

UCH-FC
DOC-B
M 125
C ✓ J

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE GLUCOQUINASA



Tesis

Presentada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Ricardo Benjamin Maccioni Baraona

Septiembre, 1975

Profesor patrocinante Dr. Jorge Babul Cattán

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile
Sede Santiago-Oriente

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 D O C T O R A D O

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad
de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el Candi
dato

Ricardo Benjamín Maccioni Baraona

ha sido aprobado por la Comisión Informante de Tesis como re-
quisito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Men-
ción en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el
día 10 de Octubre de 1975

Patrocinante de Tesis

Comisión Informante de Tesis

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Jorge Babul C.

Contó además con el patrocinio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, U. de Chile, que dirige el Dr. Antonio Morello C., y del cual el autor de esta tesis es miembro académico.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos a las siguientes personas, cuya contribución ha sido de gran valor durante el desarrollo de esta tesis:

Al Dr. Hermann Niemeyer F., por su valiosísimo apoyo crítico y por entregarme un ambiente estimulante para el desarrollo de este trabajo; al Dr. Jorge Babul C., por su aporte constante de ideas en esta investigación y por sus enseñanzas que han enriquecido mi formación; al Dr. Tito Ureta A., por el cúmulo de información que me aportó durante la investigación y por su gran apoyo en la discusión y revisión de los manuscritos.

A los Dres. Antonio Morello, Catherine C. Allende, M. Luisa Dinamarca y Alvaro Ramírez por las facilidades que me otorgaron para realizar varios de los experimentos de esta tesis; a la Dra. Elisa Marusic, quien me permitió utilizar el recinto del Departamento de Fisiología y Biofísica para la mantención de los perros.

A la Dra. Lyllian Clark, a la Srta. M. de la Luz Cárdenas, a la Srta. Eliana Rabajille y al Sr. José Peñaranda, por la información que fueron entregando para hacer posible muchos de los experimentos que aquí se presentan.

Ricardo Maccioni B.
Santiago, Septiembre de 1975

Dedico esta tesis a

mi madre Ana

R E S U M E N

En este trabajo se presentan detalles de la purificación y caracterización de la glucoquinasa (ATP: D-glucosa 6-fosfotransferasa EC 2.7.1.2) de hígado de perro. La enzima ha sido purificada cerca de 11.000 veces obteniéndose una preparación homogénea según los criterios de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia y ausencia de agentes desnaturantes y de electroenfoque. La enzima purificada presenta una actividad específica de 89 unidades/mg. El procedimiento con el cual se obtiene un rendimiento de 12 % consiste esencialmente en cromatografía en DEAE-celulosa, fraccionamiento con sulfato de amonio, filtración en Sephadex G-100 y cromatografía en una matriz de glucosamina ligada a Sepharosa. La enzima se logró purificar también mediante una cromatografía en DEAE Sephadex en reemplazo de la cromatografía en la matriz de glucosamina ligada a Sepharosa. La presencia de KCl, glucosa y 2-mercaptoetanol en las soluciones utilizadas durante el procedimiento de purificación impidieron una pérdida significativa de la actividad, resultando así una preparación estable de la glucoquinasa.

La glucoquinasa se caracterizó en relación a su estabilidad, peso molecular, composición de aminoácidos, número de grupos SH y a sus propiedades fisicoquímicas y cinéticas. La enzima presenta la propiedad de ser una proteína globular con un radio de Stokes

de 29,8 Å, un volumen parcial específico de $0,729 \text{ ml} \times \text{g}^{-1}$ y un coeficiente de difusión de $74 \text{ } \mu\text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$. Se calculó también una razón friccional máxima (f/f_0) de 1,24 y un máximo grado de hidratación de 0,65 g de agua por g de proteína. Mediante procedimientos espectrofotométricos se obtuvo un coeficiente de extinción a 280 nm de 1,25 y un máximo de adsorción en el espectro ultravioleta a 278 nm.

Mediante filtración en geles se obtuvo un peso molecular de 47.000 daltons. Se encontró un peso molecular muy similar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, lo que sugiere que la glucoquinasa contiene una sola subunidad. De acuerdo con esto, el análisis de aminoácidos revela la existencia de un total de 30 residuos para la suma de argininas y lisinas, valor que es igual al número de péptidos encontrados por el análisis de un digerido trípico de la enzima. De acuerdo con la alta proporción de aspártico y glutámico encontradas en el análisis de aminoácidos y a la fuerte unión de la enzima a DEAE-celulosa a pH 7, la glucoquinasa se caracterizó como una proteína ácida con un punto isoeléctrico de 5,1.

El análisis de aminoácidos reveló que la glucoquinasa contiene 15 tirosinas y 9 grupos sulfhidrilos, lo cual es consistente con la titulación espectrofotométrica de tirosinas y la modificación por PCMB de los grupos SH de la enzima, en experimentos realizados en presencia y ausencia de urea 8 M. El grado de

inactivación e de la glucoquinasa por PCMB fue proporcional a la modificación de los 9 grupos SH y la actividad enzimática se recuperó al agregar un exceso de DTT al sistema de reacción.

La glucoquinasa presenta una función de saturación sigmoideal para la glucosa y manosa con coeficientes de Hill de 1,5 y valores de $K_{0,5}$ de 4 y 3,5 mM respectivamente.

Estos resultados, junto con los estudios de especificidad de sustratos, indican una similitud en el comportamiento cinético entre la glucoquinasa de hígado de perro con la de rata, que se ha estudiado en este laboratorio.

ABSTRACT

Glucokinase (ATP:D-glucose 6-phosphotransferase, E C 2.7.1.2) from dog liver has been purified over 11,000 fold to homogeneity as judged by disc gel electrophoresis in the presence and absence of denaturing agents and by isoelectric focusing. About 12 % of the initial activity could be obtained in the homogeneous form by a procedure involving DEAE-cellulose Chromatography, ammonium sulphate fractionation, Sephadex G-100 filtration and chromatography on a matrix of a glucosamine derivative of Sepharose. A successful alternative procedure employed DEAE-Sephadex chromatography instead of the affinity chromatography stage. The presence of KCl, glucose and sulphhydryl-protecting reagents in all buffer used during the purification procedure prevented significant losses of activity and resulted in a stable enzyme preparation.

Glucokinase was characterized with respect to stability, molecular weight, amino acid composition, number of SH groups and physicochemical and kinetics properties. The enzyme was found to be a globular protein with a Stokes radius of 29,8 Å; a partial specific volume of 0,729 ml x g⁻¹ and a diffusion coefficient of 74 μm² x s⁻¹. A maximal frictional ratio, f/f_0 of 1,24 and a maximal degree of hydration of 0,65 g per g were also calculated. A maximum ultraviolet absorption at 278 nm

and an extinction coefficient $A_{1\text{ cm}}^{0,1\%} = 1,25$ at 280 nm were calculated by spectrophotometric procedures.

A molecular weight of 47,000 daltons was estimated by gel filtration. An almost identical molecular weight (49,000 daltons) was found by polyacrilamide gel electrophoresis of the enzyme in the presence of sodium dodecyl sulphate, strongly suggesting that glucokinase consist of a single polypeptide chain. In support of this view, 30 peptides were found after trypsin digestion of glucokinase, which is the number to be expected from the content of arginine plus lysine. As expected from amino acid analysis and its strong binding to DEAE cellulose at pH 7,0, the enzyme was found to be an acidic protein with an isoelectric point of 5.1.

Amino acid analysis revealed that glucokinase contains 15 tyrosines and 9 cysteinil residues, which is consistent with the spectrophotometric titration of tyrosines and the PCMB modification of the SH groups of the enzyme, in experiments performed in the presence and absence of urea. Progressive titration with PCMB resulted in a proportional loss of the enzyme activity for all SH groups and the activity was recovered by addition of an excess of DTT to the reacting system.

Glucokinase exhibits sigmoidal saturation functions for glucose and mannose with Hill coefficients about 1.5 and half saturation values ($K_{0,5}$) of 4 and 3.5 mM respectively. The

biochemicals characteristics of the enzyme from dog are similar to those of the rat, studied in this laboratory.

