

# TRABAJOS DE REVISION

---

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR  
FACULTAD DE FARMACIA. UNIVERSIDAD DE GRANADA

## CICLO DE LAS PENTOSAS FOSFATO. I. CARACTERIZACION, PROPIEDADES DE LOS ENZIMAS REGULADORES E INTEGRACION METABOLICA

J. Peragón, L. García-Salguero, F. Aranda y José A. Lupiáñez

### INTRODUCCION

El ciclo de las pentosas fosfato es considerado como una ruta alternativa en la degradación de la glucosa cuyo significado metabólico no es el de producir o almacenar energía sino más bien actuar como un suministrador de precursores biosintéticos de otras macromoléculas.

En general, en hígado, casi un tercio de la glucosa se desvía por esta vía, porcentaje que puede variar según el órgano y las condiciones en que se encuentre.

Aunque la secuencia de reacciones de esta ruta fue establecida en los años cincuenta, durante los últimos años, han continuado los estudios encaminados hacia su correcta caracterización y descripción así como sobre las propiedades cinéticas y moleculares de los enzimas más importantes.

El ciclo de las pentosas fosfato juega un papel central en la integración celular del metabolismo de la glucosa con el resto del metabolismo celular. Así su función principal es generar poder reductor imprescindible para multitud de procesos reductores biosintéticos así como pentosas fosfato utilizables como precursores en la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Como consecuencia de ambos hechos se han descrito procesos de adaptación y represión enzimática, probablemente debidos a cambios en la síntesis de enzima, de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) en respuesta a diferentes condiciones nutricionales. En este sentido se ha propuesto que los niveles de intermediarios del ciclo juegan un importante papel en el control de la síntesis de nucleótidos, actividad glucolítica, man-

tenimiento de la integridad celular y procesos de destoxificación. Describiéndose además, significativos incrementos del ciclo durante procesos de proliferación y crecimiento celular. Todo ello hace de esta ruta un elemento imprescindible en la infraestructura metabólica de la célula.

Con la presente revisión se pretende ilustrar las propiedades cinéticas y moleculares de los enzimas reguladores más importantes de esta ruta, y ahondar en la caracterización del sistema. Además se discute el papel que juega el ciclo de las pentosas en relación con el resto del metabolismo celular.

### CICLO DE LAS PENTOSAS FOSFATO. CARACTERIZACION Y PROPIEDADES DE LAS PRINCIPALES REACCIONES.

La secuencia de reacciones que engloba esta vía puede considerarse dividida en dos ramas, una rama oxidativa que transforma glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato produciendo dos moléculas de NADPH y una molécula de  $\text{CO}_2$ , gracias a la acción de tres reacciones catalizadas por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), 6-fosfoglucono lactonasa (EC 3.1.1.31) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (EC 1.1.1.44) (1). En la otra porción o rama no oxidativa se generan azúcares de seis átomos de carbono a partir de ribulosa 5-fosfato, gracias a la intervención de la ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa (EC 5.1.3.1), ribosa 5-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.6), transcetolasa (EC 2.2.1.1) y transaldolasa (EC 2.2.1.2). Estas últimas reacciones son reversibles y su dirección dependerá de la concentración de reactivos y productos, siendo pues la rama oxidativa y en especial la G6PDH y 6PGDH los enzimas claves en la regulación de esta ruta.

La secuencia de reacciones para la rama no oxidativa fue propuesta por el grupo de Horecker (2,3), basándose en experimentos que implicaban la incubación de ribosa 5-fosfato [ $1^{-14}\text{C}$ ] o pentosa 5-fosfato [ $2,3^{-14}\text{C}$ ] con extractos tamponados de enzima a partir de polvos cetónicos preparados de hígado de rata y tejidos de raíz y hoja de guisante y desde entonces se ha considerado válida para todos los tipos celulares, sin embargo, en los últimos años ha surgido una fuerte controversia pues Williams y colaboradores (4,5,6) proponen la existencia de otra secuencia de reacciones, la denominada tipo "L" (por ser según ellos mayoritaria en hígado) caracterizada por incluir la participación de cinco intermediarios diferentes (D-manno-heptulosa 7-fosfato, D-altro-heptulosa 1,7-bisfosfato, D-glicero-Dido-octulosa 1,8 bisfosfato, D-glicero-D-altro-octulosa 1,8 bisfosfato y D-arabinosa 5-fosfato) aislados posteriormente de mezclas de reacción y dos nuevos enzimas (pentosa 5-fosfato 2-epimerasa y fosfotransferasa) junto a la actividad aldolasa (7,8). Proponen que en el tejido adiposo la ruta mayoritaria sería la clásica o tipo "F".

