

Mecanismo reaccional de la purín nucleósido fosforilasa de hígado de ave.

I. Constantes cinéticas reales y de disociación

R. Fusté* y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Barcelona

(Recibido el 18 de abril de 1975)

R. FUSTE and J. BOZAL. *The Mechanism of the Reaction Catalysed by Purine Nucleoside Phosphorylase. I. Kinetics and Dissociation Constants*. Rev. esp. Fisiol., 31, 235-244. 1975.

The initial velocity studies of pigeon's liver purine nucleoside phosphorylase (purine nucleoside:orthophosphate ribosyltransferase EC 2.4.2.1) support the hypothesis that the enzymatic mechanism is a sequential one. The affinity of the phosphate substrate is superior to that of arseniate, while each substrate attaches itself to the same active center.

It should be noted that the real kinetic parameters and the corresponding dissociation constants of both phosphorolytic and arsenolytic reactions (Vestling-Florini and Dalziel's methods) are related with each other by the according to following expresion:

$$\bar{K}_1 \times K_2 = K_1 \times \bar{K}_2$$

which indicates that the enzymatic mechanism is a rapid equilibrium random bi-bi.

In the chicken liver enzyme mechanism, the combination of the enzyme with one of the substrates does not influence its affinity for the other.

The discrepancy observed between the kinetic parameters of the enzymes from each of both species suggest the existence of fundamental structural differences among these purine nucleoside phosphorylases.

Upon the inosine-purine nucleoside phosphorylase system, the phosphate induces substrate inhibition, which is uncompetitive with inosine.

Data obtained by Dixon's method suggested that the hepatic enzymes from chicken and pigeon, include both histidine and cysteine in their active centers.

La purin-nucleósido-fosforilasa (PNPasa) o purin-nucleósido ortofosfatoribosil-transferasa (EC. 2.4.2.1) (6) catali-

za la fosforólisis y arsenólisis de los nucleósidos purínicos. Ambas reacciones difieren entre sí en el estado de equilibrio; así, mientras en la fosforólisis aquél está desplazado hacia la síntesis del nucleósido, en la arsenólisis resulta favorecida la

* Becario del Ministerio de Educación y Ciencia.

liberación de la correspondiente base púrica.

En los nucleósidos purínicos, substratos de la PNPasa, el enlace N-glucosídico posee la configuración β (5). Los nucleósidos purínicos de configuración α , sintetizados químicamente, no son inhibidores ni se comportan como substratos de la PNPasa (19). En la fosforólisis de los β -ribonucleósidos, catalizada por la PNPasa, se produce una inversión de Walden del enlace glucosídico; esta consideración estereoquímica, destacada por KOSHLAN (15), limita la posibilidad de formación de un intermediario enzima-ribosa de configuración β , en la fosforólisis de un β -nucleósido.

La PNPasa de tejidos de mamíferos muestra considerable especificidad para la hipoxantina, la guanina, la xantina y sus respectivos nucleósidos (17, 20). El hecho de que la adenina sea un substrato muy deficiente (21) indica que la PNPasa no desempeña una función importante en el metabolismo de esta purina, en las células de los tejidos de mamíferos.

En el presente trabajo se estudia el comportamiento cinético de la PNPasa hepática de pichón y de pollo en la fosforólisis y arsenólisis de la inosina, comparando los parámetros cinéticos reales y las constantes de disociación de los complejos binarios que intervienen en ambas reacciones. Asimismo, en el sistema inosina-PNPasa-fosfato se establecen las condiciones en que tiene lugar, con el enzima hepático de pollo y de pichón, la inhibición por exceso de fosfato con objeto de dilucidar el posible mecanismo reaccional que presenta la PNPasa de ambos orígenes.

Por último, se ha determinado la influencia del pH en la determinación de los parámetros cinéticos correspondientes a la inosina, con el enzima hepático de pollo y de pichón, con objeto de conocer los grupos iónicos presentes en el centro activo de ambas proteínas enzimáticas.

Material y métodos

Como fuente enzimática de PNPasa se han utilizado homogeneizados crudos de hígado de pollo y de pichón, obtenidos por trituración de los órganos suspendidos en tampón de fosfato sódico o tris-acetato, ambos 0,05 M de pH 7 ó 7,4, según se trabaje con el enzima procedente de pollo o pichón, respectivamente, con ayuda de un homogeneizador adecuado y operando a $+5^{\circ}\text{C}$ en cámara frigorífica. La concentración de los homogeneizados osciló entre 20 y 250 mg de tejido por ml.

