

VCH-FC
LIC-B
T686

PURIFICACIÓN DE GLUCOQUINASA DE HÍGADO DE RATA
E INDUCCIÓN DE UN ANTISUERO ESPECÍFICO



Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Licenciado en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

por

GABRIELA CECILIA TORO ACUÑA

Octubre, 1982

Profesor Guía: Dr. Hermann Niemeyer F.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio
de Bioquímica y Biología Molecular del
Departamento de Biología

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Niemeyer que me dejó trabajar con gran libertad y cuya personalidad ha influido en mi visión sobre el quehacer científico.

Al Dr. De Ioannes, y a las personas de su laboratorio (Leonardo, Danissa, María Eugenia), quienes me guiaron en la parte inmunológica y brindaron apoyo en todo momento.

A Ximena Espinosa, que compartió mucho más que buenas y malas ideas, mucho más que malos resultados ¡¡Una gran amistad!!

A Octavio Monasterio, Juan Davagnino, Eliana Rabajille y Marilú Cárdenas, con quienes siempre pude contar.

Al Dr. Ian Trayer por sus consejos y por regalarme una matriz de sefarosa con la que él pensó solucionar mis problemas.

A Alejandro Reyes, gran amigo, que transformaba mis "monos" en gráficos y que me proporcionó ayuda en todo orden de cosas.

A toda la gente del laboratorio.

A mis amigos de la facultad que han enriquecido mi campo afectivo y que muchas veces transformaron la melancolía producida por un mal resultado en un estallido de risa al "re-analizar" la idea...., el resultado...., el laboratorio....

A mi familia
y
a la Sra.
Berta Araneda de Toro

INDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
A. INTRODUCCION	
1. La glucoquinasa de hígado de rata	6
2. Purificación de la glucoquinasa	9
3. Antisuero contra glucoquinasa	11
B. MATERIALES Y METODOS	
1. Reactivos	13
2. Animales de experimentación	14
3. Determinación de actividades enzimáticas	14
4. Determinación de proteínas	16
5. Otras determinaciones	17
6. Preparación y regeneración de los materiales cromatográficos	17
7. Preparación de la sefarosa-glucosamina	18
8. Electroforesis en geles de poliacrilamida	19
9. Obtención del suero inmune antiglucoquinasa	20
10. Métodos de caracterización del antisuero	
a) Inmunodifusión	22
b) Inmunolectroforesis	23
c) Microinmunoensayo con el método ELISA	24

C. RESULTADOS

I. Etapas habituales en la purificación de la glucoquinasa

1. Preparación de los extractos crudos	26
2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa	26
3. Precipitación con sulfato de amonio	27
4. Filtración en Sephadex G-150	29
5. Cromatografía de afinidad	31
6. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50	32
7. Control de pureza de las preparaciones	40

II. Etapas de purificación alternativas

1. Sustitución del Sephadex G-100 por Sephadex G-150	40
2. Variaciones en la cromatografía de afinidad	
a) Fuerza iónica	40
b) Agentes eluyentes	42
i. Elución con N-acetilglucosamina	42
ii. Elución con glucosa y urea	47
iii. Elución con glucosa y ATP	47
c) Dilución de la sefarosa-glucosamina	49
d) Recromatografía en sefarosa-glucosamina	53
i. Elución con glucosa 1 M	53
ii. Elución con gradiente de glucosa	54
3. Electroforesis preparativa en poliacrilamida	55

III. Análisis inmunológico

1. Inmunodifusión doble (Método de Ouchterlony)	58
2. Inmunolectroforesis	59
3. Inmunoinhibición de la glucoquinasa por el antisuero	59
4. Microinmunotitulación	63

D. DISCUSION	67
--------------------	----

E. REFERENCIAS	76
----------------------	----

INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa del extracto crudo	28
Fig. 2. Filtración en Sephadex G-150	30
Fig. 3. Cromatografía de afinidad en sefarosa-glucosamina	33
Fig. 4. Efecto protector del glicerol en la actividad de la glucoquinasa	34
Fig. 5. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50	36
Fig. 6. Glucoquinasa purificada sometida a electroforesis en geles con distintas concentraciones de poliacrilamida .	37
Fig. 7. Electroforesis en geles de poliacrilamida de glucoquinasa purificada	38
Fig. 8. Electroforesis con glucoquinasa en sucesivas etapas de purificación	41
Fig. 9. Cromatografía en columna de sefarosa-glucosamina; elución con glucosa 1 M - KCl 62 mM	43
Fig. 10. Elución con N-acetilglucosamina de la cromatografía en sefarosa-glucosamina	45
Fig. 11. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la glucoquinasa eluida con N-acetilglucosamina	46

	Página
Fig. 12. Cromatografía en columna de sefarosa-glucosamina; elución con glucosa y urea	48
Fig. 13. Cromatografía en columna de sefarosa-glucosamina; elución con glucosa y ATP	50
Fig. 14. Cromatografía en sefarosa-glucosamina diluida en Sepharose 4B	52
Fig. 15. Recromatografía en sefarosa-glucosamina; elución con glucosa 1 M - KCl 64 mM	54
Fig. 16. Recromatografía en sefarosa-glucosamina; elución con un gradiente de glucosa entre 0 y 1 M	56
Fig. 17. Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida	57
Fig. 18. Inmunodifusión doble con glucoquinasa semi-purificada .	60
Fig. 19. Inmunodifusión doble con glucoquinasa purificada	61
Fig. 20. Inmunoelectroforesis (método de los cohetes)	62
Fig. 21. Inhibición de glucoquinasa con suero inmune	64
Fig. 22. Microinmunotitulación de glucoquinasa con el método ELISA	65

RESUMEN

Se elaboró un procedimiento de purificación de la glucoquinasa de hígado de rata, basado en métodos usados previamente en este laboratorio y en algunas variantes desarrolladas en este trabajo, las cuales resultaron útiles para obtener un mayor rendimiento de la preparación enzimática.

Las etapas del procedimiento fueron: a) homogeneización del hígado y separación de un líquido sobrenadante por centrifugación a 105.000 g; b) cromatografía en DEAE-celulosa; c) precipitación con sulfato de amonio entre 45 y 80% de saturación; d) filtración en Sephadex G-150 (sefadex); e) cromatografía de afinidad en Sepharose-N-(6-aminohexanoil)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (sefarosa-glucosamina); f) cromatografía en DEAE-Sephadex A-50. En cada etapa se investigaron diversas alternativas conducentes a una cierta optimización del procedimiento. Fue especialmente importante la introducción de glicerol a diversas concentraciones en cada etapa y durante el almacenamiento de la enzima.

Mediante este procedimiento, se obtuvo una preparación de glucoquinasa con alto grado de pureza, en la cual existía una sola proteína contaminante, separada de la glucoquinasa en un gel de poliacrilamida al 10%. Conjuntos de secciones de

estos geles, donde se encontraba la glucoquinasa, se emplearon como antígeno para inmunizar un conejo.

El bajo título inicial del antisuero obligó al uso de una inyección de refuerzo con enzima soluble de menor grado de pureza (tres bandas en geles de poliacrilamida). El antisuero finalmente aislado mostró ser monoespecífico por las técnicas de inmunodifusión doble (método de Ouchterlony) y de inmuno-electroforesis (método de los cohetes), pues se producía un solo arco de precipitación con glucoquinasa de distintas concentraciones y grados de pureza (enzima de las etapas de sefadex y sefarosa-glucosamina). Se detectó actividad glucoquinásica en los arcos de precipitación.

La determinación del punto de equivalencia, utilizando una cantidad fija de glucoquinasa y cantidades variables del suero inmune semipurificado y reconstituido, indicó que 100 μ l de antisuero titulaban 6,6 mU de enzima.

Con el antisuero inducido se calibró el método ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") para realizar la microinmunitulación de glucoquinasa en extractos celulares.

ABSTRACT

A purification procedure for rat liver glucokinase was worked out. The procedure was based in previous methods used in this laboratory, with several variations developed in this work that proved to be useful to obtain the enzyme preparation in higher yields.

The steps of the procedure were the following: a) homogenization and separation of the supernatant fluid after centrifugation at 105.000 g; b) DEAE-cellulose chromatography; c) precipitation between 45 and 80% saturation ammonium sulfate; d) filtration through Sephadex G-150; e) affinity chromatography on Sepharose-N-(6-aminohexanoyl)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose (Sepharose-glucosamine); f) DEAE-Sephadex A-50 chromatography.

Different alternatives were investigated at each step in an attempt to optimize the procedure. The use of glycerol at different concentrations in each step and during enzyme storage was particularly valuable.

With this procedure a glucokinase of high purity was obtained, which had a single contaminant protein distinctly separated after electrophoresis in 10% polyacrylamide gels. A pool of gel sections containing glucokinase was used as antigen to immunize a rabbit.

Due to the low titer of the initial antiserum, a reinforcement of the immunization was accomplished by the injection of soluble enzyme of lower purity (three bands of protein in polyacrylamide gels). The antiserum finally isolated was monospecific as assessed by double immunodiffusion and immunoelectrophoretic technics, since a simple precipitation arc was observed with glucokinase at different concentrations and purities (enzyme at the Sephadex and Sepharose-glucosamine steps). Glucokinase activity was detected in the precipitation arcs.

The equivalence point was determined by using a constant amount of glucokinase and variable amounts of reconstituted semipurified immune serum. 100 μ l of antiserum neutralized 6,6 mU of glucokinase.

With the induced antiserum the ELISA method was calibrated which permitted to perform the microimmunotitulation of glucokinase in cell extracts.

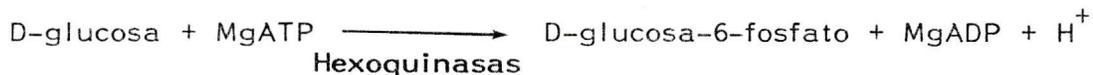
ABREVIATURAS

BSA	: Seroalbúmina bovina
Coomassie G-250	: Azul brillante de Coomassie G
DEAE-celulosa	: dietilaminoetil-celulosa
DTT	: ditioneitol
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
EDC	: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
FMS	: fenazina-metosulfato
Glc	: glucosa
GK	: glucoquinasa
G-6-P	: glucosa-6-fosfato
6-PG	: 6-fosfogluconato
GlcNAc	: N-acetilglucosamina
NBT	: Azul de nitrotetrazolio
PBS	: solución de fosfato-salino
PEP	: fosfoenolpiruvato
Tris	: Tris(hidroximetil)aminometano
TNBS	: trinitrobenceno-sulfonato

A. INTRODUCCION

1. La glucoquinasa de hígado de rata

La fosforilación de la glucosa es la primera reacción necesaria para iniciar su metabolismo, sea hacia la vía glicolítica, la síntesis de glicógeno, la vía de las pentosas o la de los ácidos urónicos. Las enzimas denominadas hexoquinasa (E.C. 2.7.1.1), presentes en la mayoría de las células, catalizan la siguiente reacción:



Los estudios de Walker (1962, 1963) revisten un significado especial en el conocimiento de esta reacción en mamíferos pues, mediante un análisis cinético, lograron distinguir en el hígado de rata y de cuy adultos, la presencia de dos enzimas fosforilantes de glucosa, una de K_m alta ($\approx 10^{-2}$ M) y otra de K_m baja ($\approx 10^{-5}$ M). En el laboratorio de Sols, por otra parte, Viñuela et al. (1963) separaron, mediante precipitaciones con sulfato de amonio, dos fracciones proteicas con actividad fosforilante de glucosa: una caracterizada por una K_m alta para glucosa ($\approx 10^{-2}$ M) que denominaron glucoquinasa y otra de baja K_m ($\approx 10^{-5}$ M) que sería una hexoquinasa como la que se conocía en muchos tejidos animales. La presencia de una glucoquinasa de K_m alta en el hígado confirmaba los resultados de DiPietro et al.

(1962). Al año siguiente González et al. (1964) separaron mediante cromatografía en DEAE-celulosa, cuatro isoenzimas capaces de fosforilar la glucosa en el hígado de rata, las que denominaron A, B, C y D, de acuerdo a su orden de elución. Estos resultados fueron confirmados mediante electroforesis en geles de almidón por Katzen et al. (1965). La isoenzima D o glucoquinasa se la ha encontrado en el hígado de la mayoría de los mamíferos, en los anfibios y en los reptiles inferiores (ref. en Ureta, 1982). La isoenzima D ha sido denominada glucoquinasa (E.C. 2.7.1.2) debido a que se pensó que tenía una especificidad algo más restringida para la glucosa (Walker, 1963; Salas et al., 1965; González et al., 1967) que las isoenzimas llamadas en grupo hexoquinasas (Viñuela et al., 1963) y que utilizan muy bien fructosa, aunque con K_m superior a glucosa (González et al., 1964, 1967). Trabajos recientes de este laboratorio han mostrado que la glucoquinasa también fosforila fructosa, con una V_{max} 2,5 veces superior a la V_{max} con glucosa pero con una K_m mayor (≈ 250 mM) (Cárdenas et al., 1981; Cárdenas, 1982). Tanto las hexoquinasas como la glucoquinasa utilizan muy bien manosa y, algo menos eficientemente, 2-desoxiglucosa (González et al., 1964; 1967). Otras propiedades distinguen a la glucoquinasa de las otras hexoquinasas. Presenta una función de saturación sigmoidea con respecto a glucosa, siendo sus parámetros cinéticos $n_H = 1,5$ y $K_{0,5} = 7,5$ mM (pH 7,5) (Niemeyer et al., 1975; Storer y Cornish-Bowden, 1976; Cárdenas et al., 1979, Cárdenas, 1982), en

cambio las hexoquinasas A y B tienen cinética michaeliana y la hexoquinasa C es inhibida por exceso de sustrato (González et al., 1964, 1967; Ureta, 1976, 1982).

La glucoquinasa posee un peso molecular de alrededor de 50.000 (Holroyde et al., 1976b; Maccioni, 1975; Cárdenas et al., 1978; Maccioni y Babul, 1980) en contraposición con las tres hexoquinasas cuyo peso molecular es alrededor de 100.000 (Ureta, 1982).

Las hexoquinasas se encuentran en número y proporciones diversas en todos los tejidos de la rata, pero la glucoquinasa parece ser una típica enzima del hepatocito (Sapag-Hagar et al., 1969; Reyes y Cárdenas, 1980; Reyes et al., 1980, 1981; Reyes, 1982).

La glucoquinasa representa aproximadamente el 85% de la capacidad del hígado para fosforilar glucosa (González et al., 1964) y tiene una respuesta adaptativa frente al contenido de hidratos de carbono de la dieta y al nivel de las secreciones del sistema endocrino, especialmente insulina y glucagón (rev. de Niemeyer y Ureta, 1972; Niemeyer et al., 1975; Weinhouse, 1976).

En este laboratorio se ha encontrado que las variaciones en los niveles de la glucoquinasa hepática, por efecto de la dieta y de alteraciones hormonales, corresponden a cambios en la cantidad de enzima, según lo demuestra la inmunotitulación con el antisuero específico en animales sometidos a diversas condiciones experimentales (Clark-Turri et al., 1974).

2. Purificación de la glucoquinasa

El problema de la purificación de la glucoquinasa ha preocupado a varios grupos de investigadores desde su descubrimiento. Su purificación presenta dificultades, las que derivan principalmente de su pequeña cantidad y su inestabilidad. Se añade la dificultad de separarla de otras enzimas fosforilantes de glucosa, tales como la hexoquinasa C y la N-acetilglucosamina-quinasa, que interfieren en el ensayo espectrofotométrico. Entre los objetivos para obtener glucoquinasa en estado puro, o al menos muy purificada, podrían mencionarse el estudio de las propiedades cinéticas y la caracterización estructural y fisicoquímica. Otro objetivo ha sido estudiar los mecanismos responsables de la variación de la cantidad de enzima utilizando la inmunoprecipitación específica, para lo cual se requiere un anticuerpo monoespecífico producido contra una enzima homogénea.

Resumimos a continuación los intentos de purificación de glucoquinasa, en orden cronológico, en diversos laboratorios.

- 1) Viñuela et al. (1963) lograron separar por medio de sulfato de amonio las dos ATP: hexosa-fosfotransferasas, como se mencionó anteriormente.
- 2) González et al. (1964) lograron separar mediante cromatografía en DEAE-celulosa las cuatro isoenzimas capaces de fosforilar glucosa en el hígado.
- 3) Salas et al. (1965) presentaron un protocolo de purificación de

la glucoquinasa de hígado de conejo, logrando una preparación con una actividad específica de 2 U/mg de proteína mediante fraccionamiento con etanol, cromatografía en DEAE-Sephadex y precipitaciones con sulfato de amonio.

4) Babul y Niemeyer (1966) describieron una purificación parcial de glucoquinasa de hígado de rata mediante cromatografías consecutivas en carboximetil-Sephadex, DEAE-celulosa e hidroxilapatita y lograron obtener una preparación con una actividad específica de 5,7 U/mg de proteína.

5) Parry y Walker (1966) describieron el mismo año un método de purificación de la glucoquinasa de hígado de rata con el que se llegaba a una actividad específica de 8,7 U/mg de proteína, trabajando con columnas de intercambio iónico y precipitaciones con sulfato de amonio.