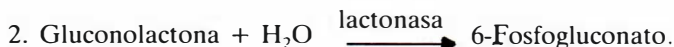
Otros autores (9-10) han encontrado evidencias en contra de la existencia de esta secuencia de reacciones en hígado; entre ellas están: i) resultados contradictorios, al repetir los experimentos, con los patrones de marcaje previsibles por esta vía, y encontrar una distribución ajustable al ciclo clásico (9) ii)

no encontrar metabolización de la arabinosa 5-fosfato en homogenados de hígado de rata (10).

Pero, sea una u otra la secuencia de reacciones de la rama no oxidativa, la porción limitante de la velocidad del proceso es la rama oxidativa y en especial las reacciones catalizadas por la G6PDH y 6PGDH, de ahí que pasemos al estudio detallado de las características de estas reacciones así como algunas propiedades de ambas enzimas.

### CARACTERISTICAS CINETICAS DE LAS REACCIONES DEL SEGMENTO OXIDATIVO DEL CICLO DE LAS PENTOSAS FOSFATO

El conjunto de reacciones que conforman esta fase oxidativa se muestra en el esquema:



Atendiendo a las características químicas de estas reacciones podría suponerse el establecimiento de un estado estacionario lejano al equilibrio termodinámico, sin embargo, este sistema según Eggleston y Krebs (11), puede considerarse cercano al equilibrio, al considerar que este NADPH (inhibidor competitivo de la G6PDH) va a irse retirando del medio, y reciclándose en la medida en que lo demanden otros procesos celulares. Se convierte así el control básico de estas reacciones esencialmente en un proceso de desinhibición. En este sentido, Gumaa et al. (12) observan que el valor de la  $K_m$  de la G6PDH para la G6P excede en más de tres veces el contenido celular de estos metabolitos siendo probable que el control de estas reacciones no se deba pues a una limitación de sustrato, sino más bien a la carencia de algún cofactor.

Existen pocos estudios sobre el mecanismo cinético de la G6PDH, parece que en la mayoría de los casos existe un mecanismo secuencial, con la unión primero del NADP y la liberación posterior del NADPH (13,14). Además proponen que es preciso considerar dos centros reguladores para el NADPH y un centro catalítico para NADP por unidad funcional de enzima.

La cinética de la descarboxilación y oxidación del 6-fosfogluconato, ha sido estudiada en detalle por varios grupos de investigadores y en diferentes organismos. Esta reacción es formalmente análoga a la isocitrato deshidrogenasa y málico deshidrogenasa NADP dependiente (enzima málico) ya que es el  $\text{CO}_2$  y no el  $\text{HCO}_3$  el producto intermediario (15). Estas dos últimas necesitan iones divalentes y parece que la transformación puede estar mediada por la formación de un  $\beta$ -cetoácido (16). Sin embargo la 6PGDH no necesita añadir iones metálicos para su actividad (17). Un mecanismo posible, alternativo, es

que la descarboxilación pueda ocurrir sin la existencia de un  $\beta$ -cetoácido por una oxidación concertada y una descarboxilación a través de un único estado de transición (18).

