

12(512-)

Dup.

ARCHIVOS DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTALES

Organo de la Sociedad de Biología de Santiago

VOL. 2

JULIO - NOVIEMBRE 1965

Nº 2 y 3

INDICE

	Pág.
38. Influencia de las gónadas sobre la diferencia sexual en la resistencia a los efectos tóxicos de la cocaína en ratas. S. GUERRERO, A. GALLARDO y C. MUÑOZ.	51
39. Substancias vasopresoras formadas en el suero sanguíneo por incubación a 38°C a pH normal. H. CROXATTO, J. ROBLERO y M. OSSIO.	55
40. Estudios sobre morfina. X. Ingestión espontánea y obligada de morfina y etonitaceno en ratas blancas. F. HUIDOBRO y C. MAGGIOLO.	63
41. Efecto del 5-Hidroxitriptofano sobre el efecto analgésico de la morfina en ratas tratadas con reserpina, guanetidina y tolazolina. L. TAMAYO y E. CONTRERAS.	70
42. Influencia del sexo, el linaje y la administración de etanol sobre el metabolismo de los carbonos 1 y 6 de la glucosa en la rata. N. SEGOVIA-RIQUELME, I. FIGUEROLA-CAMPS, I. CAMPOSHOPE, N. JARA, E. NEGRETE y J. MARDONES.	74
43. Influencia de inhibidores adrenérgicos en las acciones cardiovasculars de la quinidina. A. ROVERE y M. PENNA.	82
44. Distribución de la actividad luteinizante en el complejo hipotalámico-hipofisario de adultos y niños. J. ARRAU, H. CROXATTO, M. DE LA LASTRA y SOLEDAD DÍAZ.	87
45. Influencia de la corteza suprarrenal sobre la creatinuria producida por irradiación en la rata. G. PIWONKA y J. TALESNIK.	92
CONFERENCIAS	
Procesos de autorregulación en el sistema circulatorio. B. GÜNTHER.	97
Uso de inhibidores en el estudio de la interacción enzima-substrato. O. CORI.	109
NUEVOS INSTRUMENTOS Y MÉTODOS	
Una jeringa-pipeta para la determinación de O ₂ y CO ₂ en mezclas gaseosas. B. GÜNTHER y G. DÍAZ.	117
Un método volumétrico simplificado para determinar O ₂ en la sangre, CO ₂ en el plasma y urea en la orina. B. GÜNTHER y G. DÍAZ.	119
Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Santiago, Diciembre de 1965. Resúmenes de trabajos.	123

Comité Editorial:

Jorge Mardones (Director)
Carlos Muñoz
Hermann Niemeyer
Jaime Talesnik
Luis Vargas

Los Archivos de Biología y Medicina Experimentales aparecerán en Marzo, Julio y Noviembre. Tres números constituirán un volumen.

Subscripción por volumen:

Chile E° 12,—
Extranjero US\$ 6,—

Dirección Postal: Casilla 12967, Santiago, Chile.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

1. Los Archivos están destinados a publicar trabajos originales sobre problemas de las distintas ramas de la Biología y Medicina experimentales.

Además publicarán trabajos de revisión acerca del estado actual de problemas relacionados con las disciplinas mencionadas.

2. **Título.** El título debe ser breve y dar una idea clara del contenido del trabajo. Al título seguirá su traducción al inglés.

3. **Titulillo.** Debe indicarse un titulillo con que se encabezará cada página impresa. Este no deberá tener más de 60 letras incluyendo los espacios.

4. **Ordenación por capítulos.** Se aconseja que cada trabajo conste de los siguientes capítulos: Resumen, Introducción, Método, Resultados, Discusión de resultados, Resumen en inglés y Referencias.

Las divisiones que se desee hacer dentro de cada capítulo irán precedidas por un título subrayado, seguido del texto en la misma línea.

5. **Símbolos de unidades.** Se sugiere el uso de las siguientes unidades cuando siguen a un numeral: km, cm, mm, μ , $m\mu$, $\mu\mu$, ml, μ l, g, kg, mg, μ g, ng, °C, cal, kcal, M, mM, μ M (molar, milimolar y micromolar). Nótese que en estas abreviaturas no se emplea ni punto ni s indicadora de plural.

Es preferible escribir sin abreviar metros, litros, moles, mmoles, minutos, segundos y horas.

Cuando las unidades que se refieren en el texto no van precedidas de un numeral, debe escribirse la palabra completa y no símbolo ni abreviatura.

6. **Abreviaturas especiales.** Cuando se empleen abreviaturas especiales, se indicarán entre paréntesis la primera vez que se mencionen después de la palabra completa no abreviada. Se preferirá no emplear abreviaturas en los títulos.

7. **Fórmulas.** Tanto las fórmulas matemáticas como las fórmulas químicas deberán desarrollarse, en lo posible, en una línea.

8. **Nombre de drogas.** La denominación de las drogas se ajustará al criterio establecido en "Pharmacological Reviews".

9. **Enzimas.** Las diferentes enzimas se denominarán de acuerdo con el "Report of the Enzymes Commission of the International Union of Biochemistry, Pergamon Press", año 1961.

10. **Tablas.** Las tablas se enumerarán en forma correlativa con número romanos. Cada tabla debe tener un título. El encabezamiento de cada columna debe expresar claramente su contenido y la unidad. No se incluirán datos que puedan ser deducidos aritméticamente de otros contenidos en ella.

11. **Figuras.** Las figuras serán numeradas correlativamente con números arábigos. Cada figura tendrá una lectura en que se explique claramente lo que representa. Los dibujos deberán ser confeccionados con tinta china sobre papel o cartulina blanca y de un tamaño que permita reducirlos a 1/2 o 1/3.

