación es completamente diferente y así plenamente reconocido (15, 16). En el músculo de rana y quizá en los leucocitos de la sangre (13) la situación presenta otras variantes mostrando que la regulación del metabolismo del glucógeno se hace muy específica para satisfacer las demandas metabólicas particulares de cada tejido, órgano o especie en donde tiene lugar. A este respecto, STEINER y KING (15) han demostrado que la insulina aumenta la glucosiltransferasa hepática y el acúmulo de glucógeno en ratas aloxán-diabéticas, por

un mecanismo sensitivo a la inhibición por puromicina, etionina y actinimicina, conocidos inhibidores de síntesis proteica. En músculo, por el contrario, el estímulo que produce la insulina sobre el transporte de la glucosa y la síntesis de glucógeno no viene afectado por esos inhibidores (1, 2, 14). Recientemente, para complicar aún más el ya enrevesado conjunto de mecanismos reguladores, HORN BROOK y BURCH (5) han comunicado que la hidrocortisona parece controlar la síntesis de glucógeno hepático induciendo lo transformación de la forma de transferasa que requiere glucosa-6-P en la forma glucosa-6-P independiente. Esto parece indicar que este corticoide produciría en hígado algo semejante a lo que realiza la insulina en músculo, según han mostrado LARNER y colaboradores (6).

Resumen

El sistema enzimático responsable de la biosíntesis de glucógeno en músculo de rana descrito primero por ROSELL-PÉREZ y LARNER (8) es una forma D de UDPG: α -1,4-glucán α -4-glucosiltransferasa con características especiales.

Como otras formas D estudiadas, este enzima es inhibido por los iones SO_4^{--} y $PO_4^{=}$ en acción competidora para el lugar de activación de la glucosa-6-P.

El ion Mg^{++} que activa a primera vista excesivamente este sistema enzimático lo hace incrementando unas 10 veces la afinidad del activador alostérico glucosa-6-P por su centro de activación. Esto se comprueba de la misma manera con un activador muy pobre, no metabolizable, como es la 2 DO-G-6-P. Otro ion divalente activador del mismo nivel es el Ca^{++} . Esto sitúa a los iones divalentes nedocelulares, junto con el ion $PO_4^{=}$, y los hexosa-6-fosfatos como reguladores alostéricos de la biosíntesis de glucógeno de importancia para ciertas células.

Los incrementos de actividad D observables por preincubación en presencia de tioles, fueron explicados hipotéticamente por la activación de una forma inactiva (ROSELL

PÉREZ y LARNER (8), trabajo citado ya). La del ATP-Mg que se presenta aquí parece corroborar esta hipótesis. La forma intermedia inactiva sería en este caso más fosforilada que la activa (D). Una fosfatasa protegida por los tioles, convertirá la forma inactiva en activa durante la preincubación.

Summary

Studies on UDPG: α -Glucan transferase in frog muscle

The enzyme system responsible for the biosynthesis of glycogen in frog muscle is a D form of UDPG: α -1,4-glucan α -4-glucosyltransferase with special characteristics.

As in other D forms studied, this enzyme is competitively inhibited by $\text{SO}_4^{=}$ and PO_4^{\equiv} on the activation site of the glucose-6-P.

Mg^{++} activation initially observed is kinetically explained by a 10-fold increase in the affinity of the allosteric activator glucose-6-P for its center. This effect is also seen by using a nonmetabolizable, very poor activator, 2-deoxyglucose-6-P.

Other divalent cations such as Ca^{++} produce similar activation. This suggests a role in glycogen biosynthesis for these cations together with PO_4^{\equiv} and hexosaphosphates in certain cells.

The ATP-Mg effect observed strongly supports the hypothesis of an inactive form of the enzyme in this species, precursor of the D form, which would be more phosphorylated than the active form. A phosphatase system, activated

or protected by mercaptoethanol, would give rise to the D form during preincubation of the enzyme.

Bibliografía

- (1) CARLIN, H., y HEITCHER, O.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **15**, 127, 1964.
- (2) EBOVE-DENIS, D., CHAMBOU, A. M., VOLFIN, S., y CLAUSER, H.: *Nature*, **119**, 1183, 1963.
- (3) FRIEDMAN, D. L., y LARNER, J.: *Biochemistry*, **2**, 669, 1963.
- (4) HIZUKURI, S., y LARNER, J.: *Biochemistry*, **3**, 1783, 1964.
- (5) HORN BROOK, K. R., y BURCH, H. B.: *Fed. Proc.*, **24** (2), 508, 1965.
- (6) LARNER, J., ROSELL PÉREZ, M., FRIEDMAN, D. L., y CRAIG, J., en *Ciba Foundation Symposium on Control of Glycogen Metabolism*. (Editores: W. J. Wheland y M. P. Cameron.) J. y A. Churchill Ltd., 273-288, 1964.
- (7) ROSELL PÉREZ, M., VILLAR PALASÍ, C., y LARNER, J.: *Biochimistry*, **1**, 763, 1962.
- (8) ROSELL PÉREZ, M., y LARNER, J.: *Biochemistry*, **1**, 769, 1962.
- (9) ROSELL PÉREZ, M., y LARNER, J.: *Biochemistry*, **3**, 75, 1964.
- (10) ROSELL, PÉREZ, M., y LARNER, J.: *Biochemistry*, **3**, 81, 1964.
- (11) ROSELL PÉREZ, M., y LARNER, J.: *Biochemistry*, **3**, 773, 1964.
- (12) ROSELL PÉREZ, M., y VILLAR PALASÍ, V.: *R. esp. Fisiol.*, **20** (4), 131, 1964.
- (13) ROSELL PÉREZ, M., y ESMANN, V.: *Acta Chem. Scand.*, **19** (3), 679, 1965.
- (14) SOEVIC, O., y WAALAS, O.: *Nature*, **202**, 396, 1964.
- (15) STEINER, D. F., y KING, J.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 1292, 1964.
- (16) STEINER, D. F., YOUNG, L., y KING, J.: *Biochemistry*, **4**, 740, 1965.