Los estudios realizados sobre las características cinéticas de la 6PGDH han producido resultados contradictorios según las condiciones en las cuales se desarrolla la reacción. Tophan et al (19) trabajando en hígado de oveja parecen demostrar que se da un mecanismo secuencial asimétrico, en el que la unión de los reactivos es al azar, y la liberación de los productos ordenada siendo el primero en liberarse el  $\text{CO}_2$ , después la ribulosa 5-P y por último el NADPH. Utilizando 6PGDH de otros orígenes (levaduras y eritrocitos) otros autores (20,21) han descrito un mecanismo "mitad de sitios" para este enzima, en el cual cada una de las subunidades que conforman la molécula activa se comportan simultánea e independientemente activas en la catálisis.

## ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA

Este enzima está ampliamente distribuido y ha sido aislado tanto de plantas, animales como microorganismos. La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa existe en tejidos de rata en múltiples formas moleculares con distinta movilidad electroforética (22,23). Se han descrito al menos seis formas con actividad diferente, estas formas pueden ser dímeros, tetrámeros y hexámeros de una subunidad inactiva de pm alrededor de 60 Kd (22,26). Los dímeros (de peso molecular entre 121 Kd y 130 Kd (26) predominan en la mayoría de los tejidos, representando al 90-95% de la actividad G6PDH (27) en hígado. También se ha aislado en hígado de rata una forma tetramérica de alta actividad específica y de peso molecular 269 Kd (28).

El enzima de eritrocitos, ha sido el más estudiado estructuralmente tanto por su importancia en estas células, como por la enfermedad ocasionada por alteraciones genéticas. Se han descrito dos formas catalíticamente activas, tetrámeros (205-210 Kd) y dímeros (101-105 Kd) (29-31) constituidos por monómeros inactivos "idénticos". Poco se conoce sobre la interacción entre monómeros para la formación del dímero (25).

La asociación de dos unidades diméricas para formar el tetrámero ocurre a través de interacciones que se afectan principalmente por el pH, fuerza iónica (29,32) y cationes divalentes (31,32) (similares a las interacciones entre monómeros). Estos datos sugieren la existencia de dos planos de simetría en el tetrámero, al menos desde el punto de vista químico. Un primer plano caracterizado por contactos hidrofóbicos estabilizados por el  $\text{NADP}^+$  y un segundo mantenido por puentes iónicos que facilitan la disociación reversible a dímeros (29).

Estudios de microscopía electrónica parecen mostrar la subunidad aislada con estructura cilíndrica, que al asociarse formando el dímero sufre un cambio drástico haciéndose menos elongado disminuyendo el radio axial. La forma di-

mérica tiene un doble eje de simetría con puentes entre los monómeros, cuyos ejes mayores forman aproximadamente un ángulo de 90°. Las distintas figuras de tetrámeros son comparables con diferentes proyecciones de una estructura tetraédrica irregular, interaccionando cada monómero con 3 vecinos (25).

Estudios de modificación química implican a varios grupos como esenciales para la actividad catalítica del enzima; así se han identificado como esenciales dos residuos de arginina, importantes para la unión de la glucosa 6-P (33), uno de lisina en *L. mesenteroides* (34) y en *C. utilis* (35) esencial para la unión de piridín nucleótidos, uno de tirosina (*L. mesenteroides*) (36) y otro de histidina (probablemente His-242) por subunidad, esencial en el sitio activo de unión al sustrato (37).

Genéticamente, en el hombre el gen G6PDH se localiza en el cromosoma X en la posición q 28 (38). Además de éste existe un isoenzima autosómico y usa NAD y NADP tanto en microsomas humanos como en otros mamíferos (39,40). Recientemente Tarizawa et al (41) han obtenido la secuencia de aminoácidos completa de la subunidad 58 Kd, compuesta por 531 residuos de aminoácidos a partir de la cual han conseguido crear una sonda específica de ADNc.

