

MAG- B

V293

C-1

**ESTUDIO COMPARATIVO DE HEXOQUINASA A DE RATA
Y HEXOQUINASA DE CEREBRO DE POLLO**

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

por

INGRID PATRICIA VARELA BUNSTER

1989

Patrocinante de Tesis: Dr. Tito Ureta A.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

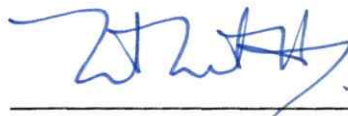
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el Candidato

INGRID PATRICIA VARELA BUNSTER

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de magister en Ciencias Biológicas con Mención en Bioquímica, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 11 de Noviembre de 1988.

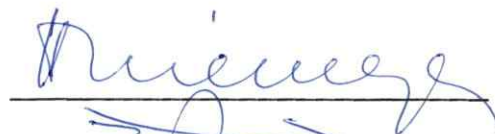
Patrocinante de Tesis:

Dr. Tito Ureta

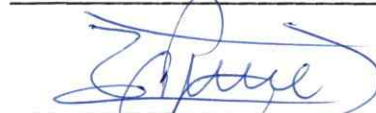


Comisión Informante de Tesis:

Dr. Hermann Niemeyer



Dr. Tulio Núñez



Dra. Luz María Pérez



Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Tito Ureta.



INDICE DE MATERIAS

	Página
Lista de Tablas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Abreviaturas	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xx
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	8
Reactivos	8
Material cromatográfico	9
Material biológico	9
Soluciones de uso frecuente	10
METODOS	11
Medición de actividad	11
Medición de proteínas	11
Determinación de la concentración de sales en solución	12
Preparación y regeneración de los materiales cromatográficos	12
1. DEAE-celulosa	12
2. Hidroxilapatita	13
3. Sephacryl S-300	13
4. Agarosa azul-2	13
Purificación de hexoquinasa de cerebro de rata	14



	Página
Purificación de hexoquinasa de cerebro de pollo	15
1. Preparación del extracto crudo	15
2. Solubilización	15
3. Cromatografía en DEAE-celulosa	16
4. Cromatografía en hidroxilapatita	16
5. Cromatografía en agarosa azul-2	16
6. Filtración en Sephacryl S-300	17
7. Recromatografía en agarosa azul-2	17
Preparación de hexoquinasas de hígado de pollo.	17
Control de pureza	18
Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	18
Electroforesis en condiciones no desnaturantes	20
Determinación de la masa molecular relativa	23
1. Filtración en Sephacryl S-300	23
2. Electroforesis en condiciones no desnaturantes	24
3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	25
Caracterización cinética	26
Preparación de los sueros inmunes	26
1. Suero inmune Anti-hexoquinasa de cerebro de rata	26
2. Suero inmune Anti-hexoquinasa de cerebro de pollo	27



	Página
Caracterización de los antisueros	28
1. Efecto del antisuero sobre la actividad hexoquinásica	28
2. Inmuno-adsorción en placas de plástico (ELISA)	29
2.1 Reactividad inmunológica cruzada con anticuerpos policlonales	29
2.2 Reactividad inmunológica cruzada con anticuerpos monoclonales	30
2.3 Reactividad inmunológica cruzada con antígeno en condiciones nativas	31
Digestión trípica limitada	32
Determinación de la composición aminoacídica	33
RESULTADOS	34
Purificación de hexoquinasa de cerebro de rata	34
Purificación de hexoquinasa de cerebro de pollo	34
1. Preparación del extracto crudo	35
2. Solubilización de la enzima de las mitocondrias	35
3. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa	36
4. Cromatografía en hidroxilapatita	36
5. Cromatografía de pseudo afinidad en agarosa azul-2	38
6. Filtración en Sephacryl S-300	38
Tabla de purificación	42
Control de pureza	42



	Página
Determinación de la masa molecular relativa	42
1. Filtración en Sephacryl S-300	42
2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	45
Parámetros cinéticos	45
Caracterización de los sueros inmunes	49
1. Efecto del suero sobre la actividad enzimática	49
2. Inmuno-adsorción en placas de plástico (ELISA)	53
Reacción inmunológica cruzada entre las hexoquinasas de cerebro de rata y cerebro de pollo	53
1. Inmunoinhibición de la actividad hexoquinásica	57
2. Inmuno-adsorción en placas	57
Movilidades cromatográficas de las hexoquinasas de pollo	58
Reactividad inmunológica de las hexoquinasas de hígado de pollo	60
Reactividad inmunológica entre las hexoquinasas de cerebro de rata y cerebro de pollo utilizando anticuerpos monoclonales	62
Efecto de los anticuerpos monoclonales en la enzima nativa	64
Digestión trípica limitada	69

	Página
Efecto de ligandos en el estado conformacional de hexoquinasa de cerebro de rata y cerebro de pollo	71
Composición aminoacídica de hexoquinasa de cerebro de pollo	82
DISCUSION	85
REFERENCIAS	92

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA I Purificación de hexoquinasa de cerebro de pollo	43
TABLA II Comparación de hexoquinasas A y B de hígado de roedores con hexoquinasas I y II de hígado de aves	59
TABLA III Anticuerpos monoclonales anti-hexoquinasa A de rata	65
TABLA IV Composición aminoacídica de algunas hexoquinasas de mamíferos	83
TABLA V Relación entre hexoquinasas a través del índice de diferencia de composición aminoacídica (SAn)	84

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa	37
Figura 2. Cromatografía en hidroxilapatita	39
Figura 3. Cromatografía de pseudo-afinidad en agarosa azul-2	40
Figura 4. Filtración en Sephacryl S-300	41
Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de hexoquinasa de cerebro de pollo en distintas etapas de purificación	44
Figura 6. Estimación de la masa molecular relativa de hexoquinasa de cerebro de pollo por filtración en Sephacryl S-300	46
Figura 7. Estimación de la masa molecular relativa de hexoquinasa de cerebro de pollo por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	47

	Página
Figura 8. Efecto de la concentración de glucosa en la velocidad inicial de hexoquinasa de cerebro de pollo a varias concentraciones fijas de ATP	48
Figura 9. Efecto de la concentración de ATP sobre la velocidad inicial de hexoquinasa de cerebro de pollo a varias concentraciones fijas de glucosa	50
Figura 10. Influencia del suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de pollo en la actividad de las hexoquinasas de cerebro de rata y cerebro de pollo	51
Figura 11. Influencia del suero inmune anti-hexoquinasa A de rata en la actividad de las hexoquinasas de cerebro de pollo y de rata	52
Figura 12. Titulación del suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de pollo	54
Figura 13. Titulación del suero inmune anti-hexoquinasa A de rata	55

	Página
Figura 14. Reactividad inmunológica cruzada entre hexoquinasas A de rata y cerebro de pollo	56
Figura 15. Perfil de las movilidades cromatográficas de las isoenzimas presentes en hígado de pollo y cerebro de pollo	61
Figura 16. Inhibición de la actividad de las hexoquinasas de cerebro y de hígado de pollo por el suero anti-hexoquinasa de cerebro de pollo	63
Figura 17. Comparación inmunológica de hexoquinasas de cerebro de rata y de cerebro de pollo	66
Figura 18. Comparación inmunológica de hexoquinasas A de rata y cerebro de pollo por ELISA con antígeno en condiciones nativas	68
Figura 19. Digestión trípica de hexoquinasa A de rata y hexoquinasa de cerebro de pollo	70

	Página
Figura 20. Digestión trípica de hexoquinasa B de Novikoff	72
Figura 21. Digestión trípica de hexoquinasa C de Novikoff	73
Figura 22. Electroforesis de hexoquinasa A de rata en gel de poliacrilamida en placa con gradiente transversal	75
Figura 23. Electroforesis de hexoquinasa de cerebro de pollo en gel de poliacrilamida con gradiente transversal	76
Figura 24. Efecto del ATP en la migración electroforética de hexoquinasa A de rata	78
Figura 25. Efecto del ATP en la migración electroforética de hexoquinasa de cerebro de pollo	79
Figura 26. Gráfico de Ferguson para hexoquinasa A de rata en presencia y ausencia de ligando	80

Figura 27. Gráfico de Ferguson para hexoqui-
nasa de cerebro de pollo en presencia
y ausencia de ligando

81

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	:	Seroalbúmina bovina
DEAE-	:	Dietilaminoetil-
EDTA	:	Acido etilendiaminotetracético
ELISA	:	Inmuno-ensayo en fase sólida
FMS	:	Fenazina-metosulfato
Glc	:	glucosa
Glc-6-P	:	glucosa-6-fosfato
kd	:	kilodalton
MCA	:	Anticuerpo monoclonal
MTG	:	Monotioglicerol
NBT	:	Azul de nitrotetrazolio
OPD	:	Ortofenilendiamina
PBS	:	Amortiguador salino de fosfato
PBS-Tween	:	Amortiguador salino de fosfato + Tween 20, 0,05%
PMSF	:	Fenilmetilsufonil-fluoruro
POPOP	:	(1,4-bis 2(5-feniloxazolil) benceno
PPO	:	2,5-difenil oxazol
SDS	:	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	:	N,N,N',N' tetrametiletilendiamina
Tris	:	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TPCK	:	L-1-Tosilamida-2-fenilclorometilcetona

RESUMEN

En cerebro de mamíferos y de pollo se encuentra una actividad hexoquinásica asociada a la mitocondria. En el caso de mamíferos tal actividad corresponde a una isoenzima específica (hexoquinasa A), de las cuatro presentes en varios tejidos. En el caso del pollo no es claro que sea hexoquinasa A la enzima presente en mitocondrias de cerebro. Para abordar este problema se hizo necesario purificar a homogeneidad la actividad hexoquinásica presente en cerebro de pollo, estudiar sus propiedades y establecer sus posibles relaciones de homología con la hexoquinasa A de cerebro de rata.

Se diseñó un protocolo de purificación para la hexoquinasa de cerebro de pollo que implica la solubilización de la enzima de las mitocondrias con glucosa-6-P y cromatografías en DEAE-celulosa, hidroxilapatita, Sephacryl S-300 y agarosa azul-2. La enzima se purificó 219 veces (a partir de las mitocondrias) y se logró una actividad específica de 47 U/mg de proteína. Cuando la preparación se sometía a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, se obtenía un sola banda de proteína. Los valores de K_m para glucosa y ATP de la hexoquinasa de cerebro de pollo fueron 0,13 mM y 0,45 mM, respectivamente. El valor de K_m para glucosa obtenido es diferente al de la isoenzima A de rata (0,06 mM) y similar al de la hexoquinasa B de rata (0,15 mM).

La masa molecular relativa, calculada a partir de los resultados de la filtración a través de Sephacryl S-300 y electroforesis en condiciones desnaturantes, fue aproximadamente 100.000, lo que coincide con el estimado para hexoquinasa A y otras de rata.

Se prepararon sueros inmunes contra hexoquinasa A de rata y hexoquinasa de cerebro de pollo y se caracterizaron por su efecto sobre la actividad de las enzimas que se usaron como antígenos y por microinmuno-ensayo (ELISA). Los sueros inmunes mostraron ser específicos para el antígeno ya que no presentaron reacción cruzada cuando se midió su capacidad de inhibir la actividad hexoquinásica. Sin embargo, estos sueros presentaron reacción cruzada cuando se midió su capacidad de unión a la enzima mediante la técnica ELISA.

Se comparó la reactividad inmunológica de hexoquinasa A de cerebro de rata y de cerebro de pollo por inmunoadsorción en placas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la enzima de rata. Los resultados indicaron que varios de estos anticuerpos reconocen epítomos en la enzima de cerebro de pollo.

Cromatografías en columnas de DEAE-celulosa (en idénticas condiciones) de las isoenzimas de cerebro de rata y de cerebro e hígado de pollo mostraron que la movilidad cromatográfica de la hexoquinasa de cerebro de pollo es diferente a la de la hexoquinasa obtenida de cerebro de rata y, en cambio, es muy similar a la de la hexoquinasa I de hígado de pollo.

La identidad de la hexoquinasa de cerebro y hexoquinasa I de hígado de pollo pudo demostrarse mediante el suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de pollo, el que fue capaz de inhibir la actividad enzimática de la hexoquinasa I pero no de la hexoquinasa II de hígado.

El tratamiento de la hexoquinasa de cerebro de pollo con tripsina generó cuatro fragmentos que tienen aproximadamente las siguientes masas moleculares: 92.000, 63.000, 53.000, 43.000. La hexoquinasa A de cerebro de rata en condiciones similares generó el mismo número de fragmentos cuyas masas aproximadas fueron: 92.000, 64.000, 54.000 y 42.000.

Al comparar la migración electroforética de las enzimas utilizando geles de poliacrilamida en placa con un gradiente transversal de poliacrilamida en condiciones nativas, la hexoquinasa de cerebro de pollo y cerebro de rata presentaron distinto comportamiento en presencia y ausencia de ligandos. En ausencia de ligandos, la isoenzima de cerebro de rata presentó una forma molecular mayoritaria que correspondería al monómero. En las mismas condiciones, la isoenzima de cerebro de pollo presentó varias formas moleculares que corresponderían a monómero, dímero y trímero. En presencia de glucosa-6-P, es posible apreciar dos formas moleculares en la hexoquinasa de cerebro de rata, mientras que en cerebro de pollo hay varias. En presencia de ATP en ambas enzimas predominó el estado monomérico.

La composición aminoacídica de la hexoquinasa de cerebro de pollo es parecida a la de las hexoquinasas de mamíferos.

ABSTRACT

Mammalian brain cells contain an hexokinase activity associated to mitochondria, which has been shown to correspond to hexokinase A, one of the four isozymes found in different tissues. Chicken brain also contains a mitochondrial hexokinase activity, but it is not known to what type of isozyme did it correspond. In order to establish the identity of this hexokinase activity, I have purified chicken brain hexokinase to homogeneity, and studied its properties and possible relationships to rat brain hexokinase A.

The purification procedure employed involved: solubilization of the mitochondrial enzyme with glucose-6-P, followed by chromatography in DEAE-cellulose, hidroxyapatite, Sephacryl S-300 and Agarose Blue-2. The enzyme was purified 219 fold (from mitochondria) and the final specific activity was 47 U/mg. When submitted to run in polyacrilamide-SDS gels, only one band was detected. K_m values for glucose and ATP were 0.13 mM and 0.45 mM, respectively. The K_m for glucose was different to that obtained for the rat brain isozyme (0.06 mM), and similar to that of rat hexokinase B (0.15 mM).

The relative molecular mass, calculated from the results of Sephacryl S-300 chromatography and of the SDS electrophoresis, was approximately 100,000, which agrees well with that estimated for rat hexokinases A, B and C.

Immune sera were prepared against either rat hexokinase A or chicken brain hexokinase. Both sera were characterized related to their effect on the activities of the two enzymes, as well as by ELISA microimmuno-assay. Each serum specifically inhibited only the activity of its corresponding antigen, but it showed cross reactivity when assayed by ELISA.

Monoclonal antibodies to rat hexokinase were used to further clarify the immunological relationship of chicken brain hexokinase to the rat brain hexokinase A. Results revealed that several monoclonal antibodies to rat hexokinase do recognize epitopes in the chicken brain hexokinase.

DEAE-cellulose chromatography of both enzymes (under the same conditions) revealed that the chromatographic mobility of the chicken brain hexokinase was different to that of rat brain hexokinase A, and rather similar to that of chicken liver hexokinase I.

The antiserum prepared against chicken brain hexokinase was able to inhibit the activity of chicken liver hexokinase I, but not that of hexokinase II, thus establishing the immunological identity of those isoenzymes.

Trypsin digestion of chicken brain hexokinase produced four fragments of the following approximate molecular masses: 92,000; 63,000; 53,000 and 43,000. Same treatment of rat brain hexokinase under same conditions produced four fragments: 92,000; 64,000; 54,000 and 42,000.

The two enzymes were also compared by electrophoresis in slab gels with a transverse pore gradient in the absence of denaturing agents. The rat brain isozyme migrated mainly as a monomer in the absence of ligands, while the chicken brain hexokinase migrated as monomer, dimer and trimer. Conversely, in the presence of glucose-6-P, the rat brain isozyme was present in two forms, while that of chicken brain migrated as several forms and the presence of ATP, both enzymes migrated mainly as monomer.

The aminoacid composition of the chicken brain hexokinase was found to be similar to those of other mammalian hexokinases.

INTRODUCCION

La fosforilación de glucosa y otras hexosas es catalizada por enzimas llamadas **hexoquinasas** (ATP: D-hexosa 6-fosfotransferasas, EC 2.7.1.1):



La presencia de formas múltiples de hexoquinasa se estableció por primera vez en el hígado de la rata (Rattus norvegicus) (González y col., 1964), mediante la separación por cromatografía en DEAE-celulosa de cuatro isoenzimas designadas A, B, C y D. Cada isoenzima posee diferentes características cinéticas, distribución tisular y regulación de sus niveles por dieta y hormonas (Niemeyer y col., 1975; Ureta, 1975). Las isoenzimas A, B y C presentan K_m baja para glucosa, entre 0,01 y 0,2 mM, mientras que la isoenzima D tiene una K_m más alta, 5 mM (González y col., 1964; 1967). Esta diferencia puede ser importante en la regulación de la utilización de los carbohidratos. La isoenzima C es además inhibida por glucosa. Los tejidos extrahepáticos presentan las tres fosfotransferasas de baja K_m en proporciones diferentes y características. La isoenzima A predomina en cerebro, riñón y testículos. La isoenzima B es la más importante del tejido adiposo, músculo cardíaco y músculo esquelético. A diferencia de las isoenzimas A y B, la isoenzima C siempre se

encuentra en pequeñas cantidades (Wilson, 1985). La isoenzima D se presenta sólo en hígado y páncreas (Meglasson y col., 1983). En el caso de la isoenzima de hígado sus niveles varían después de modificar la cantidad o naturaleza del alimento (Niemeyer y col., 1963, 1965) y es controlada por el sistema endocrino, especialmente insulina, glucagón y catecolaminas (Salas y col., 1963; Niemeyer y col., 1966, 1967; Ureta y col., 1970).

Las hexoquinasas A, B y C son monómeros de 100.000 (Grossbard y Schimke, 1966) mientras que la hexoquinasa D es un monómero de 50.000 (Pilkis y col., 1968; Cárdenas y col., 1978). Las pruebas disponibles sobre composición de aminoácidos han llevado a postular que las hexoquinasas A, B y C de mamíferos pueden ser el resultado de la duplicación de un gen ancestral (Ureta y col., 1987).

Las isoenzimas A y B se encuentran en apreciable cantidad en la fracción particulada, específicamente en la membrana externa de la mitocondria, mientras que la isoenzima C sólo se ha encontrado en la fracción soluble. Se cree que el principal modo de regulación de la actividad hexoquinásica in vivo ocurre por una unión reversible de la enzima a una proteína específica de la membrana mitocondrial (Wilson, 1985).

En este laboratorio se han realizado numerosos estudios comparativos de los perfiles cromatográficos de las hexoquinasas en vertebrados (Ureta, 1975; 1982), suponiendo que las variaciones cualitativas y cuantitativas encontradas en las diversas especies

estudiadas permitirían intuir qué papel juega cada isoenzima en el metabolismo glucídico (Ureta y col., 1979; Ureta, 1982). Tal suposición ha resultado infundada. En efecto, aún cuando es posible documentar notables diferencias en los perfiles cromatográficos de estas isoenzimas en hígado, tanto a nivel de clase, orden, familia y aún especie, no ha sido posible establecer una correlación entre tales diferencias y la fisiología del metabolismo hidrocarbonado en estos animales (Ureta y col., 1979; Ureta 1982).

Hace algunos años, Ureta y col., (1972, 1973) realizaron estudios cromatográficos de las hexoquinasas de hígado de aves y detectaron la presencia de solo dos isoenzimas, que se semejan a las hexoquinasas A y B de mamíferos, pero diferían de ellas en varios aspectos. Se demostró además que en el hígado de aves no están presentes isoenzimas con propiedades semejantes a las hexoquinasas C y D de mamíferos. Todavía más, un estudio de la ontogenia de las hexoquinasas de pollo mostró dos isoenzimas adicionales en embriones, no expresadas en el hígado adulto, las cuales tampoco corresponden a hexoquinasas C o D (Lagos y Ureta, 1981). Por lo tanto, no es claro cuáles son las relaciones entre las hexoquinasas de aves y las de rata. En extractos de cerebro de pollo se encuentra una sola hexoquinasa la cual está mayormente asociada a las mitocondrias, pero no se conoce su identidad o similitud con la hexoquinasa A típica del cerebro de mamíferos, que también se encuentra unida a las

mitocondrias.

La homologación de las hexoquinasa de aves con las enzimas de mamíferos no es un mero problema de nomenclatura. En efecto, Ureta y col. (1975, 1979) postularon un evento mutacional que habría ocurrido durante la evolución del tronco principal que originó a reptiles superiores y aves, mutación que habría resultado en hexoquinasa diferentes a las de quelonios y mamíferos, pero con conservación de la masa molecular.

Existen pocos estudios comparativos estructurales de las hexoquinasa de vertebrados, principalmente porque sólo ha sido posible purificar a homogeneidad algunas de ellas. Por otra parte, el tamaño de las hexoquinasa (aproximadamente 850 aminoácidos en el caso de las hexoquinasa A, B y C) ha restringido los estudios de secuencia. Por estas razones, las comparaciones entre hexoquinasa han tomado en cuenta características estructurales gruesas, como por ejemplo, la composición de aminoácidos o la reactividad inmunológica cruzada. En este laboratorio, Clark-Turri y col. (1974) prepararon un antisuero que era capaz de inhibir la actividad de la hexoquinasa D obtenida de varias especies de mamíferos. De igual forma Núñez y col. (1985) utilizaron un suero inmune preparado en conejo contra hexoquinasa A aislada de varios mamíferos y encontraron que el suero inmune es capaz de inhibir sólo marginalmente la actividad de la hexoquinasa A de otras especies, aún de aquellas especies muy relacionadas, como el ratón y otros roedores.

La isoenzima apropiada para estudios comparativos inmunológicos y estructurales es la hexoquinasa A, pues se ha acumulado ya mucha información valiosa sobre ella. Los niveles de esta enzima son muy altos en el cerebro de la mayoría de los vertebrados. Una alta proporción de la actividad de hexoquinasa A de cerebro se encuentra asociada a la mitocondria (Crane y Sols, 1953), desde donde puede ser solubilizada específicamente por glucosa-6-P o ATP (Rose y Warms, 1967). Esta característica ha sido aprovechada para establecer un protocolo de purificación para la enzima de rata, que es simple y de alto rendimiento (Chou y Wilson, 1972). La disponibilidad de este protocolo ha permitido la preparación de anticuerpos convencionales (Ouchi e Ishibashi, 1975; Núñez y col., 1985) y monoclonales (Finney y col., 1984; Wilson y col., 1985), de gran potencialidad para estudios evolutivos.

La digestión tróptica limitada (Polakis y Wilson, 1984) de la hexoquinasa de cerebro de rata genera tres péptidos cuyas masas moleculares son: 10.000 (situado en el extremo N-terminal), 50.000 y 40.000 (situado en el extremo C-terminal). Los fragmentos corresponderían a los principales dominios estructurales de la enzima. Los sitios de unión para ATP y glucosa se han localizado en el fragmento C-terminal (Nemat-Gorgani y Wilson, 1986; Schirch y Wilson, 1987). El sitio de unión para glucosa-6-P, un inhibidor alostérico de hexoquinasas, parecería residir en el fragmento de 50.000 (Polakis y Wilson, 1985).