TABLA DE CONTENIDOS

	pag.
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
INTRODUCCION	1
 METODOS Y MATERIALES	
I. METODOS.	
A. Animales de experimentación	11
B. Ensayo enzimático de la actividad fosfotrans-	1
ferásica.	12
1. Método I: Medición de la glucosa 6-fosfato	13
2. Método II: Medición del ADP	17
C. Determinación de proteínas	18
D. Preparación de resinas, geles y columnas para	
la cromatografía	
1. Preparación de las resinas y geles cromato-	
gráficos.	20
2. Mantención de las resinas	23
3. Fabricación y tratamiento de las colum-	
nas.	23
4. Empacamiento de las columnas	24
E. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	24
F. Electroforesis en geles de poliacrilamida en	
presencia de urea.....	26

	Pág.
G. Electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio	27
H. Tinción de actividad glucoquinásica en geles de poliacrilamida	29
I. Determinación del punto isoelectrico	30
J. Determinación del peso molecular y parámetros hidrodinámicos	32
K. Estudios espectrales	33
L. Análisis de aminoácidos !.....	34
M. Mapa peptídico	35
N. Determinación de grupos sulfhidrilos	36
O. Hidrólisis química con CNBr	37
 II. MATERIALES	
A. Reactivos	38
B. Proteínas	39
C. Materiales cromatográficos	39
 RESULTADOS	
I. ELECCION DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACION	41
II. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA ISOENZIMATICO EN HIGADO DE PERRO	
A. Perfil cromatográfico de las isoenzimas fosforilantes de glucosa en el hígado de perro	42
B. Efecto de la dieta en los niveles de glucoquinasa de los extractos crudos	46

	Pág.
III. PURIFICACION DE LA GLUCOQUINASA DE HIGADO DE PERRO	48
A. ETAPA DE PURIFICACION	
1. Preparación de los extractos crudos	49
2. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa	51
3. Precipitación fraccionada con sulfato de amonio	55
4. Cromatografía de exclusión en geles	59
5. Cromatografía de intercambio en DEAE celu- losa microgranular	62
6. Etapas cromatográficas alternativas	
6.1. Cromatografía de filtración iónica.....	65
6.2. Cromatografía de afinidad en glucosamina acoplada a Sepharosa	71
B. METODO ABREVIADO DE PURIFICACION	78
C. TIEMPO EMPLEADO EN LA PURIFICACION	83
D. VENTAJA DEL METODO QUE UTILIZA LA MATRIZ DE SEPHAROSA-GLUCOSAMINA	84
E. CONTROL DE PUREZA DE LAS PREPARACIONES	85
F. TINCION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA	86
IV. CARACTERISTICAS DE LA GLUCOQUINASA DE HIGADO DE PERRO	
A. ESTABILIDAD DE LA GLUCOQUINASA	
1. Estabilidad de los extractos crudos	98

	Pág.
2. Estabilidad de las preparaciones de mayor purificación	99
3. Resistencia a la inactivación por urea	109
B. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES	
1. Determinación del peso molecular de la enzima nativa	110
2. Determinación del peso molecular de la enzima desnaturalada	110
C. CARACTERISTICAS HIDRODINAMICAS DE LA GLUCOQUINASA	
1. Cálculo del medio de Stokes	111
2. Cálculo del volumen parcial específico	112
3. Cálculo del medio molecular	112
4. Cálculo de la razón friccional	113
5. Cálculo del coeficiente de difusión	114
D. PUNTO ISOELECTRICO DE LA GLUCOQUINASA	125
E. ESTUDIOS ESPECTRALES	
1. Espectro ultravioleta visible	125
2. Coeficiente de extinción de la glucoquinasa ..	133
3. Contenido de tirosinas	133
4. Contenido de triptófano	133
F. COMPOSICION DE AMINOACIDOS	137
G. DETERMINACION DE GRUPOS SULFHIDRILICOS	138
H. MAPA PEPTIDICO	145

	Pág.
I. HIDROLISIS QUIMICA CON CNBr	146
J. ESTUDIOS EN RELACION A LA ACTIVIDAD CATALITICA	
1. Especificidad de sustratos	150
2. Determinación de $K_{0,5}$, V_m y coeficiente de Hill	150
3. Número de recambio de la glucoquinasa	158
DISCUSION	
A. METODO DE PURIFICACION	160
B. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD	167
C. ESTABILIDAD DE LA GLUCOQUINASA	169
D. CARACTERISTICAS FISICO-QUINICAS	171
E. ESTRUCTURA CUATERNARIA	173
F. RELACIONES ENTRE LAS ISOENZIMAS FOSFORILANTES	175
G. ACTIVIDAD CATALITICA Y COMPORTAMIENTO CINETICO	178
COMENTARIO FINAL	182
BIBLIOGRAFIA	184

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA I Efecto de la alimentación en los niveles de glucoquinasa de extractos de hígado de perro	47
TABLA II Purificación de la glucoquinasa. Método 1	70
TABLA III Purificación de la glucoquinasa. Método 2	77
TABLA IV Resumen de las propiedades fisico-químicas de la glucoquinasa de hígado de perro	128
TABLA V Composición de aminoácidos de la glucoquinasa de hígado de perro	136
TABLA VI Velocidad relativa de fosforilación de varios sacáridos por glucoquinasa	151
TABLA VII Valores comparativos de constantes cinéticas de glucoquinasa de perro y rata	157
TABLA VIII Purificación de la glucoquinasa de hígado de cerdo	164

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Perfil de elución de las isoenzimas fosforilantes de glucosa en el hígado de perro	43
Fig. 2. Cromatografía de intercambio iónico del extracto crudo en DEAE-celulosa	53
Fig. 3. Precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio de una muestra del eluido seleccionado de DEAE-celulosa	56
Fig. 4. Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción precipitada entre 55 y 80 % de saturación con sulfato de amonio	60
Fig. 5. Cromatografía en DEAE-celulosa microgranular del eluido seleccionado de Sephadex G-100	63
Fig. 6. Cromatografía de filtración iónica en columna de DEAE-Sephadex del eluido seleccionado de la re-cromatografía en DEAE-celulosa	68
Fig. 7. Cromatografía en columna de glucosamina ligada a Sepharosa del eluido seleccionado de la cromatografía en DEAE-celulosa microgranular	74
Fig. 8. Cromatografía en columna de Sepharosa-Glucosamina del eluido de Sephadex G-100	84
Fig. 9. Electroforesis en geles de poliacrilamida de preparaciones de diferentes etapas del método de purificación	88
Fig.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la glucoquinasa obtenida por el método que emplea la cromatografía en DEAE-Sephadex	90
Fig.11. Electroforesis en geles de poliacrilamida de la glucoquinasa obtenida por el método de la cromatografía en Sepharosa-Glucosamina	92
Fig.12. Electroforesis de la glucoquinasa en geles de poliacrilamida en presencia de agentes desnaturantes	94

	Pág.
Fig. 13. Electroforesis en geles de poliacrilamida para la tinción de la actividad glucoquinásica	96
Fig. 14. Inactivación de la glucoquinasa de un extracto crudo de hígado de perro por incubación a 4° ...	101
Fig. 15. Estabilidad térmica de la glucoquinasa en tres estados de pureza	103
Fig. 16. Efecto de la glucosa y el KCl en la inactivación térmica de la glucoquinasa en dos estados de pureza	105
Fig. 17. Resistencia de la glucoquinasa a la inactivación por urea	107
Fig. 18. Determinación del peso molecular de la glucoquinasa por filtración en columna de Sephadex G-100	115
Fig. 19. Determinación del peso molecular de la glucoquinasa por filtración en capa fina de Sephadex G-100	117
Fig. 20. Determinación del peso molecular de la subunidad de la glucoquinasa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 5 % en presencia de SDS 0,1 %	119
Fig. 21. Determinación del radio de Stokes de la glucoquinasa	121
Fig. 22. Determinación del coeficiente de difusión de la glucoquinasa por filtración en Sephadex G-100 ...	123
Fig. 23. Electrofocalización de la glucoquinasa en geles de poliacrilamida	126
Fig. 24. Espectro ultravioleta de la glucoquinasa nativa .	129
Fig. 25. Espectro ultravioleta de la glucoquinasa en HCl 0,1 N	131
Fig. 26. Titulación espectrofotométrica de las tirosinas .	134
Fig. 27. Influencia de la modificación de los grupos SH en la actividad de la glucoquinasa	139

	Pág.
Fig. 28. Cinética de modificación de los grupos SH con PCMB	141
Fig. 29. Modificación de los grupos SH de la glucoquinasa con PCMB en presencia de urea	143
Fig. 30. Mapa peptídico de un digerido triptico de glucoquinasa	147
Fig. 31. Actividad de la glucoquinasa de hígado de perro en función de la concentración de glucosa	152
Fig. 32. Actividad de la glucoquinasa en función de la concentración de manosa	154
Fig. 33. Electroforesis de una preparación de glucoquinasa proveniente de recromatografía en Sephadex G-100 después de la etapa 5	165

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP,ADP : Adenosin tri y difosfato
- NADP : Nicotinamida adenindinucleotido fosfato
- NAD : Nicotinamida adenindinucleotido
- EDTA : Acido etilendiaminotetracetico
- DTT : Ditionitrosol (reactivo de Cleland)
- SDS : Dodecilsulfato de sodio
- NBT : Nitrobluetetrazolium
- 2-ME : 2 -mercaptoetanol
- PEP : Fosfoenol piruvico
- Tris : Tris (hidroximetil) aminometano .
- Bisacrilamida : N, N -Metilenbisacrilamida
- PCMB : p-Cloromercuribenzoato
- DEAE-celulosa : Dietilaminoetilcelulosa
- DEAE-Sephadex : Dietilaminoetil Sephadex .
- G-6-PDH : Glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa .
- 6-PGDH : 6-fosfogluconico deshidrogenasa .

