

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

ENZIMAS FOSFORILANTES DE GLUCOSA EN
MUCOSA DE INTESTINO DE RATA

Tesis de Prueba para Optar al
Grado de Magister en Ciencias
Biológicas con Mención en
Enzimología.

MARIA LILA VERA CARO

PATROCINANTES DE TESIS:

HERMANN NIEMEYER F.

MARIA DE LA LUZ CARDENAS C.

SANTIAGO DE CHILE

1981

ENZIMAS FOSFORILANTES DE GLUCOSA EN MUCOSA DE INTESTINO DE RATA

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias con Mención en Enzimología

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular

por

Marfa Lila Vera Caro

Abril, 1981

Patrocinantes: Hermann Niemeyer F.
Marfa de la Luz Cárdenas C.

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile
Santiago

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E M A G I S T E R

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

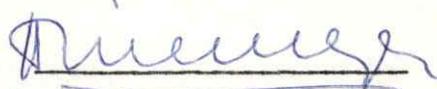
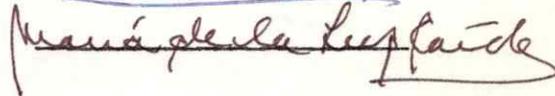
MARIA LILA VERA CARO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Magister en Ciencias con Mención en Enzimología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día

Patrocinantes de Tesis :

Hermann Niemeyer F.

María de la Luz Cárdenas C.

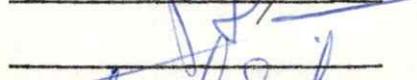



Comisión Informante de Tesis :

Tito Ureta A.

Fernando Zambrano B.

Leonel Gil H.


Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los profesores Hermann Niemeyer F. y María de la Luz Cárdenas C.

A mi madre

A mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Al Dr. Hermann Niemeyer por su apoyo constante, estímulo y por sus enseñanzas que han enriquecido mi formación durante el desarrollo de esta tesis.

A la Srta. María de la Luz Cárdenas por el gran apoyo y ayuda que me brindó durante la investigación y en la discusión y revisión de los manuscritos.

Al Sr. Nicolás Piwonka, egresado de Licenciatura en Biología, por la confección de las fotograffas.

A la Sra. Serena Mann por la confección de los dibujos.

A la Dra. Alicia Carrasco y Dr. Fernando Zambrano por las facilidades y ayuda prestadas.

A la Sra. Alicia Pinilla por la transcripción mecanográfica.

A todos los integrantes del laboratorio de Bioquímica y de Biología Molecular por brindarme su amistad y la oportunidad de convivir con ellos en un ambiente crítico, estimulante y de alta calidad humana.

INDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCION	1
Isoenzimas de hexoquinasas	1
Naturaleza y número de hexoquinasas en mucosa intestinal	3
Hexoquinasas particuladas de intestino	5
Propósitos de este trabajo	6
Principales resultados	7
2. MATERIALES Y METODOS	8
Animales	8
Preparación de homogeneizado de mucosa intestinal	8
Medición de la actividad enzimática	9
Determinación de protefnas	12

	página
Determinación de la concentración de KCl en solución	12
Cálculo de los parámetros cinéticos	12
Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa	13
Cromatografía en Sephadex	14
Cromatografía de afinidad	17
Precauciones en el trabajo cromatográfico	19
Precipitación con sulfato de amonio	19
Electroforesis en geles de poliacrilamida	20
Electroforesis en membrana de acetato de celulosa	22
3. RESULTADOS	24
Actividad de extractos crudos de mucosa intestinal	24
Separación cromatográfica de las hexoquinasas	24
Separación cromatográfica de N-acetilglucosamina- quinasa	26
Purificación de las enzimas fosforilantes de glucosa	29
Estabilidad de las hexoquinasas A y B	38
Constantes de Michaelis para glucosa de las isoenzimas A y B	38
Constante de Michaelis de la N-acetilglucosamina- quinasa	42
Especificidad de sustrato de hexoquinasas y de N-acetilglucosamina-quinasa	47
Peso molecular de hexoquinasas y de N-acetilgluco- samina-quinasa	49

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA I. Purificación de la hexoquinasa A de mucosa de intestino de rata	35
TABLA II. Purificación de la hexoquinasa B de mucosa de intestino de rata	36
TABLA III. Purificación de la N-acetilglucosamina-quinasa de mucosa de intestino de rata	37
TABLA IV. Valores de K_m aparentes de hexoquinasas y de N-acetilglucosamina-quinasa de diferentes tejidos	43
TABLA V. Especificidad de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglucosamina-quinasa de mucosa de intestino de rata	48

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Cromatografía en DEAE-celulosa de ATP: glucosafosfotransferasas del intestino delgado de rata	25
FIGURA 2. Separación cromatográfica en DEAE-celulosa de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilgluco- samina-quinasa	27
FIGURA 3. Separación cromatográfica en DEAE-celulosa de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglu- cosamina-quinasa	28
FIGURA 4. Cromatografía en Sephadex G-200 de la hexoqui- nasa A	30
FIGURA 5. Cromatografía en Sephadex G-200 de la hexoqui- nasa B	31
FIGURA 6. Cromatografía en Sephadex G-100 de la N-acetil- glucosamina-quinasa	33
FIGURA 7. Cromatografía de afinidad en Sefarosa-glucosa- mina de la hexoquinasa B	34

	Página
FIGURA 8. Estabilidad de las hexoquinasas A y B	39
FIGURA 9. Función de saturación con glucosa de la hexoquinasa A	40
FIGURA 10. Función de saturación con glucosa de la hexoquinasa B	41
FIGURA 11. Función de saturación con N-acetilglucosamina de la N-acetilglucosamina-quinasa	44
FIGURA 12. Función de saturación con ATP de la N-acetilglucosamina-quinasa	45
FIGURA 13. Función de saturación con glucosa de la N-acetilglucosamina-quinasa	46
FIGURA 14. Determinación del peso molecular de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglucosamina-quinasa	50
FIGURA 15. Electroforesis en geles de poliacrilamida de S ₁ de mucosa intestinal y de glucoquinasa y N-acetilglucosamina-quinasa purificadas	52
FIGURA 16. Electroforesis en membranas de acetato de celulosa de S ₁ de mucosa intestinal y de glucoquinasa y N-acetilglucosamina-quinasa purificadas	54

LISTA DE ABREVIATURAS

DEAE-celulosa	: Dietilaminoetilcelulosa
DTT	: Ditiotreitól
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
2-ME	: Beta-mercaptoetanol
Tris	: Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

1. Este trabajo está destinado a investigar las enzimas con actividad fosforilante de glucosa de la mucosa intestinal de rata, pues no están suficientemente definidos su número y su naturaleza en este tejido. No hay acuerdo sobre el número de enzimas de K_m baja (hexoquinasas) y es discutible la presencia de la isoenzima de K_m alta (glucoquinasa); como la última, puede ser confundida con la actividad fosforilante de glucosa de la N-acetilglucosamina-quinasa, este punto fue especialmente investigado. La actividad fosforilante de glucosa se presenta en la mucosa intestinal tanto en el citosol como asociada a la fracción particulada, pero no se conoce cuales enzimas son las particuladas.
2. La mucosa del intestino delgado de ratas alimentadas con dieta normal, se homogeneizó al 20% (p/v) y después de una centrifugación a 105.000 g durante 60 min, se aislaron las enzimas del líquido sobrenadante y del sedimento por métodos cromatográficos.
3. Por medio de la cromatografía en DEAE-celulosa con gradiente de concentración de KCl se separaron del sobrenadante tres fracciones enzimáticas capaces de fosforilar glucosa. Las que eluyen a concentraciones aproximadas de 55 mM y 115 mM corresponden a hexoquinasas

(E.C.2.7.1.1.) A y B, respectivamente; la que eluye a 250 mM corresponde a una N-acetilglucosamina-quinasa (E.C.2.7.1.59) con actividad quinásica secundaria para glucosa. De la fracción particulada se separaron solo dos fracciones con actividad fosforilante de glucosa, que corresponden a las hexoquinasas A y B. También se identificaron estas isoenzimas mediante la electroforesis en geles. Ni la cromatografía de intercambio iónico ni la electroforesis en geles de poliacrilamida o en membranas de acetato de celulosa revelaron la presencia de glucocinasa o hexocinasa C en la mucosa intestinal.

4. Las enzimas se purificaron parcialmente por medio de filtración en gel (hexoquinasas en Sephadex G-200 y N-acetilglucosamina-quinasa en Sephadex G-100), y la hexocinasa B se sometió a una etapa de mayor purificación mediante la cromatografía de afinidad en sefarosa-glucosamina.
5. El peso molecular de ambas hexoquinasas, A y B, fue 98.300 y el de la N-acetilglucosamina-quinasa fue 56.000.
6. Las K_m para glucosa fueron 0,025 mM y 0,074 mM para las hexoquinasas A y B, respectivamente. La especificidad de sustrato fue similar a la descrita para hexoquinasas en otros tejidos; además de glucosa, fosforilan manosa, fructosa y 2-desoxiglucosa.

7. La K_m de la N-acetilglucosamina-quinasa para N-acetilglucosamina fue 0,021 mM y para ATP fue 0,38 mM. La enzima fosforila también glucosa, manosa, fructosa, 2-desoxiglucosa y glucosamina. La función de saturación con glucosa fue compleja, semejando un fenómeno de cooperatividad negativa. La K_m aproximada es del orden de 100 mM.

8. Las propiedades cinéticas, así como el peso molecular, la movilidad cromatográfica y electroforética de la N-acetilglucosamina-quinasa explican algunos resultados de la literatura mal interpretados como debidos a la presencia de glucoquinasa en la mucosa intestinal.

ABSTRACT

1. The aim of this work was to investigate the glucose phosphorylating enzymes of rat intestinal mucosa since their number and nature are not well defined. There is not full agreement on the number of the low- K_m enzymes (hexokinases) and the presence of the high- K_m enzyme (glucokinase) is doubtful. As the latter one may correspond to the glucose phosphorylating activity of N-acetylglucosamine kinase, this point was especially investigated. The glucose-phosphorylating activity is found in the cytosol and associated with the particulate fraction, although it is not known which enzymes are in the last condition.
2. The mucosa of the small intestine from normally fed rats, was homogenized to 20% (w/v) and after a centrifugation at 105.000 g for 60 min the enzymes were isolated from the supernatant and from the sediment by chromatographic methods.
3. Three fractions with glucose-phosphorylating activities were obtained from the supernatant fluid by means of DEAE-cellulose chromatography using a gradient of KCl concentrations. Those eluting at 55 mM and 115 mM KCl correspond to hexokinases (E.C.2.7.1.1.) A and B, respectively and that eluting at 250 mM KCl is N-acetylglucosamine kinase (E.C.2.7.1.59.), which is also able to phosphorylate glucose. From

the sediment only hexokinases A and B were extracted: All these enzymes were also identified by gel electrophoresis. Neither ion exchange chromatography nor electrophoresis in polyacrylamide or cellulose acetate gels revealed the presence of glucokinase or hexokinase C in the intestinal mucosa.

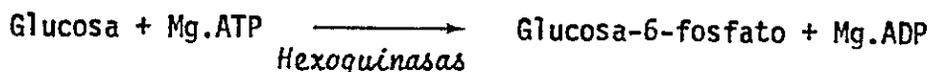
4. The enzymes were partially purified through gel filtration (Sephadex G-200 for hexokinases and Sephadex G-100 for N-acetylglucosamine kinase). Hexokinase B was further purified by affinity chromatography on Sepharose-glucosamine.
5. The molecular weight of both hexokinases A and B was 98,300 and that of N-acetylglucosamine kinase was 56,000.
6. The K_m for glucose of hexokinases A and B were 0.025 mM and 0.074 mM, respectively. Substrate specificity was the same found for enzymes from other tissues, *i.e.*, they phosphorylate glucose as well as mannose, fructose and 2-deoxyglucose.
7. The K_m of N-acetylglucosamine kinase for N-acetylglucosamine was 0.021 mM and for ATP was 0.38 mM. The enzyme also phosphorylates glucose, mannose, fructose, 2-deoxyglucose and glucosamine. The saturation function with glucose was complex, mimicking negative cooperativity. An approximate value of K_m was estimated in the order of 100 mM.

8. The kinetic properties, as well as the molecular weight and chromatographic and electrophoretic mobilities of N-acetylglucosamine kinase may explain some results misinterpreted as due to the presence of glucokinase in the intestinal mucose.

1. INTRODUCCION

Isoenzimas de hexoquinasas

Las hexoquinasas o glucosa-6-fosfotransferasas (ATP-D-hexosa-6-fosfotransferasas, EC.2.7.1.1.) son enzimas que catalizan la fosforilación de la glucosa según la reacción:



Poco después de la demostración de dos actividades enzimáticas fosforilantes de glucosa en el hígado de rata (Walker, 1963; Viñuela y col., 1963), en este laboratorio González y col. (1964) descubrieron la presencia en el mismo material biológico de una familia de cuatro glucosa-fosfotransferasas, denominadas A, B, C y D de acuerdo al orden de elución en columnas de DEAE-celulosa. Este hallazgo fue pronto confirmado, haciendo uso de la electroforesis en geles de almidón, por Katzen y col. (1965), quienes las denominaron I, II, III, IV, respectivamente, según su movilidad creciente hacia el ánodo. Esta última nomenclatura ha sido mayormente utilizada en la literatura, pero mantendremos la original en este trabajo. Las isoenzimas eran distinguibles por sus propiedades cinéticas, electroforéticas, cromatográficas y de estabilidad térmica. Las isoenzimas A, B, y C, llamadas comúnmente hexoquinasas, presentan bajas constantes de Michaelis para la glucosa (0,1 a 0,01 mM), una amplia especificidad de sus-

trato y un peso molecular de alrededor de 100.000 (González y col., 1964, 1967; Ureta, 1965; Grossbard y Schimke, 1966; Pilkis y col., 1968; revisiones en Colowick, 1973 y Niemeyer y col., 1975b). La isoenzima C presenta, además, la característica especial de ser inhibida por exceso de glucosa (González y col., 1964; Ureta, 1965). La isoenzima D, llamada también glucoquinasa (Viñuela y col., 1963), tiene una K_m ($K_{0.5}$) alta para glucosa (ca.10 mM), y exhibe una función de saturación con glucosa de carácter sigmoideo, una especificidad de sustrato algo más restringida que las hexoquinasas y un peso molecular alrededor de 55.000 (González y col., 1964, 1967; Ureta, 1965; Salas y col., 1965; Pilkis, 1972; Grossman y col., 1974; Niemeyer y col., 1975b; Holroyde y col., 1976; Storer y Cornish-Bowden, 1976; Cárdenas y col., 1978; Maccioni y Babul, 1981).

El valor alto de $K_{0.5}$ para glucosa (7,5 mM a pH fisiológico) de la glucoquinasa hepática tiene un significado funcional importante, ya que así la enzima puede controlar la fosforilación del sustrato en relación a su concentración en la sangre que llega a la célula hepática. La glucoquinasa es la única isoenzima fosforilante de glucosa cuyos niveles se modifican en el hígado en relación con la disponibilidad de insulina, glucagón y catecolaminas y de acuerdo a la cantidad y naturaleza de la dieta (revisiones en Niemeyer y Ureta, 1972; Niemeyer y col., 1975b; y Weinhouse, 1976). Así, el nivel hepático de glucoquinasa disminuye durante el ayuno y cuando se suministra una dieta exenta o pobre en hidratos de carbono, y aumenta en respuesta al suministro de glucosa y otros carbohidratos en la dieta, siendo impedido este aumento por glucagón y adrenalina; también disminuye el nivel en la diabetes y se recupera con insulina (revisiones

en Niemeyer y Ureta, 1972; Niemeyer y col., 1975b; y Weinhouse, 1976).

Las hexoquinasas se encuentran en todos los tejidos de la rata, en número y proporciones relativas diferentes (Katzen y Schimke, 1965; Grossbard y col., 1966). En cambio, la glucoquinasa parece ser una enzima típica del hígado, aunque se ha comunicado su presencia en reticulocitos de conejo (Gerber y col., 1970), cerebro humano (Bachelard, 1967), riñón de rata (Pilkis y Hansen, 1968), páncreas de ratón (Ashcroft y Randle, 1970) e intestino de rata (Stifel y col., 1968; Weiser y col., 1971a; Anderson y Tyrrell, 1973; Anderson y King, 1975). La distinción de las isoenzimas se ha hecho habitualmente sobre la base de su comportamiento cromatográfico en columnas de intercambio aniónico (González y col., 1964; Ureta, 1965; González y col., 1967) y de su movilidad relativa en electroforesis de zona en gel de almidón (Katzen y col., 1965; Katzen y Schimke, 1965) o de acetato de celulosa (Sato y col., 1969; Anderson y Tyrrell, 1973; Anderson y King, 1975). Se complementa, en primera aproximación, la identificación con el criterio de usar dos concentraciones de glucosa (0,5 mM y 100 mM) en el ensayo. Las hexoquinasas A y B muestran aproximadamente igual actividad, mientras la glucoquinasa es más activa a 100 mM y la hexoquinasa C a 0,5 mM, en virtud de los valores de K_m de las isoenzimas y de la inhibición por exceso de glucosa de la isoenzima C (ver discusión de este problema en Niemeyer y Ureta, 1972).

