

757  
01

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE D-XILOSA-DESHIDROGENASA  
DE HIGADO DE CERDO**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Magister en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

por

**SERGIO ZEPEDA MALUENDA**

1987

Patrocinante de Tesis: Dr. Tito Ureta



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGISTER

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

SERGIO ZEPEDA MALUENDA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Bioquímica, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de julio de 1987.

Patrocinante de Tesis:


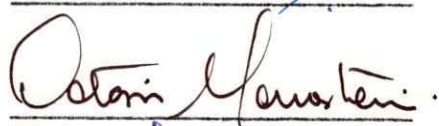
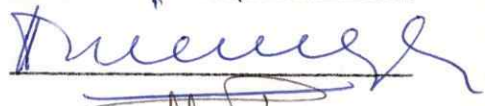
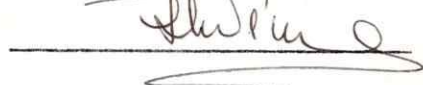
Dr. Tito Ureta

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Octavio Monasterio

Dr. Hermann Niemeyer

Dra. Luz María Pérez

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_



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



## AGRADECIMIENTOS

Mi sincero reconocimiento al Dr. Tito Ureta por su valiosa, permanente y oportuna orientación en el desarrollo de esta Tesis. Su personalidad como científico y sus cualidades humanas han influido significativamente en esta etapa de mi formación, constituyendo un fuerte estímulo para seguir perfeccionándome.

Deseo expresar además, mi profundo agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Hermann Niemeyer, quién además de científico y formador posee notables características humanas. Sus críticas acertadas fueron un eficaz aporte al desarrollo de este trabajo.

A los Drs. Octavio Monasterio y Jorge Babul por su permanente apoyo, por sus comentarios siempre útiles y sus oportunos consejos durante toda la etapa experimental y la redacción de esta Tesis.

A Carlos Medina por su permanente preocupación, entregándome valiosos comentarios y consejos durante la realización de este trabajo.



A todos los integrantes del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de esta Facultad por su cariñosa entrega de amistad, estímulo y apoyo que siempre me han brindado, no solamente durante el desarrollo de esta tesis, sino desde el inicio de mi formación.

Sergio Zepeda M.

Julio, 1987



A Chechita

A Sergio, Paulina y Juan

A nuestros Padres y Hermanos



## INDICE DE MATERIAS

	Página
Lista de Tablas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Abreviaturas	xiii
<b>RESUMEN</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xvii
<b>INTRODUCCION</b>	1
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	7
Materiales	7
Reactivos	7
Material cromatográfico	8
Proteínas estándares	8
Material biológico	8
Métodos	9
Medición de la actividad enzimática	9
Purificación de D-xilosa-deshidrogenasa	10
Preparación de extractos crudos	11
Cromatografía en CM-Sephadex	11
Precipitación con sulfato de amonio	12
Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa	13



	Página
Cromatografía de filtración en Sephacryl S-300	13
Cromatografía en hidroxilapatita	14
Cromatografía de pseudoafinidad en azul-agarosa	15
Control de pureza	16
Determinación de proteínas	16
Determinación de la concentración de sales en solución	17
Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	17
Electroforesis en gel de poliacrilamida en ausencia de SDS	19
Determinación de la masa molecular relativa	20
Caracterización cinética	23
Análisis estadístico de los resultados	24
<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
1. Purificación de D-xilosa-deshidrogenasa de hígado de cerdo	25
A. Estabilidad de la enzima durante la purificación	25
B. Etapas de la purificación	26
Etapa. 1. Preparación de los extractos crudos	26



	Página
Etapa 2. Cromatografía en CM-Sephadex	26
Etapa 3. Precipitación con sulfato de amonio	27
Etapa 4. Cromatografía en DEAE-celulosa	27
Etapa 5. Cromatografía de exclusión en Sephacryl S-300	27
Etapa 6. Cromatografía en hidroxilapatita	30
Etapa 7. Cromatografía de pseudoafinidad en azul-agarosa	30
C. Tabla de purificación	33
D. Control de pureza de las preparaciones	33
2. Caracterización de la D-xilosa-deshidrogenasa de hígado de cerdo.	38
A. Caracterización estructural	38
B. Estudios cinéticos	41
B.1. Especificidad de sustrato	41
B.2. Efecto del pH sobre la actividad	44
B.3. Efecto de la variación de la concentración de los sustratos	44
DISCUSION	53
Propiedades de la D-xilosa-NADP <sup>+</sup> -deshidrogenasa de hígado de cerdo	56

	Página
Especificidad de sustrato y coenzima	56
Influencia de la concentración de los sustratos	61
Tamaño molecular	63
Consideraciones sobre el catabolismo de D-xilosa	64
Comparación con otras deshidrogenasas	66
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>72</b>
Anexo 1. Preparación de DEAE-celulosa	72
Anexo 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	73
<b>REFERENCIAS</b>	<b>76</b>

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Purificación de D-xilosa-deshidrogenasa de hígado de cerdo	34
Tabla II. Parámetros cinéticos de D-xilosa-deshidrogenasa para varios azúcares	43

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Estructuras cíclicas de D-xilosa	2
Fig. 2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa	28
Fig. 3. Filtración en Sephacryl S-300	29
Fig. 4. Cromatografía en hidroxilapatita	31
Fig. 5. Cromatografía de pseudo-afinidad en azul-agarosa	32
Fig. 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	35
Fig. 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida de D-xilosa-deshidrogenasa en condiciones nativas	37
Fig. 8. Estimación de la masa molecular relativa de D-xilosa- deshidrogenasa	39
Fig. 9. Estimación de la masa molecular relativa de D-xilosa- deshidrogenasa por electroforesis-SDS	40
Fig. 10. Gráficas de Eisenthal y Cornish-Bowden para determinar $V_{max}$ y $K_m$ aparentes de D-xilosa-NADP <sup>+</sup> - deshidrogenasa	42
Fig. 11. Efecto del pH sobre la actividad de D-xilosa-deshidrogenasa	45

	Página
Fig. 12. Gráfica de dobles recíprocos para la variación de la concentración de D-xilosa y concentración constante de $\text{NADP}^+$ 0,5 mM	48
Fig. 13. Representación gráfica de dobles recíprocos a diferentes concentraciones de $\text{NADP}^+$ y concentración constante de D-xilosa 30 mM	49
Fig. 14. Influencia de la variación de la concentra- ción de $\text{NADP}^+$ sobre la velocidad inicial de D-xilosa-deshidrogenasa a varias concentra- ciones fijas de D-xilosa	50
Fig. 15. Influencia de la concentración de D-xilosa sobre la velocidad de D-xilosa-deshidrogenasa a varias concentraciones fijas de $\text{NADP}^+$	51
Fig. 16. Gráfica de dobles recíprocos para D-xilosa- deshidrogenasa donde las concentraciones de D-xilosa y $\text{NADP}^+$ se variaban en una razón constante de 100	52
Fig. 17. Gráfica de dobles recíprocos para D-xilosa- deshidrogenasa	52a.
Fig. 18. Conformación $\beta$ -piranósica de varios azúcares que son oxidados por D-xilosa-deshidrogenasa	59
Fig. 19. Esquema que sugiere relaciones evolutivas entre alcohol-polialcohol-azúcar-deshidrogenasas	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

CM-	Carboximetil
DEAE-	Dietilaminoetil
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
POPOP	1,4 bis [2-(5-feniloxazolil)] benceno
PPO	2,5-difeniloxazol
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TEMED	N,N,N,N', tetrametiletildiamina
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano

## RESUMEN

Se describe la purificación y caracterización de la D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa de hígado de cerdo enzima detectada anteriormente, pero que no había sido purificada ni caracterizada.

La D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa se purificó hasta homogeneidad aparente a partir de citosol de hígado de cerdo. El procedimiento comprende las siguientes etapas. 1. Preparación de extracto crudo; 2. Cromatografía en CM-Sephadex; 3. Precipitación con sulfato de amonio entre 45 y 70% de saturación; 4. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa; 5. Cromatografía de filtración en Sephacryl S-300; 6. Cromatografía en hidroxilapatita; 7. Cromatografía de pseudo afinidad en azul-agarosa. La preparación final tiene una actividad específica de  $6,1 \pm 0,7$  unidades/mg (n=6) de proteína. A partir de 300 g de hígado se obtienen mediante este procedimiento  $0,92 \pm 0,3$  mg (n=6) de enzima purificada entre 1500 a 2300 veces, con un rendimiento de  $15 \pm 5\%$ . Las preparaciones presentan una sola banda de proteínas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. La enzima es estable durante por lo menos 4 meses de almacenamiento a 4° C en presencia de EDTA, monotioglicerol y fenilmetilsulfonil-fluoruro.

La masa molecular relativa de la enzima, medida por

cromatografía de exclusión en Sephacryl S-300, es de  $62.000 \pm 1.300$  ( $n=3$ ). Por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio se calculó un valor de  $M_r$  de  $32.100 \pm 900$  ( $n=4$ ), lo que sugiere que la enzima nativa es un dímero de unidades con la misma masa molecular relativa.

Los estudios cinéticos muestran valores de  $K_m$  de 7,5 mM y 0,11 mM para los sustratos D-xilosa y  $NADP^+$  respectivamente. La enzima puede oxidar varios sustratos glucídicos, pero la especificidad (relación  $k_{cat}/K_m$ ) es mucho mayor para D-xilosa. El valor de la constante de especificidad para esta pentosa es 6 y 11 veces mayor que para D-ribosa y L-arabinosa respectivamente, que son aldopentosas que difieren en la orientación de un grupo hidroxilo con respecto a D-xilosa. Este estudio de especificidad sugiere que el mejor sustrato es una pentosa cuya configuración más probable es la de la  $\beta$ -D-xilopiranosas, con orientación ecuatorial de los grupos hidroxílicos de los carbonos 2, 3 y 4. Con respecto a la afinidad por el nucleótido, la enzima es específica para  $NADP^+$ ;  $NAD^+$  no es reducido en presencia de D-xilosa u otras pentosas.

En estudios de velocidad inicial para analizar el efecto de las variaciones de concentraciones de uno de los sustratos D-xilosa y  $NADP^+$  a concentración constante del otro sobre la actividad de la enzima las gráficas de dobles recíprocos muestran líneas paralelas. No se efectuaron otros



estudios que pudieran confirmar la sugerencia de un mecanismo ping-pong para la unión de los sustratos a la enzima.

El aislamiento y caracterización de la D-xilosa-deshidrogenasa permitirá la investigación de las vías metabólicas de utilización de la D-xilosa en mamíferos. La existencia de esta vía degradativa hace suponer que la pentosa puede catabolizarse, evitando el ciclo de los pentosas-fosfatos.

## ABSTRACT

The purification and characterization of D-xilose dehydrogenase from pig liver is described. The enzymes had been previously detected in that organ but not purified or characterized.

D-xylose-NADP<sup>+</sup>-dehydrogenase was purified to apparent homogeneity from the cytosol of frog liver. The protocol is as follows: 1. Preparation of crude extracts; 2. CM-Sephadex Chromatography; 3. Ammonium sulfate precipitation at 45-70% saturation; 4. Anionic chromatography in DEAE-cellulose; 5. Exclusion chromatography in Sephacryl S-300; 6. Hydroxyl-apatite chromatography; 7. Pseudo-affinity chromatography in blue 2-agarose. From 300 g of liver tissue  $0.92 \pm 0.3$  mg (n+6) of purified enzyme were obtained with yield of  $15 \pm 5\%$ . The purified enzyme was stable at least during 4 months if stored at 4° in a buffer containing EDTA, monothioglycerol and phenyl-methyl-sulfonyl-flouride.

Specific activities of  $6.1 \pm 0.7$  units/mg (n=6) of protein were observed in the final preparation.

A relative molecular mass of  $62.000 \pm 1300$  (n=4) was obtained by exclusion chromatography on Sephacryl S-300. Polyacrylamide electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate revealed a value of  $32.100 \pm 900$  suggesting that the native enzyme is a dimer of subunit of

similar or identical size.

Kinetic studies showed  $K_m$  values of 7.5 mM and 0.11 mM for D-xylose and  $\text{NADP}^+$ , respectively. The enzyme can oxidise several others sugars but the especificity ( $k_{\text{cat}}/K_m$  ap quotient) is higher for D-xylose than for D-ribose or L-arabinose. These aldopentoses differ from D-xylose in the orientation of one hydroxyl group.

Specificity studies suggest that the best substrate for the enzyme is a pentose whose conformation is  $\beta$ -D-pyranose with equatorial orientation of the hydroxyl groups at carbons 2, 3 and 4. i.e.,  $\beta$ -D-xylopiranose. The enzyme is specific for  $\text{NADP}^+$ ; NAD is not reduced in the presence of D-xylose or other pentoses.

Initial velocity data when D-xylose or  $\text{NADP}^+$  concentrations were varied at fixed concentratioes of the nucleotide or the sugar, respectively, revealed a pattern of parallel lines when expressed as double reciprocal plots. Further studies to confirm this suggested ping-pong mechanism were not performed.

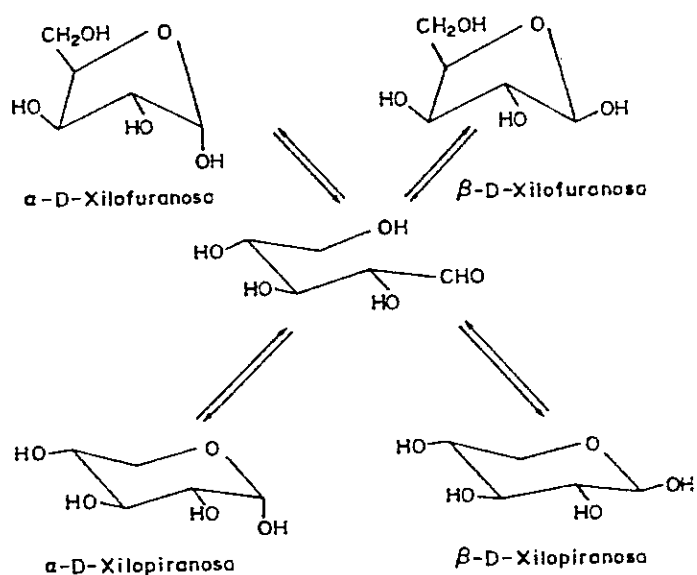
The isolation and characterization of this D-xylose dehydrogenase will allow the investigation of metabolic pathway(s) of xylose utilization in mammals. The presence of D-xylose by a pathway other than the pentose phosphate pathway.

## INTRODUCCION

La pentosa D-xilosa está ampliamente distribuida en la naturaleza (Wissler y Logemann, 1984). Constituye la unidad básica de la hemicelulosa, que es el material estructural más importante de todas las plantas. Es además el componente principal de heteropolisacáridos distribuidos en plantas, bacterias, hongos, algas, tejidos animales y humanos. Participa en la unidad básica de glicosilaminoglucanos unidos a proteínas (proteoglicanos), que son importantes componentes estructurales de membranas y vesículas, así como esqueleto del tejido conectivo y de otros tejidos, particularmente en mamíferos.

La D-xilosa es una aldopentosa cuyas formas anoméricas  $\alpha$ -D-xilopiranososa y  $\beta$ -D-xilopiranososa (Fig. 1) son los isómeros estructurales que se encuentran en mayor proporción (34% y 65% respectivamente) en solución acuosa a 20°C (Angyal y Pickles, 1972). Otros isómeros ( $\alpha$  y  $\beta$ -D-xilofuranosas) existen en proporciones menores al 1%.

Los grupos funcionales del carbono 1 de la D-xilosa son los más reactivos (carbonilo aldehído o hidroxilo hemiacetal y el hidrógeno). La reducción en este carbono produce el meso-xilitol. El producto de la oxidación en el carbono 1 de la D-xilosa, dependiendo de la coexistencia de las formas isoméricas presentes, acíclicas o cíclicas, puede ser

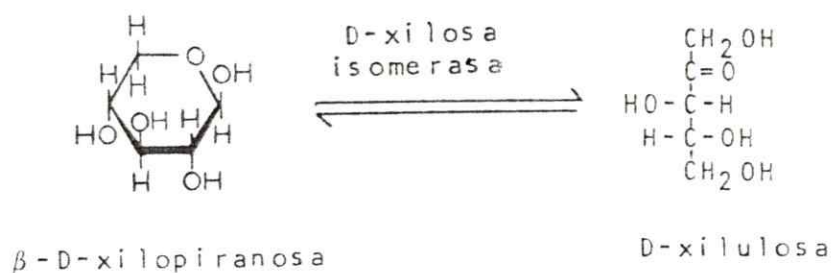


**Figura 1. Estructuras cíclicas D-xilosa.** Se considera que el equilibrio entre las formas  $\alpha$  y  $\beta$  piranósicas y las formas furanósicas ocurre a través de la forma aldehídica o cetónica abierta (polihidroxialdehído). Los anillos piranósidos son las conformaciones que existen en un 99% en agua a 20°C; las furanosas están en proporciones menores al 1%. Todas estas formas son interconvertibles por mutarrotación.

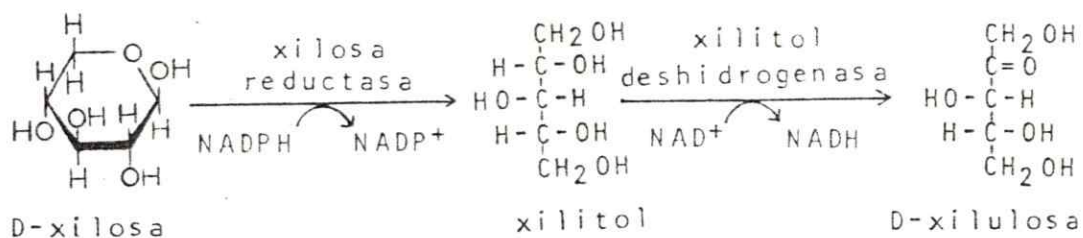
ácido-D-xilónico o D-xilono-lactona, que es rápidamente hidrolizada.