6) Pilkis (1972) logró mejorar los métodos existentes para la enzima de hígado de rata mediante la inclusión de la cromatografía en Sephadex G-100 y una separación con electroforesis en geles de almidón. Esta preparación daba una actividad específica de 29,4 U/mg de proteína y presentaba varias bandas de proteínas en un gel de poliacrilamida.

7) Grossman et al. (1974) lograron una preparación de glucoquinasa con una actividad específica de 80 U/mg de proteína, usando las mismas metodías anteriores, pero introduciendo gradientes extendidos de fosfato de potasio, que aumentan la resolución en la elución desde columnas de intercambio iónico.

8) Chesher et al. (1973) introdujeron la posibilidad del uso de la cromatografía de afinidad con glucosamina ligada a una matriz sólida, en una comunicación preliminar sin datos de purificación ni detalles del método.

9) Maccioni (1975) y Maccioni y Babul (1976, 1980) lograron una preparación homogénea de glucoquinasa de hígado de perro con una actividad específica de 88 U/mg de proteína, utilizando cromatografía de intercambio iónico (DEAE-celulosa), filtración en Sephadex G-100 y cromatografía de afinidad en glucosamina ligada a sefarosa.

10) Holroyde et al. (1976a,b) describieron un método para purificar glucoquinasa de hígado de rata con alto rendimiento, en que el paso clave consistía en una cromatografía de afinidad en Sepharose-N-(6-aminohexanoil)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (sefarosa-glucosamina), obteniendo una enzima homogénea, con actividad específica de 150 U/mg de proteína.

3. Antisuero contra glucoquinasa

El problema de las relaciones entre la glucoquinasa y las hexoquinasas en hígado, así como también el cambio en la molécula de glucoquinasa en el curso de la evolución y la relación entre las enzimas de diferentes especies, ha preocupado a investigadores de distintos laboratorios (Pilkis et al., 1968; Clark-Turri et al., 1974; Niemeyer et al., 1975; Ureta, 1982). Estos tópicos fueron abordados y discutidos desde un punto de vista inmunológico por Pilkis et al. (1968), utilizando como

herramienta un antisuero contra glucoquinasa de hígado de rata producido en conejo. También Clark-Turri et al. (1974) prepararon un antisuero inyectando en cabra una glucoquinasa de rata semipurificada. En ambos trabajos y en estudios no publicados de Clark-Turri, Espinosa y Niemeyer, se mostró que el antisuero, por una parte, no reaccionaba con las hexoquinasas y, por otra, inhibía y precipitaba a la glucoquinasa de mamíferos y a la de tortuga, pero no a la glucoquinasa de rana.

Posteriormente, Spence y Pitot (1979) indujeron un antisuero contra glucoquinasa de hígado de rata en cuy, con el cual realizaron inmunotitulación de la enzima en estudios de regulación hormonal en cultivos primarios de hepatocitos de rata. Al año siguiente, Sibrowski y Seitz (1980) utilizaron un antisuero de conejo para estudiar el recambio de la glucoquinasa en ratas normales y suprarrenalectomizadas.

En nuestro trabajo se ha logrado la obtención de glucoquinasa de hígado de rata con alto grado de pureza y muy estable, con actividad específica 80 U/mg de proteína, en cantidades suficientes para inducir un antisuero específico. Este antisuero ha sido caracterizado y ciertas técnicas han sido calibradas como para hacer la microinmunotitulación de la glucoquinasa en extractos de hígado y de hepatocitos aislados.

B. MATERIALES Y METODOS

1. Reactivos

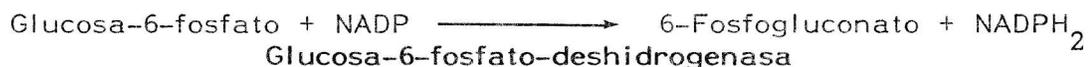
De Sigma Chemical Co Mo. U.S.A. se obtuvieron los siguientes reactivos: ATP, ADP, acrilamida, azul brillante de Coomassie G, clorhidrato de glucosamina, CH-Sepharose 4B, DTT, DEAE-Sephadex A-50, EDC, FMS, fosfatasa alcalina tipo VII de intestino de ternera, glucosa, glicerol, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa tipo VII de levadura, glucosa-6-fosfato, lactato-deshidrogenasa tipo II de músculo de conejo, 2-mercaptoetanol, NADH_2 , NADP, N-acetil-glucosamina, NBT, N,N'-metilen-bis-acrilamida, p-nitrofenilfosfato, PEP, proteína A soluble de Staphylococcus aureus, piruvato-quinasa tipo II de músculo de conejo, proteasa de Streptomyces griseus tipo XVI (pronasa), riboflavina, Sepharose 4B, Sephadex G-100 y G-150, Tris. De Eastman Chemicals se obtuvo TNBS. De Whatman, Maidstone, Inglaterra, se obtuvo DEAE-celulosa microgranular (DE-52). De Merck, Darmstad, Alemania Federal, se adquirieron ácido barbitúrico, EDTA, HClO_4 , H_3PO_4 , KCl, KH_2PO_4 , MgCl_2 , MgSO_4 , NaCl, urea. De Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia, se compró agarosa A y C.

2. Animales de experimentación

Se emplearon ratas albinas machos de la colonia del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile. Los animales, de 200 a 250 g de peso, se mantenían con dieta comercial en pella (Al-Lab Ltda.) y agua ad libitum. Se les daba a beber solución de glucosa al 10% desde 2 días antes de su muerte.

3. Determinación de actividades enzimáticas

a) La actividad fosforilante de glucosa se determinaba espectrofotométricamente a 340 nm mediante el acoplamiento de la reacción de fosforilación de glucosa con la deshidrogenación del glucosa-6-fosfato formado, en presencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y NADP. El esquema de reacciones es el siguiente:

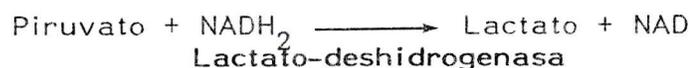
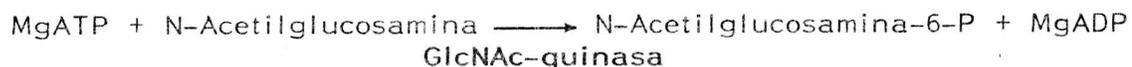


La velocidad de formación del NADPH_2 se registraba a 30° en un espectrofotómetro Gilford modelo 2400, utilizando un coeficiente de extinción molar de 6.220 l/mol.cm a 340 nm. El medio de reacción contenía, en un volumen de 0,5 ml (concentraciones finales): Tris-HCl 80 mM (pH 8,0); KCl 100 mM; MgCl_2 12,6 mM; ATP 5 mM; EDTA 1,6 mM; 0,4 U/ml de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Se utilizaba glucosa 100 mM para medir la actividad fosforilante total (glucoquinasa + hexoquinasa) y

glucosa 0,5 mM para las hexoquinasas. La glucoquinasa corresponde aproximadamente a la diferencia entre ambas determinaciones. La reacción se iniciaba agregando la preparación enzimática. Un sistema sin ATP se usaba como blanco para medir la actividad glucosa-deshidrogenásica de la enzima auxiliar. Una unidad (U) de glucoquinasa se definió como la actividad de enzima que cataliza la fosforilación de 1 μ mol de sustrato en 1 min a 30° en las condiciones de ensayo.

b) La actividad de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa se determinaba midiendo a pH 8,0 el NADPH₂ formado en un medio que contenía: Tris-HCl, EDTA, MgCl₂, KCl y NADP en las mismas concentraciones que en el ensayo para glucoquinasa, además de glucosa-6-fosfato 1 mM.

c) La actividad fosforilante de N-acetilglucosamina se determinaba espectrofotométricamente a 340 nm, midiendo la velocidad de formación de ADP a 30°, al acoplar la reacción con la oxidación de NADH₂ en presencia de fosfoenolpiruvato, piruvato-quinasa y lactato-deshidrogenasa. El esquema de reacciones es el siguiente:



El medio de reacción contenía (concentraciones finales):

Tris-HCl 80 mM (pH 7,5); $MgCl_2$ 12 mM; EDTA 1 mM; ATP 5 mM; fosfoenolpiruvato 1 mM; $NADH_2$ 0,15 mM; KCl 100 mM; DTT 2 mM; 2 U/ml de piruvato-quinasa; 2 U/ml de lactato-deshidrogenasa; N-acetilglucosamina 0,7 mM y alícuotas de la muestra enzimática. Un sistema similar sin el sustrato se usaba como blanco.

4. Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinaba por los siguientes métodos:

a) En los extractos crudos y en las fracciones obtenidas de las cromatografías en DEAE-celulosa y sefadex, los niveles aproximados de proteínas se detectaban por absorbancia a 280 nm.

b) La concentración de proteínas del conjunto de las fracciones seleccionadas después de cada cromatografía se determinaba mediante el método de Warburg y Christian (1941), deduciendo la concentración de proteínas de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm.

c) En las fracciones obtenidas de las cromatografías en sefarosa-glucosamina los niveles de proteínas se determinaron con el micrométodo de Bradford (1976), que utiliza el Coomassie G-250. 100 mg del colorante se disolvían en 50 ml de etanol al 95%; a esta solución se agregaban 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v) y luego se llevaba con agua a un volumen final de 1 l. A 0,1 ml de la solución de proteína se agregaba 1 ml del reactivo y se leía la absorbancia a 595 nm antes de los 20 min.

d) Detección de proteínas en geles de poliacrilamida. Los

geles se sumergen en una solución que contiene: Coomassie G-250 al 0,04% y ácido perclórico 3,5% (p/v). Las bandas de proteína se tiñen de azul después de tiempos variables, según la cantidad de proteína existentes (Reisner et al., 1975).

e) Detección de proteínas en placas de agarosa. Las placas se sumergen en una solución que contiene: negro de amida 0,1%, ácido acético 0,42 M, acetato de sodio 0,42 M, glicerol 15%.

5. Otras determinaciones

La glucosa se determinaba con 3,5-dinitrosalicilato (Guía de Prácticas de Laboratorio, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). A 0,5 ml de muestra se agregaba 1 ml de solución de 3,5-dinitrosalicilato al 1% y tartrato doble de sodio y potasio al 30% en NaOH 0,4 M; se calentaba a 100° por 5 min, se completaba a 5 ml con agua destilada y se determinaba la absorbancia a 540 nm.

La concentración de KCl y ortofosfato se determinaba midiendo la conductividad de las soluciones en un conductímetro Radiometer modelo CDM 2f.

6. Preparación y regeneración de los materiales cromatográficos

En el procedimiento de purificación se utilizaron columnas con diferentes tipos de soportes cromatográficos como DEAE-celulosa, Sephadex G-100 y G-150, DEAE-Sephadex A-50 y sefarosa-glucosamina (glucosamina unida a una matriz de CH-Sepharose 4B). Estos geles se prepararon y regeneraron según los métodos descritos por los fabricantes.

Mientras no eran utilizados, se guardaban a 4° en una solución de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0) y KCl 50 mM, a la que se agregaba azida de sodio 0,02% para evitar la contaminación microbiana.

7. Preparación de la sefarosa-glucosamina (Sepharose-N-(6-amino-hexanoil)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa)

Se lavaban 60 g de CH-Sepharose 4B (que ya posee el ácido 6-aminohexanoico unido) con NaCl 0,5 M (200 ml/g de sefarosa) y posteriormente con agua destilada. Se determinaba la concentración de grupos carboxílicos para conocer la capacidad del derivado para fijar glucosamina. Para esto se hacía una titulación potenciométrica de la sefarosa sustituida con KOH 50 mM, encontrándose alrededor de 10 μ mol/ml de gel. Posteriormente se lavaba con agua destilada y se procedía a la unión del ligando.

La matriz desaireada se colocaba en un vaso y se agregaba una solución de glucosamina 1 M a pH 4,5. Posteriormente se agregaba carbodiimida (EDC) sólida cuya concentración final era de 0,1 M, manteniendo durante este procedimiento el pH 4,5 con KOH 0,3 N. Luego de permanecer constante el pH por 1 h, la reacción se dejaba transcurrir por 48 h a temperatura ambiente, agitándose esporádicamente. El gel se lavaba con una solución de acetato de sodio 0,1 M (pH 3,5) en NaCl 1 M y luego con NaCl 0,5 M.

Para verificar la presencia de grupos aminos libres debido a la probable reacción de los hidroxilos del azúcar, en lugar del

amino, con el grupo carboxilo de la CH-Sepharose 4B se aplicaba la prueba del TNBS. A 0,5 ml de gel se agregaba 1,8 ml de tetraborato de sodio saturado y 3 gotas de TNBS al 1,5%. Luego de agitar se esperaba 30 min, se centrifugaba y se lavaba con agua destilada. Los grupos aminos primarios dan una coloración con el TNBS que varía de amarillo a naranja, dependiendo de su concentración. Si se comprobaba la existencia de tales grupos se procedía a acetilar la sefarosa-glucosamina con anhídrido acético (2 ml de anhídrido acético por ml de gel aproximadamente), manteniendo el pH sobre 6,0 con NaOH al 20% y la temperatura a 4°, agregando hielo. Posteriormente se lavaba con ácido clorhídrico 0,2 M durante 60 min, NaCl 0,5 M y bastante agua destilada. A través de la prueba del TNBS se controlaba que la acetilación de los grupos aminos fuera completa. Esta matriz se diluyó con Sepharose 4B en la proporción de 2:1, quedando la concentración final probable de ligando en 6 $\mu\text{mol/ml}$ de gel.

Para la regeneración de la sefarosa-glucosamina después de su uso, la matriz se mantenía en urea 6 M - KCl 2 M durante 30 a 60 min (500 ml por cada 100 ml de gel), operación que se repetía. Luego se lavaba con bastante agua destilada, dejándola posteriormente en amortiguador fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0) - KCl 50 mM.

8. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaba de acuerdo al método de Grossman y Potter (1974). La ubicación de

la actividad glucoquinásica en los geles de poliacrilamida se lograba sumergiendo el gel en una mezcla (6 ml) semejante a la usada en el ensayo de actividad, a la cual se adicionaba fenazina-metosulfato (FMS) y azul de nitrotetrazolio (NBT) (Katzen et al., 1965). La mezcla contenía los siguientes componentes: Tris-HCl 74 mM (pH 8,0); $MgCl_2$ 10 mM; KCl 40 mM; EDTA 1 mM; NADP 0,5 mM; glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa 0,2 U/ml; glucosa 100 mM; ATP 5 mM; FMS 0,004 mg/ml; NBT 0,04 mg/ml. El blanco se hacía sumergiendo el gel en una mezcla de reacción sin ATP.

9. Producción del suero inmune antiglucoquinasa

Se inmunizó un conejo hembra albino mantenido en un vivero con alimento y agua ad libitum. Otro conejo mantenido en las mismas condiciones proporcionó el suero control. Se inyectó una enzima proveniente de geles de poliacrilamida (los cuales habían sido cargados con muestras obtenidas de cromatografía en DEAE-Sephadex) que presentaban dos bandas de proteínas. Los geles fueron cargados con 2 U cada uno, cantidad que no provocaba distorsión en el gel y que con el colorante de proteínas (Coomassie G-250) se teñía en pocos segundos. Una vez identificada la banda en el gel, se cortaba, se lavaba el trozo unos segundos en amortiguador fosfato (pH 7,2) 20 mM - NaCl 0,15 M, se sacaba con pinzas y se guardaba en un vaso a 4°. Estas rodajas, correspondientes aproximadamente a 150 U de glucoquinasa, se homogeneizaron en un mortero con la misma solución y se inyectaron al conejo, siguiendo el siguiente

protocolo de inmunización.

Día 1: Un extracto de gel (correspondiente a 75 U de enzima), emulsionado con igual volumen de coadyuvante completo de Freund, se repartió en 10 dosis de 1 ml que se inyectaron en el tejido subcutáneo de la pared del abdomen y en los músculos del dorso y de los muslos.

Día 60: Un extracto de gel (correspondiente a 38 U de enzima), emulsionado con igual volumen de coadyuvante incompleto de Freund (total 5 ml) se repartió en 5 porciones iguales que se inyectaron en el tejido subcutáneo de la pared del abdomen y en los músculos de los muslos.

Día 70: Se repite la operación del día 60.

Día 140: Como el ensayo inmunológico reveló un antisuero con bajo título, se hizo una nueva inyección con enzima parcialmente pura. Se inyectó por vía intramuscular una preparación con 36 U de glucoquinasa proveniente de una recromatografía en sefarosa-glucosamina y que presentaba 3 bandas en un gel de poliacrilamida.

Obtención del suero: A los 10 días de la última inyección se extrajeron 6 ml de sangre de la oreja del conejo, donde se comprobó la presencia de anticuerpos. Dos días más tarde se sangró completamente el animal. La sangre recién extraída se colectó en frascos estériles, se incubó 30 min a 37° y se dejó luego toda la noche a 4°, para que se retrajera el coágulo. El suero (60 ml) se separó del coágulo y se centrifugó a 1.500 rpm

en una centrífuga clínica International modelo CL para eliminar los glóbulos rojos. Al suero se le agregó azida de sodio al 0,1% y se conservó a 4°.

