

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**HEXOQUINASAS DE CEPA SILVESTRE Y MUTANTES
MORFOLOGICAS DE *Neurospora crassa***

TESIS DE PRUEBA PARA OPTAR AL
GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA.

ROSA ALBA LAGOS MONACO

DIRECTOR DE TESIS: DR. TITO URETA

SANTIAGO - CHILE - 1978

A mi madre

A mis hermanos

A mis amigos

Mi eterno agradecimiento al Dr. Tito Ureta por su gran paciencia y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco las facilidades, interés y ayuda prestadas por la Dra. Alicia Carrasco y el Dr. Guido Pincheira.

Finalmente, agradezco al Dr. Hermann Niemeyer y a todos los miembros del laboratorio por brindarme la oportunidad de convivir con ellos en un ambiente crítico y estimulante.

INDICE

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCION	4
MATERIALES Y METODOS	
-Reactivos	7
-Cepas y cultivo de <i>Neurospora crassa</i>	8
-Preparación del extracto de <i>Neurospora crassa</i>	8
-Detección de la actividad enzimática	9
-Separación cromatográfica de las isoenzimas	11
-Determinación del peso molecular de las isoenzimas	12
-Preparación de anticuerpo antihexoquinasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y su reacción con hexoquinasas de <i>Neurospora crassa</i>	12
-Preparación y experimentos con antihexoquinasa de levadura unida a Sepharosa	13
RESULTADOS	
-Separación cromatográfica de las isoenzimas	15
-Caracterización cinética de las isoenzimas	15
-Peso molecular de las isoenzimas	18
-Niveles totales de actividad y perfiles isoenzimáticos de hexoquinasa durante el crecimiento de <i>Neurospora crassa</i>	21
-Perfil isoenzimático de hexoquinasas de <i>Neurospora crassa</i> cultivada en distintas fuentes de carbono	24
-Perfil isoenzimático de hexoquinasa de mutantes morfológicas de <i>Neurospora crassa</i>	26
-Perfil isoenzimático de hexoquinasa de la cepa sil-tre 77a cultivada en presencia de sorbosa	29
-Reacción de las hexoquinasas de <i>Neurospora crassa</i> con antihexoquinasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
DISCUSION	
-Formas múltiples de hexoquinasas de <i>Neurospora crassa</i>	35
-Hexoquinasas de <i>Neurospora crassa</i> y su relación con hexoquinasas de vertebrados	36
-Hexoquinasas de <i>Neurospora crassa</i> durante el crecimiento, cultivada en diferentes fuentes de carbono, y en presencia de sorbosa	37

-Hexoquinasas de mutantes morfológicas de <i>Neurospora crassa</i>	39
-Relación entre las hexoquinasas de <i>Neurospora crassa</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y otros microorganismos. Origen de las isoenzimas	40
-Proyecciones futuras	43
REFERENCIAS	44

RESUMEN

Se aislaron por cromatografía en DEAE-celulosa cuatro hexoquinasas de *Neurospora crassa* que se han denominado provisoriamente α , β , γ y δ . Son similares a las hexoquinasas A y B de vertebrados en cuanto a peso molecular y a sus constantes de Michaelis para glucosa, otros azúcares y ATP. Sin embargo no presentan inhibición por glucosa-6-P.

En la cepa silvestre los niveles totales de actividad de hexoquinasa, como también la proporción relativa de las isoenzimas, presentan variaciones de tipo cuantitativo durante el crecimiento del hongo. El perfil isoenzimático no varió en cultivos que contenían sacarosa, fructosa, glucosa o casaminoácidos como única fuente de carbono. El cultivo de la cepa silvestre en presencia de sorbosa y sacarosa modifica las proporciones relativas de las hexoquinasas.

Algunas mutantes morfológicas de *Neurospora crassa* presentan perfiles isoenzimáticos cualitativa y cuantitativamente diferentes a los de las cepas silvestres estudiadas.

Las hexoquinasas γ y δ presentan reacción inmunológica cruzada con las hexoquinasas de *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Four *Neurospora crassa* hexokinases (α , β , γ and δ) have been isolated by DEAE-cellulose chromatography. The molecular weights, K_m values for glucose, other sugars and ATP of these isozymes are similar to the corresponding values of the hexokinases A and B of vertebrates. The isozymes are not inhibited by glucose-6-P.

Wild type total levels of hexokinase activity and the relative proportions of each isozyme display quantitative variations during growth of the fungus. The isozymic pattern did not vary in cultures containing sucrose, fructose, glucose or casaminoacids as the sole carbon source. Growth in the presence of sorbose plus sucrose results in changes of the relative proportions of the wild type hexokinases.

Some morphological mutants of *Neurospora crassa* present qualitative and quantitative differences of the isozymic pattern compared to the wild type pattern.

Hexokinase γ and δ present immunological cross-reaction with the hexokinase from *Saccharomyces cerevisiae*.

ABREVIATURAS

ADP	: Adenosina 5' difosfato.
ATP	: Adenosina 5' trifosfato.
DEAE-celulosa	: Dietilaminoetil-celulosa.
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético.
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminometano.
NAD ⁺	: Nicotinamida-adenina-dinucleótido.
NADH	: Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido.
NADP ⁺	: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato.
NADPH	: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido.
PEP	: Fosfoenolpiruvato.

INTRODUCCION

Hexoquinasa (ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa, E.C.2.7.1.1.) cataliza la primera reacción de la utilización de glucosa:



En hígado de rata se han descrito cuatro isoenzimas capaces de fosforilar glucosa que se han denominado A, B, C y D de acuerdo a su orden de elución cromatográfica en columnas de DEAE-celulosa (1).

Las isoenzimas A y B presentan cinética michaeliana típica con valores de K_m para glucosa de 0,044 y 0,130 mM respectivamente (2). La isoenzima C es inhibida por concentraciones altas de sustrato y su K_m es de 0,02 mM glucosa (3). Estas tres isoenzimas fosforilan otras hexosas además de glucosa y sus pesos moleculares son cercanos a 100.000 (4). La isoenzima D o glucoquinasa presenta un $K_{0,5}$ de 8 mM glucosa y su especificidad de sustrato es más restringida (5). Su función de saturación frente a glucosa es sigmoideal con un coeficiente de Hill de 1,5 (6). La glucoquinasa es una enzima inducible pudiéndose alterar sus niveles por influencia de la cantidad y calidad de la dieta y por modificación del status hormonal de los animales (7,8,9,10).

Se han hecho estudios ontogenéticos en hexoquinasas de hígado de rata, observándose una aparición secuencial de las isoenzimas durante el desarrollo post-natal (11).

En hígado de vertebrados existen un mínimo de dos y un máximo de cuatro isoenzimas capaces de fosforilar glucosa. Las diferencias cualitativas y cuantitativas en el perfil isoenzimático de hexoquinasa pueden correlacionarse con la clase y orden a los cuales pertenecen los diferentes animales hasta ahora estudiados. Estas cuatro isoenzimas parecen ser producto de genes diferentes y posiblemente cada isoenzima estaría constituida por una cadena polipeptídica (2).

Sin embargo, las hexoquinasas de microorganismos (12,13,14) han sido poco estudiadas con excepción de *Saccharomyces cerevisiae*. En este organismo se han descrito dos formas de hexoquinasas denominadas P I y P II (15) con una K_m para glucosa de 0,3 y 0,6 mM respectivamente. Ambas hexoquinasas pesan 100.000 y son formas diméricas constituidas por subunidades idénticas. Existe además una glucoquinasa (16,17) llamada así porque su cociente de fosforilación fructosa/glucosa es muy bajo en comparación con el de las hexoquinasas P I y P II.

La actividad de hexoquinasa en *Neurospora crassa* ha sido descrita por Klingmuller *et al.* (18) y por Medina y Nicholas (19,20) quienes encontraron actividad fosforilante de glucosa y otros azúcares como manosa, fructosa y glucosamina. Sin embargo no se ha estudiado la posibilidad de formas moleculares múltiples de esta actividad enzimática.

Además del interés por un conocimiento mejor de la etapa de fosforilación de glucosa en *Neurospora* para su comparación

con otros microorganismos, este hongo presenta cualidades particulares para estudiar las bases moleculares de la multiplicidad de enzimas. Existe una gran variedad de mutantes con alteraciones genéticas de tipo morfológico y bioquímico que están asignadas a loci específicos. Es posible encontrar mutantes que tengan alterada la expresión de las hexoquinasa y éstas pueden ser de gran utilidad para el conocimiento de la genética de las isoenzimas de hexoquinasa de *Neurospora*.

Aislamos cuatro isoenzimas de *Neurospora crassa*, caracterizándolas en cuanto a su conducta durante el crecimiento y a su expresión en mutantes morfológicas. También fueron caracterizadas en forma preliminar sus propiedades cinéticas y fisicoquímicas.

Algunos de estos resultados fueron presentados en la XX Reunión de la Sociedad de Biología de Chile (Lagos y Ureta, 1977).

MATERIALES Y METODOS

Reactivos.

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, USA: ADP, ATP, NADP^+ , NADH, EDTA, PEP, Tris, glicina, sorbosa, glucosa, fructosa, manosa, 2-desoxiglucosa, fenilmetilsulfonil fluoruro, citocromo c tipo III, ovoalbúmina, alcohol-deshidrogenasa de hígado de caballo, fosfoglucoasa isomerasa de levadura, lactato-deshidrogenasa de músculo de conejo conteniendo piruvato-quinasa, glucosa-6-P-deshidrogenasa de levadura tipo VII y hexoquinasa de levadura tipo 302.

Sacarosa, arena de mar purificada, KCl, NaCl, MgCl_2 , HCl, NaHCO_3 y $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ se obtuvieron de laboratorios Merck.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ grado especial para trabajar con enzimas, se obtuvo de laboratorios Schwartz Mann.

DEAE-celulosa (DE-52) de Whatman, fue tratada de acuerdo a las instrucciones del catálogo Whatman.

Sephadex G-200 y Sepharosa 4B CNBr se obtuvieron de Pharmacia Fine Chemical, y fueron tratados de acuerdo a los catálogos e instrucciones del fabricante.

DL- Leucina 1C^{14} (0,5 mci/mg) se obtuvo de New England Nuclear.

Los demás reactivos usados eran de grado analítico.

Cepas y cultivo de Neurospora crassa.

Se emplearon las siguientes cepas de *Neurospora* provenientes de la colección de stocks Rockefeller: cepas silvestres 77a (St. Lawrence) y RL 3-8A (FGSC N° 2218), y las mutantes morfológicas *crisp-1a* (FGSC N° 488) grupo de ligamiento I, *frost-a* (FGSC N° 102) grupo de ligamiento I, *dapple-A* (FGSC N° 1077) grupo de ligamiento II, *col-16a* (FGSC N° 1348) grupo de ligamiento III y *dingy-A* (FGSC N° 64) grupo de ligamiento IV.

Se cultivó *Neurospora* en medio mínimo líquido Vogel 2% (21), sacarosa 2%, a partir de un inóculo de conidios. Otras fuentes de carbono empleadas en vez de sacarosa fueron glucosa, fructosa o casaminoácidos en concentraciones del 2%. También se cultivó *Neurospora* en medio líquido que contenía 0,5% sacarosa, 1,5% sorbosa y 2% Vogel. El cultivo de *Neurospora* se hacía en matraces Erlenmeyer de 125 o 250 ml con agitación a velocidad constante (80 rotaciones/minuto) a 25°C durante el tiempo requerido.