Las letras y números serán en tipo de imprenta, hecho de preferencia con normógrafo y de un tamaño tal que toleren una reducción a no menos de 1½ mm. Las fotografías y las fotomicrografías deberán ser reproducidas en papel brillante y con buen contraste.

No se repetirán en figuras datos que aparezcan en tablas.

12. **Referencias.** En los trabajos originales, las referencias se indicarán en el texto por un número entre paréntesis correlativo al orden de aparición. En los trabajos de revisión se ordenarán por orden alfabético de autores y en el texto por los números correlativos. Al final del texto se agruparán abreviándolas en alguna de las formas difundidas internacionalmente.

Los siguientes ejemplos sirven de ilustración:

Continúa en tapa 3

11.ENE.1966
DEPOSITO LEGAL

ARCHIVOS DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTALES

Organo de la Sociedad de Biología de Santiago

VOL. 2

JULIO - NOVIEMBRE 1965

Nº 2 y 3

INDICE

	Pág.
38. Influencia de las gónadas sobre la diferencia sexual en la resistencia a los efectos tóxicos de la cocaína en ratas. S. GUERRERO, A. GALLARDO y C. MUÑOZ.	51
39. Substancias vasopresoras formadas en el suero sanguíneo por incubación a 38°C a pH normal. H. CROXATTO, J. ROBLERO y M. OSSIO.	55
40. Estudios sobre morfina. X. Ingestión espontánea y obligada de morfina y etonitaceno en ratas blancas. F. HUIDOBRO y C. MAGGIOLO.	63
41. Efecto del 5-Hidroxitriptofano sobre el efecto analgésico de la morfina en ratas tratadas con reserpina, guanetidina y tolazolina. L. TAMAYO y E. CONTRERAS.	70
42. Influencia del sexo, el linaje y la administración de etanol sobre el metabolismo de los carbonos 1 y 6 de la glucosa en la rata. N. SEGOVIA-RIQUELME, I. FIGUEROLA-CAMPS, I. CAMPOS-HOPE, N. JARA, E. NEGRETE y J. MARDONES.	74
43. Influencia de inhibidores adrenérgicos en las acciones cardiovasculares de la quinidina. A. ROVERE y M. PENNA.	82
44. Distribución de la actividad luteinizante en el complejo hipotalámico-hipofisario de adultos y niños. J. ARRAU, H. CROXATTO, M. DE LA LASTRA y SOLEDAD DÍAZ.	87
45. Influencia de la corteza suprarrenal sobre la creatinuria producida por irradiación en la rata. G. PIWONKA y J. TALESNIK.	92
CONFERENCIAS	
Procesos de autorregulación en el sistema circulatorio. B. GÜNTHER.	97
Uso de inhibidores en el estudio de la interacción enzima-substrato. O. CORI.	109
NUEVOS INSTRUMENTOS Y MÉTODOS	
Una jeringa-pipeta para la determinación de O ₂ y CO ₂ en mezclas gaseosas. B. GÜNTHER y G. DÍAZ.	117
Un método volumétrico simplificado para determinar O ₂ en la sangre, CO ₂ en el plasma y urea en la orina. B. GÜNTHER y G. DÍAZ.	119
Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Santiago, Diciembre de 1965. Resúmenes de trabajos.	123

USO DE INHIBIDORES EN EL ESTUDIO DE LA INTERACCION
ENZIMA-SUBSTRATO (*)

Use of inhibitors in the study of the enzyme-substrate interaction.

OSVALDO CORI

Laboratorio de Bioquímica General, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile,
Casilla 233, Santiago, Chile.

El concepto de catálisis enzimática, desarrollado a fines del siglo pasado, adoleció desde sus comienzos de una predisposición hacia el vitalismo, resultado de la prevalencia de las opiniones de Pasteur en su controversia con Liebig. Si bien alrededor de 1900 (1) había descripciones cuantitativas de la velocidad de inversión de la sacarosa o de la fermentación de la glucosa, todas ellas se basaban en la premisa de que la enzima actuaba "por presencia" Barendrecht en 1904, propone radiaciones producidas por la enzima (E) y captadas por el sustrato (S) o el inhibidor (I).

Sólo en 1902 propone Brown (2) la existencia transitoria de un compuesto formado por la E y el S. Esto conduce a los tratamientos cuantitativos de equilibrio o de estado estable. Posteriormente se demuestra la existencia de cambios espectroscópicos (3) en la reacción E-S, se identifica y aísla un tioéster de la triosa-fosfato-deshidrogenasa con un grupo acilo (4) y se preparan compuestos estables de deshidrogenasas con derivados acílicos de la coenzima A (5).

Hoy puede el enzimólogo, en algunos casos, tratar el compuesto E-S como un

intermediario estable y bien definido; puede dilucidar la estructura de la porción de la molécula enzimática que se combina con el sustrato (sitio activo); puede establecer la porción de la molécula de sustrato que se combina con la E, estudiar la naturaleza del enlace E-S (covalente, iónico, de inclusión, etc.) y los cambios que ocurren al pasar la combinación E-S a E-P, (P = producto de la acción enzimática).

Pero no siempre es posible abordar este problema con las técnicas de aislamiento y estudio analítico del compuesto E-S. Si todos los estudios enzimáticos se hubieran postergado hasta haber logrado la purificación total de la enzima, creo que sabríamos muy poco sobre las secuencias de reacciones.

Por ello, introducir en un sistema enzimático sustancias que retarden la velocidad de reacción, vale decir usar *inhibidores*, resulta un método muy fructífero, sea que se empleen enzimas puras o parcialmente purificadas.