Una alícuota de 5 ml del suero se utilizó semipurificado, para lo cual se le incubó a 56° por 30 min para inactivar el complemento y luego se le agregó un volumen igual de sulfato de amonio saturado. Después de centrifugar por 20 min a 15.000 rpm en el cabezal 40 de la Spinco modelo L, el precipitado se disolvió en amortiguador fosfato (pH 7,2) 20 mM - NaCl 0,15 M hasta alcanzar su volumen inicial y luego se dializó durante 24 h en la misma solución con azida al 0,02%. Una fracción de un suero control obtenido del conejo no inmunizado se trató de igual manera. Estos sueros reconstituidos fueron usados para los estudios de inhibición de la enzima. Las otras pruebas se realizaron con sueros completos.

10. Métodos de caracterización del antisuero

a) **Inmunodifusión.** Se siguió el procedimiento descrito en Hudson y Hay (1979). Se disolvía agarosa al 1% en una solución que contenía amortiguador de fosfato 5 mM (pH 7,0), EDTA 0,5 mM y azida sódica 0,02%. Se preparaban placas para inmunodifusión agregando 3,5 ml de la agarosa fundida sobre un portaobjeto. Una vez solidificada se perforaban en el gel pocitos de unos 15 ul de capacidad, en una disposición hexagonal, en los cuales se colocaban las muestras por analizar. Se dejaban difundir antígeno y antisuero por 48 h a 4°, colocando la placa en una cámara

húmeda. Las placas se lavaban durante 3 h en una solución con amortiguador de fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0), NaCl 0,4 M y EDTA 1 mM. Se dejaban toda la noche en solución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM que contenía NaCl 0,2 M y EDTA 1 mM y finalmente se lavaban varias veces con agua destilada. Todo el procedimiento se realizaba a 4°. Para la tinción de actividad enzimática, las placas lavadas se incubaban durante 30 min en un medio semejante al usado con los geles de poliacrilamida. Para la tinción de proteínas se usó negro de amida.

b) Inmunoelectroforesis (método de los cohetes, "rockets"). Se siguió el método como se describe en Hudson y Hay (1979). Se preparaban placas de agarosa C en la cual se había incorporado el antisuero. 2 ml de un gel de agarosa C disuelta al 1% en amortiguador barbital pH 8,6 (barbiturato de sodio 75 mM, ácido barbitúrico 15 mM) se fundían en un baño de agua hirviendo, se dejaban enfriar a 56° y se mezclaban con 0,2 ml de suero y 0,8 ml de amortiguador de fosfato 10 mM - NaCl 0,15 M que se mantenían a la misma temperatura. La mezcla se vaciaba sobre un portaobjeto colocado en una mesa nivelada. Una vez solidificado, se hacían en el gel 4 pocillos que se llenaban con distintas cantidades de glucoquinasa o con enzima de distinto grado de pureza. Esta placa se sometía a electroforesis, haciendo pasar una corriente de 5 mA por cada portaobjeto durante 3,5 h. Las cámaras de los electrodos se llenaban con amortiguador de barbital. Una vez terminada la electroforesis, la placa se sometía

al mismo tratamiento de lavado y tinción al que fueron sometidas las placas de inmunodifusión antes mencionadas.

c) **Microinmunoensayo con el método ELISA.** Se realizó esencialmente según los procedimientos desarrollados por Engvall y colaboradores (Engvall y Perlmann, 1972; Engvall y Rouslahti, 1979). El microinmunoensayo se llevaba a cabo en placas de polivinilo activadas con glucoquinasa (act. esp. 1,55 U/mg de proteína) mediante el siguiente procedimiento: 50 μ l de glucoquinasa por pocillo se dejaban a temperatura ambiente por 4 h, al cabo de las cuales se adicionaban 100 μ l por pocillo de una solución de PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, amortiguador de fosfato 8 mM, pH 7,3) con BSA 1%, para saturar el plástico con un antígeno no relacionado. La placa así tratada se lavaba 3 veces con PBS con Tween-20 al 0,1%. Se hacían diluciones seriadas de antisuero y de suero control en PBS con BSA al 1% y se agregaban 50 μ l de suero a las celdas. La placa se dejaba incubar 2 h a temperatura ambiente y luego se lavaba 3 veces con PBS con Tween-20 y se agregaban 50 μ l del conjugado proteína A - fosfatasa alcalina diluido 1:200 en PBS con BSA 1%. Se dejaba incubar 3 h a 37° y se lavaba 3 veces. La actividad de la fosfatasa alcalina se medía agregando 50 μ l de una solución de p-nitrofenilfosfato (1 mg/ml) en amortiguador carbonato 0,05 M (pH 9,6) que contenía $MgCl_2$ 1 mM. Se incubaba por 1 h a temperatura ambiente y se detenía la reacción agregando 50 μ l de NaOH 3 M. La reacción es la siguiente:



El p-nitrofenol producido se midió a 405 nm ($\epsilon_{405} = 18,5$). Para medir la absorbancia a 405 nm, el contenido de las celdas se diluyó a 550 μl con NaOH 150 mM.

Para la preparación del conjugado proteína A - fosfatasa alcalina se empleó básicamente el procedimiento de Crowther y Abu Elzein (1980). Se dializaron 5 mg de fosfatasa alcalina (900 U/mg de proteína, Sigma) contra amortiguador de fosfato de potasio 0,1 M (pH 6,8), con el objeto de remover el sulfato de amonio. Luego se agregaron 2,5 mg de proteína A y se llevó a 2 ml con el amortiguador fosfato. Se agregaron en seguida, gota a gota, 0,15 ml de glutaraldehído al 1% y se agitó suavemente; se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. El conjugado formado (proteína A - fosfatasa alcalina) se dializó contra 5 l de PBS durante la noche a 4°. Se centrifugó el dializado a 20.000 rpm durante 30 min a 4° para remover los agregados formados. El sobrenadante se guardó a 4°, condición en que conserva su actividad inicial al menos por 3 meses.

C. RESULTADOS

1. Etapas habituales en la purificación de la glucoquinasa

Todas las manipulaciones fueron realizadas a 4° y el pH se midió a esa temperatura. El procedimiento tipo está descrito para un conjunto de hígados de 60 ratas, a pesar de que el método da el mismo resultado al ser aplicado a cantidades menores de tejido, ajustando las proporciones.

1. Preparación de los extractos crudos

Los hígados de 60 ratas fueron homogeneizados al 50% (p/v) en una solución A que contenía (concentraciones finales): fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0), KCl 120 mM, glucosa 100 mM, EDTA 1 mM, 2-ME 10 mM. Posteriormente se incluyó glicerol al 5% (v/v) en todas las soluciones amortiguadoras para estabilizar la enzima y mejorar así el rendimiento. El homogeneizado se centrifugaba a 105.000 g durante 60 min. El sobrenadante resultante se filtraba a través de lana de vidrio.

2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

El sobrenadante obtenido en el paso previo se aplicaba simultáneamente a 2 columnas de DEAE-celulosa, previamente equilibradas con solución A. Se prefería hacer esta duplicación a trabajar con una columna única de mayor tamaño, especialmente debido al menor tiempo de la cromatografía. Después de la aplicación de la enzima, las columnas se lavaban

con la solución amortiguadora de equilibrio hasta que la lectura a 280 nm del eluato era menor que 0,15. Posteriormente se desarrollaban las columnas con un gradiente lineal de concentración de KCl. Se reunía el conjunto de las fracciones de ambas columnas que contenían una actividad de glucoquinasa de aproximadamente 0,1 U/ml o más, como se ilustra con un experimento típico en la figura 1. En este y en los siguientes gráficos de cromatografías las fracciones de glucoquinasa seleccionadas se señalan entre dos flechas.

El procedimiento tenía un rendimiento aproximado de 45 a 50% al no emplear glicerol; desde que se empezó a usar glicerol al 5% en el líquido de lavado y de elución el rendimiento aumentó en forma sistemática a un 65%. La purificación habitual era de alrededor de 20 veces (actividad específica de 0,20 a 0,30 U/mg de proteína).

3. Precipitación con sulfato de amonio

Al líquido recolectado de la cromatografía en DEAE-celulosa se agregaba sulfato de amonio sólido hasta el 45% de saturación (25,8 g/100 ml a 0°), manteniendo un pH de 7,0 con hidróxido de amonio concentrado. Una vez disuelto el sulfato de amonio se dejaba durante 120 min y se centrifugaba 30 min a 13.000 rpm en una centrífuga Sorvall modelo RC-2B en un cabezal GSA 5775. Al sobrenadante se agregaba nuevamente sulfato de amonio hasta el 80% de saturación (22,6 g/100 ml a 0°) y se centrifugaba 30 min a 13.000 rpm, después de varias horas de equilibrio

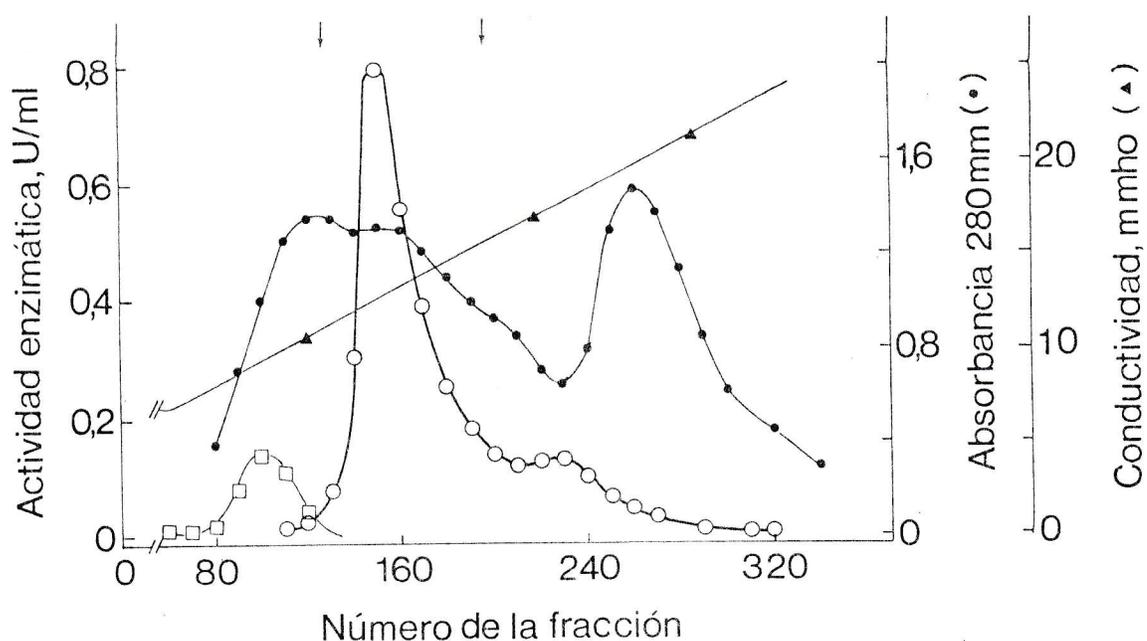


Figura 1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa del extracto crudo. A una columna de 70 cm de altura y 3 cm de diámetro de DEAE-celulosa, equilibrada con solución A, se agregó un extracto crudo, que contenía 470 U de glucoquinasa y 31,108 g de proteína. La columna se lavó con 4 l de la solución amortiguadora de equilibrio y se desarrolló con un gradiente lineal formado por la mezcla de 1,5 l de solución A y 1,5 l de una solución de composición similar pero con KCl 0,5 M. Se colectaron fracciones de 8 ml y se seleccionaron las fracciones indicadas entre las flechas. Se reunió desde el tubo 128 al 198, recuperándose en ellos el 55% de las unidades de glucoquinasa colocada. Se obtuvo una preparación con una actividad específica de 0,30 U/mg de proteína. El máximo alrededor del tubo 220 correspondería a N-acetilglucosamina-quinasa (Cárdenas, 1982). Actividad fosforilante medida con glucosa 0,5 mM (□) o 100 mM (○).

(generalmente toda la noche). Si bien el objetivo principal de esta etapa era concentrar la muestra para la etapa siguiente, se obtenía habitualmente una cierta purificación (1,5 veces) sin gran pérdida de la enzima (70% de rendimiento en la etapa). Además, se eliminaba gran parte de la N-acetilglucosamina-quinasa que era un contaminante persistente en la filtración en sefadex y que interfería en estudios cinéticos y de otra naturaleza realizados con enzima en la etapa de sefadex.

4. Filtración en Sephadex G-150

El sedimento obtenido de la precipitación con sulfato de amonio se dividía en tres fracciones, que se disolvían en solución B, la cual contenía fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0), KCl 300 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM. Solo en las últimas preparaciones se agregó glicerol al 5%.

Se filtraba en una columna de Sephadex G-150 (sefadex) que había sido equilibrada con el mismo amortiguador. La figura 2 muestra un resultado típico. Las fracciones activas (más de 0,1 U/ml) obtenidas en este paso se concentraban en un ultrafiltrador Amicon con membranas PM 10.000.

En las fracciones escogidas se determinaba, además de glucoquinasa, la presencia de N-acetilglucosamina-quinasa y de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, que son contaminantes habituales, aunque ya en pequeña cantidad, que se pretendía eliminar en las etapas siguientes de purificación por su interferencia en el ensayo fino de glucoquinasa.

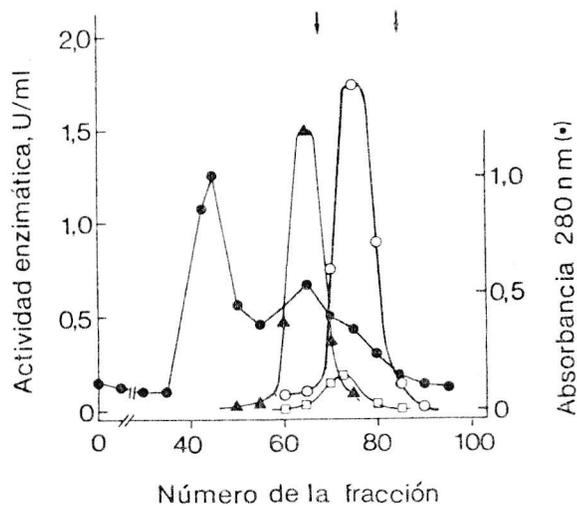


Figura 2. Filtración en Sephadex G-150. En una columna de 115 cm de altura por 2,6 cm de diámetro empacada con Sephadex G-150 equilibrada con solución B, se colocó un tercio del sedimento obtenido entre el 45 y el 80% de saturación de sulfato de amonio, disuelto en 8 ml del amortiguador de equilibrio y sacarosa al 20%. La solución contenía 110 U de glucoquinasa y 234 mg de proteínas. Se eluyeron las fracciones con la misma solución y se colectaron 3,5 ml por tubo con un flujo de 0,3 ml por min. En el conjunto de las fracciones indicadas se recuperó el 86% de la actividad colocada y se obtuvo una preparación con una actividad específica de 2,5 U/mg de proteína. ○, glucoquinasa; □, N-acetilglucosamina-quinasa; ▲, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

El rendimiento de esta etapa era habitualmente de un 85 a 90% y la purificación era de unas 6 veces, consiguiéndose actividades específicas de entre 1,8 y 2,8 U/mg de proteína.

5. Cromatografía de afinidad

La muestra proveniente de sefadex se dividía en fracciones que contenían entre 60 y 70 U de glucoquinasa, las que se cromatografiaban en forma independiente en Sepharose-N-(6-aminohexanoil)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa (sefarosa-glucosamina). La muestra se diluía en solución B sin KCl hasta obtener la concentración deseada de KCl, que era generalmente de 50 a 62 mM, cifras que se obtuvieron después de varios ensayos que se describen más adelante. Luego se aplicaba a una columna equilibrada con solución C. Esta contenía fosfato de potasio 10 mM (pH 7,0), KCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, glicerol 20%. Se lavaba con 10 volúmenes de la solución de equilibrio. Se eluía la enzima incluyendo glucosa 1 M en la solución C, se colectaban las fracciones y se juntaban las más activas (más de 0,05 U/ml). Se mantenía un flujo constante de 30 ml/h en todas las operaciones. En esta etapa el rendimiento habitual era de 80% y la actividad específica alcanzaba a unas 30 U/mg de proteína (10 veces de purificación en la etapa). Después de la elución con glucosa se eluía la columna con solución C a la que se aumentaba la concentración de KCl hasta 300 mM para eluir otras proteínas retenidas en la matriz. Entre estas era habitual encontrar una pequeña fracción de la glucoquinasa

todavía retenida, como se muestra en la cromatografía tipo de la figura 3. Además se eluía en esta forma la N-acetilglucosaminaquinasa que venía como contaminante de la glucoquinasa y de la que no había vestigios en las fracciones eluidas con glucosa 1 M. La enzima mantenía una gran estabilidad al ser incluido el glicerol 20% en las soluciones usadas. Se varió el glicerol entre 5 y 20% sin tener un efecto en el resultado de la cromatografía misma, pero sí en la mantención de la estabilidad de la enzima durante su almacenamiento, como se muestra en la figura 4.

6. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50

La cromatografía en sefarosa-glucosamina daba corrientemente una preparación que exhibía 5 bandas de proteínas en un gel de poliacrilamida. Esto nos hizo ensayar como etapa siguiente de purificación una cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-Sephadex A-50, cromatografía que es usada en las primeras etapas en algunos de los trabajos sobre purificación de glucoquinasa (Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1966; Pilkis, 1972; Holroyde et al., 1976b).

Para esto, una muestra de glucoquinasa proveniente de sefarosa-glucosamina, se concentró en una microcolumna de 200 μ l de DEAE-celulosa microgranular y posteriormente se diluyó hasta alcanzar una concentración de KCl de 100 mM. Se colocó en una columna de DEAE-Sephadex A-50, equilibrada con solución D que contenía: fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM,

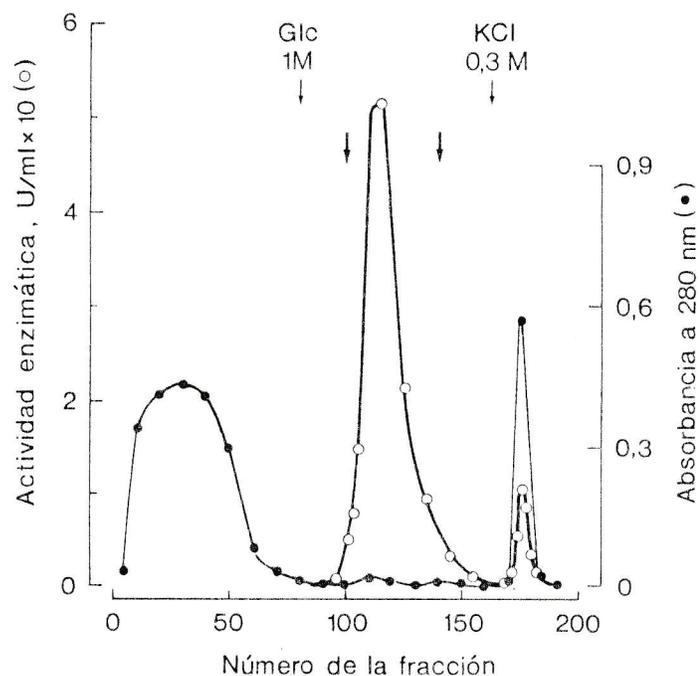


Figura 3. Cromatografía de afinidad en sefarosa-glucosamina. En una columna de 12 cm de altura por 2,4 cm de diámetro de sefarosa-glucosamina, equilibrada con solución C, se colocaron 65 U de glucoquinasa proveniente de Sephadex G-150. Se colectó el frente de la columna y el lavado para examinar las fracciones de proteínas que no eran retenidas en la columna. Posteriormente se eluyó la enzima al incluir glucosa 1 M en la solución C. Se colectaron 6,6 ml por tubo con un flujo de 30 ml/h. En el conjunto de las fracciones indicadas entre las flechas se recuperó el 80% de la actividad colocada y se obtuvo una preparación con una actividad específica de 30 U/mg de proteína. En seguida se realizó una segunda elución incluyendo KCl 300 mM en la solución C, como se indica.

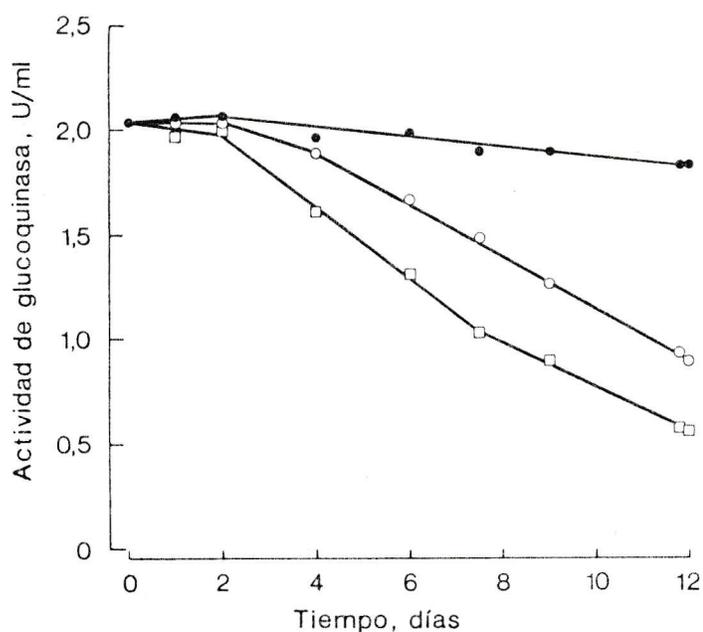


Figura 4. Efecto protector del glicerol en la actividad de la glucoquinasa. Se empleó una muestra de enzima purificada proveniente de la etapa de sefarosa-glucosamina (act. esp. 30 U/mg de proteína), la que se mantuvo a 4° en solución B, pero con glicerol 5% (□), 10% (○) y 20% (●). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para la determinación de la actividad.

MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, glucosa 50 mM y glicerol 20%. Se eluyeron las proteínas al aplicar un gradiente lineal entre 100 y 500 mM de fosfato de potasio con un volumen total de 1 l. Las fracciones que contenían la enzima se reunieron y la actividad recuperada correspondió al 80% de la colocada en la columna (Fig. 5). Esta muestra tenía una actividad específica de 79 U/mg de proteína y el análisis electroforético mostraba 2 bandas de proteínas. Con el objeto de conocer mejor este tipo de preparación se realizaron geles de poliacrilamida a distintas concentraciones, 14, 12, 10 y 7% (Fig. 6). Se observó que la distancia entre la glucoquinasa y el contaminante permanecía constante a través de los cambios de concentración del gel. Esto indicaba que sería inútil un paso de purificación ulterior por filtración en geles, pues el contaminante debía tener un peso molecular semejante a la glucoquinasa.

Hubo diferencias cuantitativas respecto de la intensidad relativa de las bandas al comparar el resultado de distintas columnas de DEAE-Sephadex A-50, como se muestra en la figura 7. El rendimiento también varió y alcanzó hasta un 95% en algunas ocasiones. La glucoquinasa siempre resultó en mayor proporción que el contaminante, por lo que esta cromatografía se incorporó como rutina en la purificación.

La Tabla I resume los resultados de un protocolo de purificación que, con pequeñas variaciones, se repitió fielmente.

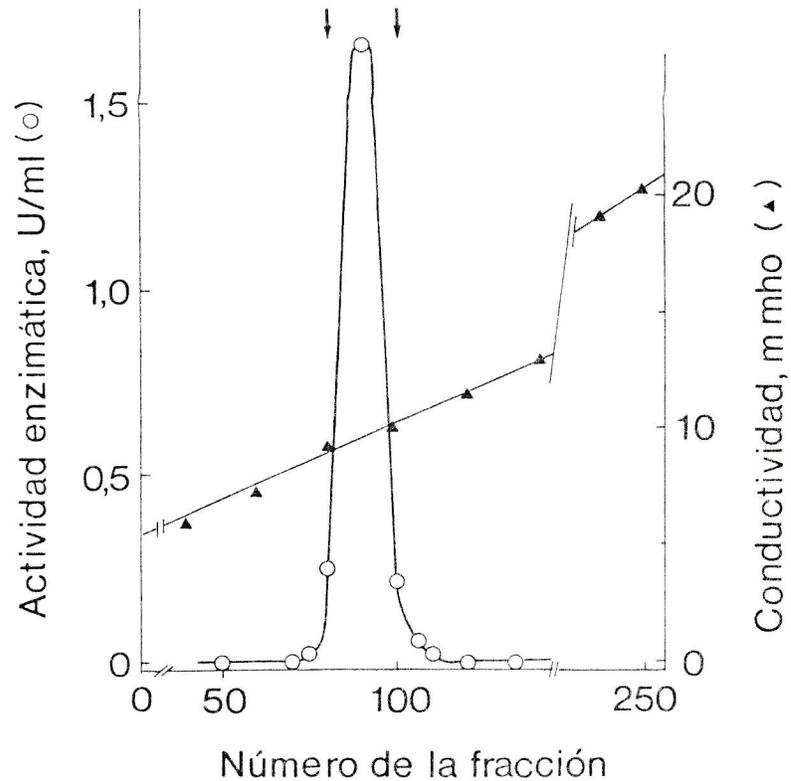


Figura 5. Cromatografía en DEAE-Sephadex A-50. A una columna de 24 cm de altura y 1,6 cm de diámetro de DEAE-Sephadex A-50, equilibrada con solución D, se agregaron 100 U de glucoquinasa de la etapa de sefarosa-glicosamina. Luego del lavado, se desarrolló un gradiente lineal de concentraciones de fosfato de potasio formado por 500 ml de solución D y 500 ml de una solución de composición similar pero con fosfato de potasio 500 mM. Se colectaron fracciones de 4,2 ml y en las fracciones indicadas entre las flechas se recuperó el 80% de la actividad glucoquinásica colocada. Se obtuvo una preparación con una actividad específica de 80 U/mg de proteína.

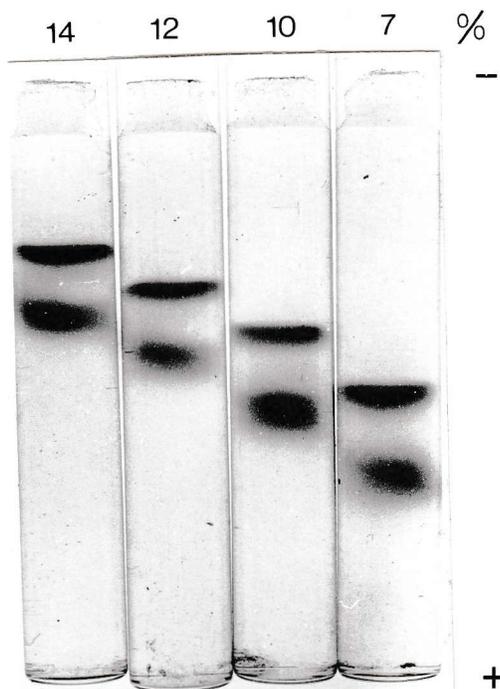


Figura 6. Glucoquinasa purificada sometida a electroforesis en geles con distintas concentraciones de poliacrilamida. Se utilizó una muestra de glucoquinasa proveniente de DEAE-Sephadex A-50. La electroforesis se desarrolló como se describe en Métodos, salvo que se emplearon las concentraciones de poliacrilamida indicadas. Los geles fueron teñidos con Coomassie G-250 para visualizar proteínas. En los geles la banda inferior corresponde a la glucoquinasa.

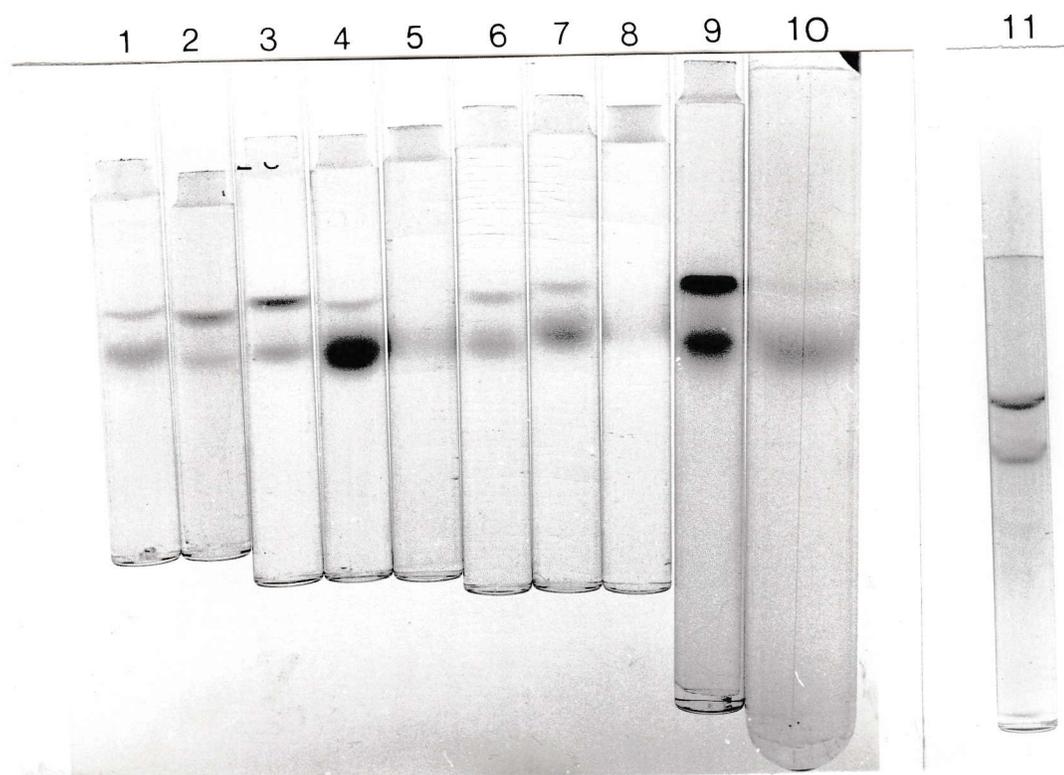


Figura 7. Electroforesis en geles de poliacrilamida de glucoquinasa purificada. Las muestras, provenientes de distintas cromatografías en DEAE-Sephadex A-50, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, como se describe en Métodos. En los geles 5 y 8 se tiñó la actividad enzimática y en los restantes las proteínas. El gel 5 se corrió simultáneamente con el 4, y el 8 con el 7. Los geles 1, 2, 3, 6, 9 y 10 también tuvieron un gel control en los cuales se tiñó la actividad de GK. El tubo 11 es un gel con dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol según Laemmli (1970). Con frecuencia este procedimiento permite observar indicios de otras proteínas de mayor migración.

Tabla I

Purificación de glucoquinasa de hígado de rata

Etapa	Volumen ml	Proteína mg/ml	Actividad ^a U/ml	Actividad específica U/mg prot.	Rendimiento %	Purificación veces
1 S ₁ ^b	621	100	1,60	0,016	100	1
2 DEAE-celulosa	1.420	1,1	0,32	0,29	46	18
3 Sulfato de amonio (0,45 - 0,80)	25	28,1	12,64	0,45	32	28
4 Sephadex G-150	240	0,433	1,17	2,8	28	175
5 Sefarosa- glucosamina	600	0,012	0,36	30	22	1.875
6 Concentración en DE-52	20	0,324	8,55	30	17	1.875
7 DEAE-Sephadex A-50	80	0,022	1,71	78	14	4.875

^aUnidad de enzima corresponde a 1 μ mol de glucosa fosforilada en 1 min a 30°, en el medio habitual de ensayo

^bLíquido sobrenadante de la centrifugación del homogeneizado a 105.000 g

7. Control de pureza de las preparaciones

El control de pureza de las diferentes preparaciones de glucoquinasa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, por el método de Grossman y Potter (1974) descrito en Métodos. La tinción de proteínas se efectuaba con azul brillante de Coomassie G y la tinción de actividad con glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (reducción del azul de nitrotetrazolio), según Katzen et al. (1965). El análisis electroforético de la preparación de glucoquinasa en las etapas consecutivas de DEAE-celulosa, Sephadex G-150, sefarosa-glucosamina y DEAE-Sephadex A-50 se muestra en la figura 8.

II. Etapas de purificación alternativas

Con el objeto de obtener un mejor resultado se intentaron algunas modificaciones a los procedimientos en uso hasta llegar al método descrito.

1. Sustitución del Sephadex G-100 por Sephadex G-150.

La sustitución del Sephadex G-100 por Sephadex G-150 dio buenos resultados, ya que la actividad glucoquinásica se encontraba en un menor volumen y había un aumento de la actividad específica en el conjunto de fracciones seleccionadas, por lo que se estableció como rutina la filtración en Sephadex G-150.