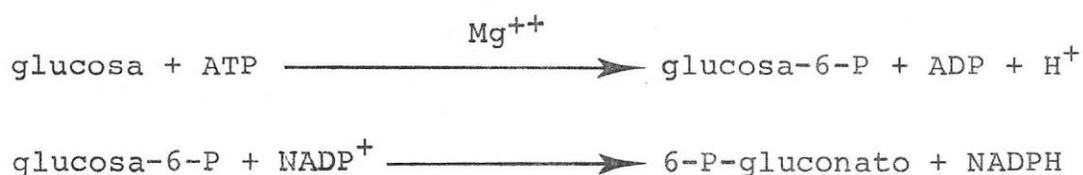
Preparación del extracto de Neurospora crassa.

El micelio de *Neurospora* cultivado en medio líquido se filtra y lava varias veces con agua destilada succionada a través de un embudo Buchner provisto de papel filtro Whatman 1. Se eliminaba el exceso de agua del micelio con papel absorbente. El material se pesaba, se adicionaba un peso igual de arena de mar purificada y se molía en un mortero previamente enfriado. El homogeneizado 25% p/v con buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, se centrifugaba a 105.000 g durante 60 minutos en

una ultracentrífuga Spinco obteniéndose un líquido sobrenadante el que se utilizaba en etapas posteriores.

Detección de la actividad enzimática.

La detección de la actividad fosforilante de glucosa se realizó espectrofotométricamente por aumento de la absorbancia a 340 nm acoplando la reacción al sistema glucosa-6-P-deshidrogenasa-NADP⁺ (22).



La formación de NADPH se reconoce por el aumento de la absorbancia a 340 nm. Se utilizó un espectrofotómetro Zeiss modelo PMQ II conectado con un registrador Servogor RE 511 y a un sistema para mantener la temperatura a 30°C.

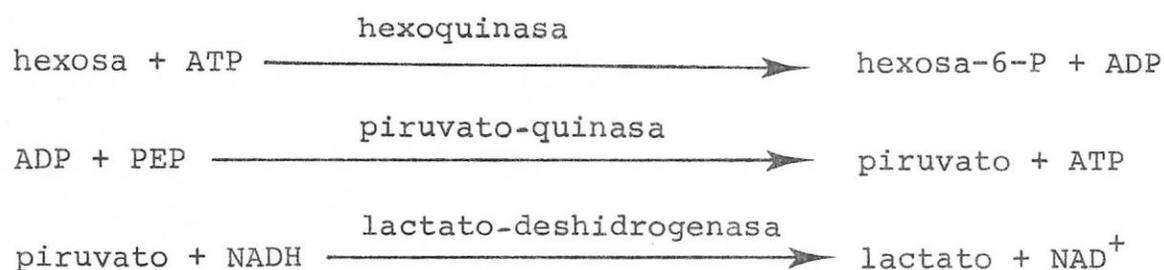
La mezcla del ensayo de reacción contenía en un volumen total de 0,5 ml: 84 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,6 mM EDTA, 12,6 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 0,5 mM NADP⁺, 0,1 unidades de glucosa-6-P-deshidrogenasa, glucosa y la enzima a medir. La concentración de glucosa usada dependía del propósito experimental: 0,5 mM en la medición de actividad de las columnas, 10 mM en los experimentos con anticuerpos y 100 mM en la medición de la actividad total de los líquidos sobrenadantes. Se iniciaba la reacción adicionando ATP. Se usaba como blanco una mezcla similar a la cual no se agregaba ATP.

Para medir fosforilación de fructosa se sustituía la glu-

cosa por fructosa y se añadía a la mezcla 0,1 unidad de fosfoglucosaisomerasa.

Se define la unidad de enzima como la cantidad capaz de fosforilar 1 μmol de glucosa por minuto a 30°C. Se usó el valor de $6,22 \times 10^6$ como coeficiente de extinción molar de NADH (23).

Ocasionalmente se usó un segundo tipo de ensayo para estudiar la especificidad de sustrato de las isoenzimas (24):



Las constantes de equilibrio favorecen la formación de lactato. Se medía la desaparición de absorbancia a 340 nm al oxidarse el NADH, en un espectrofotómetro Gilford modelo 2400 adicionado a un sistema para mantener la temperatura a 30°C. El medio de ensayo donde se realizaba la reacción contenía en un volumen total de 0,5 ml: 74,5 mM Tris-HCl pH 7,5, 10,8 mM EDTA, 5 mM ATP, 0,7 mM PEP, 0,15 mg NADH, 0,2 unidades de lactato-deshidrogenasa-piruvato-quinasa, hexosa y enzima. La reacción se iniciaba adicionando la enzima. Los controles no contenían hexosa. Puesto que el ensayo mide la formación de ADP, y las preparaciones comerciales de ATP suelen tener un 2% de ADP, se preincubó una mezcla que contenía las enzimas auxiliares, PEP y ATP para eliminar el ADP contaminante.

Separación cromatográfica de las isoenzimas.

Para estudiar el perfil isoenzimático de hexoquinasa de *Neurospora* se cromatografiaban alícuotas del líquido sobrenadante de 105.000 g en columnas de DEAE-celulosa, equilibradas en buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,0, EDTA 1 mM. Se usaron columnas de tamaños variables según la cantidad de material que se deseaba procesar. En la columna A (0,5 x 10,5 cm) se cromatografiaron líquidos sobrenadantes de 105.000 g correspondientes a 25 mg de micelio de *Neurospora*. La separación de las isoenzimas se hizo mediante un gradiente cóncavo entre 0 y 0,5 M KCl con un volumen total de 60 ml. Se recogieron fracciones de 0,31 ml por tubo en un microfraccionador Gilson. En estas columnas se separaron las hexoquinasas de *Neurospora* cultivada durante diferentes tiempos, de mutantes morfológicas y de cepa silvestre cultivada en diferentes fuentes de carbono.

En la columna B (0,8 x 18,5 cm) se aplicaron cantidades variables de muestra. Las isoenzimas se separaban con un gradiente cóncavo entre 0 y 0,5 M KCl con un volumen total de 270 ml. Se colectaban 1,4 ml por tubo. Se recromatografiaron cada una de las isoenzimas en estas mismas condiciones para caracterizarlas cinéticamente.

La conductividad se medía en un conductímetro Radiometer tipo CDM 2f y los resultados se convirtieron en concentración de KCl mediante una curva patrón.

Determinación del peso molecular de las isoenzimas.

La estimación del peso molecular se realizó en una columna de Sephadex G-200 (25) de 2,5 x 35 cm, equilibrada en buffer Tris-HCl pH 7,0, EDTA 1 mM y KCl 200 mM. Se usaron los siguientes marcadores de peso molecular: citocromo c: 13.000, ovoalbúmina: 45.000, alcohol-deshidrogenasa de hígado de caballo: 80.000, inmunoglobulina de conejo: 150.000. Se usó Azul Dextrano para medir el volumen de exclusión y Leucina C¹⁴ para el volumen interno. En la columna calibrada se filtró una muestra de líquido sobrenadante de 105.000 g correspondiente a 62 mg de peso húmedo de *Neurospora*. Se colectaron fracciones de 1,5 ml por tubo.

Preparación de anticuerpo antihexoquinasa de Saccharomyces cerevisiae y su reacción con hexoquinasas de Neurospora crassa.

Se preparó un antisuero antihexoquinasa cristalina de levadura comercial (que contenía las formas P I y P II) por inyección de 2 mg de preparación con coadyuvante de Freund completo en conejo. Con intervalos de 9 días se aplicaron dos inyecciones adicionales de 2 mg de enzima con coadyuvante incompleto. Una semana después de la última inyección se desangró el conejo por punción cardíaca. Se extrajo el suero por centrifugación a 4.000 g durante 10 minutos luego de haber incubado la sangre a temperatura ambiente por 2 horas y a 4°C por el mismo tiempo. Se aislaron las gamma globulinas del suero por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 33% (26). Las gamma globulinas

se filtraron en Sephadex G-200 y se reprecipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Concentraciones variables del anticuerpo así obtenido se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y 15-20 horas a 4°C con hexoquinasa de levadura y *Neurospora*, midiéndose la actividad remanente y comparándolas con preparaciones incubadas con suero de conejo no inyectado.

Preparación y experimentos con antihexoquinasa de levadura unida a Sepharosa.

Se lavó 1 g de Sepharosa 4B activada con CNBr en un filtro de vidrio con HCl 1 mM. Gamma globulina de conejos inyectado y normal (40 mg) en buffer acoplante (NaCO_3 100 mM, NaCl 500 mM) se mezcló con la resina activada en un tubo con agitación continua por inversión durante 12 horas a 4°C (27). Posteriormente se lavó el inmunoadsorbente con el buffer acoplante y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas con buffer H_3BO_3 90 mM, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 27,5 mM, pH 8,6, 1 M glicina para eliminar proteínas adsorbidas no covalentemente.

Columnas de 1 ml de inmunoadsorbente antihexoquinasa y control se equilibraron en buffer borato (H_3BO_3 90 mM, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 27,5 mM, NaCl 500 mM, pH 8,6). Se hacía entrar en estas columnas una alícuota entre 0,2 y 0,4 ml de hexoquinasa de levadura o *Neurospora*, y se dejaba incubando 30 minutos a 4°C . La enzima no adsorbida se eluía con buffer borato y se determinaba su actividad. La proteína unida al inmunoadsorbente se

se eliminaba pasando KCNS 4 M por la columna y lavando exhaustivamente con buffer borato.

RESULTADOS

Separación cromatográfica de las isoenzimas.

La actividad hexoquinásica de la cepa silvestre 77a se separa por cromatografía en DEAE-celulosa en cuatro picos de actividad que hemos denominado α , β , γ y δ (Fig. 1). Los mismos picos de actividad pueden detectarse en extractos provenientes de la cepa silvestre RL 3-8A (no se muestra). Asimismo, se ha logrado la separación cromatográfica de las cuatro formas de actividad hexoquinásica en experimentos (no se muestra) en los cuales todas las soluciones empleadas contenían fenilmetilsulfonil fluoruro 1 mM, compuesto que es inhibidor de proteasas dependientes de serina. Estos resultados sugieren que las formas moleculares múltiples de hexoquinasa de *Neurospora* no serían producto de la acción de este tipo de proteasas. Por otra parte, los picos de actividad se recromatografiaron separadamente en columnas de DEAE-celulosa observándose en cada caso sólo un pico de la actividad de hexoquinasa en la posición esperada (no se muestra).

Consideraremos por el momento estas formas moleculares múltiples como isoenzimas postergando para el capítulo de Discusión los argumentos acerca de la propiedad del término.

Caracterización cinética de las isoenzimas.