## INTEGRACION CELULAR DEL CICLO DE LAS PENTOSAS FOSFATO Y RESTO DEL METABOLISMO CELULAR.

Además de asegurar las funciones energéticas celulares, el metabolismo de la glucosa cuenta con otras aplicaciones indispensables para el correcto funcionamiento celular, estas aplicaciones las desempeña gracias al ciclo de las pentosas fosfato encargado de suministrar los precursores necesarios para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, así como síntesis de lípidos. Además de esto, el NADPH producido es imprescindible para el mantenimiento de la integridad celular evitando procesos de peroxidación de lípidos y en las reacciones de oxidación mixta. También existe una estrecha relación entre esta ruta y la glucolítica-gluconeogénica por compartir las tres intermediarios comunes. Como consecuencia de todo ello existe una estrecha relación entre el ciclo de las pentosas fosfato y gran número de procesos celulares como crecimiento y proliferación celular, estados de estrés oxidativo, diabetes, hipertrofia y acidosis. Estas relaciones son las que a continuación se pretende analizar más detenidamente.

### *Interrelación glucolisis-gluconeogénesis y ciclo de las pentosas fosfato.*

Una vez la glucosa es fosforilada en el interior de la célula, puede elegir varios caminos para su degradación, bien seguir la ruta glucolítica o bien entrar en el ciclo de las pentosas fosfato. Ambas rutas comparten intermediarios y compartimentación, de ahí que se hayan estudiado con mucho interés las relaciones entre ambas así como su regulación conjunta. Las técnicas empleadas van desde la valoración de los distintos metabolitos y actividades enzimáticas,

hasta el empleo de complejos modelos matemáticos capaces de cuantificar el flujo metabólico a través de cada paso conociendo la distribución del marcaje en los productos celulares obtenidos al metabolizar una mezcla de sustratos marcados.

Casazza y Veech (42) encuentran que existe una clara interdependencia de los intermediarios glucolíticos y los del ciclo de las pentosas fosfato en ratas alimentadas ad libitum, encontrando que las actividades de los enzimas de la porción no oxidativa del ciclo son suficientes para mantener cerca del equilibrio los productos glucolíticos finales del ciclo (fructosa 6-fosfato y gliceraldehído fosfato) y la porción no oxidativa. Igualmente proponen que este conjunto de reacciones representan un lazo de unión entre otros dos equipos de reacciones cercanas al equilibrio, por un lado la fosfogliceromutasa y enolasa y por otro triosafosfato isomerasa y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa. Encuentran también resultados similares en animales ayunados. Sin embargo al analizar lo que ocurría en animales alimentados con una dieta rica en carbohidratos y pobre en grasas (43) encuentran que no son válidas las relaciones cercanas al equilibrio definidas previamente, incrementándose los intermediarios del ciclo unas 25 veces respecto a los observados en animales ayunados, concluyendo que el incremento en la actividad de los enzimas oxidativos del ciclo en ausencia de cambios en la porción no oxidativa contribuía al desequilibrio observado en estos animales.

Los trabajos del grupo de Blum (44,45), en los que se cuantifica el flujo a través de la ruta gluconeogénica, glucolítica y ciclo de las pentosas fosfato en diferentes situaciones en hepatocitos aislados e incubados con una mezcla de diversos sustratos, demuestran que la ribosa puede servir como sustrato gluconeogénico (44), contribuyendo este ciclo al flujo gluconeogénico total al menos en un 15% bajo sus condiciones de estudio (45).

Más recientemente, Schuster et al. (46) estudian la interrelación entre glucolisis, ciclo de las pentosas fosfato y el sistema del glutation en eritrocitos siguiendo un modelo matemático. Estos autores predicen para in vivo que: i) bajo condiciones normales, glucolisis y ciclo de las pentosas fosfato son regulados independientemente por la carga energética y oxidativa respectivamente. ii) se produce un fuerte acoplamiento de ambas rutas si existe una carga oxidativa elevada, siendo la hexoquinasa la que controla ambas vías. y iii) existen puntos de bifurcación en los estados estacionarios en condiciones de baja y alta carga energética. También demuestran una clara disminución de la carga oxidativa tolerable para la célula cuando la carga energética es alta y viceversa, de forma que defectos en enzimas glucolíticos conectados con desórdenes en el metabolismo energético ejercen influencia sobre la velocidad del flujo a través del ciclo y así a través del sistema del glutation.