2. Variaciones en la cromatografía de afinidad

a) Fuerza iónica. Con el objeto de conocer el comportamiento

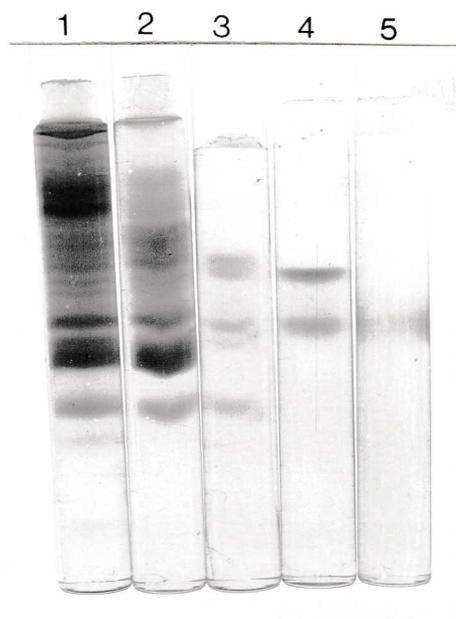


Figura 8. Electroforesis con glucoquinasa en sucesivas etapas de purificación. Geles de poliacrilamida al 10%. De 1 a 4, tinción de proteínas con Coomassie G-250. 5, tinción de actividad según Katzen et al. (1965). Los geles corresponden a las etapas: 1, DEAE-celulosa (200 μg); 2, Sephadex G-150 (150 μg); 3, sefarosa-glucoamina (50 μg), 4 y 5, DEAE-Sephadex A-50 (40 μg). Los μg corresponden a proteínas totales. Las actividades específicas de las preparaciones son las de la Tabla I.

de la cromatografía de afinidad frente a soluciones de diferente fuerza iónica, una columna de sefarosa-glucosamina equilibrada con amortiguador C, se cargó con una muestra proveniente de cromatografía en Sephadex G-150, y fue sometida a lavados sucesivos en los cuales la concentración de KCl se elevó en forma paulatina. En el primer lavado se incluyó KCl 50 mM, que se elevó en lavados sucesivos de al menos 3 volúmenes de columna a 52, 54, 56, 58, 60, 64 y 70 mM. Se eligió una concentración de KCl de 62 mM para nuevos ensayos, pues el lavado con esa concentración eliminaba gran cantidad de proteínas contaminantes; a la vez era una concentración suficientemente alejada de la necesaria para eluir la enzima en forma no bioespecífica, cuyo límite inferior estaría cercano a 70 mM. La figura 9 ilustra una de estas cromatografías, en que la elución se realizó con glucosa 1 M - KCl 62 mM.

b) Agentes eluyentes. Con el objeto de obtener una enzima con mayor grado de pureza se sometieron a prueba distintas ideas que parecían tener posibilidades de éxito, en la elución de la glucoquinasa desde la columna de sefarosa-glucosamina. Algunas de ellas se describen a continuación:

i. Elución con N-acetilglucosamina. Cuando una enzima está unida en forma bioespecífica a la matriz, puede ser eluida con un sustrato análogo, un inhibidor o un cofactor. Por esto se eligió como alternativa de elución la N-acetilglucosamina, que es un inhibidor competitivo con respecto a la glucosa en la reacción

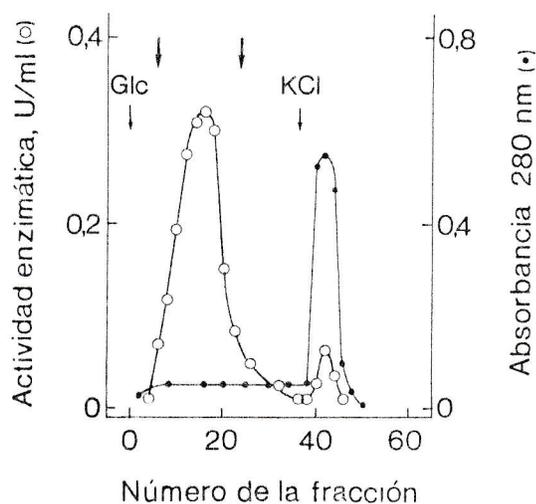


Figura 9. Cromatografía en columna de sefarosa-glucosamina; elución con glucosa 1 M - KCl 62 mM. A una columna de 8 cm de altura por 2,5 cm de diámetro de sefarosa-glucosamina, equilibrada con solución C con KCl 62 mM, se colocaron 30 U de glucoquinasa, proveniente de la columna de sefadex, diluida con amortiguador C hasta tener una concentración de KCl de 62 mM. La columna se lavó con 300 ml del amortiguador de equilibrio y se eluyó incluyendo en el amortiguador glucosa 1 M. Posteriormente se realizó una segunda elución sin glucosa, pero elevando la concentración del KCl del amortiguador de equilibrio hasta 300 mM. Se colectaron fracciones de 6 ml y se seleccionaron las fracciones indicadas en la figura (tubos 6 al 24 inclusivos). La recuperación fue del 82% y se alcanzó una actividad específica de 25 U/mg de proteína.

de glucoquinasa y presenta una alta afinidad por la enzima, pues su K_i es del orden de 10^{-4} M (0,11 - 0,15 mM) (Cárdenas, 1982).

En un ensayo (Fig. 10) se usaron dos columnas pequeñas de sefarosa-glucosamina que se trataron en forma paralela, una de las cuales actuó como control y fue eluida con glucosa (A) y la otra con N-acetilglucosamina (B). Después de ser equilibradas con solución C con KCl 62 mM, se colocaron 6 U de glucoquinasa provenientes de Sephadex G-150 en cada una. Luego de lavado exhaustivo se procedió a la elución. Se hizo como de costumbre una segunda elución con KCl 300 mM en solución C (Fig. 10).

En la columna control se obtuvo una preparación con una actividad específica de 30 U/mg de proteína y un 86% de rendimiento. En la columna eluida con N-acetilglucosamina se obtuvo, en cambio, una enzima con una actividad específica de solo 15 U/mg de proteína y un rendimiento de 50%; además, la fracción de enzima eluida con KCl 300 mM era mayor que en la columna tratada con glucosa y correspondía a un 18% de la actividad colocada en la columna. La electroforesis en gel de poliacrilamida mostró la presencia de numerosas, al menos nueve, bandas de proteínas contaminantes, contrastando con las habituales cinco de la elución con glucosa (Fig. 11).

En resumen, el procedimiento ensayado no ofreció ninguna ventaja sobre la elución con glucosa, pero sí reforzó la idea del carácter bioespecífico de la unión macromolécula-ligando, ya que

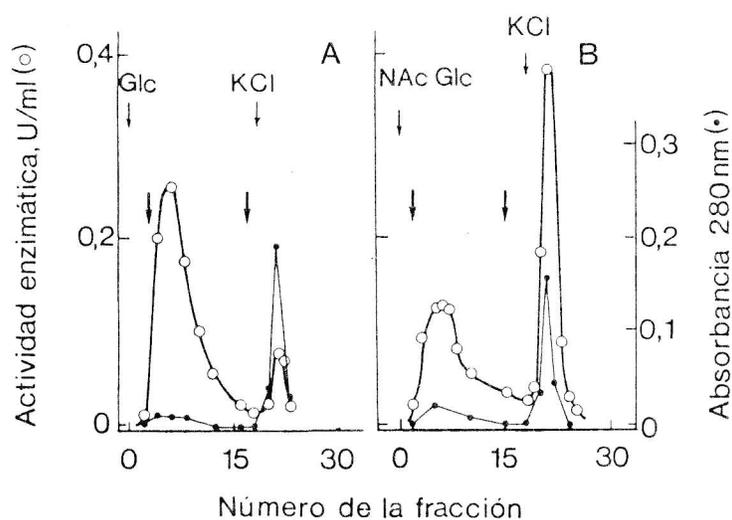


Figura 10. Elución con N-acetilglucosamina de la cromatografía en sefarosa-glucosamina. La figura muestra los perfiles de elución de dos columnas de 5 cm de altura por 1,2 cm de diámetro, equilibradas con amortiguador C con KCl 62 mM, en las que se colocaron 6 U de glucoquinasa proveniente de Sephadex G-150. Las columnas se lavaron exhaustivamente y se desarrollaron incluyendo en una, glucosa 1 M (A) y, en la otra, N-acetilglucosamina 10 mM (B). Se colectaron fracciones de 3,3 ml y se mantuvo un flujo constante de 40 ml por h.

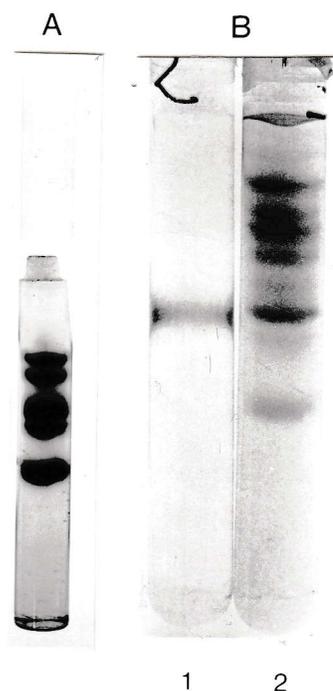


Figura 11. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la glucoquinasa eluida con N-acetilglucosamina. Se muestran las electroforesis en geles de poliacrilamida de glucoquinasa obtenida al eluir la columna de sefarosa-glucosamina con glucosa 1 M (A) o con N-acetilglucosamina 10 mM (B). (A) Se colocaron 1,5 U de glucoquinasa y se tiñó solo para proteínas. (B) Se colocaron 0,3 U de enzima y se tiñó un gel para actividad (1) y otro para proteínas (2).

la enzima retenida era eluida en forma relativamente selectiva con un ligando soluble que competía por la enzima con el ligando inmovilizado.

ii. Elución con glucosa y urea. La inclusión de urea junto a la glucosa en el eluyente corresponde a la idea de deformar o distorsionar la conformación de la glucoquinasa o de alguna de las proteínas contaminantes, de modo que se alterara la retención o la elución de ellas. Se usó urea en una concentración de 0,5 M, concentración en la cual la enzima mantiene su actividad (Cárdenas, 1982), tanto en la muestra como durante la elución (Fig. 12). En estas condiciones hubo una retención parcial de la glucoquinasa, pues el lavado contenía el 55% de la actividad colocada en la columna. La fracción retenida y posteriormente eluida correspondía a un 32% de la actividad colocada y presentaba una actividad específica de 4,5 U/mg de proteína. Los resultados indicaron, entonces, que el procedimiento diseñado no era adecuado, lo que se confirmó en la electroforesis en gel de poliacrilamida, que reveló la presencia de un número mayor de bandas, al menos siete, y una de ellas con gran concentración en relación con el método habitual (Fig. 12).

iii. Elución con glucosa y ATP. Se probó también la elución de la enzima por la acción concertada de los dos sustratos. Para esto se equilibró la columna de sefarosa-glucosamina con amortiguador C que contenía KCl 62 mM y se cargó con glucoquinasa proveniente de Sephadex G-150. Después de un

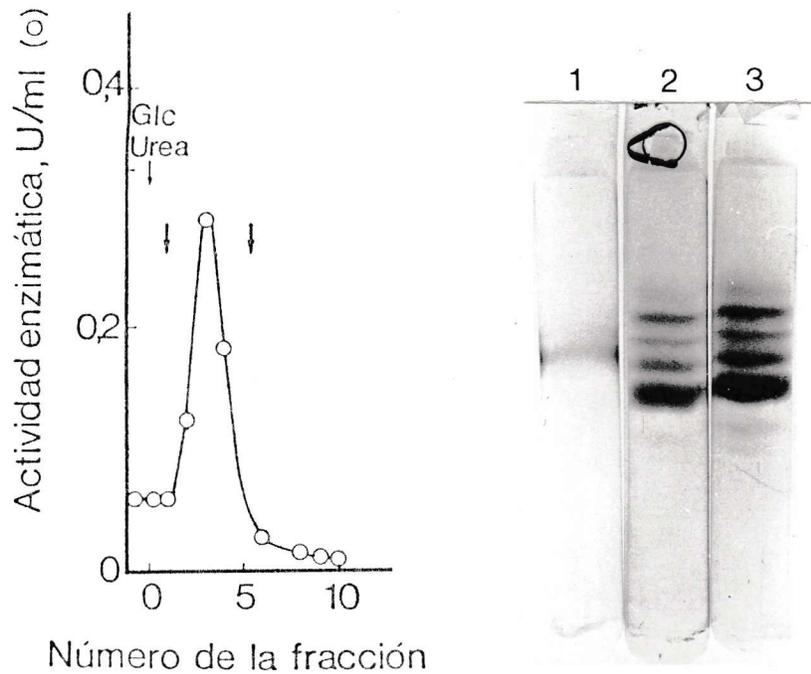


Figura 12. Cromatografía en columna de sefarosa-glucosamina; elución con glucosa y urea. En una columna de sefarosa-glucosamina de 7,5 cm de altura por 1,2 cm de diámetro, previamente equilibrada con amortiguador C que contenía KCl 62 mM, se colocaron 10 U de glucoquinasa proveniente de Sephadex G-150, a la que se había agregado urea hasta una concentración de 0,5 M. Se lavó exhaustivamente y se eluyó con glucosa 1 M y urea 0,5 M incluidas en el amortiguador de equilibrio. Se colectaron fracciones de 5 ml y el flujo de la columna fue de 30 ml por h. El rendimiento fue de un 32% y la actividad específica de 4,5 U/mg de proteína. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 10%. Se hizo tinción de actividad (1) y de proteínas (2 y 3). Se colocaron 0,3 U de enzima por gel.

lavado exhaustivo se procedió a la elución, incluyendo en el amortiguador de equilibrio glucosa 1 M y ATP 5 mM (Fig. 13). El conjunto de las fracciones activas representaba el 76% de la actividad colocada en la columna, y el análisis electroforético mostró una preparación muy contaminada, a juzgar por las numerosas bandas de proteínas contaminantes y la elevada intensidad de uno de los componentes de mayor migración (Fig. 13).

c) Dilución de la sefarosa-glucosamina. Como se ha observado hasta aquí, una fracción de las proteínas cromatografiadas es retenida en la matriz y es eluida solo al aumentar la concentración de KCl a 300 mM. Para controlar las interferencias en la adsorción no-bioespecífica de las proteínas en la columna de afinidad se ha intentado modificar las condiciones de operación, no solo en las características de la muestra y de las soluciones de equilibrio y elución, sino también de la matriz misma. Entre las variaciones de la matriz son importantes la naturaleza y el largo del espaciador usado y la concentración de ligando unido a la matriz (O'Carra et al., 1974).

En los intentos de purificar glucoquinasa de hígado de rata por medio de columnas de afinidad se habían estudiado en el laboratorio distintos espaciadores unidos a la sefarosa (León, 1977; León et al., 1977); y se concluyó que, de los examinados, el espaciador más conveniente era el ácido 6-aminohexanoico. Por otro lado, existían antecedentes sobre la influencia de la

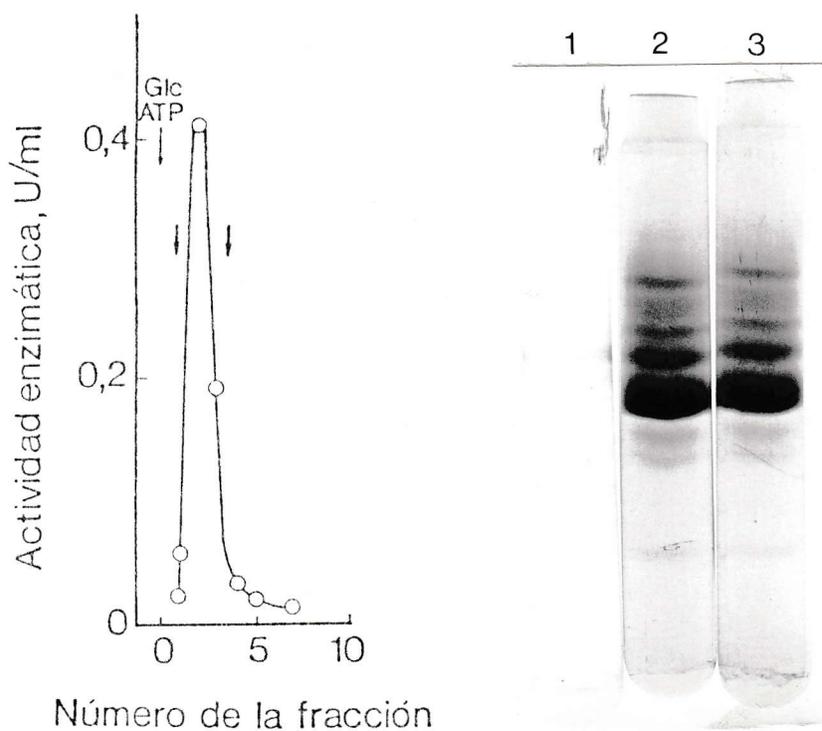


Figura 13. Cromatografía en columna de sefarosa-glucosamina; elución con glucosa y ATP. En una columna de sefarosa-glucosamina de 7,5 cm de altura por 1,2 cm de diámetro equilibrada con amortiguador C que contenía KCl 62 mM, se colocaron 10 U de glucoquinasa proveniente de Sephadex G-150. Se lavó exhaustivamente y se eluyó con glucosa 1 M - ATP 5 mM. Se colectaron fracciones de 5 ml y el flujo de la columna fue de 30 ml por h. El rendimiento fue de 76% y el análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 10% de una muestra de 0,3 U de enzima indicó una preparación muy contaminada. 1, tinción de actividad; 2 y 3, tinción de proteínas.

concentración de ligando en la elución de glucoquinasa desde sefarosa-glucosamina (Holroyde et al., 1976a). Se decidió realizar una cromatografía en sefarosa-glucosamina que fue diluida en Sepharose 4B hasta alcanzar una concentración de 2 μmol de glucosamina por ml de gel.