En esta tesis nos proponemos estudiar la relación que existe entre la hexoquinasa A de cerebro de mamíferos y la hexoquinasa presente en cerebro de aves, lo cual puede abordarse comparando la isoenzima de cerebro de pollo con la hexoquinasa A de rata, principalmente porque disponemos de un protocolo de purificación para la enzima de cerebro de rata y de una batería de anticuerpos monoclonales anti-hexoquinasa A de cerebro de rata (Finney y col., 1984; Wilson y col., 1985) que ofrecen una alternativa para comparar estas isoenzimas. Más aún, los epítomos reconocidos por varios de estos anticuerpos monoclonales han sido localizados en regiones específicas de la molécula de hexoquinasa A de cerebro de rata (Wilson y col., 1985).

La mayoría de estos anticuerpos anti-hexoquinasa A no presentan reacción cruzada con las hexoquinasas B, C o D (observaciones no publicadas de este laboratorio). Por ello, la presencia de epítomos de hexoquinasa A de rata en algunas hexoquinasas de pollo indicaría homología entre ambas enzimas.

La digestión trípica, por otra parte, ofrece una herramienta adicional para comparar las relaciones estructurales entre ambas enzimas.

Este trabajo tiene por finalidad establecer la homología de la hexoquinasa de cerebro de pollo con la hexoquinasa típica de cerebro de mamíferos, utilizando las técnicas de inmuno-reactividad y la digestión trípica limitada.

Para cumplir con estos propósitos fue necesario:

- Purificar la hexoquinasa de cerebro de rata por el método de Chou y Wilson (1972) modificado por Polakis y Wilson (1984).
- Purificar hexoquinasa de cerebro de pollo. Para ello se utilizó un protocolo que consiste en la solubilización de la enzima desde las mitocondrias y cromatografías en DEAE-celulosa, hidroxilapatita, filtración en gel y cromatografía de pseudo-afinidad.
- Preparar antisueros policlonales para ambas enzimas en conejo, y estudiar su reactividad cruzada.
- Estudiar el efecto de anticuerpos monoclonales anti-hexoquinasa A de rata en la hexoquinasa obtenida de cerebro de pollo.
- Estudiar el efecto de algunos ligandos sobre las enzimas que se comparan, utilizando electroforesis en condiciones nativas.
- Además, se hizo una caracterización global de la enzima de pollo: masa molecular, movilidad cromatográfica, propiedades cinéticas, para comparar con la información disponible para la hexoquinasa A de rata.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

De Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo. E.E.U.U., se obtuvieron los siguientes reactivos: NAD^+ , ATP, D-glucosa, glucosa-6-fosfato, Tris, acrilamida, bis-acrilamida, glicina, fenazina-meta-sulfato, azul de nitrotetrazolio, Tripsina, TPCK, o-fenilendiamina, monotioglicerol, dodecilsulfato de sodio, fenilmetilsulfonilfluoruro, azul de Coomassie R, azul de Coomassie G, azul de dextrano 2.000, Tritón X-100, 2-mercaptoetanol, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa de Leuconostoc mesenteroides, catalasa de hígado de buey, aldolasa de músculo de conejo, ovoalbúmina, albúmina bovina, hexoquinasa de levadura, citocromo c de corazón de caballo, marcadores de masa molecular conocida. De Amersham/Searle Illinois, E.E.U.U., se obtuvieron: POPOP y PPO y, ^{14}C lisina de New England Nuclear (Boston E.E.U.U.). De Cappel (West Chester. Pa), IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rabanito. De Difco Laboratories (Detroit, MI), coadyuvante de Freund, completo e incompleto. De Polysciences (Washington, E.E.U.U.), se obtuvo TEMED y persulfato de amonio.

Material cromatográfico

El material para cromatografías se obtuvo de diferentes fuentes: DEAE-Celulosa, de Pharmacia (Uppsala, Suecia), hidroxilapatita, de Bio-Rad Laboratories (California, E.E.U.U.), Sephacryl S-300 y Reactive Blue 2-Agarose, de Sigma Chemical Co. St. Louis (Mo. E.E.U.U.).

Material biológico

Se utilizaron los siguientes materiales:

Cerebros de rata (Rattus norvegicus, tipo Sprague-Dawley), obtenidos del Instituto de Salud Pública de Chile.

Cerebros e hígados de pollos (Gallus domesticus, variedad broiler) donados por Avícola Ariztía Ltda.

Conejos (Oryctolagus cuniculus, albino) del Instituto de Salud Pública de Chile.

Soluciones de uso frecuente

Solución A:	Monotioglicerol 10 mM, glucosa 10 mM.
Solución B:	Tris-HCl 10 mM, glucosa 10 mM monotioglicerol 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0.
Solución C:	Fosfato de potasio 5 mM, glucosa 10 mM, monotioglicerol 10 mM, pH 7,0.
Solución D:	Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM.
Solución E:	Fosfato de sodio 50 mM pH 8,0.
Solución F:	Fosfato de sodio 0,1 M, EDTA 0,5 mM, monotioglicerol 10 mM, glucosa 10 mM, pH 7,0.
PBS :	Fosfato de sodio 10 mM, NaCl 154 mM, pH 7,0.
PBS-Tween:	Fosfato de sodio 10 mM, NaCl 154 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,0.

METODOS

Medición de actividad

La actividad fosforilante de glucosa se medía con un ensayo espectrofotométrico acoplado la formación de glucosa-6-P con la reducción de NAD^+ en presencia de glucosa-6-P deshidrogenasa (Ureta y col., 1981). La formación de NADH se seguía a 340 nm en un espectrofotómetro Zeiss termorregulado a 30° en 0,5 ml de medio que contenía (concentraciones finales): KCl 10 mM, Tris HCl 100 mM (pH 7,5), MgCl_2 12,6 mM, ATP 5 mM, glucosa 0,5 mM EDTA 1,6 mM, NAD^+ 0,5 mM y 0,1 U de glucosa-6-P-deshidrogenasa de Leuconostoc mesenteroides. Como blanco de la reacción se usaba el mismo sistema de incubación, pero omitiendo el ATP. Una unidad de actividad hexoquinásica se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 mol de glucosa-6-P en las condiciones señaladas.

Medición de proteínas

La concentración de proteínas de los eluidos de cada columna se determinaba midiendo la absorbancia a 280 nm. Para calcular la actividad específica de cada etapa de purificación se determinaba la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976). Para este fin, se confeccionaba una curva de calibración con soluciones de seroalbúmina a diferentes concentraciones hasta

100 $\mu\text{g/ml}$. La concentración de hexoquinasa de cerebro de rata se determinaba por la absorbancia a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de $5,1 \times 10^4 \times \text{cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$ (Chou y Wilson 1972). La concentración de tripsina también se determinaba a 280 nm basándose en que una solución de 1 mg/ml posee una absorbancia de 1,45 (Polakis y Wilson, 1984).

Determinación de la concentración de sales en solución

Las concentraciones de KCl de las fracciones eluidas desde las columnas cromatográficas de DEAE-celulosa y las concentraciones de fosfato de las fracciones eluidas desde las columnas de hidroxilapatita se determinaban utilizando un conductímetro Radiometer calibrado con soluciones estándar de KCl en la solución B y de fosfato de potasio en la solución C.

Preparación y regeneración de los materiales cromatográficos

1. DEAE-celulosa

DEAE-celulosa microgranular (DE-52) se suspendía en 5 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 10 mM, y EDTA 1 mM, pH 7,0 y se eliminaba el material fino por decantación repetida. Finalmente se suspendía el intercambiador en el mismo amortiguador, pero adicionado de 10 mM glucosa y 10 mM de MTG. La suspensión se desgasificaba durante 30 min mediante una bomba de vacío y se empacaba en una columna de 1,8 cm de diámetro por 20 cm de

altura. Después de la cromatografía, el intercambiador se regeneraba colocando la suspensión de DEAE-celulosa en un embudo Büchner provisto de papel filtro Whatman 1, conectado a un sistema de vacío. El intercambiador se trataba con 10 volúmenes de HCl 0,5 M, seguidos de 15 volúmenes de agua desionizada y de 10 volúmenes de NaOH 0,5 N y finalmente de 15 volúmenes de agua desionizada hasta pH neutro.

2. Hidroxilapatita

Se mezclaban hidroxilapatita y celulosa en partes iguales (p/p); la mezcla se suspendía en 5 volúmenes de agua desionizada y se dejaba sedimentar para remover el material fino. Esta operación se repetía varias veces. Posteriormente se suspendía la mezcla en el amortiguador adecuado (solución C). Después de ser usada, la hidroxilapatita se regeneraba lavándola con solución de fosfato de potasio 0,4 M y posteriormente con agua.

3. Sephacryl S-300

Se hidrataba y equilibraba en solución B adicionado de KCl 100 mM. Después de usar, se lavaba exhaustivamente con la solución B, que contenía KCl 100 mM, en la misma columna.

4. Agarosa azul-2

Se equilibraba la resina (Cibacron Blue 3GA-Agarosa) en la solución B y se empacaba la columna. Después de la cromatografía

fía la resina se lavaba con 2 volúmenes de KCl 2 mM, 3 volúmenes de KCl 2 M y urea 6 M, y 2 volúmenes de KCl 2 M. Finalmente se lavaba con agua desionizada hasta que la solución de lavado tuviera la conductividad del agua.

Purificación de hexoquinasa de cerebro de rata

Se utilizaba el procedimiento de Chou y Wilson (1972) modificado por Polakis y Wilson (1984) que se resume como sigue:

Los cerebros de rata (aproximadamente 45 g) se homogeneizaban con 250 ml de una solución compuesta por 10 mM y glucosa 10 mM (Solución A). El homogeneizado se centrifugaba a 1.000 g por 20 min a 4°. El precipitado se eliminaba. El sobrenadante se llevaba a pH 8,2 y se centrifugaba a 40.000 x g por 20 min a 4°C. Se descartaba el sobrenadante y las mitocondrias se suspendían en la misma solución anterior manteniendo el pH en 8,2. La operación se repetía tres veces. Las mitocondrias lavadas se suspendían finalmente en 200 ml de solución A y se mantenía a pH 8,2.

La enzima se solubilizaba por adición de glucosa-6-P 1 mM ajustada a pH 7,0 y posterior incubación a 20° por 30 min con agitación ocasional. Después de la incubación la suspensión se centrifugaba a 105.000 x g por 45 min a 10°.

El líquido sobrenadante (180 ml) que contenía la enzima se cromatografiaba en una columna de DEAE-celulosa (20 x 1,8 cm), previamente equilibrada con solución B. La hexoquinasa se

elufa con KCl en un gradiente lineal de 0 a 0,3 M, en la solución B en un volumen total de 760 ml.

Las fracciones con mayor actividad específica se concentraban y dializaban en un aparato de filtración Amicon, con membrana PM 10.

Para eliminar contaminantes menores se usaba además una cromatografía en columna (10 x 0,6 cm) de agarosa azul-2 tipo 3000. La enzima se elufa con ATP 5 mM en la solución B.

Purificación de hexoquinasa de cerebro de pollo

1. Preparación del extracto crudo

Los cerebros (180 g), de pollo, 1 hora después de faenados, se homogeneizaban en solución A. El homogeneizado se centrifugaba a $1000 \times g$ durante 20 min a 4°. El líquido sobrenadante obtenido se ajustaba a pH 8,2 y se centrifugaba a $40.000 \times g$ por 30 min a 4°. Las mitocondrias así obtenidas se lavaban con 1 litro de solución A y se suspendían finalmente en 2 litros de solución de homogeneización (10 ml/g cerebro) a pH 8,2.

2. Solubilización

La enzima se solubilizaba por adición de glucosa-6-P 1 mM y posterior incubación a 10° por 18 hr. Después de la incubación la suspensión se centrifugaba a $105.000 \times g$ por 45 min a 4°.

3. Cromatografía en DEAE-celulosa

El líquido sobrenadante que contenía la enzima (aproximadamente 1800 ml) resultante de la centrifugación a $105.000 \times g$, se cromatografiaba en una columna de DEAE-celulosa (20 x 1,8 cm), equilibrada en solución B. La hexoquinasa se eluía con KCl en un gradiente de concentración lineal de 0 a 0,3 M, en la solución B utilizando un volumen total de 760 ml. Las fracciones con mayor actividad se concentraban hasta un volumen de 5 ml. Luego se diluía hasta 150 ml con solución C y se concentraba nuevamente. Este proceso se repetía dos veces.

4. Cromatografía en hidroxilapatita

La fracción obtenida en el paso anterior se aplicaba a una columna (14 x 1,2 cm) de hidroxilapatita, equilibrada en la solución C. La columna se lavaba con solución C y la enzima se eluía con fosfato en un gradiente lineal entre 0,05 a 0,4 M, en un volumen total de 360 ml.

5. Cromatografía en agarosa azul-2

Se usaba una columna (10 x 0,7 cm) de pseudo-afinidad, agarosa azul-2 tipo 3000, equilibrada en la solución B. Se cromatografiaban las fracciones con mayor actividad, provenientes de la cromatografía en hidroxilapatita. Después de aplicar la muestra, la columna se lavaba con solución B, a la que se añadía KCl 150 mM. La enzima se eluía con solución B enriqueci-

da con KCl 150 mM y ATP 10 mM.

6. Filtración en Sephacryl S-300

Se aplicaba una muestra, obtenida de la etapa anterior, concentrada y dializada en solución B adicionada de KCl 100 mM, no mayor de 4 ml, a una columna (75 x 2,5 cm), equilibrada en solución B con KCl 100 mM. La enzima se eluía con esta misma solución y se colectaban fracciones de 2 ml con un flujo de 0,5 ml/min.

7. Recromatografía en agarosa azul-2

Con el objeto de eliminar pequeñas impurezas se realizaba una recromatografía en agarosa azul-2, usando el procedimiento ya descrito.

Preparación de hexoquinasas de hígado de pollo

Se preparaba un homogeneizado con 70 g de hígado de pollo (1 hora después de removido) en 210 ml de solución D, usando un homogeneizador Potter Elvehjem. El homogeneizado se centrifugaba a $105.000 \times g$ durante 60 min. El líquido sobrenadante se cromatografiaba en una columna (20 x 1,8 cm) de DEAE-celulosa. Las isoenzimas retenidas se eluían con KCl en una gradiente lineal entre 0 a 0,5 M en solución D (Ureta y col., 1972).

Control de pureza

La pureza de las fracciones obtenidas se analizaba por electroforesis en placas de gel de poliacrilamida con SDS, preparadas con un gradiente de acrilamida entre 6,5 y 20%, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970).

Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS 0,1% se realizaba según el método de Laemmli (1970). Los geles se preparaban en placas con una gradiente de acrilamida entre 6,5 y 20%. Se utilizaban las siguientes soluciones:

1. Tris-HCl 1 M pH 8,8: para 100 ml de solución 12,1 g de Tris; se llevaba a pH 8,8 con HCl y luego se agregaba agua desionizada c.s.p. 100 ml.
2. Tris HCl 1 M pH 6,8. Para 100 ml de solución 12,1 g de Tris, se llevaba a pH 6,8 con HCl y se agregaba agua desionizada c.s.p. 100 ml.
3. Tris-glicina 0,375 M; SDS 0,1%: Para un litro de solución 3 g Tris 14,4 g de glicina, 1 g SDS y agua desionizada c.s.p. 1000 ml; pH 8,3.
4. Acrilamida 35,4%-Bis 0,62 (p/v): Para 100 ml 35,4 g acrilamida, 0,62 g bis-acrilamida.
5. 10 g de dodecilsulfato de sodio y agua desionizada c.s.p. 100 ml.
6. 0,5 g persulfato de amonio y agua desionizada c.s.p. 5 ml.

Preparación de la placa de poliacrilamida-SDS en gradiente

a) Solución con 6,5% de acrilamida

4,4 ml de agua desionizada; 3,7 ml de solución 1, 1,83 ml de solución 4; 0,1 ml de solución 5, 0,012 ml de TEMED, 0,012 ml de solución 6.

b) Solución con 20% de acrilamida

0,6 ml de agua desionizada, 3,7 ml de solución 1, 5,73 ml de solución 4, 0.1 ml de solución 5, 4 μ l TEMED, 0,023 ml de solución 6.

c) Solución al 5% de acrilamida (concentrador)

5,4 ml de agua desionizada; 1 ml de solución 2, 1 ml de solución 4, 0,1 ml de solución 5, 7,5 μ l de TEMED, 37,5 μ l de solución 6.

Inmediatamente de agregada la solución 6, se vaciaban las soluciones a un aparato Buchler Instruments, que posee dos cámaras conectadas en el fondo con una llave de paso y un sistema de agitación regulable para obtener una mezcla con una perturbación mínima y una salida a la que se conecta un capilar. Se abría la llave de paso y el extremo del capilar conectado a la cámara con agitación se colocaba al fondo de las placas de vidrio, el capilar se retiraba a medida que la mezcla en gradiente de acrilamida se vaciaba. Después de vaciar toda la mezcla se colocaban 5 ml de agua desionizada. La polimerización de la acrilamida se realizaba en presencia de luz fluorescente blanca a temperatura ambiente.

El gel concentrador se hacía a una concentración de acrilami-

da al 5%. Después de vaciar la mezcla sobre el gel separador se sumergía un espaciador que permitía, una vez polimerizado el gel, formar los pocillos para colocar las muestras de proteínas.

A un volumen de muestra, que contenía entre 5 a 40 μg de proteína, dependiendo de la etapa de purificación que se analizaba, se le adicionaba un volumen de la mezcla desnaturalante (SDS 5%) 2-mercaptoetanol 10%, Tris-HCl 75 mM, pH 6,8; glicerol 20% e inmediatamente se hervían a 100° durante 5 min. Luego se enfriaba y se agregaban 5 μl de una solución de azul de bromofenol 0,04% y se sembraba en la placa de poliacrilamida.

Para realizar la electroforesis se usaba el amortiguador Tris-glicina 375 mM pH 8,3. La electroforesis se hacía habitualmente a voltaje constante; se mantenía a 150 voltios hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol) migraba al inicio del gel separador y se mantenía en 200 voltios hasta que el colorante migraba al final del gel (generalmente 4 horas). Una vez terminada la electroforesis el gel se fijaba en una solución de metanol 46% y ácido acético 8%. La tinción de proteínas se hacía por incubación del gel durante 3 horas con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 0,1%, Isopropanol 45%, ácido acético 9,2%. Los geles se desteñían hasta fondo claro con una solución que contenía 10% de ácido acético y 10% de metanol.

Electroforesis en condiciones no desnaturalantes

Se utilizaba el procedimiento descrito por Davis (1964),

modificado por Retamal y Babul (1988). Se utilizaban geles en placa con un gradiente transversal (4-18%) de poliacrilamida. Las dimensiones del gel eran 8,5 x 5,5 cm 0,75 mm.

Se utilizaban las siguientes soluciones:

Solución A: 100 ml de acrilamida 28% y bisacrilamida 0,735% (bisacrilamida/acrilamida = 0,026).

Solución B: 100 ml de Tris-HCl 3 M, 0,23% de TEMED, pH 8,5 (36,38 Tris, 48 ml HCl 1 N, 0,23 ml de TEMED).

Solución C: 10 ml de persulfato de amonio 6%.

Solución D: 100 ml de acrilamida 10% y bisacrilamida 2,5% (bisacrilamida/acrilamida = 25).

Solución E: 100 ml de Tris-HCl 0,5 M, 0,46% de TEMED, pH 6,7 (5,98 g de Tris, 48 ml HCl 1N, 0,46 ml de TEMED).

Solución F: 50 ml de riboflavina 0,004%.

Solución G: 100 ml de sacarosa 40%.

El gradiente lineal de acrilamida entre 6,5 y 20% se preparaba a partir de las siguientes soluciones:

1. Solución 4% acrilamida

0,285 ml de la solución A, 0,25 ml de solución B, 0,02 ml de efector (ATP o glucosa o glucosa-6-P), 0,23 ml de solución C, agua desionizada hasta completar 2 ml.

2. Solución con 18% acrilamida

1,285 ml de solución A, 0,25 ml de solución B, 0,02 ml de efector, 0,023 ml de C y agua desionizada para completar 2 ml.

3. Solución con 3% acrilamida (gel concentrador).

0,75 ml de solución D, 0,375 ml de solución E, 0,375 ml de solución F y 1,5 ml de solución G.

El gradiente lineal se construyó con un aparato Buchler Instruments. Después de la polimerización, la placa se giró en 90°, de esta forma el gradiente queda de izquierda a derecha (18-4%); el gel concentrador fue de 3% de acrilamida.

Para el desarrollo de la electroforesis la muestra se dializaba en el amortiguador de los electrodos, Tris-glicina pH 8,3, diluido 1:5, adicionado de EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 0,1%. Se colocaban 3 µg de proteína por canal, previamente incubada por 1 hora con amortiguador fosfato de potasio 1 mM y NaCl 50 mM, pH 6,9 y ATP 2 mM o glucosa-6-P 0,5 mM o glucosa 1 mM. A cada volumen de muestra se agregaba una gota de glicerol al 20% y 1 µl de azul de bromofenol 0,04%. El amortiguador de electroforesis usado era el descrito por Davis (1964): Tris 495 mM, glicina 38,4 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3, en el polo positivo. En el polo negativo se usaba el mismo amortiguador, pero adicionando 2-mercaptoetanol 0,1% y el efector cuando se indicaba.

Los minigeles se realizaban en un aparato vertical (minigel Unit, Modelo M.E.V.-100 de CBS Scientific Co.) a temperatura ambiente. La electroforesis se llevaba a cabo a 100 voltios hasta la interfase entre el gel concentrador y el separador. Después se continuaba con 130 voltios hasta que el marcador alcanzaba el borde del gel separador (en la parte correspondiente a la menor concentración de acrilamida).

La tinción de proteínas se efectuaba por incubación del gel con azul de Coomassie G-250 al 0,04% de ácido perclórico al 3,5% (p/v), por 5 min. Posteriormente se destañía hasta fondo claro con una solución compuesta de ácido acético al 7%.

Para la tinción de actividad enzimática se incubaba el gel en un medio igual al descrito para el ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática, pero adicionado de FMS (0,04 mg/ml) y NBT (0,4 mg/ml) (Katzen y col. 1965).

Determinación de la masa molecular relativa

1. Filtración en Sephacryl S-300

La masa molecular en condiciones nativas se estimaba por filtración en gel (Andrews, 1964), usando una columna (75 x 2,5 cm) de Sephacryl S-300, calibrada con proteínas de masa molecular relativa conocida: catalasa (M_r : 230.000); aldolasa (M_r : 158.000); seroalbúmina (M_r : 66.000); hexoquinasa de levadura (M_r : 50.000); ovoalbúmina (M_r : 45.000); y citocromo c (M_r : 12.500). Para la cromatografía se utilizaba la misma columna usada con fines preparativos descrita en el protocolo de purificación de hexoquinasa de cerebro de pollo.

La concentración de las proteínas de referencia era de 1,5 mg/ml. La columna se sembraba con un volumen de 3 ml de la solución de proteínas. Igual volumen se usaba para la proteína problema.

El volumen de exclusión (V_o) se determinaba usando Azul de

Dextrano 2000 y el volumen total accesible al solvente (V_i) se determinaba usando ^{14}C -lisina (100.000 cpm).

El volumen de elución (V_e) que corresponde a la concentración máxima de soluto se determinaba a partir de un diagrama de elución, extrapolando ambos lados del pico de soluto a un punto de confluencia. Para la estimación de la masa molecular relativa de la enzima se confeccionó una gráfica del coeficiente de distribución $K_d = (V_e - V_o) / (V_i - V_o)$ en función de la masa molecular relativa de las proteínas estándar utilizadas.

Catalasa, aldolasa, seroalbúmina y ovoalbúmina se detectaban midiendo la absorbancia a 280 nm. Citocromo c y Azul de Dextrano se medían por la absorbancia a 414 nm y 630 nm, respectivamente. Las hexoquinasas se detectaban midiendo su actividad enzimática, como se describe en Métodos. La ^{14}C -lisina se medía en un contador de centelleo Phillips DW 4503, en una mezcla de centelleo que se preparaba agregando 2 partes de una solución que contenía 50 mg de POPOP y 4 g de PPO en un litro de tolueno, más una parte de Tritón X-100.