También se ha descrito como la concentración de metabolitos del ciclo, puede modular el flujo glucolítico regulando enzimas específicos como la piruvato quinasa (47) y la fosfofructoquinasa (48). Smith y Freedland (1979) (47) estudiando el efecto del 6-fosfogluconato sobre la piruvato quinasa de hepato-

cidos, músculo esquelético, corazón, cerebro y epidídimo, encuentran una estimulación de su actividad afectándose en mayor medida en animales alimentados con dieta rica en sacarosa y menos en los ayunados. Estos autores concluyen que durante la síntesis de ácidos grasos, este intermediario puede actuar como un nexo importante en el control armónico del ciclo de las pentosas fosfato y la porción inferior de la ruta glucolítica.

*Regulación de la actividad del ciclo de las pentosas fosfato por mecanismos oxidativos reguladores del pool intracelular de NADPH.*

La constancia del almacén intracelular de NADPH es sorprendente, teniendo en cuenta que este coenzima es utilizado a alta velocidad para la monoxigenación, reducción del glutatión oxidado (GSSG) y síntesis de ácidos grasos y colesterol (49,59). Además de la regulación de la velocidad del ciclo por parte de mecanismos dietarios y hormonales relacionados con procesos biosintéticos, bajo este nuevo epígrafe se engloba la modulación e interdependencia entre un amplio conjunto de procesos oxidativos y el ciclo de las pentosas fosfato que actúa como verdadero suministrador de NADPH utilizado por el sistema glutatión peroxidasa/reductasa y otros sistemas enzimáticos encargados no sólo de contrarrestar el efecto oxidativo de estos procesos sino también de mantener la integridad celular, por ellos ampliamente amenazada.

En este sentido, las enfermedades conocidas como distrofias musculares se caracterizan por daños celulares cuyo mecanismo exacto aún no está conocido (51). Entre las teorías que lo explican, están las que suponen que la causa es la alta toxicidad de especies activadas del oxígeno en virtud de sus fuertes propiedades oxidativas (peroxidación de lípidos de membrana, inactivación de enzimas con grupos sulfrídilos, polimerización de proteínas, inhibición de la reparación del ADN, etc.) (52,53); estas especies se producen durante la reducción secuencial de moléculas de oxígeno. Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, son sistemas enzimáticos de detoxificación que protegen a las células de los daños producidos por estos radicales (54). Mizuno (51) encuentra que en estadios tempranos del desarrollo de pollos distróficos existen incrementos en la actividad G6PDH y 6PGDH paralelamente a incrementos en niveles de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. Interpretándose como un aumento en la capacidad de turnover de radicales de oxígeno en estos animales.

Shichi et al. (55) estudiando la actividad del ciclo en condiciones de estrés oxidativo (efecto del t-butyl hidroperóxido, TBHP) en el cuerpo ciliar bovino, encuentra una alta capacidad regeneradora del almacén de NADPH por el ciclo de las pentosas fosfato. En este mismo sentido, los trabajos de Rush y Alberts (56) demuestran que el NADPH aportado por la ruta puede ser un importante componente de la actividad de los hepatocitos para resistir los daños inducidos por estrés oxidativo generado a partir del TBHP, ya que animales tratados con 6-aminonicotinamida (potente inhibidor de la 6PGDH) fueron

más susceptibles de daños celulares inducidos por TBHP que hepatocitos controles.

Schuster et al. (46) siguiendo un modelo matemático predicen que en condiciones de alta carga energética y oxidativa, la carga oxidativa máxima que pueden soportar las células sin que se produzcan daños es mucho menor que en condiciones normales, existiendo una estrecha relación entre rutas energéticas y ciclo de las pentosas fosfato.