El metabolismo de la D-xilosa en microorganismos se inicia mediante tres tipos de reacciones alternativas (Yamanaka y colaboradores, 1977):

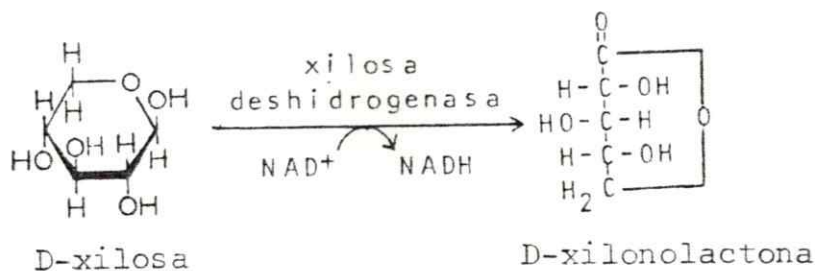
- 1) Isomerización de la D-xilosa a D-xilulosa, catalizada por la D-xilosa-isomerasa



- 2) Reducción de la D-xilosa a xilitol, catalizado por la xilosa-reductasa



3) Oxidación de la D-xilosa a D-xilonolactona por acción de la xilosa-deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$



El producto de las reacciones de isomerización y reducción, D-xilulosa, puede ser fosforilado a D-xilulosa-5-P, intermediario del ciclo de los pentosa-fosfatos.

La oxidación de la D-xilosa ha sido estudiada en numerosos microorganismos (Buchert y colaboradores, 1986), pero la enzima que cataliza esta reacción es poco conocida, a excepción de una D-xilosa-deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  (E.C. 1.1.1.175), inducida específicamente por D-xilosa en cultivos de Arthrobacter sp. (Yamanaka y colaboradores, 1977).

La vía metabólica de oxidación de la D-xilosa a dióxido de carbono en vertebrados es desconocida. Se ha propuesto (Segal y Foley, 1959) que la degradación de las pentosas en hígado de mamíferos ocurre solamente a través del ciclo de los pentosa-fosfatos. Sin embargo, la fosforilación de la D-xilosa por tejidos animales no ha sido demostrada.

La D-xilosa parece metabolizarse en animales por rutas catabólicas que no corresponden al ciclo de las pentosas. Weser y Laster (1968) mostraron que se produce  $^{14}\text{CO}_2$  después de inyectar a cuyes  $[1-^{14}\text{C}]\text{-D-xilosa}$  y que la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  es más rápida al inyectar ácido  $[1-^{14}\text{C}]\text{-D-xilónico}$ . Cortes de tejido (riñón, hígado, corazón y músculo esquelético) oxidan D-xilosa por acción de deshidrogenasas dependientes de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ . Los autores identificaron D-xilonolactona y ácido D-xilónico como productos intermediarios.

Se ha demostrado en mamíferos, la existencia de enzimas que catalizan la oxidación de pentosas libres. Por ejemplo, L-arabinosa- $\text{NAD}^+$ -(D-fucosa, D-galactosa)-deshidrogenasa de hígado de cerdo (Schachter y colaboradores, 1969), D-arabinosa-(L-fucosa)-deshidrogenasa de hígado de cerdo (Maijub y colaboradores, 1973), L-fucosa- $\text{NAD}^+$ -deshidrogenasa de hígado de conejo, activa también sobre D-arabinosa (Endo e Hiyama, 1979).

Además de la D-xilosa-deshidrogenasa ( $\text{NAD}^+$ ) de Arthrobacter (Yamanaka y colaboradores, 1977), se han descrito deshidrogenasas dependientes de  $\text{NADP}^+$  en cristalino de ternero (van Heyningen, 1958) y de cerdo (Wissler y Logemann, 1984), y en hígado de cerdo (Ureta y Radojković, 1970). Estas enzimas han sido solo parcialmente estudiadas, por lo que pareció interesante la purificación y caracterización de la última mencionada.



En esta Tesis se describe un protocolo para la purificación de la D-xilosa-deshidrogenasa-NADP<sup>+</sup> de hígado de cerdo. La preparación final obtenida exhibe una sola banda de proteína por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio. La enzima nativa es un dímero ( $M_r = 62.000$ ) de subunidades iguales o muy similares ( $M_r = 32.000$ ). Si bien la enzima puede actuar sobre otras pentosas, D-xilosa es el sustrato preferente. NAD<sup>+</sup> no es capaz de reemplazar a NADP<sup>+</sup> como aceptor de hidrógenos. Además de consignar los valores de algunas constantes se mostrarán algunas peculiaridades cinéticas de la reacción. Finalmente se intentará una especulación acerca del metabolismo de la D-xilosa en el que la D-xilosa-deshidrogenasa participaría como primera etapa.

El aislamiento y caracterización de la enzima permitirá iniciar la investigación de las vías metabólicas de utilización de la D-xilosa en mamíferos.

## MATERIALES Y METODOS

### I. Materiales

#### Reactivos

De Sigma Chemical Co. Mo. E.E.U.U., se obtuvieron los siguientes reactivos:  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NAD}^+$ , D-xilosa, L-xilosa, D-ribosa, L-arabinosa, D-arabinosa, D-lixosa, D-glucosa, 6-fosfogluconato, glucosa-6-fosfato, D-glucosamina, 2-desoxi-D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-fucosa, L-ramnosa, Tris, acrilamida, bis-acrilamida, glicina, fenazina-metosulfato, azul de nitrotetrazolio, monotioglicerol, dodecil-sulfato de sodio, fenilmetil-sulfonilfluoruro, azul de Coomassie R, azul de Coomassie G, azul-dextrano 2000, y Tritón X-100. De Merck, Darmstadt, Alemania Federal, se obtuvieron: EDTA, cloruro de potasio, cloruro de sodio, ácido clorhídrico, cloruro de magnesio, ácido acético, fosfato monopotásico, metanol, ácido ortofosfórico, ácido cítrico, azul de bromofenol, citrato de sodio. De Polysciences, Washington, E.E.U.U. se obtuvieron TEMED y persulfato de amonio. De J.T. Baker Chemicals, Co., Phillipsburg, se obtuvo sulfato de amonio. De New England Nuclear (Boston, EEUU), se obtuvo  $[^{14}\text{C}]$ -Lisina. De Amersham/Searle Illinois, E.E.U.U., se obtuvieron: 1,4-bis [2-(5-feniloxazolil)] benceno (POPOP) y 2,5-difeniloxazol (PPO).

### Material cromatográfico

DEAE-celulosa microgranular se obtuvo de Whatman, Maidstone, Inglaterra. CM-Sephadex se adquirió de Pharmacia, Uppsala, Suecia. Hidroxilapatita (Bio-Gel HTP) se obtuvo de Bio-Rad Laboratories, California, E.E.U.U. Sephacryl S-300 y Reactive Blue 2-Agarose (azul-agarosa) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Mo. E.E.U.U.

### Proteínas estándares

De Sigma Chemical Co. Mo. E.E.U.U. se obtuvieron las siguientes proteínas: alcohol-deshidrogenasa de levadura, aldolasa de músculo de conejo, ovoalbúmina, mioglobina, citocromo c de corazón de caballo. Para la determinación de masas moleculares relativas por electroforesis con SDS se usaron: fosforilasa b, albúmina de bovino, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y lisozima, obtenidas también de Sigma Chemical.

### Material biológico

Se utilizó hígado de cerdo que se obtenía fresco en el Matadero Industrial San Joaquín S.A. El órgano se extraía entre 10 a 15 minutos después de sacrificado el animal y se mantenía sumergido en hielo mientras era trasladado al labora-

torio. La preparación de los extractos crudos se iniciaba en un tiempo no superior a 1 hora después de la extracción del órgano.

## II. Métodos

### Medición de la actividad enzimática

La actividad D-xilosa-deshidrogenasa se ensayaba por medición de la velocidad de reducción de  $\text{NADP}^+$  a 340 nm en un espectrofotómetro Zeiss termorregulado a 30°C. El medio de reacción contenía en un volumen de 0,5 ml: amortiguador Tris-HCl 85 mM pH 7,5, KCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  12,6 mM, EDTA 1,6 mM,  $\text{NADP}^+$  0,5 mM, D-xilosa 100 mM y 0,02-0,1 ml de solución de enzima (Ureta y Radojković, 1970). El mismo sistema sin D-xilosa se utilizaba como blanco.

La actividad de la enzima también era detectada después de la electroforesis en geles de poliacrilamida (descrito en la sección electroforesis). Para teñir la actividad enzimática se incubaban los geles en un medio similar al empleado en el ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática, excepto que se adicionaba fenazina-metosulfato (0,04 mg/ml) y azul de nitrotetrazolio (0,4 mg/ml).

Una unidad de enzima corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 mol de  $\text{NADP}^+$  en 1

min a 30°C. en las condiciones descritas. Para el cálculo se utilizaba el coeficiente de extinción molar de NADPH que es  $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$  a 340 nm para cubetas de un centímetro de paso de luz.

La unidad de enzima también puede ser expresada en Katal (cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato en producto por segundo), teniendo presente que la relación con la Unidad Internacional es la siguiente:

1 katal =  $6 \times 10^7$  unidades internacionales; 1 Unidad Internacional = 0,016667 microkatales.

#### Purificación de D-xilosa-deshidrogenasa

Para el aislamiento y purificación de la D-xilosa-deshidrogenasa se aplicaron varias técnicas cromatográficas y fraccionamiento con sulfato de amonio. El procedimiento de purificación que se describirá es el resultado de numerosos ensayos en los que se varió el orden de las distintas etapas, las condiciones de pH, los tamaños de las columnas, la fuerza iónica de la solución de homogeneización y del gradiente de concentración para la elución de la enzima desde las columnas cromatográficas. La precipitación con sulfato de amonio fue ensayada a diferentes porcentajes de saturación y se determinó en qué etapa de la purificación resultaba mejor la aplicación de esta técnica.

A menos que se especifique otra condición, todas las etapas del procedimiento de purificación de la enzima se realizaron a 4°.

La purificación de la enzima se realizó en 7 etapas, correspondiendo la etapa 1 a la preparación de extractos crudos.

#### **Etapa 1: Preparación de extractos crudos**

El hígado de cerdo era homogeneizado en una licuadora Omni Mixer (Sorvall), en una solución que contenía Tris-HCl 5 mM pH 8,5, EDTA 1 mM, monotioglicerol 10 mM y fenilmetil-sulfonilfluoruro 1 mM (solución A), en una relación 1:1 peso de tejido : volumen de solución. En esta solución se obtenía la máxima estabilidad de la enzima. El homogeneizado se centrifugaba a  $105.000 \times g$  durante 60 min en una ultracentrífuga preparativa Beckman L5-50B. La actividad de la enzima D-xilosa deshidrogenasa se medía en el líquido sobrenadante.

#### **Etapa 2: Cromatografía en CM-Sephadex**

CM-Sephadex se suspendía en 20 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 5 mM pH 8,5, EDTA 1 mM y la suspensión resultante se dejaba en reposo al menos por 4 hr. Posterior-

mente se eliminaban burbujas de aire mediante la aplicación de vacío por medio de una bomba durante una hora. La suspensión se empacaba en una columna (habitualmente de 4,5 cm de diámetro por 38 cm de altura; 600 ml capacidad) que se equilibraba con la solución A.

El líquido sobrenadante (aproximadamente 600 ml), resultante de la centrifugación a  $105.000 \times g$  ( $S_1$ ) se hacía pasar por la columna. La enzima no es retenida en estas condiciones y se colectaba en una sola fracción hasta secar la columna, obteniéndose aproximadamente 400 ml ( $S_{1CM}$ ).

### Etapas 3: Precipitación con sulfato de amonio

La solución de enzima que provenía de la etapa 2 se diluía para obtener una concentración de 12 mg de proteína/ml. Posteriormente se agregaba sulfato de amonio en pequeñas cantidades hasta completar 25,8 g por cada 100 ml de  $S_{1CM}$  con agitación suave a  $0^\circ C$ . El pH se mantenía en 8,5 con hidróxido de amonio 5%. Después de una hr se centrifugaba en centrífuga Sorvall a  $16.300 \times g$  durante 30 min y se descartaba el sedimento. Al sobrenadante resultante se le adicionaba sulfato de amonio (15,6 g/100 ml). Después de 6 horas se centrifugaba en las mismas condiciones antes descritas. Se descartaba el líquido sobrenadante y el sedimento se disolvía en el menor volumen posible de solución A (aproximadamente 35 ml). Se recuperaba el 100 de la activi-

dad enzimática inicial. La solución se dializaba contra solución A.

La precipitación con sulfato de amonio, aumentaba aproximadamente 3 veces la actividad específica.

#### Etapa 4: Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

45 ml de la preparación dializada proveniente de la etapa 3, se hacían penetrar en una columna de DEAE-celulosa de 4,5 cm de diámetro por 38 cm de altura, equilibrada con solución A (la preparación y regeneración de la DEAE-celulosa se detallan en el Anexo 1 "Preparación de DEAE-celulosa"). La columna se lavaba con 2 litros de la misma solución. La enzima retenida se eluía mediante un gradiente lineal de KCl entre 0 y 200 mM, preparado en la solución A, en un volumen total de 2 litros. Se colectaban fracciones de 20 ml. El 90% de la actividad enzimática total sembrada en la columna fue eluida entre 12 y 25 mM de KCl. Se combinaban aquellas fracciones con más altos niveles de actividad enzimática. El volumen resultante se reducía a un volumen entre 4 y 5 ml por concentración en un aparato de filtración Amicon con membrana PM 10.

#### Etapa 5: Cromatografía de filtración en Sephacryl S-300

La cromatografía en Shephacryl S-300 se utilizaba con



finés de purificación de la D-xilosa-deshidrogenasa y con fines analíticos para la determinación de masas moleculares relativas. Para ambos propósitos el método fue esencialmente el mismo.

Para la preparación de esta cromatografía se utilizaba una suspensión de Sephacryl S-300 previamente hidratado con agua destilada. Se equilibraba el gel con solución A a la que se agregaba KCl 100 mM, y se empacaba en una columna de vidrio de 2,5 cm de diámetro por 75 cm de altura.

Para el procedimiento de purificación se colocaban en la columna entre 4 a 4,5 ml de solución concentrada obtenida en la etapa 4. Se eluía la enzima con la solución A y se colectaban fracciones de 2 ml con un flujo de 0,5 ml/min. En el eluido se medía la actividad enzimática y la absorbancia a 280 nm. Se seleccionaban y combinaban las fracciones con mayor actividad enzimática. El volumen resultante, se reducía a 5 ml por concentración en Amicon PM 10 y luego se dializaba contra la solución A.

#### Etapa 6: Cromatografía en hidroxilapatita

La hidroxilapatita se mezclaba con igual peso de celulosa en 5 volúmenes de agua desionizada y se dejaba decantar. Las partículas finas se eliminaban por succión y luego se agregaban nuevamente 5 volúmenes de agua y se

repetía el procedimiento hasta descartar la mayor cantidad posible de estas partículas finas. Posteriormente la hidroxilapatita se suspendía en Tris-HCl 5 mM pH 8,5 y EDTA 1 mM.

La solución enzimática dializada resultante de la etapa 5 se cromatografiaba en una columna (1,3 cm x 17,5 cm) previamente equilibrada con la solución A. La actividad xilosa-deshidrogenasa es retenida en estas condiciones. La columna se lavaba con 200 ml del mismo amortiguador. La enzima se eluía mediante un gradiente lineal de fosfato de potasio pH 8,0 entre 1 y 50 mM con un volumen total de 340 ml. Se colectaban fracciones de 2,8 ml. Se medían la actividad enzimática y la absorbancia a 280 nm. Se seleccionaban y juntaban las fracciones con mayor actividad enzimática y el volumen resultante se reducía en el mismo aparato concentrador descrito en las cromatografías anteriores, y luego se dializaba contra la solución A.

#### **Etapa 7: Cromatografía de pseudo-afinidad en azul-agarosa**

Para la preparación de la cromatografía de pseudo-afinidad se utilizaba azul-agarosa previamente hidratada y posteriormente equilibrada con solución A.

La solución dializada de la Etapa 6 se colocaba en una columna de azul-agarosa (0,7 x 12cm) previamente equili-

brada con la solución A. Toda la actividad enzimática es retenida en estas condiciones. La columna se lavaba luego con 40 ml de KCl 150 mM en la misma solución. La enzima se eluía con  $\text{NADP}^+$  1 mM en la solución A. Se colectaban fracciones de 1 ml. Se medía la actividad enzimática y se determinaba la concentración de proteínas en cada fracción como también en la mezcla de las fracciones seleccionadas.

#### Control de pureza

La pureza de las fracciones obtenidas se analizaba por electroforesis en placas de gel con SDS, preparadas con un gradiente de acrilamida entre 6% y 20%, de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970). También se usaba la electroforesis en placas de poliacrilamida en ausencia de SDS según el método de Davis (1964). Se utilizaban las mismas concentraciones de acrilamida. El detalle de estas técnicas está descrito más adelante en la sección electroforesis.

#### Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinaba por uno de dos procedimientos:

1. En las fracciones resultantes de las diferentes cromatografías utilizadas, los niveles aproximados de proteínas se

determinaban por medición de la absorbancia a 280 nm.

2. La concentración de proteínas de las soluciones obtenidas del conjunto de las fracciones seleccionadas después de cada cromatografía se determinaba por el micrométodo de Bradford (1976). Para calcular la concentración de proteínas, se confeccionó una curva de calibración con soluciones de ovoalbúmina a diferentes concentraciones entre 0 y 100  $\mu\text{g}$  proteína/ml.