Naturaleza y número de hexoquinasas en mucosa intestinal

Existen opiniones controvertidas sobre el número y la naturaleza de las isoenzimas de hexoquinasa en la mucosa intestinal. Katzen y Schimke (1965),

por medio de la electroforesis en gel de almidón, identificaron solo dos bandas de actividad enzimática, correspondientes a las hexoquinasas A y B, en el sobrenadante de una centrifugación a 105.000 g del homogeneizado de intestino de rata. Además, describieron una tercera banda de actividad visible cuando la tinción se realizaba en presencia de glucosa 0,5 mM, y que desaparecía con glucosa 100 mM, lo que sugería fuera isoenzima C. Srivastava y col. (1968), haciendo uso del mismo método de electroforesis en gel de almidón, identificaron en la fracción sobrenadante de un homogeneizado de mucosa intestinal de rata y de cuy dos bandas de actividad hexoquinásica, cuyas movilidades electroforéticas sugerían que fueran hexoquinasas A y B, lo que fue confirmado por cromatografía en DEAE-celulosa. Stifel y col. (1968), basándose solo en la diferencia de actividad con dos concentraciones de glucosa (0,5 y 100 mM) en extractos crudos de intestino de rata, postularon la presencia de una hexoquinasa de K_m alta (glucoquinasa), que aumentaría su actividad con una dieta alta en glucosa. Weiser y col. (1971)

encontraron las hexoquinasas A y B, pero sugirieron la existencia en el intestino de rata, pero no de cuy, de las isoenzimas C y D en "cantidades extremadamente pequeñas y probablemente no significativas", basándose en el comportamiento frente a concentraciones variables de glucosa de algunas fracciones provenientes del pico de hexoquinasa B (II) de una cromatografía en DEAE-celulosa.

Además de las isoenzimas de K_m baja (A, B y C), Anderson y colaboradores (Anderson y Tyrrell, 1973; Anderson y King, 1975) señalaron la presencia de una glucosa-fosfotransferasa de K_m alta en intestino de rata, que correspondería a glucoquinasa. Utilizaron en sus estudios la electrofore-

sis en acetato de celulosa de la fracción no particulada de un homogeneizado de mucosa yeyunal. En presencia de concentraciones de glucosa 100 mM (alta) podían distinguir 4 bandas con actividad enzimática, que corresponderían a las hexoquinasas A, B, C y D, pues la última banda no era visible al usar concentraciones bajas de glucosa (0,5 mM) y, por otro lado, la que correspondería a la isoenzima C sería más visible con baja concentración del sustrato.

Hexoquinasas particuladas de intestino

Fuera del problema del número y naturaleza de las glucosa-fosfotransferasas, existe el problema de su ubicación en la célula. En varios trabajos se ha mostrado que una considerable cantidad de la actividad hexoquinásica total de las células epiteliales intestinales, tanto de rata como de cuy, está unida a la fracción particulada, es decir, al sedimento resultante de una centrifugación a velocidad variable (Long, 1953; Srivastava y col., 1968; Mayer y Hübscher, 1971; Weiser y col., 1971a; Anderson y Tyrrell, 1973; Anderson y King, 1975; May y Mc Carthy, 1976), en su mayor parte en la fracción mitocondrial (Mayer y Hübscher, 1971; May y Mc Carthy, 1976; Anderson y King, 1975). No se han identificado, sin embargo, cuales son las isoenzimas unidas a las mitocondrias.

Anderson y Tyrrell (1973) y Anderson y King (1975) encontraron una respuesta adaptativa de la mucosa yeyunal a las alteraciones dietarias, que incluía cambios en la distribución intracelular de la hexoquinasa total. Así, en comparación con ratas alimentadas con dieta estándar, la actividad hexoquinásica del homogeneizado disminuía en un 20 a 30% después de

un ayuno de 5 días, en especial en el sobrenadante, y era 20 a 30% mayor cuando la dieta tenía un exceso de glucosa (75%), siendo más precoz el aumento en la fracción mitocondrial (Anderson y Tyrrell, 1973; Anderson y King, 1975). Srivastava y col. (1968) encontraron también una cierta disminución de la actividad hexoquinásica durante el ayuno y Stifel y col. (1968) comunicaron una disminución en el ayuno y un aumento en dieta con glucosa. Por otra parte, Mayer y col. (1970) no observaron una reducción significativa en la actividad hexoquinásica en ratas en ayuno, pero al perfundir el intestino con solución glucosada durante 10 minutos encontraron una disminución de la actividad en el homogeneizado total y un aumento en el sobrenadante. Se reprodujo el efecto con análogos de glucosa (Jones y Mayer, 1973).

Propósitos de este trabajo.

En virtud de trabajos en realización en este laboratorio (Davagnino y Ureta, 1978) se tuvo la sospecha que la enzima identificada como glucoquinasa por algunos autores pudiera corresponder a N-acetilglucosamina-quinasa. La presente investigación se orientó a la identificación de las enzimas fosforilantes de glucosa en el intestino y su distribución entre el sedimento y el líquido sobrenadante de una centrifugación a 105.000 g. Se utilizaron tanto la cromatografía en DEAE-celulosa y la electroforesis en acetato de celulosa, como la electroforesis en gel de poliacrilamida, que no había sido usada con este objeto. Una vez semi-purificadas las enzimas, se estudiaron algunas propiedades cinéticas y fisicoquímicas con el objeto de caracterizarlas.

Principales resultados

Se logró la identificación de las hexoquinasas A y B, tanto en el sobrenadante como en el sedimento de mucosa intestinal.

Los valores de las constantes de Michaelis aparentes para glucosa de las hexoquinasas A y B, así como su especificidad y peso molecular fueron semejantes a los de las isoenzimas de otros tejidos.

No se encontró glucoquinasa, pero se demostró en la fracción sobrenadante la presencia de N-acetilglucosamina-quinasa, enzima que por ser capaz de fosforilar glucosa con muy baja afinidad y por tener migración electroforética semejante a la glucoquinasa puede confundirse con ésta. Las propiedades de la N-acetilglucosamina-quinasa fueron semejantes a las descritas para la enzima de otros tejidos.

En partes estos resultados fueron presentados en Reuniones Anuales de la Sociedad de Biología de Chile (Vera y col., 1976) y de la Sociedad de Bioquímica de Chile (Vera y col., 1977).

2. MATERIALES Y METODOS

Animales

Se emplearon ratas adultas (machos y hembras) con alimento y agua *ad libitum*, a las cuales en algunos casos se les dió a beber solución de glucosa desde dos días antes de su muerte.

Preparación de homogeneizado de mucosa intestinal

Después de decapitar y desangrar cada animal, se abría el abdomen, se extraía rápidamente la porción de intestino que va desde el píloro hasta la válvula ileo-cecal y se sumergía en una solución fría (en hielo) de glucosa 100 mM y KCl 150 mM. Una vez terminada la extracción de los intestinos, éstos se lavaban acuciosamente con NaCl 150 mM (suero fisiológico) hasta eliminar todo el contenido intestinal y luego se mantenían de nuevo en la solución fría de glucosa 100 mM y KCl 150 mM. Para obtener la mucosa, el intestino se evertía sobre papel filtro y se procedía, de acuerdo al método de Anderson y Zakim (1970), a raspar suavemente la mucosa con un porta-objeto (lámina de vidrio) de bordes esmerilados. Se pesaba la mucosa y se suspendía en 4 volúmenes (20% p/v) de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0 que contenía etilendiaminatetraacetato (EDTA) 1 mM, beta-mercáptoetanol (2-ME) 5 mM y glucosa 100 mM. El tejido se homogeneizaba en un homogeneizador Potter-Elvehjem acondicionado con un émbolo de

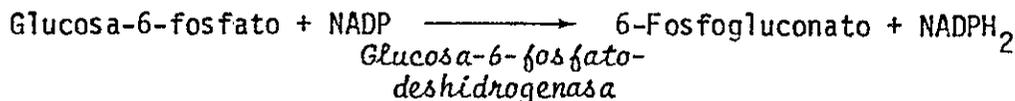
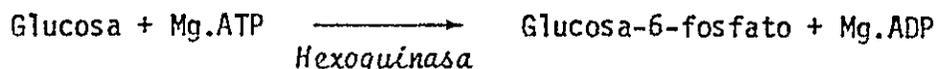
teflón, y luego se centrifugaba a 105.000 g en una ultracentrifuga Spinco modelo L durante 60 minutos. Los líquidos sobrenadantes se extraían por aspiración con jeringa.

Para medir las enzimas de la fracción particulada se trataba el sedimento de la centrifugación anterior con Tritón X-100 al 0,5% durante 30 minutos y se volvía a centrifugar a 105.000 g durante 60 minutos, extrayéndose el líquido sobrenadante.

Medición de la actividad enzimática

La determinación de la actividad fosfotransferásica se hacía a través de la medición espectrofotométrica de glucosa-6-fosfato (*método A*) o de ADP (*método B*) formados en la reacción, utilizando enzimas auxiliares. A continuación se describen brevemente los dos métodos utilizados.

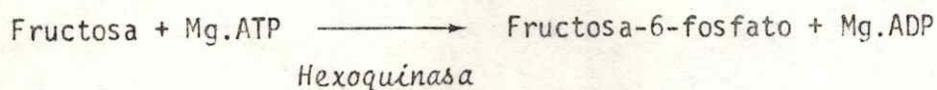
Método A (medición de glucosa-6-fosfato). Se acopla la reacción de fosforilación con la de deshidrogenación del glucosa-6-fosfato (Slein y col., 1950).

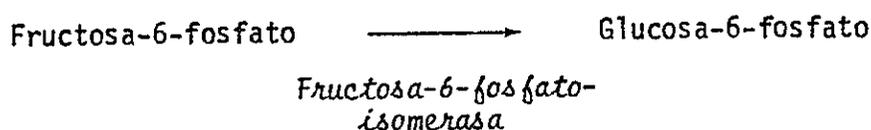


En este procedimiento se mide la velocidad de reducción del NADP, registrando el aumento de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Gilford 2400, provisto de un termóstato para mantener la temperatura a 30°.

El medio de reacción contenía los siguientes componentes en un volumen final de 0,5 ml: Tris-HCl 80 mM, pH 7,5; MgCl₂ 12 mM; KCl 100 mM; EDTA 1 mM; NADP 0,5 mM; 0,1 - 0,2 unidades de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa; ATP 5 mM; glucosa a concentraciones variables y la enzima a medir (Niemeyer y col., 1975a). Los diferentes reactivos se agregaban en un orden constante: se colocaban 0,3 ml de una mezcla que contenía todos los componentes del ensayo menos la glucosa, el ATP y la enzima; en seguida se agregaban en forma sucesiva 50 µl de ATP, 100 µl de la enzima (3 a 15 mU) y finalmente 50 µl de glucosa a la concentración seleccionada, que iniciaba la reacción. El sistema se preincubaba a 30° durante 3 min antes de iniciar la reacción, y luego se medía el aumento de absorbancia a 340 nm durante algunos minutos. Se utilizaba como blanco un sistema en el que se omitía el ATP, y cuyo valor corresponde a una actividad glucosa-deshidrogenasa de la enzima auxiliar; esta no mostró tener actividad hexoquinásica contaminante, por lo que no era necesario hacer sistemáticamente blancos en los que se omitiera la preparación enzimática problema.

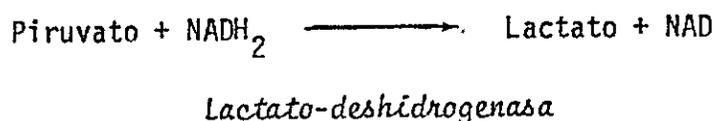
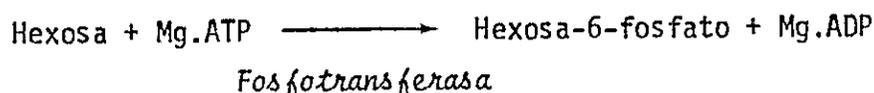
En los estudios cinéticos en que se utilizó fructosa como sustrato de la hexoquinasa, se empleó una modificación del método descrito. Consistía en determinar espectrofotométricamente el glucosa-6-fosfato formado al acoplar el sistema de la hexoquinasa con el de glucosa-6-fosfato-isomerasa, según la siguiente secuencia de reacciones:





El sistema de reacción tenía los mismos componentes ya descritos, más una unidad de fructosa-6-fosfato-isomerasa.

Método B (medición de ADP). Se acopla la reacción de la hexoquinasa con las de la piruvato-quinasa y de la lactato-deshidrogenasa (Kornberg y Pricer, 1951) de acuerdo a las siguientes reacciones:



En este caso la reacción de fosforilación se midió por registro de la disminución de la absorbancia a 340 nm, que corresponde a la desaparición del NADH_2 inicial. El medio de reacción contenía los siguientes componentes, en un volumen final de 0,5 ml: tris-HCl 80 mM, pH 7,5; KCl 100 mM; NADH_2 0,25 mM; MgCl_2 12 mM; fosfoenolpiruvato 1,2 mM; EDTA 1,6 mM; 1 unidad internacional de piruvato-quinasa y 1 unidad de lactato-deshidrogenasa; soluciones de la hexosa y de la enzima. La reacción se iniciaba con la adición del sustrato. Como blanco se usaba un sistema semejante en el que se omitía la hexosa. El 2% de ADP que aproximadamente contienen las preparaciones comerciales de ATP se convertía en

ATP al preincubar el sistema por cinco minutos antes de agregar el sustrato. Un blanco sin hexosa medía la actividad ATP-ásica de la muestra enzimática, que es importante sólo en los extractos crudos. Este método se utilizó para medir la actividad N-acetilglucosamina-quinasa con cualquier sustrato, y también la de las hexoquinasas con diversos sustratos, excluidos glucosa y fructosa.

Una unidad de enzima corresponde a la cantidad de enzima que fosforila un micromol de sustrato en un minuto a 30° en las condiciones establecidas. Para el cálculo se utilizó el coeficiente de extinción molar de NADPH_2 y NADH_2 que es $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ a 340 nm para cubetas de un centímetro de paso de luz.

Determinación de proteínas

Se hacía mediante la medición de la absorbancia a 280 y 260 nm, según el método de Warburg y Christian (Dawson y col., 1972).

Determinación de la concentración de KCl en solución

Para medir las concentraciones de KCl de las fracciones eluidas de las columnas cromatográficas de DEAE-celulosa se utilizó un conductímetro marca Radiometer, calibrado con soluciones estándares de KCl.

Cálculo de los parámetros cinéticos

Los valores de la velocidad máxima (V) y de la constante de Michaelis (K_m) aparente se obtuvieron a partir de la línea de regresión que ajusta

los datos experimentales a la transformación lineal de Lineweaver y Burk (1934) de la ecuación de Michaelis-Menten. La línea de regresión fue calculada por el método de los cuadrados mínimos.

Las curvas de los gráficos correspondiente a la función de Michaelis-Menten (velocidad en función de la concentración del sustrato) en las figuras 9 a 12 corresponden a las calculadas sobre la base de los parámetros cinéticos obtenidos.

Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

La DEAE-celulosa se suspendía en 5 volúmenes de agua destilada y se sometía a un procedimiento de decantación para extraer partículas finas de menor tamaño, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. El intercambiador iónico se trataba luego con ácido y álcali antes de ser equilibrado con la solución amortiguadora que se utilizaba en la cromatografía. Para realizarlo, se colocaba la suspensión del intercambiador (100 a 400 ml) en un embudo Büchner, provisto de papel Whatman # 1, conectado a un sistema de vacío. Se trataba sucesivamente la DEAE-celulosa con 10 volúmenes de HCl 0,5 N, 15 volúmenes de agua destilada, 10 volúmenes de NaOH 0,5 N y nuevamente 15 volúmenes de agua. Luego se transfería a un vaso de precipitado, donde se lavaba con 5 volúmenes de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0. Los intercambiadores que habían sido utilizados en cromatografía se dejaban en una solución de NaCl 1 M durante una hora antes de someterlos al proceso de regeneración.

La cromatografía en DEAE-celulosa se usó con fines preparativos en la purificación de las quinasas y con fines analíticos en la determinación del

número de isoenzimas y proporciones relativas de éstas. En ambos casos el método empleado era básicamente el mismo, variando sólo la cantidad de mucosa intestinal procesada, el tamaño de las columnas y los volúmenes de líquidos empleados.

En la purificación, el líquido sobrenadante de la centrifugación del homogeneizado a 105.000 g (S_1) se colocaba en una columna de DEAE-celulosa, habitualmente de 1 cm de diámetro por 18 cm de altura (14 ml de cama), previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfato 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM y 2-ME 5 mM. La cantidad de muestra empleada era variable de acuerdo al material disponible, normalmente alrededor de 10 g de mucosa. Una vez colocada la solución que contenía la enzima, se lavaba la columna con la misma solución amortiguadora (200 ml) con el objeto de arrastrar las proteínas no retenibles. Las enzimas se eluían con KCl en un gradiente lineal de concentración de 0 a 0,5 M, preparado en la solución amortiguadora (volumen total 240 ml). Se recolectaban 2,1 ml por tubo. Se medían la actividad hexoquinásica con glucosa 0,5 mM y 100 mM (ocasionalmente 400 mM) con el *método A* y la N-acetilglucosamina-quinásica con el *método B*.

En las ocasiones en que se procesó una mayor cantidad de mucosa, se usó una columna de 28 ml de cama y volumen de líquido eluyente de 480 ml. Con fines analíticos se usó la mucosa intestinal de sólo una o dos ratas, empleándose en este caso una columna de 0,5 x 10 cm (2 ml) ó de 0,7 x 10,5 cm (4 ml) con volúmenes de elución de 34 ml y 68 ml respectivamente.

Cromatografía en Sephadex

Para preparar los geles de Sephadex, se dejaban hidratar como mínimo 2

días en agua destilada, según lo recomiendan los fabricantes (Pharmacia Fine Chemical, 1968). Se lavaban con 5 volúmenes de agua destilada y luego se equilibraban en solución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0. De esta manera el gel quedaba listo para ser utilizado en la columna de filtración.