INTRODUCCION

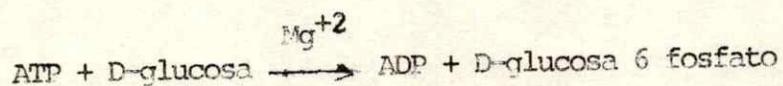
Los organismos vivos están ligados al medio ambiente a través de múltiples formas de interacción. Para mantener su integridad y desarrollar sus funciones requieren el aporte de energía, que la obtienen de los alimentos que toman del medio ambiente en que viven. Una de las fuentes importantes de energía en el alimento son los hidratos de carbono y para aprovechar la energía que contienen estas moléculas, las células vivas realizan la glicólisis. La glicólisis consiste en el proceso de degradación metabólica de la glucosa mediante una serie de reacciones catalizadas por enzimas y que le permiten a la célula producir energía en forma gradual.

Los orígenes del conocimiento acerca de este proceso están vinculados a una serie de descubrimientos importantes, entre los cuales es conveniente mencionar los de Schwan y Kützing en 1837, quienes demostraron que en el fenómeno de la fermentación alcohólica intervienen las células de levadura. Unos años más tarde, en 1861 Pasteur demuestra que la producción de alcohol por la levadura a partir de la glucosa es un proceso anaeróbico e infiere en forma visionaria que las células vivas que requieren oxígeno para su crecimiento y funciones son también capaces de obtener la energía de la glucosa descomponiéndola en condiciones anaeróbicas. Otro aporte importante a estas investigaciones viene de los estudios de Meyerhof, quien observó el proceso de la glicólisis en extractos musculares de mamíferos y describió en la levadura la enzima que cataliza la transferencia del fosfato terminal del ATP al carbono 6 de la glucosa y otras hexosas,

la primera reacción de la degradación de la glucosa (1).

La fosforilación de la glucosa en el hígado fue demostrada por Colowick et al (2) y en las últimas dos décadas esta reacción ha despertado un creciente interés debido a su importancia en la regulación del metabolismo de los carbohidratos.

La reacción de fosforilación de la glucosa por el ATP es la siguiente:



Los estudios de Walker (3,4) y Walker y Rao (5) revisten un significado especial en el conocimiento de esta reacción pues mediante un análisis cinético lograron distinguir en el hígado de rata la presencia de dos enzimas fosforilantes de glucosa, una de K_m alta (10^{-2} M) y otra con una K_m baja (10^{-5} M). En el laboratorio de Sols, por otra parte, Viñuela et al (6) y Salas et al (7) separaron mediante precipitaciones con sulfato de amonio dos fracciones proteicas con actividad fosforilante de glucosa: una caracterizada por una K_m alta para glucosa (10^{-2} M) que denominaron glucoquinasa y otra de baja K_m (10^{-5} M) que denominaron hexoquinasa. En 1964, en el laboratorio de Niemyer, González et al (8,9) descubrieron mediante el uso de cromatografía en DEAE-celulosa la existencia de cuatro isoenzimas capaces de fosforilar la glucosa en el hígado de rata, las que se denominaron con las letras A, B, C y D de acuerdo a su orden de elución cromatográfica. Estos resultados fueron pronto confirmados mediante electroforesis en geles de almidón (10,11). Las isoenzimas A, B y C

presentan constantes de Michaelis bajas para la glucosa (10^{-4} - 10^{-5} M), una amplia especificidad de sustratos y un peso molecular de alrededor de 100.000 daltons (8,9,12 y 13). Este grupo es conocido como hexoquinasa (ATP: D-hexosa 6-fosfotransferasa, E.C.2.7.1.1). Una característica que identifica a la isoenzima C es su inhibición por exceso de sustrato (9). La isoenzima D o glucoquinasa (ATP: D-glucosa 6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.2) tiene una K_m alta para glucosa (10^{-2} M), una especificidad más restringida para los sacáridos y un peso molecular entre 50.000 y 65.000 daltons (6,8,9,13-18). La diferencia en los valores de K_m entre la glucoquinasa y las hexoquinasa ha sido el criterio más utilizado para diferenciarlas. El alto valor en la K_m para glucosa de la glucoquinasa tiene un significado fisiológico importante puesto que la enzima puede controlar la fosforilación del sustrato en relación a su concentración en la célula hepática (19,20).

Para estudiar las relaciones entre las isoenzimas fosforilantes de glucosa, su evolución y función es fundamental el tener un conocimiento de la estructura de éstas. Los conocimientos de las características estructurales de estas isoenzimas son, hasta el presente, muy limitados y los resultados de este trabajo contribuyen a aumentar la información acerca de la estructura de estas isoenzimas, al lograrse la purificación y caracterización estructural de la glucoquinasa.

La familia de isoenzimas fosforilantes de glucosa tiene una distribución casi universal, variando el número y proporción de cada una de ellas en relación con la especie y el tipo de célula o tejido. En las levaduras se han encontrado 2 hexoquinasa que han sido purificadas y caracterizadas en relación a sus propiedades cinéticas y

estructurales (21-25). Estas enzimas presentan algunas propiedades diferentes de las hexoquinetas de rata. También hay hexoquinetas en muchas bacterias (26-28) y en algunos tejidos vegetales (29). Son innumerables los trabajos que describen la existencia de hexoquinetas en diferentes tejidos de animales superiores (30-33).

La importancia filogenética de este sistema de isoenzimas se revela por los variados estudios de tipo comparativo. Este problema ha constituido un aspecto importante de las investigaciones de este laboratorio (34). Se han publicado estudios comparativos entre hexoquinasa de levadura y de tejidos animales (35 y 36) y un número importante de investigadores ha enfocado su atención en el aspecto filogenético de este sistema de isoenzimas en los vertebrados (13,19,34,37 y 38). La glucoquinasa y algunas hexoquinetas están presentes en el hígado de muchos mamíferos (31,37-41), tortugas (42 y 43) y anfibios (20,43 y 44) en relaciones variables según la especie. La glucoquinasa no ha sido encontrada en las aves (45), reptiles superiores (42) y algunos mamíferos como los rumiantes y el gato entre los carnívoros (46 y 47). Las diferencias encontradas, aún entre especies de un mismo orden hace difícil obtener generalizaciones en relación al papel filogenético de estas isoenzimas.

Los resultados de la estructura cuaternaria y del mapa péptido de la glucoquinasa, presentados en este trabajo, aportan información para una mejor comprensión del problema filogenético de estas isoenzimas.

Las hexoquinetas están distribuidas en todos los tejidos de la rata aunque en número y proporciones diferentes (31,48). Sin embargo,

la glucoquinasa parece ser una enzima típica del hígado aunque su presencia se ha revelado también en el riñón (49) y páncreas (50) de la rata y en reticulocitos (51) y cerebro humanos (52). Uno de los descubrimientos importantes acerca de la glucoquinasa hepática fue el hecho de que los niveles tisulares de esta enzima aumentan en respuesta al suministro de glucosa y otros carbohidratos en la dieta (53-57). Los niveles de glucoquinasa decrecen durante el ayuno (19,20,58,59) y la enzima es inducida por administración de glucosa (20,58) al animal ayunado.

Los niveles de la glucoquinasa hepática dependen estrictamente del suministro de carbohidratos en la dieta. La glicógeno fosforilasa y la glicógeno sintetasa, involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, dependen también del suministro de glucosa, en tanto que otras enzimas de la glicólisis dependen del aporte de proteínas o de proteínas y carbohidratos (20,60,61). La glucoquinasa presenta además un interés especial desde el punto de vista adaptativo, puesto que es la única enzima fosforilante de glucosa cuyos niveles se modifican en relación con la dieta (6,62,63).

Los cambios en la dieta producen cambios en el balance endocrino y así la glucosa estimula la producción de insulina, hormona que es indispensable para mantener la actividad glucoquinásica e iniciar la inducción de la enzima (64,65). Otras hormonas como el glucagón (66) y las catecolaminas (67) inhiben la inducción de la glucoquinasa según la dosis empleada, en tanto que los glucocorticoides (68) parecen modular la velocidad de inducción de la enzima.