#### Determinación de la concentración de sales en solución

Las concentraciones de KCl de las fracciones eluidas desde las columnas cromatográficas de DEAE-celulosa y las concentraciones de fosfato de las fracciones eluidas desde las columnas de hidroxilapatita, se determinaban utilizando un conductímetro Radiometer, calibrado con soluciones estándares de KCl pH 8,5 y fosfato de K pH 8,0 respectivamente.

#### Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS 0,1% se realizaba en un instrumento Bio-Rad (Protean Dual Vertical Slab Gel Electrophoresis cell). Se utilizaban placas de 140 mm de ancho por 100 mm de largo y 1,2 mm de espesor. Las placas se preparaban con un gradiente lineal de acrilamida desde 6 a 20% y un porcentaje constante,

0,8%, de bisacrilamida. El sistema de amortiguadores que se utilizaba como también la tinción de bandas de proteínas correspondían al método descrito por Laemmli (1970). La preparación de los geles y las soluciones que se utilizaban están descritas con detalle en el Anexo 2 "Electroforesis en geles de poliacrilamida".

A un volumen de muestra, que contenía entre 5 a 25  $\mu\text{g}$  de proteína, dependiendo de la etapa de purificación que se analizaba se le adicionaba un volumen de la mezcla desnaturalante (SDS 5%; 2-mercaptoetanol 10%; Tris HCl 75 mM, pH 6,8; Glicerol 20%) e inmediatamente se sometía a baño María hirviente durante 5 min. Luego se enfriaba y se agregaban 5  $\mu\text{l}$  de una solución de azul de bromofenol al 0,04% y se sembraba en la placa de poliacrilamida. La solución de los electrodos corresponde al amortiguador Tris glicina 375 mM pH 8,3 (solución D). La electroforesis se hacía habitualmente a voltaje constante; se mantenía a 80 voltios hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol) migraba al inicio del gel separador y se mantenía a 160 voltios, hasta que el colorante migraba al final del gel (generalmente en 6 horas). Durante el desarrollo de la electroforesis se mantenía una temperatura de 18°C. Una vez terminada la electroforesis se retiraba el gel de las placas de vidrio y se fijaba por inmersión en una solución de metanol 46% y ácido acético 8%.

La tinción de proteínas se hacía por incubación del

gel durante 12 horas en solución de azul brillante de Coomassie R-250 0,2% en metanol al 46% y ácido acético 8%. Los geles se destañan hasta fondo claro con cambios sucesivos de una solución acuosa que contenía 12% de ácido acético y 5% de metanol.

#### Electroforesis en gel de poliacrilamida en ausencia de SDS

La electroforesis sin SDS se hacía en placas de poliacrilamida preparadas con un gradiente lineal de acrilamida entre 6 y 20%. La metodología utilizada para la obtención de estas placas es idéntica a la descrita para los geles con SDS (ver Anexo 2). Las soluciones y proporciones son las mismas, excepto que la solución F (SDS) era reemplazada por igual volumen de agua desionizada.

Para el desarrollo de la electroforesis se colocaban en la placa entre 5 a 20  $\mu\text{g}$  de proteína, en triplicado. A un volumen de muestra se le agregaba un volumen de sacarosa 40% o glicerol 20% y 5  $\mu\text{l}$  de azul de bromofenol 0,04%. La cámara electroforética está conectada por agua circulante a un baño refrigerante que se mantiene a 4°C. La solución de los electrodos corresponde al amortiguador Tris-glicina pH 8,3 (esta solución contiene 0,6 g de Tris y 2,88g de glicina por litro de agua desionizada). Al iniciar la electroforesis se aplicaba un voltaje constante de 200 voltios, el que se

aumentaba a 300 voltios en el momento que el colorante de referencia había migrado hasta el gel separador.

Una vez terminada la electroforesis y retirada la placa de poliacrilamida se procedía a cortar el gel en tres partes, conteniendo cada una de ellas la misma(s) proteína(s). Cada una de estas secciones del gel se sumergía en diferentes medios de incubación que permitían la tinción de la actividad enzimática y de la proteína.

La tinción de proteína se efectuaba por incubación del gel durante una hr en solución de azul brillante de Coomassie R 0,25% en metanol 45% y ácido acético 9%. Posteriormente se desteñía hasta fondo claro con cambios sucesivos de solución acuosa con ácido acético 7,5% y metanol 5%.

Para la tinción de la actividad enzimática se incubaba el gel en un medio igual al descrito para el ensayo espectrofotométrico de actividad enzimática, pero adicionando fenazina-metosulfato (0,04 mg/ml) y azul de nitrotetrazolio (0,4 mg/ml). Otra sección del gel se incubaba en la misma solución recién descrita, pero en ausencia de D-xilosa.

#### Determinación de la masa molecular relativa

La masa molecular relativa de la enzima nativa se determinaba por medio de filtración analítica en columnas de Sephacryl S-300 calibrada con proteínas de masa molecular

relativa conocida, aplicando la metódica de Andrews (1964).

Para la cromatografía se utilizaba la misma columna usada con fines preparativos descrita en el protocolo de purificación de D-xilosa-deshidrogenasa. Las soluciones de equilibrio y elución eran las mismas.

La concentración de proteínas de referencia (aldolasa, alcohol-deshidrogenasa, ovoalbúmina, mioglobina y citocromo c era de 1,5 mg/ml. Se sembraba la columna con 3 ml de cada solución de proteína. Igual volumen se usaba para la proteína problema con 0,3 unidades/ml de actividad.

El volumen de exclusión ( $V_o$ ) se determinaba usando azul-dextrano 2000 y el volumen total accesible al solvente ( $V_i$ ) se determinaba usando [ $^{14}\text{C}$ ]-lisina (200.000 cpm).

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

Aldolasa, ovoalbúmina y mioglobina se detectaban midiendo la absorbancia a 280 nm. Citocromo c y azul-dextrano por la absorbancia a 414 nm y 630 nm, respectivamente; la alcohol-deshidrogenasa se medía en una mezcla de reacción



que contenía: amortiguador fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 5 mM; etanol 220 mM y  $\text{NAD}^+$  0,5 mM. La  $[^{14}\text{C}]$ -lisina se medía en un contador de centelleo Phillips DW 4503, en una mezcla de centelleo que se preparaba agregando 2 partes de una solución que contenía 50 mg de POPOP y 4 g de PPO en un litro de tolueno, más una parte de Tritón X-100. La xilosa-deshidrogenasa se determinaba por el método descrito en la sección "Medición de la actividad enzimática".

La determinación de la masa molecular relativa de la enzima desnaturada se realizaba por el método de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, aplicando la técnica en placas de acrilamida en gradiente entre 6 y 20%, descrita en la sección electroforesis con SDS.

Habitualmente se sembraban en el gel de poliacrilamida entre 5 y 10  $\mu\text{g}$  de proteínas. En canales paralelos se sembraba una mezcla de proteínas de masa molecular relativa conocida que tenía: fosforilasa b, albúmina de bovino, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y lisozima.

Para la estimación de la masa molecular relativa de la D-xilosa-deshidrogenasa, se confeccionó un gráfico de la movilidad electroforética relativa en función de la masa molecular relativa de las proteínas estándares.

### Caracterización cinética

El efecto de la concentración de los sustratos en la actividad enzimática fue analizada midiendo las velocidades iniciales de reacción y variando la concentración de cada sustrato a diferentes concentraciones fijas del otro sustrato. Los datos de velocidad inicial son presentados en gráficas convencionales de dobles recíprocos (Lineweaver y Burk, 1934), con los cuales se confeccionaban las gráficas secundarias y se calculaba el valor de la constante de Michaelis ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ).

En el estudio de especificidad de la D-xilosa deshidrogenasa se utilizaron 16 sustratos, además de la D-xilosa. En el caso de sustratos que presentaban una  $V_{max}$  relativa mayor que un 10% de la  $V_{max}$  con D-xilosa, se determinaron los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  ap con el método gráfico de Eisenthal y Cornish-Bowden (1974). Se determinaba la constante de especificidad de acuerdo a la relación  $k_{cat}/K_m$  de Brot y Bender (1969).

Para estudiar la influencia del pH sobre la actividad enzimática se preparaba una escala de pH entre 4,6 y 9,0, utilizando tres tipos de soluciones amortiguadoras (Dawson, 1972): citrato 50 mM (pH 4,6 a 6,5); fosfato 50 mM (pH 5,8 a 8,0) y Tris 85 mM (pH 7,2 a 9,0)

### Análisis estadísticos de los resultados

El análisis de los resultados cinéticos con los diferentes sustratos se hizo a través de métodos gráficos, empleando las transformaciones lineales de la Lineweaver y Burk (1934) y sus respectivos gráficos secundarios. Todas las líneas de regresión fueron calculadas por el método de los mínimos cuadrados.

Los resultados de la purificación y masa molecular relativa de la D-xilosa-desidrogenasa se expresan con el valor de la media y su desviación estandar (D.S.) de acuerdo a la fórmula:

$$D.S. = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

## RESULTADOS

### 1

#### Purificación de D-xilosa-deshidrogenasa de hígado de cerdo

El protocolo para la purificación de D-xilosa-deshidrogenasa que se presenta en esta Tesis es el resultado de numerosos ensayos (que no se describirán), en los que se estudiaron variadas condiciones para cada una de las etapas, como también el orden en que éstas se utilizaron. El protocolo final se ha repetido en 7 preparaciones con esencialmente los mismos resultados.

##### A. Estabilidad de la enzima durante la purificación

Se ensayaron varias condiciones que permitieran máxima estabilidad y reproducibilidad en los experimentos. Ambas se logran utilizando una solución amortiguadora pH 8,5 (solución A, preparada como se detalla en la sección correspondiente a preparación de extractos crudos en Métodos), tanto en la etapa de homogeneización como en todas las etapas siguientes de la purificación. Las preparaciones de enzima guardadas a 4° conservan la actividad inicial por varios meses.

## B. Etapas de la purificación

### Etapa 1. Preparación de los extractos crudos

Los homogeneizados de hígado de cerdo se obtenían a partir de 300 g de tejido. La actividad de la D-xilosa-deshidrogenasa en la fracción citosólica  $S_1$  (sobrenadante resultante de la centrifugación del homogeneizado a  $105.000 \times g$ ), puede estimarse en  $0,18 \pm 0,04$  unidades/g de tejido promedio y D.S. de 7 preparaciones) con una actividad específica de  $0,0042 \pm 0,0012$  unidades/mg de proteína. La concentración de proteínas de la fracción era  $49,1 \pm 2,0$  mg/ml.

### Etapa 2. Cromatografía en CM-Sephadex

La fracción  $S_1$  ( $279 \pm 13$  ml,  $n=7$ ) se filtraba por CM-Sephadex. La actividad enzimática no es retenida, obteniéndose una fracción  $S_{1CM}$  ( $374 \pm 13$  ml) que contenía  $16,5 \pm 1,9$  mg proteína/ml. La recuperación de la actividad enzimática fluctuaba entre 110 y 135% de la actividad sembrada, con una actividad específica de  $0,011 \pm 0,002$  unidades/mg proteína, que representa un aumento de aproximadamente 3 veces con respecto a la fracción  $S_1$ . En esta etapa se eliminan hemoproteínas, visibles por su color rojo, que quedaban retenidas.

### Etapa 3. Precipitación con sulfato de amonio

La actividad enzimática precipita entre 45 a 70% de saturación. La resuspensión del precipitado en un mínimo volumen de solución A, logra un aumento de la actividad específica a  $0,031 \pm 0,0035$  unidades/mg de proteína, con una purificación de 10 veces en relación a  $S_1$ . Se recupera toda la actividad enzimática.

### Etapa 4. Cromatografía en DEAE-celulosa

La cromatografía en DEAE-celulosa de la preparación obtenida en la etapa anterior retiene el 90% de la actividad enzimática sembrada en la columna. Esta actividad era eluída con KCl en un gradiente lineal entre 0 y 200 mM. En el perfil cromatográfico de la figura 2 se observa que la actividad enzimática eluye en un solo pico, a concentraciones entre 12 y 25 mM de KCl. En las fracciones seleccionadas y combinadas se obtiene un  $60 \pm 17\%$  de la actividad total de la fracción citosólica, con una actividad específica de  $0,17 \pm 0,04$  unidades/mg proteína lo que representa un aumento de aproximadamente 45 veces con respecto a  $S_1$ .

### Etapa 5. Cromatografía de exclusión en Sephacryl S-300

La solución enzimática resultante de la etapa anterior fue sometida a filtración en Sephacryl S-300. La figura 3 muestra que la actividad D-xilosa-deshidrogenasa eluye en

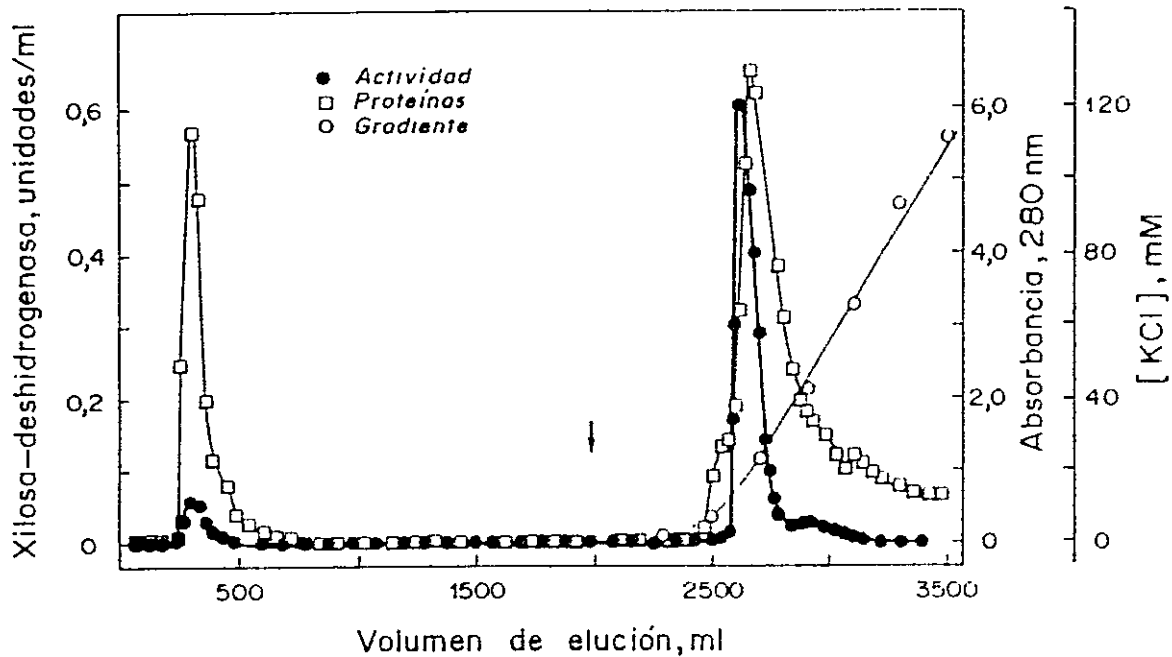
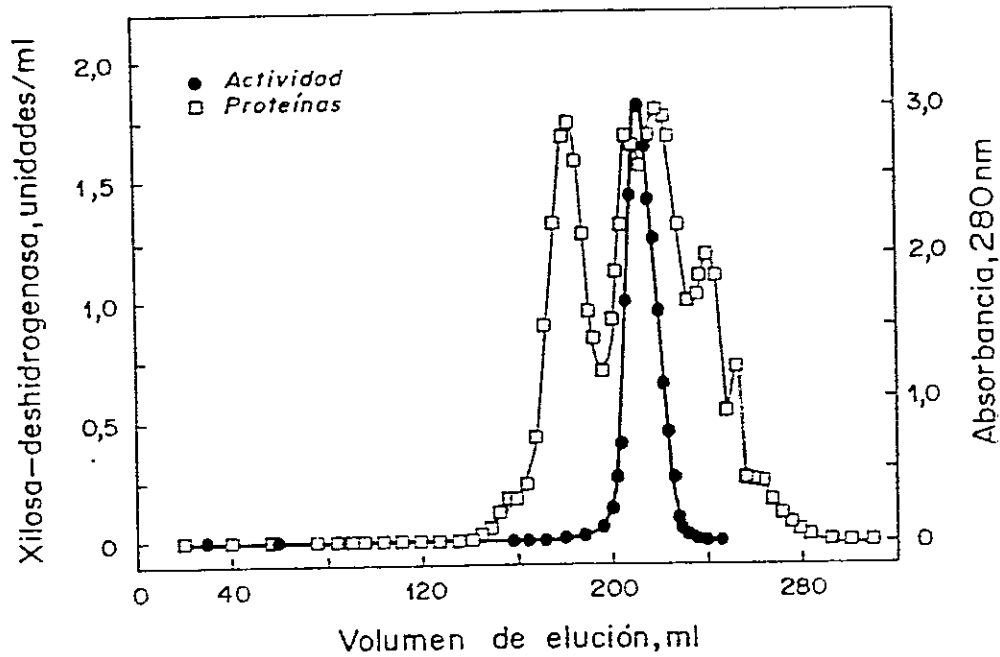


Figura 2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. En una columna de 38 cm de altura por 4,5 cm de diámetro de DEAE-celulosa equilibrada con solución A (ver Métodos), se colocaron 45 ml de la preparación dializada obtenida en la etapa 3. La solución contenía 72 U de D-xilosa deshidrogenasa y 2.740 mg de proteínas. La columna se lavó con 2 L de solución A. A partir de este volumen de elución se desarrolló un gradiente lineal de concentración de KCl (indicado con la flecha) formado por 1 L de solución A y 1 L de la misma solución pero con KCl 200 mM. Se colectaron fracciones de 20 ml y se seleccionaron los volúmenes eluidos de los 3 tubos con más alta actividad enzimática, recuperándose en ellos el 47% de las unidades de enzima colocadas.