La cromatografía en Sephadex se usó con fines preparativos en la purificación de las quinasas y con fines analíticos en la determinación de pesos moleculares. El método usado con ambos fines era esencialmente el mismo, variando solo el tamaño de las columnas según el caso. Las columnas se equilibraban y filtraban en cámara fría (aproximadamente 4°).

Uso en purificación de quinasas. Cuando se efectuaba la filtración en gel con fines preparativos, el precipitado de sulfato de amonio correspondiente a las hexoquinasas A o B de la cromatografía de intercambio iónico se suspendía en 1 a 2 ml de una solución amortiguadora de fosfato 10 mM, pH 7,0, que contenía: KCl 100 mM; EDTA 1 mM; 2-ME 5 mM; glucosa a 10 ó 100 mM, y sacarosa 20% (p/v). La suspensión se colocaba con una jeringa en una columna de Sephadex G-200 de 2 x 48 cm previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfato 10 mM, pH 7,0 que contenía KCl 100 mM, EDTA 1 mM y 2-ME 5 mM. La elución de la enzima se hacía con esta misma solución, colectando fracciones de 1 ml, con flujo de salida de 0,3 ml/min. En el eluido se medía la actividad enzimática y la absorbancia a 280 nm. Se seleccionaban y juntaban las fracciones con mayor actividad enzimática.

Para la filtración de N-acetilglucosamina-quinasa con fines preparativos, se utilizaba una columna de Sephadex G-100 de 3 x 64 cm. La solución de equilibrio y elución era la misma usada para las hexoquinasas. Se

colectaban fracciones de 2 ml.

Uso en determinación de pesos moleculares. La determinación de pesos moleculares aparentes para las hexoquinasas y la N-acetilglucosamina-quinasa, se hizo por medio de filtración en columna de geles, según el método de Andrews (1964). Este consiste en comparar los volúmenes de elución de las enzimas con los de otras proteínas de peso molecular conocido, que sirven como referencia.

Para la cromatografía se aprovecharon las mismas columnas utilizadas con fines preparativos, aunque no es lo más recomendado. Las soluciones de equilibrio y de elución también eran las mismas, pero el flujo se disminuía a 6,5 ml/h.

La concentración de las proteínas de referencia (seroalbúmina de bóvido, ovoalbúmina, alcohol-deshidrogenasa de levadura o de caballo y citocromo c) era de 4 mg/0,5 ml. Se sembraban las columnas en forma desfasada con 1 ml de cada una de las soluciones de las enzimas problemas y de las proteínas marcadoras, las cuales siempre contenían ^{14}C -leucina.

Para determinar el volumen de exclusión (V_0) se usaba azul dextrano 2000 y para determinar el volumen total accesible al solvente (V_i) se usaba ^{14}C -leucina (50.000 cpm). El volumen de elución (V_e) correspondiente a la concentración máxima de soluto se estimaba a partir de un diagrama de elución, extrapolando ambos lados del pico de soluto a un punto de confluencia. Para la estimación de los pesos moleculares se hizo un gráfico del coeficiente de distribución $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$ contra el peso molecular de las proteínas marcadas usadas.

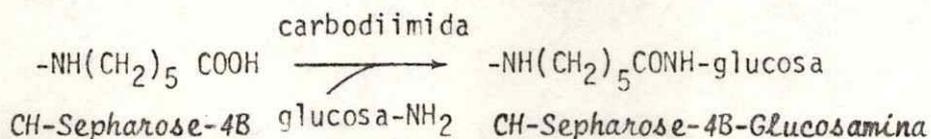
La elución de seroalbúmina de bóvido y ovoalbúmina se detectaba por me-

dición de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Gilford 2000; el citocromo *c* por su absorbancia a 414 nm y el azul-dextrano a 640 nm; la deshidrogenasa alcohólica se determinaba en una mezcla de reacción que contenía (concentraciones finales): amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; 2-ME 5 mM; etanol 220 mM y NAD 0,5 mM. La ^{14}C -leucina se medía en un contador de centelleo Nuclear Chicago con una mezcla estándar de tolueno más Tritón X-100. La actividad hexoquinásica se determinaba por el *método A*.

Cromatografía de afinidad

Para la purificación de la isoenzima B se utilizó, a continuación de la cromatografía en Sephadex, una cromatografía de afinidad en sefarosa que lleva glucosamina unida por medio de un espaciador de ácido 6-amino-hexanoico. El gel de sefarosa-glucosamina (Sepharose-6-aminohexanoil-2-deso-xiglucopiranosa) se preparaba mediante la reacción de acoplamiento entre CH-Sepharose-4B (que tiene el espaciador 6-amino-hexanoico) y la glucosamina, en presencia de hidrocioruro de 1-etil-3-(3-dimetilalilaminopropil)-carbodiimida (EDC) (Pharmacia Fine Chemicals, 1974).

La reacción permite la formación de una unión amida entre el grupo amino de la glucosamina y el grupo carboxilo del ácido 6-aminohexanoico, quedando un derivado ureico de la carbodiimida.



La CH-sepharose-4B se obtiene al estado de polvo seco. Para obtener 20 ml de gel se suspendían 5 g de la sefarosa en 100 ml de NaCl 0,5 M, con el propósito de hidratar. La suspensión se lavaba en un embudo Büchner con 1000 ml de NaCl 0,5 M con el objeto de eliminar lactosa y dextranos que acompañan la sefarosa, y luego con 1000 ml de agua destilada para retirar el exceso de sal. Después de eliminar el agua de lavado, se hacían reaccionar los 20 ml de gel con una solución acuosa de glucosamina 0,1 M y carbodiimida (EDC) 0,1 M en un volumen final de 60 ml. Para otras cantidades de polvo seco de la sefarosa se usan las soluciones en cantidades que guardan la misma proporción. Se mantenía el pH entre 4,5 y 6,0 por medio de HCl o NaOH diluidos. Se dejaba a la temperatura de 25° con agitación suave. Para cumplir este propósito se utilizaba un agitador rotatorio colocado en estufa a la temperatura requerida. Después de 24 h de incubación se controlaba el pH y se lavaba con 200 ml de una solución amortiguadora de acetato de Na 50 mM, pH 3,5 y NaCl 1 M. A continuación se lavaba con 200 ml de amortiguador de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 y luego con bastante agua destilada y solución de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. El gel se mantenía en esta solución y solamente antes de la cromatografía se equilibraba con la solución empleada en la cromatografía.

La hexoquinasa B es retenida en sefarosa-glucosamina bajo condiciones que fueron analizadas en estudios preliminares con respecto a la fuerza iónica de las soluciones de equilibrio, lavado y elución, así como a la concentración de glucosa en la solución eluyente. Estos estudios y otros de este laboratorio (León, 1977; León y col., 1977; Monasterio y col., 1977) permitieron normalizar el procedimiento utilizado que se detallará

en *Resultados*.

Precauciones en el trabajo cromatográfico

Las suspensiones de DEAE-celulosa, Sephadex y sefarosa-glucosamina se guardaban a 4° en la solución amortiguadora de equilibrio en presencia de azida de sodio al 0,02% para evitar la contaminación microbiana, hasta el momento de su uso.

Precipitación con sulfato de amonio

Esta precipitación se utilizaba con el fin de concentrar las enzimas después de la cromatografía en DEAE-celulosa. Las fracciones con mayor actividad de cada una de las enzimas (hexoquinasas o N-acetilglucosamina-quinasa) provenientes de las columnas de DEAE-celulosa, se juntaban y se les agregaba glucosa hasta una concentración final de 10 mM para estabilizar las enzimas. Probablemente la adición de glucosa no era necesaria en el caso de la N-acetilglucosamina-quinasa, que es en general bastante estable. La concentración de sulfato de amonio era 65% de saturación. Los precipitados se guardaban a 4° en el refrigerador. Este tratamiento resultaba útil, pues, además de concentrar las enzimas, las mantenía bastante estables por algunas semanas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida, se realizaba de acuerdo al método de Grossman y Potter (1974). Se utilizaban tubos de vidrio Pyrex de 6 x 70 mm como soporte de los geles. La preparación de los geles se hacía a partir de las soluciones que se describen a continuación.

Soluciones utilizadas

- A) 48 ml de HCl 1 N; 5,98 g de Tris; 0,46 ml de N, N, N', N'-tetrametilendiamina (TEMED) y agua destilada c.s.p. 100 ml. Debe dar pH 6,7.
- B) 10 g de acrilamida; 2,5 g de metilenbisacrilamida (Bis) y agua destilada c.s.p. 100 ml.
- C) 1 mg de riboflavina y agua destilada c.s.p. 25 ml.
- D) glucosa 3 M.
- E) 48 ml de HCl 1 N; 6,85 g de Tris; 0,46 ml de TEMED y agua destilada c,s,p. 100 ml . Debe dar pH 7,5.
- F) 28 g de Acrilamida; 0,5 g de Bis y agua destilada c.s.p. 100 ml.
- G) glucosa 0,2 M.

Las soluciones A, B, E y F son estables por lo menos 3 semanas cuando son mantenidas a 4° en la obscuridad. Las soluciones C, D y G deber ser preparadas en el momento de usar.

Preparación de los geles. Para el gel separador se mezclaban las soluciones en la proporción de 1 parte de E; con 2 partes de F, .1 parte de C y 4 partes de G. 1,8 ml de esta mezcla se agregaban a cada tubo. Se dejaban

los tubos polimerizando en presencia de luz ultravioleta durante 30 min o de luz natural por tiempo más largo (aproximadamente 2 h). En seguida se agregaban 0,3 ml del gel espaciador, que se había preparado como sigue; 1 parte de A; 2 partes de B; 1 parte de C y 4 partes de D. Se dejaban los tubos polimerizando durante 30 min. Se guardaban tapados en el refrigerador.

Procedimiento. Para la colocación de la muestra se mezclaban 0,2 ml de la solución que contenía 50 a 250 μg de proteína, con 5 μl de solución indicadora de azul de bromofenol (0,01%) y 50 μl de glucosa 3 M y se colocaban sobre el gel. La solución de los electrodos era un amortiguador de barbital pH 7,8, de la siguiente composición: ácido barbitúrico 30 mM; EDTA (sal potásica) 4 mM; MgSO_4 5 mM; glucosa 50 mM; DTT 5 mM ó 2-ME 5 mM. El pH se llevaba a 7,8 agregando Tris en sustancia. La corriente aplicada en cada gel era de 3 mA, durante 3,5 h a 4°. En este tiempo el colorante de referencia (azul de bromofenol) migraba hasta aproximadamente el 90% del largo del gel. Una vez terminada la electroforesis se retiraban los geles de los tubos, y se sometían a la tinción de la actividad enzimática.

Tinción de actividad enzimática. Para detectar la posición de las enzimas fosforilantes de glucosa en los geles de poliacrilamida por tinción producida por la actividad enzimática, se utilizó una modificación de la técnica de Katzen y col. (1965). La tinción se hacía por inmersión del gel en una solución semejante a la usada en el ensayo de actividad (*método A*), a la cual se adicionaban fenazina-metasulfato y azul de nitrotetrazolio. A 1 ml de solución que contenía Tris-HCl 200 mM, pH 7,5; MgCl_2 30 mM;

KCl 250 mM, y EDTA 2,5 mM se agregaban: 0,25 ml de NADP 5 mM; 0,25 ml de solución de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (2 U/ml); 0,25 ml de ATP 50 mM; 0,25 ml de glucosa 5 mM (glucosa baja) ó 1 M (glucosa alta); 0,25 ml de fenazina-metosulfato 0,4 mg/ml y 0,25 ml de azul de nitrotetrazolio 4 mg/ml. Como blanco se usaba el gel en contacto con una mezcla de reacción semejante, de la cual se omitía el ATP.

Electroforesis en membrana de acetato de celulosa.

La electroforesis en membrana de acetato de celulosa se realizó de acuerdo al método de Sato y col. (1969). Se utilizaban membranas de acetato de celulosa de 5,7 x 14 cm, las que previamente eran sumergidas en solución amortiguadora de electroforesis durante 30 min como mínimo, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Chemetron).

Las muestras de 1 a 2 μ l de la preparación de enzima, se colocaban con el aplicador a 3 cm de uno de los bordes de la membrana de acetato de celulosa. Las preparaciones enzimáticas fueron de 2 tipos: a) Sobrenadantes y fracciones particuladas de homogeneizados al 50% y b) fracciones semipurificadas provenientes de columnas de Sephadex, concentradas por ultrafiltración en un aparato Amicon (membrana P.M. 10).

La electroforesis se llevaba a cabo a 4° durante 3,5 h (210 min) a un voltaje fijo de 200 voltios totales (13 a 16 mA), usando un amortiguador de barbital pH 8,6. El amortiguador de barbital utilizado contenía los siguientes componentes: barbital sódico 50 mM; glucosa 10 mM; 2-ME 2 mM y EDTA 5 mM. Se llevaba a pH 8,6 con HCl.

Después de realizada la electroforesis se sacaban las membranas, se colocaban sobre una placa de vidrio y se procedía a la tinción de la actividad enzimática.

Tinción de la actividad enzimática. Para la tinción de la actividad enzimática se utilizó la mezcla de tinción utilizada por Sato y col. (1969) con pequeñas variaciones en las concentraciones finales de algunos de los componentes: Tris-HCl 100 mM, pH 7,4; glucosa 200 mM (ó 0,5 ó 400 mM); ATP 5 mM; $MgCl_2$ 5 mM; glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa 20 mU/ml (Sato y colaboradores utilizaron 400 mU/ml); NADP 1 mM; KCN 2 mM; fenazina-metossulfato 12 μ g/ml (Sato y colaboradores utilizaron 25 μ g/ml); azul de nitrotetrazolio 0,38 mg/ml y agar al 1%.

Se necesitaban 7 ml de la mezcla de tinción para cubrir las membranas. La tinción se llevaba a cabo por 120 min a 37° y en la obscuridad.

3. RESULTADOS

Actividad de extractos crudos de mucosa intestinal

En el homogeneizado total de mucosa intestinal, tratado con Tritón X-100 al 0,1%, la actividad glucosa-fosfotransferásica puede estimarse en 4 U/g de tejido. La actividad se encuentra repartida aproximadamente en partes iguales en la fracción soluble del homogeneizado y en el sedimento resultante de la centrifugación a 105.000 g.

Separación cromatográfica de las hexoquinasas

Por cromatografía en columna de DEAE-celulosa, con KCl en un gradiente de concentración de 0 a 0,5 M, se separaron claramente solo dos fracciones enzimáticas con actividad fosforilante de glucosa. Esto se observó tanto en el líquido sobrenadante como en el sedimento del homogeneizado y midiendo la actividad con glucosa 0,5 y con glucosa 100 mM (Fig.1). Esas dos fracciones elúan con KCl 55 mM, la primera, y con KCl 115 mM, la segunda (Fig. 1). Por sus movilidades cromatográficas y sus propiedades cinéticas, que se analizarán más adelante, corresponderían a las isoenzimas A y B respectivamente (González y col., 1964, 1967; Ureta, 1965). Nunca se encontró isoenzima C, o sea, la inhibida por exceso de glucosa (González y col., 1964). Tampoco se encontró isoenzima D (glucoquinasa), que debería haber eluido alrededor de una concentración de KCl de 250 mM, por analogía con

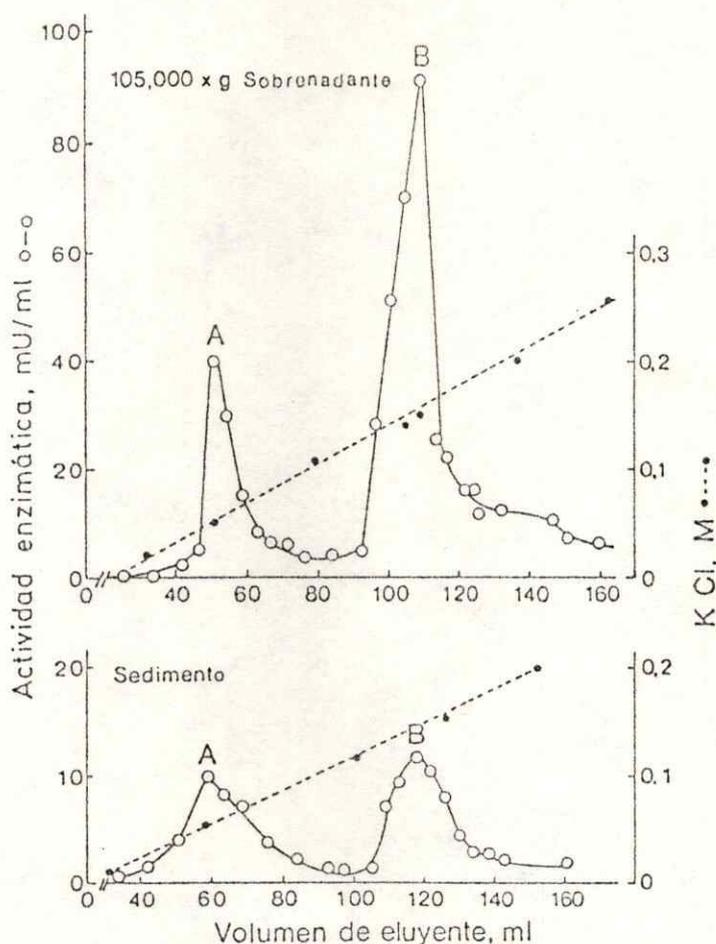


Figura 1. Cromatografía en DEAE-celulosa de ATP: glucosafosfotransferasas del intestino delgado de rata. El raspado de mucosa de intestino delgado proveniente de cinco ratas bien alimentadas, se homogeneizó y se centrifugó a 105.000 g durante 60 minutos, como se describe en *Materiales y métodos*. Perfil superior, fracción sobrenadante. Perfil inferior, fracción particulada tratada con tritón X-100 al 0,5%. Tamaño de la columna, 1 x 14 cm. Volumen del eluyente, 240 ml. Volumen de cada fracción, 2,1 ml. La actividad enzimática se midió con el método A con glucosa 100 mM.

la glucoquinasa de hígado. En algunas cromatografías, la rama de la derecha del pico de la hexoquinasa B presentaba una cola o deformación (ver más adelante).