Las cuatro isoenzimas presentan cinética michaeliana típica (Fig. 2), sin inhibición por exceso de sustrato o funciones sigmoidales de saturación como en algunas hexoquinasas de

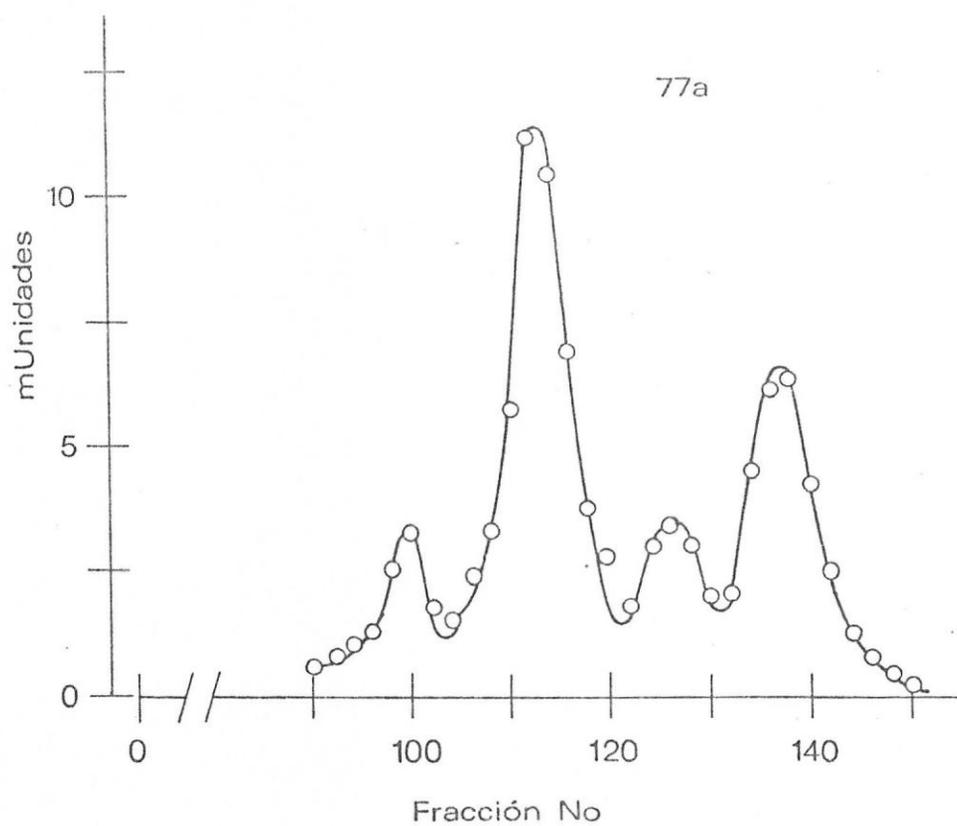


Figura 1. Separación cromatográfica de las hexoquinasas de *Neurospora crassa*. Una alícuota de líquido sobrenadante correspondiente a 0,1 g de peso húmedo de micelio, se cromatografió en la columna B de DEAE-celulosa según está descrito en el capítulo de Materiales y Métodos.

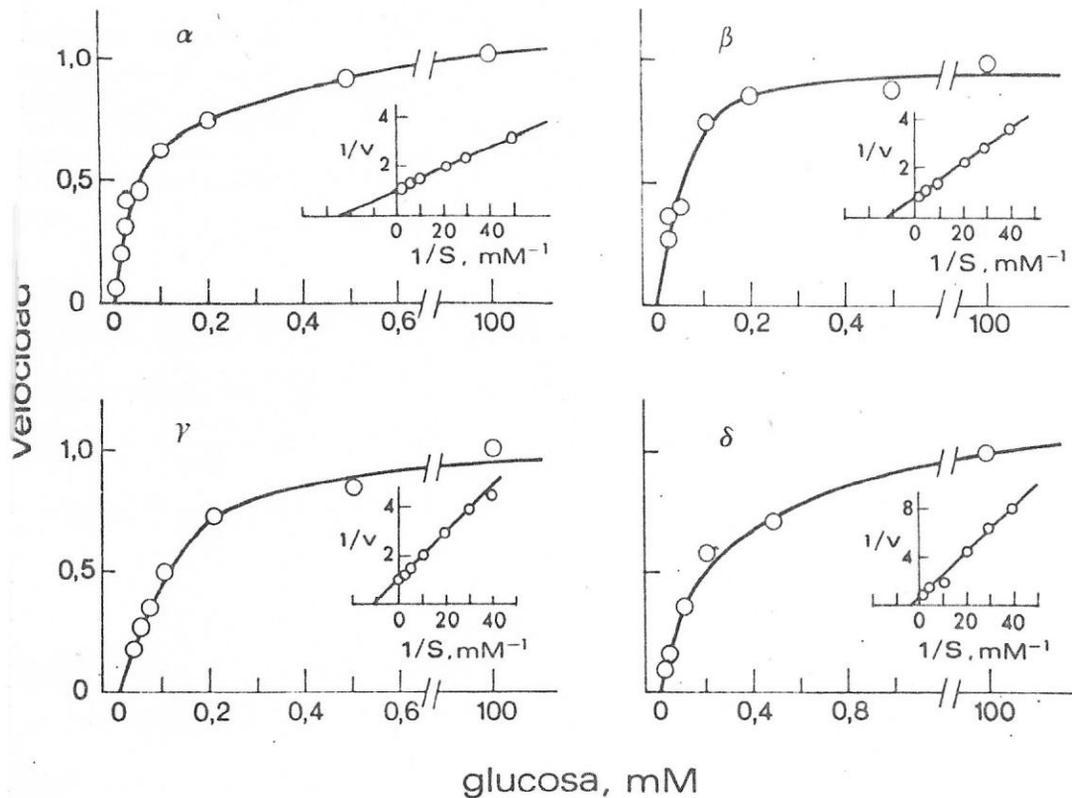


Figura 2. Curvas de función de saturación de las hexoquinásas de *Neurospora crassa*. La actividad hexoquinásica se midió con el método acoplado a glucosa-6-P-deshidrogenasa-NADP según se describe en Materiales y Métodos. Para estas mediciones se usaron las fracciones activas recromatografiadas en DEAE-celulosa. Se usaron al menos 6 concentraciones de glucosa entre 0,01 y 100 mM. Las constantes de Michaelis se calcularon a ojo mediante la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.

vertebrados. Los valores de K_m glucosa fluctúan entre 0,056 mM (isoenzima β) y 0,18 mM (isoenzima δ). Presentan una amplia especificidad de sustrato ya que además de glucosa pueden fosforilar manosa, fructosa y 2-desoxiglucosa. Esta es una característica común a las hexoquinasas de muchos organismos (2). Puede observarse en la Tabla I que las isoenzimas α y β tienen constantes cinéticas similares entre sí que difieren de las constantes de γ y δ que a su vez se parecen entre sí. Hace excepción el valor de K_m para manosa que es muy similar en las cuatro formas.

Es conocido el hecho que las hexoquinasas de vertebrados son inhibidas por glucosa-6-P con valores de K_i muy bajos (28, 29,30). En cambio, las hexoquinasas de *Saccharomyces* no son inhibidas por el éster fosfórico (31). Pareció de interés por lo tanto estudiar este fenómeno con las hexoquinasas de *Neurospora*. La medición de la actividad hexoquinásica se realizó por estimación de la velocidad de formación de ADP (ver Materiales y Métodos). Para cada nivel de glucosa-6-P (0,1, 1 y 10 mM) se utilizaba glucosa y ATP en las siguientes concentraciones: glucosa 0,5 mM, ATP 5 mM; glucosa 0,05 mM, ATP 5 mM; glucosa 0,5 mM, ATP 0,5 mM. No se observó inhibición por glucosa-6-P a ninguna de estas combinaciones de sustratos y con ninguna de las cuatro isoenzimas de *Neurospora*.

Peso molecular de las isoenzimas.

En condiciones ideales, la medición del peso molecular de

TABLA I

Algunas propiedades de las hexoquinazas de *Neurospora crassa*, cepa silvestre 77a

Parámetro	Isoenzimas			
	α	β	γ	δ
<i>Constantes de Michaelis</i>	mM			
Glucosa	0,061	0,056	0,077	0,180
Fructosa	22,7	12,7	2,9	2,5
Manosa	0,200	0,158	0,270	0,300
2-desoxiglucosa	0,185	0,400	7,90	7,14
ATP	1,42	1,88	0,75	0,56
<i>Especificidad de sustrato</i>	$V_{m\acute{a}x}$ relativa			
Glucosa	1,00	1,00	1,00	1,00
Fructosa	0,75	0,73	1,38	1,96
Manosa	0,72	0,72	1,00	1,00
2-desoxiglucosa	0,78	0,80	0,67	0,60
<i>Inhibición por glucosa-6-P</i>	no	no	no	no
<i>Movilidad cromatográfica</i>	mM KCl			
	123±9	156±8	186±12	216±11
<i>Peso molecular</i>	95000	95000	95000	95000

Las preparaciones usadas fueron fracciones activas de columnas de DEAE-celulosa tipo B, dializadas y recromatografiadas en columnas similares. Las constantes de Michaelis se calcularon a partir de gráficos de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk. Los resultados sobre especificidad de sustrato se expresan como velocidad máxima relativa ($V_{hexosa}/V_{glucosa}$) con concentraciones de sustrato 100 mM. La no inhibición por glucosa-6-P se verificó como se describe en el texto. La movilidad cromatográfica se expresa como la media \pm la desviación estandar de 5 valores. Los pesos moleculares corresponden a los valores obtenidos en el experimento de la Fig. 3.

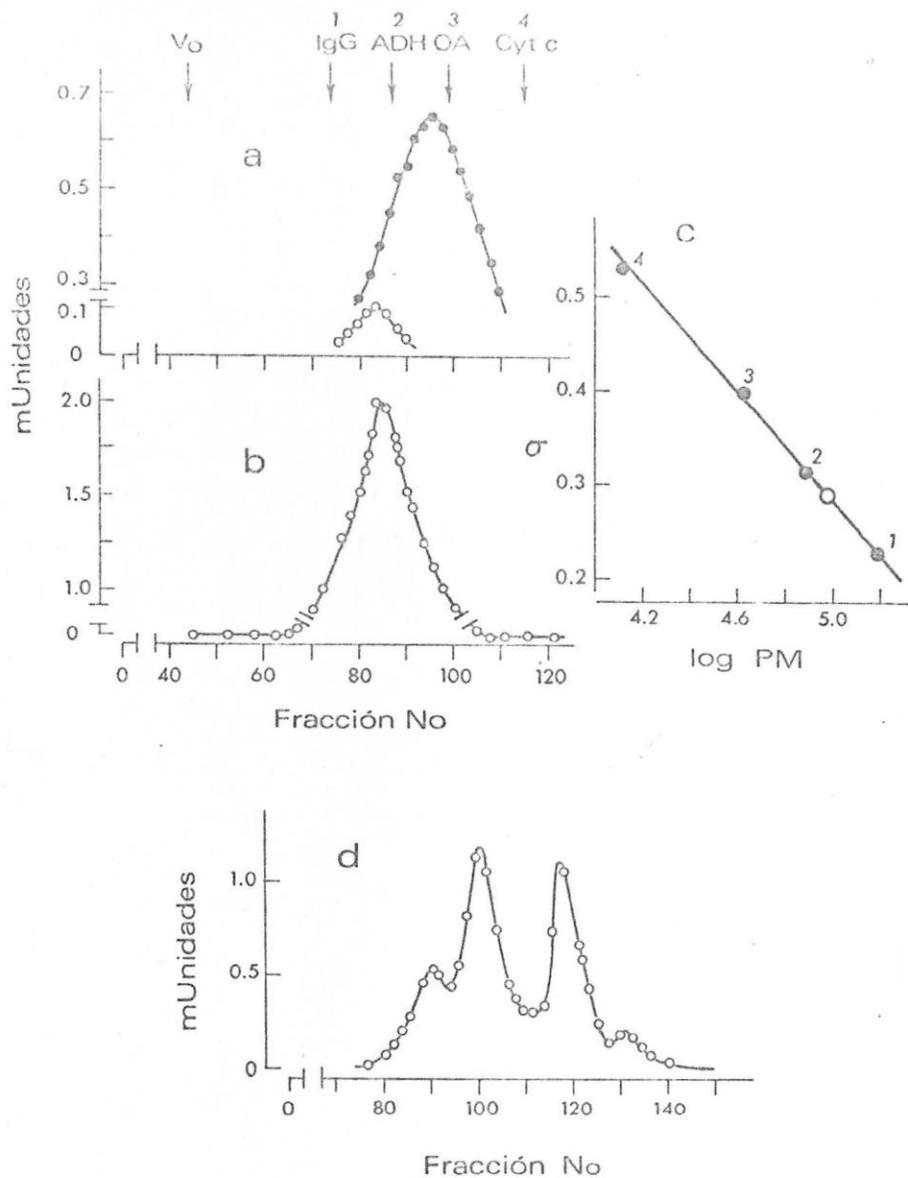


Figura 3. Determinación del peso molecular de las hexoquinásas de *Neurospora crassa*. Se utilizó una columna de Sephadex G-200 (2,5 x 35 cm), calibrada con proteínas de peso molecular conocido. (a) V_0 : volumen de exclusión, IgG: gamma globulinas, ADH: alcohol-deshidrogenasa, OA: ovoalbúmina, cyt c: citocromo c. Además la columna se calibró filtrando una alícuota de líquido sobrenadante de hígado de rata. Círculos abiertos: actividad fosforilante de glucosa medida con glucosa 0,5 mM. Círculos llenos: actividad fosforilante de glucosa medida con glucosa 100 mM; (b) Filtración de una alícuota de *Neurospora* correspondientes a 62 mg de micelio. Círculos vacíos: actividad fosforilante de glucosa medida con glucosa 0,5 mM; (c) Correlación entre $\sigma = (V_e - V_0 / V_1)$ y logaritmo del peso molecular de las diferentes proteínas usadas; (d) Cromatografía en DEAE-celulosa de las fracciones activas reunidas del experimento mostrado en b.