**Figura 3.** Filtración en Sephacryl S-300. En una columna de 75 cm de altura por 2,5 cm de diámetro empacada con Sephacryl S-300 y equilibrada con solución A, se colocaron 4 ml de la preparación que provenía de la cromatografía en DEAE-celulosa. La solución contenía 28 unidades de D-xilosa-deshidrogenasa y 196 mg de proteínas. Se eluyó la enzima con la solución A y se colectaban fracciones de 2 ml.



un solo pico simétrico, separada de varios picos de proteínas de mayor y menor tamaño molecular. La actividad específica de la solución que resultaba de la mezcla de las fracciones con mayor actividad fue  $0,35 \pm 0,036$  unidades/mg de proteína, con un rendimiento de  $33 \pm 10\%$  en relación a la actividad total de  $S_1$ .

#### Etapa 6. Cromatografía en hidroxilapatita

La cromatografía en hidroxilapatita de la solución enzimática que se obtenía en la etapa 5, retiene toda la actividad enzimática sembrada. Al conectar el gradiente lineal de fosfato de K pH 8,0, la enzima eluye entre 10 y 18 mM (figura 4). La actividad específica promedio de las fracciones seleccionadas fue  $1,8 \pm 0,4$  unidades/mg proteína con un rendimiento de  $23 \pm 7\%$  en relación a  $S_1$ . Esta etapa cromatográfica permitía purificar la enzima aproximadamente 400 veces.

#### Etapa 7. Cromatografía de pseudo-afinidad en azul-agarosa

La solución que provenía de la cromatografía en hidroxilapatita, se cromatografiaba en una columna de azul-agarosa. Toda la actividad enzimática es retenida aún después de la lavar con HCl 150 mM. La enzima es eluída con  $\text{NADP}^+$  1 mM (figura 5). La preparación final presenta una actividad

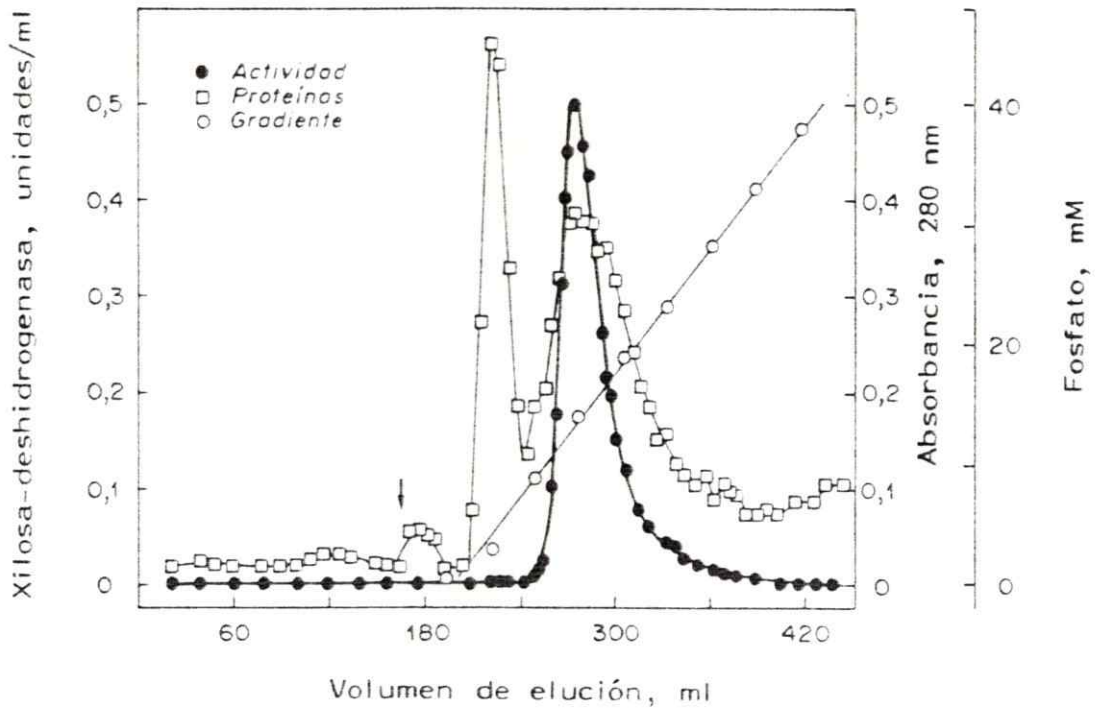


Figura 4. Cromatografía en hidroxilapatita. En una columna de 17,5 cm de altura por 1,3 cm de diámetro de hidroxilapatita equilibrada con solución A, se colocaron 5 ml de solución enzimática concentrada que provenía la filtración en Sephacryl S-300. La solución contenía 16 unidades de D-xilosa deshidrogenasa y 39,5 mg de proteínas. La columna se lavó con 175 ml de solución A. A partir de este volumen se conectó un gradiente lineal formada por 170 ml de fosfato de K1 mM pH 8,0 y 170 ml de la misma solución pero a una concentración de 50 mM. Se colectaron fracciones de 2,8 ml.

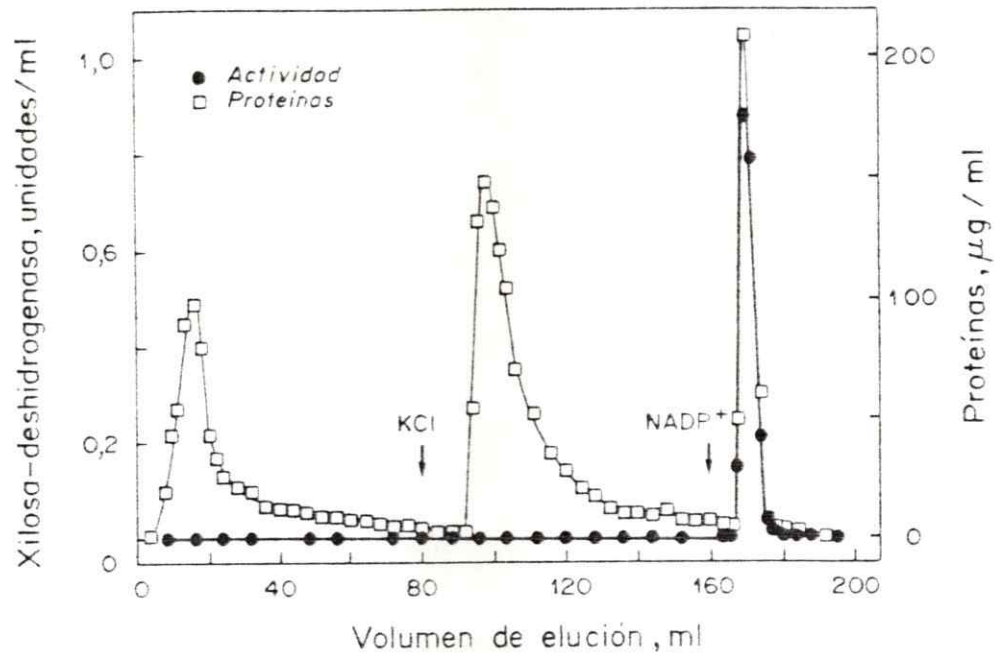


Figura 5. Cromatografía de pseudo-afinidad en azul-agarosa. En una columna de 12 cm de altura por 0,7 cm de diámetro de azul-agarosa equilibrada con solución A, se colocaron 3 ml de la preparación enzimática concentrada proveniente de la cromatografía en hidroxilapatita. La solución contenía 9 unidades de D-xilosa-deshidrogenasa con 11,6 mg de proteína. La columna se lavó con 80 ml de la solución A, se continuo lavando con 80 ml de la misma solución pero con KCl 150 mM. La enzima fué eluida con  $\text{NADP}^+$  1 mM preparado en la solución A. Se colectaron fracciones de 2 ml por tubo. Se recuperó 82% de las unidades colocadas.

específica de  $6,1 \pm 0,7$  unidades/mg proteína ( $n=6$ ) con un rendimiento de  $14,9 \pm 5\%$  en relación a la solución inicial  $S_1$ .

#### C. Tabla de purificación

Un protocolo típico que resume el método de purificación de la D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa de hígado de cerdo, se muestra en la Tabla I. Mediante este procedimiento se logra obtener  $0,92 \pm 0,3$  mg de una enzima purificada 1500 a 2300 veces. Este protocolo puede completarse en 7 días de trabajo y resulta en una preparación homogénea y estable. El aumento del rendimiento total, en las etapas CM-Sephadex y sulfato de amonio, sobre el 100% en relación a  $S_1$  se debería a que probablemente se han eliminado proteínas que inhibirían la actividad de la D-xilosa-deshidrogenasa.

#### D. Control de pureza de las preparaciones

El control de pureza de las diferentes preparaciones de D-xilosa-deshidrogenasa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, usando como base la metodología de Laemmli (1970) para los geles con SDS y el método de Davis (1964) para la electroforesis en condiciones nativas. La electroforesis con dodecilsulfato de sodio muestra una banda de proteína (figura 6). La figura 6 muestra además las bandas de proteínas que se tiñen en las preparaciones de las últimas etapas de purificación.

Tabla I

Purificación de D-xilosa-deshidrogenasa de hígado de cerdo\*

Etapa	Volumen ml	Protefnas totales mg	Unidades		Actividad Específica U/mg	Rendimiento		Purificación
			Totales	Etapa		Total	%	
1 S <sub>1</sub>	298	15.347	47	100	0,0031	100	100	
2 CM--Sephadex	400	5.416	62	132	0,012	132	132	4
3 Sulfato Amonio (45-70)	33	2.010	70	113	0,035	113	149	11
4 DEAE-- celulosa	100	276	43	61	0,15	61	91	48
5 Sephacryl S-300	25	71	24	56	0,34	56	51	110
6 Hidroxil-- apatita	68	9.5	14,6	61	1,54	61	31	497
7 Azul-- agarosa	4,2	1,4	9,9	68	7,1	68	21	2.290

\*El procedimiento de purificación está descrito con detalle en Métodos.



**Figura 6.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en placas formadas por un gradiente de acrilamida entre 6 y 20%. El procedimiento se describe en Métodos. Los canales 1 y 2 contienen 10 y 5  $\mu\text{g}$  de enzima. Las bandas del canal 3 corresponden a una solución de proteínas proveniente de la cromatografía en hidroxilapatita. En el canal 4 se sembró una preparación que muestra impurezas. Las bandas del canal 5 corresponden a proteínas estándares: fosforilasa b, albúmina de bovino, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina y lisozima. A la derecha en este mismo orden se indican los valores de la masa relativa ( $M_r$ ).

\*D-xilosa deshidrogenasa (Ver figura 9)

La preparación homogénea (una banda en poliacrilamida-SDS) se sembró en geles convencionales sin SDS, preparados en un gradiente de acrilamida entre 6 y 20%. La tinción de proteínas revela varias bandas, una de las cuales (la de menor movilidad) muestra intensa actividad enzimática (figura 7). Este resultado sugiere que la proteína nativa, en las condiciones de la electroforesis, podría encontrarse en varios estados de agregación, correspondiendo a uno de ellos la forma activa de la enzima. Algunos experimentos realizados (cuyos resultados no se informan), como la elución desde el gel de poliacrilamida de la banda de menor movilidad y sometida nuevamente al mismo tipo de electroforesis, no fueron suficientes para confirmar esta especulación sobre los distintos estados de agregación de la proteína.

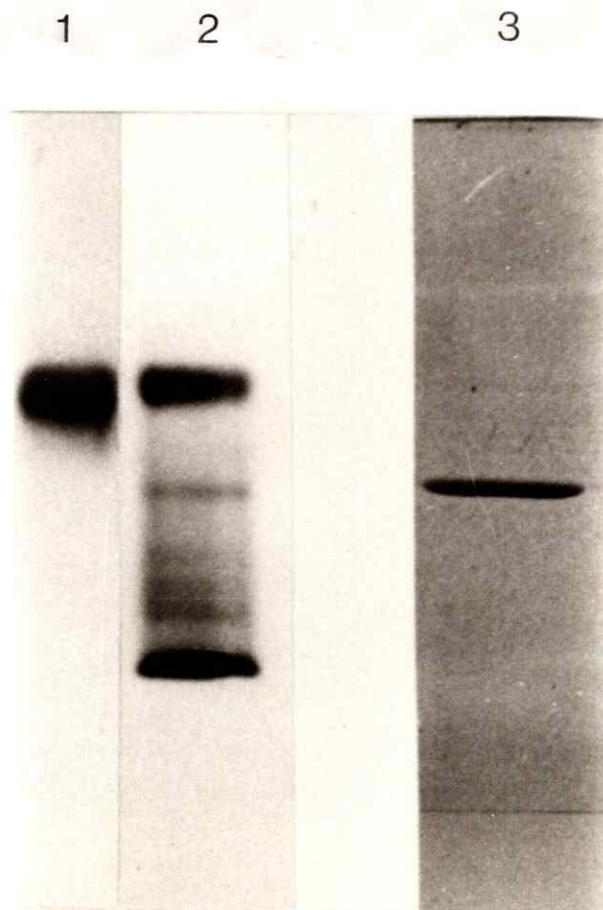


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida de D-xilosa-deshidrogenasa en condiciones nativas. En el canal 1 el gel se tiñó la actividad enzimática. En el canal 2 la tinción se realizó con azul de Coomasie. La preparación de enzima es la misma que revela una banda en la electroforesis con SDS (gel 3) .



## Caracterización de la D-xilosa-deshidrogenasa de hígado de cerdo

### A. Caracterización estructural

El valor para la masa molecular relativa de la enzima pura en condiciones nativas medida por filtración analítica en Sephacryl S-300 a pH 8,5, de acuerdo al método de Andrews (1964), fue  $62.000 \pm 1.300$  ( $n = 4$ ). La columna fue calibrada con las proteínas de masa molecular relativa conocida que se indican en la figura 8. La actividad enzimática eluía en un pico simétrico. Un experimento similar se realizó con una preparación semipurificada, obteniéndose un valor de 63.800. Se midió además la masa molecular relativa de la enzima pura con la columna equilibrada con la misma solución de homogeneización a pH 7,0. El valor estimado en estas condiciones corresponde a 62.200.

La masa molecular relativa de la D-xilosa-deshidrogenasa por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio, fue de  $32.100 \pm 900$  ( $n = 3$ ) (Figuras 6 y 9).

Los resultados sugieren que la enzima tiene dos subunidades de igual o similar masa molecular relativa.

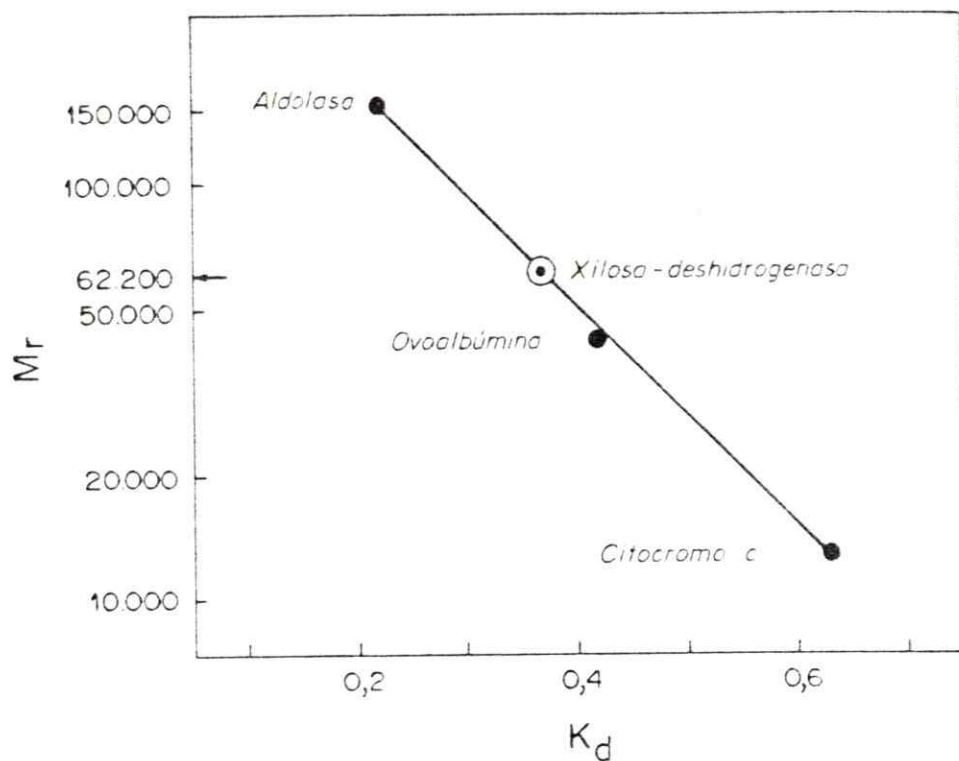


Figura 8. Estimación de la masa molecular relativa de D-xilosa-deshidrogenasa. Relación entre  $K_d$  ( $K_d = (V_e - V_o) / (V_i - V_o)$ ) y el logaritmo de la masa molecular relativa de las proteínas estándares. Se utilizó una columna de Sephacryl S-300 (75 x 2,5 cm). El volumen de la muestra fue de 3 ml y se colectaron fracciones de 3 ml;  $V_o$  162 ml;  $V_i$  366 ml; los volúmenes de elución ( $V_e$ ) para aldolasa ( $M_r$  158.000), ovalbúmina ( $M_r$  43.000), citocromo c ( $M_r$  12.500) y la enzima fueron 207, 246, 291 y 237 ml respectivamente.