2. Electroforesis en condiciones no desnaturalantes

La masa molecular relativa de las hexoquinasas que se comparan se determinaba por el método descrito por Retamal y Babul (1988) en el que se usaba un gel con un gradiente transversal de poliacrilamida. Después de realizada la electroforesis se medía el largo del gel y se dividía por 14, de tal forma

que un extremo del gel correspondía al 4% y el otro extremo al 18% de acrilamida. Luego se medía la distancia recorrida por la muestra y por el frente (Azul de bromofenol) en cada uno de los porcentajes de acrilamida del gel para obtener la movilidad relativa (R_f) de la proteína en cada caso. Luego se graficaba $100 \log (R_f \times 100)$ en función del porcentaje del gel, obteniéndose líneas rectas con pendientes negativas (Hedrick y Smith, 1968). La determinación de la masa molecular de las proteínas en condiciones nativas se obtiene al interpolar el valor de su pendiente en una gráfica de pendientes negativas con respecto a la masa molecular de las proteínas estándar (Gráfico de Ferguson).

Se utilizaban las siguientes proteínas marcadoras: lactoalbúmina (M_r :14.200); anhidrasa carbónica (M_r : 29.000); ovoalbúmina (M_r : 45.000); seroalbúmina (M_r : 66.000, monómero y M_r : 132.000, dímero); ureasa (M_r : 24.000, dímero y M_r : 480.000, tetrámero).

3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Se determinaba la masa molecular relativa de la enzima en condiciones desnaturantes por electroforesis en geles de poliacrilamida en un gradiente lineal de 6,5-20%, descrito más arriba. Se utilizaban las siguientes proteínas como marcadores: lisozima (M_r : 14.300), lactoglobulina (M_r : 18.400), pepsina (M_r : 34.700), ovoalbúmina (M_r : 45.000), seroalbúmina bovina (M_r : 66.200), fosforilasa b (M_r : 92.500), β -galactosidasa (M_r : 116.250) y cadena H de miosina (M_r : 200.000). Las bandas de proteínas se teñían con azul de Coomasie R-250.

Para la estimación de la masa molecular relativa de la hexoquinasa de cerebro de pollo, se confeccionó un gráfico de la movilidad electroforética relativa en función de la masa molecular relativa de las proteínas estándar.

Caracterización cinética

El efecto de la concentración de los sustratos en la actividad enzimática de hexoquinasa de cerebro de pollo fue analizada midiendo las velocidades iniciales de reacción y variando la concentración de cada sustrato a diferentes concentraciones fijas del otro sustrato. Se usaba una concentración fija de ATP de 0,5 a 5 mM y concentraciones variables de glucosa entre 0,025 a 0,5 mM, y una concentración fija de glucosa de 0,025 a 0,5 mM a concentraciones variables de ATP entre 0,5 a 5 mM. Los datos de velocidad inicial se presentan en gráficas convencionales de dobles recíprocos (Lineweaver y Burk, 1934), con las cuales se confeccionaban las gráficas secundarias y se calculaba el valor de la constante de Michaelis (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}).

Preparación de los sueros inmunes

Suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de rata

Se utilizó un conejo hembra albino. Previo a la inmunización, se le extrajeron 15 ml de sangre para obtener un suero control. Luego se inyectó subcutáneamente, en las patas traseras y en el lomo, una suspensión que contenía 1 mg de hexoquinasa de cerebro de rata pura en coadyuvante de Freud completo y

solución B. Las inyecciones se repitieron 3 veces cada 4 semanas, con menor cantidad de enzima, (aproximadamente 500 μ g), suspendida en coadyuvante incompleto y solución B. Diez días después de la 2° y 3° inyección se controló la capacidad del suero para inhibir la actividad enzimática. Después de la 3° inyección se obtuvo un título de 1/164 y se extrajeron 25 ml de sangre. La sangre extraída se dejó a temperatura ambiente hasta que se retrajera el coágulo. Posteriormente se centrifugó durante 10 min. El suero se guardaba a -20° , en fracciones de 1 ml.

Suero inmune antihexoquinasa de cerebro de pollo

Para la preparación de un suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de pollo, se utilizó el mismo procedimiento descrito para la obtención del suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de rata, pero utilizando menor cantidad de enzima pura en la primera inyección (aproximadamente 500 μ g).

Purificación de las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (1,5 ml) de tipo IgG se separaron del resto de las proteínas mediante cromatografía en columna (1,5 ml) empacada con proteína A Sepharose CL-4B, equilibrada con solución E. Por la columna se pasaba 1 ml de suero inmune o suero control y se lavaba con 5 volúmenes del amortiguador fosfato. Posteriormente las IgG se elúan con ácido acético 0,1 N y NaCl 0,15 M. Se colectaban fracciones de 0,6 ml que se

recibían en 100 μ l de Tris-HCl 1 M pH 7,0, con el objeto de neutralizar el ácido. La absorbancia de las distintas fracciones se medía a 280 nm.

Caracterización de los antisueros

1. Efecto del antisuero sobre la actividad hexoquinásica

Preparaciones puras de hexoquinasa de cerebro de rata y cerebro de pollo (2 U) diluídas en PBS-BSA 1% se incubaban con cantidades variables de suero inmune (0-18 μ l) anti-hexoquinasa de cerebro de rata o de suero control en un volumen final de 100 μ l y suero inmune (0-16 μ l) anti-hexoquinasa de cerebro de pollo o de suero control en un volumen final de 50 μ l. Después de incubar durante 30 min a 30° y 18 h a 4°, se centrifugaba la mezcla durante 10 min en una microcentrífuga Gélman-Hawksley, y se ensayaba la actividad enzimática en los líquidos sobrenadantes.

Los sueros no presentaban actividad hexoquinásica al ensayar esta actividad en las condiciones indicadas arriba.

Titulación de los sueros inmunes

Cantidades variables de hexoquinasa de rata o pollo (0-2 U), diluidas en PBS-BSA 1% se incubaban con 4 μ l del antisuero correspondiente, en un volumen final de 100 μ l para la hexoquinasa de cerebro de rata y 50 μ l para la hexoquinasa de cerebro de pollo, durante 30 min a 30° y después por 18 horas a 4°.

Se hicieron ensayos paralelos para cada enzima en que se reemplazaba el suero inmune por la misma cantidad de suero normal. La mezcla se centrifugaba durante 10 min y se determinaba la actividad enzimática remanente en una alicuota del sobrenadante.

2. Inmunoadsorción en placas de plástico (ELISA)

2.1 Reactividad inmunológica cruzada con anticuerpos policlonales

Se estudiaba la reactividad antigénica cruzada entre las hexoquinasas de cerebro de pollo y cerebro de rata utilizando un método indirecto ELISA (Lawrence y Trayer, 1984) que consiste en adsorber el antígeno a la superficie de los pocillos de una placa de plástico. Posteriormente se agregaba el antisuero y se cuantificaban los anticuerpos unidos específicamente al antígeno por adición de anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. La enzima unida se detectaba por adición del sustrato o-fenilendiamina y medición espectrofotométrica de la o-fenilendiamina oxidada. Como controles en todos los experimentos se usaban sueros preinmunes como primer anticuerpo y seroalbúmina de bovino como antígeno. Las celdas se cebaron con 100 μ l de las preparaciones puras de las hexoquinasas (10 μ l por ml) en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 6,0, durante toda la noche a 4°. Después de cebar las placas se lavaban 4 veces con PBS-Tween. Se hicieron 24 diluciones seriadas del antisuero policlonal, transfiriendo sucesivamente 100 μ l de muestra a una celda que contenía

100 μ l de PBS. Se incubaba 1 hora a 20° en cámara húmeda. Después de lavar se agregaba el segundo anticuerpo (100 μ l de anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa), diluido 1:1000 con PBS. Después de incubar 30 min a temperatura ambiente se lavaba y colocaban 100 μ l del reactivo de color (o-fenilendiamina al 0,04% (p/v) y peróxido de hidrógeno) 0,01% (v/v) en ácido cítrico 50 mM pH 4,0. Después de 30 min se detenía la reacción por la adición de 100 μ l de H₂SO₄. La absorbancia de cada celda se leía a 490 nm.

2.2 Reactividad inmunológica cruzada con anticuerpos monoclonales

La reactividad inmunológica de hexoquinasa de cerebro pollo con anticuerpos monoclonales específicos, obtenidos contra la enzima de cerebro de rata, se estudiaba por ELISA. Los anticuerpos fueron cedidos por el Dr. John E. Wilson (Michigan State University, U.S.A). Se utilizaba un ensayo ELISA esencialmente como describen Ureta y col., (1986). Se cebaban las placas con preparaciones puras de hexoquinasas de cerebro de pollo y de cerebro de rata con 100 μ l de una solución de 5 μ g/ml en amortiguador carbonato de sodio 50 mM pH 9,6 y se incubaban toda la noche a 4°. La placa se lavaba cuatro veces con PBS-Tween. Se colocaban 100 μ l de medio (que contenía los anticuerpos monoclonales o el control) en cada celda y se incubaba por 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las celdas se lavaban cuatro veces con PBS-Tween y se colocaban 100 μ l de una dilución de anti IgG de ratón

conjugada con peroxidasa (1/1000 en PBS-Tween más BSA al 0,2%), en cada celda. Después de incubar la placa por una hora se lavaba nuevamente y se colocaban 100 μ l del reactivo de color en cada celda (o-fenilendiamina 4 mg/10 ml, y 1 μ l/ml de H_2O_2 al 30% en amortiguador). El color se desarrollaba en 4 min y la reacción se detenía por adición de 100 μ l de H_2SO_4 4 N.

2.3 Reactividad inmunológica cruzada con anticuerpos monoclonales con antígenos en condiciones nativas

Las placas se cebaron con 100 μ l de los antisueros policlonales (purificados en proteína A Sepharose) en una solución que contenía 10 μ g/ml de antisuero, en amortiguador borato de sodio pH 8,5. Las placas se incubaron toda la noche a 4°, se lavaron con PBS-Tween, se incubaron por 1,5 h con una solución de gelatina 0,5% en amortiguador borato de sodio 50 mM, pH 8,5 para bloquear los sitios de unión a proteínas. Después de lavar, las placas se incubaron por 1,5 h con una solución (100 μ l por celda), que contenía 10 μ g/ml de hexoquinasa purificada en PBS-Tween y 0,2% BSA. Después del tratamiento, las placas se lavaron con PBS-Tween y se agregó 100 μ l de medio de cultivo que contenía los anticuerpos o el medio control, y las placas se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Luego de lavar, las placas se incubaron por otra hora con una dilución 1:1000 de peroxidasa de rabanito conjugada con inmunoglobulina anti-IgG de ratón (100 μ l por celda). La actividad peroxidasa absorbida se detectaba con 2,2 mM de o-fenilendiami-

na, 0,03% H_2O_2 en 50 mM de citrato, pH 4,0 (100 μ l por celda). La reacción se detuvo por la adición de H_2SO_4 4 N, (100 μ l por celda). La absorbancia se leía a 490 nm.

Digestión trípica limitada

Las hexoquinasas purificadas se suspendían en solución F y se guardaban a -20° . La digestión trípica se realizaba en la misma solución, manteniendo una concentración de 0,5 mg/ml de proteína aproximadamente.

La hexoquinasa de cerebro de rata se incubaba con tripsina (0,1 mg/ml) tratada con TPCK, a temperatura ambiente, manteniendo una relación de 1:5 (p/p) de tripsina y hexoquinasa. Para la hexoquinasa de cerebro de pollo la incubación se realizaba con tripsina (0,05 mg/ml), manteniendo una relación de 1:10 (p/p) de tripsina:hexoquinasa. La reacción se llevaba a cabo a diferentes tiempos de incubación (0, 15, 30 y 60 min), y se detenía con PMSF 1 mM. Para la digestión trípica de las hexoquinasas B y C se utilizaron preparaciones proporcionadas por Jasna Radojković, purificadas de acuerdo a los protocolos descritos por Radojković y Ureta (1987). La digestión trípica se realizó a diferentes tiempos de incubación (0, 15 y 30 min) manteniendo una relación 1:10 (p/p) de tripsina:hexoquinasa en el caso de hexoquinasa B y de 1:5 (p/p) para la hexoquinasa C. Los digeridos trípticos se llevaban a electroforesis en SDS sembrando 20 μ g de proteína por canal (como se describe en Materiales y Métodos).

Determinación de la composición aminoacídica

La composición aminoacídica de hexoquinasa de cerebro de pollo fue realizada en el Laboratorio del Dr. John E. Wilson (Departamento de Bioquímica de la Universidad de Michigan, East Lansing, Michigan).

La composición aminoacídica se puede usar para demostrar el grado de similitud entre las secuencias de dos proteínas, utilizando el índice $S\Delta n$ (Cornish-Bowden, 1983) que se ha definido como $\frac{1}{2}\sum(n_{iA} - n_{iB})^2$, donde A y B son las proteínas que se comparan y n_{iA} y n_{iB} son los números de residuos del *i*ésimo aminoácido en A y B ($N = 18$ aminoácidos comunmente encontrados en las determinaciones aminoacídicas). Si $S\Delta n < 0,42 N$ ($N =$ Número total de residuos), existe una probabilidad muy alta de que las proteínas estén relacionadas y se dice que satisfacen la prueba fuerte de la relación composicional. Si $0,42 N < S\Delta n < 0,93 N$, existe cierta probabilidad de que las proteínas estén relacionadas, satisfaciendo la prueba débil. Si $S\Delta n > 0,93 N$ no existiría relación entre ellas.

Para usar el ensayo, las proteínas que se comparan deben tener aproximadamente el mismo tamaño. Para lograr ésto, los valores de $S\Delta n$ se calculan a partir de una composición aminoacídica normalizada a un peso molecular de 48.000 para todas las enzimas, situación específicamente analizada por Cornish-Bowden (1983). No se usaron los coeficientes de corrección por diferencia de largo debido a que los valores corregidos no variaban significativamente con respecto a los no corregidos.

RESULTADOS

PURIFICACION DE HEXOQUINASA DE CEREBRO DE RATA

Se utilizaba el procedimiento descrito por Chou y Wilson (1972) modificado por Polakis y Wilson (1984) (descrito con detalles en Materiales y Métodos), que consiste en purificar las mitocondrias por centrifugación diferencial, solubilizar específicamente la hexoquinasa por incubación de las mitocondrias con glucosa-6-P 1 mM y cromatografía en DEAE celulosa. En esta etapa se obtenía un rendimiento de un 60% y una actividad específica de 25 U/mg de proteína.

Con el objeto de obtener una preparación altamente purificada se introdujo una cromatografía de pseudoafinidad en agarosa azul-2, que presentaba un rendimiento de 80%. La preparación final tenía una actividad específica de 36 U/mg de proteína. Esta preparación mostraba una sola banda en electroforesis en SDS.

PURIFICACION DE HEXOQUINASA DE CEREBRO DE POLLO

Experimentos preliminares mostraron que no era posible aplicar directamente el procedimiento descrito por Chou y Wilson (1972). La hexoquinasa de cerebro de pollo está firmemente unida a la mitocondria y sólo era posible solubilizar un 10% de la actividad presente en las mitocondrias con glucosa-6-P. El protocolo que se describe es el resultado de una serie de

intentos para obtener una mayor solubilización y purificación de la enzima.

1. Preparación del extracto crudo

Se preparaba un homogeneizado con aproximadamente 200 g de cerebros (alrededor de 100 cerebros). La actividad hexoquinásica presente en el citosol, obtenido después de homogeneizar los cerebros y centrifugar a 2.000 rpm (S_1) era de 1.480 U. En general se obtenían, como promedio, 7,4 U/g de tejido. El líquido sobrenadante total contenía 3,7 mg de proteína/ml y tenía una actividad específica de 0,21 U/mg de proteína.

Las mitocondrias obtenidas después de centrifugar la fracción S_1 a 40.000 x g, se llevaban a un volumen de 2.000 ml, que contenían en total 1.180 U, con una actividad específica de 2,2 U/mg de proteína.

2. Solubilización de la enzima de las mitocondrias

Para solubilizar la enzima desde las mitocondrias se probaron diversos métodos, entre ellos KCl 0,8 M y citrato de Na 0,01 M, pH 5,5, Tritón X-100 0,5%, ATP 5 mM, los que no tuvieron un efecto muy importante. Finalmente se optó por la solubilización con glucosa-6-P 1 mM, con una preparación de mitocondrias diluidas 1:10.

Las mitocondrias en relación 1:10 (2 l) se incubaron toda la noche con glucosa-6-P a 4° y luego se centrifugaban a 105.000 x g por 45 min a 10°.

3. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

El líquido sobrenadante que contiene la enzima (1800 ml), obtenido de la centrifugación a 105.000 x g se aplicaba directamente a una columna de DEAE-celulosa, equilibrada en solución B. Después de aplicar la muestra, la columna se lavaba con la solución amortiguadora de equilibrio hasta que la lectura del eluido a 280 nm fuera menor a 0,1. La columna retiene el 100% de la actividad sembrada. Las proteínas se elúan de la columna con KCl en un gradiente lineal entre 0 y 0,3 M. En la figura 1 se muestra el perfil de elución de la enzima que eluye como una sola actividad, entre 80-100 mM de KCl. El procedimiento tenía un rendimiento cercano al 60%, con una actividad específica de 17 unidades/mg de proteína, lo que representa un aumento aproximado de 80 veces con respecto al sobrenadante obtenido después de centrifugar a 1.000 x g.

4. Cromatografía en hidroxilapatita

La solución enzimática obtenida en la etapa anterior (95 ml) se dializaba en solución C y se aplicaba a una columna de hidroxilapatita equilibrada en la misma solución. La columna se lavaba con amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0. En

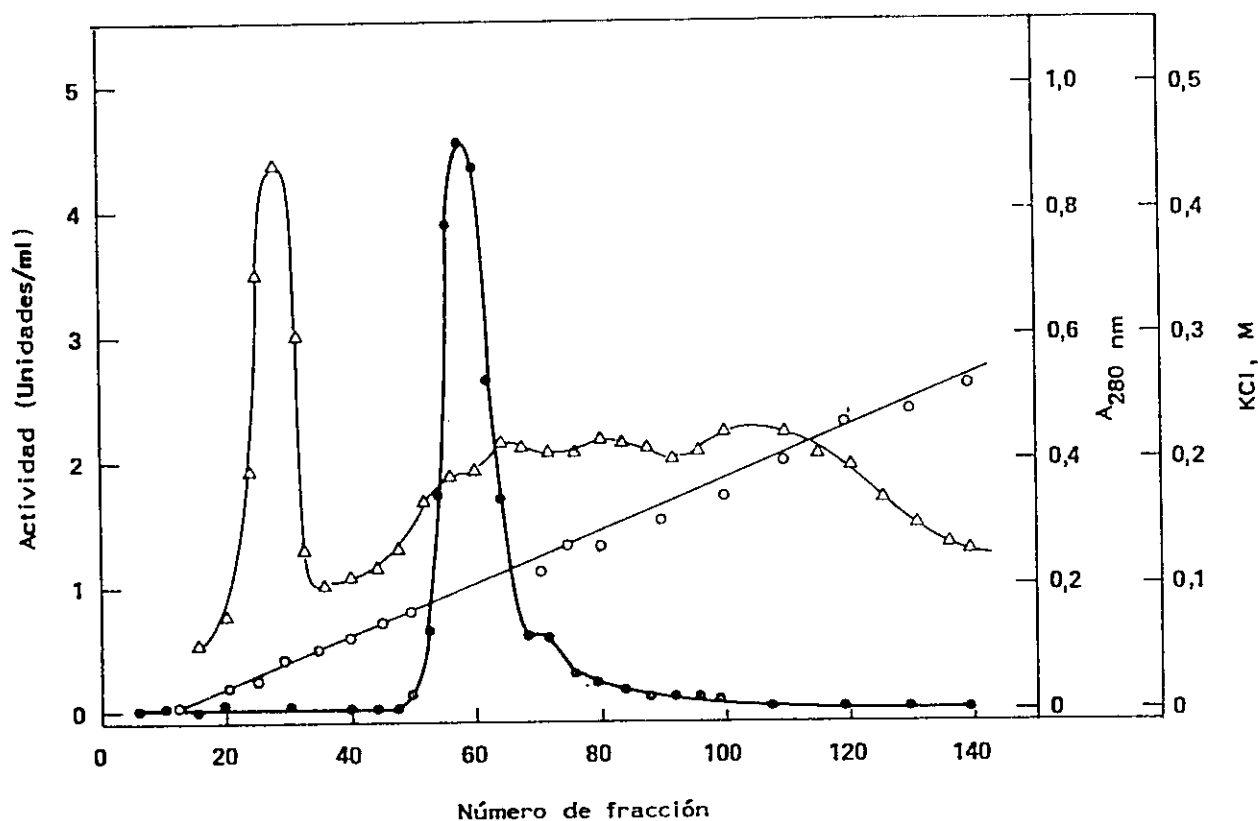


Fig. 1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. El producto de la solubilización desde las mitocondrias por glucosa-6-P, aproximadamente 0,25 U/ml, se aplicó a una columna de DEAE-celulosa (22 cm x 1,7 cm). La columna se lavó con solución B. La enzima se eluía con KCl en un gradiente lineal entre 0 a 0,3 M en la solución B. Se colectaron fracciones de 5 ml. (Δ , absorbancia a 280 nm; \bullet , actividad enzimática; \circ , gradiente de KCl).

estas condiciones se retiene toda la actividad enzimática sembrada. Para eluir las proteínas se aplicaba un gradiente lineal entre 50 y 400 mM de fosfato de potasio en un volumen total de 360 ml. La enzima eluía entre 0,18 M y 0,23 M (Fig. 2). Las fracciones que contenían la enzima se reunían y la actividad recuperada correspondía al 69% de la colocada en la columna. La actividad específica promedio de las fracciones seleccionadas fue de 23 unidades/mg de proteína. Esta cromatografía permitía purificar la enzima aproximadamente 109 veces.

5. Cromatografía de pseudo-afinidad en agarosa azul-2

Las fracciones con mayor actividad provenientes de la cromatografía en hidroxilapatita se cromatografiaban en una columna de agarosa azul-2. Toda la actividad enzimática era retenida. La columna se lavaba con solución B adicionada de KCl 150 mM. La enzima eluía con ATP 10 mM (Fig. 3) y presentaba una actividad específica de 36 unidades/mg de proteínas y un rendimiento de 55%.