Una muestra proveniente de Sephadex G-150 se colocó en una columna equilibrada con amortiguador C, que contenía KCl 10 mM. Luego de un lavado exhaustivo se agregó glucosa 1 M al amortiguador, intentando la elución de la enzima. En las fracciones obtenidas no se detectó actividad, por lo que se lavó nuevamente la columna, aumentando la concentración de KCl a 20 mM. Después de este segundo lavado, en que no se encontró actividad, se agregó glucosa 1 M y nuevamente no se encontró actividad en las fracciones colectadas. Por último, se lavó con amortiguador con KCl 30 mM y la enzima siguió retenida. Al agregar glucosa 1 M, la enzima eluyó, como se ilustra en la figura 14. La muestra obtenida correspondió a un 71% de la colocada en la columna. El problema que representa esta cromatografía es el gran volumen de elución, que equivale a 10 volúmenes de columna. Fuera de que esto significa inconvenientes en un procedimiento para purificar grandes cantidades de glucoquinasa, la enzima obtenida con alto grado de pureza (Fig. 14) es inestable cuando se encuentra diluida y la concentración por ultrafiltración en Amicon o en microcolumnas de DEAE-celulosa microgranular tenía mal rendimiento.

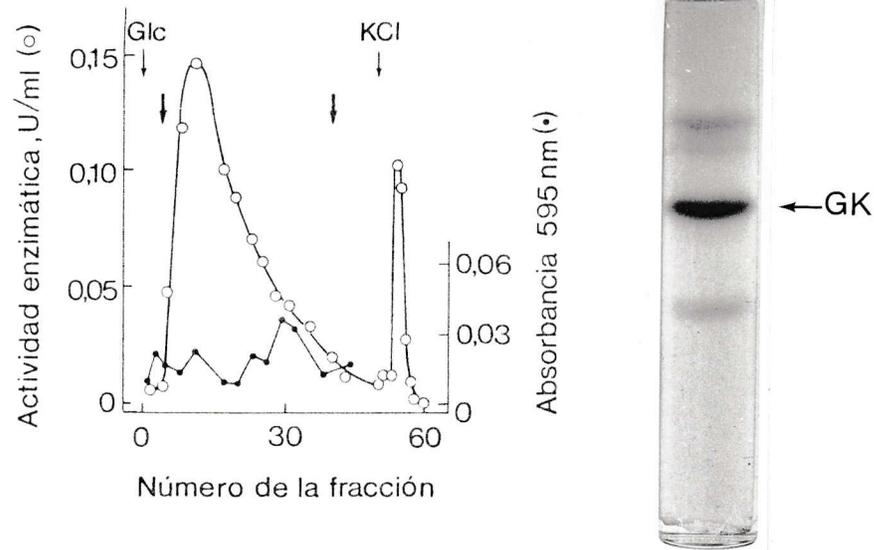


Figura 14. Cromatografía en sefarosa-glucosamina diluida en Sepharose 4B. Una columna de sefarosa-glucosamina diluida (2 $\mu\text{mol/ml}$ de gel) de 7,5 cm de altura por 1,2 cm de diámetro se cargó con 10 U de glucoquinasa proveniente de sefadex. La elución se realizó incluyendo glucosa 1 M y KCl 30 mM en el amortiguador de equilibrio. El flujo era de 30 ml por h y se colectaron fracciones de 2,2 ml. El conjunto de fracciones seleccionadas (tubos 4 a 40) correspondió al 71% de la actividad colocada en la columna. El análisis electroforético de la preparación de glucoquinasa en esta etapa de purificación mostró 4 bandas de proteínas. Uno de los geles, en que se colocaron 0,4 U de enzima, se muestra en la figura. La banda más intensa corresponde a la glucoquinasa (GK). Se observan diferencias cuantitativas de los contaminantes respecto a la glucoquinasa, en comparación con los resultados habituales.

d) Recromatografía en sefarosa-glucosamina

i. Elución con glucosa 1 M. Una muestra proveniente de sefarosa-glucosamina eluida con glucosa 1 M - KCl 62 mM fue recromatografiada, previo paso de la muestra por una pequeña columna de DEAE-celulosa microgranular, que retiraba la glucosa, y dilución de la muestra hasta alcanzar la concentración de KCl deseada. La muestra presentaba en el análisis electroforético 5 bandas de proteínas.

En la figura 15 se muestra el perfil de elución de la glucoquinasa de la columna de recromatografía equilibrada con amortiguador C que contenía KCl 64 mM, en vez de KCl 62 mM que era lo habitual. El conjunto de las fracciones seleccionadas representaba el 80% de la actividad colocada en la columna y el análisis electroforético mostró una preparación con 3 bandas de proteínas, siendo la glucoquinasa la que se encontraba en mayor concentración.

El volumen de elución de la enzima disminuyó al usar esta concentración de KCl, lo que se considera una ventaja ya que un menor volumen hace más rápida la concentración posterior de la enzima, al mismo tiempo que la hace menos inestable. Al agregar KCl 0,3 M se eluyeron algunas fracciones con actividad glucoquinásica. Después de reunir las se pasaron por una columna de DEAE-celulosa microgranular para eliminar la glucosa y detectar N-acetilglucosamina-quinasa, que no se encontró, como era de esperar, pues la muestra provenía de una cromatografía

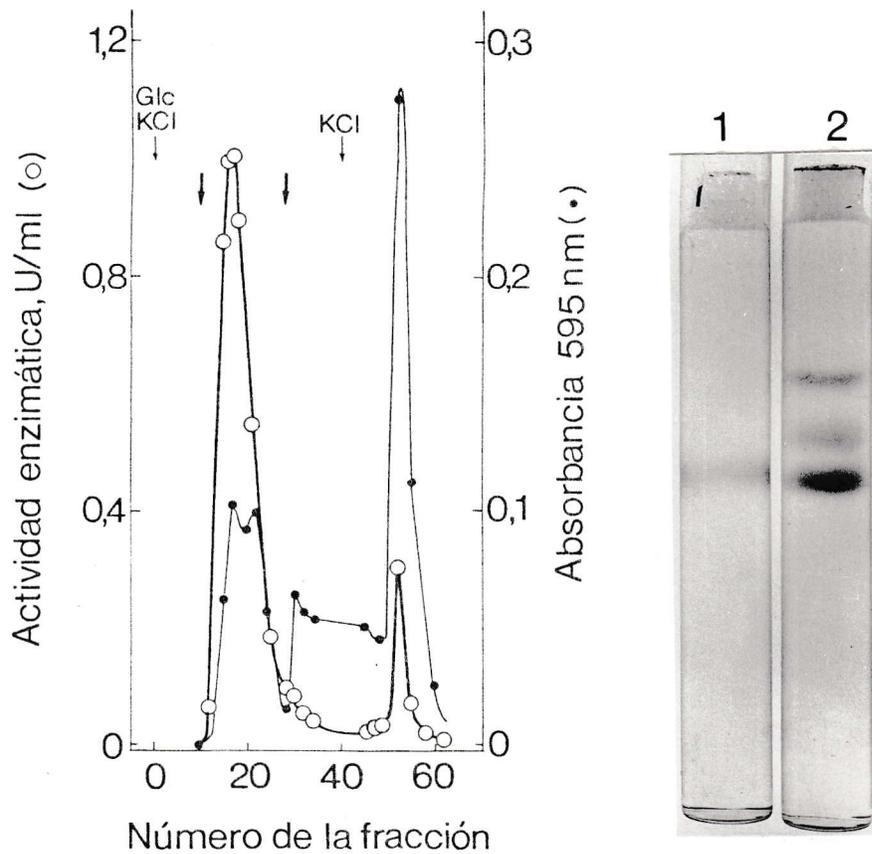


Figura 15. Recromatografía en sefarsa-glucosamina; elución con glucosa 1 M KCl 64 mM. Una columna de sefarsa-glucosamina de 7,5 cm de altura por 1,5 cm de diámetro se cargó con 10 U de glucoquinasa y después de lavado exhaustivo la enzima fue eluida con amortiguador C al que se agregó glucosa 1 M - KCl 64 mM. Se colectaron fracciones de 1,5 ml y se mezclaron las fracciones 10 a 28. Cada gel se cargó con 0,3 U de enzima. 1, actividad; 2, proteínas.

en sefarosa-glucosamina eluida con glucosa 1 M.

ii. Elución con gradiente de glucosa. Una muestra de glucoquinasa proveniente de una cromatografía en sefarosa-glucosamina a la que se le eliminó la glucosa haciéndola pasar por una microcolumna de DEAE-celulosa microgranular, se colocó en una nueva columna de sefarosa-glucosamina. Luego de lavado exhaustivo se eluyó con un gradiente de glucosa desde 0 hasta 1 M (Fig. 16). El rendimiento de la columna fue del 80% y el análisis electroforético mostró una preparación con 3 bandas de proteínas, semejante a la recromatografía en la que la elución se hizo con una solución de composición constante (glucosa 1 M - KCl 62 mM). Las bandas sin actividad en el gel de poliacrilamida, es decir, los contaminantes, eran diversos a los obtenidos en la recromatografía con KCl constante de la figura anterior.

3. Electroforesis preparativa en poliacrilamida.

El hecho que la glucoquinasa se separara de los contaminantes en geles analíticos de poliacrilamida hizo pensar que la electroforesis preparativa, en que las proteínas son eluidas, podría ser un buen método de purificación de la glucoquinasa después de la etapa de sefarosa-glucosamina. Para esto se preparó en gel de poliacrilamida según Grossman y Potter (1974) en una columna de mayor tamaño que lo habitual (Fig. 17).

La glucoquinasa apareció en una posición análoga a la

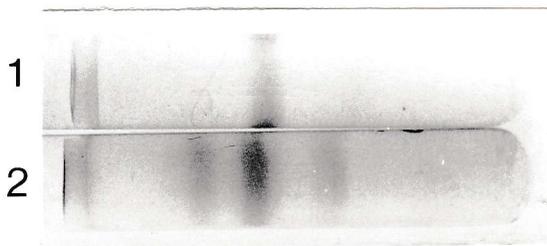
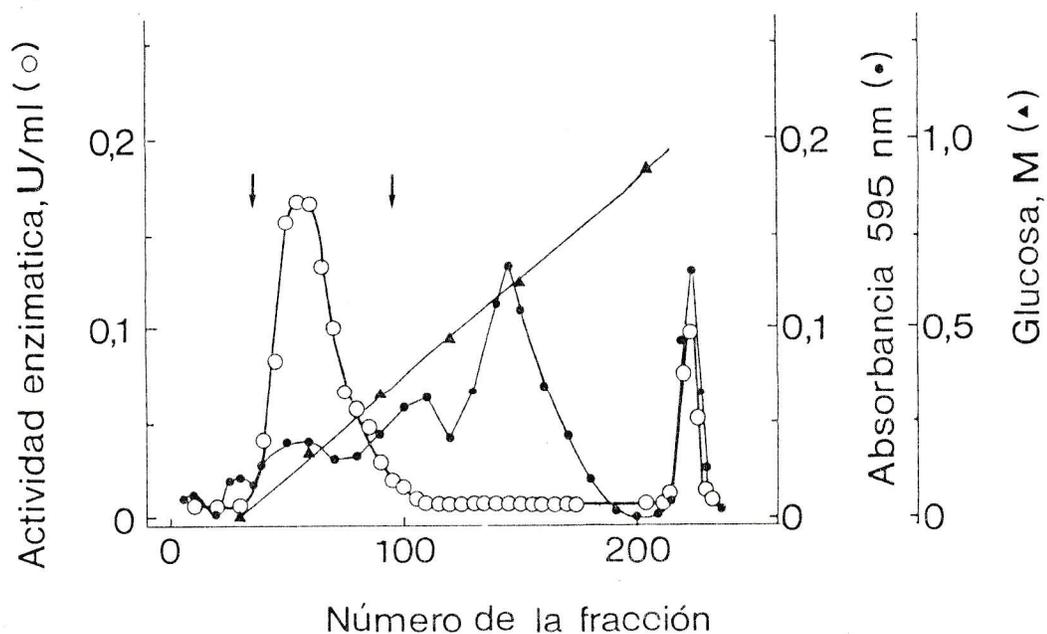


Figura 16. Recromatografía en sefaroza-glucosamina; elución con un gradiente de glucosa entre 0 y 1 M. Una columna de 7,5 cm de altura por 1,5 cm diámetro de sefaroza-glucosamina equilibrada con amortiguador C con KCl 62 mM, se cargó con 10 U de glucoquinasa, se lavó exhaustivamente y se eluyó con un gradiente lineal de glucosa desde 0 hasta 1 M, de 300 ml totales. Se colectaron fracciones de 1,5 ml y se seleccionaron las indicadas en la figura. La proteína se determinó por el método que utiliza Coomassie G-250 (absorbancia a 595 nm). En los geles de poliacrilamida se colocó una muestra equivalente a 0,3 U de glucoquinasa: 1, actividad; 2, tinción de proteínas.

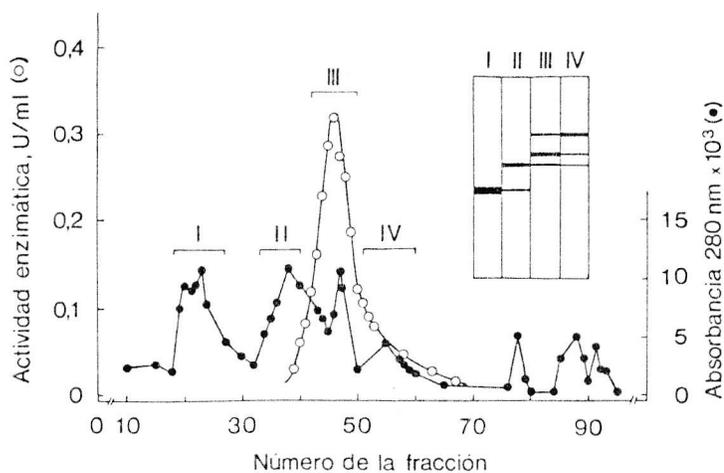


Figura 17. Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida. La columna, de $3,3 \text{ cm}^2$ de sección, tenía 6 cm (20 ml) de gel separador al 10% y 2 cm (7 ml) de gel concentrador al 2% de poliacrilamida. Se cargó con 2 ml de una muestra de glucoquinasa proveniente de la etapa de sefariosa-glucosamina que contenía 9 U de enzima (act. esp. 30 U/mg de proteína). La electroforesis comenzó con 10 mA, que se llevaron a 20 mA al entrar la muestra al gel separador. La elución se mantuvo con un flujo aproximado de 0,2 ml por min y se colectaron fracciones cada 8 min (1,5 ml). Los geles analíticos del recuadro se hicieron al 10%, como habitualmente.

observada en los geles analíticos; sin embargo no se logró una buena resolución, pues se encontraron 3 (II, III, IV) proteínas en el pico correspondiente a la actividad (Fig. 17). Se recuperó solo el 26% de la actividad colocada, ya que el proceso demoró 17 h, durante las cuales la columna se mantuvo a aproximadamente 15°. El pico de actividad, después de concentrado, mostró 3 bandas de proteínas en electroforesis analítica, como se esquematiza en el recuadro de la figura.

III. Análisis inmunológico

Como se describió en Métodos, se preparó un antisuero de conejo mediante la inyección de repetidas dosis de glucoquinasa de hígado de rata purificada hasta la etapa de DEAE-Sephadex A-50 y posteriormente corrida en geles de poliacrilamida. Se cortaron las bandas de los geles correspondientes a la glucoquinasa, se homogeneizaron y se inyectaron. Se hizo una inyección de refuerzo con glucoquinasa en solución proveniente de la recromatografía en sefarosa-glucosamina. El antisuero se estudió con los siguientes procedimientos.

1. Inmunodifusión doble (Método de Ouchterlony)

En este ensayo se encontró que el antisuero reaccionaba contra la preparación inmunizante dando una banda única de precipitación. Mediante esta técnica se encontró el mismo resultado al usar muestras de glucoquinasa con distinta concentración de proteína y con diferentes grados de pureza,

como se muestra en las figuras 18 y 19. Se observa en ambas figuras que las líneas únicas de precipitación se fusionan para dar un solo arco continuo, lo que implicaría que el suero es monoespecífico por este criterio. Al usar el suero control de conejos no inmunizados, no se observaban líneas de precipitación con las mismas cantidades de glucoquinasa.

Se encontró además que el inmunoprecipitado en el agar es enzimáticamente activo (Fig. 18B), al someter una placa con muestra proveniente de sefadex a tinción de actividad (como se describe en Métodos).

2. Inmunoelectroforesis

El antisuero se incorporó al agar que cubre un portaobjeto y se hizo electroforesis para separar las proteínas ubicadas en los pocillos de un extremo del agar. La existencia de una línea única de precipitación, en forma de "coquete", indica la monoespecificidad del antisuero y el área enmarcada por ella es proporcional a la concentración de antígeno (Fig. 20).

De los varios métodos en que se combina la difusión y la electroforesis para analizar la especificidad de un antisuero, se escogió el llamado de los "rockets" (cohetes) por su gran sensibilidad.