Las experiencias descritas a continuación se han efectuado con el sobrenadante obtenido por centrifugación a $5.000 \times g$ durante 30 minutos a 0°C , de homogeneizados de ambas procedencias. La concentración enzimática final en la cubeta espectrofotométrica fue de 0,83 y 1,43 mg de tejido/ml para la fosforólisis y la arsenólisis, respectivamente.

Las velocidades iniciales de reacción se determinaron espectrofotométricamente acoplado al sistema xantinoxidasa de leche (13). El método consiste en determinar los incrementos de densidad óptica, a $\lambda = 293\text{ nm}$, debidos a la formación de ácido úrico a $30 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DBG-T, provisto de inscriptor, en cubetas termostatadas de 3 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz.

El cálculo de los parámetros cinéticos reales para la PNPasa de ambos orígenes se ha efectuado por aplicación de los métodos de VESTLING-FLORINI (12) y de DALZIEL (9) aplicados ambos a sistemas birreactantes.

El método de Dalziel ha permitido caracterizar la inhibición que ejerce un exceso de fosfato, así como el establecimiento de la naturaleza de dicha inhibición respecto a la inosina.

Resultados

Velocidades iniciales de reacción de los sistemas inosina-fosfato e inosina-arsenia-

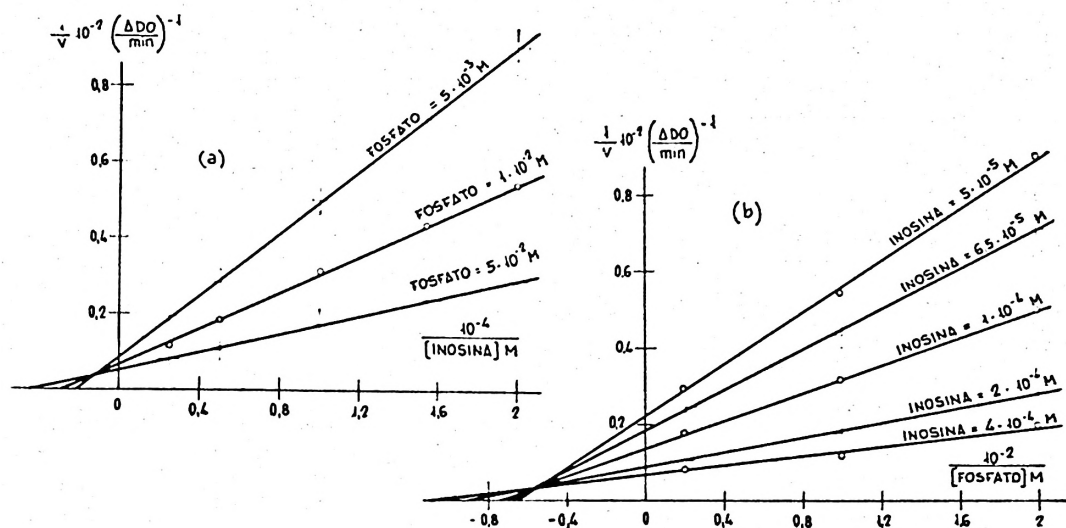


Fig. 1. Velocidades iniciales de reacción del sistema inosina-PNPasa (hepática de pichón)-fosfato.

a) Inosina sustrato variable y fosfato constante. b) Fosfato sustrato variable e inosina constante.

to y PNPasa hepática de pichón. Al atribuirse a la PNPasa la catálisis fosforolítica y arsenolítica de la inosina, se procedió a estudiar, con el enzima de hígado de pichón, la variación de las velocidades iniciales de reacción respecto a las concentraciones de los sustratos, inosina-fosfato (fosforolisis) e inosina-arseniato (arsenolisis) con objeto de obtener información acerca del mecanismo cinético general que rige la actuación de la PNPasa en los mencionados sistemas catalíticos.

Los valores de las velocidades iniciales de reacción, obtenidos con varias concentraciones de los correspondientes sustratos, conducen a la obtención de rectas no paralelas en la representación de LINEWEAVER-BURK (18) para la fosforolisis (fig. 1). Análogos resultados se obtienen para la arsenolisis.

De acuerdo con las predicciones teóricas de CLELAND (7, 8), el hecho de que en ambas reacciones la variación de la concentración de uno de los sustratos afecte a la pendiente y a la intersección

de las rectas obtenidas respecto al otro sustrato, indica que en ambos casos — fosforolisis y arsenolisis — la acción enzimática transcurre según un mecanismo secuencial en el cual la adición de todos los sustratos es previa a la liberación de los productos de la reacción.