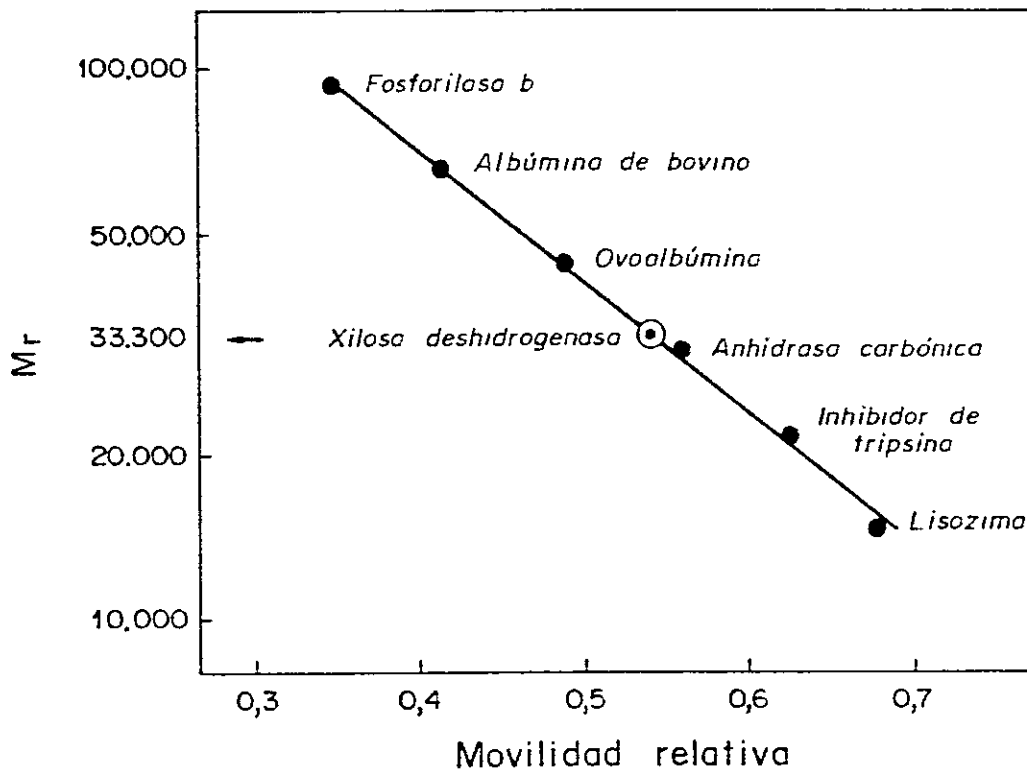


Figura 9. Estimación de la masa molecular relativa de D-xilosa-deshidrogenasa por electroforesis-SDS. Gráfica de la movilidad electroforética relativa en función del logaritmo de la masa molecular relativa de proteínas estándares. Los valores usados de movilidad electroforética se calcularon a partir de los resultados que se muestran en la Figura 6.

## B. Estudios cinéticos

### B.1. Especificidad de sustrato

La actividad de la D-xilosa-deshidrogenasa fue ensayada utilizando varios monosacáridos como sustratos a concentración 100 mM, en presencia de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$  0,5 mM.

Aquellos sustratos que presentaban una velocidad relativa igual o mayor al 10%, con respecto a la obtenida en presencia de D-xilosa, se estudiaron con mayor detalle. Se determinó en estos casos el valor de la  $K_m$  aparente y la constante de especificidad expresada por la razón entre  $k_{\text{cat}}/K_m \text{ ap}$  (Brot y Bender, 1969). Los parámetros  $V_{\text{max ap}}$  y  $K_m \text{ ap}$  fueron calculados mediante el método gráfico de Eisenthal y Cornish-Bowden (1974) y Merino (1974). Algunos ejemplos de estas determinaciones se muestran en la figura 10. Para calcular la constante catalítica ( $k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E_0]}$ ) se estimó la concentración molar de la enzima  $E_0$  utilizando la masa molecular relativa determinada en esta tesis (62.200).

En la Tabla II se presentan los resultados de este estudio de especificidad. La enzima puede oxidar varios sustratos, aunque con menor velocidad y valores de  $K_m \text{ ap}$  mayores que para D-xilosa. El valor de la constante de especificidad ( $K_{\text{esp}} = k_{\text{cat}}/K_m \text{ ap}$ ) sugiere que D-xilosa es el mejor sustrato. En efecto, D-ribosa y L-arabinosa (que tam-

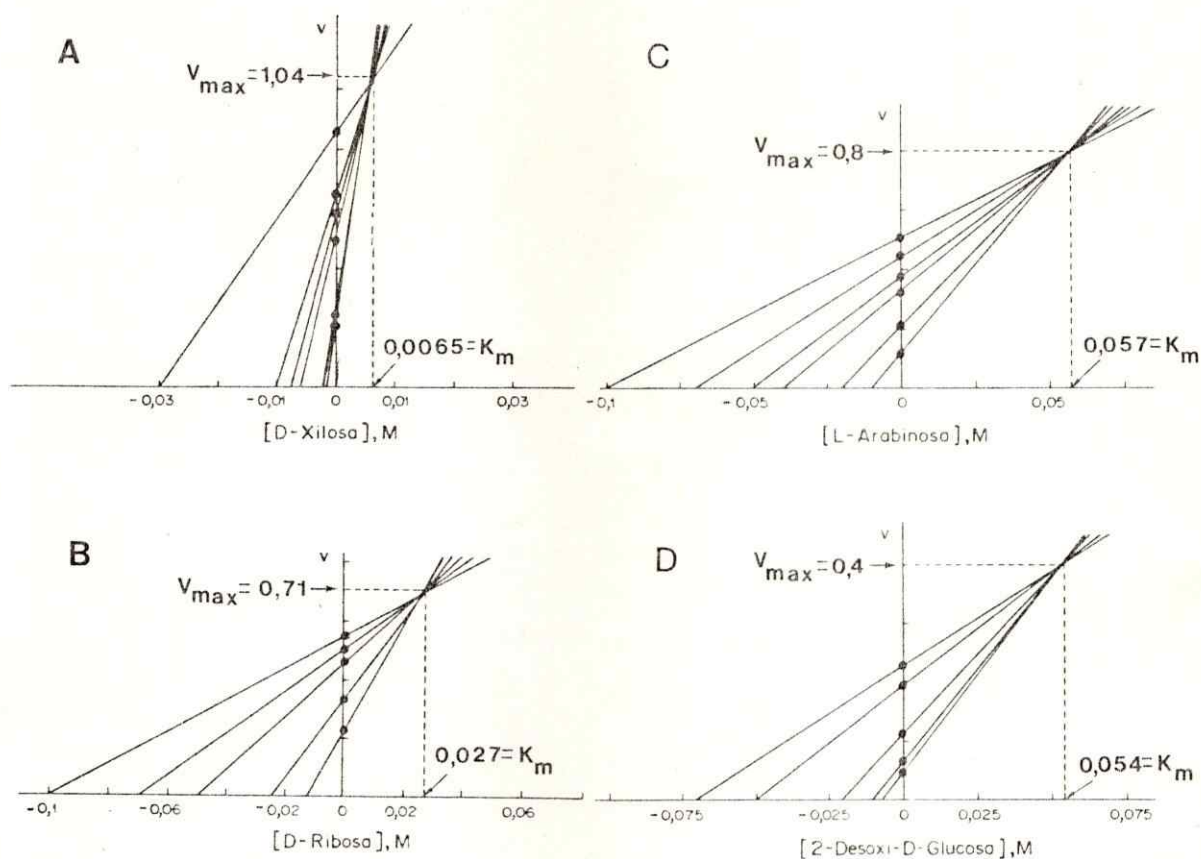


Figura 10. Gráficas de Eisenthal y Cornish-Bowden para determinar  $V_{max}$  y  $K_m$  aparentes de D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa. Se muestra la estimación de  $K_m$  ap y  $V_{max}$  ap para la enzima con diferentes sustratos glucídicos: (A) D-xilosa, (B) D-ribosa, (C) L-arabinosa y (D) 2-Desoxi-D-glucosa. La concentración de NADP<sup>+</sup> era 0,5 mM. Las mediciones de velocidad inicial se hicieron el mismo día con la misma enzima y en igual cantidad. Los valores de  $K_m$  ap y  $V_{max}$  ap se indican con la flecha. La velocidad de reacción enzimática se expresa en  $\mu$ moles de NADPH/min

Tabla II

Parámetros cinéticos de D-xilosa-deshidrogenasa para varios azúcares.

Azúcar	$V_{\max \text{ ap}}$ Unidades/mg prot.	$K_m \text{ ap}$ M	$k_{\text{cat ap}}$ $s^{-1}$	$K_{\text{esp}}$ $M^{-1} s^{-1}$
D-xilosa	7,6	0,0065	58	8923
D-ribosa	5,2	0,0270	40	1481
L-arabinosa	5,9	0,0570	45	789
2-desoxi-D glucosa	2,9	0,0540	22	407
D-glucosa	1,1	0,0490	16	326
D-galactosa	1,5	0,1400	12	86
D-arabinosa	1,2	0,1300	9	69

Los valores de  $V_{\max \text{ ap}}$  y  $K_m \text{ ap}$  se determinaron con el método gráfico de Eisenthal y Cornish-Bowden (1974). Ninguno de los azúcares estudiados fue capaz de reducir  $NAD^+$  en presencia de la enzima. Los sustratos se encuentran preferentemente en la conformación  $\beta$ -piranósica (Angyal y Pickles, 1972; Lange y Kohn, 1961; Sols y Crane, 1954).

bién son oxidados por la enzima) presentan valores de especificidad 6 y 11 veces menores que D-xilosa, respectivamente. Al aumentar el número de carbonos, como en el caso de las aldohexosas (2-desoxiglucosa, D-glucosa y D-galactosa), la velocidad de oxidación es mucho menor.

Otros azúcares que no se incluyen en la tabla II, no eran sustratos para la deshidrogenasa. Por ejemplo, para L-xilosa la velocidad relativa fue 7%; D-fucosa y D-lixosa presentaban velocidades relativas de 1,3%; con D-manosa, D-fructosa, L-ramnosa, D-glucosamina y los ésteres fosfatos, D-glucosa-6-fosfato, 6-fosfogluconato y D-ribosa-5-fosfato, no se detectó actividad.

Ninguno de los sustratos estudiados fué capaz de reducir  $\text{NAD}^+$  en presencia de la enzima.

### B.2. Efecto del pH sobre la actividad

El efecto del pH sobre la actividad de la enzima se muestra en la figura 11. La máxima actividad se obtiene a pH 8,0.

### B.3. Efecto de la variación de la concentración de los sustratos

El análisis del efecto de las concentraciones de los sustratos sobre la actividad de la D-xilosa-NADP-deshidrogena-

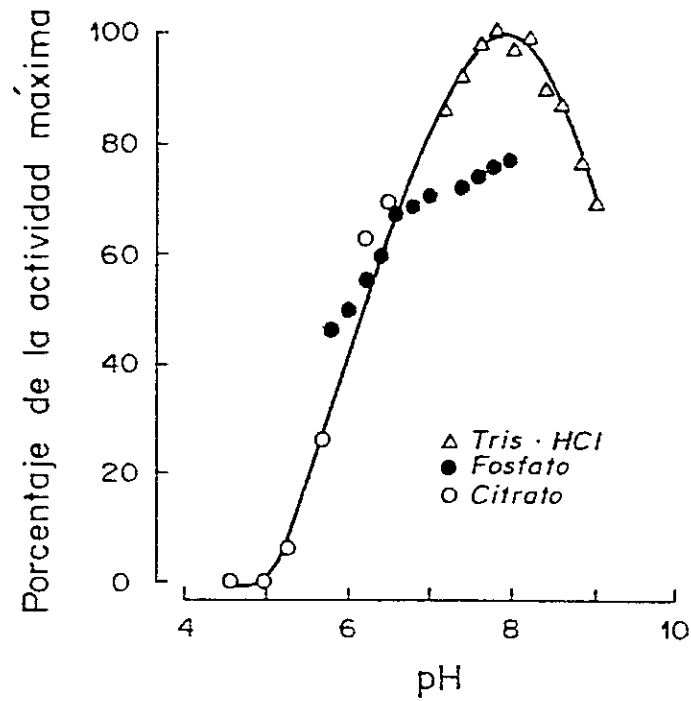


Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad de D-xilosa-deshidrogenasa. La concentración de D-xilosa y  $\text{NADP}^+$  usadas eran de 100 mM y 0,5 mM, respectivamente. Se indican las soluciones amortiguadoras utilizadas.



sa se realizó midiendo las velocidades iniciales de reacción, en presencia de concentraciones variables de un sustrato a diferentes concentraciones fijas del otro sustrato. Para la elección de las concentraciones apropiadas de D-xilosa y  $\text{NADP}^+$  se determinaron previamente las constantes de Michaelis aparentes para estos sustratos. Las  $K_m$  ap para D-xilosa y  $\text{NADP}^+$  de 6,8 mM y 0,024 mM respectivamente, fueron calculadas a partir de la representación gráfica de dobles recíprocos (Figuras 12 y 13). Concentraciones de  $\text{NADP}^+$  mayores que 0,25 mM son inhibitoras (Figura 13).

El efecto de la variación de las concentraciones de  $\text{NADP}^+$  a distintas concentraciones fijas de D-xilosa se muestra mediante una gráfica de dobles recíprocos (Figura 14). Nuevamente se observa que concentraciones altas de  $\text{NADP}^+$  tienen efecto inhibitor que es menos evidente mientras mayor es la concentración de D-xilosa. La representación de dobles recíprocos en que D-xilosa es el sustrato variable a distintas concentraciones fijas de  $\text{NADP}^+$  se muestra en la Figura 15. Las constantes de Michaelis verdaderas se calcularon a partir de las gráficas secundarias insertas en las figuras 14 y 15. Los valores calculados fueron 7,5 mM y 0,11 mM, para D-xilosa y  $\text{NADP}^+$  respectivamente.

Al variar las concentraciones de D-xilosa y  $\text{NADP}^+$  en una razón constante se observó una variación lineal de la actividad inicial (Figura 16). Resultado similar se obtuvo al

medir las velocidades en presencia de distintas concentraciones de L-arabinosa y  $\text{NADP}^+$  en razón constante (Figura 17).

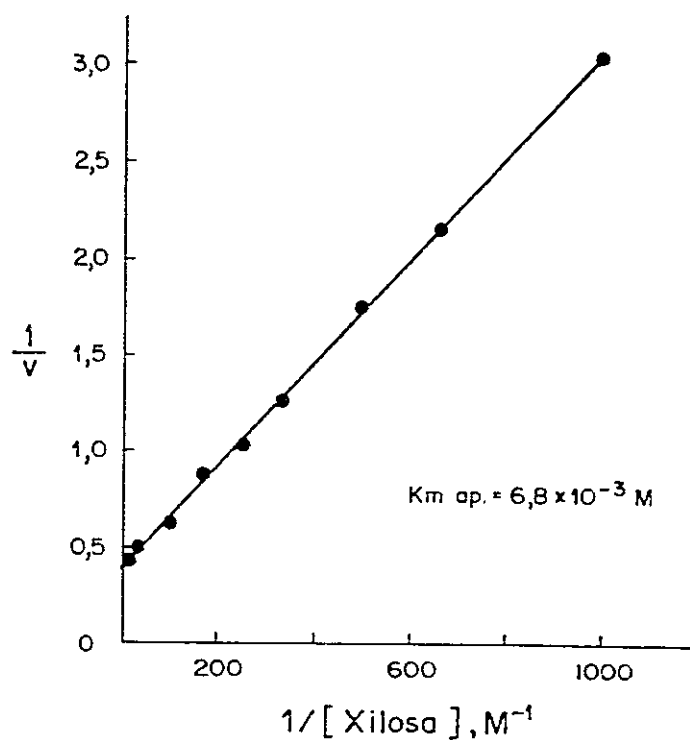


Figura 12. Gráfica de dobles recíprocos para la variación de la concentración de D-xilosa y concentración constante de  $NADP^+$  de 0,5 mM. El medio de reacción para la medición de la actividad enzimática, correspondía al descrito en Métodos. La velocidad de reacción se expresa en  $\mu$ moles/min.

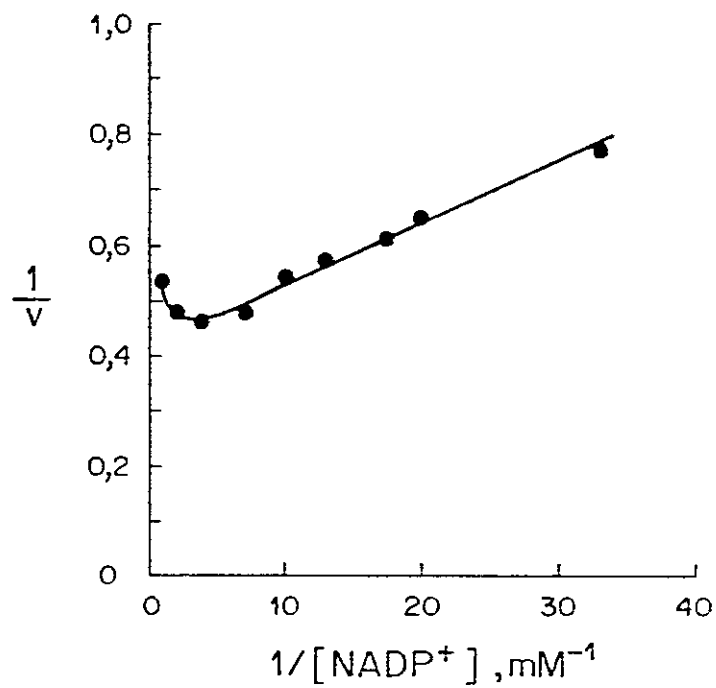


Figura 13. Representación gráfica de dobles recíprocos a diferentes concentraciones de  $NADP^+$  y a concentración constante de D-xilosa 30 mM. La velocidad de reacción enzimática corresponde a  $\mu$ moles de NADPH/min.