Las oxidaciones de función mixta son otro grupo de reacciones que funcionan con NADPH como cofactor, su misión es la de crear grupos hidroxilos en la desintoxicación frente a drogas, o bien introducir dobles enlaces en la formación de ácidos grasos insaturados. Aunque en hepatocitos intactos, algunos estudios han demostrado que el NADPH puede limitar la oxidación de función mixta (57,58), Junge y Brand (59) proponen que el aporte de NADPH vía ciclo de las pentosas fosfato excede las necesidades de la oxidasa de función mixta en el metabolismo de drogas. En este mismo sentido Kauffman et al. (60) en animales alimentados, observan que los niveles de NADPH citosólico permanecen constantes o ligeramente incrementados de acuerdo con la idea anterior. Belinsky et al. (61) observan que inhibiendo casi completamente el ciclo de las pentosas fosfato con 6-aminonicotinamida no se altera la velocidad de oxidación de función mixta, concluyendo que los equivalentes de reducción para esta reacción no son suministrados por este ciclo en estas condiciones, sino por reacciones de transhidrogenación mitocondrial.

#### *Ciclo de las pentosas fosfato y procesos de crecimiento y proliferación celular.*

Los procesos de crecimiento y proliferación celular se caracterizan por la demanda de constituyentes celulares implicados en la síntesis de nuevas macromoléculas correlacionándose todos estos procesos con un aumento en la síntesis de ácidos nucleicos y demás componentes celulares que van a sostener en última instancia este amplio grupo de reacciones. En los últimos años se está reconociendo una fuerte relación entre los niveles del ciclo de las pentosas fosfato y este tipo de procesos poniéndose de manifiesto claramente el papel que juega esta ruta como suministrador de metabolitos en relación con el resto del metabolismo celular.

Por un lado se ha demostrado que el aporte de ribosa 5-fosfato es imprescindible para abastecer el exceso de demanda de bases púricas en estos procesos de proliferación celular. Pilz et al. (62) ponen de manifiesto la fuerte relación existente entre la producción de ribosa 5-fosfato y las concentraciones de fosforribosilpirofosfato y purinas en cultivos de linfoblastos estimulados con un mitógeno. Estos autores encuentran que las concentraciones intracelulares de ribosa 5-fosfato pueden ser determinantes de la velocidad de síntesis de novo de purinas y por lo tanto del crecimiento de estas células.

De la misma forma, se ha relacionado el aumento en la actividad de la G6PDH y 6PGDH con el exceso de producción de colesterol existente en estos



procesos. Es bien conocido que la biosíntesis de colesterol está implicada en la proliferación celular, tanto es así, que tejidos como el intestino, muy proliferativos, presentan altos niveles de síntesis de colesterol, mientras que órganos como el riñón, con poco recambio celular, esta síntesis es prácticamente inexistente (63). Además de su necesidad en la formación de nuevas membranas, el colesterol o algún intermediario de su metabolismo juega un papel importante en la regulación de la síntesis de ADN (63,64) y por tanto en el crecimiento celular.

Recientes trabajos han demostrado un aumento en la síntesis de colesterol en hiperplasias hepáticas inducidas (65) relacionado con un incremento en las actividades G6PDH y 6PGDH y un incremento en la incorporación de timidina marcada al ADN concluyendo que el ciclo del fosfogluconato juega un importante papel en esta situación como suministrador de desoxirribosa y NADPH.

Otro enzima que se encuentra activado en presencia de crecimiento y proliferación es la ornitín decarboxilasa (66), cuyo producto inmediato, la putrescina, puede restaurar completamente los bajos niveles de G6PDH causados por una dieta deficiente en piridoxina, pudiendo actuar también a este nivel en procesos de crecimiento.

También se ha encontrado una estrecha relación entre el aumento del flujo de glucosa a través del ciclo y procesos de hipertrofia renal producidos en la diabetes experimental inducida por streptozotocina y alloxan (67,68). Incrementos que según el comportamiento cinético de G6PDH y 6PGDH parecen ser debidos a un aumento en la cantidad de enzima existente (68).