En 15 preparaciones se encontró que la isoenzima A constituía aproximadamente el $19 \pm 14\%$ de la actividad hexoquinásica total de la fracción soluble, mientras la isoenzima B correspondía al $79 \pm 14\%$ restante. Había bastante variación de un animal a otro, y de una preparación a otra cuando provenían de grupos de animales. Sin embargo, en dos preparaciones destinadas a verificar esta proporción, y que fueron obtenidas de un solo animal cada una, los porcentajes de hexoquinasas A y B para el primer animal fueron 14,5% y 85,5% respectivamente y para el segundo animal fueron 9,6% y 90% respectivamente.

Separación cromatográfica de N-acetilglucosamina-quinasa

La N-acetilglucosamina-quinasa de intestino de rata eluía como un pico separado de la hexoquinasa B (II), a mayor concentración de KCl (250 mM), como se ilustra en la figura 2. Ocasionalmente se presentaba una superposición parcial de ambas actividades. La figura 3 muestra el perfil cromatográfico de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglucosamina-quinasa de la fracción no particulada y del sedimento del homogeneizado de mucosa intestinal de rata. En la fracción soluble (Fig. 3A) se determinó la actividad fosforilante de glucosa a tres concentraciones, 0,5, 100, y 400 mM. Puede observarse que de acuerdo a lo esperado de los valores de las K_m respectivas (ver más adelante) la isoenzima A dió un cuociente de fosforilación de 1 al medir su actividad con glucosa 0,5 y 100 mM, mientras la

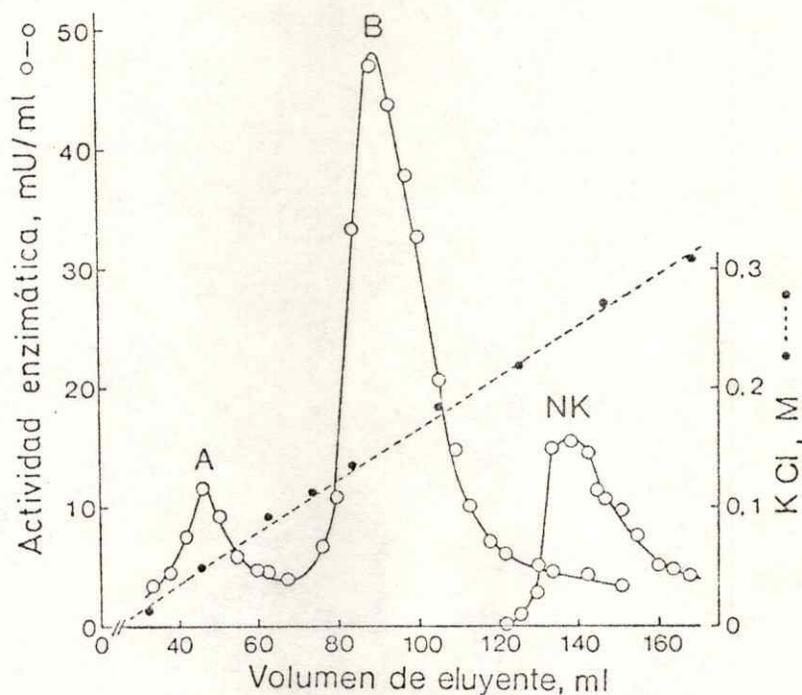


Figura 2. Separación cromatográfica en DEAE-celulosa de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglucosamina-quinasa. Se usó la fracción sobrenadante del centrifugado a 105.000 g de la mucosa de intestino de dos ratas. Las condiciones del experimento fueron iguales a las señaladas en la leyenda de la figura 1. La N-acetilglucosamina-quinasa (NK) se midió con N-acetilglucosamina 2 mM a través de la formación de ADP (método B). Las hexoquinasas se midieron con glucosa 100 mM mediante el método A.

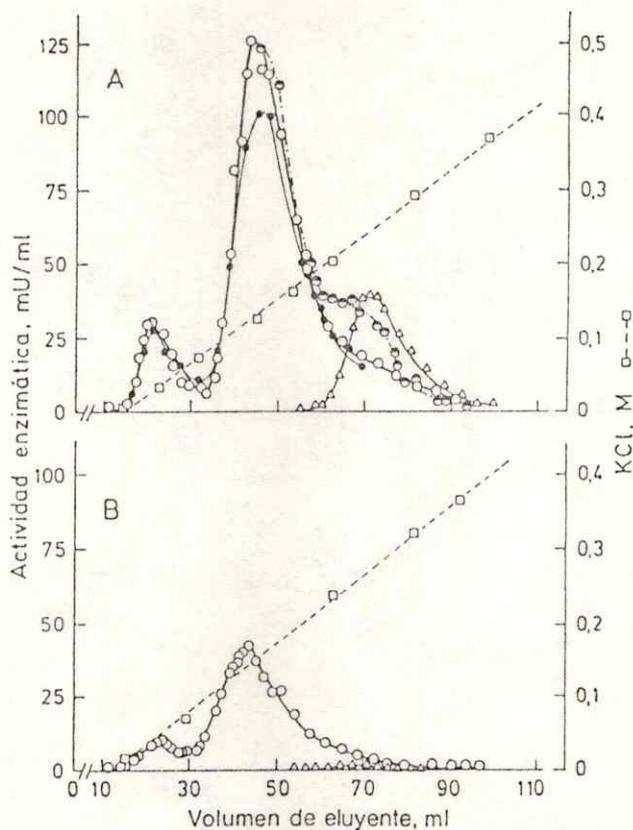


Figura 3. Separación cromatográfica en DEAE-celulosa de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglucosamina-quinasa. La mucosa de intestino proveniente de una rata se homogeneizó y centrifugó como se describe en *Materiales y métodos*. A, fracción sobrenadante; B, fracción particulada. Las condiciones del experimento fueron similares a las señaladas en la leyenda de la figura 1. Tamaño de la columna, 0,6 x 6 cm. Volumen del eluyente, 104 ml. Volumen de cada fracción, 0,9 ml. La actividad de la N-acetilglucosamina-quinasa (\blacktriangle) se midió con N-acetilglucosamina 2 mM mediante el método B y la actividad fosforilante de glucosa de las hexoquinasas y de la N-acetilglucosamina-quinasa con el método A a diversas concentraciones de glucosa: \bullet , 0,5 mM; \circ , 100 mM; \ominus , 400 mM.

isoenzima B mostró una actividad mayor con glucosa 100 y 400 mM. Al ser medida por su actividad fosforilante de glucosa, la N-acetilglucosamina-quinasa aparecía claramente como una deformación u hombro de la hexoquinasa B cuando se utilizaba una concentración alta de glucosa (400 mM). Esto se explica por la capacidad de la N-acetilglucosamina-quinasa de fosforilar glucosa con una K_m muy alta (ver más adelante). En el sedimento tritonizado no se encontró N-acetilglucosamina-quinasa (Fig. 3B) y se estima que los pequeños indicios corresponden a contaminación con la fracción soluble.

Purificación de las enzimas fosforilantes de glucosa

El esquema de purificación fué básicamente el mismo para las hexoquinasas A y B y para la N-acetilglucosamina-quinasa. Consistía en una cromatografía en DEAE-celulosa, seguido de precipitación con sulfato de amonio al 65% de saturación y de cromatografía en Sephadex, utilizando los procedimientos descritos en detalle en *Materiales y métodos*. Las fracciones provenientes de DEAE-celulosa que contenían cada una de las enzimas en forma aislada, se precipitaban con sulfato de amonio al 65% de saturación con el objeto de concentrarlas antes de las filtraciones en gel.

Las figuras 4 y 5 ilustran filtraciones típicas en Sephadex G-200 de las hexoquinasas A y B, respectivamente. La actividad específica de la hexoquinasa A después de Sephadex fue alrededor de cinco veces mayor que la actividad de la enzima de DEAE-celulosa en cuatro preparaciones diferentes y el rendimiento promedio en esta etapa fue de 42%. El grado de purificación de la hexoquinasa B por filtración en Sephadex fue muy variable

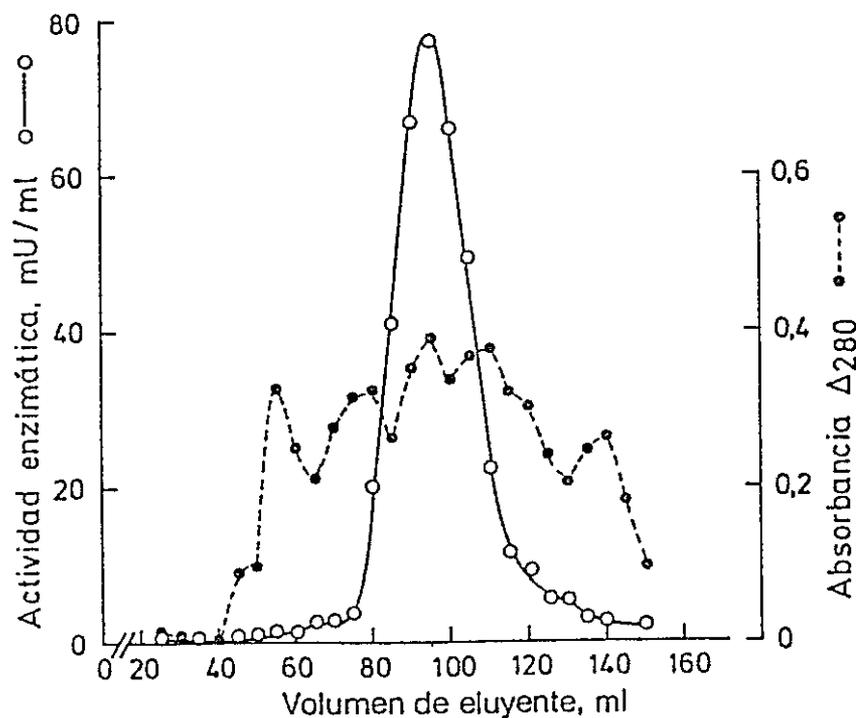


Figura 4. Cromatografía en Sephadex G-200 de la hexoquinasa A. El precipitado de sulfato de amonio, correspondiente a las fracciones de hexoquinasa A de la cromatografía de DEAE-celulosa, se filtró por Sephadex G-200, según se indica en *Materiales y métodos*. Se utilizó una columna de 2 x 48 cm. Se colectaron fracciones de 1 ml, con un flujo de salida de 0,3 ml por minuto. La actividad fosforilante de glucosa se midió con glucosa 100 mM (método A).

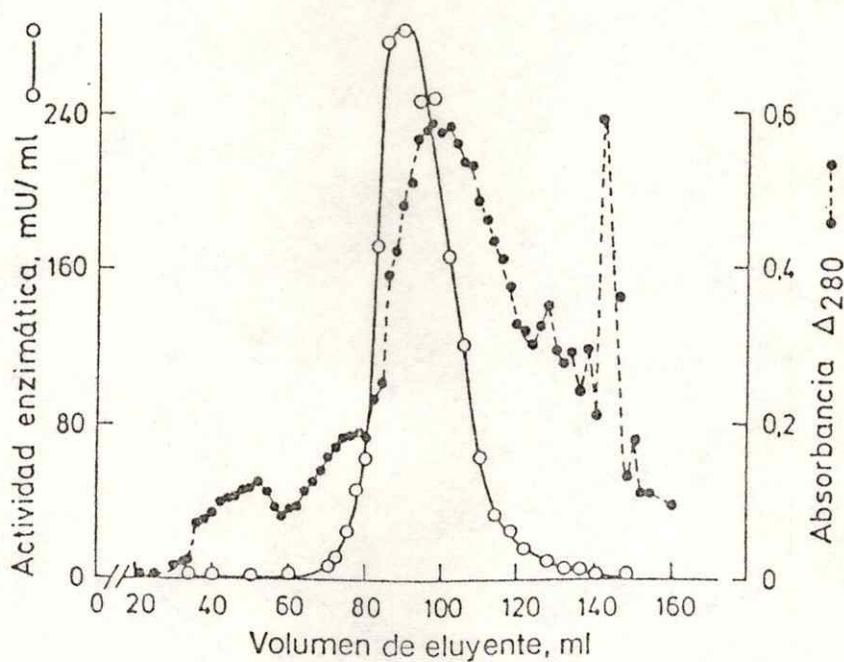


Figura 5. *Cromatografía en Sephadex G-200 de la hexoquinasa B.* El precipitado de sulfato de amonio, correspondiente a las fracciones de hexoquinasa B de la cromatografía de DEAE-celulosa, se filtró en Sephadex G-200 según se describe en *Materiales y métodos*. Se utilizó la misma columna de la figura 4 y en iguales condiciones.

y el promedio de aumento de la actividad específica en 9 preparaciones fue sólo dos veces mayor que el de la etapa anterior. El rendimiento era alrededor de un 25%. La N-acetilglucosamina-quinasa era filtrada en Sephadex G-100 (Fig. 6), obteniéndose una purificación de alrededor de tres veces en relación a la enzima de DEAE-celulosa y el rendimiento era habitualmente cerca del 35%. La hexoquinasa B se sometía a una etapa adicional de purificación en cromatografía de afinidad con sefarosa-glucosamina (Fig. 7), que producía una purificación de cinco veces aproximadamente, con un rendimiento entre el 50 y 60%. La columna de sefarosa-glucosamina de 1 x 4 cm se equilibraba con un amortiguador de Tris 25 mM, pH 8,0, que contenía: EDTA 1 mM; 2-ME 5 mM y KCl 15 mM. La muestra de enzima proveniente de la columna de Sephadex se diluía 6,6 veces con un amortiguador semejante al de equilibrio, pero exento de KCl. Una vez colocada la muestra en la columna se lavaba con 5 volúmenes de una solución semejante a la de equilibrio, pero con KCl 20 mM. En esta fase se observaba eliminación de la mayor parte de las proteínas y la retención del 95% de la actividad hexoquinásica. Al agregar glucosa a la solución de lavado en una concentración de 100 mM se producía la elución del 73% de la actividad hexoquinásica. Al continuar el lavado de la columna con la solución sin glucosa, pero con KCl 50 mM, se eluía una gran cantidad de las proteínas y un 16% de actividad hexoquinásica que había quedado retenida. Si se aumentaba la concentración de KCl a 100 mM, prácticamente ya no se eliminaban proteínas ni hexoquinasa. Las fracciones colectadas eran de 0,5 ml.

Las tablas I, II y III ilustran los procesos típicos de purificación de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglucosamina-quinasa respectiva-

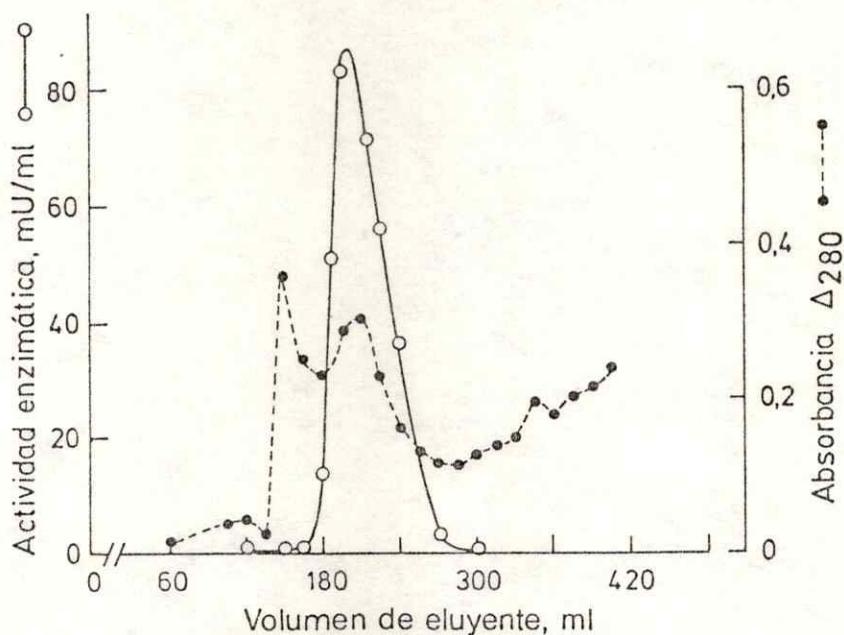


Figura 6. Cromatografía en Sephadex G-100 de la N-acetilglucosamina-quinasa. El precipitado de sulfato de amonio, correspondiente a las fracciones de N-acetilglucosamina-quinasa de la cromatografía de DEAE-celulosa, se filtró como se describe en *Materiales y métodos*, en una columna de Sephadex G-100 de 3 x 64 cm; se colectaron fracciones de 2 ml. La actividad fosforilante de N-acetilglucosamina se determinó mediante el método B.