En este laboratorio se ha encontrado que las variaciones en los niveles de la glucoquinasa hepática, por efecto de la dieta, corresponden a cambios en la cantidad de enzima; según lo demuestran los estudios con inhibidores de la síntesis de proteínas en la inducción (58,65,68) y más recientemente, por pruebas experimentales de tipo inmunológico (69). Un estudio inmunológico del mecanismo de este aumento en la cantidad de enzima requiere de la preparación de anticuerpos específicos contra la glucoquinasa. Es así como en este laboratorio se han invertido muchos esfuerzos para la purificación total de la enzima con el fin primordial de preparar estos anticuerpos. Ello permitiría esclarecer el mecanismo de la inducción en el sentido de determinar si los cambios en los niveles de enzima, asociados a diferentes condiciones fisiológicas, son correlativos de variaciones en la velocidad de síntesis o en la velocidad de degradación de la glucoquinasa.

Esta tesis se orientó fundamentalmente hacia la búsqueda de un método de purificación que permitiera obtener, con buenos rendimientos, la glucoquinasa en forma homogénea y a realizar estudios de tipo estructural con la enzima purificada. Uno de los objetivos para la obtención de un método simple de purificación y que permitiera juntar enzima en corto tiempo fue el de hacer posible la preparación de anticuerpos contra la glucoquinasa. Esta preparación de anticuerpos abre las puertas a los estudios de recambio de la glucoquinasa, con los cuales se puede comprender el mecanismo de la inducción y también a los estudios comparativos entre las isoenzimas fosforilantes

de diferentes especies.

Un objetivo más inmediato fue la caracterización estructural de la enzima en relación con la estructura de subunidades, propiedades fisicoquímicas y otras características. El conocimiento de la composición de subunidades de la glucoquinasa constituye una información clave para comprender la función regulatoria de esta enzima dentro del cuadro metabólico. Las últimas investigaciones de este laboratorio han demostrado que la glucoquinasa presenta un comportamiento cinético de tipo sigmoidal y el modelo para explicar este comportamiento dependerá de la estructura de subunidades de la enzima. Además el conocimiento de la estructura cuaternaria de la glucoquinasa, conjuntamente con el de las otras isoenzimas fosforilantes de glucosa, permitirá conocer si la información para la biosíntesis de estas isoenzimas está codificada en un gen o en genes independientes.

El problema de la purificación de la glucoquinasa ha estimulado a varios grupos de investigadores con objetivos diferentes. Al comenzar este trabajo no habían aparecido metodías que permitieran obtener una enzima homogénea. Durante el desarrollo de éste, Grossmann et al (70) publicaron un método que, aunque bastante complicado experimentalmente, permite la obtención de la glucoquinasa de rata aparentemente pura.

Salas et al (14) en el año 1965 presentaron un protocolo de purificación de la glucoquinasa de hígado de conejo y de algunas de sus características cinéticas, logrando una preparación con una actividad específica de 2 unidades/mg de proteína mediante fraccionamientos con etanol, columnas de DEAE Sephadex y precipitaciones con

sulfato de amonio. Muy poco tiempo después aparecen dos contribuciones importantes al estudio de la purificación: Parry y Walker (15) describieron un método de purificación de la glucoquinasa de hígado de rata con el que se llegaba a una actividad específica de 8,7 unidades/mg trabajando con columnas de intercambio iónico y precipitaciones con sulfato de amonio. Por otra parte, Babul y Niemeyer describieron una purificación parcial de glucoquinasa de hígado de rata mediante cromatografía en Carboximetil Sephadex, DEAE celulosa e hidroxilapatita y lograron obtener una preparación con una actividad específica de 5,7 (71,72). Desde 1966, transcurren seis años en los que no aparecen publicaciones en relación a la purificación de la glucoquinasa hepática, hasta que Pilakis en 1972, trabajando con la enzima de hígado de rata, logró mejorar los métodos existentes mediante un procedimiento que incluye la cromatografía en Sephadex G-100 y una separación con electroforesis en geles de almidón. Esta preparación tenía una actividad específica de 29,4, pero sobre la base del criterio analítico de electroforesis en disco, presentaba varias otras proteínas (73). Durante el desarrollo de este trabajo, Walker et al (74) abren la posibilidad al uso de la cromatografía de afinidad con glucosamina ligada a una matriz sólida, en una comunicación preliminar en la cual no se presentan datos de purificación ni se dan detalles del método usado.

Además de la glucoquinasa del hígado de algunos vertebrados, se ha descrito la existencia de una proteína con actividad glucoquinásica en *Bacillus stearothermophilus* (75). Esta proteína se ha

logrado purificar y la preparación obtenida presenta una banda de proteínas en geles de poliacrilamida, un peso molecular de 67.000 daltons mediante filtración en geles y un peso molecular de 34.500 por electroforesis en geles en el sistema acrilamida -SDS.

A pesar de los enormes avances en estas dos últimas décadas, en el campo de las técnicas de fraccionamiento de las macromoléculas, la purificación de la glucoquinasa ha resultado un problema complejo y difícil de resolver. Las principales razones por las cuales ha sido difícil de purificar derivan de la gran inestabilidad presentada por esta enzima en las etapas iniciales de purificación y también de los bajísimos niveles presentes en el hígado de los animales estudiados.

En este trabajo se ha logrado obtener una preparación homogénea de glucoquinasa de hígado de perro con una actividad específica de 88,8 unidades/mg utilizando cromatografías de intercambio iónico, filtración en Sephadex G-100 y cromatografía de afinidad en glucosamina ligada a una matriz sólida. Esta enzima se ha caracterizado como un monómero de peso molecular 48.000 daltons. Se presentan además otras propiedades estructurales y cinéticas de la enzima.

CAPITULO I

METODOS Y MATERIALES

MÉTODOS Y MATERIALES

I. MÉTODOS

A. ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En estos estudios se empleaban perros que eran obtenidos a través del Departamento de Zoonosis del Servicio Nacional de Salud, de la población de animales encontrados en la vía pública o requisados de domicilios. Los animales utilizados pesaban entre 10 y 15 Kg; su edad, sexo y estado de nutrición eran variables y su raza no definida.

Una vez capturados se les mantenía al menos durante una semana en los viveros de animales del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Sede Norte de la Universidad de Chile. Los perros eran alimentados durante 4 a 7 días con una dieta diaria que consistía en 175 g de un concentrado que contenía la fuente de proteínas, lípidos, sales minerales y vitaminas de la dieta y 250 g de tallarines para animales como fuente de carbohidratos. El concentrado alimenticio contenía principalmente harinas de pescado y carne de vacuno, trigo, maíz, torta de maravilla, vitaminas A, B₁₂ y D₃ y Na⁺, Ca⁺² y Zn⁺² entre las sales minerales.

Dos días antes de sacrificarlos se les aumentaba la ración alimenticia al doble.

Los animales se sacrificaban mediante una inyección intravenosa de una solución saturada de KCl. Los hígados recién extraídos

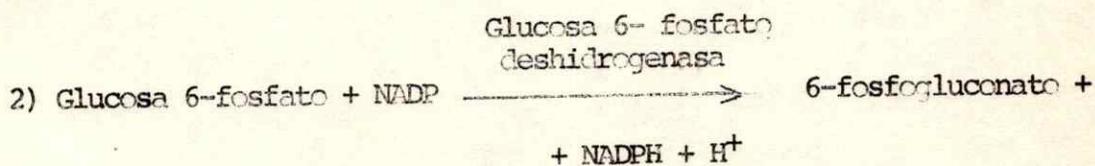
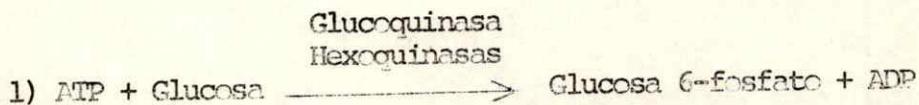
se lavaban varias veces con agua para retirarles el máximo de la sangre superficial y se dejaban sobre hielo picado durante 1 a 2 horas para hacer luego los homogeneizados según se describirá en RESULTADOS.

B. ENSAYO ENZIMATICO DE LA ACTIVIDAD FOSFOTRANSFERASICA

La actividad enzimática de la glucoquinasa y las hexoquinatas se medía sobre la base de la formación de glucosa-6-fosfato. En los estudios de especificidad de sustratos de la glucoquinasa se midió la actividad por la formación de ADP. De acuerdo con esto se describen los dos métodos utilizados:

1. Método I Medición de la Glucosa-6-fosfato

Método espectrofotométrico. La actividad de la glucoquinasa y de las hexoquinatas se medía acoplando el sistema de reacción de estas enzimas con el sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (35) de acuerdo a las siguientes reacciones:

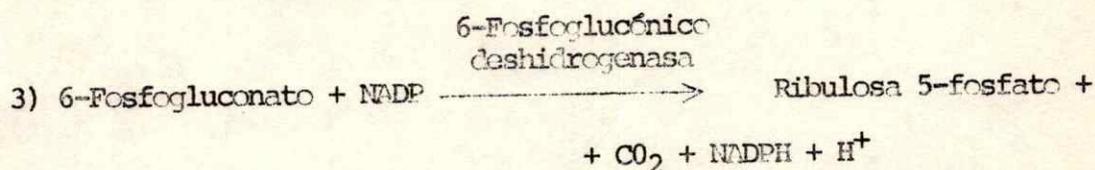


Con este método se medía la velocidad de reducción del NADP, registrando el cambio de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Gilford 2000 provisto de un termostato para mantener la temperatura a 30°. De este aumento de absorbancia se calculaban los μ moles de NADPH formados por μ mol de glucosa fosforilada.