Parámetros cinéticos reales de los sistemas inosina-PNPasa-fosfato e inosina-PNPasa-arseniato. Se han determinado los parámetros cinéticos reales para cada uno de los correspondientes sustratos en los sistemas catalizados por la PNPasa hepática de pichón, aplicando los métodos gráficos de VESTLING-FIORINI (12) y DALZIEL (9).

En la tabla I se indican los valores de los coeficientes cinéticos ϕ_i , calculados según el método de Dalziel, correspondientes a ambas reacciones que son necesarios para el cálculo de los parámetros cinéticos reales y de la velocidad máxima de reacción según el mencionado método.

En la tabla II se recogen los valores de

Tabla I. Coeficientes cinéticos ϕ_i (Dalziel) de las reacciones catalizadas por la PNPasa de pichón y pollo.

	Pichón		Pollo
	Fosforolisis ($\Delta DO/\text{min.}$)	Arsenolisis ($\Delta DO/\text{min.}$)	Fosforolisis ($\Delta DO/\text{min.}$)
ϕ_o	4,6	5,6	10,5
ϕ_{ino}	$8,7 \times 10^{-4} \text{ M}$	$3 \times 10^{-3} \text{ M}$	$4,4 \times 10^{-4} \text{ M}$
ϕ_{fos}	$2,2 \times 10^{-2} \text{ M}$	—	$1,4 \times 10^{-1} \text{ M}$
ϕ_{ars}	—	$1,1 \times 10^{-1} \text{ M}$	—
$\phi_{\text{ino-fos}}$	$1,6 \times 10^{-5} \text{ M}^2$	—	$5,6 \times 10^{-6} \text{ M}^2$
$\phi_{\text{ino-ars}}$	—	$4,4 \times 10^{-5} \text{ M}^2$	—

los parámetros cinéticos reales para la fosforolisis y arsenolisis de la inosina.

Constantes de disociación de los complejos binarios enzima-substrato. Las constantes de disociación de los complejos binarios E-inosina, E-fosfato correspondientes a la fosforolisis y E-inosina, E-arseniato para la arsenolisis se han calculado por el método gráfico a partir de la inversa de la abscisa del punto de intersección de las distintas rectas obtenidas en las representaciones de LINEWEAVER-BURK (*loc. cit.*), de las velocidades iniciales de reacción (fig. 1). Se han deducido, también, mediante el método de DALZIEL (9), a partir de los valores de los coeficientes cinéticos ϕ_i , y por el método de VESTLING-FLORINI (12) a partir de los parámetros cinéticos reales.

De los valores obtenidos de las constantes de disociación correspondientes a

los complejos binarios enzima-substrato (tabla III) se deduce que la constante de disociación del complejo E-inosina es menor que la correspondiente al complejo E-fosfato y E-arseniato, lo cual indica que en ambas reacciones — fosforolisis y arsenolisis — la inosina es el substrato más afín.

En ambos sistemas se cumple la relación:

$$\bar{K}_{\text{ino}} \times K_{\text{fos o ars}} = \bar{K}_{\text{fos o ars}} \times K_{\text{ino}}$$

Según ALBERTY (3, 4) el hecho constituye un indicio de que el mecanismo que rige la actuación de la PNPasa hepática de pichón, tanto en la fosforolisis como en la arsenolisis de la inosina, es secuencial al azar con la particularidad de que la etapa limitante de velocidad es la interconversión del complejo ternario E-substrato en E-productos.

Tabla II. Parámetros cinéticos reales de las reacciones catalizadas por la PNPasa hepática de pichón.

	Fosforolisis		Arsenolisis	
	Vestling-Florini 10^3	Dalziel 10^3	Vestling-Florini 10^3	Dalziel 10^3
μmoles				
$\text{min} \times \text{ml}$	17,6	17,6	14,6	14,6
K_{inosina}	$2 \times 10^{-1} \text{ M}$	$1,9 \times 10^{-1} \text{ M}$	$5,6 \times 10^{-1} \text{ M}$	$5,7 \times 10^{-1} \text{ M}$
$K_{\text{fos o ars}}$	5 M	4,8 M	20 M	21 M
$K_{\text{ino-fos}}$	$3,9 \times 10^{-3} \text{ M}^2$	$3,5 \times 10^{-3} \text{ M}^2$	—	—
$K_{\text{ino-ars}}$	—	—	$8,8 \times 10^{-3} \text{ M}^2$	$8,3 \times 10^{-3} \text{ M}^2$

Tabla III. Constantes de disociación de los complejos binarios PNPasa-substrato.