Los inhibidores pueden actuar en las formas más variadas como se resume en la Fig. 1, pero me reduciré a analizar sólo 3 de ellas.

I) Modificación permanente de la molécula de enzima (MYA, PCMB, DFP, DNFB, TPCK).

II) Combinación reversible de la enzima con un inhibidor, producto, segundo sustrato, etc.

III) Modificaciones de la concentración del solvente.

En el caso particular de las ATPasas propiamente tales, se tiene bastante información sobre el sitio activo de la miosina, así como sobre los requerimientos que debe reunir una molécula para que constituya sustrato (6). Pero por otra parte no está clara aún la naturaleza de la combinación E-ATP (7), y se supone por el intercambio de O¹⁸ con el agua, que se forme una fosforil-enzima.

(*) Conferencia dictada en la mesa redonda sobre Cinética de las Reacciones Enzimáticas, VI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas (A.L.A.C.F.) Viña del Mar (Chile) 23-28 de Noviembre de 1964.

Los experimentos relatados en este trabajo han sido realizados en colaboración con A. Traverso, M. Tetas, H. Chaimovich, J. Rabí y M. Rosenblatt.

Estos trabajos han sido financiados con fondos de la Ley N° 11 575 y por subvención N° 62121 de la Fundación Rockefeller.

Abreviaturas empleadas: E = enzima libre; S = sustrato libre; ES = compuesto enzima-sustrato; I = inhibidor; E-P = enzima-producto; DFP = diisopropil fosfofluoridato; MYA = ác. monoyodoacético; DNFB = dinitro fluorobenceno; PCMB = paracloromercuribenzoato; TPCK = toluensulfonilfenilalanil-clorocetona; NAD = nicotinamida-adenina dinucleotido; ARPPRN = adenin-difosforil-ribosa.

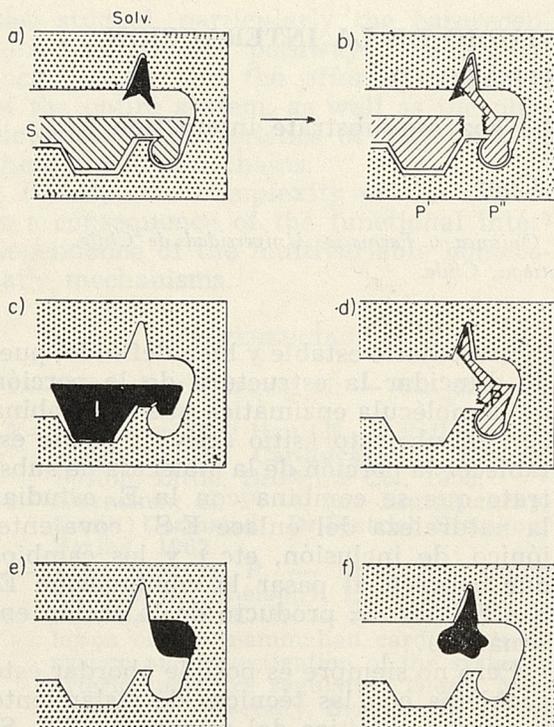


FIG. 1. a) Esquema de la reacción de una enzima con un sustrato (S) y solvente (solv); b) Productos de la reacción combinados con la enzima; c) Inhibidor en el sitio del sustrato; d) Inhibición por producto; e) Inhibidor inespecífico; f) Inhibidor que ocupa el lugar del solvente.

Nos ha ocupado desde hace algunos años, el estudio de una ATPasa de la papa (apirasa) que hidroliza tanto ATP como ADP hasta AMP y ortofosfato inorgánico (P_i) (8, 9). Si bien hemos purificado esta enzima unas 300 o más veces, creemos que aún no se halla totalmente pura. A pesar de ello, hemos creído útil tratar de obtener información sobre el sitio activo de esta enzima.

Los ácidos monohaloacéticos (10) se cuentan entre los reactivos que más fácilmente pueden dar resultados, pues son agentes alquilantes. Según el pH alquilan distintos grupos nucleofílicos (SH, fenólicos, imidazol, amino, metil-tio). Por ejemplo, la histidina de la ribonucleasa es carboximetilada por el ácido monobromoacético. Un inhibidor de la RNAasa, el citidinmonofosfato la protege de la inhibición (11).

Barany ha demostrado que la apirasa no es sensible ni al MYA ni a otros reactivos de sulfhidrilos (12).

El diisopropil fluorofosfato (DFP) (13) es un poderoso inhibidor de colinesterasa, quimotripsina, fosfoglucomutasa a concentraciones que bajan hasta 10^{-6} y 10^{-8} M (las fosfatasas, la pepsina o la amilasa no son afectadas). La reacción es estequiométrica (14, 15) y puede ser invertida por agentes nucleofílicos (oximas). Se recupera de la enzima así tratada una fosfoserina o un fosfoserin-péptido (16). La serina libre no reacciona con el DFP. Se ha visto que es la histidina el aminoácido que "activa" la serina (fotooxidación). Este aminoácido fija el análogo de sustrato TPCK (17), pero esta fijación es impedida por el DFP.

La hidrólisis del ATP por la apirasa de la papa no es afectada por el DFP 10^{-3} M, lo que podría ser la consecuencia de una protección de la enzima por el sustrato (2×10^{-3} M). La incubación de la enzima durante 20 horas a 0°C no produce cambios observables; en este caso la concentración de DFP es por lo menos el doble de la de la enzima.