las cuatro isoenzimas debería realizarse por filtración de cada isoenzima en columnas de tamices moleculares apropiados. En nuestras condiciones sin embargo, el aislamiento preparativo de las isoenzimas γ y δ (que están presentes en bajas concentraciones) no es sencillo. Por lo tanto se procedió a filtrar por una columna calibrada de Sephadex G-200 una alícuota de líquido sobrenadante de 105.000 g. La medición de la actividad enzimática en el eluido reveló un pico único, simétrico cuyo peso molecular corresponde a aproximadamente 95.000 (Fig. 3b y 3c). La cromatografía del eluido activo en una columna de DEAE-celulosa mostró la presencia de las cuatro isoenzimas aunque sus proporciones relativas no fueron las mismas del sobrenadante original (Fig. 3d). Esto puede deberse a inactivación preferencial de algunas isoenzimas durante el procedimiento. Estos resultados sugieren que las cuatro hexoquinasas de *Neurospora* tienen un peso molecular cercano a los 95.000.

La columna de Sephadex G-200 habría permitido la detección de proteínas con actividad hexoquinásica de pesos moleculares diferentes. La figura 3a muestra que es posible detectar separadamente hexoquinasas de baja K_m (peso molecular: 100.000) de la isoenzima de alta K_m (peso molecular: 50.000) de hígado de rata.

Niveles totales de actividad y perfiles isoenzimáticos de hexoquinasa durante el crecimiento de Neurospora crassa.

En la fase logarítmica del crecimiento hifal que ocurre en-

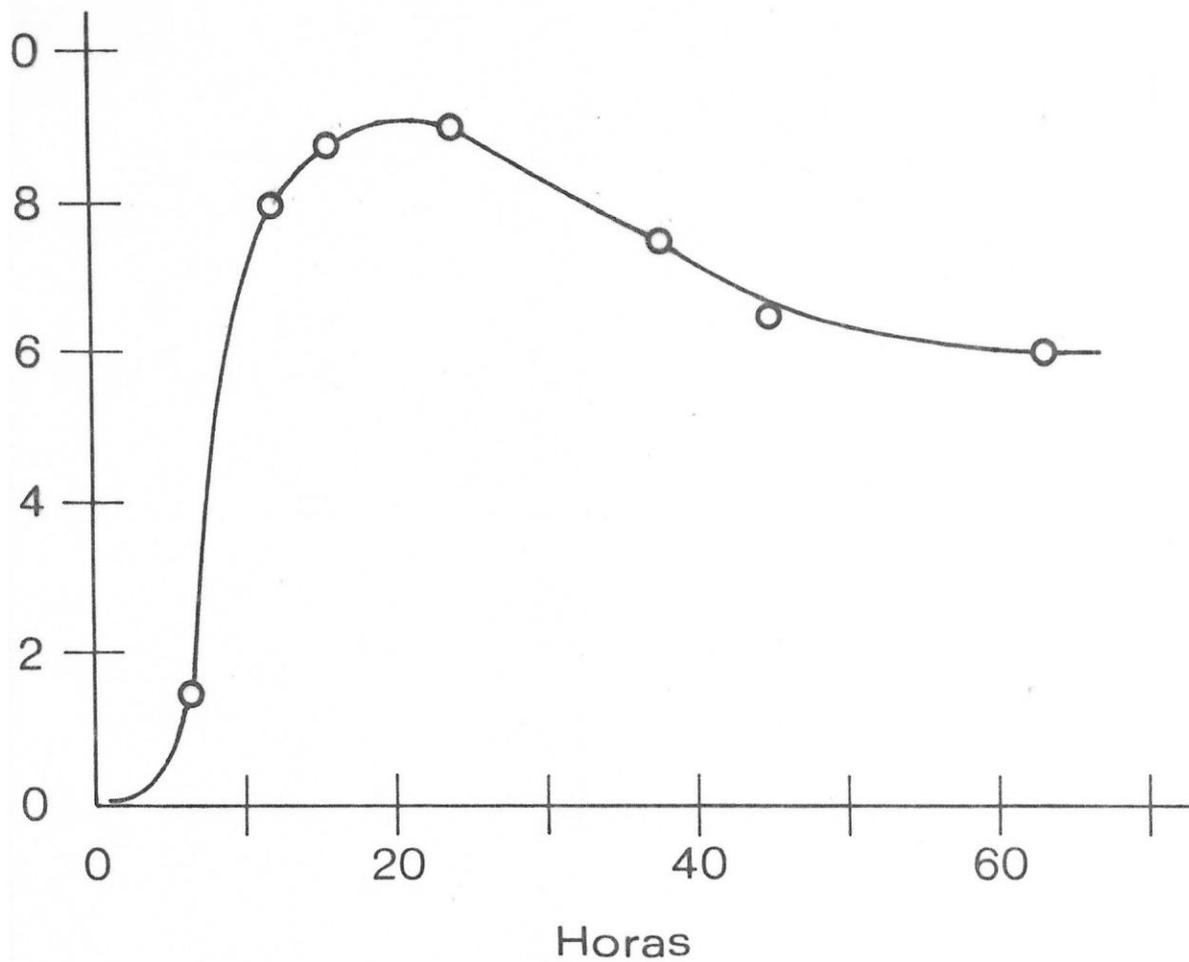


Figura 4. Niveles totales de hexoquinasa durante el crecimiento de *Neurospora crassa*. Se midió la actividad hexoquinásica en líquidos sobrenadantes de *Neurospora* (equivalente a 0,25 mg de micelio) cultivada a diferentes tiempos. Se usó glucosa 100 mM para la detección de la actividad enzimática (ver Materiales y Métodos).

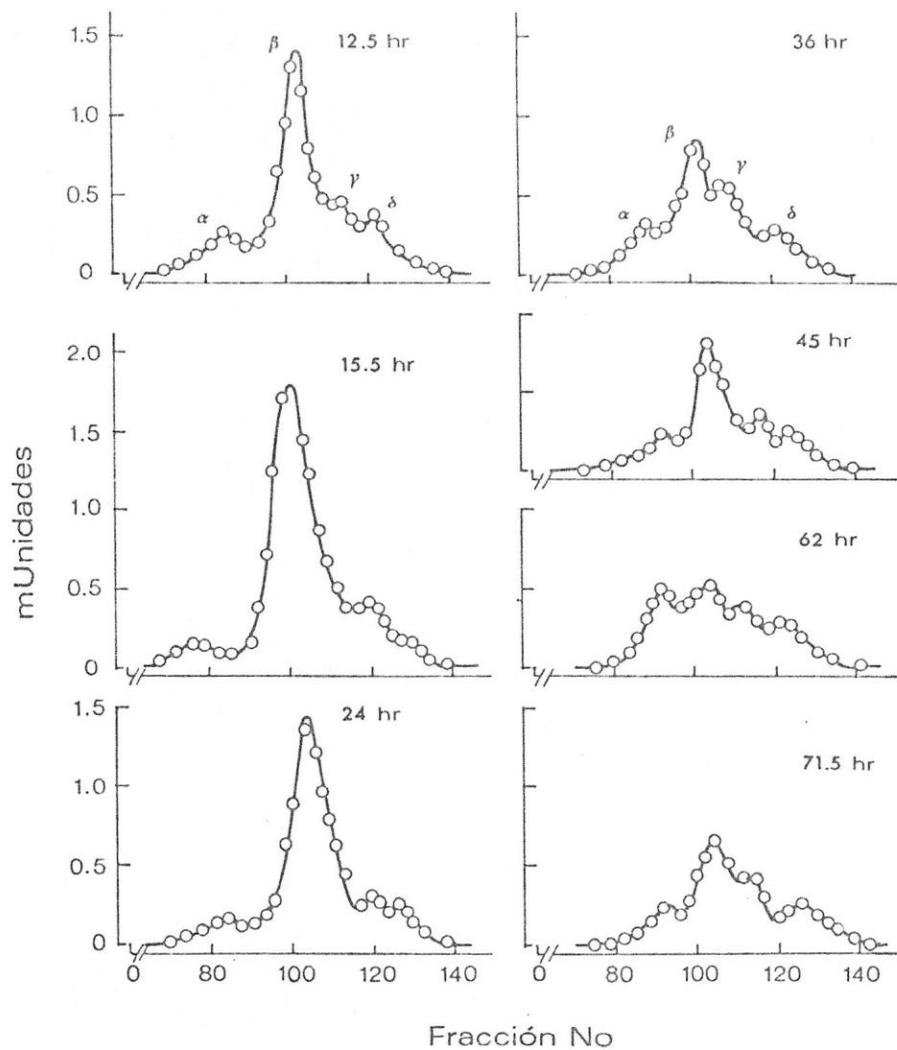


Figura 5. Hexoquinasas de *Neurospora crassa* cepa silvestre 77a a diferentes tiempos de cultivo. Alícuotas de líquido sobrenadante correspondientes a 25 mg de micelio se cromatografiaron en la columna de DEAE-celulosa tipo A, según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

tre las 2 y 24 horas de cultivo (32), se observa un aumento en los niveles totales de actividad (Unidades/g húmedo de micelio) de hexoquinasa para luego disminuir levemente en la fase de madurez del crecimiento hifal (Fig. 4). Igual fenómeno ha sido descrito en hexoquinasas de *Candida tropicalis* (14). El perfil isoenzimático se modifica cuantitativamente durante el crecimiento (Fig. 5). A las 15 horas de cultivo los niveles relativos de actividad de las isoenzimas son 3, 82, 11 y 4% para α , β , γ y δ respectivamente, mientras que a las 45 horas de cultivo los niveles de las isoenzimas son más parecidos entre sí (24, 44, 17 y 15% respectivamente). No se observaron cambios notables en el perfil isoenzimático en tiempos más prolongados de cultivo.

Perfil isoenzimático de hexoquinasas de Neurospora crassa cultivada en distintas fuentes de carbono.

En este hongo se han descrito enzimas inducibles por metabolitos como es el caso de la inducción de la ornitina aminotransferasa al agregar ornitina al medio de cultivo (33). Para estudiar si ocurría un fenómeno similar con las hexoquinasas se cultivó *Neurospora* durante 48 horas usando sacarosa, glucosa, fructosa o casaminoácidos como fuentes de carbono. Los perfiles isoenzimáticos no muestran diferencias apreciables entre sí (Fig. 6), lo cual sugiere que no existen hexoquinasas inducibles o represibles que dependan de la fuente de carbono en que se crezca el hongo.