PNPasa	Constantes disociación	Método gráfico	Dalziel	Vestling-Florini	Valor promedio
Hígado de pichón	$\bar{K}_{\text{ino}}$	$8,33 \times 10^{-4} \text{ M}$	$7,3 \times 10^{-4} \text{ M}$	$7,8 \times 10^{-4} \text{ M}$	$7,8 \times 10^{-4} \text{ M}$
	$\bar{K}_{\text{fos}}$	$1,72 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1,8 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1,9 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1,8 \times 10^{-2} \text{ M}$
	$\bar{K}_{\text{ino}}$	$4,8 \times 10^{-4} \text{ M}$	$4,4 \times 10^{-4} \text{ M}$	$4,4 \times 10^{-4} \text{ M}$	$4,5 \times 10^{-4} \text{ M}$
	$\bar{K}_{\text{ars}}$	$1,43 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1,4 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1,5 \times 10^{-2} \text{ M}$
Hígado de pollo	$\bar{K}_{\text{ino}}$	$4,4 \times 10^{-5} \text{ M}$	$4,2 \times 10^{-5} \text{ M}$	—	$4,3 \times 10^{-5} \text{ M}$
	$\bar{K}_{\text{fos}}$	$1,3 \times 10^{-2} \text{ M}$	$1,3 \times 10^{-2} \text{ M}$	—	$1,3 \times 10^{-2} \text{ M}$

Competencia del fosfato y del arseniato por el centro activo de la PNPasa de hígado de pichón. Dado que la fosforolisis y la arsenolisis de la inosina transcurren mediante un mecanismo análogo, se ha determinado si el fosfato y arseniato compiten por el mismo centro activo del enzima.

Se midieron las velocidades máximas de reacción y las constantes de Michaelis para el fosfato y el arseniato, empleando como aceptores de grupos ribosilo el fosfato monosódico, el arseniato monosódico

y mezclas equimolares de ambos substratos. Como dador de grupos ribosilo se utilizó inosina ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$). La concentración del homogeneizado fue 1,66 mg órgano/ml.

Se comprueba que los substratos en estudio compiten por el mismo centro activo de la PNPasa ya que las constantes cinéticas determinadas a partir de la figura 2 cumplen la relación (11): $V_{\text{fos}} \cdot V_{\text{mezcla}} / V_{\text{mezcla}} \cdot V_{\text{arseniato}} = K_m(\text{fosfato}) / K_m(\text{arseniato})$.

El conjunto de los estudios cinéticos expuestos sobre la actuación de la PNPasa hepática de pichón en la fosforolisis y arsenolisis de la inosina, revelan que ambas reacciones transcurren de modo análogo. La única diferencia reside en que el enzima muestra menor afinidad por el arseniato que por el fosfato y ambos substratos se unen al enzima por el mismo locus activo.

Velocidades iniciales de reacción en el sistema inosina-PNPasa (hepática de pollo)-fosfato. Considerando los resultados obtenidos con homogeneizados hepáticos de pichón, y puesto que la fosforolisis es la vía metabólica de degradación de los nucleósidos purínicos en sus respectivas bases púricas, el estudio cinético correspondiente a la PNPasa hepática de pollo se ha limitado a la fosforolisis de la inosina. El método operatorio seguido es

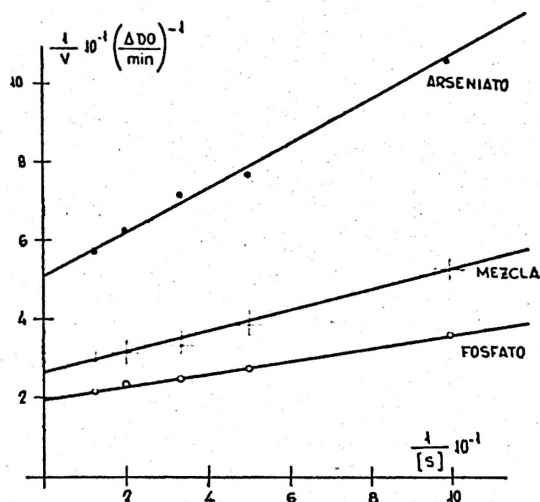


Fig. 2. Actuación de la PNPasa (hígado de pichón) en mezclas equimolares de fosfato y arseniato.