## AGRADECIMIENTOS.-

J. Peragón es becario del P.F.P.I. de la Junta de Andalucía.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Horecker, B.L., Smyrniotis, D.Z. & Seegmiller, J.E. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 383-396.
- (2) Horecker, B.L., Gibbs, M., Klenow, H. & Smyrniotis, D.Z. (1954). *J. Biol. Chem.* 207, 393-403.
- (3) Gibbs, M. & Horecker, B.L. (1954). *J. Biol. Chem.* 208, 813-820.
- (4) Williams, J.F., Clark, M.G. & Blackmore, P.F. (1978). *Biochem. J.* 176, 241-256.
- (5) Williams, J.F., Blackmore, P.F. & Clark, M. (1978). *Biochem. J.* 176, 257-282.
- (6) Williams, J.F. (1980). *Tibs* 5, 315-320.
- (7) Williams, J.F., Clark, M.G., Arora, K.K. & Reichstein, I.C. (1984). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365, s. 1425-1434.
- (8) Williams, J.F., Blackmore, P.F. & Arora, K.K. (1985). *Biochem. Int.* 11, 599-610.
- (9) Rongstad, R., Wals, P. & Katz, J. (1982). *Biochem. J.* 208, 851-855.
- (10) Scofield, R.F., Kosugi, K., Chandramovli, V., Kumaran, K., Schumann, W.C. & Landau, B.R. (1985). *J. Biol. Chem.* 260, 15439-15444.
- (11) Eggleston, L.V. & Krebs, H.A. (1974). *Biochem. J.* 138, 425-435.
- (12) Gumaa, V.A., McLean, P. & Greenbaum, A.L. (1971). *Essays in Biochemistry.* 7, 39-86.
- (13) Soldin, S.J. & Balinsky, D. (1968). *Biochemistry* 7, 1077-1083.