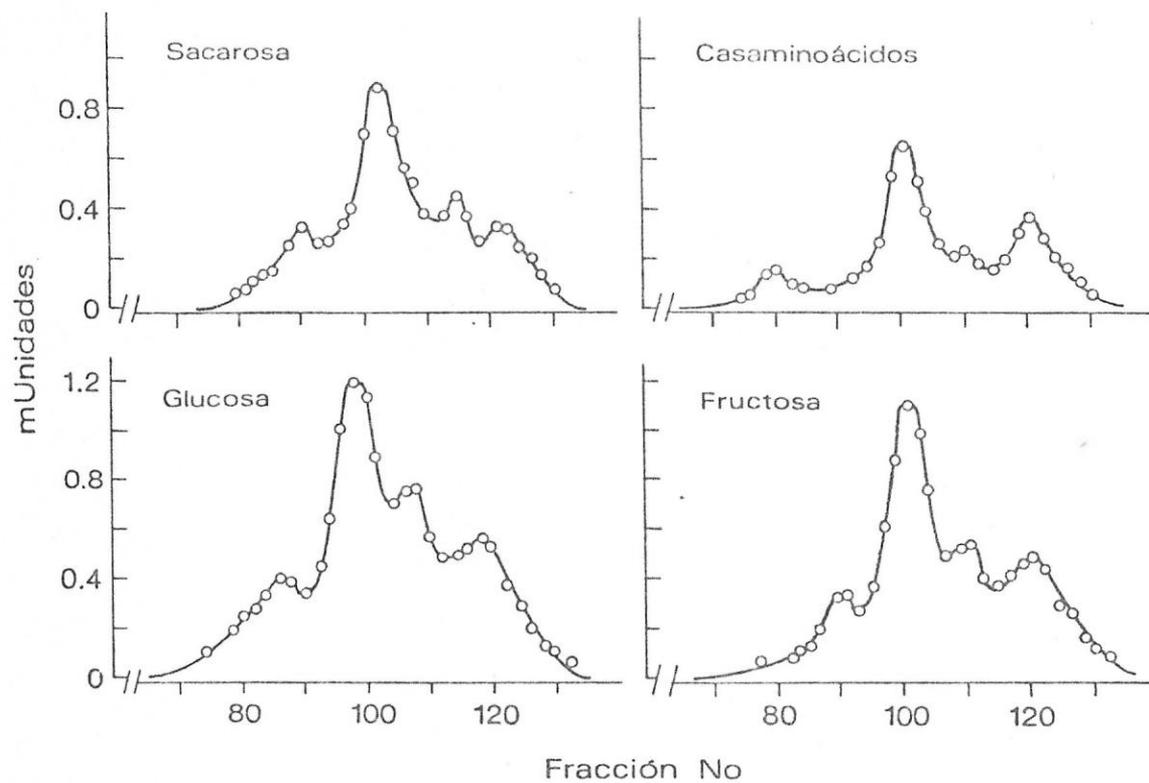


Figura 6. Hexoquinasas de *Neurospora crassa* cultivadas en diferentes fuentes de carbono. Alícuotas de líquidos sobrenadantes correspondientes a 25 mg de micelio cosechado a las 48 horas de cultivo, se cromatografiaron en la columna A de DEAE-celulosa. Los extractos provenían de *Neurospora* cultivada en medios que contenían sacarosa (superior izquierda), glucosa (inferior izquierda), casaminoácidos (superior derecha) y fructosa (inferior derecha) al 2% como fuentes de carbono.

Perfil isoenzimático de hexoquinasa de mutantes morfológicas de *Neurospora crassa*.

Con el propósito de pesquisar posibles variantes de las hexoquinasas se estudiaron los perfiles isoenzimáticos de varias mutantes morfológicas de *Neurospora* (Fig. 7). Estas mutantes se cultivaron en medio mínimo líquido con sacarosa durante 48 horas. La comparación de los niveles totales de actividad (Unidades/g húmedo de micelio) de las mutantes en relación a la cepa silvestre (Tabla II) indica que *dapple* tiene mayor actividad hexoquinásica que la cepa silvestre. Los niveles en *col-16* son similares a la cepa silvestre, en cambio en *dingy*, *frost* y *crisp* son francamente menores.

Los perfiles isoenzimáticos de varias mutantes difieren de los obtenidos en la cepa silvestre. Las variaciones observadas son: a) variaciones cuantitativas de las proporciones relativas de las isoenzimas como es el caso de *col-16* que presenta menor actividad de α y mayor actividad de γ y δ . *Crisp* presenta una baja proporción de α , mientras que β está en mayor cantidad; b) variaciones cualitativas como en *dapple* en que se observó sólo la presencia de las isoenzimas β y γ , con proporciones semejantes de las dos isoenzimas, y en *dingy* que presenta mayor cantidad de β . No se observaron las isoenzimas α y δ en estas mutantes cultivadas durante 24 y 72 horas aún cuando hubo variaciones en las proporciones relativas de las isoenzimas (no se muestra). El criterio de reconocimiento de estas formas fue su elución cromatográfica y el cociente de

Tabla II

Niveles totales de actividad y proporciones relativas de hexoquinasas en mutantes morfológicas de *Neurospora crassa*.

	Actividad total		Proporción relativa de las isoenzimas			
	Unidades/g	%	α	β	γ	δ
<i>77a</i>	6,48	100	24	44	17	15
<i>frost-102a</i>	3,00	46	22	40	24	14
<i>col-16a</i>	5,20	80	5	37	32	26
<i>crisp-1a</i>	1,70	26	11	55	17	17
<i>dingy 64A</i>	2,00	31	-	61	39	-
<i>dapple 1077A</i>	12,40	191	-	54	46	-

La actividad fosforilante de glucosa se midió en líquidos sobrenadantes de mutantes morfológicas de *Neurospora* cultivada durante 48 horas en medio mínimo líquido con sacarosa. Se midió la actividad hexoquinásica en líquidos sobrenadantes equivalente a 0,25 mg de micelio. Se usó glucosa 100 mM para la detección de la actividad enzimática (ver Materiales y Métodos). Las proporciones de las isoenzimas en cada experimento se calcularon por integración bajo la curva de los picos de actividad, suponiendo que éstos son simétricos, y que no hay inactivación preferencial de alguna isoenzima. El guión (-) indica que no se detectó actividad hexoquinásica en las fracciones correspondientes a las isoenzimas α o δ .

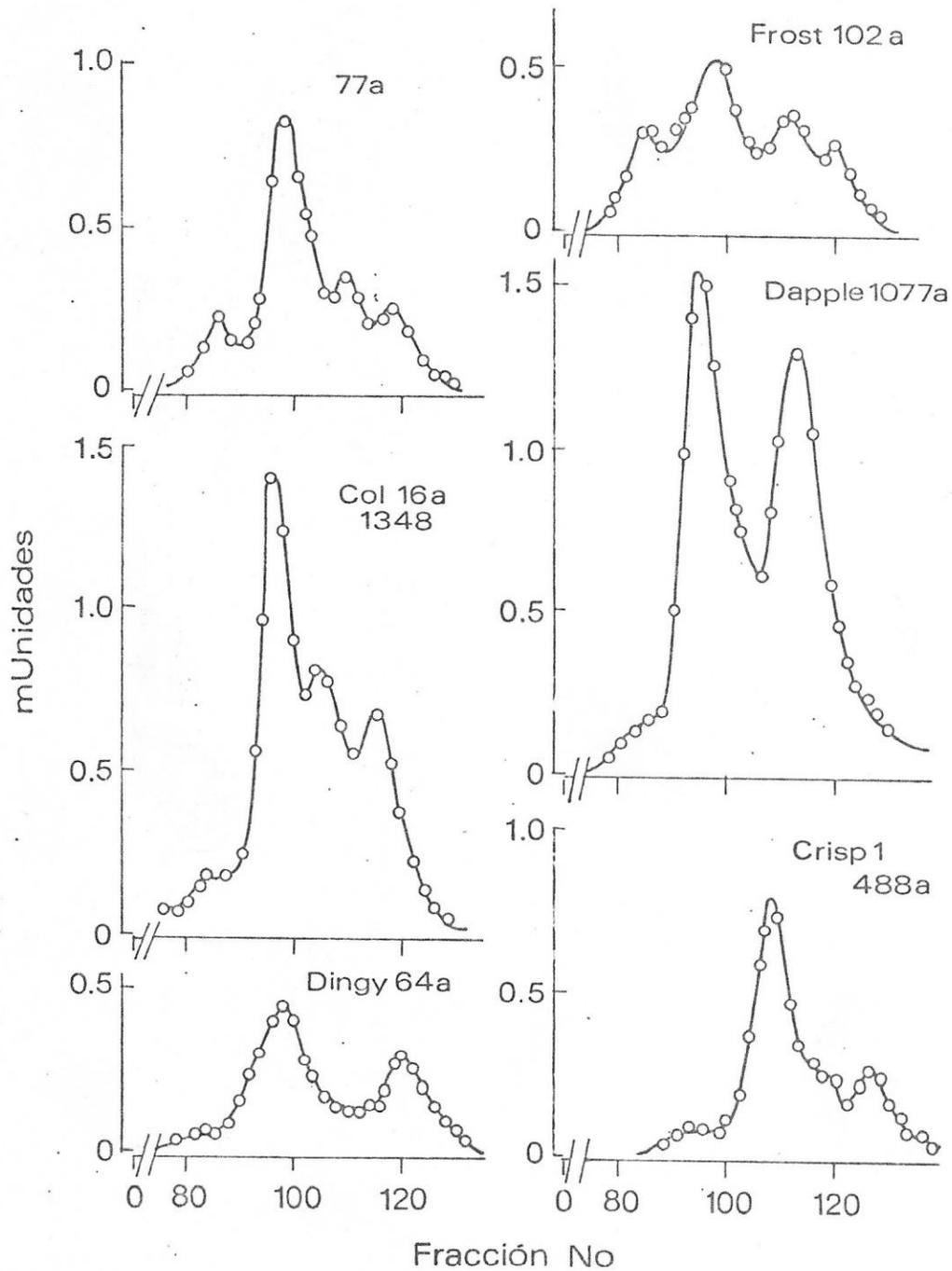


Figura 7. Hexoquinasas de mutantes morfológicas de *Neurospora crassa*. Alícuotas de líquidos sobrenadantes correspondientes a 25 mg de micelio de las mutantes indicadas, se cromatografiaron en columnas de DEAE-celulosa tipo A. El tiempo de cultivo fue de 48 horas.

fosforilación fructosa/glucosa.

La mutante *frost* no presenta diferencias significativas en las proporciones relativas de las isoenzimas con respecto a la cepa silvestre.

Perfil isoenzimático de hexoquinasa de la cepa silvestre 77a cultivada en presencia de sorbosa.

La presencia de L-sorbosa en el medio mínimo líquido que contiene sacarosa induce a crecer de modo colonial a la cepa silvestre (34,35). La sorbosa produce un efecto dramático en la morfología, composición de la pared celular y arquitectura de la superficie celular de la cepa silvestre. La observación en algunas mutantes coloniales (ver párrafo anterior) de perfiles isoenzimáticos particulares, hizo de interés estudiar el efecto de sorbosa sobre las hexoquinasas de la cepa silvestre.