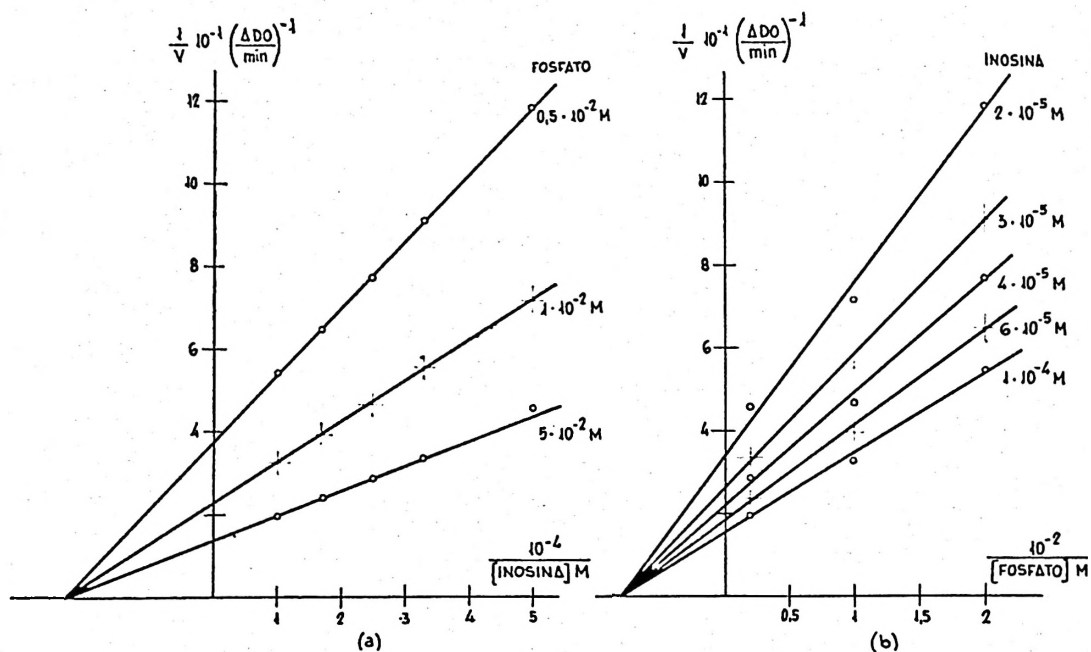


Fig. 3. Velocidades iniciales de reacción del sistema inosina-PNPasa (hígado de pollo)-fosfato.

- a) Inosina sustrato variable y fosfato constante.
b) Fosfato sustrato variable e inosina constante.

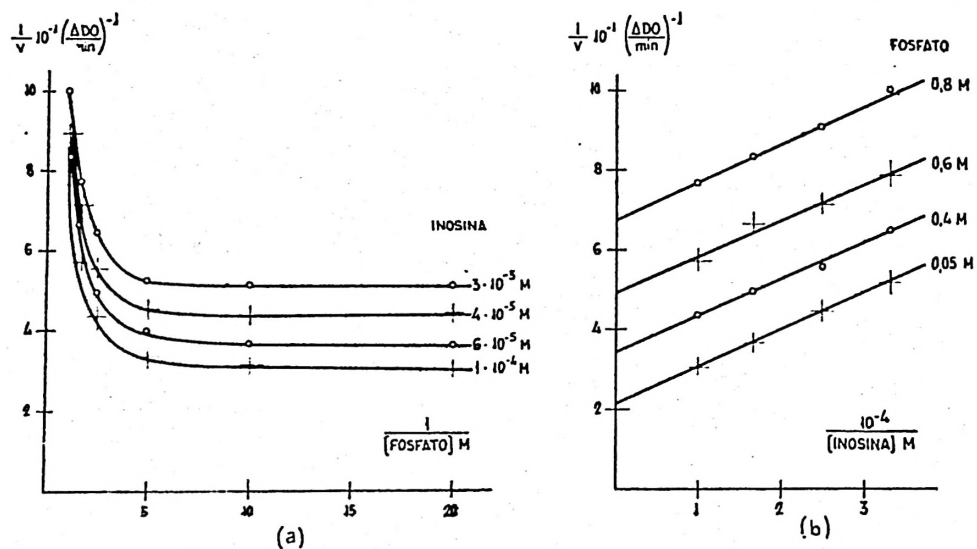


Fig. 4. Inhibición por sustrato en el sistema inosina-PNPasa (hígado de pollo)-fosfato.