El medio de reacción contenía los siguientes componentes (concentraciones finales) en un volumen final de 0,5 ml: Tris -HCl 80 mM pH 7,5, $MgCl_2$ 12 mM, EDTA 1 mM, KCl 100 mM, NADP 0,5 mM, glucosa 100 mM, ATP 5 mM, 0,1 unidades internacionales de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6PDH) y 20-50 μ l de la preparación enzimática adecuadamente diluida. Las concentraciones de los diferentes componentes se elegían de manera tal que el equilibrio de cada reacción del sistema de ensayo estaba desplazado hacia la derecha, siendo la oxidación de la glucosa 6-fosfato virtualmente cuantitativa en las condiciones de ensayo (76). Los diferentes reactivos se agregaban en un orden constante: se colocaba 0,3 ml de una mezcla que contenía todos los componentes del ensayo menos la glucosa y el ATP, luego se adicionaba 50 μ l de glucosa, la enzima y agua en volúmenes variables y finalmente se comenzaba la reacción con 50 μ l de ATP 0,05 M. El sistema se preincubaba a temperatura ambiente durante 1 a 3 minutos y se medía el aumento de absorbancia a 340 nm durante 8 minutos. Se utilizaba como blanco un sistema que contenía la misma composición de la mezcla de ensayo, pero se omitía el ATP.

Los extractos crudos de hígado en los que se medían los niveles de glucoquinasa contenían 6-fosfogluconato deshidrogenasa

(6-PGDH), una enzima que cataliza la reacción 3 y que igualmente produce NADPH:



Debido a ésto, para obtener las unidades de enzima, los valores de cambio de absorbancia se dividían por 2 ya que se agregaba suficiente cantidad de 6-P-GDH al medio de ensayo como para producir 2 moles de NADPH por mol de glucosa fosforilada (71). Cuando la reacción se hacía sin adicionar la 6-PGDH, se obtenía en las diferentes preparaciones un valor de 1,4 moles de NADPH formados a partir de un mol de glucosa fosforilada.

Los dos tipos de enzimas fosforilantes de la glucosa descritas por Viñuela et al (6) pueden medirse en un mismo extracto gracias a que sus Km para glucosa tienen entre sí una diferencia de tres órdenes de magnitud. Al realizar el ensayo con una concentración de glucosa de 100 mM se mide la actividad de ambas enzimas fosforilantes y al disminuir la concentración de glucosa a 0,5 mM se logra solamente medir la actividad hexoquinásica.

Para calcular la actividad glucoquinásica de los extractos crudos, en los cuales existen además las hexoquinasas y la 6-fosfogluconico deshidrogenasa se procedía de la siguiente manera:

- a) se medía la actividad enzimática total en presencia de glucosa 100 mM, ATP 5 mM y 0,2 unidades de la 6-fosfogluconico

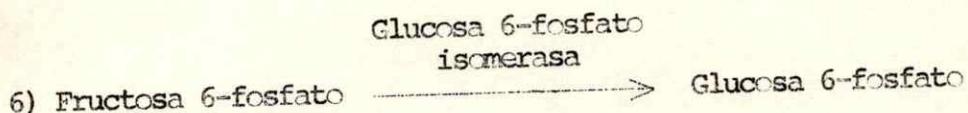
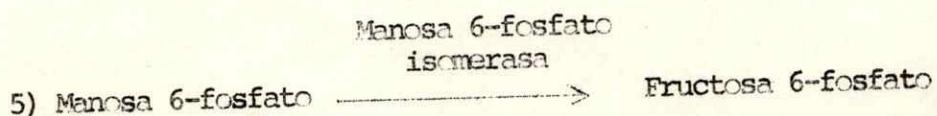
deshidrogenasa y al valor de esta actividad se le restaba la actividad obtenida en ausencia de ATP (blanco del ensayo). De esta manera se eliminaba la actividad debido a la glucosa deshidrogenasa, no relacionada con la reacción de fosforilación pero que utiliza NADP como aceptor de hidrógenos,

- b) el valor de actividad corregido en a) se dividía por 2, puesto que, de acuerdo con la reacción 3, si la 6-fosfogluconico deshidrogenasa está en exceso en el medio de ensayo se obtienen 2 moléculas de NADPH por molécula de glucosa fosforilada. De esta manera la actividad total se obtiene restando la actividad de la 6-PGDH presente en el extracto crudo,
- c) al valor corregido según a) y b) se le restaba la actividad de las hexoquinasas. Cuando los homogeneizados se hacían en presencia de glucosa, debían diluirse convenientemente los extractos, de manera de tener una concentración de glucosa de 0,5 mM en el medio de ensayo.

Las preparaciones obtenidas de las etapas de purificación de la glucoquinasa, posteriores a la preparación del extracto crudo, no contienen hexoquinasas ni 6-fosfogluconico deshidrogenasa, por lo tanto no era necesario realizar las correcciones y en el ensayo enzimático de estas preparaciones no se agregaba la 6-PGDH.

En los estudios cinéticos en que se utilizaba la manosa como sustrato de la glucoquinasa, se empleaba una modificación del método descrito para medir la actividad enzimática. Esta modificación

consiste en determinar espectrofotométricamente la glucosa 6-fosfato formada al acoplar al sistema de la glucoquinasa con los de la manosa 6-fosfato isomerasa y la glucosa 6-fosfato isomerasa, según la siguiente secuencia de reacciones (9):



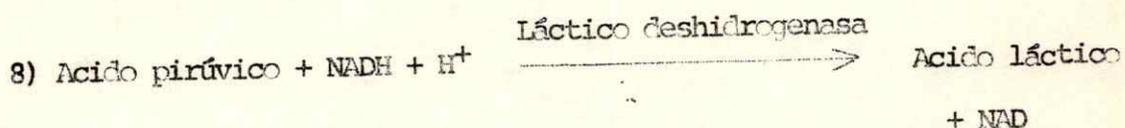
El sistema de reacción tenía los mismos componentes del método descrito con la excepción de manosa que se agregaba en reemplazo de glucosa y de la adición de 0,1 unidades internacionales de ambas isomerasas.

Método Radioactivo. Al efectuar la cromatografía de un extracto crudo de hígado de perro en una columna de DEAE celulosa, con el fin de determinar el número de isoenzimas fosforilantes de glucosa, se midieron las hexoquinasa con el método radioactivo de Ureta et al (77). En este método se utiliza glucosa-C¹⁴ como sustrato y es posible medir actividades menores que las detectables por el método espectrofotométrico, lo que permite trabajar con cantidades pequeñas de tejido.

La mezcla de reacción era similar a la del método anterior con las excepciones del NADP y de la deshidrogenasa, que se omitieron. La concentración de glucosa empleada fue de 0,5 mM y tenía una radioactividad de 500.000 cpm en 0,5 ml. La glucosa 6-fosfato formada se separó de la glucosa no reaccionada en pequeñas columnas de Dowex-1 y se eluyó con formiato de amonio 0,4 M. Alícuotas del eluido se contaron en un aparato Nuclear Chicago con una mezcla de centelleo con tolueno y Tritón X-100.

2. Método II Medición de ADP

Este ensayo se utilizó en los estudios de especificidad de sustratos. La formación de ADP se midió al acoplar la reacción de la glucoquinasa con los de la pirúvico quinasa y láctico deshidrogenasa (78) de acuerdo a las siguientes reacciones:



En este caso, la reacción de fosforilación se midió registrando la disminución de la absorbancia a 340 nm que corresponde a la desaparición del NADH presente.

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales en 0,5 ml): Tris-HCl 80 mM pH 7,5, ATP 5 mM, NADH 0,25 mM, MgCl₂ 12 mM,

fosfoenol piruvato 2,5 mM, EDTA 1,6 mM y 1 unidad internacional de cada una de las enzimas auxiliares.

Expresión de Resultados

Para expresar la actividad fosfotransferásica se utilizó la definición de una unidad de enzima como la cantidad capaz de catalizar la formación de un μmol de glucosa 6-fosfato por minuto a 30°

Se utilizaba el coeficiente de extinción molar del NADPH y del NADH que es $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ a 340 nm para cubetas de 1 cm (79).

C. DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas se determinaba por los siguientes métodos:

- a) en los extractos crudos, la concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry et al (80),
- b) en las fracciones obtenidas de las cromatografías, los niveles relativos de proteínas se detectaban por absorbancia a 280 nm,
- c) la concentración de proteínas del conjunto de las fracciones seleccionadas después de cada cromatografía se determinaba mediante el método de Warburg y Christian (31), deduciendo la concentración de proteínas de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm,

d) en las preparaciones puras, la concentración de proteínas se determinaba por lectura de absorbancia a 280 nm, sobre la base del coeficiente de extinción de la glucoquinasa. El coeficiente de extinción se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y estimando la concentración de proteínas de acuerdo al método de Webster que consiste en medir la absorbancia de la proteína a 210 nm (82). Se utilizó un valor de 1,25 para el coeficiente de extinción, determinado para una solución 0,1 % de proteínas, cuando la glucoquinasa estaba disuelta en fosfato de potasio 1 mM.

En algunos casos, la concentración de proteínas se determinó por el método de Schaffner y Weissmann (83).

D. PREPARACION DE LAS RESINAS, GELES Y COLUMNAS PARA LAS CROMATOGRAFIAS

1. Preparación y Regeneración de Las Resinas y Geles Cromatográficos

En el procedimiento de purificación se utilizaron columnas con diferentes tipos de soportes cromatográficos como el DEAE celulosa, DEAE Sephadex, Sephadex G-100 y glucosamina unida a una matriz sólida de CH-Sepharosa 4 B.

Estas resinas y geles se prepararon y regeneraron según los siguientes métodos:

1.1. Preparación y regeneración del DEAE celulosa

- a) la resina se suspendía en 5 volúmenes de agua y se sometía a un procedimiento para extraer partículas finas de menor tamaño de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (34),
- b) la resina cromatográfica suspendida en agua se colocaba sobre un embudo Buchner en un sistema de filtración al vacío y se filtraba la fase líquida utilizando papel Whatman 1 como medio de filtración. El filtrado se recogía en un matraz Kitasato de 4 lt.,
- c) después de las dos etapas anteriores, se regeneraba la resina, operación que se efectuaba con las resinas sin uso y las ya utilizadas en el procedimiento cromatográfico. La regeneración se comenzaba agregando HCl 0,5 N (10 volúmenes) sobre la resina en el sistema de filtración al vacío. El ácido se agregaba lentamente y en fracciones de volumen, y luego se filtraba de manera tal que la resina no estuviera en contacto con el ácido por más de 30 minutos,
- d) se lavaba la resina con agua destilada (15 volúmenes) para retirar el exceso de ácido, y posteriormente se agregaba NaOH 0,5 M de la misma forma como se hacía la adición del ácido,

- e) se retiraba el exceso de álcali haciendo pasar por filtración 15 volúmenes de agua destilada, se sacaba la resina del embudo, se colocaba en un vaso de precipitado y se ajustaba el pH a un valor de 7,0,
- f) se lavaba con 5 volúmenes de agua destilada y luego con 5 volúmenes de solución de fosfato de potasio 10 mM pH 7,0. La resina equilibrada en esta solución se utilizaba para la cromatografía.

En los casos en que la resina se había utilizado en la cromatografía, se agregaban 2 volúmenes de una solución de NaCl 1 M antes del procedimiento de regeneración, y se dejaba en presencia de esta sal durante una hora.

1.2. Preparación de Sephadex G-100 y Sephadex G-25

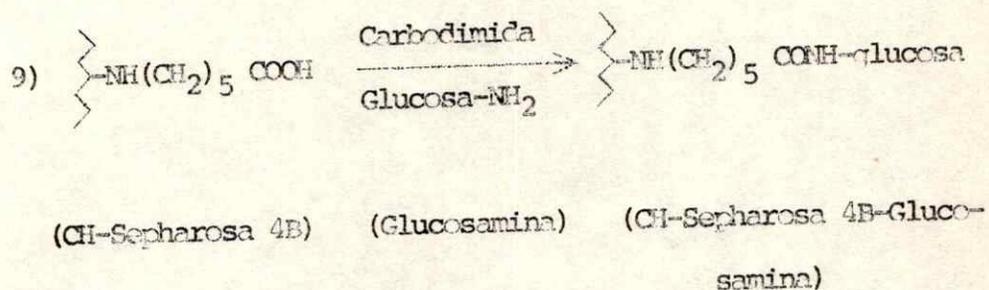
Los geles se dejaban hinchando al menos durante 48 horas en agua destilada, según lo recomiendan los fabricantes (85). Se lavaban con 5 volúmenes de agua destilada y se equilibraban en una solución de fosfato de potasio 10 mM pH 7,0 para luego utilizarlos en las respectivas columnas de filtración.

1.3. Preparación y Regeneración del DEAE Sephadex y DEAE Celulosa (DE-52, microgranular).

Estos soportes cromatográficos se prepararon y regeneraron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (86,87).

1.4. Preparación de la Matriz de Glucosamina Unida a Sepharosa

Para la purificación de la glucocuinasa se utilizó una cromatografía en una matriz sólida de glucosamina unida a Sepharosa. El gel de glucosamina unido a Sepharosa se preparó mediante la reacción de acoplamiento entre la CH-Sepharosa 4 B (que tiene el espaciador 6-aminoHexanoico) con la glucosamina, en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. La reacción consiste en la formación de una unión amídica entre el grupo amino de la glucosamina y el grupo carboxilo del ácido 6-aminohexanoico:



La CH-Sepharosa 4 B se obtuvo al estado de polvo seco y se hinchó en una solución de NaCl 0,5 M. Para retirar la lactosa y dextranos que trae desde su fabricación, se lavó con 200 ml de una solución de NaCl 0,5 M por gramo de polvo seco y luego con agua destilada para retirar el exceso de sal. La CH-Sepharosa 4 B (12 ml), después de estos lavados se hizo reaccionar con una solución acuosa de glucosamina 0,1 M v

carbodiimida 0,1 M (1-etil-3(3 dimetilaminopropil) carbodiimida en un volumen de 24 ml, durante 24 horas, a temperatura ambiente y con agitación suave. Se controló el pH en 5,0 durante la primera hora de la reacción y luego de este tiempo no se observaron variaciones de pH (88). Al terminar la reacción se lavaba el gel con 10 volúmenes de agua y luego con una solución de Tris 100 mM pH 8,3 con KCl 1 M. El gel se mantenía en esta solución y solamente antes de la cromatografía se equilibraba con la solución empleada en el método (ver RESULTADOS).

2. Mantención de las Resinas

Los geles y resinas se guardaban a 4° en una solución de fosfato de potasio 10 mM pH 7,0 con excepción de la glucosamina unida a Sepharosa que se mantenía en solución de Tris 100 mM pH 8,3. Los geles y la matriz de Sepharosa glucosamina se mantenían en las columnas cromatográficas en presencia de azida de sodio (0,02 %) para evitar contaminación microbiana.

3. Fabricación y Tratamiento de las Columnas

Las columnas cromatográficas fueron fabricadas en vidrio en los talleres de la Facultad de Ciencias, U. de Chile. Las conexiones y terminaciones de éstas fueron hechas de material plástico en este laboratorio.

El procedimiento normal de lavado consistía en dejarlas durante un día en mezcla sulfocrómica y luego lavarlas con detergente en agua caliente.

4. Empacamiento de las Columnas de DEAE Celulosa

Las columnas de DEAE celulosa para la primera cromatografía (ver RESULTADOS) se empacaban durante su preparación mediante succión desde la salida de la columna, lo cual se hacía conectando el polietileno de salida a un matraz Kitasato herméticamente cerrado y conectado a una trompa de agua en la cual se hacía el vacío. Las columnas de DEAE celulosa (microgranular) utilizadas para la recromatografía se empacaban haciendo presión sobre la columna por aplicación de aire mediante un insuflador de goma.

E. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La electroforesis analítica en geles de poliacrilamida se hacía esencialmente de acuerdo a la técnica de Davis (89), utilizando geles de 3,5 , 5 y 7 % en acrilamida con una relación de concentración entre acrilamida y N, N'-metilen bisacrilamida de 40 : 1. La electroforesis se realizaba en un sistema de tubos verticales de 70 x 6 mm, utilizando una solución de Tris-glicina pH 8,3 en ambos electrodos con una intensidad de 3 mA/gel, hasta que el colorante de referencia (azul de bromofenol) migraba hasta aproximadamente

un 90 % del largo del gel.