Se observaron variaciones de tipo cuantitativo en el perfil isoenzimático de hexoquinasa de la cepa silvestre crecida en presencia de sorbosa durante 48 horas con respecto al obtenido del hongo cultivado en medio sin sorbosa (Fig. 8). Las proporciones relativas de las isoenzimas fueron 5, 54, 29 y 12% para α , β , γ y δ respectivamente. Los niveles de la isoenzima α están disminuídos en relación a la isoenzima α de *Neurospora* cultivada en ausencia de sorbosa, en cambio las hexoquinasas β y γ presentan niveles más altos. Dada la similitud de este perfil isoenzimático con el que se observa en

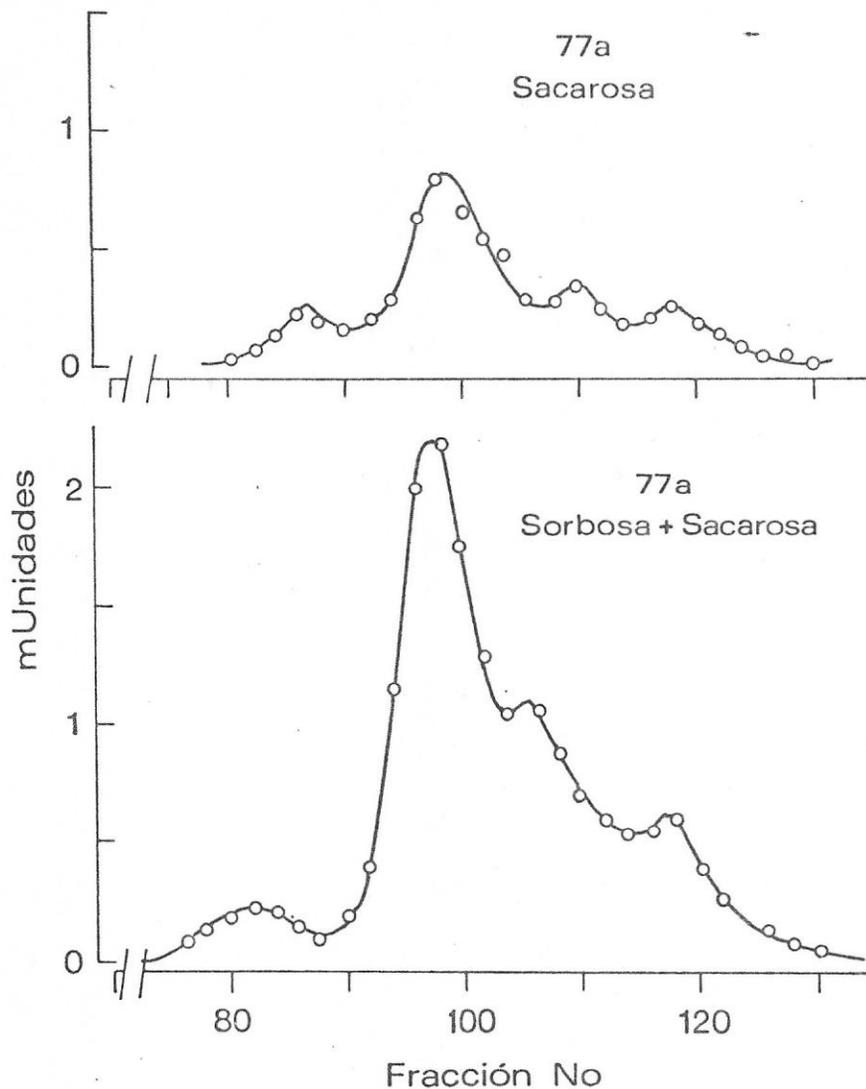


Figura 8. Cepa *silvestre* 77a cultivada en presencia de sorbosa. Alícuotas de líquidos sobrenadantes correspondientes a 25 mg de micelio se cromatografiaron en una columna de DEAE-celulosa tipo A. En la parte inferior de la figura se muestra el perfil de hexoquinasas de *Neurospora* cultivada durante 48 horas en medio líquido conteniendo 1,5% sorbosa, 0,5% sacarosa y 2% Vogel. En la parte superior de la figura se muestran las hexoquinasas de *Neurospora* cultivada durante el mismo tiempo en medio mínimo líquido carente de sorbosa.

etapas tempranas de crecimiento del hongo cultivado en ausencia de sorbosa, se estudiaron las hexoquinastas de *Neurospora* cultivada durante 24 y 72 horas en presencia de L-sorbosa. La variación de los perfiles isoenzimáticos durante el tiempo no presenta relación alguna con lo que sucede en *Neurospora* cultivada en ausencia del agente paramorfógeno, lo cual descarta la posibilidad que la semejanza se explique por un retardo del desarrollo enzimático inducido por sorbosa (no se muestra).

*Reacción de las hexoquinastas de Neurospora crassa con antihe-
xoquinasa de Saccharomyces cerevisiae.*

Se investigó la existencia de relación inmunológica entre hexoquinastas de *Neurospora* y *Saccharomyces*, ya que ambos organismos por pertenecer al grupo de Ascomycetes podrían tener hexoquinastas semejantes.

Después de incubar suero antihexoquinasa de levadura con las hexoquinastas de *Neurospora* se midió la actividad remanente (Fig. 9). No se observó efecto del antisuero sobre las isoenzimas α y β . En cambio la actividad de γ y δ fue inhibida en aproximadamente 50% por la antihexoquinasa de levadura. La reacción homóloga (hexoquinasa de levadura con antihexoquinasa de levadura) resultó en prácticamente un 100% de inhibición de la actividad a concentraciones de anticuerpo en que no hay inhibición de la actividad de las hexoquinastas de *Neurospora*. Esto sugiere algún tipo de reconocimiento débil entre las isoenzimas γ y δ de *Neurospora* y el suero antihexoqui-

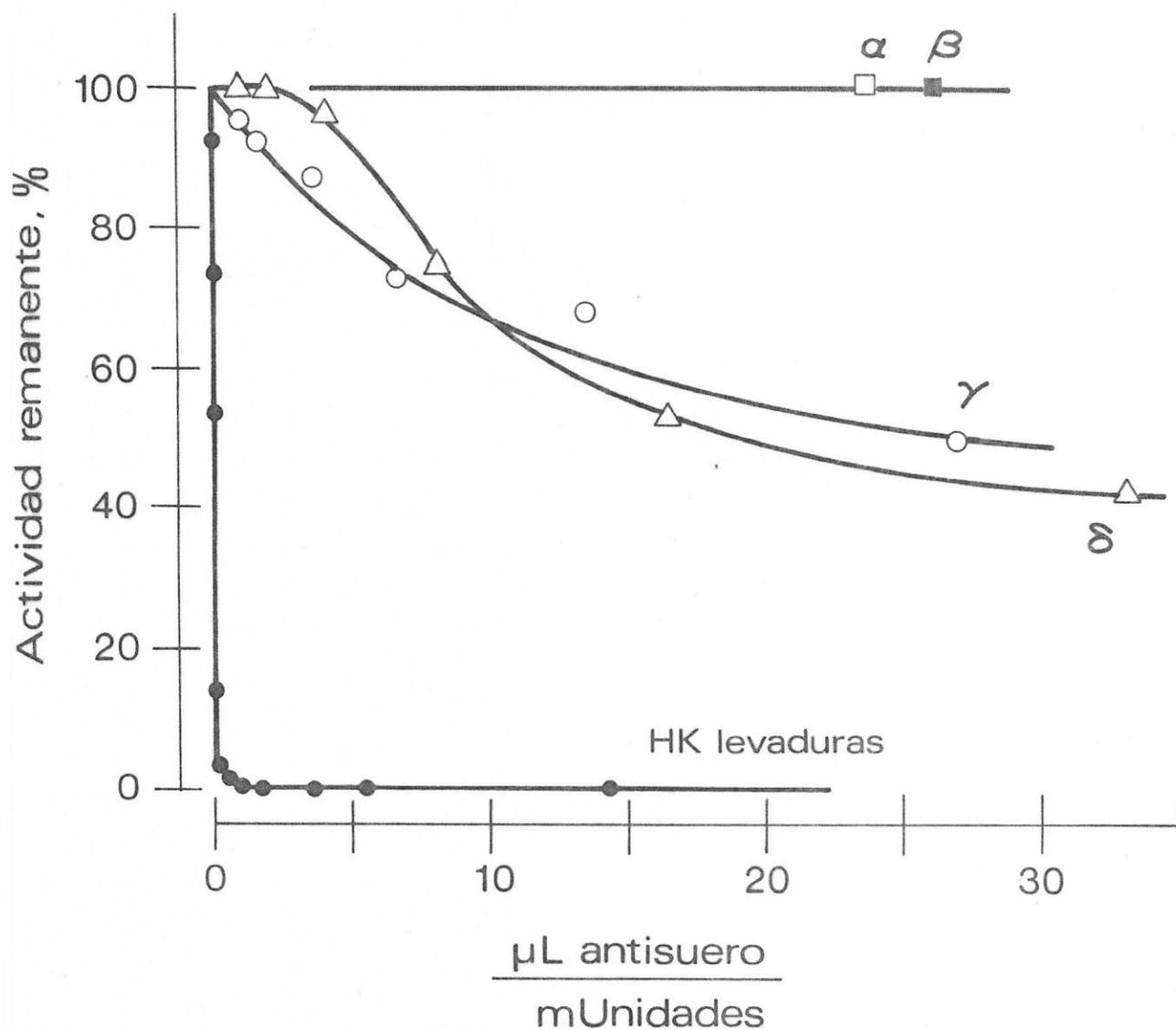


Figura 9. Inhibición de la actividad fosforilante de glucosa de isoenzimas de *Neurospora crassa* y hexoquinasas de levadura por suero anti-hexoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. La reacción inmunológica se realizó como se describió en Materiales y Métodos, utilizando de 2 a 3 miliunidades de enzima y cantidades variables de antisuero (entre 0,012 y 100 μL). Después de la incubación se midió la actividad hexoquinásica remanente usando glucosa 10 mM.

nasas de *Saccharomyces*.

Estos resultados fueron corroborados por experimentos con antihexoquinasa de levadura unida a Sepharosa. La Tabla III muestra que columnas de Sepharosa-antihexoquinasa de levadura retienen parcialmente la actividad de las isoenzimas γ y δ , pero no de α y β . Como era de esperar, la hexoquinasa de levadura es totalmente retenida en estas columnas. La recuperación de la actividad enzimática en una columna de Sepharosa con suero control de conejo no inyectado fue prácticamente de 100% para las isoenzimas α y β . En cambio para la actividad γ y δ fue del 61 y 70% respectivamente. Es posible que estas isoenzimas se inactiven parcialmente por contacto con Sepharosa o la resina la retenga por unión inespecífica. El porcentaje de retención de las isoenzimas γ y δ en la columna con antihexoquinasa fue referido a la actividad recuperada en la columna control.

TABLA III

Retención de la actividad de las hexoquinasa de *Neurospora crassa* en columnas de Sepharosa-antihexoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae**

Isoenzima	columna control	columna anticuerpo	
		a	b
	% de actividad recuperada		
α	94 \pm 6	100 \pm 5	96 \pm 2
β	95 \pm 1	100 \pm 4	96 \pm 5
γ	61 \pm 7	83 \pm 4	52 \pm 7 ¹
δ	70 \pm 7	62 \pm 4	50 \pm 2 ²

*Se filtraron alícuotas de 0,2 a 0,4 ml de enzima por columnas de inmoadsorbente. Las isoenzimas eran fracciones cromatografiadas en columnas de DEAE-celulosa tipo B. Se midió la actividad enzimática con glucosa 10 mM en todas las fracciones (0,5 ml) eluidas, para calcular la recuperación. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar de tres observaciones.

a: Actividad recuperada con respecto a la columna control.

b: Actividad recuperada con respecto al total de actividad colocada en la columna.