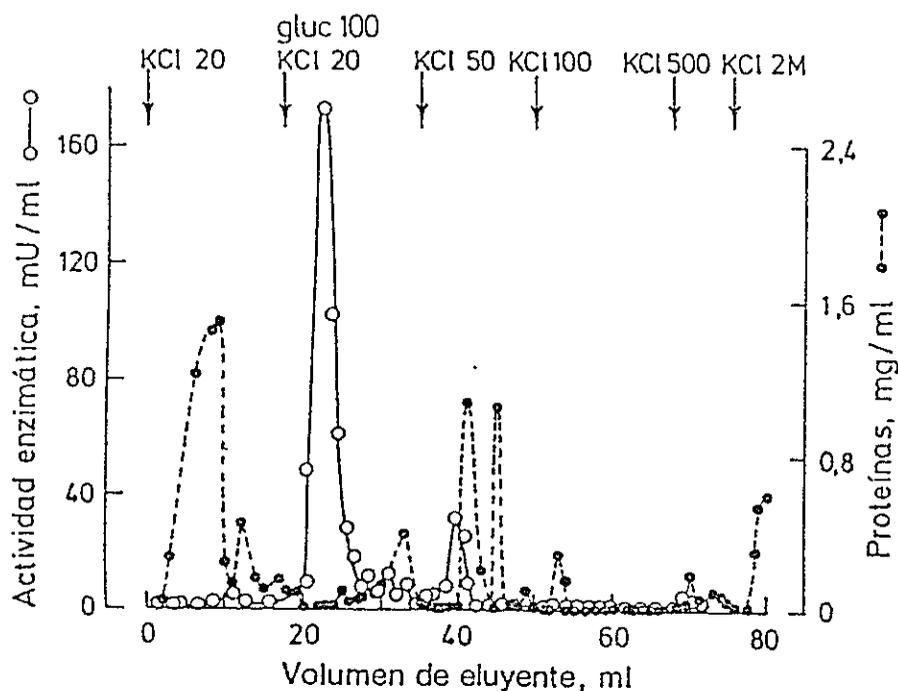


Figura 7. *Chromatografía de afinidad en Sepharosa-glucosamina de la hexoquinasa B.* La muestra de hexoquinasa B (0,76 U) provenía de una cromatografía en Sephadex G-200. Tamaño de la columna, 1 x 4 cm. Volumen de las fracciones, 0,5 ml. La actividad fosforilante de glucosa se midió con glucosa 100 mM. Las flechas señalan los cambios introducidos en las soluciones de elución (ver texto) en cuanto a concentraciones de KCl y de glucosa (glc). En las fracciones seleccionadas de esta cromatografía se recuperó el 56,5% de la actividad.

Tabla I
Purificación de la hexoquinasa A de mucosa de intestino de rata^a

Etapa	Volumen ml	Actividad total U	Proteínas totales mg	Actividad específica U/mg	Purifi- cación veces	Rendi- miento %
Sobrena- dante S ₁	70	2,02 ^b	637	0,003	1	100
DEAE-ce- lulosa	21	0,61	6,82	0,089	29,7	30
Sephadex G-200	7	0,25	0,62	0,406	135	12,4

a Se usó la mucosa intestinal (7,5 g) proveniente de 5 ratas. La actividad fosforilante total del S₁ fue 17 unidades.

b La cantidad de hexoquinasa A en el S₁ se estimó sobre la base de la proporción de la hexoquinasa A en la cromatografía de DEAE-celulosa, que fue 11,8% de la actividad fosforilante total. Para el cálculo se despreció la contribución de la N-acetilglucosamina-quinasa a la fosforilación de la glucosa.

Tabla II

Purificación de la hexoquinasa B de mucosa de intestino de rata^a

Etapa	Volumen ml	Actividad total U	Proteínas totales mg	Actividad específica U/mg	Purifi- cación veces	Rendi- miento %
Sobrena- dante S ₁	185	60,6 ^b	2.557	0,024	1	100
DEAE-ce- lulosa	45	9,16	34,5	0,266	11,1	15
Sephadex G-200	18	0,76	1,2	0,633	26,4	1,3
Sefarosa- glucosamina	19	0,43	0,13	3,31	138	0,71

^a Se usó la mucosa intestinal (24,9 g) proveniente de 9 ratas. La actividad fosforilante total del S₁ fue 76,7 unidades.

^b La cantidad de hexoquinasa B en el S₁ se estimó sobre la base de la proporción de la hexoquinasa B en la cromatografía en DEAE-celulosa, que fue 79,5% de la actividad fosforilante total. Para el cálculo se despreció la contribución de la N-acetilglucosamina-quinasa a la fosforilación de la glucosa.

Tabla III

Purificación de la N-acetilglucosamina-quinasa de mucosa de intestino de rata^a

Etapa	Volumen ml	Actividad total U	Proteínas totales mg	Actividad específica U/mg	Purifi- cación veces	Rendi- miento %
Sobrena- dante S ₁ ^b	110	-	4.030	-	-	-
DEAE-ce- lulosa	128	5,1	39	0,131	1	100
Sephadex G-100	34	1,33	3,45	0,386	3	26

^a Se usó la mucosa intestinal (69,9 g) proveniente de 24 ratas.

^b No es posible estimar la actividad enzimática en el S₁ debido a que se obtienen blancos muy altos.

mente.

Estabilidad de las hexoquinasas A y B

Pareció conveniente hacer una exploración sobre la estabilidad de las hexoquinasas en las condiciones habituales de almacenamiento de los eluidos de la cromatografía de intercambio iónico. Para hacer estas mediciones se mezclaron las fracciones con mayor actividad de cada isoenzima provenientes de una columna de DEAE-celulosa. Las soluciones enzimáticas, conteniendo glucosa 10 mM como posible agente protector, se mantuvieron en hielo y en el refrigerador y desde allí se tomaban muestras periódicamente. Como lo indica la figura 8, la isoenzima B es más inestable que la A. En efecto a los tres días pierde el 46% de su actividad, mientras que la isoenzima A solo pierde un 20%. Estos datos coinciden en general con los encontrados en isoenzima A de cerebro e isoenzima B de músculo por Grossbard y Schimke (1966).

Constantes de Michaelis para glucosa de las isoenzimas A y B

Los valores de K_m aparentes fueron obtenidos a partir del gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver y Burk (1934), como se indica en *Materiales y métodos*.

La K_m aparente para glucosa de la isoenzima A, purificada 50 veces en DEAE-celulosa, fue 0,025 mM (Fig. 9) y la K_m aparente para glucosa de la isoenzima B, purificada 20 veces, proveniente de DEAE-celulosa, fue 0,074 mM (Fig. 10). Estos valores son semejantes a los encontrados por diversos au-

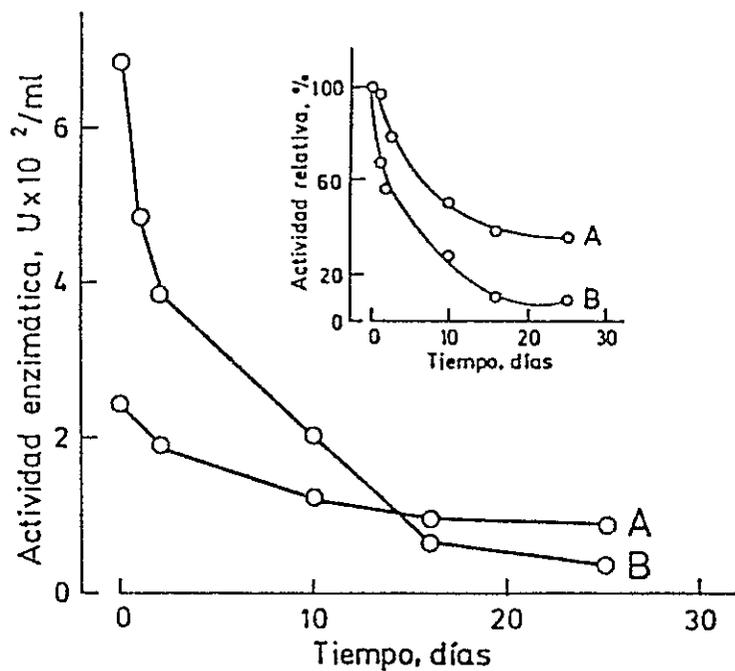


Figura 8. Estabilidad de las hexoquinatas A y B. Las enzimas provenían de una cromatografía en DEAE-celulosa y contenían glucosa 10 mM. Eran mantenidas en hielo y en el refrigerador y se retiraban muestras a los tiempos indicados para medir la actividad (método A, con glucosa 100 mM).

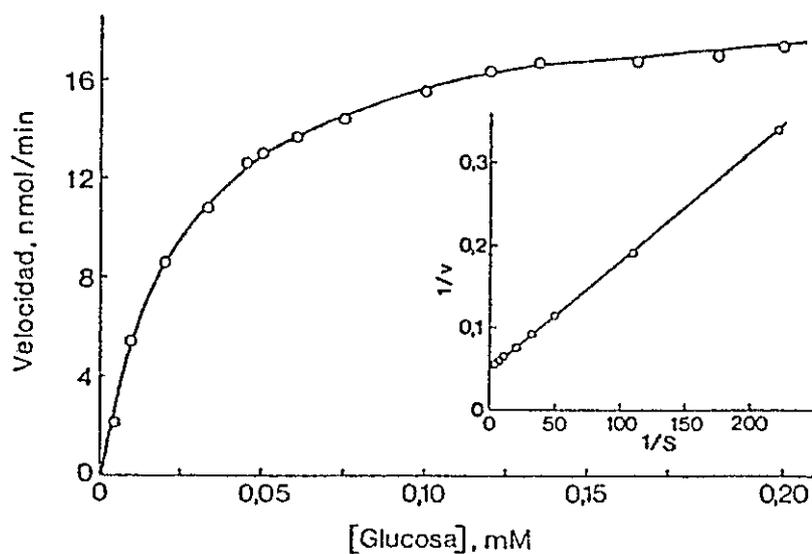


Figura 9. Función de saturación con glucosa de la hexoquinasa A. Para este experimento, se mezclaron las fracciones con mayor actividad provenientes de una columna de DEAE-celulosa. En el gráfico del recuadro se omitieron los valores correspondientes a las concentraciones de glucosa superiores a tres veces K_m . El valor de la K_m aparente fue 0,025 mM.

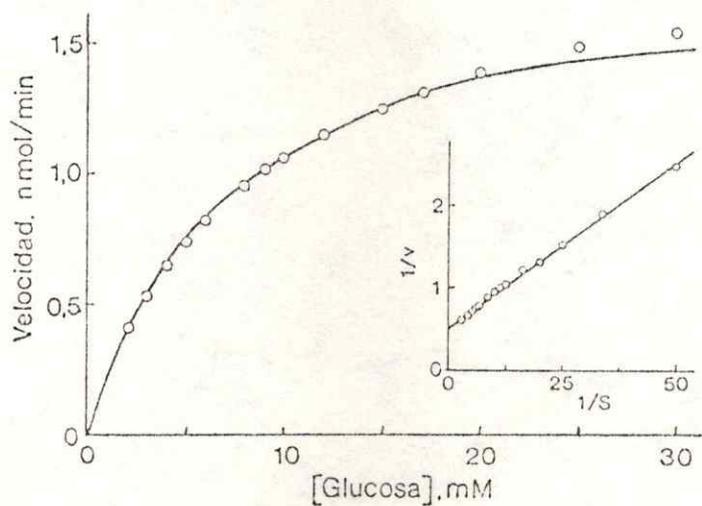


Figura 10. Función de saturación con glucosa de la hexoquinasa B. Para el experimento, se mezclaron las fracciones con mayor actividad provenientes de una columna de DEAE-celulosa. El valor de la K_m aparente fue 0,074 mM.

tores en tejidos diferentes (ver *Discusión*)(Tabla IV).

Constantes de Michaelis de la N-acetilglucosamina-quinasa

Se determinaron las K_m aparentes de la N-acetilglucosamina-quinasa para N-acetilglucosamina y para ATP. Se usó una enzima al estado de purificación de Sephadex (2,7 μ /mg de proteína). La K_m aparente para N-acetilglucosamina fue 0,021 mM (Fig. 11). Este valor es comparable al encontrado por otros investigadores en diversos tejidos de vertebrados (Tabla IV). La K_m aparente para ATP (Fig. 12) dió un valor de 0,38 mM, que es semejante a la K_m para otras quinasas.

Dado que la N-acetilglucosamina-quinasa puede fosforilar glucosa, pareció conveniente determinar el valor de K_m para este sustrato. Este dato era importante, ya que en los trabajos donde se había descrito la presencia de glucoquinasa en mucosa intestinal, el criterio para esta afirmación era la razón de fosforilación de glucosa a 0,5 y 100 mM. Si la N-acetilglucosamina-quinasa presentara una K_m alta para glucosa (mayor o igual que 10 mM) podría imitar la conducta de la glucoquinasa y ser confundida con ella.

Al estudiar la función de saturación de la N-acetilglucosamina-quinasa, se obtuvo una cinética atípica que, en general, muestra una aparente cooperatividad negativa, expresada por una línea curva de concavidad inferior en el gráfico de Lineweaver-Burk (Levitzki y Koshland, 1969) (Fig. 13A). Debido a esta circunstancia no es posible determinar un valor de K_m para glucosa a partir del gráfico de dobles recíprocos. Se puede decir sí que la concentración de glucosa de semisaturación es mayor que 100 mM y así

Tabla IV

Valores de K_m aparentes de hexoquinasas y de N-acetilglucosamina-quinasa de diferentes tejidos

Tejido y especie	Hexoquinasa A	Hexoquinasa B	N-acetilglucosamina-quinasa
	K_m (mM)	K_m (mM)	K_m (mM)
Intestino de rata	0,025 ^a 0,056 ^b	0,074 ^a 0,14 ^b	0,021 ^a
Hígado de rata	0,044 ^{c,d} 0,025 ^e	0,13 ^{c,d}	0,06 ⁱ
Cerebro de rata	0,030 ^e 0,045 ^f		
Riñón de rata	0,049 ^e		0,019 ^h 0,04 ^j
Músculo de rata	0,024 ^e	0,20 ^e 0,23 ^f	
Músculo de cuy		0,103 ^g	
Músculo de paloma		0,93 ^g	
Mucosa gástrica humana			0,11 ⁱ
Bazo bovino			0,06 ^h

^aEste trabajo. ^bSrivastava y col., 1968. ^cGonzález y col., 1964. ^dGonzález y col., 1967. ^eKatzen y Schimke, 1965. ^fGrossbard y Schimke, 1966. ^gGuixé, 1978. ^hDavagnino, 1979. ⁱGindzieński y col., 1974. ^jAllen y Walker, 1980b.

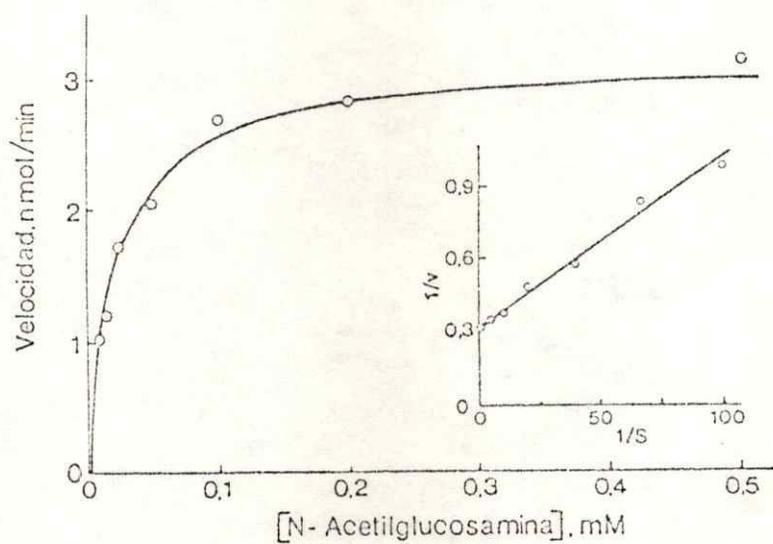


Figura 11. Función de saturación con *N*-acetilglucosamina de *N*-acetilglucosamina-quinasa. Se utilizó una enzima proveniente de Sephadex G-100. El valor de la K_m aparente fue 0,021 mM.

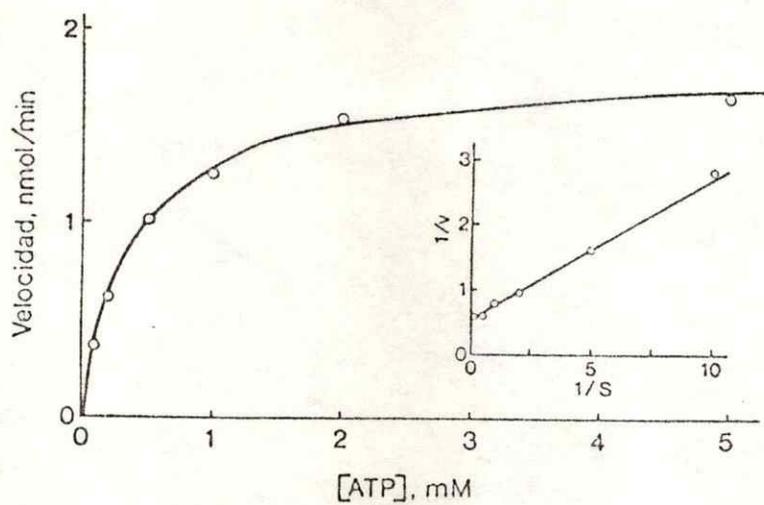


Figura 12. Función de saturación con ATP de la *N*-acetilglucosamina-quinasa. Se utilizó la misma enzima de la figura 11. La K_m aparente fue 0,38 mM.