6. Filtración en Sephacryl S-300

Las fracciones con mayor actividad obtenidas de la etapa anterior se reunían y concentraban en un concentrador Amicon con membranas PM 10. Se sembraba un volumen no mayor a 4 ml. La enzima eluía en un solo pico simétrico (Fig. 4). La actividad específica promedio de las fracciones con mayor activi-

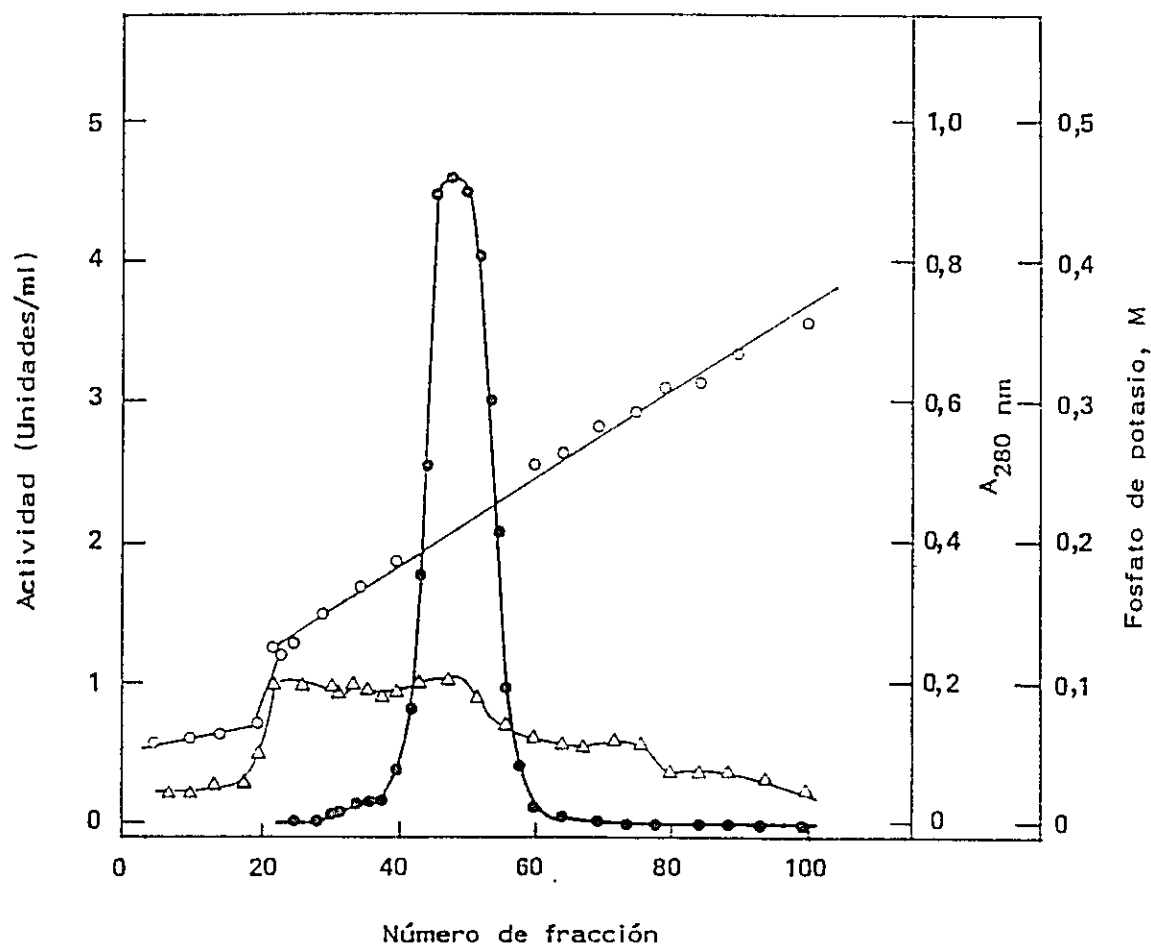


Fig. 2. Cromatografía en hidroxilapatita. La fracción proveniente de la columna de intercambio iónico concentrada y dializada en Solución C, se colocó en una columna de hidroxilapatita (17 cm x 1,3 cm) equilibrada en solución C. La preparación contenía 256 unidades de hexoquinasa. La columna se lavó con 250 ml de solución C. La enzima se eluía con un gradiente lineal de fosfato entre 0,05 a 0,40 M. Se colectaron fracciones de 3 ml. (Δ , absorbancia a 280 nm; \bullet , actividad enzimática; \circ , gradiente de fosfato de potasio).

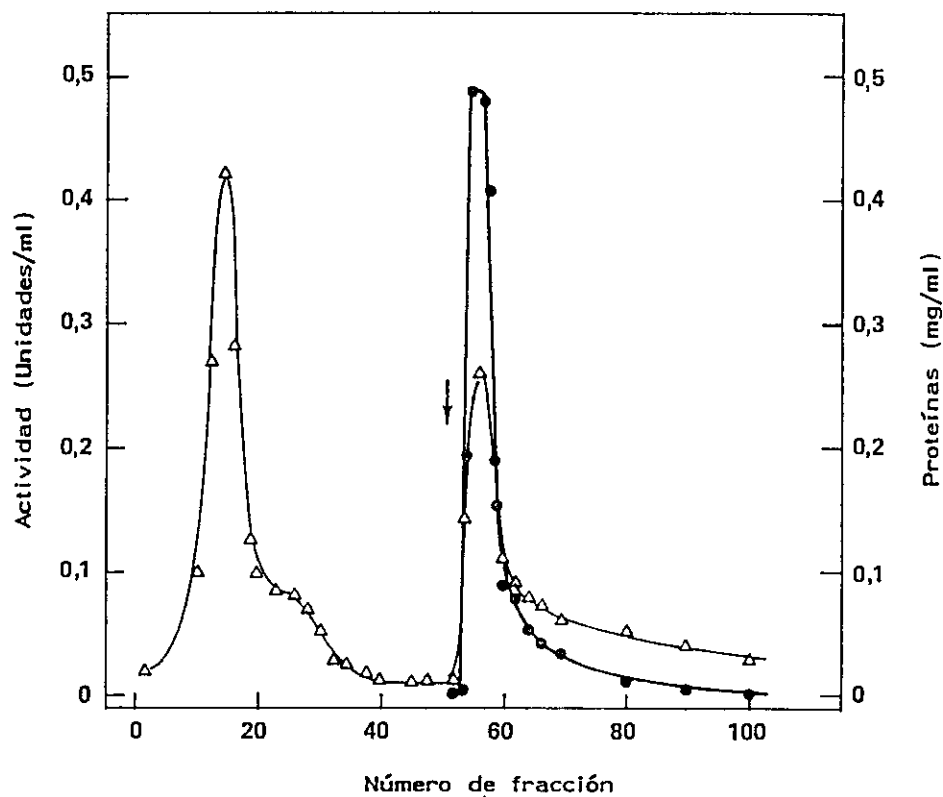


Fig. 3. Cromatografía de pseudo-afinidad en agarosa azul-2. Se usó una columna de 10 cm x 0,7 cm de agarosa azul-2, equilibrada con solución B. Se colocaron 62 ml provenientes de la cromatografía en hidroxilapatita, que contenían 95 unidades de hexoquinasa. La columna se lavó con 50 ml de solución B que contenía KCl 0,150 M. La enzima fue eluida con la misma solución B, pero enriquecida con KCl 0,150 M y ATP 0,010 M. Se colectaron fracciones de 1,6 ml. La flecha indica el número de fracción en la cual se agregó ATP. (Δ, concentración de proteínas; ●, actividad enzimática).

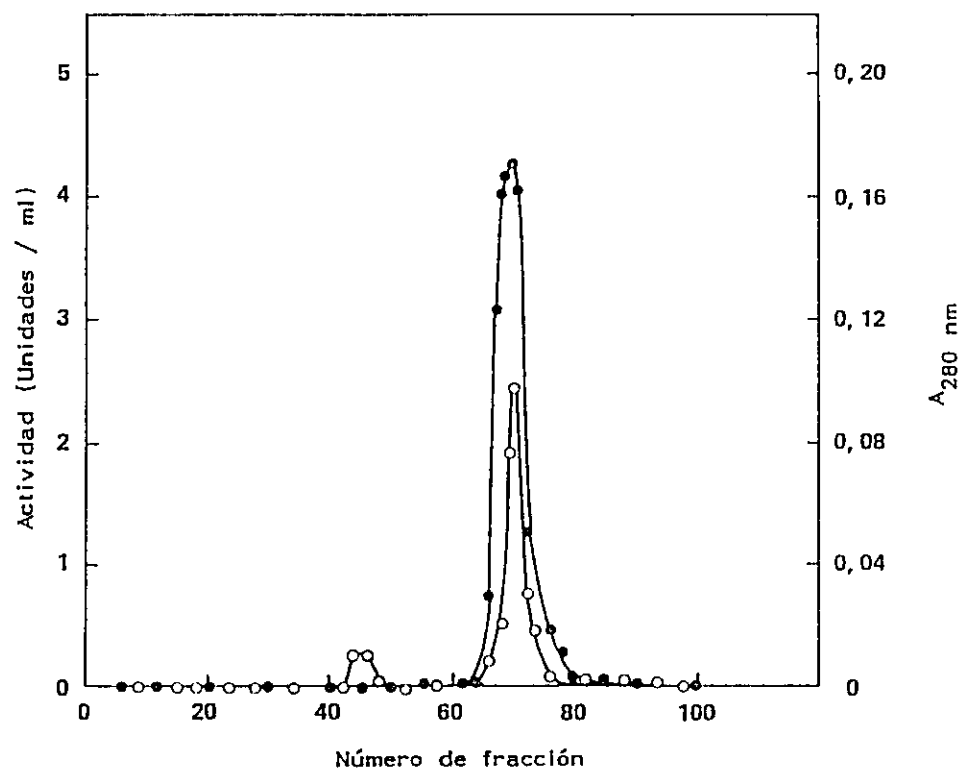


Fig. 4. Filtración en Sephadex S-300. En una columna de 75 por 2,5 cm, empacada con Sephadex S-300 y equilibrada en solución B con KCl 0,100 M, se colocaron 4 ml de la solución enzimática, proveniente de la cromatografía en agarosa azul-2, concentrada y dializada en la solución B mas KCl 0,100 M. La solución contenía 90 unidades. Se colectaron fracciones de 3 ml. (○, absorbancia a 280 nm; ●, actividad enzimática).

dad era de 47 unidades por mg de proteína, con un rendimiento de un 82%. Esta etapa permitía obtener una purificación de 219 veces.

Tabla de purificación

Un protocolo típico que resume el método de purificación de la hexoquinasa de cerebro de pollo se muestra en la Tabla 1. Mediante este procedimiento se logra obtener 1 mg de enzima pura con una actividad específica de 47 U/mg de proteínas. Este procedimiento permite purificar la enzima alrededor de 219 veces. La preparación resultante es homogénea y estable por varios meses a 4° y 50% glicerol.

Control de pureza

El control de pureza de las distintas preparaciones se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, los que se preparaban según Laemmli (1970).

La figura 5 muestra un gel después de electroforesis en presencia de SDS, de las últimas etapas de purificación. Se observa que la muestra final presenta una sola banda de proteínas en estas condiciones.

Determinación de la masa molecular relativa

1. Filtración en Sephacryl S-300

Se calculó la masa molecular relativa de la enzima en

TABLA I

Purificación de la hexoquinasa de cerebro de pollo

Etapa	Volumen (ml)	Proteínas µg/ml)	Actividad Enzimática		Rendimiento %	Purificación (veces)
			U/ml	U/mg		
1. S ₁	2.000	3.700	0,74	0,21	100	-
2. Mitochondrias	2.000	260	0,59	2,20	79	11
3. Solubilización Glu-6P	1.800	80	0,25	3,13	30	15
4. DEAE- celulosa	95	134	2,7	17,60	17,6	84
5. Hidroxil- apatita	62	124	2,8	23,0	11,7	109
6. Agarosa Azul-2	19	140	5,0	36,0	6,5	171
7. Sephacryl S-300	33	50	2,4	47,0	5,3	219

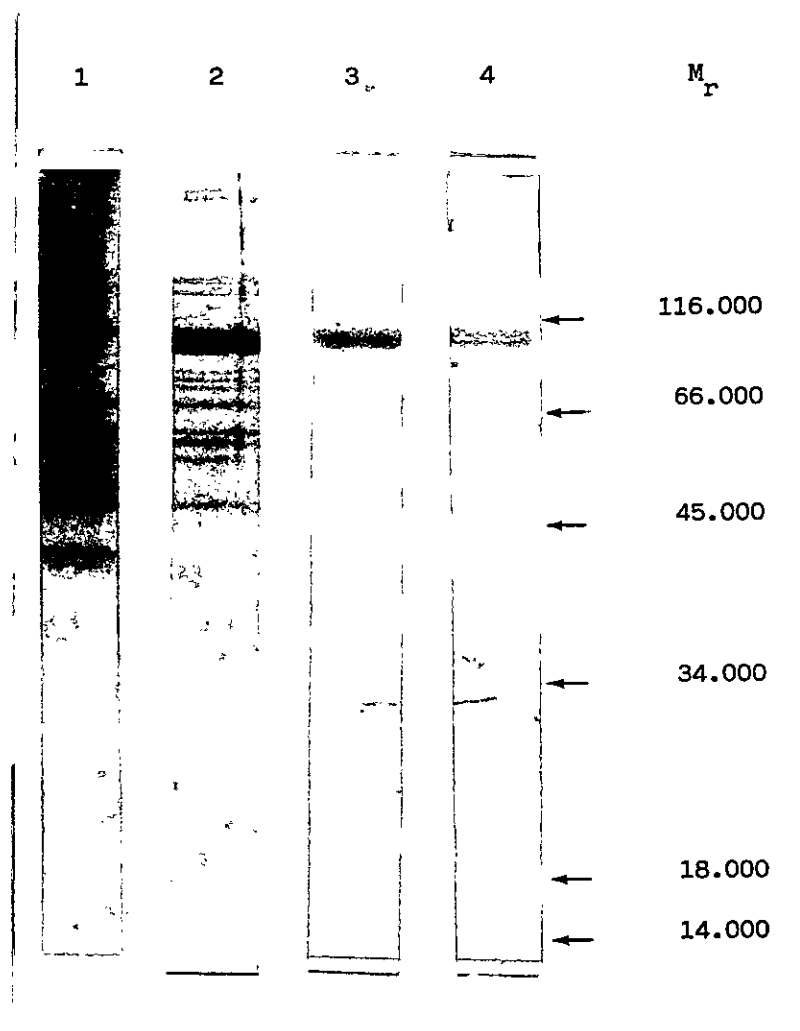


Fig. 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de hexoquinasa de cerebro de pollo en distintas etapas de purificación. Canal 1: 50 μg de la preparación obtenida de la etapa en DEAE-celulosa; canal 2: 25 μg de la preparación obtenida en hidroxilapatita; canal 3: 8 μg de la enzima obtenida de la cromatografía en agarosa azul-2; canal 4: 5 μg de la enzima filtrada por Sephacryl S-300. A la derecha se indican los valores de la masa relativa (M_r) de las proteínas estándar: β -galactosidasa, fosforilasa b, albúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y lisozima.

condiciones nativas, a partir de los resultados de la filtración en Sephacryl S-300 a pH 7,0. La columna se calibró con proteínas de masa molecular conocida. La masa molecular relativa de la hexoquinasa de cerebro de pollo fue de 100.000 ± 2.000 ($n = 4$). Un experimento similar se realizó con una preparación pura de hexoquinasa de cerebro de rata obteniéndose una masa molecular relativa de 104.000 (Fig. 6).

2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

La masa molecular relativa de la hexoquinasa de cerebro de pollo determinada en condiciones desnaturalantes en geles de poliacrilamida con SDS fue de 102.000 ± 1.800 ($n = 8$) (Fig. 7). Los resultados sugieren que la enzima está formada por una sola cadena polipeptídica. En las mismas condiciones la hexoquinasa de cerebro de rata presentó una masa molecular relativa de 104.000 ± 5.000 ($n = 8$).

Parámetros cinéticos

Se analizó el efecto de la concentración de sustrato midiendo las velocidades iniciales de reacción en presencia de concentraciones variables de un sustrato a diferentes concentraciones fijas del otro sustrato. El efecto de la concentración de glucosa sobre la velocidad inicial de hexoquinasa de cerebro de pollo, a varias concentraciones fijas de ATP, se muestra mediante un gráfico de dobles recíprocos (Fig. 8). Las figuras insertas muestran los gráficos secundarios de las pendientes y de las

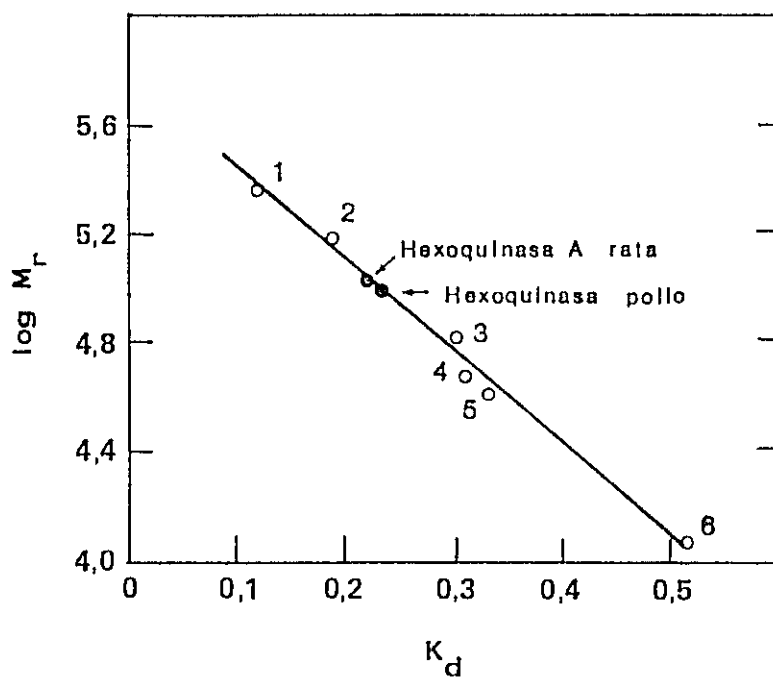


Fig. 6. Estimación de la masa molecular relativa de hexoquinasa de cerebro de pollo por filtración en Sephacryl S-300. El gráfico muestra la movilidad relativa (K_d) en función del logaritmo de la masa molecular relativa de proteínas estándar. ($K_d = V_e - V_i / V_i - V_e$). 1: Catalasa 2: Aldolasa 3: Seroalbúmina 4: Hexoquinasa de levadura 5: Ovoalbúmina 6: Citocromo c.

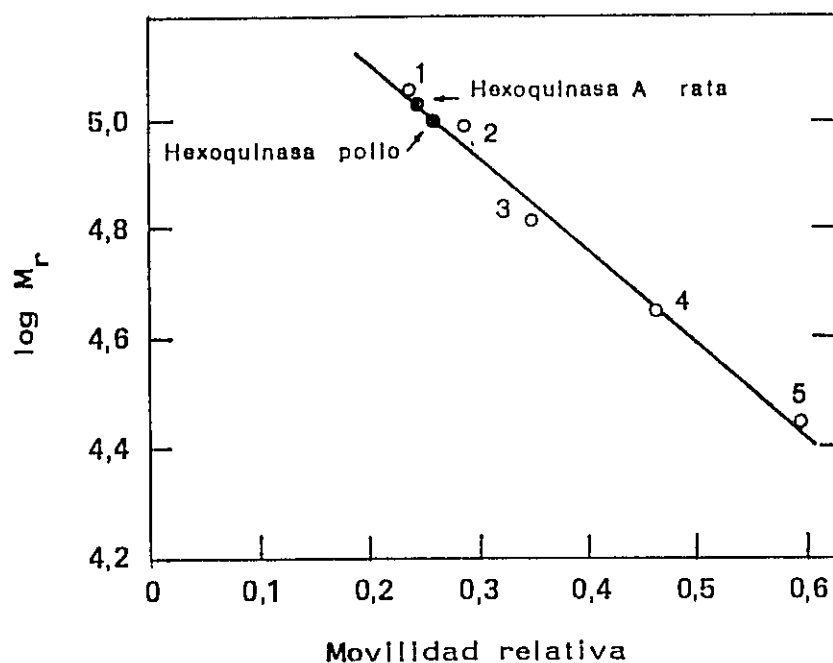


Fig. 7. Estimación de la masa molecular relativa de hexoquinasa de cerebro de pollo por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Se grafica la movilidad electroforética relativa en función del logaritmo de la masa molecular relativa de proteínas estándar. 1: Miosina 2: β-galactosidasa 3: fosforilasa b 4: seroalbúmina de bovino 5: Lisozima.

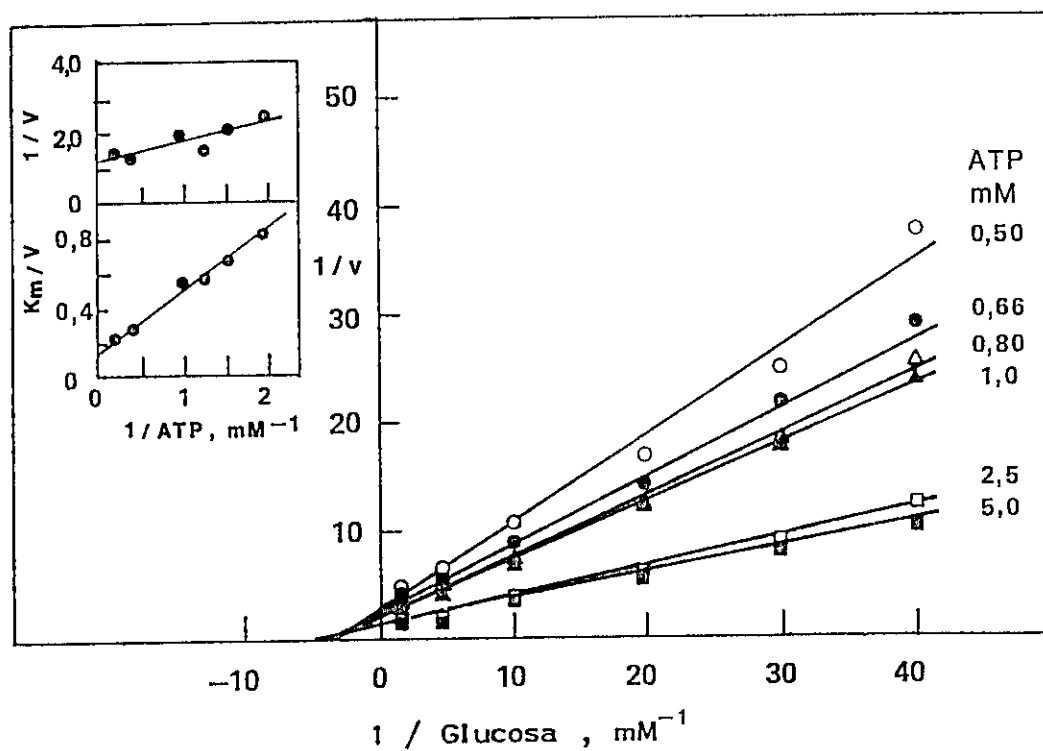


Fig. 8. Efecto de la concentración de glucosa en la velocidad inicial de hexoquinasa de cerebro de pollo a varias concentraciones fijas de ATP. En los recuadros se muestran las gráficas secundarias de las pendientes y de las intersecciones en función de los valores recíprocos de las concentraciones de ATP. La K_m para glucosa fue de 0,13 mM y la V_m 0,83 $\mu\text{moles glucosa-6-P}/\text{min}$.

intersecciones en función del recíproco de las concentraciones de ATP. Se obtuvo un valor de K_m para glucosa de 0,13 mM y una V_m de 0,83 μ moles de Glc-6-P/min. En la figura 9 se muestra la representación de los dobles recíprocos en que el ATP es el sustrato variable a distintas concentraciones fijas de glucosa. El valor calculado para K_m de ATP fue de 0,45 mM y el de la V_m de 0,79 μ moles de Glc-6-P/min.

Caracterización de los sueros inmunes

Se prepararon antisueros en conejo (descrito en Métodos) mediante la inyección de repetidas dosis de hexoquinasas obtenidas de cerebro de rata y cerebro de pollo que se habían purificado hasta la etapa final. Cada antisuero se estudió con los siguientes procedimientos.