¹No difiere del valor correspondiente en la columna control (0,25 > p > 0,20).

²Difiere del valor correspondiente en la columna control. (p < 0,025).

DISCUSION

Formas múltiples de hexoquinasas de Neurospora crassa.

La cromatografía en DEAE-celulosa permitió separar cuatro formas de hexoquinasa en cepas silvestre de *Neurospora*. La Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (36) recomienda el uso del término isoenzimas para designar proteínas que posean la misma actividad enzimática en la misma especie, cuya estructura primaria esté codificada por genes diferentes. La expresión isoenzimas incluye: a) proteínas genéticamente independientes, b) variantes alélicas (aloenzimas) y c) heteropolímeros o híbridos de dos o más cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente. El término formas moleculares múltiples es más amplio y cubre a todas las proteínas que posean la misma actividad enzimática en la misma especie cualesquiera sean las causas de la multiplicidad. Sin embargo, es frecuente el uso en la literatura del término isoenzimas como sinónimo de formas moleculares múltiples.

Las formas de hexoquinasas de *Neurospora* no serían proteínas derivadas de una única cadena polipeptídica (como en el caso de la quimotripsina que deriva de quimotripsinógeno) o polímeros de una única subunidad (como por ejemplo en glutamato deshidrogenasa), ya que las cuatro formas presentan el mismo peso molecular. Si estas hexoquinasas no fuesen isoenzimas propiamente tales, podrían ser producto de cambios conformacionales de una proteína o, menos probablemente, proteínas conjugadas con otros grupos. Puesto que al recromatografiar

cada pico de actividad no se originan los otros, es muy probable que las hexoquinasas de *Neurospora* correspondan a isoenzimas, pero la evidencia definitiva deberá esperar estudios genéticos acerca del número de genes implicados, o fisicoquímicos que precisen la estructura cuaternaria de estas isoenzimas putativas.

Hexoquinasas de Neurospora crassa y su relación con hexoquinasas de vertebrados.

Cualesquiera que sean las causas de multiplicidad de hexoquinasas en *Neurospora* resulta interesante la comparación entre estas isoenzimas y aquellas estudiadas en vertebrados. Las hexoquinasas de *Neurospora* resultan ser muy parecidas a las clásicas isoenzimas A y B de mamíferos (1,37,38). En efecto, presentan amplia especificidad de sustrato, y sus valores de K_m glucosa son del mismo orden de magnitud siendo hiperbólicas sus funciones de saturación. Además sus pesos moleculares son prácticamente idénticos. Por la misma razón de su parecido con las hexoquinasas A y B de mamíferos, las isoenzimas de *Neurospora* difieren de las hexoquinasas C y D. Estas últimas presentan características cinéticas muy peculiares: la isoenzima C de vertebrados es inhibida por altas concentraciones de glucosa (1,3,4) y la hexoquinasa D presenta una especificidad de sustrato más restringida, cinética sigmoideal frente a glucosa (6) con valores de $K_{0,5}$ altos (~ 8 mM) y un peso molecular de aproximadamente 50.000 (2,37).

Sin embargo, las hexoquinasas de *Neurospora* y de vertebrados son diferentes ya que aquellas son insensibles a la inhibición por el producto glucosa-6-P (Tabla I). Crane y Sols (39) mostraron que la hexoquinasa de cerebro es fuertemente inhibida por concentraciones micromolares del éster fosfórico, muy probablemente por interacción con un sitio alostérico en la enzima. La inhibición por glucosa-6-P parece tener importancia fisiológica (para una revisión extensa del problema véase Purich *et al.* (15) y Colowick (31)).

Al igual que las hexoquinasas de *Neurospora* las isoenzimas de *Saccharomyces* tampoco son inhibidas por glucosa-6-P (31) y este hecho parece ser importante porque establece un vínculo de parentesco evolutivo entre las isoenzimas de *Neurospora* y *Saccharomyces* (ambos Ascomycetes). A mayor abundamiento, un examen detallado de la Tabla IV muestra que las hexoquinasas γ y δ de *Neurospora* presentan características muy similares a la isoenzima P II de *Saccharomyces* (hace excepción el cociente de fosforilación para manosa). Los estudios inmunológicos (Fig. 9 y Tabla 3) que serán discutidos más adelante, refuerzan la relación de parecido al menos entre las hexoquinasas γ y δ de *Neurospora* y la hexoquinasa P II de levadura.

Hexoquinasas de Neurospora crassa durante el crecimiento, cultivada en diferentes fuentes de carbono, y en presencia de sorbosa.

En *Neurospora* existe una etapa de mayor actividad hexoquinásica que corresponde al período logarítmico del crecimiento hifal. Otras enzimas, como la β -galactosidasa, también presentan cambios en los niveles relacionados con su tiempo de cultivo (32). Este fenómeno sugiere que en determinados estadios de crecimiento hay vías metabólicas que aumentan su actividad, jugando un papel importante en ese momento de crecimiento. Si el aumento de los niveles de una isoenzima es concomitante con una alza en la actividad de una vía metabólica, podría pensarse en la participación de isoenzimas específicas en vías metabólicas específicas (40). Por el momento no estamos en condiciones de relacionar vías metabólicas de utilización de glucosa con alguna hexoquinasa en particular.

La expresión diferencial de hexoquinasas en distintas etapas de crecimiento se ha descrito también en *Saccharomyces* (17). Mientras que en la fase exponencial está presente la forma P II, en la fase estacionaria de crecimiento están las isoenzimas P I, P II y glucoquinasa.

Al cultivar *Neurospora* en diferentes fuentes de carbono no se observa variación en el perfil isoenzimático de hexoquinasas. Aparentemente ninguna de estas formas sería una enzima del tipo inducible o represible como la glucoquinasa de hígado de rata (7,9).

L-sorbosa es un agente paramorfógeno que produce una fenocopia en la cepa silvestre de *Neurospora* haciéndola crecer de modo colonial (41,42), produciendo drásticos cambios en la mor-

fología, composición de la pared celular y arquitectura de la superficie celular. En presencia de sorbosa, *Neurospora* utiliza glucosa menos eficientemente, y Crocken y Tatum (43) sugieren que L-sorbosa produce un gran desorden metabólico. Por lo tanto, si se acepta la participación específica de isoenzimas en diferentes vías metabólicas, no es de extrañar el hallazgo de diferencias cuantitativas en el perfil isoenzimático de hexoquinasas en relación a *Neurospora* cultivada en medio sin sorbosa. Existirían reguladores de la expresión génica de estas isoenzimas que de algún modo dependerían del metabolismo o morfología del hongo.

Hexoquinasas de mutantes morfológicas de Neurospora crassa.

En mutantes morfológicas se han descrito alteraciones de algunas enzimas, consistentes en variaciones en sus niveles de actividad, estabilidad térmica, afinidad por sustrato, comportamiento en electroforesis y electroenfoque. Por ejemplo las mutantes *frost*, *balloon* y *col-2* tienen glucosa-6-P-deshidrogenasa defectuosa (44,45); *col-3* y *col-10* poseen 6-P-glucónico-deshidrogenasa alterada (46,47); en *col-16* los niveles de arabinosa-deshidrogenasa están aumentados (48); en *crisp-1* la actividad específica de la adenil-ciclasa está reducida (49) (para mayores detalles véase referencia 50). En cuanto a variaciones del número de formas moleculares múltiples, solo es conocido el caso de la mutante *su-C* que presenta dos picos de actividad de glucosa-6-P-deshidrogenasa se-

parados mediante electroenfoque en vez de los tres observados en la cepa silvestre (45).

Nuestros resultados muestran que las mutantes *crisp-1* y *col-16* presentan variaciones de tipo cuantitativo en el perfil isoenzimático de hexoquinasas. Es probable que la mutación causante del cambio morfológico produzca grandes desórdenes metabólicos que modifiquen la expresión de estas isoenzimas (efecto análogo al de sorbosa). En cambio en las mutantes *dapple* y *dingy* se detectan sólo las isoenzimas β y γ . La desaparición de las isoenzimas α y δ podría deberse a mutaciones que afectan genes estructurales o reguladores de la expresión génica. La pérdida concomitante de ambas isoenzimas podría ser el producto de una única mutación que afectaría las dos enzimas (mutación regulatoria), o alternativamente, *dapple* y *dingy* serían dobles mutantes.

Relación entre las hexoquinasas de Neurospora crassa, Saccharomyces cerevisiae y otros microorganismos. Origen de las isoenzimas.

La Tabla IV resume algunas propiedades de las hexoquinasas de hongos y levaduras estudiados hasta ahora. La hexoquinasa P II de levadura presenta similitud en todos los parámetros medidos con las isoenzimas γ y δ de *Neurospora*. La hexoquinasa de *Aspergillus oryzae* en cambio es similar a las isoenzimas α y β de *Neurospora* exceptuando su K_m para manosa. Las dos constantes cinéticas conocidas de las hexoquinasas

Tabla IV
Algunas propiedades de las hexoquinasas de hongos y levaduras

Parámetro	<i>N. crassa</i> ¹				<i>S. cerevisiae</i> ²			<i>A. oryzae</i> ³	<i>R. glutinis</i> ⁴		<i>C. tropicalis</i> ⁵	
	α	β	γ	δ	P I	P II	GK	HK	HK	GK	HK	GK
<i>Constantes de Michaelis (mM)</i>												
Glucosa	0,061	0,056	0,077	0,180	0,30	0,60	0,03	0,05	0,10	0,10	0,34	0,34
Fructosa	22,7	12,7	2,9	2,5	4,1	2,5	3,1	30,0	2,0	no	2,2	no
Manosa	0,200	0,158	0,270	0,300	0,11	0,24	0,12	0,75	0,1	0,2	-	-
2-desoxiglucosa	0,185	0,40	7,90	7,14	0,85	1,21	1,46	0,40	0,3	0,3	-	-
ATP	1,42	1,80	0,75	0,56	0,30	0,30	0,048	-	0,5	0,6	-	-
<i>Velocidad máxima relativa</i>												
Glucosa	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fructosa	0,75	0,73	1,38	1,96	3,0	1,3	0,4	1,2	3,1	no	1,8	no
Manosa	0,72	0,72	1,00	1,00	0,6	0,3	0,2	0,8	0,8	0,3	-	-
2-desoxiglucosa	0,78	0,80	0,67	0,60	1,03	0,46	0,45	0,8	0,75	0,6	-	-
<i>Inhibición por glucosa-6-P</i>												
	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	-	-
<i>Peso molecular</i>												
	95000	95000	95000	95000	100000	100000	*	-	96000	110000	-	-

¹ Resultados de esta tesis; ² Tomados de refs. 16, 52 y 53; ³ Ref. 12; ⁴ Ref. 13; ⁵ Ref. 14; HK = hexoquinasa de amplia especificidad de sustrato; GK = hexoquinasa de especificidad restringida (glucoquinasa); el guión (-) indica mediciones no realizadas; la palabra no indica que el fenómeno no ocurre; * el peso molecular de esta enzima no ha sido determinado porque la enzima forma agregados de alto peso molecular (16).

de *Candida tropicalis* son semejantes a la isoenzima δ de *Neurospora*. La forma P I de *Saccharomyces* es similar a la hexoquinasa de *Rhodotorula glutinis*. Todas estas hexoquinasas tienen en común el peso molecular de 100.000 y la insensibilidad a la inhibición por el producto glucosa-6-P.