3. Inmunoinhibición de la glucoquinasa por el antisuero

Para estudiar la propiedad del antisuero de inhibir la enzima y titular el antisuero con la enzima, se incubaba una cantidad constante de enzima con cantidades variables de

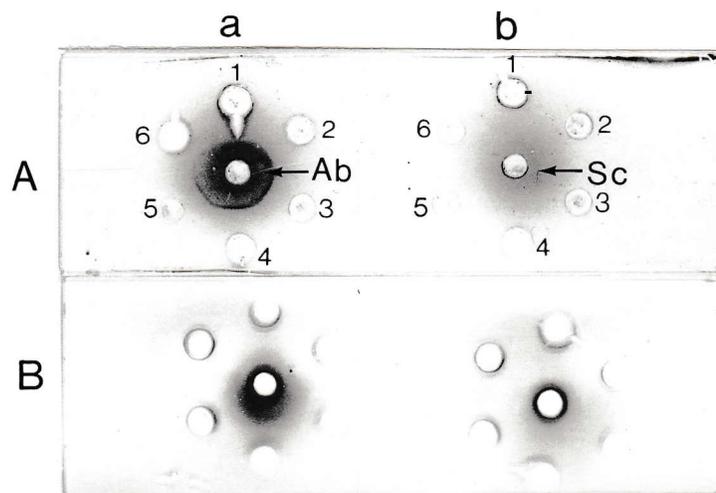


Figura 18. Inmunodifusión doble con glucoquinasa semipurificada. A. Se usaron diferentes concentraciones de glucoquinasa proveniente de la etapa de sefadex (act. esp. 1,8 U/mg de proteína). a. Ab, antisuero; 1, GK 12 mg de proteínas totales por ml; 2 a 6, diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. b. Sc, suero control; 1 a 6, GK como en a. Se tiñeron las proteínas con Coomassie G-250. B. Se muestra la mantención de la actividad glucoquinásica en el complejo precipitado de antisuero-enzima. a y b como en A.

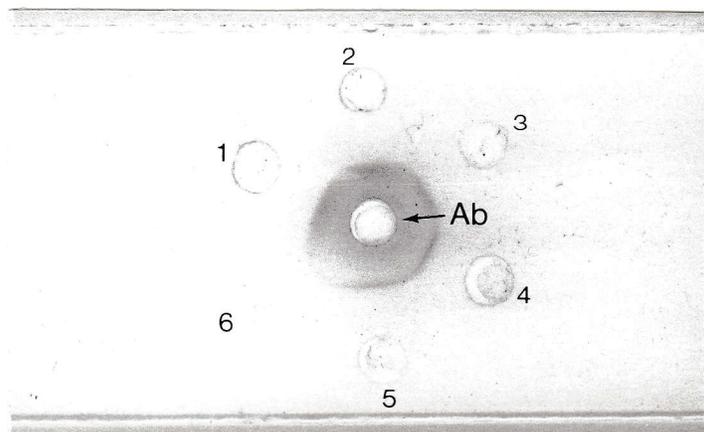


Figura 19. Inmunodifusión doble con glucoquinasa purificada. Se colocaron diferentes concentraciones de glucoquinasa proveniente de la etapa de sefarosa-glucosamina (act. esp. 30 U/mg de proteína). Ab, antisuero; 1, GK 1 mg de proteínas totales por ml; 2 a 6, diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.



Figura 20. Inmunoelectroforesis (método de los cohetes). A. La glucoquinasa proveniente de sefadex (act. esp.: 1,8 U/mg de proteína) se colocó en los pocillos de la placa de agarosa C impregnada de antisuero. La placa se sometió a electroforesis haciendo pasar una corriente de 5 mA, durante 3,5 h. Los pocillos 1 a 4 contenían 0,75; 1,5; 3 y 6 mg de proteína por ml, respectivamente. B. La glucoquinasa provenía de sefarosa-glucosamina (act. esp.: 30 U/mg de proteína). Los pocillos 1 a 4 contenían 0,125; 0,25; 0,5 y 1 mg de proteínas totales por ml.

antisuero o de suero control reconstituidos, durante 30 min a 37° y después toda la noche a 4°. Al término de la incubación se centrifugaba y se leía la actividad remanente en el sobrenadante. La mezcla amortiguadora contenía los protectores conocidos de la glucoquinasa, para evitar su inactivación espontánea al incubar a 37° (Clark-Turri et al., 1974). La figura 21 ilustra un experimento en el cual se observa la desaparición de la actividad enzimática al aumentar la cantidad del suero inmune. Se pudo calcular por extrapolación que 100 ul de antisuero neutralizan a 6,6 mU de enzima.

4. Microinmunotitulación

Los anticuerpos pueden ser detectados y cuantificados por el método llamado abreviadamente ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay"), 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-antisuero se añade un conjugado de proteína A y fosfatasa alcalina. Para medir la actividad enzimática unida a la fase sólida se agrega p-nitrofenilfosfato y se cuantifica la liberación del p-nitrofenol, lo que refleja la cantidad de anticuerpo unido en la primera incubación. La figura 22A ilustra un experimento que permitió elegir la dilución adecuada de antisuero para hacer la curva de calibración destinada a la determinación de glucoquinasa por competencia (Fig. 22B). Esta determinación se

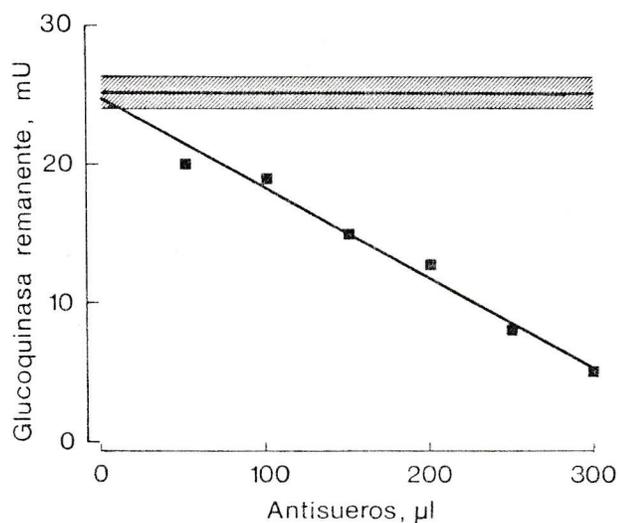


Figura 21. Inhibición de glucoquinasa con suero inmune. Se incubaron cantidades crecientes de antisuero o de suero control reconstituidos con 25 mU de glucoquinasa proveniente de Sephadex G-150, en una mezcla amortiguadora. En un volumen de 500 µl, la mezcla contenía (concentraciones finales): Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), KCl 75 mM, glucosa 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 2,5 mM. La incubación se hizo a 37° durante 30 min y se dejó durante la noche a 4°. Al término de la incubación se centrifugó durante 15 min en una microcentrífuga Gelman-Hawksley y se leyó la actividad remanente en el líquido sobrenadante. ■, antisuero; zona gris, indica el promedio de los valores obtenidos con cantidades iguales del suero control con la desviación estándar de las observaciones.

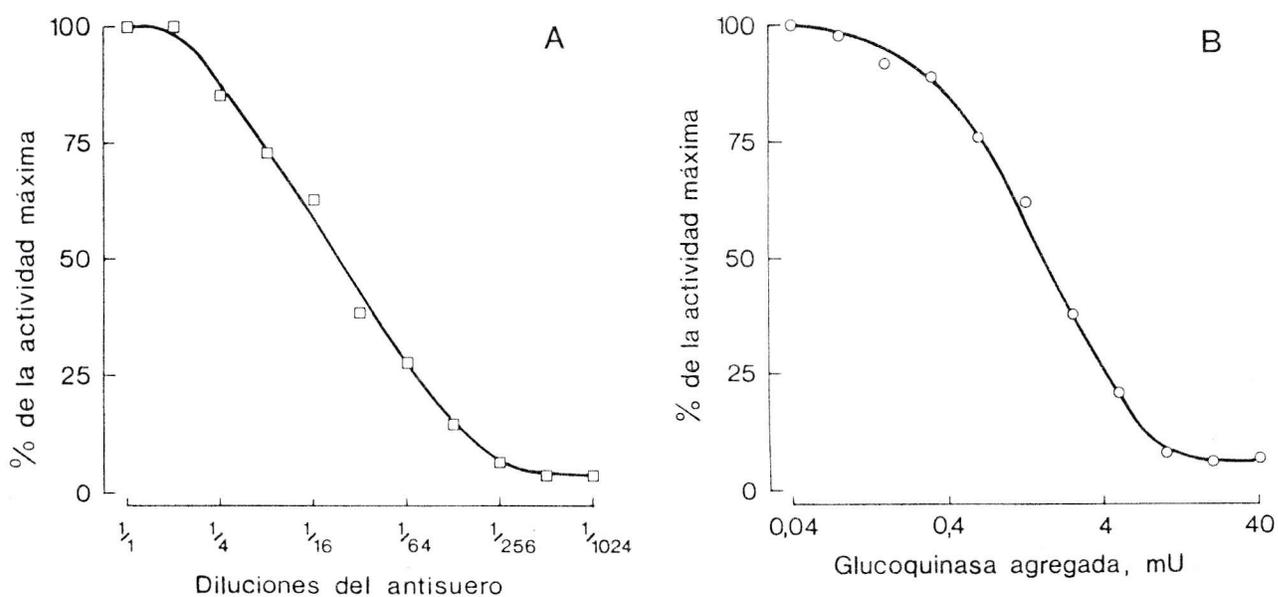


Figura 22. Microinmunotitulación de glucoquinasa con el método ELISA.

A. Valores obtenidos para el antisuero, corregidos con el suero control. B. Titulación de la cantidad de glucoquinasa por competencia. Se usó una dilución constante de antisuero, correspondiente a 1/4 en A. El 100% corresponde al control con albúmina bovina 1% (sin glucoquinasa).

basa en la posibilidad de interferir la interacción del antígeno con el antisuero en la fase sólida, haciendo reaccionar previamente el antisuero con cantidades crecientes de enzima y agregando esta mezcla de antisuero-enzima a la placa que tenía la glucoquinasa adsorbida. La interferencia se manifiesta en menor actividad fosfatásica a medida que aumenta la glucoquinasa agregada. Se origina una curva de calibración que permitirá la determinación del antígeno en mezclas complejas. Los detalles de estos procedimientos están descritos en Materiales y Métodos.

D. DISCUSION

La glucoquinasa representa solo el 0,005% (p/p) del total de las proteínas en el extracto de hígado de rata después de la centrifugación a 105.000 g (Holroyde et al., 1976b). Este hecho, agregado a la inactivación de la enzima durante los tratamientos ensayados, ha constituido una limitante importante para lograr la purificación. En el momento de comenzar este trabajo permanecía el problema de la inestabilidad de la enzima, problema que se acentuaba al aumentar el grado de pureza de la preparación. Esto hacía difícil la purificación de grandes cantidades de enzima a través de varios pasos cromatográficos, en que se trabajaba con volúmenes grandes de soluciones y con concentraciones cada vez menores de proteína. En las primeras etapas de purificación también hay una rápida desaparición de la actividad glucoquinásica. Para mantenerla es necesaria la presencia de KCl, de glucosa y de protectores de grupos tioles (DTT, 2-mercaptoetanol o N-acetilcisteína)(Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1966; Babul y Niemeyer, 1966; González et al., 1967). Sin embargo, parece que la enzima es relativamente estable cuando se guarda precipitada en sulfato de amonio a 4°. La enzima también es bastante estable en la etapa de sefadex, pero después de unos dos meses la actividad comienza a disminuir y termina inactivándose en aproximadamente 3 meses

(Heberlein, 1979; Monasterio, 1980; Niemeyer et al., 1981). En etapas más avanzadas de purificación aumenta la inestabilidad de la glucoquinasa. Así, después de sefarosa la enzima diluida (0,15 U/ml) era estable solo por pocas horas, aún en presencia de glucosa. Fue nuestro propósito inicial estabilizar la enzima después de la cromatografía en sefarosa-glucosamina, ya que nuestra preparación en este momento presentaba una actividad específica de 30 U/mg de proteína y 5 bandas de proteínas en un gel de poliacrilamida, por lo que era necesario añadir al menos otro paso de purificación. Se probó el glicerol como estabilizante, que ha demostrado ser un excelente protector de otras proteínas. Rose (1976) y Holroyde et al. (1976b) habían observado el efecto estabilizante del glicerol en la actividad de la glucoquinasa. Nuestras observaciones confirmaron este efecto y nos condujeron a introducir el glicerol en todos los pasos de purificación. En DEAE-celulosa el uso de glicerol al 5% junto con glucosa aumentaba el rendimiento de la preparación desde un 50% hasta un 70%. La concentración de glicerol se subió al 20% durante la purificación en las etapas de sefarosa-glucosamina y de cromatografía en DEAE-Sephadex, etapa posterior a la de sefarosa, encontrándose que el rendimiento era de un 80% y cercano al 100%, respectivamente. En la etapa de sefarosa-glucosamina se probó el glicerol al 5%, no encontrándose cambio en el resultado de la cromatografía misma, pero sí durante el almacenamiento de la enzima, ya que ésta solo mantenía el 40%

de la actividad en 12 días. Por otra parte, el glicerol al 10% mantenía la enzima con un 50% de la actividad y el glicerol al 20% mantenía el 95% de la actividad inicial en este período. Si se conservaba la glucoquinasa, aún con alto grado de pureza (79 U/mg de proteína), en un amortiguador de fosfato de potasio 250 mM (pH 7,0) con 20% de glicerol, además de los protectores usuales, se mantenía cerca de un 80% de su actividad inicial después de al menos 7 meses de almacenamiento a 0°. Esto permitió guardar cantidades de enzima suficientes para la preparación del antisuero. En cuanto a estabilidad y concentración de la enzima, se detectó que las muestras diluidas perdían actividad más rápidamente que las muestras concentradas guardadas en iguales condiciones. Esto, sumado al hecho de trabajar con grandes volúmenes, nos hizo estudiar la manera de concentrar la enzima con rapidez y alto rendimiento, encontrándose que el método de concentración en microcolumnas de DEAE-celulosa microgranular ofrecía ventajas sobre otros métodos (ultrafiltración en Amicon, diálisis al vacío), en los cuales había una gran pérdida de actividad.

El paso clave en el esquema de purificación actual de la glucoquinasa es la cromatografía en sefarosa-glucosamina, que empezó a estudiarse en el laboratorio de Trayer (Chesher et al., 1973). Holroyde et al. (1976a, b) describieron una preparación homogénea, con resultados que indican la necesidad de un control cuidadoso en varios de los parámetros

involucrados en la operación y en la posición relativa de la cromatografía de afinidad en la secuencia del esquema de purificación. Estos autores discuten la posibilidad de obtener resultados variables en el procedimiento al modificar diversos parámetros que nosotros también hemos examinado.

El resultado de la cromatografía está influido por las características de la matriz, algunas de las cuales quedan condicionadas en su preparación. En el procedimiento seguido por Holroyde et al. (1976a,b) se une primero la glucosamina al ácido 6-aminohexanoico y luego el compuesto resultante a la matriz de sefarosa. Spence y Pitot (1979), usando el procedimiento descrito por Holroyde et al. (1976b) obtuvieron una preparación no homogénea, con aproximadamente la mitad de la actividad específica descrita en el procedimiento original y que presentaba varias bandas en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio. También Neet ha encontrado problemas semejantes (comunicación personal de I. Trayer). En nuestro laboratorio no se obtuvieron mejores resultados al trabajar con sefarosa-glucosamina enviada por el Dr. I. Trayer, por lo que el procedimiento siguió haciéndose con sefarosa-glucosamina preparada por nosotros, en que la glucosamina se une a la hexanoil-sefarosa.

En este laboratorio, León (1977) y León et al. (1977) realizaron un estudio sobre cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa en derivados de sefarosa con

residuos de glucosamina inmovilizados a través de distintos espaciadores que diferían en hidrofobicidad. Estos estudios señalaron las condiciones adecuadas para la separación de la glucoquinasa de las hexoquinasas y de la N-acetilglucosamina-quinasa, que son enzimas contaminantes que interfieren en el análisis de las propiedades cinéticas de la glucoquinasa. Hacen notar, además, que la fuerte adsorción de glucoquinasa en sefarosa-glucosamina y la sensibilidad a la concentración de sales sugieren la presencia de fuerzas inespecíficas que contribuyen a reforzar la unión de la enzima a la matriz sustituida. Consideraciones semejantes hacen Holroyde et al. (1976a).

El efecto del cambio en la concentración de ligando unido a la matriz podría indicar que muchas de las interacciones no específicas estarían ocurriendo ya sea por un proceso de intercambio iónico, presumiblemente por la introducción de grupos cargados en el procedimiento de activación por CNBr, o por interacciones hidrofóbicas debido a la presencia del espaciador polimetilénico (O'Carra et al., 1974). Al diluir la sefarosa-glucosamina en Sepharose 4B se obtuvo glucoquinasa con alto grado de pureza (Fig. 14), pero el procedimiento no resultó aplicable para la obtención de grandes cantidades de enzima, debido al gran volumen de elución y al tiempo que permanecía la enzima con bajas concentraciones de KCl, lo que la hacía muy inestable.