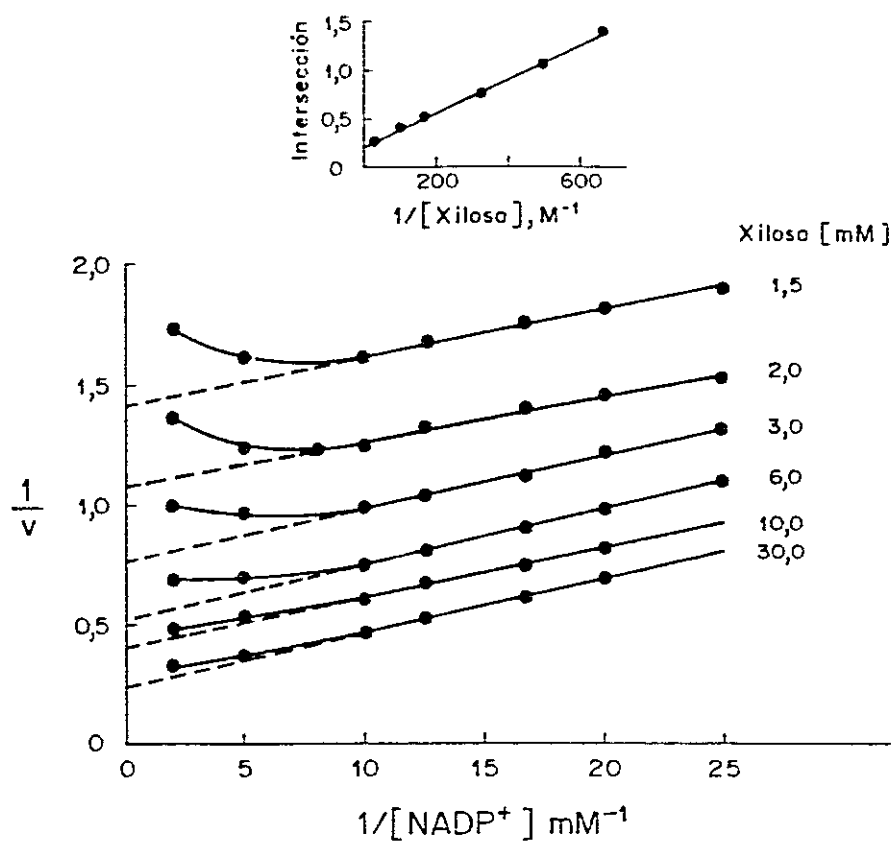


Figura 14. Influencia de la variación de la concentración de  $NADP^+$  sobre la velocidad inicial de D-xilosa-deshidrogenasa a varias concentraciones fijas de D-xilosa. Se muestra la representación de dobles recíprocos y la gráfica secundaria de las intersecciones. La velocidad de reacción enzimática se expresa en  $\mu$ moles de NADPH/min.

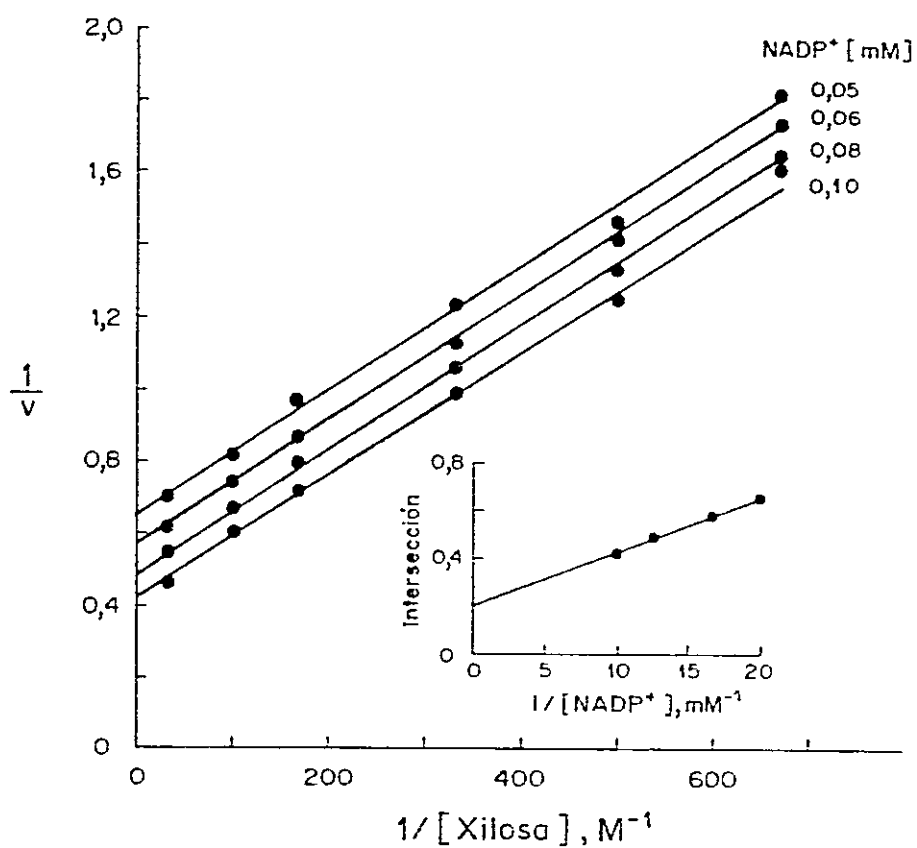


Figura 15. Influencia de la concentración de D-xilosa sobre la velocidad de D-xilosa-deshidrogenasa, a varias concentraciones fijas de  $NADP^+$ . Se muestra la representación de dobles recíprocos y la gráfica secundaria de las intersecciones. La velocidad de reacción enzimática se expresa en  $\mu$ moles de NADPH/min.

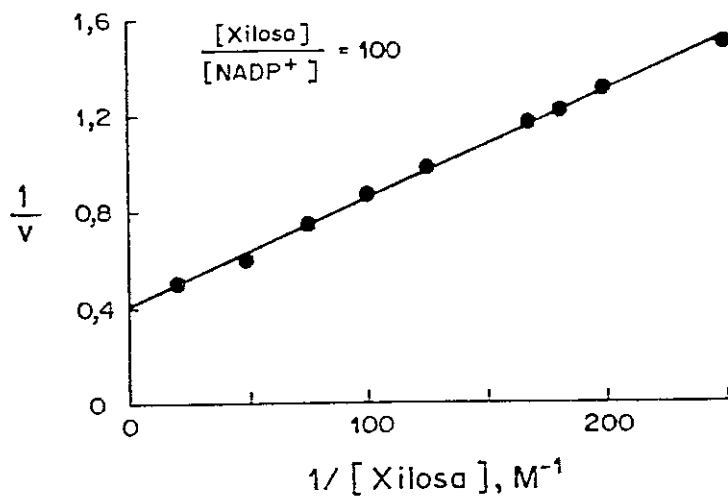


Figura 16. Gráfica de dobles recíprocos para D-xilosa-deshidrogenasa donde las concentraciones de D-xilosa y  $NADP^+$  se variaban en una razón constante de 100. La velocidad de reacción enzimática se expresa  $\mu$ moles de NADPH/min.

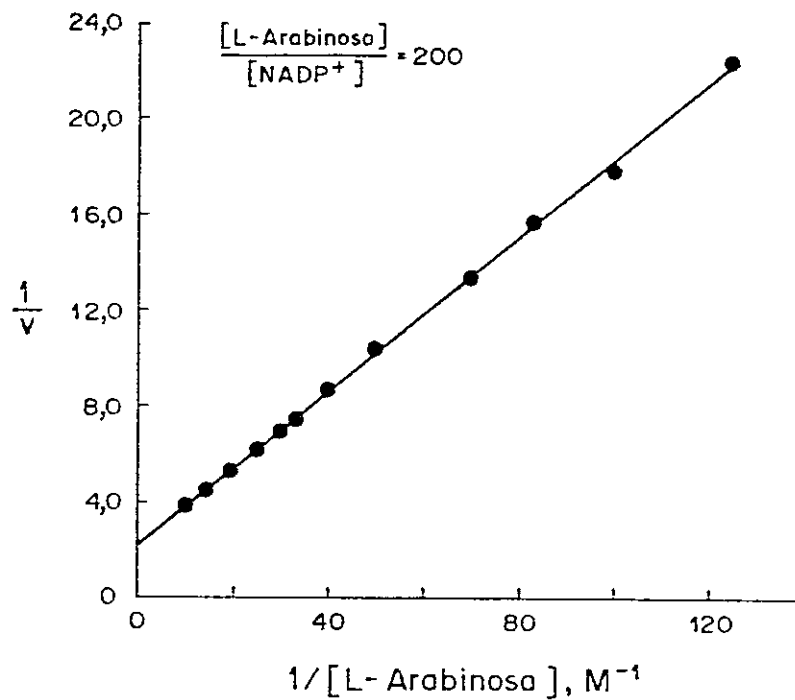


Figura 17. Gráfica de dobles recíprocos para D-xilosa-deshidrogenasa. Se utiliza el sustrato L-arabinosa en que las concentraciones de este azúcar y  $NADP^+$  se variaban en una razón constante de 200. La velocidad de reacción enzimática se expresa  $\mu$ moles de NADPH/min.



## DISCUSION

En varios organismos se ha demostrado la existencia de enzimas que catalizan la oxidación de pentosas como, por ejemplo, la D-arabinosa (L-fucosa)-NAD<sup>+</sup> deshidrogenasa de Pseudomonas sp. (Palleroni y Doudoroff, 1956) o de Neurospora crassa (Carrasco y colaboradores, 1981; Pincheira y colaboradores, 1973). También en hígado de mamíferos se encuentra este tipo de enzimas: L-arabinosa-NAD<sup>+</sup> (D-fucosa, D-galactosa)-deshidrogenasa de cerdo (Schachter y colaboradores, 1969), D-arabinosa (L-fucosa)-deshidrogenasa de cerdo (Maijub y colaboradores, 1973), L-fucosa-NAD<sup>+</sup>-deshidrogenasa de hígado de conejo activa también sobre D-arabinosa (Endo e Hiyama, 1979), D-arabinosa-NAD<sup>+</sup>-deshidrogenasa de cerdo (Ureta y Radojković, 1970; Meztger y colaboradores, 1967).

La D-xilosa es oxidada por varios microorganismos pero la enzima responsable, D-xilosa-NAD<sup>+</sup>-deshidrogenasa [D-xilosa: NAD<sup>+</sup> oxidoreductasa, EC 1.1.1.175], solo ha sido parcialmente purificada y caracterizada de Arthrobacter sp. (Yamanaka y colaboradores, 1977). La enzima fué purificada 186 veces por precipitación con sulfato de amonio, cromatografías de DEAE-celulosa, DEAE Sephadex y filtración en Sephadex G-100, hasta una actividad específica de 24 unidades/mg proteínas.

En hígado de cerdo se encontró actividad D-xilosa-des-

hidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  (Ureta y Radojković, 1970). En cristalinos de cerdo se ha descrito una deshidrogenasa también dependiente de  $\text{NADP}^+$  muy específica para D-xilosa (D-xilosa:  $\text{NADP}^+$  oxidoreductasa, EC 1.1.1.179) (Wissler y Logemann, 1984), pero la caracterización de la enzima es muy preliminar. Hay pruebas de la presencia de D-xilosa-deshidrogenasa, dependiente solo de  $\text{NADP}^+$ , en la fracción soluble de hígado de Mus musculus (Newton y colaboradores, 1982), enzima para la que se ha identificado un locus estructural en el cromosoma 7.

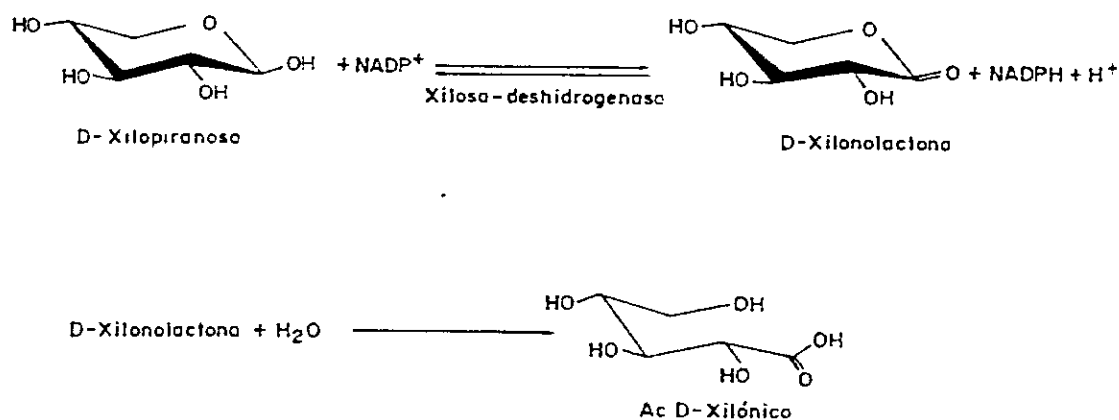
La D-xilosa- $\text{NADP}^+$ -deshidrogenasa de hígado de cerdo que se estudia en esta tesis, fué purificada hasta homogeneidad aparente ya que presenta una banda de proteína al ser sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Figura 6). El protocolo de purificación que se propone es sencillo, reproducible, relativamente rápido y resulta en una preparación estable. Esta xilosa-deshidrogenasa representa el 0,04% del total de las proteínas en el citosol de hígado de cerdo.

Al iniciar el aislamiento de la deshidrogenasa observamos inestabilidad de la actividad enzimática. En presencia de solución amortiguadora a pH 8,5 (Tris-HCl, EDTA, monotio-glicerol y fenilmetilsulfonilfluoruro), la actividad logró estabilizarse, lo que hace suponer que la enzima requiere de grupos tioles reducidos y que es susceptible a inactivación

por proteasas endógenas. En las condiciones descritas la enzima a 4°C mantiene su actividad inicial durante 6 meses de almacenamiento por lo menos.

La cromatografía de pseudo-afinidad con azul agarosa (que produce un aumento importante de la actividad específica de la enzima) fue ensayada en varias etapas de la purificación; obteniéndose una preparación homogénea solamente cuando se la usa como etapa final del proceso. Probablemente la presencia de otras proteínas que copurifican con D-xilosa-deshidrogenasa en las preparaciones interfieren con la unión de la enzima a la matriz de pseudo-afinidad.

La enzima cataliza la siguiente reacción:



Los productos de reacción, D-xilonolactona y ácido xilónico, no fueron identificados en este trabajo, pero en experimentos realizados anteriormente en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de esta Facultad, se encontró la formación de hidroxamato utilizando los sustratos D-ribosa

y  $\text{NADP}^+$  en presencia de hidroxilamina y una preparación enzimática semipurificada de hígado de cerdo (Ureta, comunicación personal). Por otra parte, en muchos microorganismos se ha observado la formación de ácido xilónico a partir de D-xilosa. Por ejemplo, cultivos de *Pseudomonas fragi* mantenidos en un medio que contiene D-xilosa, producen ácido D-xilónico en cantidades que corresponden al 92% de la xilosa original (Buchert y colaboradores, 1986). También se ha demostrado la producción de D-xilonolactona y ácido xilónico en cortes de tejidos de animales (Weser y Laster, 1968) y en cristalinos (van Heyningen, 1958).

#### Propiedades de la D-xilosa- $\text{NADP}^+$ -deshidrogenasa de hígado de cerdo

##### Especificidad de sustrato y coenzima

Metzger y colaboradores (1970) sugirieron que la actividad xilosa-deshidrogenasa de hígado de rata y oveja puede ser actividad marginal de otras enzimas. Algo similar proponen Yamanaka y colaboradores (1977) para la xilosa-deshidrogenasa de cristalino de ternero descrita por van Heyningen (1958). Esta proposición se basa en el hecho que varios sustratos glucídicos pueden ser oxidados por preparaciones semipurificadas. Nuestro estudio de la deshidrogenasa purificada de hígado de cerdo, sugiere su identificación como D-xilosa- $\text{NADP}^+$ -deshidrogenasa puesto que D-xilosa fue el mejor

sustrato (entre 17 sustratos razonablemente posibles) tanto por el valor más alto de  $V_{\max}$  como por su menor  $K_m$ . Sin embargo, la enzima puede oxidar otros sustratos glucídicos, entre ellos D-ribosa y L-arabinosa, pentosas de estructura muy semejante a D-xilosa, pero la especificidad (relación  $k_{\text{cat}}/K_m$ ) es mucho menor que para D-xilosa (Tabla II).

Si bien el valor de la constante de Michaelis (7,5 mM) para D-xilosa es relativamente alto, el desconocimiento de las concentraciones de D-xilosa que pudieran llegar a las células donde está presente la enzima, o de la concentración intracelular de D-xilosa, o la posibilidad de que la reacción de la deshidrogenasa in vivo pudiera estar acoplada a otra reacción o reacciones, o que la afinidad sea mucho mayor en el medio intracelular, permite aceptar que el alto valor de  $K_m$  que se ha encontrado no descalifica a la enzima en su funcionalidad. Así por ejemplo, la hexoquinasa D de hígado de rata presenta una  $K_m$  para glucosa de 6 mM (Niemeyer y colaboradores, 1975), valor que coincide con la concentración de glucosa en la sangre portal. Además ya se ha mencionado la existencia de D-xilosa-NAD<sup>+</sup>-deshidrogenasa en Arthrobacter sp. (inducible solo por D-xilosa), cuya  $K_m$  para esta pentosa es de 17,4 mM que es aún más alto que el determinado para la enzima de hígado de cerdo.