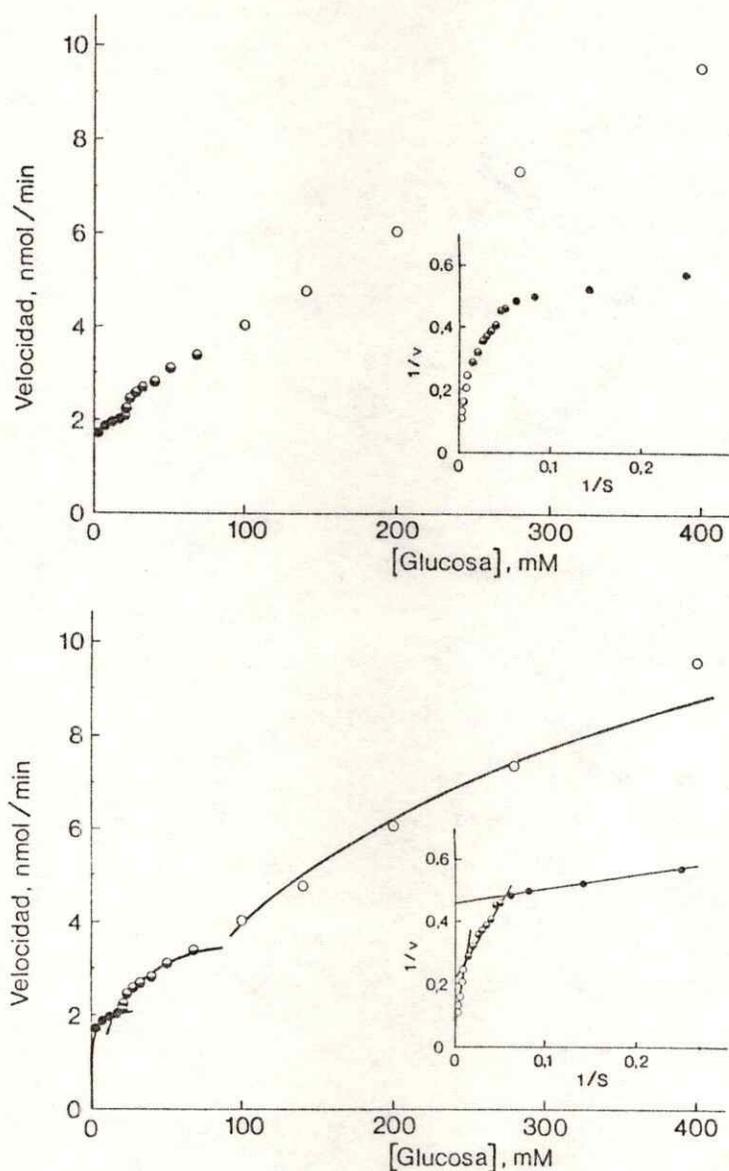


Figura 13. Función de saturación con glucosa de la *N*-acetilglucosaminasa. Para este experimento se utilizó una enzima proveniente de Sephadex G-100. A, sin el dibujo de la línea que pudiera ajustarse a los datos experimentales. B, con el dibujo de las líneas que se pueden ajustar a tres sub-conjuntos de datos considerados como independientes.

- , concentraciones de glucosa 4 a 16 mM; K_m , 1,02 mM.
- ◐ , concentraciones de glucosa 20 a 67 mM; K_m , 20,9 mM.
- , concentraciones de glucosa 100 a 400 mM; K_m , 282 mM.

se explican los resultados de la figura 3. Cabe destacar, sin embargo, que si no se toma un número adecuado de puntos y se hace el estudio en un rango relativamente estrecho de concentraciones de glucosa, podría pasar inadvertido el fenómeno de aparente cooperatividad negativa. En la figura 13B se eligieron tres subconjuntos de datos experimentales y se trazaron las rectas en un gráfico de dobles recíprocos, por el método de los cuadrados mínimos. Suponiendo que cada una de esas rectas representara diferentes funciones de saturación independientes se calcularon y dibujaron las curvas en el gráfico directo de v en función de S . Dependiendo del conjunto de puntos experimentales que se tomen, se obtienen distintos valores de K_m para glucosa. Así, por ejemplo, si se estudia entre 4 y 16 mM de glucosa, se podría asignar a la K_m un valor alrededor de 1 mM; en cambio si se toman puntos entre 20 y 67 mM de glucosa, sería alrededor de 20 mM, y si el estudio se hace entre concentraciones de glucosa de 100 y 400 mM la K_m tendría un valor alrededor de 280 mM.

Especificidad de sustrato de hexoquinasas y de N-acetilglucosamina-quinasa

Los estudios se realizaron con preparaciones de enzimas provenientes de la etapa de Sephadex G-200 (para hexoquinasas A y B) y de Sephadex G-100 (para N-acetilglucosamina-quinasa). La especificidad fue estimada por la actividad relativa, con respecto a la glucosa, del azúcar problema usado como sustrato a las concentraciones señaladas en la Tabla V (10 ó 100 mM).

La actividad de las hexoquinasas A y B es indetectable al utilizar N-acetilglucosamina, glucosamina, xilosa, arabinosa o galactosa como sustrato (Tabla V), tal como sucede en otros tejidos (ver *Discusión*). La acti-

Tabla V

Especificidad de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglucosamina-quinasa de mucosa de intestino de rata^a.

Sustrato	Hexoquinasa A		Hexoquinasa B		N-acetilglucosamina-quinasa	
	10 mM	100 mM	10 mM	100 mM	10 mM	100 mM
D(+)glucosa	1,00	1,00	0,03	0,04		
N-acetil-D-glu- cosamina	b	b	1,00	1,00		
D(+)manosa	0,88	1,17	0,02	0,07		
D(-)fructosa	1,19	1,82 ^c	0,02	0,03		
2-desoxiglucosa	1,02	2,53	0,03	0,11		
D(+)xilosa	b	0,07	b	b		
L(+)arabinosa	b	b	b	b		
D(+)galactosa	b	b	b	b		
D(+)glucosamina	b	b	-	0,04		

a El ADP formado se midió en un sistema acoplado con piruvato-quinasa y deshidrogenasa láctica; usando concentraciones fijas de los sustratos (10 ó 100 mM). Para las hexoquinasas se tomó de referencia la actividad con glucosa y para la N-acetilglucosamina-quinasa la actividad con N-acetilglucosamina.

b Menor o igual que 0,01

c Se midió el fructosa-6-fosfato formado, mediante un sistema acoplado con glucosa-6-fosfato-isomerasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.

vidad relativa con manosa, fructosa y 2-desoxiglucosa es similar o levemente diferente a la encontrada por diversos autores en otros tejidos para hexoquinasa A y hexoquinasa B como analizaremos en *Discusión*.

Los resultados de especificidad de sustrato para N-acetilglucosamina-quinasa muestran que el cociente de actividades con glucosa y con N-acetilglucosamina como sustratos es de 0,03 a 0,04 según la concentración de glucosa utilizada (Tabla V). Este valor es inferior al obtenido en bazo de vaca, que fue 0,19 (Davagnino y Ureta, 1978). La actividad de fosforilación de manosa, fructosa y 2-desoxiglucosa es también pequeña y depende de las concentraciones de sustrato utilizadas. Con xilosa, arabinosa y galactosa no se detecta actividad de fosforilación, pero con glucosamina el valor es semejante al de glucosa (Tabla V).

Peso molecular de hexoquinasas y de N-acetilglucosamina-quinasa

La determinación de los pesos moleculares se hizo con preparaciones de la etapa de purificación de DEAE-celulosa, como se describió en *Materiales y métodos*.

La medición de la actividad enzimática en el eluido reveló un pico único y simétrico para ambas hexoquinasas. Si se hace un gráfico de los valores de K_d en función del logaritmo del peso molecular de las proteínas marcadoras (Fig.14A), se obtiene un valor promedio de 98.300 ± 1.187 para ambas hexoquinasas en conjunto. La variación estimada se hizo sobre la base de dos mediciones de isoenzima A y cuatro mediciones de isoenzima B.

La determinación del peso molecular de la N-acetilglucosamina-quinasa indicó un valor promedio de 56.000 (Fig.14B). Los valores para dos prepa-

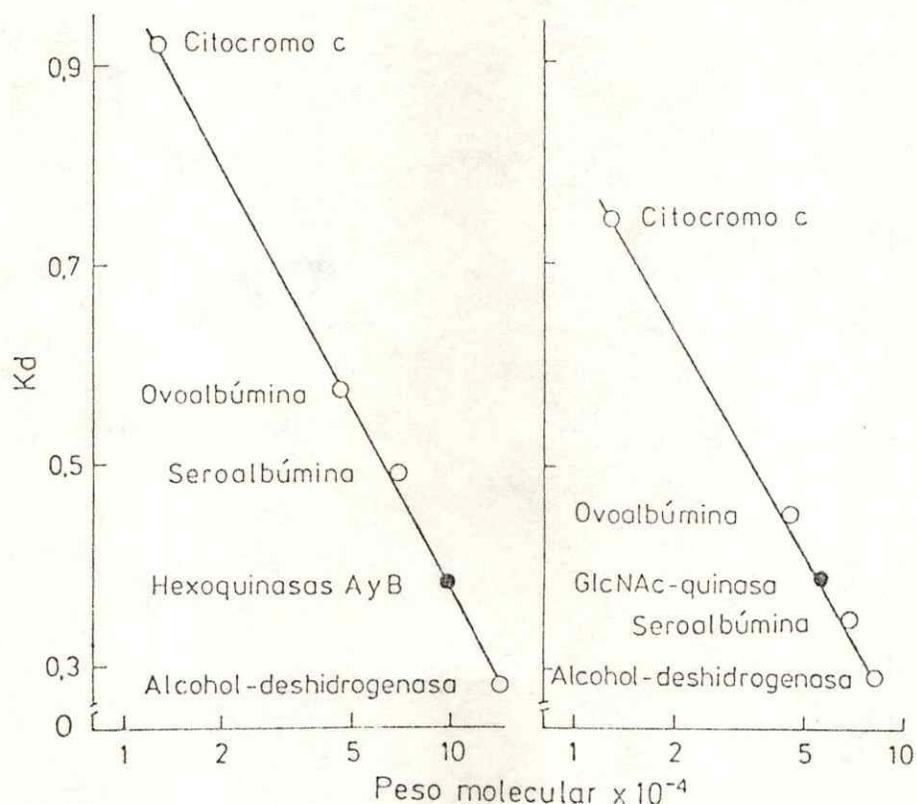


Figura 14. Determinación del peso molecular de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglucosamina-quinasa. Gráfico de K_d en función del logaritmo del peso molecular de proteínas de peso molecular conocido. A. Para las hexoquinasas se utilizó una columna de Sephadex G-200 (2 x 48 cm). Tamaño de la muestra, 1 ml y de las fracciones, 1 ml. V_0 , 53 ml; V_i , 115,5 ml. B. Para la N-acetilglucosamina-quinasa se utilizó una columna de Sephadex G-100 (3 x 63 cm). Tamaño de la muestra, 2 ml. Tamaño de las fracciones, 2 ml. V_0 , 152 ml; V_i , 444 ml. $K_d = (V_e - V_0) / (V_i - V_0)$.

raciones diferentes fueron 50.000 y 62.000. La medición en el eluido de Sephadex G-100 dió un pico único y simétrico como se ilustra en la figura 6.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La migración electroforética en geles de poliacrilamida al 7% de la N-acetilglucosamina-quinasa se hizo con preparaciones purificadas hasta la etapa de Sephadex G-100. Las cantidades de enzimas utilizadas fluctuaron entre 150 y 200 μ l (2 a 6 mU de enzima).

La figura 15a ilustra la electroforesis de glucoquinasa, de N-acetilglucosamina-quinasa y de una mezcla de ambas. Después de teñir la actividad enzimática, utilizando glucosa 100 mM como sustrato, se observaba una sola banda de actividad a una altura semejante en los tres casos. Sin embargo, el R_m de la N-acetilglucosamina-quinasa era 0,485 y el de la glucoquinasa 0,528. Con la mezcla de las dos enzimas, se obtenía una banda de actividad más ancha y que migraba con un R_m de 0,50. La especificidad de la reacción fosforilante de glucosa en los geles fue asegurada por la ausencia de bandas en los geles controles, donde se omitía el ATP de la mezcla de reacción.

Estos geles señalan la facilidad con que pueden confundirse la N-acetilglucosamina-quinasa y la glucoquinasa al ser analizadas por electroforesis. Así, la electroforesis de la fracción S_1 (sobrenadante 105.000 g) de mucosa intestinal, revelada por actividad enzimática con glucosa 100 mM, daba tres bandas de actividad que correspondían a las isoenzimas A (con menor migración), B (banda central) y N-acetilglucosamina-quinasa (mayor migración). Esta última banda podría señalarse como glucoquinasa, pero su

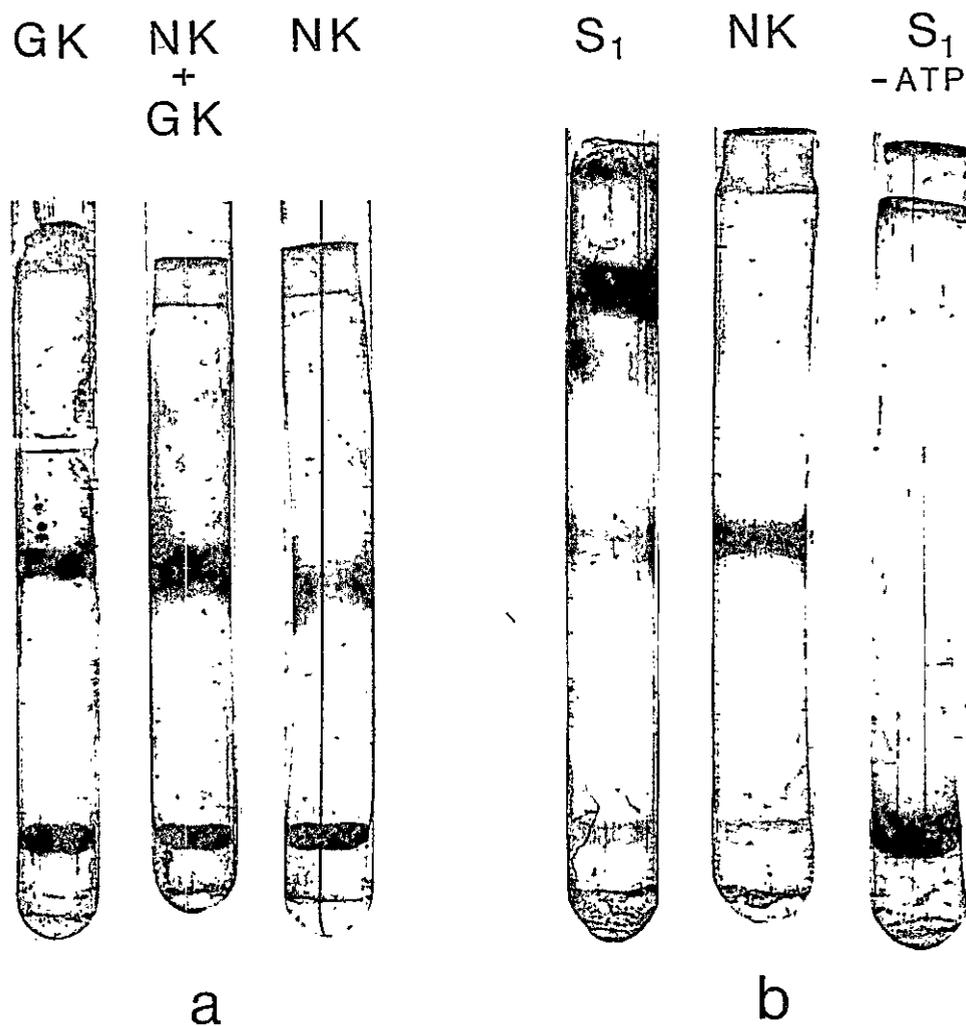


Figura 15. Electroforesis en geles de poliacrilamida de S_1 de mucosa intestinal y de glucoquinasa y *N*-acetilglucosamina-quinasa purificadas. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 7%, según se indica en *Materiales y métodos*. Para la tinción de la actividad enzimática, los geles se incubaron en presencia de glucosa 100 mM. a) Patrón electroforético de *N*-acetilglucosamina-quinasa (NK) de intestino de rata y de glucoquinasa (GK) de hígado de rata. La NK provenía de la etapa de Sephadex G-100 y la GK de la cromatografía de afinidad en sefarosa-glucosamina. b) Patrón electroforético de un sobrenadante a 105.000 g (S_1) de mucosa de intestino de rata y de *N*-acetilglucosamina-quinasa (NK). Los valores de movilidad relativa (R_m) fueron: NK, 0,485; GK, 0,528.

identificación como N-acetilglucosamina-quinasa se hizo debido a que migra con el mismo R_m que el control de N-acetilglucosamina-quinasa purificada (Fig. 15b). La electroforesis de un extracto tritonizado del sedimento de 105.000 g reveló solo la presencia de las hexoquinasas A y B, sin rastros de N-acetilglucosamina-quinasa (no se muestra).

Electroforesis en membranas de acetato de celulosa

Como ya se comentó, al utilizar electroforesis en acetato de celulosa, Anderson y Tyrrell (1973) y Anderson y King (1975) postularon que en la fracción sobrenadante de la mucosa yeyunal se encontraban los cuatro tipos de isoenzimas (A, B, C y D) descritos para hígado, ya que la isoenzima de K_m alta sería glucoquinasa.

Realizamos la electroforesis en membrana de acetato de celulosa de N-acetilglucosamina-quinasa semipurificada de mucosa intestinal, glucoquinasa semipurificada de hígado y de un extracto crudo (S_1), como se utilizaron en los geles de poliacrilamida. Las cantidades de enzimas aplicadas a las placas de electroforesis no fueron mayores que 2 μ l. Para la tinción de la actividad fosforilante de glucosa se utilizaba una concentración de glucosa de 200 mM, con el objeto de visualizar mejor la banda de actividad correspondiente a N-acetilglucosamina-quinasa.