En cuanto a las concentraciones de sal y de sustrato requeridas para la elución de la glucoquinasa, el estudio de distintas alternativas, por ensayo y error, nos condujo a elegir como condición favorable la elución con KCl entre 50 y 62 mM y glucosa 1 M. Con concentraciones bajas de glucosa la enzima eluye en un gran número de fracciones con disminución de la actividad específica en la preparación final. Se ha observado buena reproducibilidad del procedimiento final seleccionado.

Al no conseguirse glucoquinasa homogénea, se utilizó como antígeno para la preparación del antisuero la glucoquinasa proveniente de DEAE-Sephadex, una vez separada por electroforesis en geles analíticos de poliacrilamida y recortadas las secciones correspondientes a la enzima. Se hicieron algunos ensayos para eluir la enzima de las rodajas de gel por medio del método de Braatz y McIntire (1977). Este consiste esencialmente en hacer una electroforesis reversa a las rodajas colocadas en los tubos habituales de electroforesis, a los cuales se ajustaba una bolsa de diálisis en su extremo superior. Los resultados no fueron alentadores debido al bajo rendimiento. Por otra parte, se pensó que el hecho de tener la enzima incluida en un gel posiblemente aumentaría la respuesta inmune por la persistencia de la proteína en los tejidos, de donde sería liberada lentamente (Eisen, 1981). Como después de una serie de inyecciones del antígeno, el suero presentaba un

título muy bajo, evaluado por la inhibición de la actividad glucoquinásica y por la inmunodifusión doble, se inoculó el mismo conejo con una preparación soluble de enzima proveniente de una recromatografía en sefarosa-glucosamina, sin coadyuvante. Esta preparación contenía, además de glucoquinasa, dos proteínas contaminantes. La enzima inyectada por vía intramuscular alcanzaría rápidamente los órganos linfoides comprometidos en la síntesis de anticuerpos y estimularía la memoria inmunológica, si es que las inyecciones iniciales la indujeron. Se optó por esta alternativa conscientes del riesgo de iniciar la síntesis de anticuerpos contra las proteínas contaminantes. El uso de una dosis baja única, sin adyuvantes, permitiría estimular preferencialmente células de memoria preexistentes más que inducir una respuesta primaria contra los contaminantes introducidos en la inyección de refuerzo. El resultado obtenido se ajustó a lo esperado, puesto que la inmunodifusión contra la glucoquinasa de diferentes concentraciones y grados de pureza mostró un solo arco de precipitación, que mantenía actividad glucoquinásica. Este resultado se corroboró por inmunoelectroforesis (método de los cohetes), pues nuevamente se producía un arco único de precipitación al utilizar glucoquinasa de diferentes concentraciones y grados de pureza.

La interacción de una enzima con un antisuero específico generalmente conduce a una reducción en su actividad

enzimática. Principalmente, la neutralización puede ocurrir por tres mecanismos: a) Interacción directa del antisuero con el sitio activo, b) interacción de los anticuerpos con regiones contiguas y adyacentes al sitio activo, con generación de impedimento estérico, y c) interacción con otras regiones de la proteína, induciendo un cambio conformacional en la molécula que lleva a la pérdida de la actividad catalítica o previene el cambio conformacional inducido por el sustrato para llegar a la conformación activa (Arnon, 1974). En sistemas en que ocurre un cambio conformacional por la unión del anticuerpo a la enzima, el sustrato puede proteger de la inactivación por el antisuero, como ocurre con la creatina-quinasa (Samuels, 1963) y la alcohol-deshidrogenasa (Fuller y Marucci, 1971). También puede ocurrir un aumento de la actividad enzimática, como sucede con la glutamato-deshidrogenasa (Lehman, 1970), o una estabilización de la actividad, como ha sido observado con la catalasa (Feinstein et al., 1971).

Cualquiera sea el mecanismo de la neutralización de la actividad enzimática por el antisuero, la formación de agregados contribuirá a la inhibición.

En el caso concreto de nuestra preparación es difícil disociar estos mecanismos debido a que una respuesta policlonal complica la interpretación por ser altamente heterogénea, y debe aceptarse que el antisuero contiene una mezcla de anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes antigénicos

de la enzima. Entre nuestros proyectos está investigar la obtención de anticuerpos monoclonales contra glucoquinasa de hígado de rata, en colaboración con el Dr. Alfredo De Ioannes, del Departamento de Biología Celular de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Esto nos permitiría contar con anticuerpos en grandes cantidades dirigidos presumiblemente contra diferentes determinantes antigénicos y con títulos altos, que facilitaría la investigación de distintos problemas. Con el antisuero obtenido se calibró el método ELISA, lo que ha permitido la microinmunotitulación de la glucoquinasa en extractos celulares de hígado de rata. Este método demostró ser altamente reproducible y sensible. Se pretende usarlo para comparar la similitud inmunológica de las enzimas con características cinéticas y estructurales semejantes a las de la glucoquinasa de rata, presentes en otros mamíferos, en anfibios y en quelónidos, para así completar los estudios preliminares de Pilkis et al. (1968) y de Clark-Turri et al. (1974).

El método ELISA permitirá, además, investigar la presencia de glucoquinasa en diversos tejidos donde su existencia es discutible (Davagnino, 1979; Davagnino y Ureta, 1980; Allen et al., 1980; Vera, 1981). También podría utilizarse para evaluar el título de nuevos antisueros, puesto que estudios cinéticos y de adsorción han demostrado que los anticuerpos, especialmente los de baja avidéz, son mejor detectados con el antígeno inmovilizado en una fase sólida que en los ensayos en solución (Rubin et al., 1980).

E. REFERENCIAS

- Allen, M.B., Brockelbank, J.L., Walker, D.G. (1980). Apparent glucokinase activity in non-hepatic tissues due to N-acetyl-D-glucosamine kinase. Biochim. Biophys. Acta **614**, 357-366.
- Annon, R. (1974). Enzyme inhibition by antibodies. En Karolinska symposia on research methods in reproductive endocrinology, pp 133-153.
- Babul, J., Niemeyer, H. (1966). Purificación de glucoquinasa de hígado de rata. Arch. Biol. Med. Exp. **3**, 65-70.
- Braatz, J.A., Mc Intire, K.R. (1977). A rapid and efficient method for the isolation of proteins from polyacrylamide gels. Prep. Biochem. **7**, 495-509.
- 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.
- Cárdenas, M.L. (1982). Glucoquinasa, una enzima monomérica con cinética cooperativa. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E., Niemeyer, H. (1978). Maintenance of the monomeric structure of glucokinase under reacting conditions. Arch. Biochem. Biophys. **190**, 142-148.

- Cárdenas, M.L., Rabajille, E., Niemeyer, H. (1979). Kinetic cooperativity of glucokinase with glucose. Arch. Biol. Med. Exp. **12**, 571-580.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E., Niemeyer, H. (1981). Interacción de la glucoquinasa con fructosa. V Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, Punta de Tralca. Arch. Biol. Med. Exp. **14**, 198.
- Clark-Turri, L., Peñaranda, J., Rabajille, E., Niemeyer, H. (1974). Immunochemical titration of liver glucokinase from normal, fasted, and diabetic rats. FEBS Lett. **41**, 342-344.
- Chesher, N.M.E., Trayer, I.P., Walker, D.G. (1973). Affinity-chromatographic studies on rat hepatic glucokinase. Biochem. Soc. Trans. **1**, 876.
- Crowther, J.R., AbuElzein, E.M.E. (1980). Detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus using purified Staphylococcus A protein conjugated with alkaline phosphatase. J. Immunol. Methods **34**, 261-267
- Davagnino, J. (1979). Glucoquinasas múltiples y extrahepáticas: su identificación como N-acetilglucosamina-quinasa. Tesis de Licenciatura en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Davagnino, J., Ureta, T. (1980). The identification of extrahepatic "glucokinase" as N-acetylglucosamine kinase. J. Biol. Chem. **255**, 2633-2636.
- Dawson, R.M., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M. (1972). Data for Biochemical Research, 5^a Ed., Oxford University Press.

- DiPietro, D.L., Sharma, C., Weinhouse, S. (1962). Studies on glucose phosphorylation in rat liver. Biochemistry 1, 445-462.
- Eisen, H.N. (1981). Immunology, 2^a Ed., Harper and Row, New York.
- Engvall, E., Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. J. Immunol. 109, 129-135
- Engvall, E., Ruoslanti, E. (1979). Principles of ELISA and recent applications to the study of molecular interactions. En: Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine (Nakamura, R.M., Dito, W.R., Tucker III E.S. eds.) vol 3, pp 89-96. Alan R. Liss Inc., New York
- Feinstein, R.N., Jaroslow, B.N., Howard, J.B., Waksman, B.H. (1971). Stabilization of mutant catalase by complex formation with antibody to normal catalase. J. Immunol. 106, 1316-1322.
- Fuller, T.C., Marucci, A.A. (1971). Immunoenzymology of liver alcohol dehydrogenase. I. Factors influencing the inhibition of horse liver alcohol dehydrogenase by rabbit and guinea pig antisera. J. Immunol. 106, 110-119.
- González, C., Ureta, T., Sánchez, R., Niemeyer, H. (1964). Multiple molecular forms of ATP:hexose 6-phosphotransferase from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 347-352.
- González, C., Ureta, T., Babul, J., Rabajille, E., Niemeyer, H. (1967). Characterization of isoenzymes of adenosine triphosphate: D-hexose 6-phosphotransferase from rat liver. Biochemistry 6, 460-468.

- Grossman, S.H., Potter, V.R. (1974). Identification of rat hepatic glucokinase after polyacrylamide disc electrophoresis. Anal. Biochem. 59, 54-62.
- Grossman, S.H., Dorn, C.G., Potter, V.R. (1974). The preparation and characterization of pure rat liver glucokinase. J. Biol. Chem. 249, 3055-3060.
- Heberlein, U. (1979). Inactivación de glucoquinasa de hígado de rata por 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoato). Tesis de Bioquímico. Escuela de Química y Farmacia y Bioquímica, Universidad de Concepción.
- Holroyde, M.J., Chesher, N.M.E., Trayer, I.P., Walker, D.G. (1976a). Studies on the use of Sepharose-N-(6-aminohexanoyl)-2-deoxy-D-glucopyranose for the large-scale purification of hepatic glucokinase. Biochem. J. 153, 351-361.
- Holroyde, M.J., Allen, M.B., Storer, A.C., Warsy, A.S., Chesher, J.M.E., Trayer, I.P., Cornish-Bowden, A., Walker, D.G. (1976b). The purification in high yield and characterization of rat hepatic glucokinase. Biochem. J. 153, 363-373.
- Hudson, L., Hay, F.C. (1979). Inmunología Práctica. Editorial J.I.M.S. Barcelona, España.
- Katzen, H., Soderman, D., Nitowsky, H. (1965). Kinetic and electrophoretic evidence for multiple forms of glucose-ATP phosphotransferase activity from human cell cultures and rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 377-382.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature (London) 227, 680-685.

Lehman, F.G. (1970). Citado por Arnon, R. (1974).

León, O. (1977). Cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y de N-acetilglucosamina en derivados de glucosamina inmovilizados en Sefarosa. Tesis de Bioquímico. Escuela de Química y Farmacia y Bioquímica, Universidad de Concepción.

León, O., Monasterio, O., Niemeyer, H. (1977). Cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y N-acetilglucosamina en derivados inmovilizados en Sefarosa. I Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, Talca. Libro de resúmenes.

Maccioni, R. (1975). Purificación y caracterización de glucoquinasa. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Maccioni, R., Babul, J. (1976). Glucoquinasa. Purificación y caracterización. XVII Reunión Anual Soc. Biol. Chile, Concepción, 1974. Arch. Biol. Med. Exp. 10, R-61.

Maccioni, R., Babul, J. (1980). Purification and characterization of dog liver glucokinase. Arch. Biol. Med. Exp. 13, 271-286.

Monasterio, O. (1980). Mecanismo cinético de la glucoquinasa. Estudios en velocidad inicial con 2-desoxiglucosa como sustrato y efecto de inhibidores, modificaciones químicas e interacciones enzima-ligandos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Niemeyer, H., Ureta, T. (1972). Enzyme adaptation in mammals. En Molecular Basis of Biological Activity (K. Gaede, B.L., Horecker, W.J., Whelan, eds.). vol 1, pp 221-273. Academic Press, New York.

- Niemeyer, H., Ureta, T., Clark-Turri, L. (1975). Adaptive character of liver glucokinase. Mol. Cell. Biochem. 6, 109-126.
- Niemeyer, H., Heberlein, U., Monasterio, O. (1981). Dissociation between catalytic activity and susceptibility to inactivation by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) of rat glucokinase. Arch. Biol. Med. Exp. 14, 177-182.
- O'Carra, P., Barry, S., Griffin, T. (1974). Interfering and complicating adsorption effects in bioaffinity chromatography. Methods Enzimol. 34, 108-126.
- Parry, M.J., Walker, D.G. (1966). Purification and properties of adenosine 5'-triphosphate-D-glucose 6-phosphotransferase from rat liver. Biochem. J. 99, 266-274.
- Pilkis, S.J. (1972). Rat hepatic glucokinase: improved purification and some properties. Arch. Biochem. Biophys. 149, 349-360.
- Pilkis, S., Hansen, R.J., Krahl, M.E. (1968). Hexose-ATP phosphotransferases: comparative aspects. Comp. Biochem. Physiol. 25, 903-912.
- Reyes, A. (1982). Enzimas fosforilantes de glucosa en hepatocitos y células no-parenquimatosas aislados de hígado de rata. Tesis de Licenciatura en Ciencias. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Reyes, A., Cárdenas, M.L., (1980). Distribución celular de las isoenzimas fosforilantes de glucosa en hígado de rata. IV Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile y XVI Reunión Anual Soc. Argent. Invest. Bioquím., Mendoza, Argentina. Arch. Biol. Med. Exp. 13, 467.

- Reyes, A., Cárdenas, M.L., Rabajille, E., Niemeyer, H. (1980). Distribución celular de las isoenzimas fosforilantes de glucosa en hígado de rata. Efectos dietarios y hormonales. XXIII Reunión Anual Soc. Biol. Chile, Viña del Mar. Arch. Biol. Med. Exp. **13**, 102.
- Reyes, A., Cárdenas, M.L., Rabajille, E., Niemeyer, H. (1981). Hexoquinasas, N-acetilglucosamina-quinasa y piruvato-quinasa. Distribución celular e influencia de la dieta. XXIV Reunión Anual Soc. Biol. Chile, Punta de Tralca. Arch. Biol. Med. Exp. **14**, 290.
- Reisner, A.H., Nemes, P., Bucholtz, C. (1975). The use of Coomassie Brilliant Blue G-250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectrofocusing on polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **64**, 509-516.
- Rose, M.C. (1976). Purificación de glucoquinasa de hígado de cerdo. Tesis de Bioquímico. Escuela de Química y Farmacia y Bioquímica, Universidad de Concepción.
- Rubin, R.L., Hardtke, M.A., Carr, R.I. (1980). The effect of high antigen density on solid-phase radioimmunoassays for antibody regardless of immunoglobulin class. J. Immunol. Methods **33**, 277-292.
- Salas, J., Salas, M., Viñuela, E., Sols, A. (1965). Glucokinase of rabbit liver. Purification and properties. J. Biol. Chem. **240**, 1014-1018.
- Samuels, A. (1963). Citado por Arnon, R. (1974).

- Sapag-Hagar, M., Marco, R., Sols, A. (1969). Distribution of hexokinase and glucokinase between parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver. FEBS Lett. 3, 68-71.
- Sibrowski, W., Seitz, H.J. (1980). Hepatic glucokinase turnover in intact and adrenalectomized rats in vivo. Eur. J. Biochem. 113, 121-129.
- Spence, J.T., Pitot, H.C. (1979). Hormonal regulation of glucokinase in primary cultures of adult rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 254, 12331-12336.
- Storer, A.C., Cornish-Bowden, A. (1976). Kinetics of rat liver glucokinase. Cooperative interactions with glucose at physiologically significant concentrations. Biochem. J. 159, 7-14.
- Ureta, T. (1976). The allosteric regulation of hexokinase C from amphibian liver. J. Biol. Chem. 251, 5035-5042.
- Ureta, T. (1982). The comparative isozymology of vertebrate hexokinases. Comp. Biochem. Physiol. 71B, 549-555.
- Vera, M.L. (1981). Enzimas fosforilantes de glucosa en mucosa de intestino de rata. Tesis de Magister en Ciencias. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Viñuela, E., Salas, M., Sols, A. (1963). Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. J. Biol. Chem. 238, PC 1175-1177.
- Walker, D.G. (1962). The development of hepatic hexokinase after birth. Biochem. J. 84, 118P.

Walker, D.G. (1963). On the presence of two soluble glucose-phosphorylating enzymes in adult liver and the development of one of these after birth. Biochim. Biophys. Acta 77, 209-226.

Warburg, O., Christian, W. (1941). Citado por Dawson (1972).

Weinhouse, S. (1976). Regulation of glucokinase in liver. Current Top. Cell. Regul. 11, 1-50.