La reacción de la antihexoquinasa de *Saccharomyces* con las formas γ y δ de *Neurospora* indica un parentesco evolutivo. El anticuerpo fue preparado por inyección de una mezcla de las isoenzimas P I y P II, y no sabemos si el reconocimiento inmunológico con las hexoquinasas de *Neurospora* proviene de la reacción con el anticuerpo de una de estas formas enzimáticas o de ambas. Aunque el reconocimiento inmunológico es débil, sugeriría la existencia de una proteína ancestral común para ambos tipo de hexoquinasas.

Hansen *et al.* (51) no detectaron reacción inmunológica cruzada entre hexoquinasas de levaduras y *Neurospora*. Los experimentos de estos autores fueron realizados con extractos crudos que contenían las cuatro isoenzimas. Por otra parte el reconocimiento inmunológico de las isoenzimas γ y δ es débil. Ambos factores pueden explicar la no detección de inhibición de la actividad enzimática con el anticuerpo.

Una explicación evolutiva acerca del origen de las cuatro hexoquinasas de *Neurospora* debería tomar en cuenta el número de genes implicados en su síntesis y un conocimiento de sus estructuras subunitarias. En ausencia de estos datos sólo podemos especular que el parecido inmunológico y las propieda-

des cinéticas que hemos observado entre las isoenzimas γ y δ , sugiere que ambas se originaron por duplicación génica a partir de un gen ancestral.

Proyecciones futuras.

Los resultados de este trabajo abren posibilidades interesantes de investigación con el fin último de comprender las relaciones entre estructura y función de isoenzimas. Estas perspectivas inmediatas pueden enumerarse de la siguiente manera:

- a) Determinar si el reconocimiento inmunológico entre hexoquinasas γ y δ de *Neurospora* y antihexoquinasa de levadura resulta de reacción cruzada con las formas P I o P II, o con ambas.
- b) Caracterizar el perfil isoenzimático de un mayor número de mutantes buscando aquellas que presenten deleciones de isoenzimas, a fin de realizar estudios genéticos que sugieran el número de genes implicados en la síntesis de estas isoenzimas.
- c) Investigar si existen mutantes en las cuales se pueda correlacionar la pérdida de una isoenzima con la ausencia de una vía metabólica.
- d) Purificar las formas múltiples de hexoquinasa de *Neurospora* y estudiar su estructura cuaternaria.
- e) Preparar anticuerpos antihexoquinasa para cada una de las formas de *Neurospora* para averiguar si existe reacción cruzada entre las isoenzimas.
- f) Aislar y caracterizar las hexoquinasas de otros hongos y microorganismos con el fin de establecer relaciones evolutivas entre las diferentes isoenzimas.

REFERENCIAS

- 1) González, C., Ureta, T., Sánchez, R. and Niemeyer, H. (1964). Multiple molecular forms of ATP: hexose 6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 16, 347-352.
- 2) Ureta, T. (1975). Phylogeny, ontogeny, and properties of the hexokinases from vertebrates. En C. L. Markert (editor) *Isozymes*. Vol III- *Developmental Biology*. pp 575-601, Academic Press, New York.
- 3) Ureta, T. (1976). The allosteric regulation of hexokinase C from amphibian liver. *J. Biol. Chem.* 251, 5035-5042.
- 4) González, C., Ureta, T., Babul, J., Rabajille, E. and Niemeyer, H. (1967). Characterization of isozymes of adenosine triphosphate: D-hexose 6-phosphotransferase from rat liver. *Biochemistry* 6, 460-468.
- 5) Niemeyer, H., Ureta, T. and Clark-Turri, L. (1975). Adaptive character of liver glucokinase. *Mol. Cell. Biochem.* 6, 109-126.
- 6) Niemeyer, H., Cárdenas, M. L., Rabajille, E., Ureta, T., Clark-Turri, L. and Peñaranda, J. (1975). Sigmoidal kinetics of glucokinase. *Enzyme* 20, 321-333.
- 7) Niemeyer, H., Clark-Turri, L. and Rabajille, E. (1963). Induction of glucokinase by glucose in rat liver. *Nature* 198, 1096-1097.
- 8) Niemeyer, H., Pérez, N., Garcés, E. and Vergara, F. E. (1962). Enzyme synthesis in mammalian liver as a consequence of refeeding after fasting. *Biochim. Biophys. Acta* 62, 411-413.
- 9) Niemeyer, H., Clark-Turri, L., Pérez, N. and Rabajille, E. (1965). Studies on factors affecting the induction of ATP: D-hexose 6-phosphotransferase in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 109, 634-645.
- 10) Niemeyer, H., Pérez, N. and Rabajille, E. (1966). Interrelation of actions of glucose, insulin and glucagon on induction of adenosine triphosphate: D-hexose phosphotransferase in rat liver. *J. Biol. Chem.* 241, 4055-4059.
- 11) Ureta, T., Bravo, R. and Babul, J. (1975). Rat liver hexokinases during development. *Enzyme* 20, 334-348.
- 12) Ruiz-Amil, M. und Sols, A. (1961). Hexokinase aus *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Z.* 334, 168-174.

- 13) Mazón, M. J., Gancedo, J. M. and Gancedo, C. (1975). Hexose kinase from *Rhotorula glutinis*. Identification and properties of an hexokinase and a glucokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 167, 452-457.
- 14) Hirai, M., Ohtani, E., Tanaka, A. and Fukui, S. (1977). Glucose phosphorylating enzymes of *Candida* yeast and their regulation *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 480, 357-366.
- 15) Purich, D. L., Fromm, H. J. and Rudolph, F. B. (1973). The hexokinases: kinetic, physical and regulatory properties. *Adv. Enzymol.* 35, 249-326.
- 16) Maitra, P. K. (1970). A glucokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 245, 2423-2431.
- 17) Gancedo, J. M., Clifton, D. and Fraenkel, D. (1977). Yeast hexokinase mutants. *J. Biol. Chem.* 252, 4443-4444.
- 18) Klingmuller, W. and Truper, H. G. (1965). Determination of hexokinase and other enzyme wich possibly phosphorylate fructose in *Neurospora crassa*. *Neurospora Newsletter* 8, 18-19.
- 19) Medina, A. and Nicholas, D. J. D. (1957). Some properties of a Zinc dependent hexokinase from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 66, 573-578.
- 20) Medina, A. and Nicholas, D. J. D. (1957). A Zinc dependent hexokinase from *Neurospora crassa*. *Nature* 179, 87-88.
- 21) Vogel, H.J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). *Microbial Genet. Bull.* 13, 42-43.
- 22) Slein, M. W., Cori, G. T. and Cori, C. F. (1950). A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. *J. Biol. Chem.* 186, 763-780.
- 23) Horecker, B. L. and Kornberg, A. (1948). The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175, 385-390.
- 24) Kornberg, A. and Pricer, W. E. (1951). Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. *J. Biol. Chem.* 193, 481-495.
- 25) Andrews, P. (1965). The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96, 595-606.
- 26) Kabat, E. A., and Mayer, M. M. (1967). *En Experimental*

immunochemistry. Charles C. Thomas (Publisher) Third Edition, pp 762-763. Springfield, Illinois, USA.

- 27) Pharmacia Fine Chemicals. Instrucciones adjuntas al reactivo Sepharosa 4B activada con CNBr.
- 28) Schimke, R. T. and Grossbard, L. (1968). Studies on isozymes of hexokinase in animal tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 332-350.
- 29) Viñuela, E., Salas, M. and Sols, A. (1963). Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* 238, 1175-1177.
- 30) Walker, D. J. (1966). The nature and function of hexokinase in animal tissues. *Essays in Biochemistry* 2, 33-67.
- 31) Colowick, S. P. (1973). The hexokinases. En P. D. Boyer (Editor) *The enzymes*. Vol IX Part B, Third Edition, pp 1-48. Academic Press, New York and London.
- 32) Zalokar, M. (1959). Enzyme activity and cell differentiation in *Neurospora*. *Amer. Jour. Bot.* 46, 555-559
- 33) Weiss, R. L. and Anterasian, G. P. (1977). Control of arginine metabolism in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* 252, 6974-6980.
- 34) Tatum, E. L., Barrat, R. W. and Cutter, U. M. (1949). Chemical induction of colonial paramorphs in *Neurospora* and *Syncephalastrum*. *Science* 109, 509-511.
- 35) de Terra, N. and Tatum, E. L. (1961). Colonial growth of *Neurospora*. *Science* 134, 1066-1068.
- 36) IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 5939-5941.
- 37) Grossbard, L. and Schimke, R. T. (1966). Multiple hexokinase of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. *J. Biol. Chem.* 241, 3546-3560.
- 38) Ureta, T., González, C. and Niemeyer, H. (1971). Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates-II. Chromatographic patterns of glucokinase and hexokinase in the liver of rodents. *Comp. Biochem. Physiol.* 40B, 81-91.
- 39) Crane, R. K. and Sols, A. (1954). The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate and related compounds. *J. Biol. Chem.* 210, 597-606.

- 40) Ureta, T. (1978). The role of isozymes in metabolism. *En Horecker, B. L. and Stadtman, E. R. (Editors). Current Topics in Cellular Regulation. 13, 233-258. Academic Press, New York.*
- 41) de Terra, N. and Tatum, E. L. (1963). A relationship between cell wall structure and colonial growth in *Neurospora*. *Am. J. Bot. 50, 669-677.*
- 42) Mishra, N. C. and Tatum, E. L. (1972) Effects of L-sorbose in polysaccharide synthetase of *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 313-317.*
- 43) Crocken, B. and Tatum, E. L. (1968). The effect of sorbose on metabolism and morphology of *Neurospora*. *Biochim. Biophys. Acta 156, 1-8.*
- 44) Scott, W. A. and Tatum, E. L. (1970). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and *Neurospora* morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 66, 515-522.*
- 45) Scott, W. A. and Brody, S. (1973). Effects of suppressor mutations on nonallelic glucose-6-phosphate dehydrogenase mutants of *Neurospora crassa*. *Biochem. Genet. 10, 285-295.*
- 46) Scott, W. A. and Abramsky, T. (1973). *Neurospora* 6-phosphogluconate dehydrogenase. I. Purification and characterization of the wild type enzyme. *J. Biol. Chem. 248, 3535-3542.*
- 47) Scott, W. A. and Abramsky, T. (1973). *Neurospora* 6-phosphogluconate dehydrogenase. II. Properties of two purified mutant enzymes. *J. Biol. Chem. 248, 3542-3545.*
- 48) Carrasco, A., Pincheira, G. y Ureta, T. (1976). Control genético de la deshidrogenasa de D-arabinosa-NAD en *Neurospora crassa*. XIX Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile. Resúmenes, p. R-12.
- 49) Terenzi, H. F., Flawiá, M. M. and Torres, H.N. (1974). A *Neurospora crassa* morphological mutant showing reduced adenylate cyclase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 990-996.*
- 50) Mishra, N. C. (1977). Genetics and biochemistry of morphogenesis in *Neurospora*. *Advances in Genetics. 19, 341-405.*
- 51) Hansen, R. J., Creighton, S. R. and McGrath, C. J. (1971). Hexose-ATP phosphotransferases: comparative aspects-II. Cross-reactivity of hexokinases from a variety of species with antisera to yeast hexokinase. *Comp. Biochem. Physiol. 39B, 607-615.*

- 52) Ramel, A. H., Rustum, Y. M., Jones, J. G. and Barnard, E. A. (1971) Yeast hexokinase-IV. Multiple forms of hexokinase in the yeast cell. *Biochemistry* 10, 3499-3508.
- 53) Gazith, J., Schulze, I. T., Gooding, R. H., Womack, F. C. and Colowick, S. P. (1968). Multiple forms and subunits of yeast hexokinase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 307-331.