Un análisis preliminar de la estructura conformacional de D-xilosa y los otros sustratos glucídicos usados en el

estudio de especificidad de la D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa de hígado de cerdo, permite estimar el requerimiento estructural mínimo de los azúcares que son oxidados por la enzima. Wisler y Logemann (1984), sugieren que la conformación  $\beta$ -D-piranosica de la xilosa es el mejor sustrato para la deshidrogenasa de cristalino de cerdo, informando que la conversión de D-xilosa a ácido D-xilónico es óptima en presencia de la enzima aldosa-1-epimerasa que cataliza la conversión por mutarrotación de D-xilosa hacia el epímero  $\beta$ -D-xilopiranosica. En la figura 18 se muestra la representación cíclica de la conformación  $\beta$ -D-piranosica de los sustratos que tienen mayor actividad con la D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa de hígado de cerdo. Los sustratos D-ribosa y L-arabinosa, 2-desoxi-D-glucosa y D-glucosa presentan valores de  $K_m$   $ap$  semejantes entre sí, pero mayores que el correspondiente a la D-xilosa (Tabla II). Todos ellos tienen el grupo hidroxilo del carbono 2 en posición ecuatorial, pero difieren en la posición de los hidroxilos en los carbonos 3 y 4, o en la presencia de un grupo voluminoso unido al carbono 5 (Figura 18). La presencia de este grupo, tanto en la 2-desoxi-D-glucosa como en la D-glucosa, produce además un marcada disminución en la  $V_{max}$   $ap$ . La orientación del grupo hidroxilo del carbono 2 parece ser fundamental ya que la actividad de la enzima con D-lixosa es prácticamente despreciable. Del mismo modo con D-manosa (hidroxilo del carbono 2 con orientación axial) la

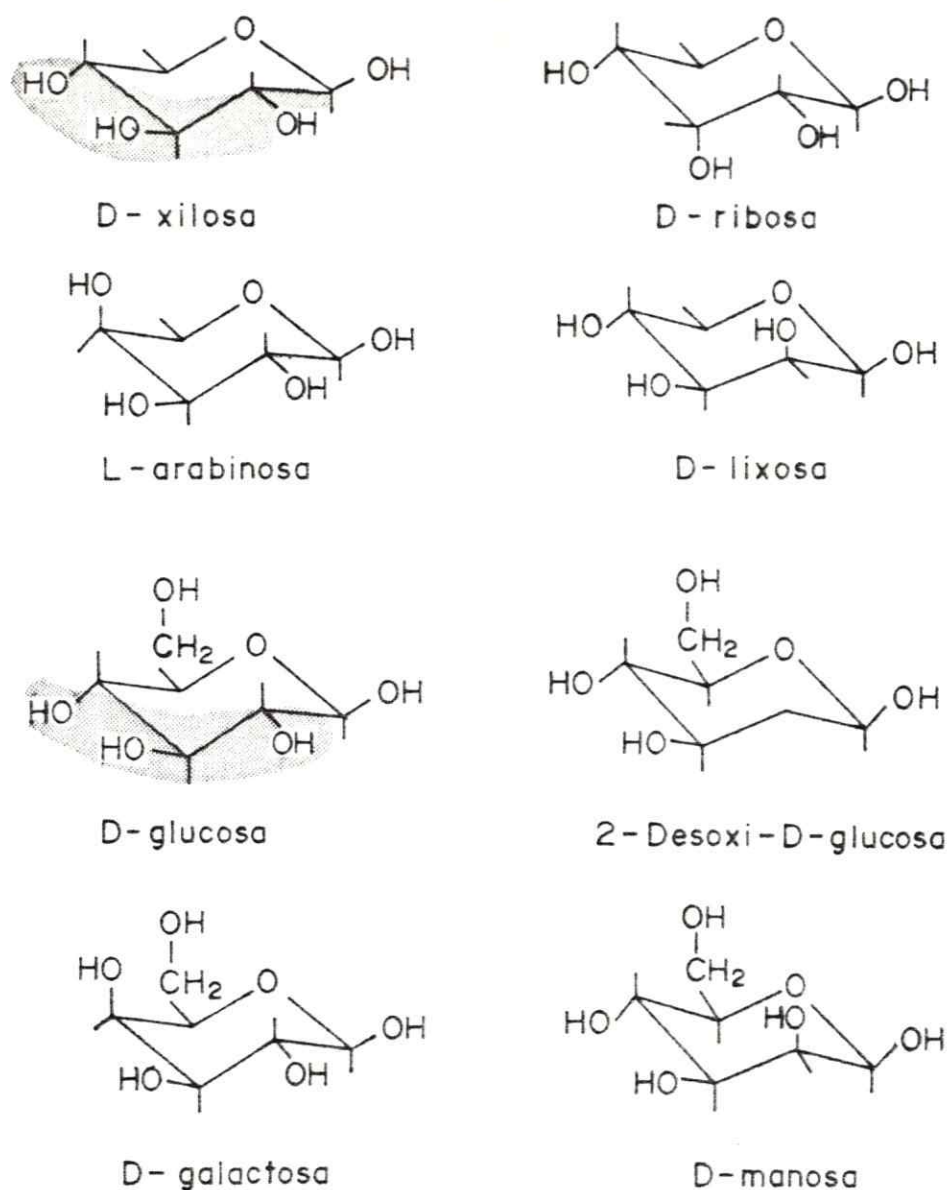


Figura 18. Conformación  $\beta$ -piranósica de varios azúcares que son oxidados por D-xilosa-deshidrogenasa. El mínimo requerimiento para la unión de la enzima con más alta afinidad por el azúcar, se presenta cuando el sustrato es una pentosa con los grupos hidroxilos de los carbonos 2, 3 y 4 orientados en posición ecuatorial (D-xilosa). La enzima no oxida a sustratos con el hidroxilo del carbono 2 en orientación axial.

enzima no presenta actividad.

Por otra parte, al usar D-ribosa-5-P como sustrato no se observó actividad enzimática. La conformación de este sustrato que tiene esterificado el hidroxilo del carbono 5, corresponde a la de una furanosa. Esta misma conformación es la que presenta la D-fructosa, que tampoco es sustrato de la enzima, lo que confirma la especificidad de la D-xilosa-deshidrogenasa por un anillo piranósico.

Por lo tanto la enzima se une con mayor afinidad y oxida a monosacáridos que presenten una conformación de  $\beta$ -piranosa, con una orientación ecuatorial de los grupos hidroxilos de los carbonos 2, 3 y 4 y que no tengan un sustituyente voluminoso en el carbono 5. El sustrato que mejor se ajusta a estos requerimientos estructurales es la D-xilosa.

Aún cuando en el presente estudio no se midió la actividad de la enzima en presencia de eritrosa o ribulosa, se esperaba que la D-xilosa-deshidrogenasa no los utilizara como sustratos. Estos azúcares tienen una estructura lineal y no forman anillos heterocíclicos, a diferencia de los monosacáridos estudiados (Tabla II, figura 18) cuyas estructuras lineales contribuyen en menos de un 5% en la concentración total.

Los resultados de especificidad de sustrato permiten suponer que la D-xilosa-deshidrogenasa pueda participar en



una vía de degradación específica para D-xilosa, en la que prácticamente no exista degradación de otros monosacáridos a través de los mismos sistemas enzimáticos.

#### Influencia de la concentración de los sustratos

El efecto de las concentraciones de los sustratos D-xilosa y  $\text{NADP}^+$  sobre la actividad de la D-xilosa- $\text{NADP}^+$ -deshidrogenasa de hígado de cerdo, midiendo las velocidades iniciales obtenidas al variar la concentración de cada sustrato a diferentes concentraciones fijas del otro sustrato, se estudió con el objeto de calcular la constante de Michaelis verdadera para cada sustrato. El hallazgo de líneas paralelas en gráficas de dobles recíprocos y las líneas rectas obtenidas en este mismo tipo de gráfico, cuando la velocidad se midió variando las concentraciones de D-xilosa y  $\text{NADP}^+$  o de L-arabinosa y  $\text{NADP}^+$  en una razón constante, muestran un comportamiento que sugiere un mecanismo ping-pong. Al respecto, en general se acepta que las deshidrogenasas dependientes de los nucleótidos pirimidínicos  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ , presentan reacciones que responden a un mecanismo secuencial ordenado, caso en el cual el sustrato conductor es el nucleótido. Carper y colaboradores (1976) informan que las enzimas glucosa  $\text{NAD(P)}^+$ -deshidrogenasa y arabinosa (fucosa)  $\text{NAD}^+$ -deshidrogenasa de hígado de cerdo, presentan un mecanismo secuen-

cial BiBi ordenado. Sin embargo, existen algunas deshidrogenasas dependientes de  $\text{NAD}^+$  que en ciertas condiciones siguen una cinética ping-pong. La alcohol-deshidrogenasa de hígado de caballo o de ratón, cataliza la oxidación de etanol y en presencia de lactaldehído, que reoxida la enzima unida a NADH, muestra un mecanismo de reacción ping-pong (Gershman y Abeles, 1973), con características similares al mecanismo de acción de la malato-lactato-transhidrogenasa (Allen y Patil, 1972); estas enzimas unen fuertemente el nucleótido, por lo que a éste se le ha asignado la función de grupo prostético de la deshidrogenasa en vez de sustrato (Spector, 1982). Para la D-xilosa- $\text{NADP}^+$ -deshidrogenasa de hígado de cerdo, no obstante las pruebas que se disponen que permite sugerir un comportamiento cinético ping-pong, es necesario obtener otros argumentos experimentales para confirmarlo, teniendo en cuenta que hay enzimas que en gráficos de doubles recíprocos muestran líneas paralelas que realmente no lo son. Así ocurre con la fosfofructoquinasa de Dictyostelium discoideum (Baumann y Wright, 1968), con aspartato-transcarbamilasa de Escherichia coli (Porter y colaboradores, 1969) y con proteína-quinasa de Neurospora crassa (Gold y Segel, 1974). Por lo tanto, en futuros estudios debería continuarse con la caracterización del mecanismo de reacción de la D-xilosa- $\text{NADP}^+$ -deshidrogenasa de hígado de cerdo, por ejemplo con estudios de inhibición por los productos de la

reacción, por aislamiento del probable complejo enzima-sustrato covalentemente unidos, u otros experimentos que permitan determinar con certeza el comportamiento cinético de esta deshidrogenasa.

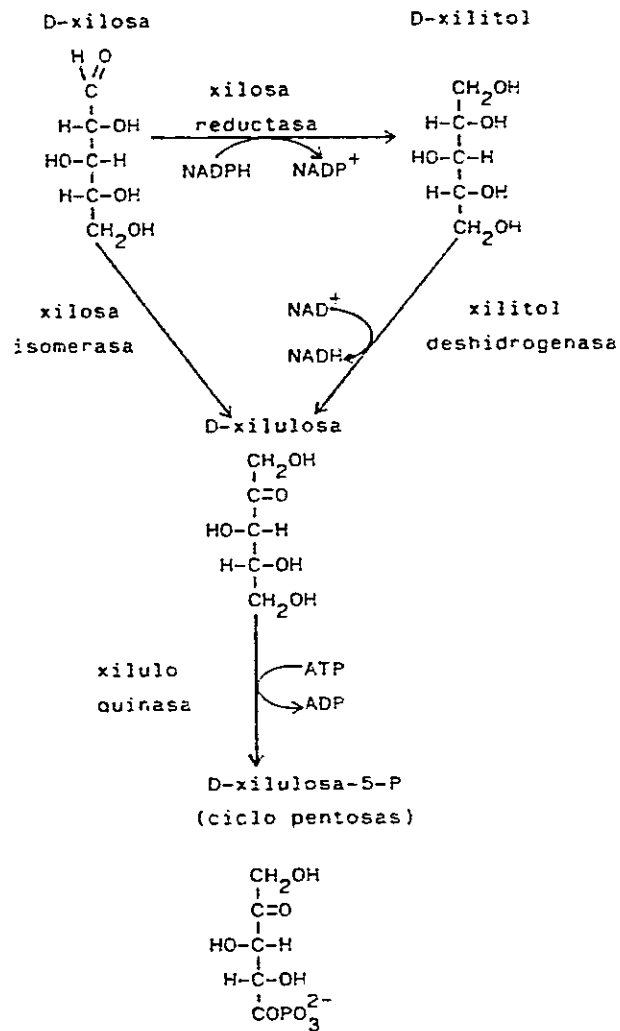
#### Tamaño molecular

La D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa de hígado de cerdo, en condiciones nativas existe como dímero ( $M_r$  estimado  $62.000 \pm 1.300$ ) compuesto por dos subunidades de igual o similar masa molecular relativa ( $M_r$  subunitario  $32.000 \pm 900$ ). Los resultados de la electroforesis en condiciones nativas (Fig. 7) sugieren que la enzima presenta diferentes estados de agregación, problema que deberá tenerse en cuenta en futuros estudios.

La masa molecular relativa nativa que hemos determinado es igual a la obtenida por filtración en Sephadex G-100 para D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa de Arthrobacter sp. (Yamanaka y colaboradores, 1977) que corresponde a  $62.000 \pm 2.000$ . Wissler y Logemann (1984) informaron un valor de 48.000 (obtenido en una columna de Ultrogel AcA34) para D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa de cristalino de cerdo. Estos autores no determinaron la masa molecular relativa en condiciones desnaturalantes.

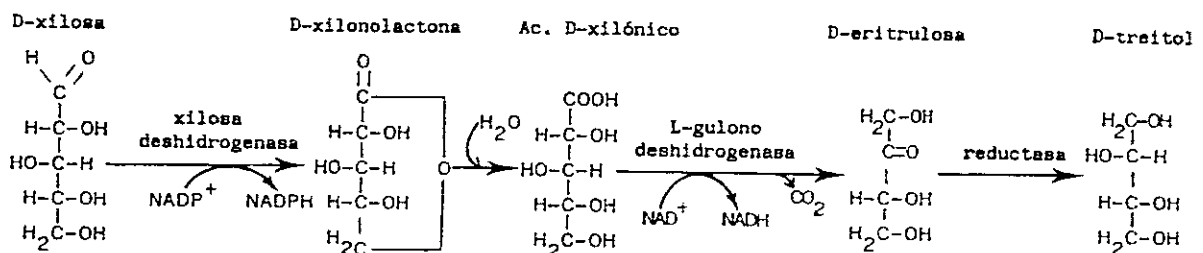
## Consideraciones sobre el catabolismo de D-xilosa

La vía metabólica para la oxidación de D-xilosa en vertebrados no se conoce. En plantas y bacterias hay enzimas que catalizan la transformación de D-xilosa a D-xilulosa y se ha propuesto que en mamíferos ocurre lo mismo, donde luego de la isomerización de D-xilosa a D-xilulosa se utiliza la vía de las pentosas.



No obstante, Hiatt (1957) encontró que sólo el 1% de la D-xilosa inyectada en rata fué incorporada a glicógeno en el hígado, mientras que había un 10% de incorporación de D-ribosa o D-glucosa.

Las rutas catabólicas por las que se metaboliza D-xilosa en animales, parecen no corresponder al ciclo de las pentosas. Weser y Laster (1968) mostraron en cuyes que hay producción de  $\text{CO}_2$  con formación de ácido D-xilónico, como metabolito intermediario. Estos mismos autores afirman que la identificación del metabolito urinario D-treitol en el humano, apoya la proposición de que D-xilosa es convertida en ácido D-xilónico compuesto que se descarboxila por acción de la L-gulono-deshidrogenasa (Smiley y Ashwell, 1961) a eritru-losa y este último sería reducido a D-treitol.



Estudios en cristalinós de ternero sugieren que D-xilosa se oxida a ácido D-xilónico por acción de una xilosa-deshidrogenasa. La oxidación se realizaría mediante el  $\text{NAD}^+$  dispo-

nible normalmente para la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato de la vía glicolítica (van Heyningen, 1958).

Logeman y Wissler (1985) informaron que la D-xilosa-deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$ , aislada a partir de cristalinos de cerdo (Wissler y Logemann, 1984), está relacionada con el proceso de regulación del metabolismo intermediario de fosfoinosítidos, especialmente en el reciclaje del nucleótido reducido (NADPH) necesario para la producción de alditoles e inositol.

Nuestro trabajo confirma la existencia de una deshidrogenasa en el hígado de cerdo que cataliza la oxidación de D-xilosa en presencia solamente de  $\text{NADP}^+$ , permitiendo suponer que en este tejido habría catabolismo de D-xilosa por una vía metabólica que se iniciaría con la participación de esta deshidrogenasa. Consideramos de interés iniciar una investigación de las vías metabólicas que utilizan D-xilosa en mamíferos, organismos en los que no ha sido descrita una quinasa que fosforile esta pentosa ni tampoco una isomerasa que catalice la conversión de D-xilosa a D-xilulosa.

#### Comparación con otras deshidrogenasas

Existe mucha información acerca de la estructura primaria y tridimensional de varias deshidrogenasas dependientes de nucleótidos pirimidínicos (Rossman y colaboradores, 1975). El análisis de esas estructuras ha mostrado que la gran

mayoría de estas enzimas son muy similares en el plegamiento de la cadena polipeptídica especialmente en las regiones que unen el nucleótido. Se ha definido el llamado "bolsillo nucleotídico" como un plegamiento particular formado por seis láminas  $\beta$  paralelas rodeadas por 4  $\alpha$ -hélices, que sería común a todas las deshidrogenasas aún cuando la estructura primaria de tal bolsillo sea diferente en cada enzima. Se ha postulado que las similitudes resultan del origen común de las deshidrogenasas que habrían divergido a partir de un gen ancestral único que codificaba a una deshidrogenasa de amplia especificidad de sustrato.