La preparación de los geles se hacía a partir de una mezcla de soluciones para el gel separador, y otra para el gel concentrador. Para preparar el gel separador se utilizaban las siguientes soluciones acuosas: solución A: 28 % de acrilamida y 0,7 % de bisacrilamida (p/v); solución B: Tris 36,6 %, HCl 1,5 % y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,23 % (v/v), pH 8,9, y solución C: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ al 14 % (p/v). Las soluciones A, B y C se mezclaban con un volumen de agua destilada en una relación de 2:1:4:1 para geles al 7 % de acrilamida, y la polimerización se hacía en presencia de luz fluorescente blanca por 30 minutos a temperatura ambiente, en los tubos de electroforesis.

El gel concentrador se preparaba a partir de la mezcla de las siguientes soluciones: solución D: 10 % de acrilamida y 2,5 % de bis; solución E: TEMED 0,46 % (v/v) en Tris 5,98 % (p/v) y HCl 1 N hasta ajustar un valor de pH de 6,7; solución F: riboflavina 0,004 % y solución G: sacarosa 40 %. Las soluciones D, E, F y G se mezclaban en una relación de 2:1:1:4 y se fotopolimerizaban 30 minutos luego de colocar la mezcla (0,2 ml) sobre el gel separador en cada tubo de electroforesis.

Las soluciones para el gel separador y para el gel concentrador se guardaban en frascos separados, protegidas de la luz, a 4°, y se desaereaban antes de preparar los geles.

Las soluciones de proteína para la electroforesis se dializaban una hora contra 250 ml de la solución de los electrodos que tenía

un 60 % de sacarosa y se colocaban sobre los geles en presencia de azul de bromofenol 0,01 %.

Una vez terminada la electroforesis se retiraban los geles de los tubos, se fijaban y teñían simultáneamente en una solución acuosa que contenía Anilín Schwarz 0,2 % (p/v) y ácido acético 7 % (v/v) durante 90 minutos. Los geles se desteñían en ácido acético al 7 % en un aparato de destinción por difusión Bio Rad modelo 172. En algunos casos se utilizó la tinción durante 16 horas con azul brillante de Coomassie R-250 al 0,025 % disuelto en una solución acuosa de isopropanol al 25 % y ácido acético al 10 %. Los geles se desteñían en el mismo solvente (90).

F. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE UREA

Se emplearon las mismas soluciones descritas en E, con excepción de la solución A que tenía 40 % de acrilamida y 0,5 % de bisacrilamida. Se utilizaba solamente el gel separador con 10 % de acrilamida y se obtenía al mezclar las soluciones A, B, C y agua en la misma relación descrita en E. En el gel se lograba una concentración de urea de 6,25 M cuando la solución C y el agua agregada contenían urea 10 M. Las soluciones para los geles eran cuidadosamente desaeradas al vacío para evitar la formación de burbujas. Los geles se hacían en tubos de 90 x 6 mm, haciéndose la fotopolimerización en presencia de luz fluorescente blanca durante 30 minutos a temperatura ambiente y se utilizaban inmediatamente.

La electroforesis se hacía durante 150 minutos, tiempo en el cual el colorante de referencia migraba un 90 % del largo del gel, utilizándose una solución de tris-glicina pH 8,3 en ambas cámaras y una intensidad de 3 mA por cada gel.

También se utilizó la técnica de Chalkley para la electroforesis en presencia de urea 6,2 M, siendo ácido acético 0,9 M pH 3,2, la solución de ambos electrodos (91).

G. ELECTROFORESIS EN PRESENCIA DE DODECILSULFATO DE SODIO

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) con la enzima pura y preparaciones altamente purificadas se hizo de acuerdo a la técnica de Shapiro, Viñuela y Maizel (92) con algunas modificaciones.

Los geles de 5 % de acrilamida se preparaban mezclando las soluciones A, B y C descritas en E con una solución de fosfato de sodio 0,44 M pH 7,1 que contenía SDS 0,44 % en una relación de 2:1: 5,5 :2,5. En algunos geles se reemplazaba el persulfato de amonio de la solución C por riboflavina 0,004 % como catalizador de la polimerización. Antes de mezclar las soluciones para los geles se retiraba el aire atrorado en éstas. La mezcla se colocaba en tubos de 90 x 6 mm y se polimerizaban en presencia de luz fluorescente blanca durante 40 minutos.

Tratamiento de la enzima. La enzima se dializaba por dos horas y media contra 250 ml de una solución de fosfato de sodio 0,1 M pH 7,1, cambiando 3 veces la solución de diálisis y se incubaba por 3 horas a 37° en un medio que contenía 1 % de SDS y 1 % de 2-mercaptoetanol (2-ME) en la solución de fosfato. Se dializaba después contra 250 ml con tres cambios de la solución de fosfato de sodio con SDS y 2-ME, diluida 10 veces. Se ensayó también la incubación directamente en la solución diluida durante 3 horas, evitando la diálisis (93) y también la incubación por dos minutos en un baño de agua hirviendo. Las proteínas de referencia, de peso molecular conocido, se trataron de la misma manera que la glucoquinasa.

Sembrado de la solución de proteínas. A la proteína dializada en un medio con SDS al 0,1 % y 2-ME 0,1 % se le arregaba una alícuota de la solución de siembra que contenía sacarosa al 80 % y azul de bromfenol al 0,1 % en la solución de fosfato de sodio 0,01 M, SDS 0,1 % y 2-ME 0,1 % de modo de obtener una concentración de sacarosa de 20 % en un volumen de siembra de 100 a 200 μ l.

Electroforesis de las proteínas. Las proteínas (60-90 μ g) se sembraban sobre los geles y la electroforesis se hacía hasta que el colorante de referencia migraba un 80-85 % de largo del gel (aproximadamente 8 horas y media), utilizando una solución de fosfato de sodio 0,1 M pH 7,1 con SDS 0,1 % en ambas cámaras. Los geles se cortaron en la posición del colorante de referencia y se midió la longitud de éstos.

Sistema de tinción. Los geles se teñían durante 16 horas utilizando azul brillante de Coomassie según la técnica descrita en E, y posteriormente se les medía nuevamente su longitud. Se ensayó con mejor resolución de las bandas una fijación de las proteínas al gel, incubando los geles durante 12 horas en el solvente del colorante, lo que permitía retirar el exceso de SDS. También se logró teñir los geles con amido Schwarz al 0,1 % en ácido acético 7 %.

Para el estudio de los pesos moleculares se medía la migración relativa de las bandas en los geles desteñidos.

H. TINCION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para detectar la posición de la glucoquinasa en geles de poli-acrilamida por tinción debido a la actividad de la enzima se utilizaba una modificación de la técnica de Grossman et al (94). Se preparaban geles de 70 x 6 mm con soluciones para el gel separador y el gel concentrador. La solución A contenía acrilamida al 40 % y bisacrilamida 0,5 %; la solución B tenía TEMED 0,46 % en Tris 6,85 % y HCl hasta ajustar un pH de 7,5 y la solución C tenía riboflavina 0,004 %. Las soluciones A, B y C se mezclaban con una solución 0,1 M de glucosa en una relación de 2:1:1:4.

Las soluciones para el gel concentrador fueron las mismas que se utilizaban en el método de Davis, con excepción de la solución G que se reemplazó por glucosa 3 M. Las soluciones D, E, F y la solución de glucosa se mezclaban en la relación de 2:1:1:4.

La electroforesis se hacía con una solución de Tris 30 mM, EDTA 4 mM, $MgSO_4$ 5 mM, glucosa 50 mM, ditiotritol (DTP) 2 mM pH 8,0 en ambas cámaras, a una temperatura de 4° y con 3 mA/gel durante 4 horas. Tiempos mayores se traducían en una marcada inactivación de la enzima.

La tinción de la actividad glucoquinásica se hacía por inmersión del gel en una mezcla igual a la usada en el ensayo de actividad (Método I), a la cual se adicionaba fenazina metasulfato y nitroblue tetrazolium, ambos a una concentración de 0,4 mg por ml de la mezcla de reacción (11). El blanco se hacía colocando el gel en contacto con una mezcla de reacción igual pero se omitió el ATP. Algunos geles, en los cuales se hacía la electroforesis en las mismas condiciones de los teñidos para actividad, se ponían en contacto con Amido Schwarz 0,2 % para tinción de la proteína.

I. DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO

La determinación del punto isoelectrico de las preparaciones puras de glucoquinasa se hacía mediante electrofocalización en geles de poliacrilamida.

El electroenfoque se realizaba en tubos verticales con los geles utilizando H_3PO_4 0,2 % como anolito y NaOH 0,28 % como catolito y aplicando una intensidad inicial de 3 mA por gel (95). La focalización se continuaba por dos horas y media, tiempo en el cual la

resistencia del sistema se hacía constante en el tiempo. Los geles se preparaban mezclando los reactivos de polimerización, la acrilamida, el anfolito y la proteína convenientemente dializada contra 3 x 2 lt de una solución de fosfato de potasio 2 mM pH 7,0 y se dejaba polimerizar durante 40 minutos.