Contrariamente a lo descrito por Wilson (18), el efecto del DFP en incubación durante 30 minutos a 30°C es tanto mayor cuanto mayor sea la concentración de proteína (Fig. 2). Esto se confirma en un experimento cinético a 30°C , en el cual se observa que el DFP protege transitoriamente a la enzima de la desnaturalización térmica (Fig. 3). Podría pensarse que el DFP se combina con la enzima en un sitio diverso del activo, y que en ese lugar se desdobra y pierde su efecto protector. Podría aún pensarse que al desdoblarse produce un inhibidor, lo que explicaría el efecto mayor del DFP a concen-

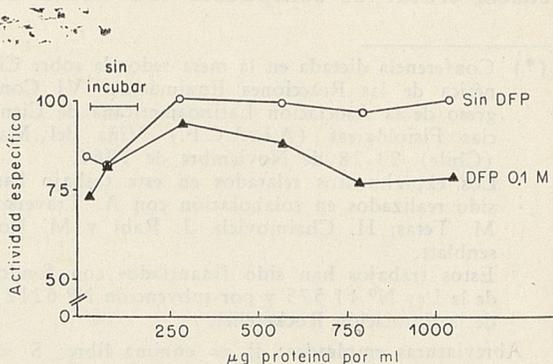


FIG. 2. Efecto del DFP sobre la apirasa de papa a distintas concentraciones de proteína. Incubación de la enzima en la concentración indicada, por 1 hora a 30°C a pH 6,0.

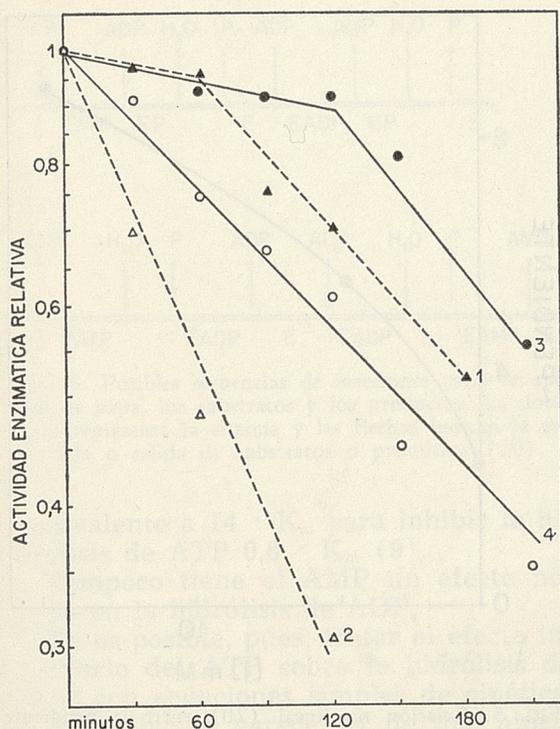
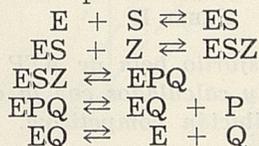


FIG. 3. Efecto protector del DFP sobre la inactivación térmica de la apirasa de papa a 30° y pH 6,0. Concentraciones de enzima indicadas en cada gráfica.

traciones más altas de proteína. En todo caso estos experimentos excluyen la acción concertada histidina-serina del sitio activo de la apirasa.

Los inhibidores que se fijan en forma covalente a la enzima ofrecen un medio de "marcar" un aminoácido del sitio activo; pero para poder iniciar este tipo de trabajo es necesario tener una enzima altamente purificada.

Si por otra parte pensamos que una secuencia de reacción enzimática puede ser representada por:



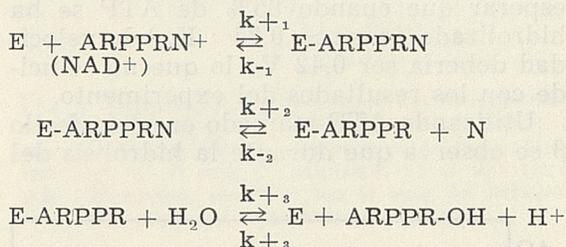
donde S y Z representan los sustratos y P y Q los productos, puede comprenderse fácilmente que Q pueda competir con S por el sitio activo de la enzima, y que incluso Z y P pueden modificar la velo-

cidad de reacción, que depende de las concentraciones en estado estable de ESZ y EPQ.

Wong y Hanes (19) y Cleland (20) han resuelto las ecuaciones cinéticas que resultan de este planteamiento y de otros equivalentes. Estas ecuaciones de velocidad generalizadas permiten decidir si una secuencia de reacciones es válida o no. Así, por ejemplo, Morrison y James (21) demuestran que ATP-Mg y ADP-Mg compiten por el mismo sitio activo de la creatina-fosfoquinasa, en tanto que no compiten entre sí.

Walter y Frieden (22) han revisado las inhibiciones por producto, y destacan que la ecuación que describe el efecto del producto no es siempre la de una inhibición competitiva. Por otra parte, el que la inhibición sea no-competitiva no tiene como corolario que el sustrato y el producto se combinen en distintos sitios de la enzima.

Un ejemplo de este planteamiento es la inhibición no-competitiva de la hidrólisis de NAD⁺ por la nicotinamida (23).



Los datos experimentales coinciden con la ecuación.

Por otra parte, si una misma enzima (24) reacciona con dos sustratos distintos a y b, que dan productos diferentes, la ecuación que describe la velocidad de reacción para el sustrato a es:

$$1 : v_a = 1 : V_a + [K_a (1 + b : k_b)] : a V_a$$

análoga a la de una inhibición competitiva.

La apirasa de papa actuando sobre el ATP, desdobra de preferencia el fosforilo γ, de modo que la curva de hidrólisis resulta bifásica (8). Puede pensarse que ambos fenómenos son condicionados por una represión de la hidrólisis del ADP formado por el ATP presente.