En el sobrenadante (S_1) se presentaban tres bandas de actividad, que por su migración relativa correspondían a hexoquinasa A (migra menos), hexoquinasa B (banda más ancha intermedia) y N-acetilglucosamina-quinasa (que migra más) (Fig. 16a). Esta última migraba a la misma distancia que la N-acetilglucosamina-quinasa purificada. Al emplear concentraciones ba-

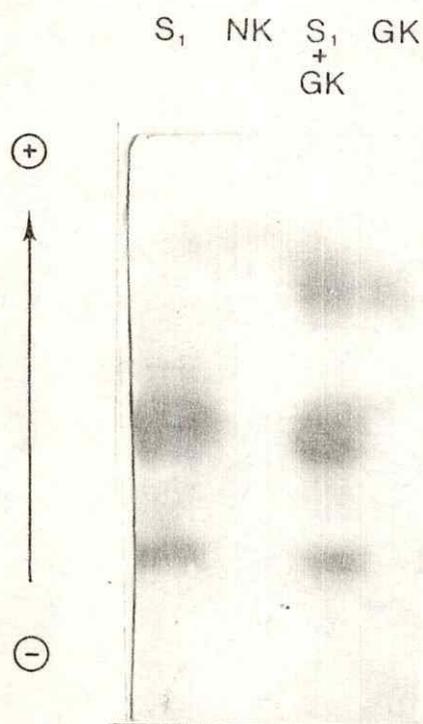
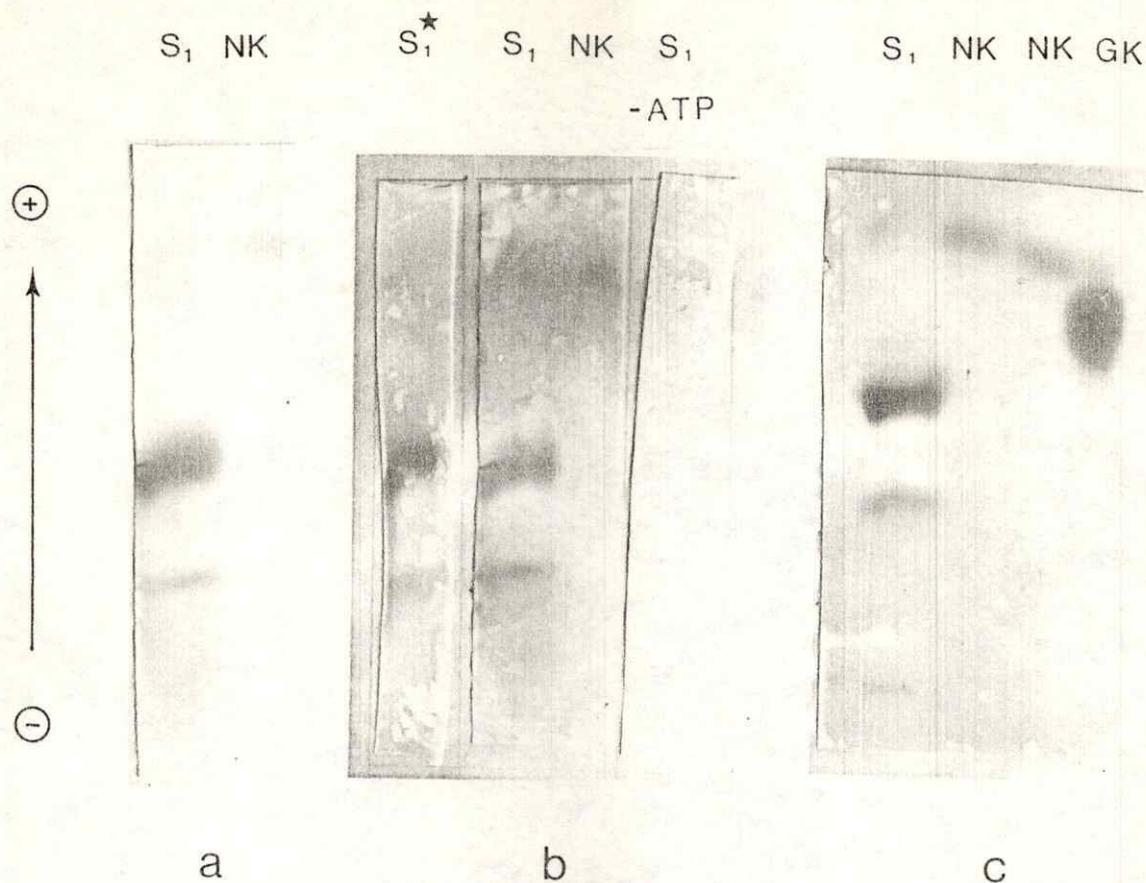


Figura 16. Electroforesis en membranas de acetato de celulosa de S₁ de mucosa intestinal y de glucoquinasa y N-acetilglucosamina-quinasa purificadas. Se siguió el procedimiento descrito en *Materiales y métodos*. El sobrenadante de 105.000 g (S₁) de mucosa de intestino se obtenía de una rata; la N-acetilglucosamina-quinasa (NK) de intestino de rata provenía de la etapa de Sephadex G-100 y la glucoquinasa de hígado de rata (GK) de una cromatografía de afinidad en se-farosa-glucosamina. Cantidad de muestra, 2 μ l. Para la tinción de la actividad enzimática, las membranas se incubaron en presencia de glucosa 200 mM, salvo la marcada con asterisco en la cual se usó glucosa 0,5 mM.

jas de glucosa (0,5 mM) para la tinción de la actividad no se observaba la tercera banda de actividad, de mayor migración, así como desaparecía la única banda de actividad de la N-acetilglucosamina-quinasa purificada (Fig. 16b). Se hicieron controles de S_1 sin ATP en presencia de glucosa 200 mM, y no apareció ninguna banda de actividad (Fig. 16b). En otro experimento (Fig. 16c) se observó que la tercera banda del sobrenadante coincide también con la N-acetilglucosamina-quinasa y migra más que la muestra de glucoquinasa.

En un cuarto experimento (Fig. 16d) se comparó la conducta electroforética del S_1 de intestino con la de N-acetilglucosamina-quinasa, glucoquinasa y una mezcla de S_1 de intestino con glucoquinasa de hígado. En el sobrenadante se observan las tres bandas típicas de las hexoquinasas A y B y de la N-acetilglucosamina-quinasa, coincidiendo con la banda control de N-acetilglucosamina-quinasa. En la mezcla de sobrenadante de mucosa intestinal y de glucoquinasa de hígado, se observan cuatro bandas de actividad, de las cuales la que aparece entre la hexoquinasa B y la N-acetilglucosamina-quinasa correspondería a la glucoquinasa, pues migra a la misma altura que la banda única de actividad de la glucoquinasa control.

4. DISCUSION

Identificación de las enzimas fosforilantes de glucosa y su distribución subcelular

Se ha comunicado que alrededor del 90% de la actividad glicolítica del homogeneizado de la mucosa intestinal de rata, cuy y otras especies, se encuentra en la fracción soluble (Srivastava y Hübscher, 1966). Sin embargo, entre el 50 y el 60% de la hexoquinasa total del homogeneizado de la mucosa de intestino de rata aparece asociado a estructuras subcelulares (Long, 1953; Srivastava y col., 1968; Weiser y col., 1971; May y Mc Carthy, 1976), especialmente mitocondrias (Srivastava y col., 1968; May y Mc Carthy, 1976). Los resultados de este trabajo confirman que aproximadamente un 50% de actividad fosforilante de glucosa se encuentra en la fracción soluble y el resto en el sedimento.

La demostración de la existencia de las isoenzimas A y B por cromatografía en DEAE-celulosa en la fracción soluble confirman los hallazgos de Katzen y Schimke (1965), Srivastava y col. (1968) y Weiser y col. (1971). La isoenzima B se encuentra en cantidad tres a cuatro veces superior a la hexoquinasa A, pero la proporción de ambas isoenzimas, tiene una alta dispersión. Así, en la fracción soluble de 15 preparaciones, la isoenzima A se encuentra en un $19 \pm 14\%$ (promedio \pm desviación típica de las observaciones). Se explica así que Srivastava y col. (1968) hayan encontrado solo un 5,8% de A, mientras que Weiser y col. (1971) un 40%, valores que

están dentro de la dispersión encontrada por nosotros. En este trabajo se muestra por primera vez que en el sedimento también se encuentran las isoenzimas A y B, más o menos en la misma proporción que en la fracción soluble y también con mucha variación en la proporción de una preparación a otra. Podría ser de interés determinar los factores responsables de estas variaciones, entre los cuales puede encontrarse la estabilidad de la hexoquinasa B que, como se mostró, es menor que la de la isoenzima A. El uso de protectores adecuados y la normalización del tiempo de preparación del extracto pudieran ser importantes.

No hemos detectado la presencia de isoenzima C, ni aún en preparaciones de tipo analítico, en que se cromatografía en DEAE-celulosa el extracto de mucosa proveniente de un solo animal; tampoco se visualizó una actividad que pudiera interpretarse como correspondiente a la hexoquinasa C en las electroforesis en geles de poliacrilamida y de acetato de celulosa, en discordancia con lo comunicado por Anderson y colaboradores (1973, 1975) y también, pero con cautela, anteriormente por Katzen y Schimke (1965).

Como la glucoquinasa es inducible en el hígado de rata y otros mamíferos (revisión en Niemeyer y col., 1975b), y Stifel y col. (1968) postularon un aumento de una posible glucoquinasa intestinal con dieta rica en glucosa, las ratas fueron alimentadas con una solución glucosada desde dos días antes de su muerte, con lo que se pretendía hacer más detectable la glucoquinasa putativa.

No hemos encontrado, sin embargo, glucoquinasa o isoenzima D, aunque se ha buscado sistemáticamente midiendo la actividad fosforilante con con-

centraciones altas (100 mM) y bajas (0,5 mM) de glucosa en todas las preparaciones enzimáticas. Los picos de actividad enzimática de las columnas de DEAE-celulosa en la fracción soluble y en el sedimento son simétricos. Hace excepción ocasional el pico de actividad correspondiente a la isoenzima B en el sobrenadante; éste presenta a veces una asimetría, consistente en un hombro o deformación, que se vislumbra con glucosa 100 mM y que se hace más pronunciado al aumentar la concentración de glucosa a 200 o 400 mM (Fig. 3). Este hombro coincide con la presencia de N-acetilglucosamina-quinasa, enzima con actividad secundaria fosforilante de glucosa, que solo se encuentra en la fracción soluble. Como ya se dijo, las pequeñas trazas que aparecen en el sedimento se debe muy probablemente a contaminación con la fracción soluble.

K_m y especificidad de las hexoquinasas A y B y de N-acetilglucosamina-quinasa

La K_m para glucosa de la hexoquinasa A fue 0,025 mM, valor que es similar al comunicado por Srivastava y col. (1968) (0,056 mM) y a los encontrados en hígado, riñón, cerebro y músculo (Tabla IV). La K_m para glucosa de la hexoquinasa B fue 0,074 mM, también similar o algo menor al obtenido por Srivastava y col. (1968) (0,14 mM) y a los valores dados para músculo e hígado (Tabla IV). Tanto la hexoquinasa A como la hexoquinasa B fosforilan bastante bien otros azúcares, como manosa, fructosa y 2-desoxiglucosa. La actividad relativa de fosforilación de la hexoquinasa A parece similar para estas tres azúcares. La hexoquinasa B, en cambio, fosforila mejor fructosa y 2-desoxiglucosa que glucosa a las concentraciones

de sustratos empleadas. Las K_m para manosa son generalmente muy similares a las K_m para glucosa, solo ligeramente más elevadas, por lo que puede estimarse que las concentraciones de sustratos utilizadas con ambas isoenzimas son saturantes y los valores de actividad reflejan la velocidad máxima. Aunque la K_m de las isoenzimas A y B para 2-desoxiglucosa es dos a cuatro veces mayor que para glucosa (Grossbard y Schimke, 1966), también las concentraciones usadas serían saturantes y por lo tanto válidos los resultados comparativos de actividad. Sin embargo la K_m para fructosa de ambas isoenzimas es alrededor de 3 mM (González y col., 1964; Katzen y Schimke, 1965; Grossbard y Schimke, 1966), lo que hace que la concentración de 10 mM empleada para analizar las actividades relativas de la hexoquinasa A no sea saturante y por lo tanto se está subestimando la velocidad máxima con fructosa. No ocurre lo mismo en el caso de la hexoquinasa B, que se ensayó con azúcares a una concentración de 100 mM.

Es interesante mencionar, con propósitos comparativos, que también la glucoquinasa de hígado fosforila manosa, 2-desoxiglucosa y fructosa. Cuando se estudia la velocidad máxima de estos sustratos por el método de Gulbinsky y Cleland (1968) se obtienen los siguientes valores relativos con respecto a la actividad de glucosa: manosa 0,77 y 2-desoxiglucosa 0,73 (Monasterio, 1980) y fructosa 2,6 (Cárdenas, 1981). Al igual que las hexoquinasas, la glucoquinasa no fosforila galactosa, glucosamina ni las pentosas (Salas y col., 1965; González y col., 1967).

La K_m de la N-acetilglucosamina-quinasa para N-acetilglucosamina fue 0,021 mM, similar o algo inferior que los valores obtenidos en mucosa gástrica, bazo bovino y riñón e hígado de rata (Tabla IV). Como la K_m

para N-acetilglucosamina es muy baja, es muy importante asegurarse que las curvas de progreso sean lineales a bajas concentraciones del sustrato; es decir, que se mantengan las condiciones de velocidad inicial. Para que esto sea posible es necesario trabajar con una cantidad de enzima suficientemente pequeña y la máxima sensibilidad que dé el instrumento (alta velocidad, máxima amplificación de la escala). El haber tomado estas precauciones permitió obtener una función de Lineweaver-Burk lineal.

Al no tomarlas podría obtenerse una curva de concavidad superior, semejando un fenómeno de cooperatividad positiva. Tal vez esta sea la explicación de los resultados comunicados recientemente por Allen y Walker^{col (1980)} (1980b), que muestran una cierta concavidad superior en un gráfico de Hanes-Woolf y les hacen concluir que la función de saturación presenta una cooperatividad positiva.

Como vimos en *Resultados*, la K_m para glucosa no puede determinarse con precisión, debido a la función irregular de la velocidad con respecto a la concentración del sustrato. En efecto la función de saturación aparece como discontinua y al utilizar el gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver y Burk se obtienen al menos tres rectas y según el rango de concentración de sustrato que se utilice se pueden obtener valores para K_m de 1, 21 ó 280 mM. Resultados semejantes han obtenido Davagnino y Ureta (Davagnino y Ureta, 1978; Davagnino, 1979; Davagnino y Ureta, 1980) en bazo bovino, placenta humana y riñón de rata con enzimas semipurificadas. Podría pensarse que esta cinética tenga su origen en que la enzima está solo parcialmente purificada y los resultados corresponderían a varias enzimas coexistentes; sin embargo, persisten estas características

en enzima pura preparada de bazo de vaca (Davagnino, 1979).

En contraste con la experiencia del laboratorio, recientes trabajos indican una conducta hiperbólica con glucosa de la N-acetilglucosamina-quinasa semipurificada, tanto de hígado y riñón (Allen y Walker, 1980b), como de mucosa intestinal (Allen y col., 1980). Las concentraciones empleadas son en general altas (hasta 800 mM) y es posible que se hayan enmascarado los resultados obtenidos a concentraciones relativamente bajas (menos que 100 mM). Los valores de K_m dados por el grupo de Walker son del orden de 200, 400 y 600 mM para intestino, riñón e hígado, respectivamente, es decir, en los rangos altos obtenidos en el laboratorio.

Respecto a la fosforilación de otros azúcares por la N-acetilglucosamina-quinasa (Tabla V), parece que la fosforilación de manosa, fructosa, 2-desoxiglucosa y glucosamina es semejante, cuando se estudia a concentraciones iguales de los sustratos, claramente subsaturantes, en varios tejidos (Davagnino y Ureta, 1980; Allen y Walker, 1980a). No se han hecho estudios cinéticos detallados con estos sustratos alternativos como para dar significación a las pequeñas variaciones comunicadas en los diferentes trabajos. Si bien Oguchi y col. (1975) comunicaron que la fosforilación de glucosamina corresponde con la fracción donde eluye la glucoquinasa de una columna de DEAE-celulosa, en este laboratorio hemos encontrado, por una parte, que la glucoquinasa pura no fosforila glucosamina (Vera y Cárdenas, no publicado) y, por otra, que en hepatocitos aislados la fosforilación de glucosamina coincide con la fracción de N-acetilglucosamina-quinasa y no con la de glucosamina (Peyes y Cárdenas, comunicación personal). Parece claro que, al igual que las hexoquinasas y la glu-

coquinasa, la N-acetilglucosamina-quinasa no es capaz de fosforilar a velocidades medibles ni galactosa ni las pentosas ensayadas (Tabla V).