1. Efecto del suero inmune en la actividad enzimática

Ambos sueros anti-hexoquinasa de cerebro de pollo y anti-hexoquinasa de cerebro de rata fueron capaces de inmunoprecipitar la actividad enzimática de la enzima que se usó como antígeno. En la figura 10 se observa el efecto de cantidades variables de suero anti-hexoquinasa de cerebro de pollo en la actividad de hexoquinasa de cerebro de pollo. Se determinó que 16 μ l de suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de pollo neutralizan 2 U de hexoquinasa de cerebro de pollo. En la figura 11 se muestra el efecto del suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de rata en la actividad de hexoquinasa de cerebro de

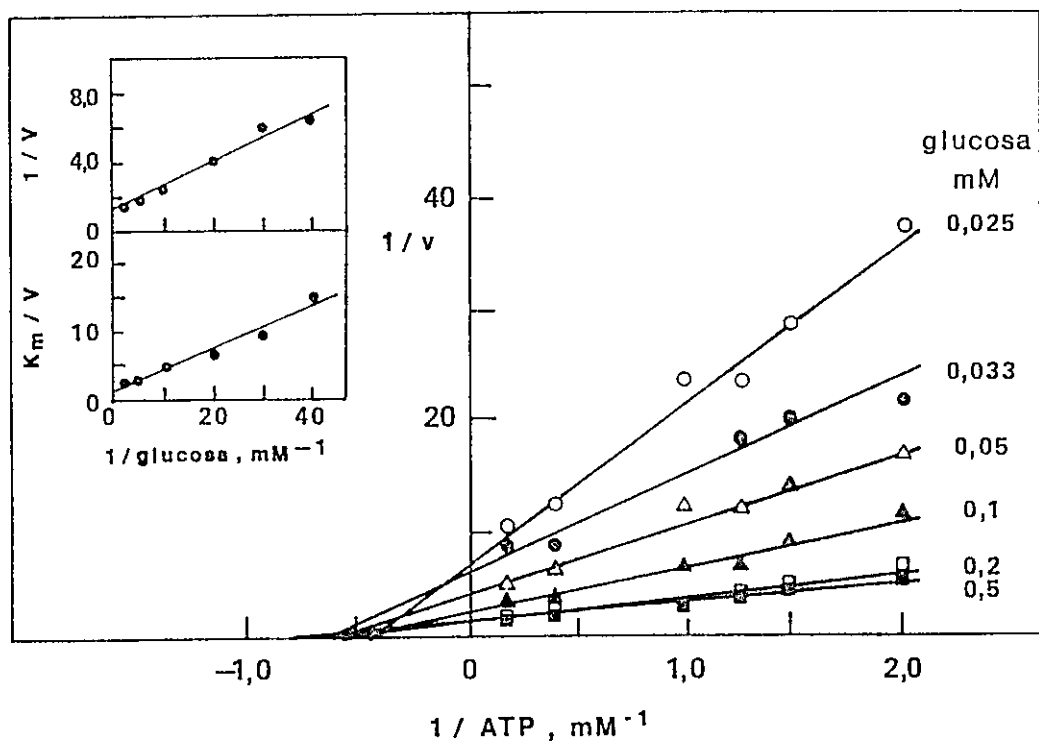


Fig. 9. Efecto de la concentración de ATP sobre la velocidad inicial de hexoquinasa de cerebro de pollo a varias concentraciones fijas de glucosa. En los recuadros se muestran las gráficas secundarias de las pendientes y de las intersecciones en función del recíproco de la concentración de glucosa. El valor de la K_m para ATP fue de 0,45 mM y la V_m de 0,79 μ moles de glucosa-6-P/min.

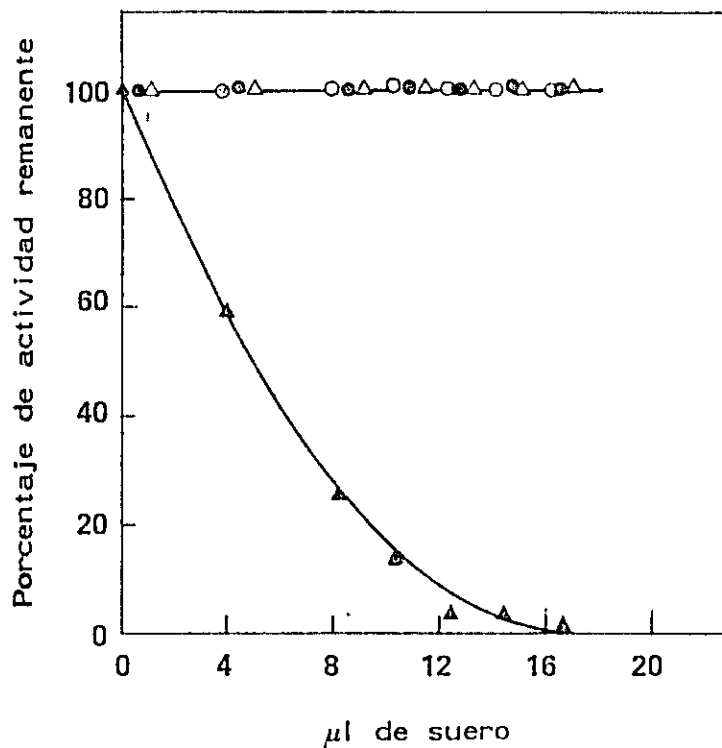


Fig. 10. Influencia del suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de pollo en la actividad de las hexoquinasas de cerebro de rata y cerebro de pollo. Aproximadamente 2,0 U de hexoquinasa de cerebro de pollo o 2,0 U de hexoquinasa de cerebro de rata, se incubaron con cantidades variables de (4-16 μ l) de suero inmune o suero preinmune. El volumen final fue de 50 μ l. Hexoquinasa A de rata (o) y hexoquinasa de cerebro de pollo (Δ) tratadas con suero preinmune; Hexoquinasa A de rata (\bullet) y hexoquinasa de cerebro de pollo (Δ) tratadas con suero inmune. Otros detalles como se describe en la leyenda de la Fig. 12.

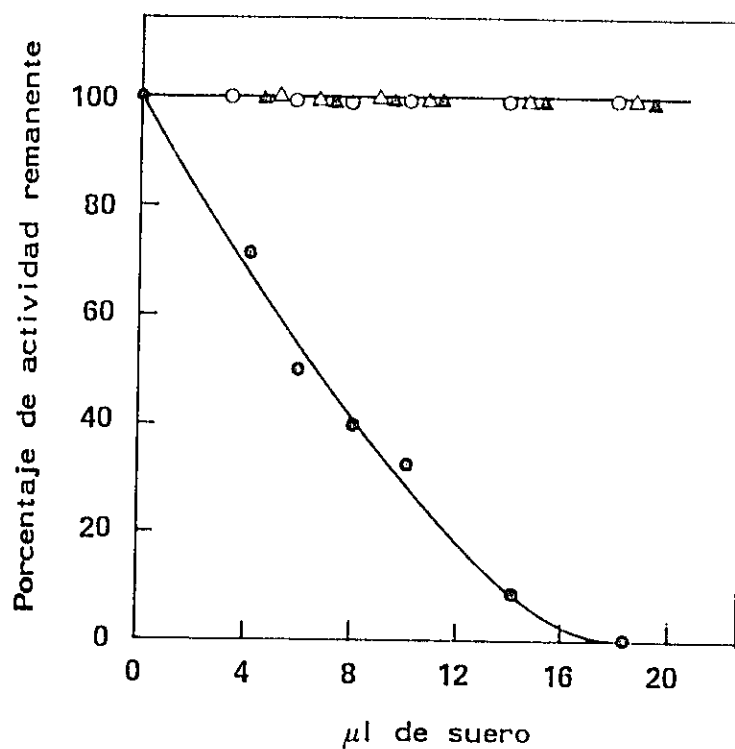


Fig. 11. Influencia del suero inmune anti-hexoquinasa A de rata en la actividad de las hexoquinasas de cerebro de pollo y de rata. Aproximadamente 2,0 U de hexoquinasa A de rata o 2,0 U de hexoquinasa de cerebro de pollo se incubaron con cantidades variables, (4 a 18 μ l) de suero inmune o de suero preinmune. El volumen final fue de 100 μ l. Hexoquinasa A de rata (o) y hexoquinasa de cerebro de pollo (Δ) tratadas con suero preinmune; Hexoquinasa A de rata (\bullet) y hexoquinasa de cerebro de pollo (\blacktriangle) tratadas con suero inmune. Otros detalles como se describe en la leyenda de la Fig. 12.

rata, 18 μ l de suero inmune neutralizan 2 U de enzima.

Al titular el suero inmune se encontró que 1 ml de suero inmune contra hexoquinasa de cerebro de pollo fue capaz de neutralizar alrededor de 350 U de hexoquinasa (Fig. 12), mientras que 1 ml de suero contra hexoquinasa de cerebro de rata neutralizaba 200 U de la hexoquinasa usada como antígeno (Fig. 13).

2. Inmunoadsorción en placas de plástico (ELISA)

Los anticuerpos pueden ser detectados y cuantificados por el método ELISA, que es un método indirecto realizado en fase sólida. En esta técnica el antígeno se adsorbe sobre una superficie plástica a la que se agrega el antisuero específico en diluciones progresivas. Para evaluar la reacción antígeno anti-suero se añade un conjugado de anti IgG y peroxidasa. Para medir la actividad peroxidasa unida se agrega OPD y se cuantifica la liberación de OPD oxidada, lo que refleja la cantidad del anticuerpo unido en la primera incubación (Fig. 14). En estas condiciones el título del antisuero contra hexoquinasa de cerebro de rata fué de 1:15.000 y el del antisuero contra hexoquinasa de cerebro de pollo fué de 1:500.000.

Reacción inmunológica cruzada entre las hexoquinasas de cerebro de rata y cerebro de pollo

Con el objeto de estudiar la presencia de determinantes antigénicos comunes en ambas enzimas, cada isoenzima se hizo

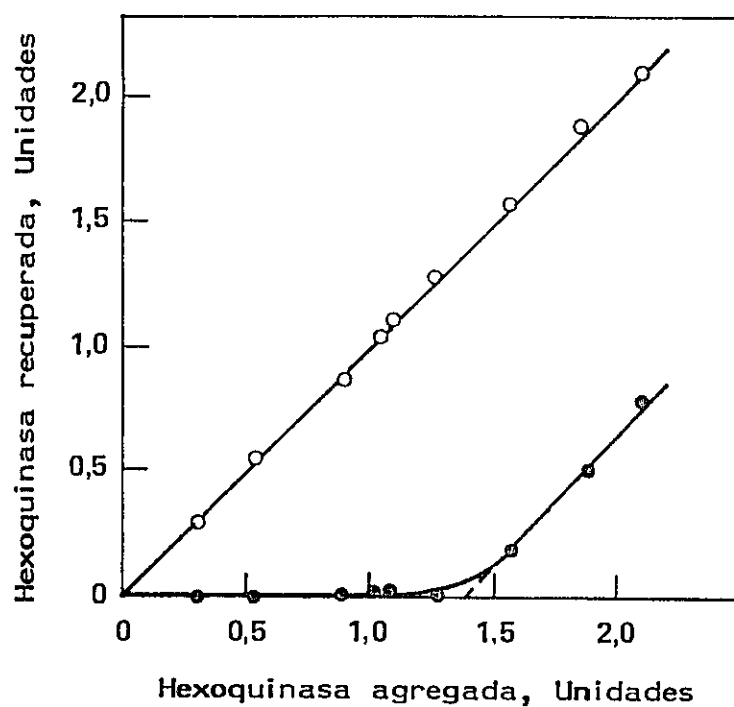


Fig. 12. Titulación del suero Inmune anti-hexoquinasa de cerebro **de pollo**. Cantidades variables (0,3 a 2,1 U) de hexoquinasa de cerebro de pollo, se incubaron con 4 μ l de suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de pollo (●) o 4 μ l de suero preinmune (○) en un volumen final de 50 μ l, durante 30 min a 30° y luego por 18 h a 4°. El amortiguador usado para todas las diluciones era fosfato salino (PBS). Los precipitados se descartaron por centrifugación durante 10 min (ver Métodos) y la actividad hexoquinásica se midió en los líquidos sobrenadantes.

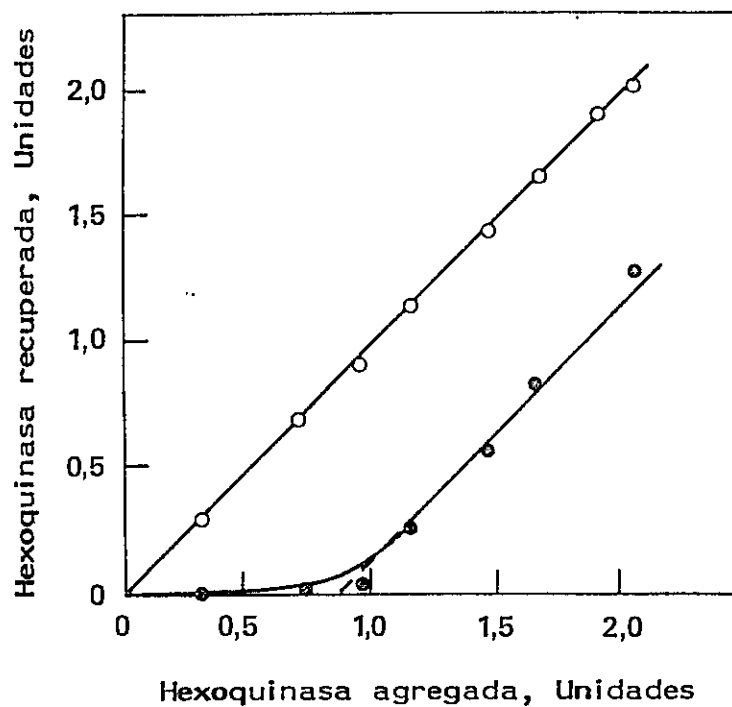


Fig. 13 . Titulación del suero inmune anti-hexoquinasa A de rata. Cantidades variables (0,5 a 2,0 U) de hexoquinasa de cerebro de rata se incubaron con 4 μ l de suero inmune anti-hexoquinasa A de rata (●), o 4 μ l de suero preinmune (○) en un volumen de 100 μ l durante 30 min a 30° y 18 h a 4°. Otros detalles como se describe en la leyenda de la Fig. 12.

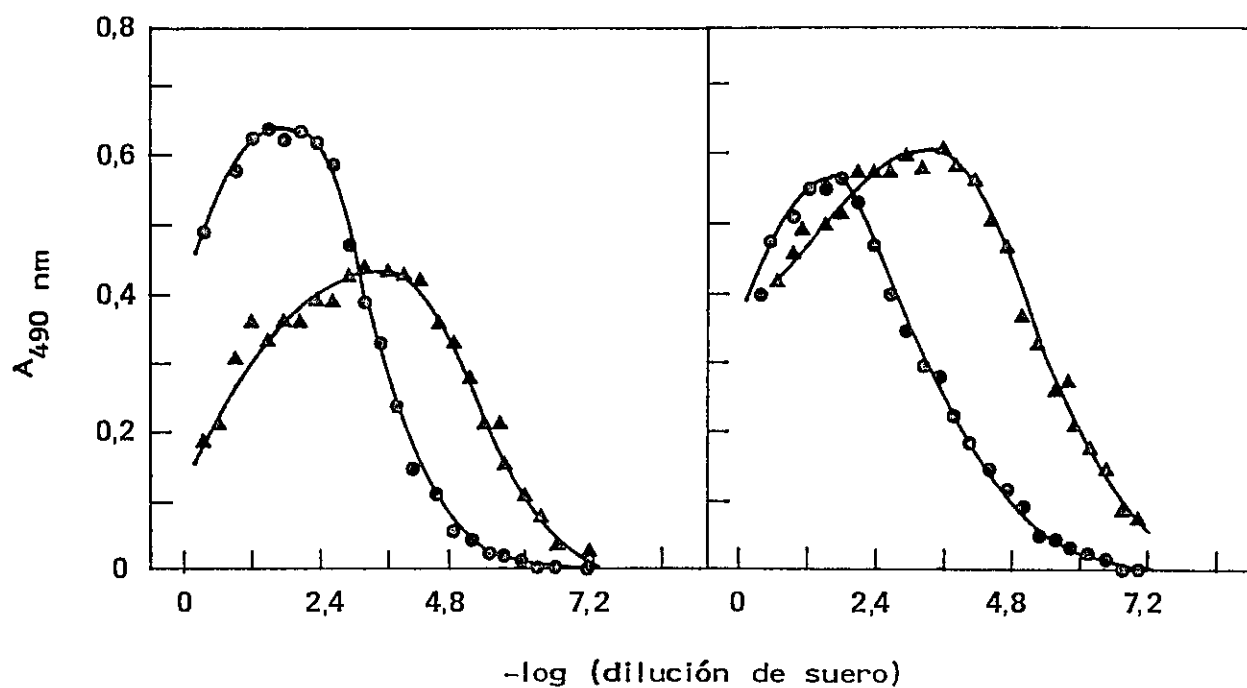


Fig. 14. Reactividad inmunológica cruzada entre hexoquinasa A de rata y hexoquinasa de cerebro de pollo. Se utilizó la técnica ELISA. Cada placa ase cebó con soluciones que contenían 10 $\mu\text{g/ml}$ de las hexoquinasas puras de ambas especies. Los sueros se agregaron a las diluciones indicadas en el gráfico. Izquierda, suero inmune anti-hexoquinasa A de rata. Derecha; suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de pollo. (●) Hexoquinasa A de rata; (▲) hexoquinasa de cerebro de pollo.

reaccionar con ambos sueros inmunes mediante los procedimientos que ya se describieron.

1. Inmunoinhibición de la actividad hexoquinásica

Los sueros generados contra las hexoquinasas homogéneas de cerebro de rata y cerebro de pollo no presentaron reacción cruzada por el ensayo de inmunoinhibición de la actividad enzimática. Al incubar cantidades variables de los sueros con concentraciones fijas de hexoquinasa de cerebro de pollo o de cerebro de rata se observó que el suero sólo inhibía la actividad de la enzima que se usó como antígeno. La hexoquinasa de cerebro de rata es inactivada por el suero anti-hexoquinasa A de rata y no por el suero anti-hexoquinasa de cerebro de pollo (Fig. 10). Por otro lado, hexoquinasa de cerebro de pollo sólo es inactivada cuando se incuba con el suero específico y no con el suero anti-hexoquinasa A de rata (Fig. 11).

2. Inmuno-adsorción en placas

Cuando se estudió el efecto de los antisueros en las enzimas por inmuno-adsorción en placas (ELISA) se detectó reactividad inmunológica cruzada con ambas enzimas. En la figura 14 se muestran los perfiles de unión obtenidos cuando sueros contra las hexoquinasas de cerebro de rata y pollo preparados en conejos se titularon con cada enzima individualmente. En cada figura la densidad óptica se ha corregido por el efecto de interacciones no específicas con los antígenos individuales, restan-

do los valores correspondientes al suero normal o preinmunizado.

En ambos casos se observó una fuerte interacción entre cada suero y su antígeno homólogo, como también una fuerte reacción cruzada. La máxima absorbancia a 490 nm que se obtiene refleja el grado de interacción de cada anticuerpo con cada antígeno.

Movilidades cromatográficas de las hexoquinasas de pollo

La cromatografía en DEAE-celulosa de extractos de hígado de pollo adulto ha permitido detectar la presencia de dos picos de actividad hexoquinásica (I y II), que eluyen a 110 y 175 mM KCl respectivamente (Ureta y col., 1973). Se han clasificado como hexoquinasas típicas debido al valor de K_m para glucosa, especificidad de sustratos y pesos moleculares de aproximadamente 100.000. Ninguna de las hexoquinasas encontradas muestra inhibición por exceso de sustrato, como es el caso de la isoenzima C de hígado de roedores, y ambas presentan valores bajos de K_m para glucosa lo que excluye su identificación con hexoquinasa D. La Tabla II muestra algunas propiedades de esas enzimas y de las hexoquinasas A y B de roedores.

Puede observarse en la Tabla II que si bien las movilidades cromatográficas y las K_m para glucosa de las hexoquinasas de hígado de pollo son parecidas a las de las isoenzimas A y B de rata, hay diferencias cuantitativas que hacen dudar de su identificación como A y B.

Tabla II

Comparación de hexoquinasas A y B de hígado de roedores con hexoquinasas I y II de hígado de aves

Parámetro	Roedores		Aves	
	Isoenzimas			
	A	B	I	II
Constante Michaelis				
Glucosa (mM)	0,048±0,006	0,130-0,240	0,113±0,026	0,083±0,016
ATP (mM)	0,42	0,70	1,24	0,66
Movilidad cromato- gráfica KCl (mM)	70±10	152 ±46	117±5	175±4
Masa molecular	96.000	96.000	98.000	95.000

Adaptada de Ureta y col., 1973.

La movilidad cromatográfica de la hexoquinasa de cerebro de pollo es diferente de la de cerebro de rata y es en cambio muy parecida a la de hexoquinasa I de hígado de pollo. La fig. 15 muestra las movilidades cromatográficas en DEAE-celulosa (en idénticas condiciones) de las isoenzimas de cerebro de rata y cerebro e hígado de pollo. La movilidad cromatográfica de la actividad hexoquinásica presente en cerebro de rata fue de 80 mM KCl, mientras que la isoenzima presente en cerebro de pollo posee una movilidad de 110 mM KCl. En hígado de pollo la isoenzima I eluye también con una concentración de 110 mM KCl, y la isoenzima II eluye con una concentración de 175 mM KCl.

Reactividad inmunológica de las hexoquinasas de hígado de pollo con el suero anti-hexoquinasa de cerebro de pollo

Los sueros preparados contra hexoquinasas de mamíferos (Ureta y col., 1979; Núñez y col., 1985) son siempre muy específicos de tal manera que el suero anti-hexoquinasa A no inhibe la actividad de las hexoquinasas B, C o D. El estudio de reactividad cruzada de un suero inmune preparado contra la hexoquinasa obtenida de cerebro de pollo podría dar alguna información acerca de su identidad con las isoenzimas presentes en hígado. La correspondencia de hexoquinasa de cerebro con la hexoquinasa I de hígado de pollo pudo demostrarse mediante el suero inmune anti-hexoquinasa de cerebro de pollo, el que fue capaz de inhibir la actividad enzimática de la hexoquinasa I

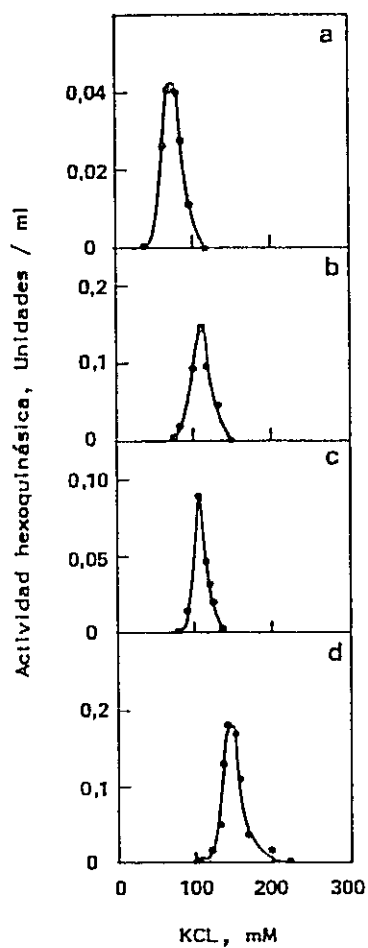


Fig. 15. Perfil de las movilidades cromatográficas de las isoenzimas presentes en el hígado de pollo y cerebro de pollo. En los tres experimentos se usó una columna (5 cm x 1 cm) de DEAE-celulosa equilibrada con solución A. En a, b o c las proteínas se eluyeron con KCl en un gradiente lineal entre 0 y 0,3 M en solución A, en d se eluyeron en un gradiente lineal entre 0 y 0,5 M. Se colectaron fracciones de 0,6 ml. a) hexoquinasa A de rata, b) hexoquinasa de cerebro de pollo (FI), c) hexoquinasa de hígado de pollo (FI), d) hexoquinasa de hígado de pollo (FII).

pero no la de la hexoquinasa II (Fig. 16). En consecuencia, la hexoquinasa que eluye en primer lugar, en la cromatografía de extractos de hígado de pollo, se corresponde con la hexoquinasa presente en cerebro de pollo

Reactividad inmunológica cruzada entre las hexoquinasas de cerebro de rata y cerebro de pollo utilizando anticuerpos monoclonales

Trabajos previos han demostrado que los anticuerpos monoclonales pueden ser usados como sondas para estudiar características estructurales específicas de las hexoquinasas. Además se pueden correlacionar los efectos de los anticuerpos monoclonales sobre la función hexoquinásica con péptidos específicos de la molécula de hexoquinasa (Finney y col., 1984; Wilson y col., 1985).