TABLA I

Valores de los parámetros cinéticos para ATP y ADP utilizados como substrato o inhibidor.

	Substrato M_m (mM)	Inhibidor K_i (mM)
ATP	0,12	$0,09 \pm 0,02$
ADP	0,26	0,24

Esta hipótesis se confirma utilizando ATP no marcado para reprimir la hidrólisis del fosforilo β del ADP marcado con P^{32} . El uso de este substrato, así como del ATP marcado en el fosforilo γ , permite establecer en forma inequívoca los parámetros cinéticos para ATP y ADP (9).

Las diferencias entre estos valores para ATP y ADP son relativamente pequeñas (Tabla I), lo que hace difícil explicar la inhibición casi total de la hidrólisis del fosforilo γ durante la primera fase de la reacción. Si comparamos las velocidades de reacción obtenidas de un registro potenciométrico continuo (Fig. 4), sería de esperar que cuando 85% de ATP se ha hidrolizado (conc = $0,75 \cdot K_m$) la velocidad debería ser $0,42 V_m$ lo que no coincide con los resultados del experimento.

Utilizando ATP marcado en el fosforilo β se observa que durante la hidrólisis del

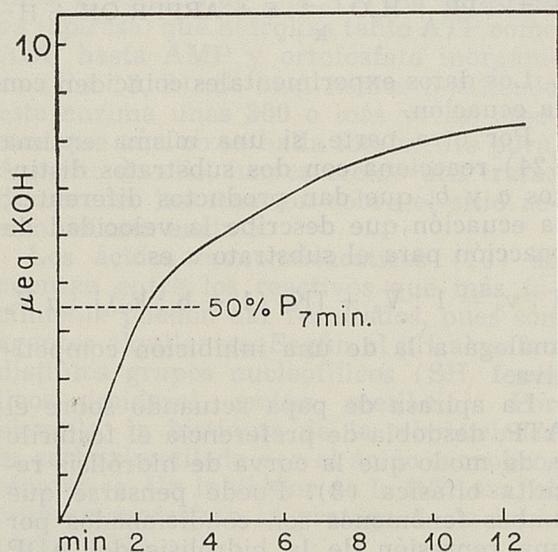


FIG. 4. Titulación potenciométrica de la apirasa de papa, inscripción directa. Volumen 1 ml; temperatura 34°C ; enzima 5,6 mg/ml; ATP 0,46 mM.

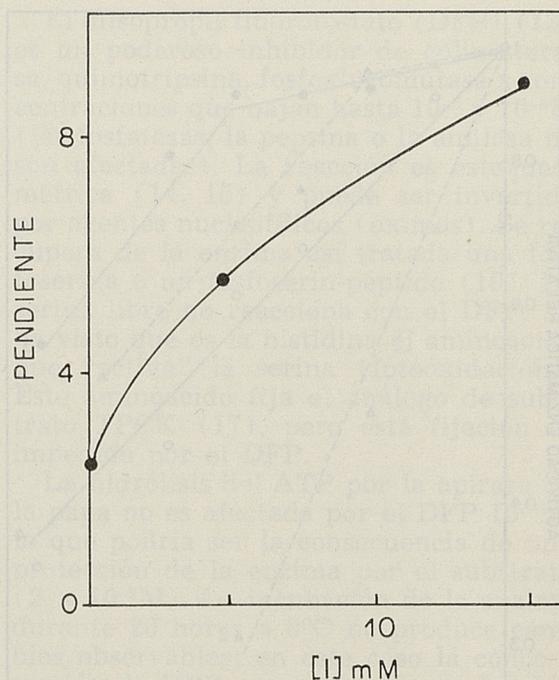


FIG. 5. Relación no lineal (20) entre la pendiente del gráfico de Lineweaver y Burk para la velocidad de hidrólisis de ADP por la apirasa de papa y la concentración de ATP agregado (I).

fosforilo γ se hidroliza hasta un 15% del fosforilo β . Por otra parte, si se utilizan los parámetros cinéticos mencionados más arriba para calcular la cantidad de ADP que debería haberse hidrolizado, se obtiene discrepancia con los valores experimentales (Tabla II). Esto, junto con la discrepancia en la curva potenciométrica, indican que el ATP satura a la enzima a concentraciones más bajas de lo que deja suponer su K_m .

La participación de la inhibición por producto no es de mayor importancia, pues se requiere una concentración de ADP

TABLA II

Hidrólisis del fosforilo beta de ATP (β - P^{32}). Datos obtenidos y calculados con la ecuación de inhibición competitiva.

Tiempo minutos	Velocidad de hidrólisis de ADP $\cdot 10^3$ ($\mu\text{mole}/\text{minuto}$)	
	Calculada	Obtenida
3	0,68	1,8
5	1,29	3,7
7	1,34	8,5

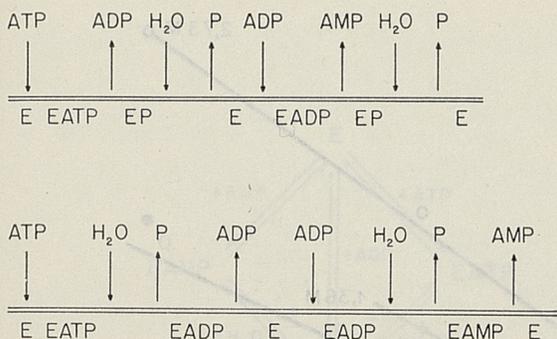


FIG. 6. Posibles secuencias de reacciones entre la apirasa de papa, los sustratos y los productos. La doble línea representa la enzima y las flechas indican la entrada o salida de sustratos o productos (20).

equivalente a $14 \cdot K_m$ para inhibir la hidrólisis de ATP $0,8 \cdot K_m$ (9).