- (14) Olive, C., Gerock, M.E. & Levy, H.R. (1971). *J. Biol. Chem.* 246, 2047-2053.
- (15) Villet, R.H. & Dalziel, K. (1969). *Biochem. J.* 115, 633-638.
- (16) Rutter, W.J. & Lardy, H.A. (1958). *J. Biol. Chem.* 233, 374-382.
- (17) Villet, R.H. & Dalziel, K. (1972). *Eur. J. Biochem.* 27, 251-258.
- (18) Topham, M. & Dalziel, K. (1986). *Biochem. J.* 234, 671-677.
- (19) Topham, C.M., Matthews, B. & Dalziel, K. (1986). *Eur. J. Biochem.* 156, 555-567.
- (20) Dallochio, F., Matteuzzi, M. & Bellini, T. (1981). *J. Biol. Chem.* 256, 10778-10780.
- (21) Dallochio, F., Matteuzzi, M. & Bellini, T. (1985). *Biochem. J.* 227, 305-310.
- (22) Taketa, K. & Watanabe, A. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 235, 19-26.
- (23) Holten, D. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 268, 4-12.
- (24) Chang, H., Holten, D. & Karin, R. (1979). *Can. J. Biochem.* 57, 396-401.
- (25) Bonsignore, A. & De FLORA, A. (1972). *Current Topics in Cellular Regulation.* 6, 21-56.
- (26) Hizi, A. & Yagil, G. (1974). *Eur. J. Biochem.* 45<sup>7</sup>, 201-209.
- (27) Martins, R.N., Stokes, G.B. & Masters, C.L. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 127, 136-142.
- (28) Dao, M.L., Watson, J.J., Delaney, R. & Johnson, B.C. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 9441-9447.
- (29) Cohen, P. & Rosemeyer, M.A. (1969). *Eur. J. Biochem.* 8, 8-13.
- (30) Ratazzi, M.C. (1968). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 31, 16-21.
- (31) Wrigley, N.G., Heather, J.V., Bonsignore, A. & De Flora, A. (1972). *J. Mol. Biol.* 68, 483-494.
- (32) Bonsignore, A., Lorenzoni, I., Cancedda, R., Cosulich, M.E. & De Flora, A. (1971). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42, 159-166.
- (33) Levy, H.R., Ingulli, J. & Afolayan, A. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 3745-3748.
- (34) Haghghi, B., Flynn, T.G. & Levy, H. R. (1982). *Biochemistry.* 21, 6415-6417.
- (35) Bellini, T., Signorini, M., Dallochio, F. & Rippa, M. (1979). *Biochem. J.* 183, 297-301.
- (36) Domschke, W., Von Hinveber, C. & Domagk, G.F. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* 207, 485-489.
- (37) Topham, M. & Dalziel, K. (1986). *Eur. J. Biochem.* 155, 87-94.
- (38) Pai, G.S., Sprengle, J.A., Do, T.T., Mareni, C.E. & Migeon, B.R. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 2810-2813.
- (39) Show, C.R. & Barto, E. (1965). *Science* 148, 1099-1100.
- (40) Beutler, E. & Morrison, M. (1967). *J. Biol. Chem.* 242, 5289-5293.
- (41) Tarizawa, T., Huang, I., Ikuta, T. & Yoshida, A. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4157-4161.
- (42) Casazza, J.P. & Veech, R.L. (1986). *J. Biol. Chem.* 261, 690-698.
- (43) Casazza, J.P. & Veech, R.L. (1986). *Biochem. J.* 236, 635-644.
- (44) Crawford, J.M. & Blum, J.J. (1983). *Biochem. J.* 212, 595-598.
- (45) Rabkin, M. & Blum, J.J. (1985). *Biochem. J.* 225, 761-786.
- (46) Schuster, R., Holzhütter, H. & Jacobasch, G. (1988). *BioSystems* 22, 19-36.
- (47) Smith, S.B. & Freedland, R.A. (1979). *J. Biol. Chem.* 254, 10644-10648.
- (48) Sommercorn, J., Steward, T. & Freedland, R.A. (1984). *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 579-584.
- (49) Conway, J.G., Kauffman, F.C. & Thurman, R.G. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 3825-3831.
- (50) Krebs, H.A. & Eggleston, L.V. (1972). *Biochem. J.* 137, 425-435.
- (51) Mizuno, Y. (1985). *J. Neurol. Sci.* 68, 47-60.
- (52) Freeman, B.A. & Crapo, J.D. (1982). *Lab. Invest.* 47, 312-426.
- (53) Halliwell, B. & Gutteridge, M.C. (1984). *Biochem. J.* 219, 1-14.
- (54) Fridovich, I. (1984). *Adv. Enzymol.* 41, 35-97.
- (55) Shichi, H., Hodder, W.A. & Giblin, F.J. (1986). *J. Ocular Pharmacol.* 2, 59-66.
- (56) Rush, G.F. & Alberts, D. (1986). *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* 85, 324-331.
- (57) Thurman, R.G., Marazzo, D.P., Jones, L.S. & Kauffman, F.C. (1977). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 201, 498-506.
- (58) Moldeus, P., Grundin, R., Vadi, H. & Orrenius, S. (1974). *Eur. J. Biochem.* 46, 351-360.

- (59) Junge, O. & Brand, K. (1975). *Arch. Biochem. Biophys.* 171, 398-406.
- (60) Kauffman, F.C., Evans, R.K., Reinke, L.A. & Thurman, R.G. (1979). *Biochem. J.* 184, 675-681.
- (61) Belinsky, S.A., Reinke, L.A., Scholz, R., Kauffman, F.C. & Thurman, R.G. (1985). *Molecular Pharmacology* 28, 371-376.
- (62) Pilz, R.B., Willis, R.C. & Boss, G.R. (1984). *J. Biol. Chem.* 259, 2927-2935.
- (63) Siperstein, M.D. (1984). *J. Lipid. Res.* 25, 1462-1468.
- (64) Quesney-Huneeus, V., Galick, H.A., Siperstein, M.D., Erickson, S.K., Spencer, T.A. & Nelson, J.A. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 378-385.
- (65) Ledda-Columbano, G.M., Columbano, A., Dessi, S., Coni, P., Chiodino, C. & Pani, P. (1985). *Carcinogenesis* 6, 1371-1373.
- (66) Dodds, R.A., Dunhan, J., Bitensky, L. & Chayen, J. (1986). *Febs* 201, 105-108.
- (68) Pérágon, J., Aranda, F., García-Salguero, L. & Lupiáñez, J.A. (1989). *Int. J. Biochem.* 21, 689-694.  
prensa.