Con el objeto de detectar epítopos comunes entre la hexoquinasa A de rata y de cerebro de pollo, se estudió la reactividad inmunológica cruzada, utilizando un conjunto de anticuerpos monoclonales específicos contra hexoquinasa A de rata. Una medida cuantitativa de la reactividad inmunológica se puede obtener por ELISA.

Ensayos preliminares mostraron que la mayoría de los anticuerpos monoclonales reconocen a la hexoquinasa A de rata, pero algunos presentaron reacción cruzada con hexoquinasas B, C y D, por lo que no fueron usados en estos experimentos. Se usaron algunos anticuerpos monoclonales de la clase IgG (monoclonales 5A, HD1 G10, HD2D5 y 15B) y anticuerpos monoclonales de las

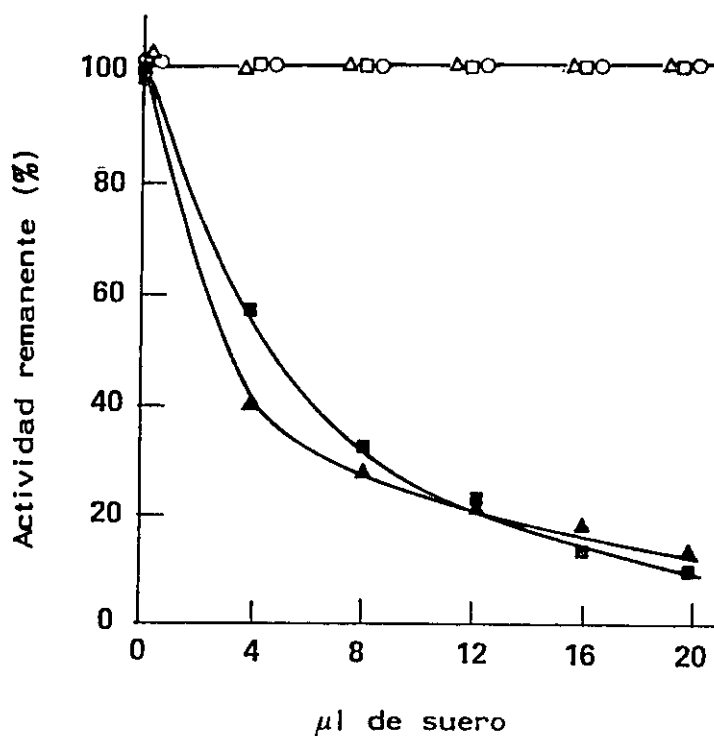


Fig. 16. Inhibición de la actividad de las hexoquinasas de cerebro y de hígado de pollo por el suero anti-hexoquinasa de cerebro de pollo. Cantidades variables de suero inmune o preinmune se incubaron con hexoquinasa de cerebro de pollo y las hexoquinasas parcialmente purificadas de hígado de pollo. Cerebro (▲); FI hígado (□), FII hígado (○) tratados con suero preinmune; cerebro (▲), FI hígado (■), FII hígado (○) tratados con suero inmune. Otros detalles como se describe en la leyenda de la Fig. 12

siguientes subclases: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, (Tabla III). Los resultados muestran (Fig. 17) que el grado de reactividad cruzada depende del anticuerpo monoclonal que se usó para el ensayo. Así los anticuerpos monoclonales, 5A y HD2D5 que reconocen el dominio de 40.000 y 50.000 muestran una alta reactividad cruzada con la enzima de cerebro de pollo. Los monoclonales HD1G10 y 15B también reconocen epítomos en la hexoquinasa de cerebro de pollo, pero estos anticuerpos monoclonales son poco reactivos con la hexoquinasa de cerebro de rata. Lo mismo ocurre con los monoclonales 2B y 3A2. En contraste los anticuerpos 1B4, 4D4, 21 y 20 muestran muy poca reactividad cruzada con hexoquinasa de cerebro de pollo. Estos anticuerpos, que se unen al fragmento de 10.000, aumentan la capacidad de glucosa-6-P para solubilizar la enzima de la mitocondria y presentan reactividad cruzada mínima con la enzima de cerebro de pollo.

Estos resultados demuestran que estas enzimas tendrían algunos epítomos conservados.

Efecto de los anticuerpos monoclonales en la enzima nativa

Se ha observado (Finney y col., 1984) que el procedimiento ELISA convencional da resultados positivos con los antígenos que reconocen las enzimas nativas y también con los antígenos que reconocen la enzima desnaturalada (Lawrence y col., 1984). Esto ocurre debido a que, cuando la enzima se adhiere a la placa de ELISA, se produce su desnaturalación. Smith y Wilson (1986) han

TABLA III

Anticuerpos monoclonales anti-hexoquinasa A de rata

MCA	CLASE	FRAGMENTO
5A	IgM	40K
HD1G10	IgM	40K
HD2D5	IgM	50K
15B	IgM	50K
2B	IgG1	50K
2C5	IgG	
1B4	IgG1	
4D4	IgG1	10K
5C2	IgG1	
21	Ig1	10K
20	IgG1	10K
1D1	IgG2a	50K
1C2	IgG2a	
2D1	IgG2a	
1C4	IgG2a	10K
3A2	IgG2b	10K
13	IgG2b	50K
1D5	IgG3	

Finney, K.G., Messer, J.L. y Wilson, J.E. (1984)

Polakis, P.G. y Wilson, J.E. (1984)

Polakis, P.G. y Wilson, J.E. (1985)

Wilson, J.E. y Smith, A.D. (1985)

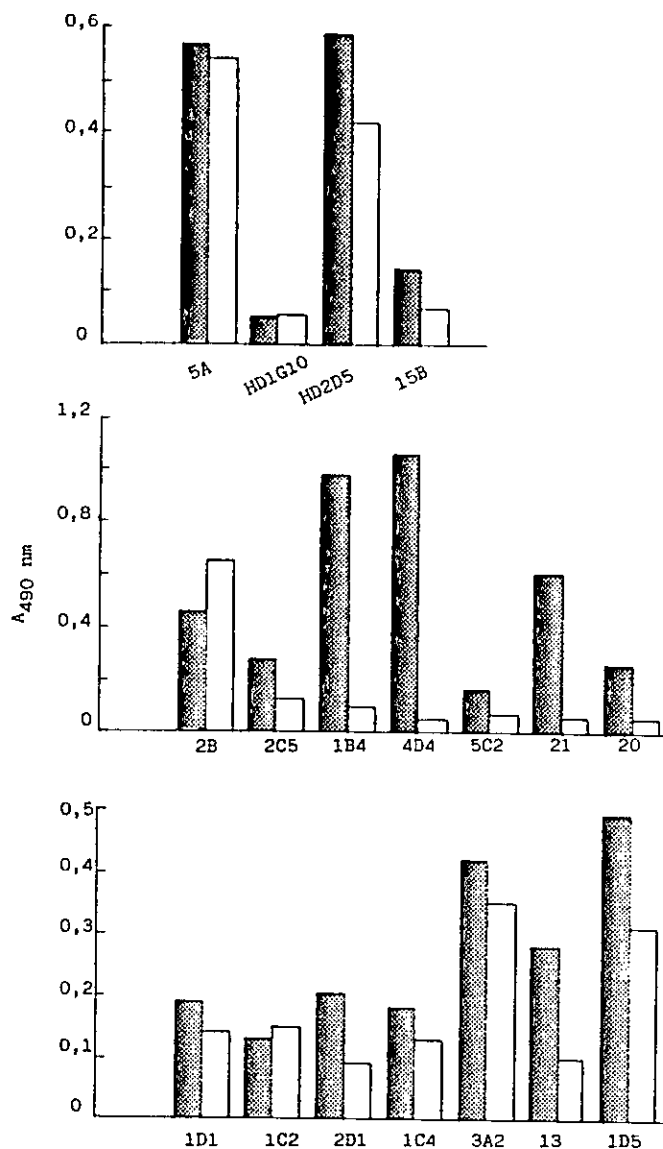


Fig. 17. Comparación inmunológica de hexoquinasas de cerebro de rata y de cerebro de pollo. Se utilizó la técnica ELISA agregando a los pocillos soluciones que contenían 5 $\mu\text{g/ml}$ de hexoquinasa de una u otra especie. Luego se agregaron los anticuerpos monoclonales anti-hexoquinasa de rata indicados, en la forma de medios de cultivo de los hibridomas. Las barras a llenas corresponden a la reacción con la enzima de rata. Las barras vacías corresponden a la reacción con la enzima de pollo. Superior: anticuerpos monoclonales de la clase IgM; Medio: anticuerpos de la clase IgG1; inferior: anticuerpos de las clases IgG2 e IgG3. Los resultados corresponden al promedio de tres observaciones.

propuesto una modificación del método ELISA con el cual se puede mantener la enzima en su conformación nativa. El método se basa esencialmente en inmovilizar la enzima, sin que se produzca desnaturación, durante la adsorción en las placas, lo que se consigue usando anticuerpos policlonales como agentes inmovilizantes que son adsorbidos en la placa.

Para realizar este tipo de experimento se usaron sueros policlonales contra hexoquinasa A de rata y cerebro de pollo preparados en conejo, los que fueron adsorbidos en las microplacas para inmovilizar las enzimas sin que pierdan su estructura.

En la figura 18 se muestra la reactividad cruzada de las hexoquinasas que se comparan utilizando el procedimiento ELISA modificado. Se puede apreciar que los anticuerpos de la clase IgM reaccionan tanto con la enzima desnaturada como con la nativa, destacándose los anticuerpos HDG10 y 15B que presentan mayor reactividad con la enzima nativa, tanto de rata como de pollo. Los anticuerpos monoclonales de la clase IgG muestra preferencias por la enzima nativa (2B, 2C5, 21, 20, 2D1, 3A2 y 13). Todos los monoclonales estudiados presentaron mayor reactividad con la hexoquinasa de cerebro de rata.

Para comprobar que la enzima inmovilizada estaba en condiciones nativas, se inmovilizaron ambas enzimas y se midió su actividad utilizando la técnica para medir actividad en el gel (descrita en Métodos). En estas condiciones las dos enzimas eran activas.

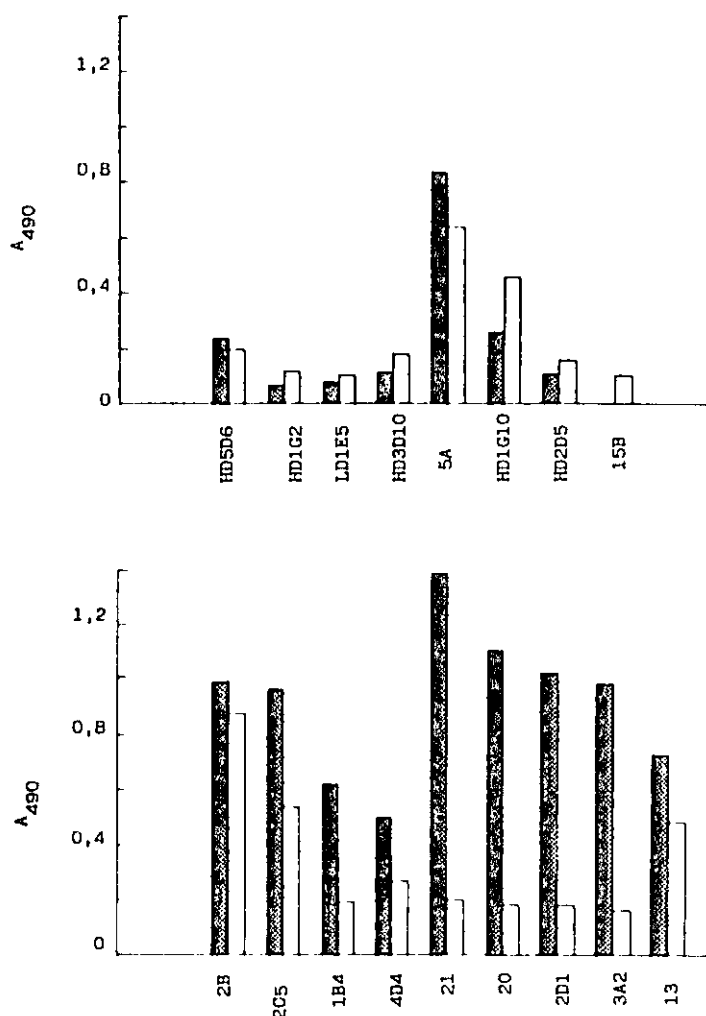


Fig. 18. Comparación inmunológica de hexoquinasa A de rata y cerebro de pollo por ELISA, con antígeno en condiciones nativas. Se utilizó la técnica ELISA modificada. Se agregaron a los pocillos soluciones que contenían 10 $\mu\text{g/ml}$ de hexoquinasa de una u otra especie. Las placas se cebaron previamente con el respectivo antisuero policlonal. Luego se agregaron los anticuerpos monoclonales anti-hexoquinasa A de rata indicados (para más detalles ver Métodos). Las barras llenas corresponden a la reacción con la enzima de rata. Las barras vacías corresponden a la reacción con la enzima de pollo. Superior: anticuerpos monoclonales de la clase IgM; inferior: anticuerpos monoclonales de la clase IgG1, IgG2 e IgG3.

Digestión trípica limitada

Se ha descrito que la proteólisis limitada de hexoquinasa de cerebro de rata con tripsina genera tres fragmentos de peso molecular: 10.000, 40.000 y 50.000 (Polakis y Wilson, 1984, Wilson y Smith 1985). Además, se observan dos péptidos intermedios de 60.000 y 90.000, los que continúan degradándose para dar los péptidos de 50.000, 40.000 y 10.000. Los resultados sugieren dos sitios de ruptura dentro de la molécula: un sitio de corte que genera los fragmentos de 10.000 y 90.000 y un segundo sitio de corte que aporta los fragmentos de 40.000 y 50.000.

El tratamiento de hexoquinasa de cerebro de pollo con tripsina (0,05 mg/ml) a diferentes tiempos de incubación (0, 15, 30, y 60 min) genera cuatro fragmentos que tienen aproximadamente los siguientes pesos moleculares: 92.000, 63.000, 53.000 y 43.000 ($n = 5$). A tiempos mayores los péptidos de 92.000 y 60.000 desaparecen (Fig. 19).

La digestión trípica limitada de hexoquinasa A de rata (0,1 mg/ml de tripsina), a los mismos tiempos de incubación, genera el mismo número de péptidos cuyos pesos moleculares aproximados fueron los siguientes: 92.000, 64.000, 54.000 y 42.000. Estos resultados concuerdan con los comunicados por Polakis y Wilson (1984).

La digestión trípica de las hexoquinasas B y C de Novikoff genera péptidos diferentes a los obtenidos para la hexoquinasa A de rata. El tratamiento de hexoquinasa B con tripsina (0,05

mg/ml) a diferentes tiempos de incubación, genera 2 fragmentos principales que tienen una movilidad relativa de 60.000 y 39.000. La enzima sin tratar posee además un fragmento contaminante, que tiene una movilidad relativa de aproximadamente 50.000 y que también aparece en la enzima tratada con tripsina (Fig. 20). El patrón de corte se parece al de la hexoquinasa A con la diferencia que ésta no genera el fragmento de 90.000; en cambio, la hexoquinasa C, tratada con tripsina (0,1 mg/ml), presenta un patrón de corte distinto. En la figura 21, se observa que después del tratamiento de hexoquinasa C con tripsina aparecen varios fragmentos cuya movilidad relativa oscila entre los 90.000 y 40.000, lo que indicaría que habría más de tres sitios de corte en estas condiciones. Estos resultados estarían indicando que las tres isoenzimas poseen distintos sitios susceptibles al ataque por tripsina.

Efecto de ligandos en el estado conformacional de hexoquinasa de cerebro de rata y cerebro de pollo

El glucosa-6-P es un inhibidor de la hexoquinasa de cerebro de rata, pero además provoca un cambio conformacional visualizado por la disminución de la susceptibilidad al ataque por quimotripsina (Wilson, 1973). Un efecto similar se observa en el caso de la hexoquinasa de cerebro de bóvido, a la que glucosa-6-P protege de la inactivación por reactivos que se unen a los grupos sulfidrilos, como el DTNB (Redkar y Kenkare,

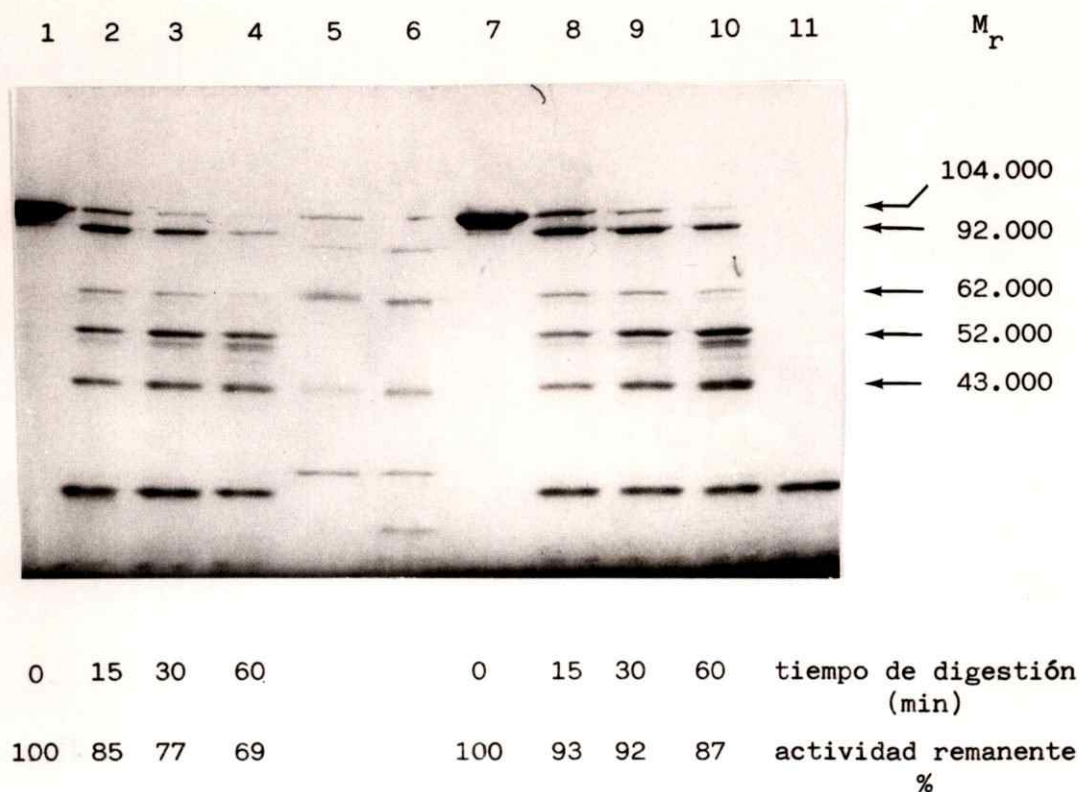


Fig. 19. Digestión triptica de hexoquinasa A de rata y hexoquinasa de cerebro de pollo. Aproximadamente 80 μg de hexoquinasa (de cerebro de rata o cerebro de pollo), fueron digeridos con tripsina a distintos tiempos de incubación (0, 15, 30, 60 min) a temperatura ambiente. La digestión se detuvo por la adición de PMSF 1 mM. El análisis de los péptidos se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (6,5 a 20% de acrilamida). Más detalles en Métodos. Los números en el borde derecho corresponden a los tamaños de la hexoquinasa sin digerir y de los principales fragmentos tripticos.

Canal 1, 2, 3 y 4: Hexoquinasa de cerebro de rata. Canal 5 y 6: Proteínas estándar M_r : 116.000, 92.500, 66.200, 45.000, 21.500, 14.400. Canal 7, 8, 9 y 10: Hexoquinasa de cerebro de pollo. Canal 11: Tripsina.

En la parte inferior de la figura se indica el porcentaje de actividad remanente después de la digestión.

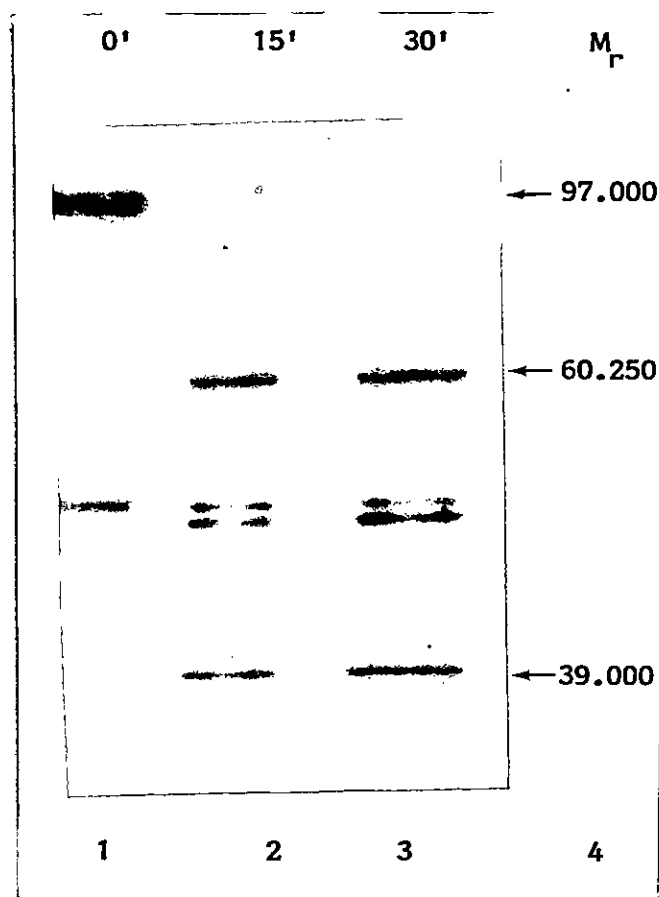


Fig. 20. Digestión trípica de hexoquinasa B de Novikoff. Aproximadamente 60 μ g de hexoquinasa fueron digeridos con tripsina, en relación 1:10 de tripsina-hexoquinasa. La digestión se detuvo por la adición de PMSF 1 mM. El análisis de los péptidos se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (6,5 a 20% de acrilamida). Los números en el borde derecho corresponden al tamaño de la hexoquinasa sin digerir y a los principales fragmentos tríplicos. En la parte superior de la figura se indican los tiempos de incubación.