Tampoco tiene el AMP un efecto notorio en la hidrólisis de ADP.

No es posible, pues, tratar el efecto inhibitorio del ATP sobre la hidrólisis de ADP con ecuaciones simples de cinética, y la inhibición parece ser de tipo hiperbólico (Fig. 5).

Si bien la existencia de una inhibición competitiva sugiere la presencia de un solo sitio activo para ambas enzimas, aún

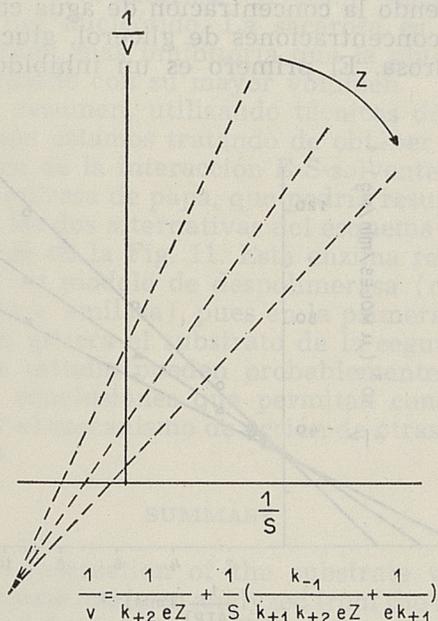


FIG. 7. Relación entre pendiente, intersección y concentración de solvente según Main, Z, el agente solvolytico (agua), k, constantes de velocidad, e, concentración de enzima y S concentración de sustrato.

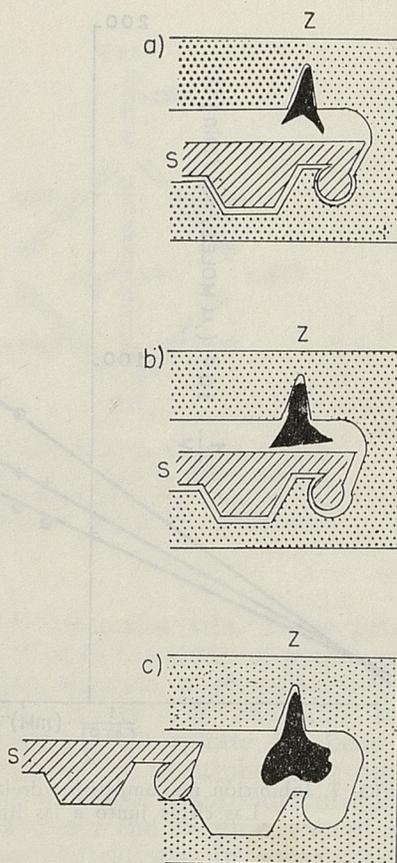
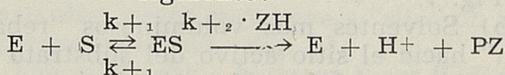


FIG. 8. Esquema de la combinación enzima-sustrato-solvente. a) básico; b) el solvente normal (agua) es reemplazado por otro que ocupa su sitio, pero que no interfiere con el sitio del sustrato; c) el solvente es más voluminoso, interfiere con el sitio del sustrato y actúa como inhibidor competitivo.

no queda claro el mecanismo de interacción. Hemos propuesto 2 esquemas para la secuencia de reacciones (Fig. 6), pero aún no hemos podido desarrollar las ecuaciones cinéticas para estos esquemas.

Quiero finalmente referirme al efecto del solvente. En una reacción de hidrólisis se suele suponer que el solvente se encuentra en tal exceso que su concentración prácticamente no cambia, y que además se combina sólo con el compuesto ES, atacando directamente a la porción de sustrato combinado con la enzima y sin combinarse con ésta. Esto se expresa en la ecuación siguiente:



En el tratamiento de Michaelis se incluye la concentración de Z en k_{+2} . Kosh-