Peso molecular

El peso molecular de las hexoquinasas A y B en preparaciones semi-purificadas fue de 98.300, medido por filtración en Sephadex. No se conocen valores para las enzimas de mucosa de intestino, pero los resultados obtenidos son similares a los encontrados en otros tejidos (Grossbard y Schimke, 1966; Pilkis y col., 1968; Chou y Wilson, 1972; Wilson, 1972; Holroyde y Trayer, 1976). Para N-acetilglucosamina-quinasa el peso molecular fue 56.000, menor que el comunicado para la enzima de mucosa gástrica (77.000, Gindziński y col., 1974) y para la enzima de hígado de rata (80.000, Allen y Walker, 1980a). Allen y Walker (1980a) encontraron que la N-acetilglucosamina-quinasa de hígado aparecía como un pico asimétrico en la filtración en geles (Bio-gel P-100 y Sephadex G-100), que correspondería a un peso molecular promedio de 80.000. Sugieren que corresponde a un dímero, pues en electroforesis de poliacrilamida con SDS aparece una banda correspondiente a un peso de 39.000 y otra de 90.000 (Allen y Walker, 1980a). No hacen referencia en ninguno de sus trabajos al peso molecular de la N-acetilglucosamina-quinasa de mucosa intestinal.

Identificación de la actividad fosforilante de glucosa de alta K_m con la N-acetilglucosamina-quinasa

En la fracción no particulada de homogeneizado de mucosa intestinal de rata, se identificó la presencia de solo las isoenzimas A y B y de la

N-acetilglucosamina-quinasa al utilizar electroforesis en geles de poliacrilamida y en membrana de acetato de celulosa. En el sedimento solo se identificaron dos bandas de actividad enzimática, correspondientes a las isoenzimas A y B. Estos resultados coinciden con los perfiles obtenidos en columnas cromatográficas de DEAE-celulosa. De acuerdo con la intensidad de tinción de la actividad enzimática en electroforesis en membranas de acetato de celulosa, hay mayor cantidad de isoenzima B que de A, como en la cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, en los geles de poliacrilamida se observa que la banda de actividad correspondiente a la isoenzima B se tiñe con menor intensidad que la isoenzima A, lo que puede explicarse por la mayor inestabilidad de la isoenzima B. Aunque el método tendría esta desventaja, por ser más lento en el proceso de tinción de actividad en las condiciones utilizadas, tiene por otro lado la ventaja de admitir mayor cantidad de muestra que la membrana de acetato de celulosa y por lo mismo ser más sensible para la detección de enzimas estables que se encuentran en pequeña proporción.

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Katzen y Schimke (1965) quienes, por electroforesis en gel de almidón, identificaron solo dos bandas de actividad hexoquinásica en la fracción sobrenadante (36.000 x g) de mucosa de intestino, las que corresponden aparentemente a las isoenzimas A y B de hígado. También son concordantes con los resultados de Weiser y col. (1971), quienes identificaron la presencia de isoenzimas A y B y de N-acetilglucosamina-quinasa mediante columnas de DEAE-celulosa. En cambio, Anderson y Tyrrell (1973) y Anderson y King (1975), utilizando electroforesis en membrana de acetato de celulosa del sobrena-

dante 105.000 g de la mucosa yeyunal del intestino de rata, concluyen que ésta tiene cuatro isoenzimas (A, B, C y D). La isoenzima D o glucoquinasa tendría una movilidad electroforética y un requerimiento de alta concentración de glucosa (100 mM) para su detección, como en el hígado. Como hemos mostrado, nuestros resultados obtenidos en geles de acetado de celulosa, en los cuales se comparan directamente glucoquinasa (de hígado) y N-acetilglucosamina-quinasa (de intestino), indican que la movilidad es bastante diferente, aunque ambas deban reconocerse mediante su actividad fosforilante de glucosa a elevada concentración. En estas condiciones se comprueba que la enzima fosforilante de glucosa de K_m alta de un sobrenadante corresponde claramente con la N-acetilglucosamina purificada y no con la glucoquinasa. Con otros métodos de separación, la N-acetilglucosamina-quinasa puede confundirse con cierta facilidad con la glucoquinasa, en diversas condiciones experimentales. Así sucede en la cromatografía en DEAE-celulosa, donde tienen una movilidad semejante, llegando a confundirse en determinadas modalidades de operación. También en la electroforesis de poliacrilamida, donde migran con semejantes, pero diferenciables, R_m . Además, el peso molecular en filtración en Sephadex es muy semejante. Por lo tanto, podemos concluir que para identificar la enzima como glucoquinasa no basta el criterio empleado por Anderson y Tyrrell (1973) y Anderson y King (1975), cuál es la alta K_m con glucosa de la enzima. El criterio inmunológico parece más riguroso para diferenciar glucoquinasa de N-acetilglucosamina-quinasa y ha sido empleado por Davagnino y Ureta (1980) y por Allen y col. (1980) en diversos tejidos de diferentes orígenes.

En el hígado se encuentra N-acetilglucosamina-quinasa y en una cromatografía en DEAE-celulosa se eluye algo retrasada con respecto a la glucoquinasa (Cárdenas, 1981). Como la migración electroforética de ambas enzimas puede ser muy similar en algunas condiciones experimentales y ambas enzimas requieren una concentración alta de glucosa para ser reveladas se explica que por electroforesis en geles de la fracción sobrenadante 105.000 g de hígado, algunos autores han postulado la presencia de más de una glucoquinasa en el hígado de rata (Pilkis y Hansen, 1968; Allen y Walker, 1976) o en hepatoma (Shatton y col., 1969) por la aparición de bandas con actividad fosforilante de glucosa a concentración 100 mM en electroforesis en geles. Recientes trabajos de Allen y col. (1980), aparecidos durante la redacción de esta tesis, ya han identificado una de estas glucoquinasas putativas, la GK_a , como N-acetilglucosamina-quinasa.

Para terminar, diremos que para postular la presencia de glucoquinasa en un tejido que no sea el hepático, parece necesario demostrarse que la glucoquinasa putativa no es N-acetilglucosamina-quinasa, conclusión a que también han llegado recientemente Davagnino y Ureta (1980) y Allen y col. (1980).

5. REFERENCIAS

Allen, M.B., Brockelbank, J.L. y Walker, D.G. (1980). Apparent glucokinase activity in non-hepatic tissues due to N-acetyl-D-glucosamine kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 614, 357-366.

Allen, M.B. y Walker, D.G. (1976). Multiple forms of hepatic glucokinase. *Biochem. Soc. Trans*, 4, 36.

Allen, M.B. y Walker, D.G. (1980a). The isolation and preliminary characterization of N-acetyl-D-glucosamine kinase from rat kidney and liver. *Biochem. J.* 185, 565-575.

Allen, M.B. y Walker, D.G. (1980b). Kinetic characterization of N-acetyl-D-glucosamine kinase from rat liver and kidney. *Biochem. J.* 185, 577-582.

Anderson, J.W. y King, P. (1975). Subcellular distribution of hexokinase activity in rat jejunal mucosa: response to diabetes and dietary changes. *Biochem. Med.* 12, 1-11.

Anderson, J.W. y Tyrrell, J.B. (1973). Hexokinase activity of rat intestinal mucosa: demonstration of four isozymes and of changes in subcellular distribution with fasting and refeeding. *Gastroenterology* 65, 69-76.

Anderson, J.W. y Zakim, D. (1970). The influence of alloxan-diabetes and eating on glycolytic and gluconeogenic enzyme activities of rat intestinal mucosa and liver. *Biochim. Biophys. Acta* 201, 236-241.

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

Ashcroft, S.J.H. y Randle, P.J. (1970). Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets. *Biochem. J.* 119, 5- 15.

Bachelard, H.S. (1967). Glucose-phosphorylating enzyme with high K_m in human brain. *Nature* 215, 959-960.

Cárdenas, M.L. (1981). Regulación de la actividad de la glucoquinasa. *Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.*

Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1978). Maintenance of the monomeric structure of glucokinase under reacting conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 142-148.

Chemtron. Cellogel: Electrophoresis and immunotechniques. *Milano. Italia.*

Chou, A.C. y Wilson, J.E. (1972). Purification and properties of rat brain hexokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 48-55.

Colowick, S.P. (1973). The hexokinases. En *The enzymes*, 2nd Ed. vol. IX, Part B. (Boyer, P. ed.) Academic Press.

Davagnino, J. (1979). Glucoquinasas múltiples y extrahepáticas: su identificación como N-acetilglucosamina-quinasa. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.*

Davagnino, J. y Ureta, T. (1978). Glucoquinasas múltiples y extrahepáticas: su identificación como N-acetilglucosamina-quinasa. II Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, Santiago. *Arch. Biol. Med. Exp.* 11, 12.

Davagnino, J. y Ureta, T. (1980). The identification of extrahepatic glucokinase as N-acetylglucosamine kinase. *J. Biol. Chem.* 255, 2633-2636.

Dawson, R.M., Elliott, D.C., Elliot, W.H. y Jones, K.M. (1972). *Data for Biochemical Research.* Oxford University Press, p. 625.

Gerber, G. K.G., Schultze, M. y Rapoport, S.M. (1970). Occurrence and function of a high K_m hexokinase in immature red blood cells. *Eur. J. Biochem.* 17, 445- 449.

Gindziński, A., Glowacka, D. y Zwierz, K. (1974). Purification and properties of N-acetylglucosamine kinase from human gastric mucosa. *Eur. J. Biochem.* 43, 155-160.

González, C., Ureta, T., Babul, J., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1967). Characterization of isoenzymes of adenosine triphosphate: D-hexose 6-phosphotransferase from rat liver. *Biochemistry* 6, 460-468.

- González, C., Ureta, T., Sánchez, R. y Niemeyer, H. (1964). Multiple molecular forms of ATP: hexose 6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 347-352.
- Grossbard, L. y Schimke, R.T. (1966). Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms. *J. Biol. Chem.* 241, 3546-3560.
- Grossbard, L., Weksler, M. y Schimke, R.T. (1966). Electrophoretic properties and tissue distribution of multiple forms of hexokinase in various mammalian species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 32-38.
- Grossman, S.H., Dorn, C.G. y Potter, V.R. (1974). The preparation and characterization of pure rat liver glucokinase. *J. Biol. Chem.* 249, 3055-3060.
- Grossman, S.H. y Potter, V.R. (1974). Identification of rat hepatic glucokinase after polyacrylamide disc electrophoresis. *Anal. Biochemistry* 59, 54-62.
- Guixé, V. (1978). Hexoquinasas de músculo. Aspectos comparativos y localización celular. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.*
- Gulbinsky, J.S. y Cleland, W.W. (1968). Kinetic studies of *Escherichia coli* galactokinase. *Biochemistry.* 7, 566-575.

- Holroyde, M.J., Allen, M.B., Storer, A.C., Warsy, A.S., Chesher, J.M.E., Trayer, I.P., Cornish-Bowden, A. y Walker, D.G. (1976). The purification in high yield and characterization of rat hepatic glucokinase. *Biochem. J.* 153, 363-373.
- Holroyde, M.J. y Trayer, I.P. (1976). Purification and properties of rat skeletal muscle hexokinase. *FEBS Lett* .. 62, 215-219.
- Jones, G.M. y Mayer, R.J. (1973). Glucose metabolism in the small intestine: the effect of glucose analogues on hexokinase activity. *Biochem. J.* 132, 125-128.
- Katzen, H.M. y Schimke, R.T. (1965). Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54, 1218-1225.
- Katzen, H.M., Soderman, D.D. y Nitowsky, H.M. (1965). Kinetic and electrophoretic evidence for multiple forms of glucose-ATP phosphotransferase activity from human cell cultures and rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 377-382.
- Kornberg, A. y Pricer, W.E. (1951). Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. *J. Biol. Chem.* 193, 481-495.
- León, O. (1977). Cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y de N-acetilglucosamina en derivados de glucosamina inmovilizados en sefarosa. *Tesis de Bioquímica. Universidad de Concepción.*

León, O., Monasterio, O. y Niemeyer, H. (1977). Cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y de N-acetilglucosamina en derivados inmovilizados en sefarosa. I Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, Talca. *Libro de Resúmenes*, s/n.

Levitzki, A. y Koshland, D.E., Jr. (1969). Negative cooperativity in regulatory enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62, 1121-1128.

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

Long, C. (1953). Studies involving enzymic phosphorylation. 2. Changes in the hexokinase activity of the small intestine of rats caused by feeding different diets. *Biochem. J.* 53, 7-12.

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

May, R.J. y Mc Carthy, D.M. (1976). Particulate hexokinase activity in rat intestine: The comparative contributions of mitochondria and brush-border membranes. *Biochem. J.* 159, 189-192.

Mayer, R.J. y Hübscher, G. (1971). Mitochondrial hexokinase from small-intestinal mucosa and brain. *Biochem. J.* 124, 491-500.

Mayer, R.J., Shakespeare, P. y Hübscher, G. (1970). Glucose metabolism in the mucosa of the small intestine. Changes of hexokinase activity during perfusion of the proximal half of rat small intestine. *Biochem. J.* 116, 43-48.

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

Monasterio, O., León, O. y Niemeyer, H. (1977). Propiedades de los ácidos 6-aminohexanoico y N-etilsuccinámico, como espaciadores de glucosamina inmovilizada a sefarosa, en cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y N-acetilglucosamina. II Reunión Regional PAABS y XIII Reunión Soc. Argentina Invest. Bioquím. Córdoba, Argentina. *Libro de Resúmenes*, 90.

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

Niemeyer, H. y Ureta, T. (1972). Enzyme adaptation in mammals. En *Molecular basis of biological activity*. (Gaede, K., Horecker, B. y Whelan, W., ed.). p. 221-272. Academic Press, N. York.

Niemeyer, H., Ureta, T. y Clark-Turri, L. (1975b). Adaptative character of liver glucokinase. *Mol. Cell. Biochem.* 6, 109-126.

- Oguchi, M., Miyatake, Y., Ayake, J. y Akamatsu, N. (1975). Phosphorylation of D-glucosamine by rat liver glucokinase. *J. Biochem.* 77, 1117-1121.
- Pharmacia Fine Chemical (1968). Sephadex. Gel filtration theory and practice. *Uppsala, Suecia.*
- Pharmacia Fine Chemicals (1974). Affinity Chromatography. Principles and methods. *Uppsala. Suecia.*
- Pilkis, S.J. (1972). Rat hepatic glucokinase: improved purification and some properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 349-360.
- Pilkis, S.J. y Hansen, R.J. (1968). Resolution of two high K_m ATP: D-hexose phosphotransferase bands by starch-gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 159, 189-191.
- Pilkis, S.J., Hansen, R.J. y Krahl, M.E. (1968). Apparent molecular weights of some ATP: D-hexose phosphotransferases. Specific effects of Sephadex G-100. *Biochem. Biophys. Acta* 154, 250-252.
- Reyes, A. y Cárdenas, M.L. (1980). Distribución celular de las isoenzimas fosforilantes de glucosa en hígado de rata. IV Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile. XVI Reunión Soc. Argentina Invest. Bioquím. Mendoza, Argentina. *Libro de Resúmenes*, 100.
- Salas, J., Salas, M., Viñuela, E. y Sols, A. (1965). Glucokinase of rabbit liver. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 240, 1014-1018.

- Sato, S., Matsushima, T. y Sugimura, T. (1969). Hexokinase isozyme patterns of experimental hepatomas of rats. *Cancer Res.* 29, 1437-1446.
- Shatton, J.B., Morris, H.P. y Weinhouse, S. (1969). Kinetic, electrophoretic, and chromatographic studies on glucose-ATP phosphotransferases in rat hepatomas. *Cancer Res.* 29, 1161-1172.
- Slein, M.W., Cori, G. y Cori, C.F. (1950). A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. *J. Biol. Chem.* 186, 763-780.
- Srivastava, L.M. y Hübscher, G. (1966). Glucose metabolism in the mucosa of the small intestine. Glycolysis in subcellular preparations from cat and rat. *Biochem. J.* 100, 458-466.
- Srivastava, L.M., Shakespeare, P. y Hübscher, G. (1968). Glucose metabolism in the mucosa of the small intestine. A study of hexokinase activity. *Biochem. J.* 109, 35-42.
- Stifel, F.B., Rosensweig, N.S., Zakim, D. y Herman, R.H. (1968). Dietary regulation of glycolytic enzymes. I. Adaptative changes in rat jejunum. *Biochim. Biophys. Acta* 170, 221-227.
- Storer, A. y Cornish-Bowden, A. (1976). Kinetics of rat liver glucokinase. Cooperative interactions with glucose at physiologically significant concentrations. *Biochem. J.* 159, 7-14.
- Ureta, T. (1965). Formas moleculares múltiples de ATP: D-hexosa-6-fosfo-transferasas. *Tesis de carrera académica. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.*

- Ureta, T. (1976). The allosteric regulation of hexokinase C from amphibian liver. *J. Biol. Chem.* 251, 5035-5042.
- Viñuela, E., Salas, M. y Sols, A. (1963). Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* 238, PC 1175-1177.
- Vera, M.L., Cárdenas, M.L. y Niemeyer, H. (1976). Enzimas fosforilantes de glucosa de mucosa de intestino de rata. XIX Reunión Anual Soc. Biol. Chile, Jahuel. *Arch. Biol. Med. Exp.* 11, R-110, 1978.
- Vera, M.L., Cárdenas, M.L. y Niemeyer, H. (1977). Enzimas fosforilantes de glucosa y de N-acetilglucosamina en mucosa de intestino de rata. I Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, Talca. *Libro de Resúmenes*, s/n.
- Walker, D.G. (1963). On the presence of two soluble glucose-phosphorylating enzymes in adult liver and the development of one of these after birth. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 209-226.
- Weinhouse, S. (1976). Regulation of glucokinase in liver. En *Current topics in cellular regulation*, vol. 11 (Horecker, B.L. y Stadman, E.R., eds.), pp. 1-50.
- Weiser, M.M., Quill, H. e Isselbacher, K.J. (1971). Isolation and properties of intestinal hexokinases, fructokinase and N-acetylglucosamine kinase. *J. Biol. Chem.* 246, 2331-2337.
- Wilson, J.E. (1972). The molecular weight of rat brain hexokinase. *Biochim. Biophys. Acta* 276, 568-571.