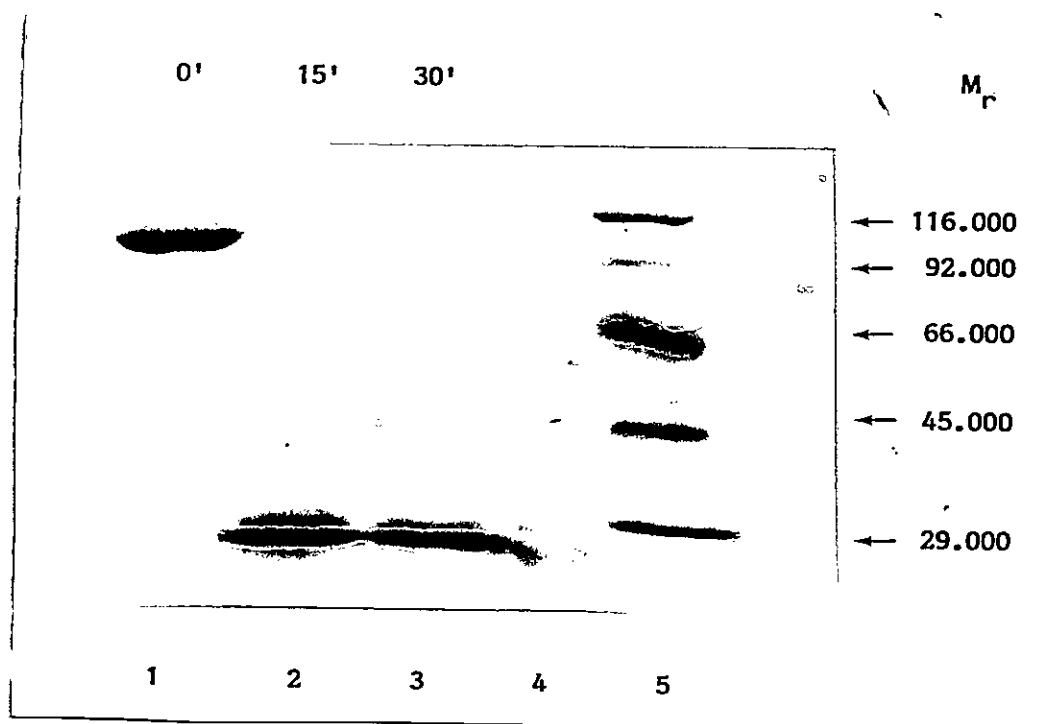


Fig. 21. Digestión trípica de hexoquinasa C de Novikoff. Aproximadamente 60 μ g de hexoquinasa fueron digeridos con tripsina, en relación 1:5 de tripsina-hexoquinasa. La digestión se detuvo con PMSF 1 mM. El análisis de péptidos se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (6,5 a 20% de acrilamida). Los números en el borde derecho corresponden al tamaño de la hexoquinasa sin digerir y a los fragmentos tríplicos. En la parte superior de la figura se indican los tiempos de incubación.

Canales 1, 2 y 3: hexoquinasa C; canal 4: tripsina; canal 5: proteínas estándar.

1972). Chakrabarti y Kenkare (1974) encontraron que la hexoquinasa de cerebro bovino es capaz de dimerizar en presencia de glucosa-6-P en una reacción dependiente de la concentración de enzima. Estos efectos son revertidos competitivamente por P_i y ATP (Wilson, 1973). Por otro lado, glucosa no es capaz de revertir la inhibición por glucosa-6-P y no modifica el estado conformacional de la enzima (Easterby, 1973).

Pareció interesante determinar el efecto de algunos ligandos en el estado polimérico de las hexoquinasas de cerebro de rata y cerebro de pollo. Para realizar este tipo de experimentos se usó una electroforesis en condiciones nativas, con un gradiente transversal de poliacrilamida (ver Materiales y Métodos).

En la figura 22 se muestra la migración electroforética de hexoquinasa de cerebro de rata. Se puede apreciar una forma mayoritaria de la enzima como monómero cuya movilidad electroforética correspondería a 100.000. Por otro lado, en la figura 23 se muestra la migración electroforética de hexoquinasa de cerebro de pollo tratada en las mismas condiciones que la hexoquinasa de cerebro de rata. Es posible apreciar la presencia de varias formas moleculares, siendo las formas diméricas y triméricas las que están en mayor porcentaje. Estas observaciones concuerdan con las publicadas por Easterby (1975) que sugieren un equilibrio entre la forma dimérica y monomérica de la hexoquinasa de corazón de cerdo. Para averiguar si las distintas formas moleculares que presentaban ambas enzimas eran

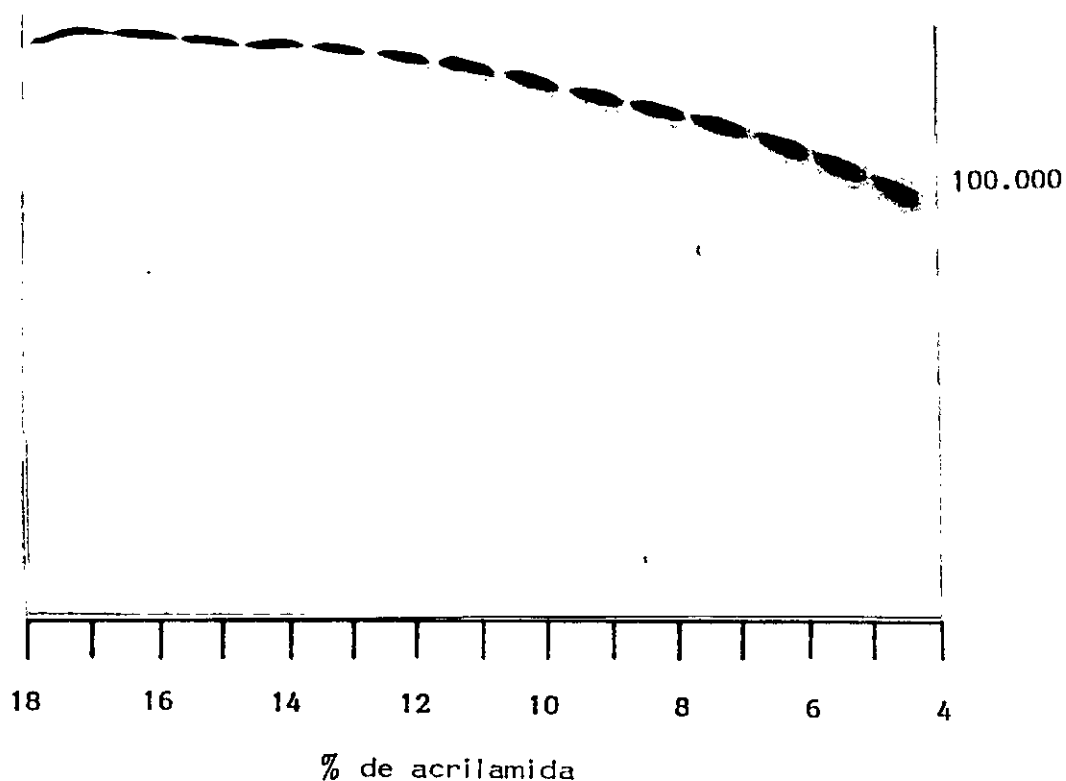


Fig. 22. Electroforesis de hexoquinasa A de rata en gel de poliacrilamida en placa con gradiente transversal. (Desde 4 a 18% de derecha a izquierda). El gel fue preparado como se describe en la sección Métodos. Aproximadamente 45 μ g (150 μ l) de proteína se incubaron con 45 μ l de amortiguador fosfato 1 mM y NaCl 50 mM, pH 7,0. La muestra final contenía también 4,5 μ l de 2-mercaptoetanol, 22 μ l de azul de bromofenol 0.05% y 30 μ l de glicerol. En cada celda se colocó aproximadamente 3 μ g de proteína.

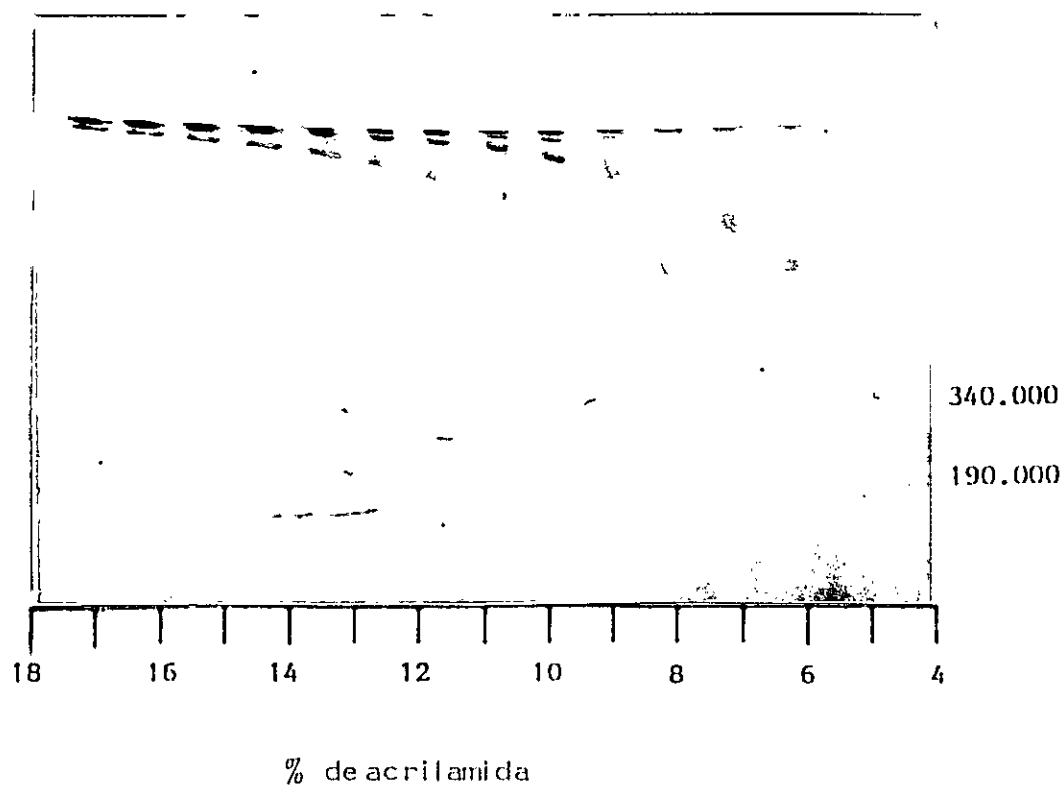


Fig. 23. Electroforesis de hexoquinasa de cerebro de pollo en gel de poliacrilamida con gradiente transversal. Se sembraron aproximadamente 45 μ g de protefina (150 μ l), tratada como se describe en la leyenda de la figura 22.

biológicamente activas después de realizada la electroforesis se tiñó la actividad enzimática en el gel. Se estudió el efecto de ATP en ambas enzimas, ya que se ha visto que ATP se puede unir a la enzima y puede eliminar la dimerización (Easterby 1975). En las figuras 24 y 25 se muestra el efecto del ATP en la estructura cuaternaria de las hexoquinasas de cerebro de rata y pollo. Se observa que la hexoquinasa de cerebro de rata presenta sólo una forma estructural en estas condiciones. En el caso de la hexoquinasa de cerebro de pollo, se observa una forma predominante que corresponde al monómero.

En las figuras 26 y 27 se muestran los gráficos de Ferguson obtenidos de la migración electroforética de las hexoquinasas de cerebro de rata y cerebro de pollo, en función de la concentración de acrilamida, en presencia y ausencia de ligandos. El gel obtenido para la hexoquinasa de cerebro de rata presentó sólo una forma estructural activa que coincide con la banda de proteína. En el caso de la hexoquinasa de cerebro de pollo las diferentes formas estructurales separadas en el gel eran activas (resultados no mostrados).

En condiciones similares a las descritas más arriba, se estudió el efecto que tenía glucosa 6-P en el cambio conformacional de las hexoquinasas. La enzima de cerebro de rata en presencia de glucosa-6-P 0,5 mM está principalmente como monómero. En cambio, la hexoquinasa de cerebro de pollo en estas condiciones presenta diferentes formas (resultados no mostrados).

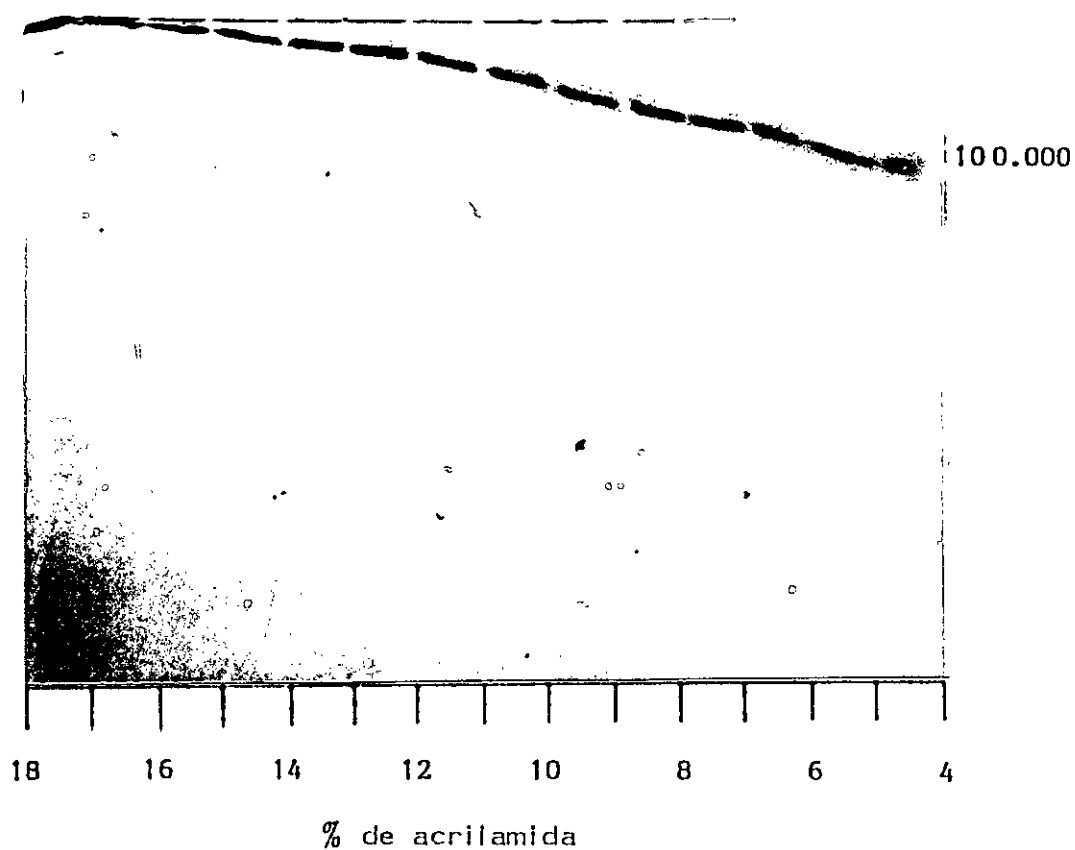


Fig. 24. Efecto del ATP en la migración electroforética de hexoquinasa A de rata. Se sembraron 45 μ g de proteínas tratadas como se describe al pie de la figura 22, excepto que se agregaron 4 μ l de ATP 0,100 M al medio de incubación.

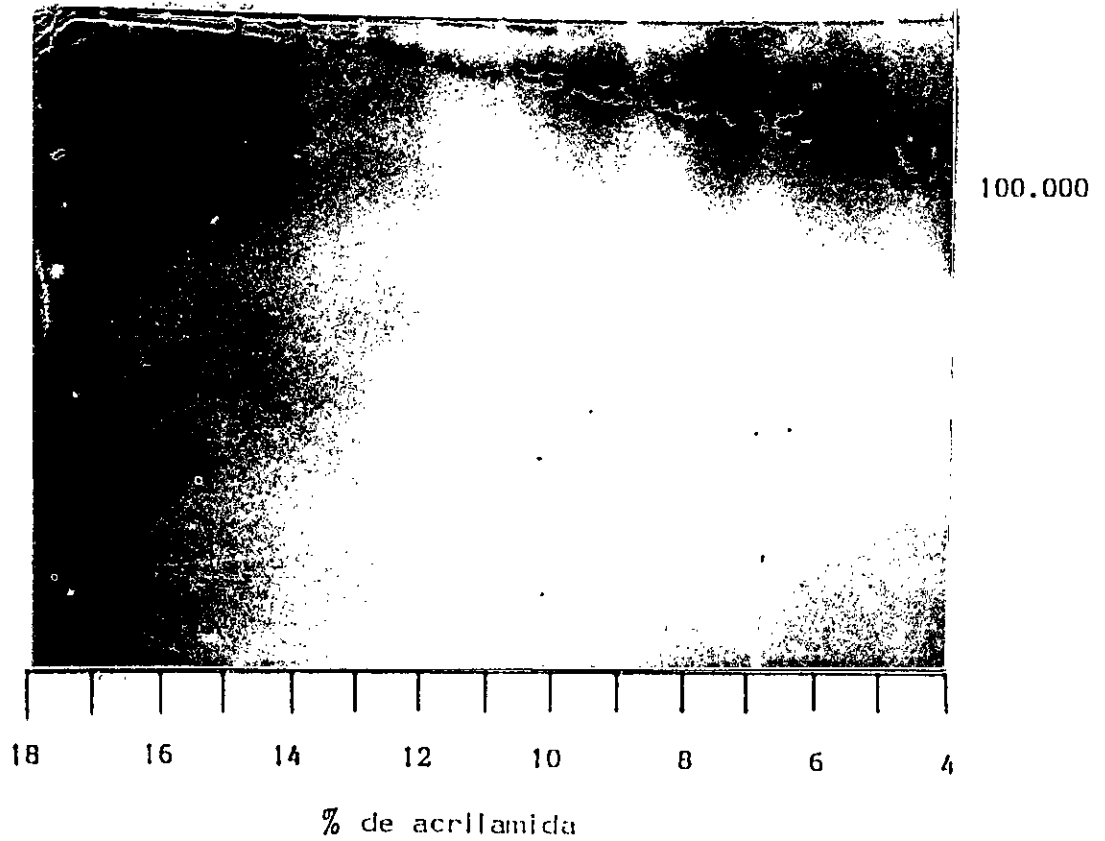


Fig. 25. Efecto del ATP en la migración electroforética de hexoquinasa de cerebro de pollo. Se sembraron aproximadamente 45 μ g de proteínas las que fueron tratadas como se describe al pie de la figura 22, excepto que se agregó 4 μ l de ATP 0,1 M al medio de incubación.

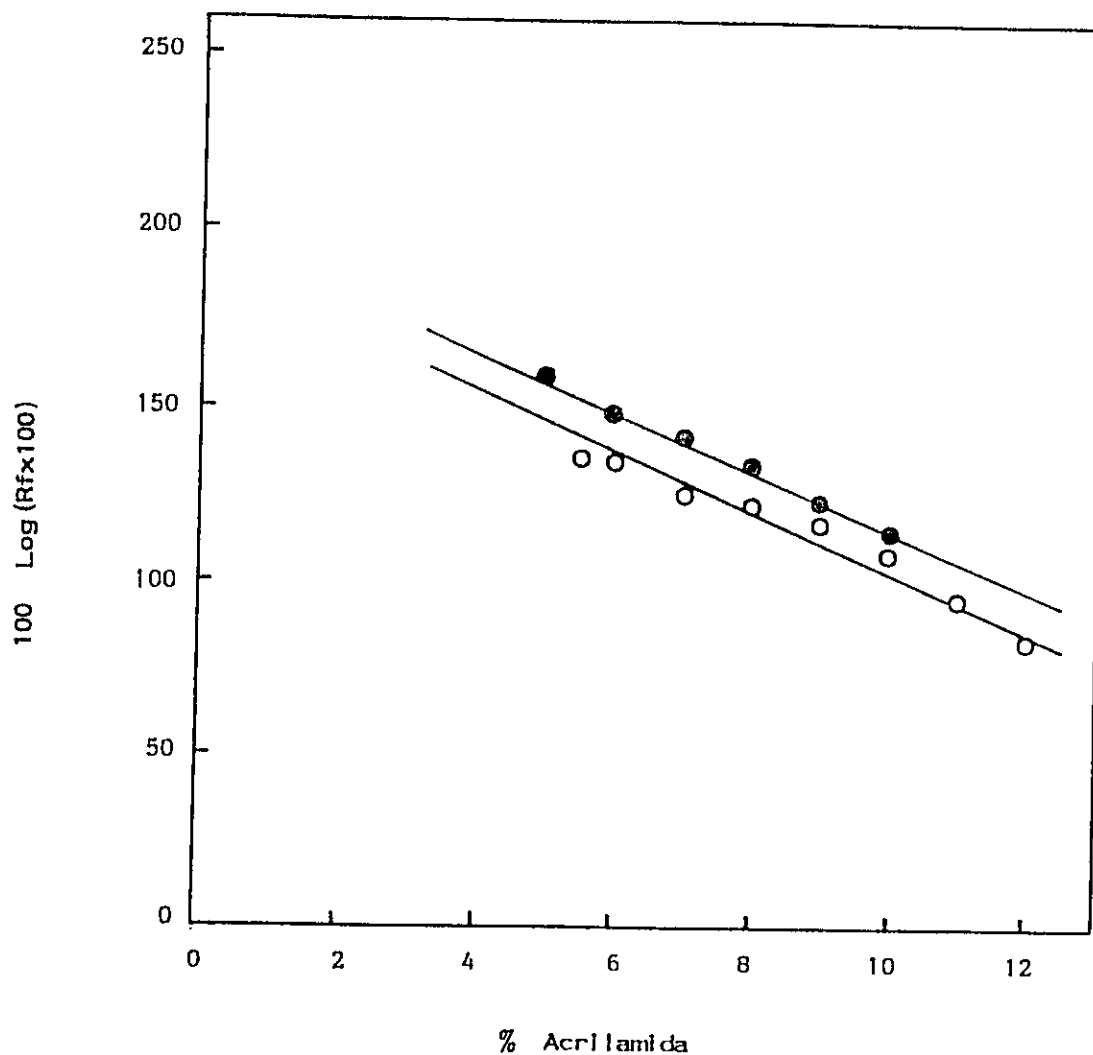


Fig. 26. Gráfico de Ferguson para hexoquinasa A de rata en presencia y ausencia de ligando. Se utilizaron minigeles con gradiente transversal de poliacrilamida (4 a 18%). Se graficó la movilidad relativa (R_f) de la hexoquinasa en función de la concentración de poliacrilamida. (○, sin ATP; ●, ATP 2 mM).

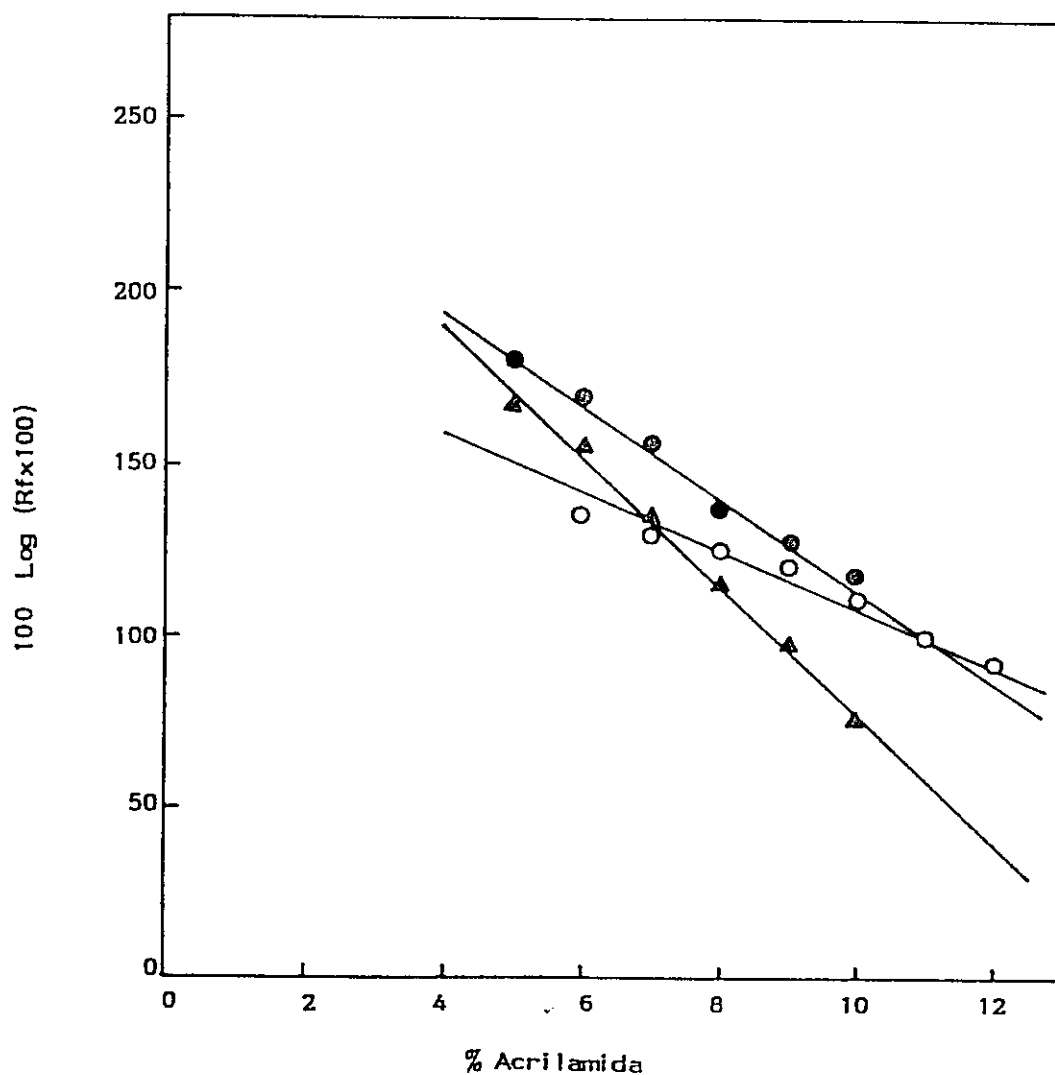


Fig. 27. Gráfico de Ferguson para hexoquinasa de cerebro de pollo en presencia y ausencia de ligando. Se utilizaron minigelles con gradiente transversal de poliacrilamida (4 a 18%). Se graficó la movilidad relativa (R_f) de la hexoquinasa en función de la concentración de poliacrilamida. (○, monómero; ●, dímero; ▲, trímero). Símbolos llenos: sin ATP; vacíos: ATP 2 mM.