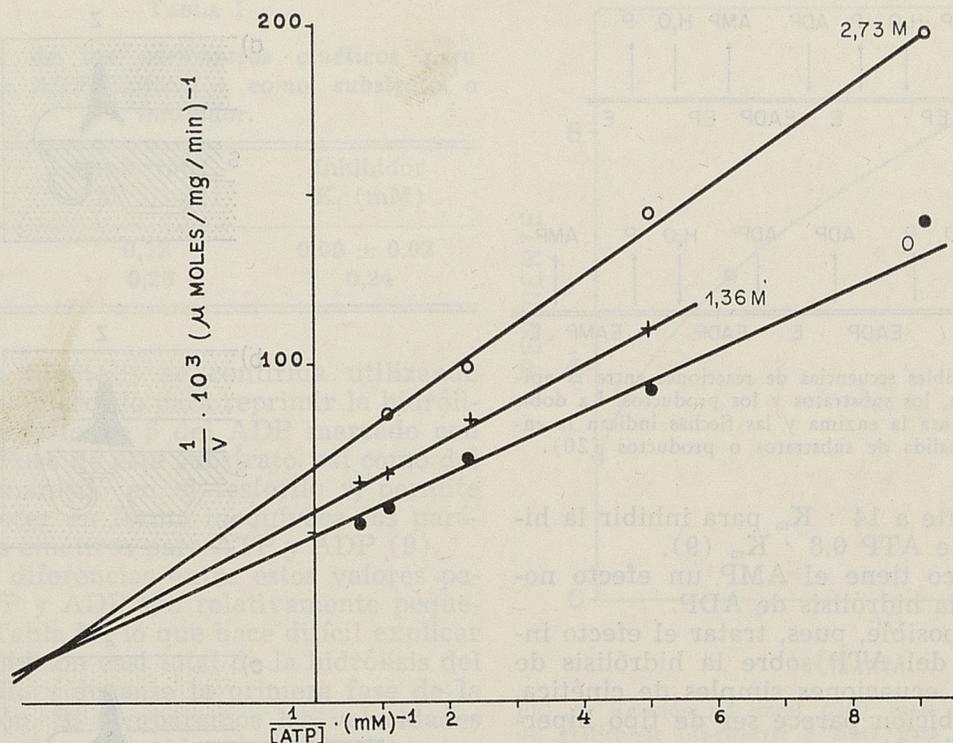


FIG. 9. Inhibición no-competitiva de la apirasa de papa por glicerol, con ATP como sustrato. Las cifras junto a las líneas representan la concentración de glicerol.

land (25) ha demostrado que en la hidrólisis no-enzimática de ésteres fosfóricos lábiles, la constante cinética de solvólisis en agua es entre 0,4 y 2,7 veces la constante en metanol. En cambio, en la hidrólisis enzimática de ATP este cociente es >100 . De esto concluye que el agua ocupa un lugar en la enzima, y no actúa simplemente como solvente libre.

Canady *et al.* (26) obtienen resultados en este mismo sentido, al estudiar el efecto de éteres y alcoholes sobre la quimotripsina. En tanto que el metanol es un inhibidor no-competitivo, el alcohol amílico terciario y el éter dietílico son inhibidores competitivos. Esto sugiere dos hechos importantes: a) el solvente actúa desde algún punto combinado en la enzima, ya que de otro modo (27) el efecto inhibitorio debería ser el representado en la Fig. 7.

b) Solventes más voluminosos "rebasan" hacia el sitio activo del sustrato e interfieren en la combinación de éste con la enzima (inhibición competitiva). (Fig. 8).

Hemos estudiado este problema disminuyendo la concentración de agua con altas concentraciones de glicerol, glucosa o sacarosa. El primero es un inhibidor no

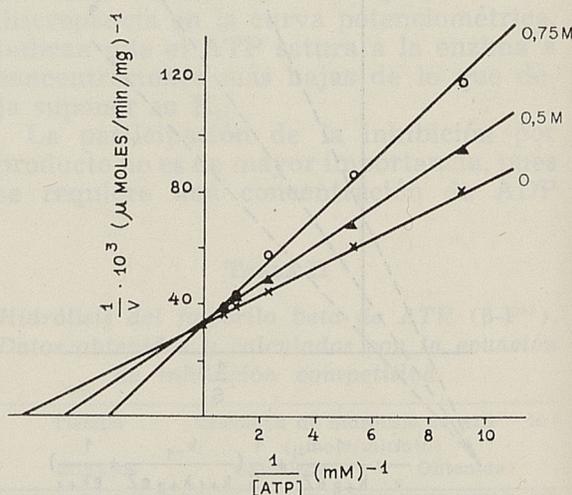


FIG. 10. Inhibición competitiva de la apirasa de papa por sacarosa, con ATP como sustrato. Las cifras junto a las líneas representan la concentración de sacarosa.

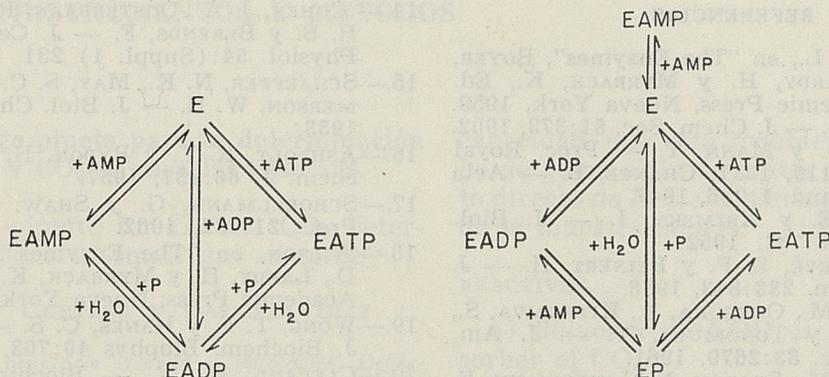


FIG. 11. Dos posibles esquemas de la reacción de la apirasa de papa con el ATP y ADP. En el mecanismo a) (izquierda), el complejo central sería la enzima-fosfato y el AMP formaría un complejo no reaccionante. En el esquema b) (derecha), el complejo sería enzima-ADP y el complejo enzima-AMP podría ser reaccionante.

competitivo; los glúcidos son inhibidores competitivos (Figs. 9 y 10). Esto indica que estos últimos se combinan de alguna manera con la enzima, pues si sólo actuaran por disminución de concentración de solvente, cambiaría sólo el valor de " k_2 aparente" y la cinética sería de tipo Main (27). Puede pensarse que, tal como en los experimentos de Canady, el glicerol ocupa el "sitio del agua", en tanto que la glucosa y la sacarosa "rebasan" hacia el sitio del nucleótido. La sacarosa es, por lo demás, más inhibitoria que la glucosa, de acuerdo con su mayor volumen.

En resumen, utilizando técnicas de inhibición estamos tratando de obtener una imagen de la interacción E-S-solvente para la apirasa de papa, que podría resumirse en las dos alternativas del esquema que aparece en la Fig. 11. Esta enzima representa un modelo de despolimerasa (ribonucleasa, amilasa), pues en la primera reacción genera el substrato de la segunda. De su estudio pueden probablemente sacarse conclusiones que permitan conocer mejor el mecanismo de acción de otras enzimas.