- a) Concentraciones variables de fosfato y constantes de inosina.
b) Concentraciones variables de inosina y constantes de fosfato.

análogo al descrito para la PNPasa hepática de pichón, trabajando a pH 7, que es el óptimo de aquel enzima.

Mediante la representación de Lineweaver-Burk se expresan los valores de las velocidades iniciales de reacción respecto a concentraciones variables y constantes de los dos substratos inosina y fosfato. Las rectas obtenidas indican que el mecanismo por el que rige su actuación la PNPasa hepática de pollo es secuencial (fig. 3). Que la intersección de las rectas tenga lugar sobre el eje de las abscisas indica que los parámetros cinéticos aparentes coinciden con los reales y son iguales a sus respectivas constantes de disociación. Según ALBERTY (3, 4) ello es característico de un mecanismo secuencial al azar en equilibrio rápido, con la particularidad de que la unión del enzima con uno de los substratos no modifica su afinidad por el otro substrato.

Parámetros cinéticos reales y constantes de disociación del sistema inosina-PNPasa (hepática de pollo)-fosfato. Análogamente a lo realizado en el sistema catalizado por la PNPasa hepática de pichón se han calculado las constantes de disociación correspondientes a los complejos binarios E-inosina y E-fosfato coincidentes en este caso con los parámetros cinéticos reales de ambos substratos, ya que las K_M correspondientes a los dos substratos, inosina y fosfato, son independientes de la concentración del substrato que se ha mantenido constante (fig. 3).

En la tabla I se indican los valores de los coeficientes cinéticos ϕ_i (Dalziel) correspondientes a la fosforolisis de la inosina.

Los valores de las constantes de disociación correspondientes a la fosforolisis de la inosina, aparecen en la tabla III.

Inhibición por exceso de fosfato. Se ha estudiado en el enzima de ambos orígenes la magnitud de la inhibición producida por exceso de fosfato para diversas concentraciones de inosina, mediante

aplicación del método de DALZIEL (*loc. cit.*) para sistemas birreactantes.

En la figura 4, correspondiente a la PNPasa hepática de pollo, se observa que a concentraciones de fosfato superiores a 0,1 M la representación de Lineweaver-Burk deja de ser lineal apareciendo una disminución de la velocidad inicial de reacción debida a la inhibición que presenta el enzima por su propio substrato.

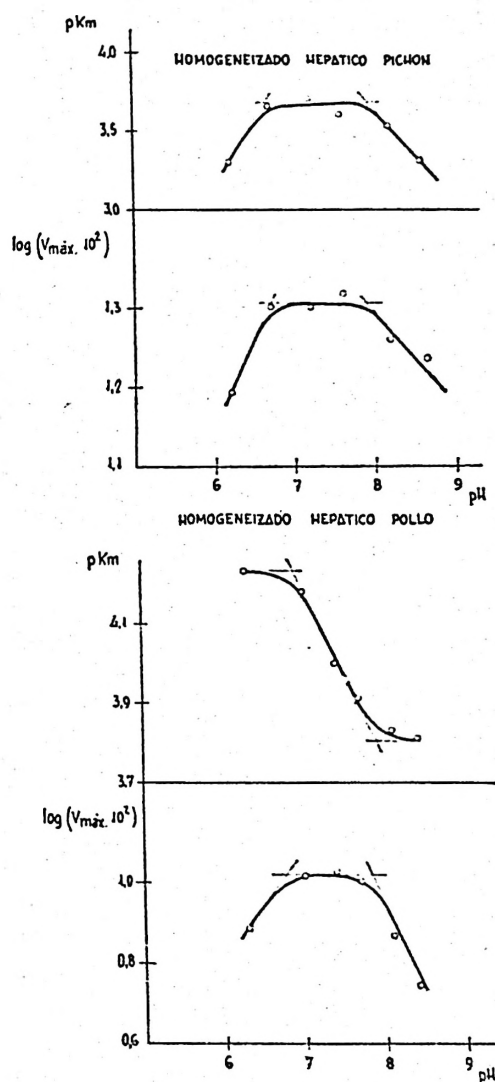


Fig. 5. Efecto del pH sobre la K_m y V_{max} del sistema inosina-PNPasa-fosfato.

El carácter de dicha inhibición es competitivo respecto a la inosina. Análogo resultado se obtiene con el enzima procedente de hígado de pichón.

Según las predicciones teóricas de CLELAND (*loc. cit.*) el carácter de dicha inhibición, en una reacción bisubstrato, corresponde a un mecanismo secuencial ordenado debido a que en él tiene lugar la formación de un complejo de «vía muerta» EBQ que, en este caso, correspondería al complejo E-fosfato-hipoxantina.