Jornvall y colaboradores (1984) encontraron similitudes altamente significativas en las secuencias de aminoácidos de glucosa-deshidrogenasa de Bacillus megaterium y ribitol-deshidrogenasa de Klebsiella aerogenes; entre sorbitol-deshidrogenasa de hígado de oveja y alcohol-deshidrogenasa de levadura; entre alcohol-deshidrogenasa de Drosophila y ribitol-deshidrogenasa de Klebsiella. Basados en estas homologías han sugerido un esquema evolutivo que incluye dos linajes de alcohol-polialcohol-azúcar-deshidrogenasas, provenientes de un hipotético ancestro común: un linaje con cadena "larga" (aproximadamente 350 residuos) que une zinc como ligando catalítico y otro con cadena polipeptídica "corta" (aproximadamente 250 residuos) que no une zinc (Figura 19). Si bien nuestros resultados no incluyen información estructural más

Molécula ancestral  
(hipotética)

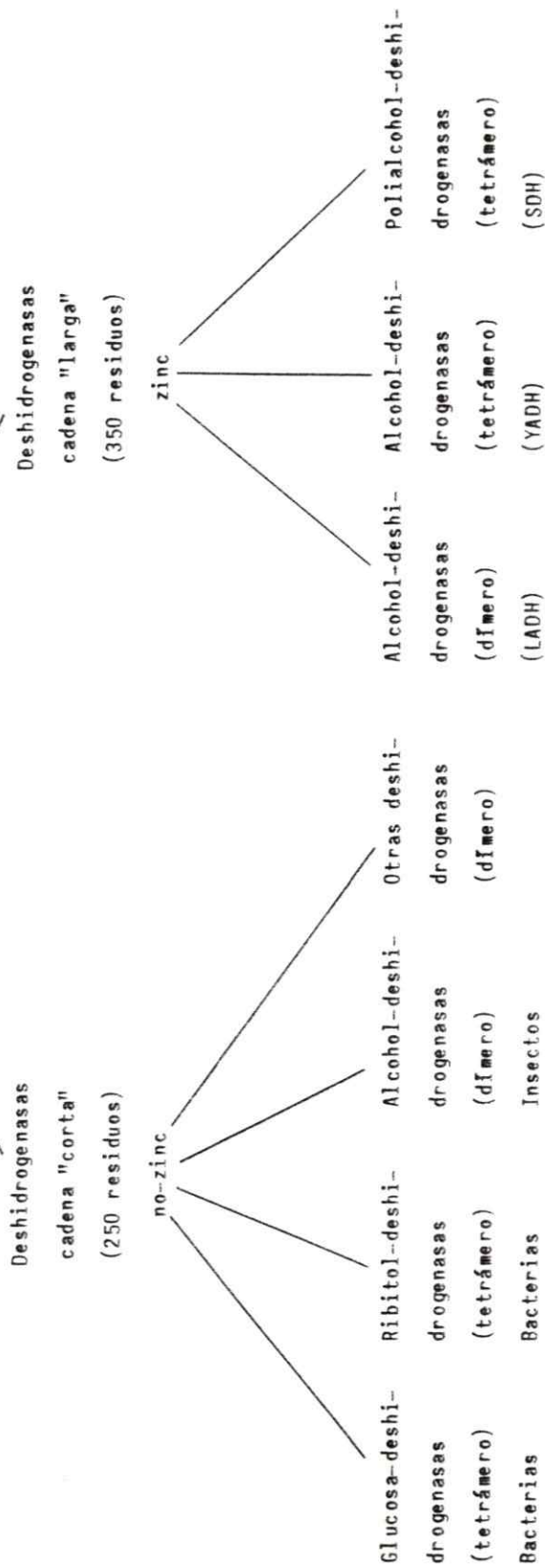


Figura 19. Esquema que sugiere relaciones evolutivas entre alcohol-polialcohol-azúcar-deshidrogenasas (tomado de Jornvall y colaboradores, 1984). La xilosa-deshidrogenasa de hígado de cerdo podría agregarse tentativamente a "otras deshidrogenasas". LADH y YADH corresponden a alcohol-deshidrogenasas de hígado y levadura respectivamente; SDH es sorbitol-deshidrogenasa.



allá de la masa molecular relativa de las subunidades, es de interés señalar que el tamaño de la xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa de hígado de cerdo ( $M_r$  de la subunidad de 32.000; aproximadamente 260 residuos) permitiría incluirla entre las deshidrogenasas de cadena "corta", lo que sería también válido para xilosa-deshidrogenasa de procariontes (por ejemplo la de Arthrobacter sp.; Yamanaka y col., 1977). La figura 19 muestra el esquema propuesto por Jornvall y colaboradores (1984), en el cual es posible insertar a la D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa en la rama allí mencionada para "otras deshidrogenasas". Esta especulación predice que la xilosa-deshidrogenasa no requiere de Zn para la catálisis.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se logró confirmar la existencia de una D-xilosa-NADP<sup>+</sup>-deshidrogenasa en el citosol de hígado de cerdo. La enzima se purificó y caracterizó, encontrándose que el mejor sustrato es D-xilosa (entre 17 azúcares), por su mayor especificidad. La oxidación de la pentosa se produce solamente en presencia de NADP<sup>+</sup>; NAD<sup>+</sup> no es reducido por D-xilosa u otras pentosas. La enzima es un dímero con subunidades de igual o similar masa molecular relativa (32.100).

Estudios preliminares sugieren que la unión de la enzima con los sustratos se realiza mediante un mecanismo ping-pong.

La enzima se une con mayor afinidad y oxida monosacáridos que presenten una conformación de  $\beta$ -piranosa con una orientación ecuatorial de los grupos hidroxilos de los carbonos 2, 3 y 4 y que no tengan un sustituyente voluminoso en el carbono 5. El sustrato que mejor se ajusta a estos requerimientos estructurales, es la D-xilosa.

La oxidación de D-xilosa por acción de esta deshidrogenasa permite suponer que en hígado de cerdo existiría una vía de utilización para xilosa que se inicia con esta reacción.

Los resultados de especificidad de sustrato permiten suponer que la D-xilosa-deshidrogenasa pueda participar en

una vía de degradación específica para D-xilosa, en la que prácticamente no exista degradación de otros monosacáridos a través de los mismos sistemas enzimáticos.

## ANEXO 1

## Preparación de DEAE-celulosa

DEAE-celulosa microgranular (DE-52) se suspendía en 5 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 5 mM pH 8,5 y EDTA 1 mM. Los intercambiadores iónicos que habían sido utilizados en cromatografías se lavaban en la columna con una solución de NaCl 0,5 M antes de realizar el proceso de regeneración, que consistía en tratar el intercambiador con ácido y álcali para luego ser equilibrado con la solución amortiguadora que se requería para la cromatografía. La regeneración se hacía colocando la suspensión de DEAE-celulosa en un embudo Büchner provisto de papel filtro Whatman 1, conectado a un sistema de vacío. El intercambiador se trataba con 10 volúmenes de HCl 0,5 M, luego con 15 volúmenes de agua desionizada, posteriormente con 10 volúmenes de NaOH 0,5 N y nuevamente con 15 volúmenes de agua. En seguida se transfería a un vaso de precipitado para ser lavado con 10 volúmenes de amortiguador Tris-5 mM pH 8,5 y EDTA 1 mM. La suspensión se desaireaba durante una hora a través de un sistema de vacío y se empacaba en una columna de 4,5 cm de diámetro por 38 cm de altura, luego era equilibrada con la solución A (descrita en materiales y métodos)

## ANEXO 2

## Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) 0,1% se realizaba según la metodología de Laemmli (1970). Los geles se preparaban en placas con un gradiente de acrilamida entre 6% y 20%. Las soluciones utilizadas eran las siguientes:

- B. Tris-HCl 1,5 M pH 8,8: Para 100 ml de solución 18,15 g de Tris, llevar a pH 8,8 con HCl y luego agregar agua desionizada c.s.p. 100 ml.
- C. Tris-HCl 0,5 M pH 6,8: Para 100 ml de solución 6,05 g de Tris, llevar a pH 6,8 con HCl y agregar agua desionizada c.s.p. 100 ml.
- D. Tris-glicina 0,375 M; SDS 0,1% Tris 3 g; glicina 14,4 g; SDS 1 g y agua desionizada c.s.p. 100 ml; pH 8,3.
- E. 30 g de acrilamida; 0,8 g de bisacrilamida y agua desionizada c.s.p. 100 ml.
- F. 10 g de dodecilsulfato de sodio y agua desionizada c.s.p. 100 ml.
- G. 0,5 g de persulfato de amonio y agua desionizada c.s.p. 5 ml.

Preparación de la placa de poliacrilamida-SDS en gradiente:

Con el propósito de obtener un gradiente lineal, de acrilamida entre 6 y 20% y un porcentaje constante de bisacrilamida de 0,8%, se preparaba la placa de poliacrilamida a partir de las soluciones siguientes:

1) Solución con 6% de acrilamida.

5,4 ml agua desionizada; 2,5 ml sol B; 2,0 ml sol E; 0,1 ml sol F; 5  $\mu$ l TEMED.

2) Solución con 20% de acrilamida.

0,7 ml agua desionizada; 2,5 ml sol B; 6,7 ml sol E; 0,1 ml sol F; 5  $\mu$ l TEMED.

A cada una de estas soluciones se le agregaba 20  $\mu$ l de sol G e inmediatamente se vaciaban en un aparato Buchler Instruments, que posee 2 cámaras conectadas en el fondo por una llave de paso. De una de las cámaras sale una manguera de plástico (Tygon) a la que se conectaba un capilar que llegaba hasta el fondo del sistema de placas de vidrio donde se formaba la placa en gradiente de acrilamida. Esta cámara posee un sistema de agitación regulable para obtener una mezcla con mínima perturbación. Se colocaban 10 ml de solución con 20% de acrilamida en la cámara con agitación,

y en la otra cámara se colocaba igual volumen de solución con 6% de acrilamida; se abría la llave de paso y el extremo del capilar de la cámara de salida (con agitación) se colocaba en el fondo de las placas de vidrio, el capilar se retiraba paulatinamente a medida que la mezcla en gradiente de acrilamida se vaciaba entre las placas de vidrio. Al vaciar toda la mezcla, se depositaba sobre esta 5 ml de H<sub>2</sub>O desionizada. Luego la polimerización de la acrilamida se realizaba en presencia de luz fluorescente blanca por un tiempo mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente.

El gel concentrador se hacía a una concentración constante de acrilamida al 5%, vaciando sobre el gel separador una solución que se había preparado como sigue: 5,4 ml agua desionizada; 2,5 ml solución C; 2,0 ml solución E; 0,1 ml sol F; 16  $\mu$ l TEMED y 60  $\mu$ l sol G. Inmediatamente se sumergía un espaciador que permitía una vez polimerizado el gel, formar los pocillos para colocar las muestras de proteínas.

## REFERENCIAS

Allen, S.H.G. y Patil, J.R. (1972). Studies on the structure and mechanism of action of the malate-lactate. Transhydrogenase. J. Biol. Chem. **247**, 909-916.

Andrews, P. (1964). Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex Gel-Filtration. Biochem. J. **91**, 222 -233.

Angyal, S.J. y Pickles, V.A. (1972). Citado por Wissler y Logemann. Methods of Enzymatic Analysis. Volume VI. Third edition pp. 449-465. (1984).

Baumann, P. y Wright, B. (1968). The phosphofructokinase of Disctyostelium discoideum. Biochemistry, **7**, 3653-3661.

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.

Brot, F.E. y Bender, M.L. (1969). Use of the Specificity constant of  $\alpha$ -chymotrypsin. J. Am. Chem. Soc. **91**, 25, 7187-7191.

Buchert, J., Viikari, M., Linko, M. y Markkanen, P. (1986).



Production of xilonic acid by Pseudomonas fragi. Biotechnol. Letters. 8, 541-546.

Carper, W.R., Toews, M.L., Thompson, R.E. y Buess, Ch.M. (1976). A kinetic study of pig liver glucose dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 175, 312-320.

Carrasco, A., Pincheira, G., y Ureta, T. (1981). Genetic and biochemical characterization of D-arabinose dehydrogenase from Neurospora crassa. J. Bact. 145, 164-170.

Davis, B.J. (1964). Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427.

Dawson, R.M., Elliot, W.H., y Jones, K.M. (1972). En Data for Biochemical Research, 2a. Edición, Oxford University Press. p. 483.

Eisenthal, R. y Cornish-Bowden, A. (1974). The Direct Linear Plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. Biochem. J. 139, 715-720.

Endo, M. y Hiyama, N. (1979). Isolation and characterization

of L-fucose dehydrogenase from rabbit liver. J. Biochem. **86**, 1559-1565.

Gershman, H., y Abeles, R.H. (1973). Deuterium isotope effects in the oxidation of alcohols in vitro and in vivo. Arch. Biochem. Biophys. **154**, 659-674.

Gold, M. y Segel, I.H. (1974). Neurospora crassa protein kinase. Purification, properties, and kinetic mechanism. J. Biol. Chem. **249**, 2417-2423.

Hiatt, H.H. (1957). Glycogen formation via the pentose phosphate pathway in mice in vivo. J. Biol. Chem. **224**, 851-859.

Jörnvall, H., von Bahr-Lindström, H. Jany, K.-D., Ulmer, W. y Fröschle, M. (1984). Extended superfamily of short alcohol-polyol-sugar dehydrogenases: structural similarities between glucose and ribitol dehydrogenases. FEBS Lett. **165**, 190-196.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**, 680-685.

Lange, Ch. F., y Kohn, P. (1961). Hexokinase specificity of

some tumor tissue extracts. Cancer Res. **21**, 1055-1061.

Lineweaver, H., y Burk, D. (1934). The determination of dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. **56**, 658-666.

Logemann, E. y Wissler, J. (1985). A function for inososes: Inhibition of D-xylose: NADP 1-oxido reductase as a regulatory link of inositol metabolism to ATP-independent NADPH production from aldoses. 13th International Congress of Biochemistry, Amsterdam, Abstract MO-30.

Maijub, A.G., Peckt, M.A., Miller, G.R. y Carper, W.R. (1973). Arabinose (Fucose) dehydrogenase from pig liver. I. Isolation and characterization. Biochim. Biophys. Acta. **315**, 37-42.

Merino, F. (1974). A new method for determining the Michaelis constant. Biochem. J. **143**, 93-95.

Metzger, R.P., Copp, E.F., Metzger, S.A. y Wick, A.N. (1970). Dehydrogenation of glucose and xylose catalysed by rat and sheep liver microsomal and soluble fractions. Metabolism. **19**, 587-597.

Metzger, R.P., y Wick, A.N. (1967). Partial purification of

rat liver D-arabinose dehydrogenase. Biochem. Biophys. Res. Commun. **26**, 742-747.

Newton, M.F., Nash, H.R., Peters, J., y Andrews, S. (1982). Xylose dehydrogenase-1, a new gen on mouse chromosome 7. Biochem. Genet. **20**, 733-745.

Niemeyer, H., Cárdenas, M.L., Rabajille, E., Ureta, T., Clark-Turri, L. y Peñaranda, J. (1975). Sigmoidal kinetics of glucokinase. Enzyme, **20**, 321-333.

Palleroni, N. y Doudoroff, M. (1956). Characterization and properties of 2-keto-3-deoxy-arabonic acid. J. Biol. Chem. **223**, 499-508.

Pincheira, G., León, G., y Ureta, T. (1973). Aldosugar dehydrogenase from Neurospora crassa. Partial purification for D-arabinose: NAD-dehydrogenase. FEBS Lett. **30**, 111-114.

Porter, R.W., Modebe, M.O. y Stark, G.P. (1969). Aspartate transcarbamylase. Kinetics studies of the catalytic subunit. J. Biol. Chem. **244**, 1846-1859.

Rossmann, M.G., Liljas, A., Branden, C.I. y Banaszak, L.J. (1975). Evolutionary and Structural Relationships among Dehy-

drogenases. En The enzymes. Vol. XI Oxidation - Reduction. Part A. Third Edition, Paul D. Boyer (Ed.) Academic Press, New York. p. 61-102.

Schachter, H., Sarney, J. McGuire, E. y Roseman, S. (1969). Isolation of diphosphopyridine nucleotide-dependent L-fucose dehydrogenase from pork liver. J. Biol. Chem. **224**, 4785-4792.

Segal, S. y Foley J.B. (1959). The metabolic fate of  $^{14}\text{C}$ -labeled pentoses in man. J. Clin. invest. **38**, 407-413.

Smiley, J.D. y Ashwell, G. (1961) Purification and properties of  $\beta$ -L-hydroxy acid deshydrogenase. II. Isolation of  $\beta$ -keto-L-gulonic acid, an intermediate in L-xylulose biosynthesis. J. Biol. Chem. **236**, 357-364.

Spector, L.B. (1982). Covalent Catalysis by Enzymes. Springer-Verlag. New York. p. 33.

Sols, A. y Crane, R. (1954). Substrate specificity of brain hexokinase. J. Biol. Chem. **210**, 581-595.

Ureta, T. y Radojković, J. (1970) Cromatographic and electrophoretic evidence for several sugar deshydrogenase in mammalian liver. FEBS Lett. **9**, 57-60.

van Heyningen, R. (1958) Metabolism of xylose by the lens. Calf lens in vitro. Biochem. J. **69**, 481-491.

Weser, E. y Laster, L. (1968). Metabolism of D-xylose and D-xylic acid in vivo and in vitro by the guinea pig. Biochem. Med. **2**, 53-69.

Wissler, J. y Logemann, E. (1984). En Methods of Enzymatic Analysis. Third Edition. Ed. H. Bergmeyer. Volume VI Metabolites 1: Carbohydrates. D-xylose. pp. 449-465.

Yamanaka, K., Gino, M. y Kaneda, R. (1977). A specific NAD-D-xylose dehydrogenase from Anthrobacter sp. Agri. Biol. Chem. **41**, 1493-1499.