El hecho que el glucosa-6-P afecte poco el estado de dimerización de la hexoquinasa de rata se podría deber a que la molécula puede tener algo de ATP unido, el que podría estar revirtiendo el efecto de glucosa-6-P. También se estudió el efecto de glucosa 1 mM en la estructura de estas enzimas, pero ésta no provoca cambios en el estado conformacional de las enzimas.

Composición aminoacídica

En la Tabla IV se muestra la composición aminoacídica (número de residuos por molécula) de hexoquinasa de cerebro de pollo, junto a los valores publicados para hexoquinasas A de corazón de cerdo, cerebro de bóvido, cerebro de rata y las hexoquinasas B de músculo de rata y C de hepatoma de Novikoff. Para comparar la composición aminoacídica de estas isoenzimas, se usó el índice $S\Delta n$ (Tabla V). En este análisis las comparaciones entre las isoenzimas tipo A de mamíferos y B y C de rata satisfacen el análisis estadístico fuerte entre ellas, mientras que hexoquinasa de cerebro de pollo satisface el análisis débil. De acuerdo con estos resultados, hexoquinasa C de rata no estaría relacionada con las hexoquinasas A de mamíferos y si con hexoquinasas B de rata y con la hexoquinasa de cerebro de pollo.

TABLA IV

Composición aminoacídica de algunas hexoquinasas de mamíferos

Amino-ácido	Bovido A (Ref. 1)	Cerdo A (Ref. 2)	Rata A (Ref. 3)	Pollo (Ref. 4)	Rata B (Ref. 5)	Rata C (Ref. 6)
ASX	90	104	98	64	92	60
GLX	100	93	88	96	104	111
SER	51	49	48	64	52	65
GLY	86	79	80	159	86	99
HIS	19	18	18	16	23	21
ARG	54	51	54	48	56	54
THR	57	51	50	32	54	52
ALA	52	55	48	72	66	74
PRO	51	26	36	32	26	31
TYR	19	22	8	16	16	16
VAL	52	60	64	48	66	72
MET	26	24	30	16	30	16
ILE	39	49	50	32	36	33
LEU	87	85	84	72	92	105
PHE	37	37	36	40	36	32
LYS	61	61	60	48	52	32
Σ	881	864	852	855	887	873

1. Subbarao, B. y Kenkare, U. (1977)
2. Easterby, J.S. y O'Brien, M.J. (1973)
3. Chou, A.C. y Wilson, J.E. (1972)
4. Resultados de esta tesis
5. Holroyde, M.J. y Trayer, J.P. (1976)
6. Radojković, J. y Ureta, T. (1987)

TABLA V

Relación entre hexoquinasas a través del índice de diferencia de composición aminoacídica ($S\Delta n$)

BOVIDO A	-					
CERDO A	144,9*	-				
RATA A	120,0*	59,3*	-			
POLLO	274,0 ⁺	226,6 ⁺	302,5 ⁺	-		
RATA B	151,0*	98,9*	151,0*	230,0 ⁺	-	
RATA C	504,3	635,0	649,0	336,7 ⁺	292,3 ⁺	-

BOVIDO A

CERDO A

RATA A

POLLO

RATA B

RATA C

* Fuertemente relacionada
 + Débilmente relacionada

DISCUSION

En el cerebro de mamíferos y de pollo se encuentra una actividad hexoquinásica asociada a la mitocondria. En el caso de mamíferos tal actividad corresponde a la hexoquinasa A, que es una de las cuatro isoenzimas presentes en diversos tejidos. No es obvio que en el pollo dicha actividad se deba a la misma hexoquinasa. Por ello se hizo necesario purificar a homogeneidad la hexoquinasa presente en cerebro de pollo, estudiar sus propiedades y establecer sus posibles relaciones de homología con la hexoquinasa A de cerebro de rata.

Los valores de K_m para glucosa y ATP de la hexoquinasa de cerebro de pollo fueron 0,13 mM y 0,45 mM, respectivamente. El valor de K_m para glucosa obtenido es ligeramente superior al de la isoenzima A de rata (0,06 mM). Por otro lado la K_m para ATP es similar a la de la isoenzima A de rata.

La hexoquinasa purificada de cerebro de pollo presentó una masa molecular de aproximadamente 100.000, valor que coincide con las masas moleculares estimadas para las hexoquinasas presentes en hígado de pollo adulto y en embriones de pollo (Lagos y Ureta, 1981) y que también es similar a la masa molecular estimada para la hexoquinasa A de rata (Wilson, 1972).

Ni los parámetros cinéticos ni el peso molecular de la hexoquinasa de cerebro de pollo permiten la identificación del

tipo de isoenzima o su homologación con alguna de las hexoquinásas de los mamíferos. Por ello se recurrió al estudio comparativo de las propiedades inmunológicas de las enzimas de pollo y rata. Los hallazgos mostrados en la sección Resultados permiten concluir que existe alguna reacción inmunológica cruzada entre las hexoquinásas A de rata y pollo.

Si bien los sueros policlonales preparados contra las enzimas en estudio solo son capaces de inmunoinhibir la actividad enzimática de la proteína usada como antígeno, se observa reacción cruzada si el estudio se realiza en placas de plástico por el método ELISA. La ausencia de inhibición de la actividad enzimática era esperada, ya que Nuñez y col. (1985) mostraron que un suero inmune anti-hexoquinasa A de rata inhibe solo parcialmente la actividad en las hexoquinásas de cerebro de otros roedores y su efecto sobre las enzimas de cerebro de rumiantes es prácticamente nulo.

Por otra parte, el uso de anticuerpos monoclonales anti-hexoquinasa A de rata confirma la presencia de determinantes antigénicos parecidos en la enzima de pollo. En un estudio previo, Ureta y col. (1986) habían mostrado que algunos de esos anticuerpos monoclonales son inespecíficos ya que reaccionan muy bien con hexoquinásas de cerebro de varios otros mamíferos. Otros, en cambio, son muy específicos para la enzima de rata y no son capaces de unirse a la enzima de cerebro de especies muy relacionadas (roedores). Los estudios resumidos en la figura

17 muestran que varios anticuerpos monoclonales anti-hexoquinasa A de rata fueron capaces de unirse a la enzima de cerebro de pollo, a pesar de que no son capaces de unirse a otras hexoquinasas (B, C, o D) de rata.

Otra herramienta susceptible de discriminar entre los distintos tipos de hexoquinasas es la técnica de digestión trípica limitada. Polakis y Wilson (1984) han encontrado que en ciertas condiciones se generan tres fragmentos a partir de la hexoquinasa de rata: uno de 50 kd, otro de 40 kd y otro de 10 kd, resultantes del corte proteolítico en dos sitios susceptibles; además los péptidos intermediarios de 90 kd y 60 kd. Como se observa en la figura 19, la hexoquinasa de cerebro de pollo tratada con tripsina muestra un patrón de corte muy similar al de la hexoquinasa A de cerebro de rata, es decir, se generan fragmentos de masas moleculares aproximadas a: 90 kd, 60 kd, 50 kd y 40 kd. Sin embargo no se visualizó el péptido de 10 kd en ninguna de las dos especies. La misma técnica genera, en cambio, fragmentos diferentes en las hexoquinasas B y C de la rata (Fig. 20 y 21). Podemos concluir que la hexoquinasa de pollo es parecida a la hexoquinasa A de rata y diferente a las hexoquinasas B y C.

Los resultados del estudio de reactividad cruzada de las hexoquinasas presentes en hígado de pollo con el suero anti-hexoquinasa de cerebro de pollo han mostrado que existe

identidad entre la isoenzima presente en cerebro y la isoenzima I y no con la isoenzima II presentes en hígado. Estos resultados y los obtenidos con la digestión trípica limitada nos indicarían que también la isoenzima I presente en cerebro sería semejante a la hexoquinasa A de rata.

Es conveniente recordar algunas pruebas experimentales en relación a los estudios de unión de ligandos a la enzima que indican que la unión de ciertos ligandos inducen cambios conformacionales en la hexoquinasa de cerebro de rata (Wilson, 1979). Estos cambios conformacionales se definirían por la capacidad que tienen estos ligandos para proteger a la hexoquinasa de la inactivación por calor, quimotripsina y DTNB. Estas observaciones indicarían que los ligandos inducen cambios conformacionales, aunque no se ha demostrado el cambio estructural que ocurre en la proteína. Chakrabarti y Kenkare (1974) y Easterby (1975) estudiaron el efecto del glucosa-6-P en el coeficiente de sedimentación de las hexoquinasas de cerebro de bóvido y de cerdo y encontraron formación de dímeros a ciertas concentraciones de la enzima, que se podrían atribuir a cambios conformacionales inducidos por el ligando.

Los resultados del efecto de algunos ligandos (ATP y Glc-6-P) en el comportamiento electroforético en condiciones nativas de la hexoquinasa de cerebro de pollo concuerdan con los mencionados arriba. Los experimentos mostrados en las figuras 22 y 23 nos

permiten concluir que la hexoquinasa de cerebro de pollo presenta un tipo de conformación con una fuerte tendencia a polimerizar, tanto en ausencia como en presencia de glucosa-6-P.

La capacidad de polimerizar parece ser un comportamiento dependiente de la concentración de enzima y el ligando usado. Para hexoquinasa A de rata se aprecia también cierta tendencia a formar dímeros en presencia de Glc-6-P. Los distintos estados de agregación pueden influir en su capacidad de unión a la membrana externa de la mitocondria

Para poder interpretar los valores obtenidos comparando las composiciones de aminoácidos a través del índice $S\Delta n$, deben hacerse las siguientes consideraciones. La primera de ellas, de orden técnico, consiste en recordar que la correlación existente entre $S\Delta n$ y porcentaje de diferencia de estructuras primarias es limitada, decreciendo rápidamente conforme aumentan los valores. Conviene hacer presente además, que el objetivo perseguido al comparar composiciones de aminoácidos es el obtener una estimación de la diferencia en estructuras primarias, ya que son los datos de secuencias y no los de composiciones los que permiten una clara interpretación filogenética. Por consiguiente, el obtener valores altos de $S\Delta n$, como de hecho ocurrió en algunos casos, deja abierta la posibilidad que dichos valores se deban a: i) diferencias reales existentes entre las dos secuencias, ii) diferencias reales existentes entre las dos composiciones, pero que no

corresponden a diferencias entre las secuencias, e incluso, iii) diferencias entre las composiciones tales como fueron determinadas y que no corresponden a diferencias reales entre las composiciones. La segunda consideración que debe hacerse para interpretar correctamente los valores de S_n , guarda relación con la historia evolutiva de las hexoquinasas.

Se postula que el gen de hexoquinasa sufrió una duplicación que llevó el tamaño de la proteína de aproximadamente 50.000 a 100.000. Esta duplicación habría ocurrido con posterioridad a la divergencia protocordados-cordados y con anterioridad a la divergencia de los distintos linajes de cordados (Ureta y col., 1987). Ahora bien, como las isoenzimas A, B y C son todas ellas de masa molecular de 100.000, sus respectivas divergencias son necesariamente posteriores a la duplicación 50.000-100.000. No existe, por consiguiente, seguridad de que los linajes de vertebrados de divergencia más temprana -por ejemplo, peces, anfibios- posean efectivamente los tres tipos A, B y C. Podría ocurrir que careciesen de algunas de ellas o que tuviesen tipos isoenzimáticos diferentes de A, B y C, probabilidad tanto más alta cuanto mayor sea el tiempo transcurrido desde la separación del linaje del tronco común.

Conviene recordar que las diferencias en la estructura primaria de dos proteínas homólogas son función de la tasa evolutiva de la molécula y del tiempo de divergencia de los

linajes de los que provienen. Aun cuando la tasa evolutiva de la hexoquinasa no fuese muy elevada, cabría de todas maneras esperar diferencias de magnitud entre las secuencias de dos proteínas provenientes, una de ave y la otra de mamífero. Para establecer definitivamente las homologías es necesario disponer de las secuencias aminoacídicas de las proteínas.

REFERENCIAS

1. Andrews, P. (1964) Estimation of molecular weights of protein by Sephadex gel filtration. Biochem. J. **91**, 222-223.
2. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.
3. Cárdenas, M.L.; Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1978) Maintenance of the monomeric structure of glucokinase under reacting conditions. Arch. Biochem. Biophys **190**, 142-148.
4. Chakrabarti, U. y Kenkare U.W. (1974) Dimerization of brain hexokinase induced by its regulator glucose-6-phosphate. J. Biol. Chem. **249**, 5984-5988.
5. Chou, A.C. y Wilson, J.E. (1972) Purification and properties of rat brain hexokinase. Arch. Biochem. Biophys. **151**, 48-55.
6. Clark-Turri, L., Peñaranda, I., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1974) Inmunochemical titration of liver glucokinase from normal, fasted and diabetic rats. FEBS Lett. **41**, 342-344.

7. Cornish-Bowden, A. (1983) Relating proteins by amino acid composition. Methods Enzymol. **91**, 60-75.
8. Crane, R. y Sols, A. (1953) Association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissues homogenates. J. Biol. Chem. **203**, 273-292.
9. Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. **121** 404-427.
10. Easterby, J.S. (1975) Heart hexokinase: Quaternary structure changes accompanying the binding of regulatory molecules. Eur. J. Biochem. **58**, 231-235
11. Easterby, J.S. y O'Brien, M.I. (1973) Purification and properties of pig-heart hexokinase. Eur. J. Biochem. **38**, 201-211.
12. Finney, K., Messer, J.L., De Witt, D.L. y Wilson, J.E. (1984) Monoclonal antibodies against rat brain hexokinase. Effects on catalytic function and binding to the outer mitochondrial membrane. J. Biol. Chem. **259**, 8232-8237.

13. González, C., Ureta, T., Sánchez, R. y Niemeyer, H. (1964) Multiple molecular forms of ATP: hexose 6-phosphotransferase from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Comm. **16**, 347-352.
14. González, C., Ureta, T., Babul, J., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1967) Characterization of isoenzymes of adenosine triphosphate: D-hexose 6-phosphotransferase from rat liver. Biochemistry, **6**, 460-468.
15. Grossbard, L. y Schimke, R. (1966). Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. J. Biol. Chem. **241**, 3546-3560.
16. Hedrick, J.L. y Smith, A. (1968) Size and charge isomer-separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys **126**, 155-164.
17. Holroyde, M.I. y Trayer, I.P. (1976) Purification and properties of rat skeletal muscle hexokinase. FEBS Lett. **62**, 215-219.

18. Katzen, H.M., Soderman, D.D. y Nitowsky, H.M. (1965) Kinetic and electrophoretic evidence for multiple forms of glucose ATP phosphotransferase activity from human cell cultures and rat liver. Biochem. Biophys. Res. Comm. 19, 377-382.
19. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227, 680-685.
20. Lagos, R. y Ureta, T. (1981) Ontogeny of chick liver hexokinase isoenzymes. Arch. Biol. Med. Exp. 14, 331-341.
21. Lawrence, G. y Trayer, I. (1984) Hexokinase isoenzymes: antigenic cross reactivities and aminoacid compositional relatedness. Comp. Biochem. Physiol. 78B, 233-238.
22. Lineweaver, H., y Burk, D. (1934) The determination of dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666.
23. Meglasson, M.D., Burch, P.T., Berner, D.K., Najafi, H., Vogin, A.P. y Matchinsky, F.M. (1983) Chromatographic resolution and kinetic characterization of glucokinase from islets of Langerhans. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 85-89.

24. Nemat-Gorgani, M. y Wilson J.E. (1986) Rat brain hexokinase: Location of the substrate nucleotide binding site in a structural domain at the C-terminus of the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. **234**, 341-352.
25. Niemeyer, H., Clark-Turri, L. y Rabajille, E. (1963) Induction of glucokinase by glucose in rat liver. Nature, **198**, 1096-1097.
26. Niemeyer, H., Clark-Turi, L., Pérez, N y Rabajille, E. (1965) Studies on factors affecting the induction of ATP: D-hexose 6-phosphotransferase in rat liver. Arch. Biochem. Biophys., **109**, 634-645.
27. Niemeyer, H., Pérez, N. y Rabajille, E. (1966) Interrelation of actions of glucose, insuline and glucagon on induction of adenosine triphosphate: D-hexose phosphotransferase in rat liver. J. Biol. Chem., **241**, 4055-4059.
28. Niemeyer, H., Pérez, N. y Codoceo, R. (1967) Liver glucokinase induction in acute and chronic insulin insufficiency in rats. J. Biol. Chem. **242**, 860-864.
29. Niemeyer, H., Ureta, T. y Clark-Turri, L. (1975) Adaptative character of liver glucokinase. Mol. Cell. Biochem. **6**, 109-126.

30. Núñez, L., De Ioannes, A. y Ureta, T. (1985) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes from vertebrates. VIII. Immunochemical studies on mammalian hexokinase A. Comp. Biochem. Physiol. **82B**, 247-253.
31. Ouchi, M. e Ishibashi, S. (1975) Discrimination of antigenic site and thiol-inhibitor-sensitive site of hexokinase isoenzymes. Biochem. J. **149**, 481-483.
32. Pilkis, S.J., Hansen, R.J. y Krahl, M.E. (1968) Apparent molecular weights of some ATP: D-hexose 6-phosphotransferases: specific effects of Sephadex G-100. Biochim. Biophys. Acta. **154**, 250-251.
33. Polakis, P.G. y Wilson, J.E. (1984) Proteolytic dissection of rat brain hexokinase: Determination of the cleavage pattern during limited digestion with trypsin. Arch. Biochem. Biophys. **234**, 341-352.
34. Polakis, P.G. y Wilson, J.E. (1985) An intact hydrophobic N-terminal sequence is critical for binding of rat brain hexokinase to mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. **236**, 238-337.

35. Radojković, J. y Ureta, T. (1987) Hexokinase isoenzymes from the Novikoff hepatoma. Biochem. J. **242**, 895-903.
36. Redkar, U.D. y Kenkare, U.W. (1972) Bovine brain mitochondrial hexokinase. Solubilization, purification and role of sulphhydryl residues. J. Biol. Chem. **247**, 7576-7584.
37. Retamal, C. y Babul, J. (1988) Determination of the molecular weight of proteins by electrophoresis in slab gels with a transverse pore gradient of crosslinked polyacrylamide in absence of denaturing agents. Anal. Biochem. En prensa.
38. Rose I. A. y Warms, J.V.B. (1967) Mitochondrial hexokinase. Release, rebinding, and location. J. Biol. Chem., **242**, 1635-1645.
39. Salas, M., Viñuela, E. y Sols, A. (1963) Insulin-dependent synthesis of liver glucokinase in the rat. J. Biol. Chem., **238**, 35351-3538.
40. Schirch, D.M. y Wilson, J.E. (1987) Rat brain hexokinase: amino acid sequence at the substrate hexose binding site is homologous to that of yeast hexokinase. Arch. Biochem. Biophys. **257**, 1-12.

41. Smith, A.D. y Wilson, J. (1986) A modified ELISA that selectively detects monoclonal antibodies recognizing native antigen. J. Immunol. Meth. **94**, 31-35.
42. Subbarao, B. y Kenkare, U. (1977) Reaction of brain hexokinase with tetranitromethane: Oxidation of essential thiol groups. Arch. Biochem. Biophys. **181**, 8-18.
43. Ureta, T. (1975) Phylogeny, ontogeny and properties of the hexokinases from vertebrates. En: Isozymes III. Developmental Biology, (Markert, C.L., editor) Academic Press, New York, pp. 575-601.
44. Ureta, T. (1982) The comparative isozymology of vertebrate hexokinase. Comp. Biochem. Physiol. **71B**, 549-555.
45. Ureta, T., Radojković, J. y Niemeyer, H. (1970) Inhibition by catecholamines of the induction of rat liver glucokinase. J. Biol. Chem. **245**, 4819-4824.
46. Ureta, T., Radojković, J., Slebe, J.C. y Reichberg, S. (1972) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates III. Isolation and properties of two hexokinases from chick liver. J. Biochem. **3**, 103-110.

47. Ureta, T., Reichberg, S.B., Radojković, J. y Slebe, J.C. (1973) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates IV. Chromatographic profiles of hexokinases from the liver of several species. Comp. Biochem. Physiol. **45B**, 445-461.
48. Ureta, T., Slebe, J.C., Radojković, J. y Lozano, C. (1975) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates-V. Glucose phosphotransferases in the liver of reptiles. Comp. Biochem. Physiol. **50B**, 515-524.
49. Ureta, T., Radojković, J., Preller, A. y Guixé, V. (1979) Glucose utilization in vertebrates as a molecular probe for the study of evolution. Arch. Biol. Med. Exp. **12**, 49-58.
50. Ureta, T., Radojkovic, J., Zepeda, S. y Guixé, V. (1981) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. VII. Mammalian hexokinases. Comp. Biochem. Physiol. **70B**, 225-236.
51. Ureta, T., Smith, A.D. y Wilson, J.E. (1986) Hexokinase A from mammalian brain: comparative peptide mapping and immunological studies with monoclonal antibodies. Arch. Biochem. Biophys. **246**, 419-427.

52. Ureta, T., Medina, C. y Preller, A. (1987). The evolution of hexokinases. Arch. Biol. Med. Exp. **20**, 343-357.
53. Wilson, J.E. (1972) The molecular weight of rat brain hexokinases. Biochim. Biophys. Acta **276**, 568-571.
54. Wilson, J.E. (1973) Ligand induced conformation of rat brain hexokinase: Effects of glucose-6-phosphate and inorganic phosphate. Arch. Biochem. Biophys. **159**, 543-549.
55. Wilson, J.E. (1979) Ligand induced conformational changes of rat brain hexokinase: Their role in determining the substrate specificity for hexoses and inhibitory effectiveness of hexose 6-phosphates. Arch. Biochem. Biophys. **196**, 79-87.
56. Wilson, J.E. (1985) Regulation of mammalian hexokinase activity. En regulation of carbohydrate metabolism (R. Beitner, Ed.) CRC Press, Boca Raton, F.l., Vol. 1, pp. 45-85.
57. Wilson, J.E. y Smith, A.D. (1985) Monoclonal antibodies against brain hexokinase: utilization in epitope mapping studies and establishment of structure-function relationships. J. Biol. Chem. **260**, 12838-12843.