Variación de los parámetros cinéticos de reacción con el pH en el sistema fosforolítico de la PNPasa hepática de pollo y de pichón. Se han determinado los valores de K_m y V_{max} del sistema inosina PNPasa-fosfato, en el intervalo de pH comprendido entre 6,2 y 8,6, con tampón de tris-acetato 0,05 M; los resultados obtenidos se representan por el método de DIXON (10). Las concentraciones de fosfato 0,05 M y del homogeneizado de hígado 0,8 mg/ml se mantuvieron constantes a todos los valores de pH.

En la figura 5 se observa que, independientemente de la procedencia del enzima, aparecen en la representación del $\log V_{max}$ frente al pH, dos grupos ionizables en el complejo E-sustrato cuyos pK_a oscilan entre 6,5-6,7 y 7,9-8, los cuales aparecen también al representar pK_m frente al pH.

Puede deducirse que en el enzima de ambas procedencias los grupos iónicos del complejo E-sustrato son los mismos y cabe sugerir, con las limitaciones propias del método, la intervención de la histidina y del grupo sulfhidrilo de la cisteína en la formación del complejo PNPasa-sustrato.

Los resultados descritos concuerdan en parte con lo descrito por ARGEWALL (1) con PNPasa cristalina procedente de eritrocitos humanos, quien observa, además, la presencia de un grupo ionizable en el enzima libre cuyo pK oscila alrededor de 7,2.

Discusión

El estudio de las velocidades iniciales de reacción en el sistema inosina-PNPasa (pichón)-fosfato (o arseniato) ha puesto de manifiesto que la actuación del enzima de ambas reacciones se rige por un mecanismo secuencial, hecho que implica que la unión de los sustratos al enzima tenga lugar antes de la liberación de los productos de la reacción.

A partir de los valores correspondientes a los parámetros cinéticos reales y a las constantes de disociación de los complejos binarios E-inosina, E-fosfato y E-arsenato, se puede afirmar que tanto en la fosforolisis como en la arsenolisis, las mencionadas constantes se hallan relacionadas por la siguiente expresión:

$$\bar{K}_{ino} \times K_{fos \text{ o } ars} = \bar{K}_{ino} \times K_{fos \text{ o } ars}$$

lo cual es indicio, según ALBERTY (*loc. cit.*), de que el mecanismo de actuación de la PNPasa hepática de pichón, en ambas reacciones, es secuencial al azar en el cual la etapa limitante de velocidad corresponde a la interconversión de los complejos terciarios E-sustrato en E-productos.

Estudios cinéticos sobre el centro activo indican que el fosfato y el arseniato se unen al enzima en el mismo *locus* activo; el fosfato es el sustrato con mayor afinidad.

Los resultados obtenidos con PNPasa de hígado de pollo ponen de manifiesto que la fosforolisis de la inosina se rige por un mecanismo secuencial. El hecho de que en este caso los parámetros cinéticos aparentes para ambos sustratos coincidan con los reales y sean iguales a sus respectivas constantes de disociación, es característico según ALBERTY (2, 3) de un mecanismo secuencial al azar, en equilibrio rápido, con la particularidad de que la unión del enzima con uno de los sustratos no modifica su afinidad para con el otro.

El enzima de ambas procedencias, en el sistema inosina-PNPasa-fosfato, es inhibido acompetitivamente, respecto a la inosina, a concentraciones elevadas de fosfato. De acuerdo con las predicciones teóricas de CLELAND (5, 6) dicha inhibición es típica, en una reacción bisubstrato, de un mecanismo secuencial ordenado, debido a la formación del complejo de «vía muerta» EBQ.

Al no establecerse correlación entre los resultados obtenidos en el estudio de las velocidades de reacción con los de la inhibición ejercida por el fosfato, se precisa efectuar el estudio de las inhibiciones por los propios productos de reacción mediante el método de CLELAND (7); hecho que será objeto de una siguiente publicación.

El dilucidar exactamente el tipo de mecanismo reaccional al que se ajusta la PNPasa procedente de hígado de aves (pollo y pichón) tienen interés, ya que se encuentran discrepancias en el modo de actuación de la PNPasa de eritrocitos humanos (14) y de bazo de buey (2, 16), pues a pesar de que ambos adaptan su secuencia reaccional a un mecanismo ordenado bi-bi, es de destacar que la PNPasa procedente de bazo de buey actúa a través de distintas formas isomórficas interconvertibles entre sí.