SUMMARY

The interaction of the substrate with the enzyme has been analyzed from the chemical point of view. When the enzyme has not been completely purified, the use of inhibitors or of pH changes may furnish some information regarding the na-

ture of the active site. These principles are applied to the study of potato apyrase.

Potato apyrase, a phosphoryl-transferase which splits ATP and ADP to AMP plus inorganic phosphate, has been shown to be insensitive to sulphhydryl group reagents. Diisopropyl phosphofluoridate does not inactivate the enzyme, except at very high concentrations. In some conditions, it may even protect the enzyme from thermal inactivation (Fig. 3).

ATP is a competitive inhibitor of ADP hydrolysis and vice-versa. However, if the inhibition and Michaelis constants are used to calculate the expected reaction rate for β -P³² labeled ADP, the experimental data do not agree with the calculations. Potentiometric measurement of ATP hydrolysis also shows disagreement with the calculated rate of ATP hydrolysis (Fig. 4).

A plot of slope versus ATP concentration in the hydrolysis of ADP is parabolic (Fig. 5). This shows that the equations derived from the Michaelis-Menten or Briggs-Haldane postulates do not accurately describe the effect of ADP and ATP on potato apyrase. Two alternative reaction schemes are presented (Fig. 6 and 9).

The effect of polyhydroxy compounds as inhibitors of ATP or ADP hydrolysis suggests that water may have a "site" on the apyrase molecule (Fig. 8).

The relationship between these findings and those described in other enzymic reactions is discussed.

REFERENCIAS

- 1.—SEGAL, H. L., en "The Enzymes", BOYER, P. D., LARDY, H. y MYRBACK, K., Ed. 1:1. Academic Press, Nueva York, 1959.
- 2.—BROWN, A. — J. Chem. Soc. 81:373, 1902.
- 3.—KEILIN, D. y MANN, T. — Proc. Royal Soc. 122:119, 1937; CHANCE, B. — Acta Chem. Scand. 1:236, 1947.
- 4.—RACKER, E. y KRIMSKY, I. — J. Biol. Chem. 198:731, 1952.
- 5.—STEYN-PARVÉ, E. P. y BEINERT, H. — J. Biol. Chem. 233:843, 1958.
- 6.—IKEHARA, M., OHTSUKA, E., KITAGAWA, S., YAGI, K. y TONOMURA, Y. — J. Am. Chem. Soc. 83:2679, 1961.
- 7.—LEVY, H. M., SHARON, N., LINDEMANN, E. y KOSHLAND, D. E. — J. Biol. Chem. 235:2628, 1960.
- 8.—TRAVERSO CORI, A. y CORI, O. — Biochim. Biophys. Acta 57:158, 1962.
- 9.—TRAVERSO-CORI, A., CHAIMOVICH, H. y CORI, O. — Arch. Biochem. Biophys. 109:173, 1965.
- 10.—FRENCKEL-CONRAT, H. en "The Enzymes", BOYER, P. D., LARDY, H. y MYRBACK, K., Ed. 1:511, Academic Press, Nueva York, 1959.
- 11.—BARNARD, E. A. y STEIN, W. D. — Biochem. J. 71:19, 1959; GUNDLACH, H. G., STEIN, W. H. y MOORE, S. — J. Biol. Chem. 234:1754, 1959.
- 12.—BARANY, M. y BARANY, K. — Biochim. Biophys. Acta 35:544, 1959.
- 13.—BALLS, A. K. y JANSEN, F. J. — Adavan. Enzymol. 13:321, 1952.
- 14.—COHEN, J. A., OOSTERBAAN, R. A., JANSZ, H. S. y BERENDS, F. — J. Cell. Compar. Physiol. 54:(Suppl. 1) 231, 1959.
- 15.—SCHAEFFER, N. K., MAY, S. C. Jr. y SUMMERSON, W. H. — J. Biol. Chem. 202:67, 1953.
- 16.—ASHBOLT, R. F. y RYDON, H. N. — Biochem. J. 66:237, 1957.
- 17.—SCHOELLMANN, G. y SHAW, E. — Fed. Proc. 21:232, 1962.
- 18.—WILSON, en "The Enzymes", BOYER, P. D., LARDY, H. y MYRBACK, K., Ed. 4:512, Academic Press, Nueva York, 1962.
- 19.—WONG, T. F. y HANES, C. S. — Canadian J. Biochem. Biophys. 40:763, 1962.
- 20.—CLELAND, W. W. — Biochim. Biophys. Acta 67:104, 1963.
- 21.—MORRISON, J. F. y JAMES, E. — Proc. VI International Congr. Biochem., New York 1964, Abstracts 4:323.
- 22.—WALTER, C. y FRIEDEN, E. — Advan. Enzymol. 25:167, 1963.
- 23.—ZATMAN, L. J., KAPLAN, N. O. y COLOWICK, S. P. — J. Biol. Chem. 200:197, 1953; *ibid.* 209:453, 1954; *ibid.* 209:467, 1954.
- 24.—DIXON, M. y WEBB, E. C. — "Enzymes". Longmans, Londres, 1958.
- 25.—KOSHLAND, D. E. y HERR, E. B. — J. Biol. Chem. 228:1021, 1957.
- 26.—MILES, J. L., MOREY, E., CRAIN, F., GROSS, S., SAN JULIAN, S. y CANADY, W. J. — J. Biol. Chem. 237:1319, 1962.
- 27.—MAIN, A. R. — Biochem. J. 79:246, 1961.

SUMMARY

The interaction of the substrate with the enzyme has been analyzed from the chemical point of view. When the enzyme has not been completely purified, the use of inhibitors or of pH changes may furnish some information regarding the re-