El hecho de que para el enzima de ambas procedencias las constantes cinéticas (K_m y V_{max}) correspondientes a la inosina, para una concentración constante de fosfato, varíen con el pH, ha permitido establecer, mediante las representaciones propuestas por DIXON (10), que los grupos iónicos activos del complejo E-sustrato son los mismos, independientemente de la procedencia del enzima y a pesar de que la forma de las curvas sea diferente, lo cual puede ser indicio de que la estructura global de ambas proteínas es distinta.

Resumen

La determinación de las velocidades iniciales de reacción en la fosforolisis y arsenolisis de

la inosina catalizadas por la purín nucleósido fosforilasa (purín nucleósido:ortofosfato ribosiltransferasa EC 2.4.2.1) de hígado de pichón, revela que en ambas reacciones la actuación enzimática se rige mediante un mecanismo secuencial. La afinidad del fosfato es mayor que la del arseniato compitiendo ambos por el mismo *locus* activo de la proteína enzimática.

El cálculo de los parámetros cinéticos reales y de las constantes de disociación correspondientes a ambas reacciones (métodos de Vestling-Florini y Dalziel) pone de manifiesto en ambos casos que dichas constantes se hallan relacionadas por la expresión:

$$\bar{K}_1 \times K_2 = K_1 \times \bar{K}_2$$

lo que indica según ALBERTY, que el mecanismo de actuación de la PNPasa hepática de pichón en la fosforolisis y arsenolisis de la inosina es secuencial al azar, la etapa limitante de velocidad es la interconversión de los complejos ternarios E-sustratos en E-productos.

Análogo resultado se ha obtenido para el enzima de hígado de pollo, con la particularidad de que la unión del enzima con uno de los sustratos no modifica su afinidad para con el otro.

El enzima de ambas procedencias es inhibido acompetitivamente por exceso de fosfato, con respecto a la inosina en el sistema inosina-PNPasa-fosfato.

El que la PNPasa de hígado de pollo y de pichón presenten valores muy diferentes de sus parámetros cinéticos, a pesar de la analogía de su mecanismo cinético, puede ser indicio de la existencia de diferencias estructurales entre ambas.

Se sugiere que el enzima de ambas procedencias posee en su centro activo histidina y cisteína (método Dixon).

Bibliografía

1. AGARWAL, R. P. y PARKS, R. E., Jr.: *J. Biol. Chem.*, 244, 664, 1969.
2. AGARWAL, R. P. y PARKS, R. E., Jr.: En «The Enzymes» (3.^a ed.), Vol. 7, Academic Press, New York, 1972, p. 483.
3. ALBERTY, R. A.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 1928, 1953.
4. ALBERTY, R. A.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 80, 1777, 1958.

5. BADDILEY: En «The Nucleic Acids» (E. Chargaf y J. N. Davidson, eds.), Vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 137.
6. BARMAN, T. E.: En «Enzyme Handbook», Vol. I, Springer-Verlag, Berlin, 1969, pág. 330.
7. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104-137, 1963.
8. CLELAND, W. W.: *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, Part. I, 77, 1967.
9. DALZIEL, K.: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1706, 1957.
10. DIXON, M.: *Biochem. J.*, **55**, 161, 1953.
11. DIXON, M. y WEBB, C. E.: En «Enzymes» (2.^a ed.), Longmans Green, New York, 1967, p. 84.
12. FLORINI, J. R. y VESTLING, C. S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 575, 1957.
13. KIM, B. K., CHA, S. y PARKS, R. E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 575, 1957.
14. KIM, B. K., CHA, S. y PARKS, R. E., Jr.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 177, 1968.
15. KOSHLAND, D. E.: En «The Mechanism of Enzyme Action» (W. D. Mc Elroy y B. Glass, eds.), J. Hopkins Press, Baltimore, 1954, p. 608.
16. KRENITSKY, T. A.: *Mol. Pharmacol.*, **3**, 526, 1967.
17. KRENITSKY, T. A., BARCLAY, M. y JACQUEZ, J. A.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 805, 1964.
18. LINEWEAVER, H. y BURK, D.: *J. Amer. Chem.*, **56**, 658, 1934.
19. LEPAGE, G. A.: *Can. J. Biochem.*, **46**, 655, 1968.
20. TSUBOI, K. K. y HUDSON, P. B.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 889, 1957.
21. ZIMMERMAN, T. P., GERSTEN, N., ROSS, A. F. y MIECH, B. P.: *Can. J. Biochem.*, **49**, 1050, 1971.