La composición de cada gel en un volumen de 2 ml era la siguiente: acrilamida 7 %, bisacrilamida 0,175 %, persulfato de amonio 0,07 %, solución Ampholine^R al 1 %, TEMED 0,032 % y la proteína enzimáticamente activa en un volumen tal que contenía entre 50 y 80 µg de proteína. Estos valores se lograban al mezclar 0,5 ml de la solución A de acrilamida, 0,66 ml de la solución C, 0,065 ml de la solución de TEMED al 1 % (v/v), 0,275 ml de Ampholine al 8 % y 0,5 ml de la solución con la glucoquinasa.

Al finalizar el electroenfoque, los geles se teñían con azul de bromofenol al 0,2 % en una mezcla que contenía etanol, ácido acético y agua en una relación de 50:5:45 y se desteñían hasta fondo claro en una mezcla que contenía etanol, acético y agua en una relación de 30:5:65. En algunos casos los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie según la técnica descrita en E.

Un grupo de geles se cortaba en trozos de 2 mm en orden correlativo y se medía el pH correspondiente a cada fracción luego de incubar las fracciones con agua bidestilada en un volumen de 2 ml durante una hora a 30°.

J. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES Y PARAMETROS HIDRODINAMICOS

Los pesos moleculares aparentes de la glucoquinasa pura fueron determinados utilizando filtración en geles, en columna y en capa fina y mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

La filtración en Sephadex G-100 se hizo mediante la comparación de los volúmenes de elución de la glucoquinasa pura con los de otras proteínas utilizadas como referencia según el método de Andrews (96). Esta cromatografía se hizo en una columna de 95 x 1 cm equilibrada con una solución de fosfato de potasio 10 mM, EDTA 1 mM, 2-ME 5 mM y KCl 0,3 M, pH 7,0, con un flujo de 6,2 ml/hora. La concentración de las cinco proteínas de referencia fue de 2 mg/0,5 ml y se colocaron 2 unidades (0,028 mg) de la glucoquinasa. El azul dextrano 2000 y la leucina C^{14} (50.000 cpm) se hicieron pasar por la columna sin la presencia de las proteínas.

La elución de las proteínas de referencia (ribonucleasa, ovalbúmina, seroalbúmina de bovino y quimotripsinógeno) se detectó por medición de absorbancia a 280 nm en un Gilford 2400, excepto el citocromo c que se detectó a 414 nm. El azul dextrano se midió a 630 nm y leucina se midió en un contador Nuclear Chicago; la actividad glucoquinásica se midió espectrofotométricamente por el Método I. De esta cromatografía se obtuvo también la información para el cálculo del radio de Stokes y el coeficiente de difusión (97).

La cromatografía de exclusión en placas cubiertas por Sephadex G-100 superfino se realizó de acuerdo al método de Andrews (96) en placas de 40 x 20 cm. La placa fina se preequilibró y eluyó cromatográficamente con la misma solución utilizada para la filtración en columnas de Sephadex G-100 durante 44 horas en una cámara construida de acrílico en el laboratorio de Química de la Facultad de Medicina, U. de Chile. Esta cromatografía como la filtración en columnas se hicieron a una temperatura de 4°.

Después de terminada la cromatografía se impregnó un papel Whatmann 1 sobre la placa y se tiñó con azul de Coomassie 0,25 % en metanol y ácido acético (90 : 1). El papel se destiñó luego con una mezcla que contenía metanol, acético y agua en una relación de 50:10:50 (v/v) y se determinaron las migraciones relativas de cada mancha.

La electroforesis en geles de poliacrilamida al 5 % en presencia de SDS se efectuó en las condiciones descritas en G.

La enzima y las proteínas de referencia de peso molecular conocido se pretrataban mediante la incubación durante 3 horas a 37° en presencia de SDS al 1 % y 2-ME al 1 %. Las proteínas usadas como referencia se señalan en la figura 20.

K. ESTUDIOS ESPECTRALES

Se hicieron estudios espectrales de la glucoquinasa pura nativa y en presencia de HCl o NaOH 0,1 N, aOH 0,1 N, utilizando un

espectrofotómetro Cary 18. Estos estudios se hicieron con la proteína disuelta en fosfato de potasio 2 mM.

Para la determinación de triptofano se hizo un espectro ultravioleta con la enzima disuelta en 0,1 N de NaOH de acuerdo a la técnica de Bencze y Schmidt (98).

Las tirosinas de la glucoquinasa se titularon espectrofotométricamente a 243 nm con la proteína disuelta en fosfato 2 mM en presencia y ausencia de urea 8 M. La titulación se efectuó registrando los cambios de absorbancia a 243 nm al variar el pH desde 2 a 13,5 y viceversa.

L. ANALISIS DE AMINOACIDOS

La hidrólisis ácida de la proteína se hizo de acuerdo al método de Moore y Stein (99). La glucoquinasa se hidrolizó durante 22-24 horas en presencia de HCl 6 N a una temperatura de 110° en ampollas de pyrex selladas al vacío. Previo a la hidrólisis, la solución de enzima se dializó exhaustivamente durante 14 horas contra fosfato de potasio 2 mM. Los hidrolizados se analizaron en un analizador Beckman 120 C según la técnica de Spackman et al (100), colocando volúmenes iguales del hidrolizado en las columnas ácida y básica. Como patrón de referencia interno para la hidrólisis se utilizó norleucina, la cantidad total de medias cistinas se estimó como ácido cisteico y el triptofano se determinó espectrofotométricamente (98).

M. MAPA PEPTIDICO

Digestión triptica. La glucoquinasa (0,8 mg) se dializó contra fosfato de potasio 2 mM durante 16 horas y luego se desnaturalizó por calentamiento en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos. La digestión se hizo agregando una alícuota de 10 μ l de tripsina (tratada con tosil-amido 2 feniletilclorometilcetona) disuelta en HCl 0,001 N, manteniendo una relación en peso de sustrato a tripsina de 40 : 1. La mezcla se incubó a 25°, se controló el pH en un valor de 8,2 mediante adición de NH_4OH diluido y se detuvo la reacción a las 16 horas bajando el pH a 4,0. Se centrifugó para eliminar una pequeña cantidad de precipitado y el líquido sobrenadante se liofilizó.

Mapa peptídico. El residuo seco obtenido luego de la digestión se disolvió en mínimo volumen de agua destilada (50 μ l) y se aplicó sobre una hoja de papel Whatmann 3 MM de 46 x 56 cm. El mapa peptídico se hizo según el método de Katz et al (101). La cromatografía en la primera dirección se hizo en forma descendente durante 16 horas en una cámara cromatográfica utilizando como solvente la mezcla de butanol, acético, piridina y agua en una relación de 15:3:10:12.

Se usó como referencia para la cromatografía el rojo fenol. La electroforesis en la segunda dirección se hizo con una solución de piridina en ácido acético pH 3,5 en ambos electrodos y aplicando un voltaje constante de 2000 volts a lo largo de la lámina de papel

durante 90 minutos a la temperatura ambiente.

Los péptidos se visualizaron y marcaron 30 minutos después de aplicar sobre el papel seco una solución pulverizada de ninhidrina 0,25 % en etanol absoluto (101b) y calentar la lámina de papel a 70°.

N. DETERMINACION DE GRUPOS SULFIDRILOS

Los grupos tioles fueron determinados con p-cloromercuriobenzoato de acuerdo al método de Boyer (102) en presencia y ausencia de urea. Antes de la determinación, la enzima se dializó exhaustivamente contra una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, con KCl 50 mM y glucosa 0,1 M para titular los grupos tioles de la enzima nativa.

En el experimento de la cinética de titulación se omitió la glucosa y en la titulación en presencia de urea 8 M, se omitieron la glucosa y el KCl. La reacción se realizó en una cubeta de 1 ml midiendo el incremento de absorbancia a 250 nm respecto a la solución blanco, luego de cada adición de alícuotas de la solución de PCMB.

En la titulación de grupos tioles en presencia y ausencia de urea 8 M se agregaba una alícuota de la solución de PCMB y se esperaba hasta que el valor de absorbancia a 250 nm se mantenía constante en el tiempo para luego adicionar la alícuota siguiente. En la titulación de la enzima nativa se retiraban alícuotas de 5 μ l para hacer el ensayo enzimático.

En el estudio de la cinética de titulación se agregaba un exceso de PCMB (3,0 moles/ml de SH de la enzima) y se seguía el cambio de absorbancia a 250 nm en el tiempo.

El número de grupos sulfhidrilos se determinó sobre la base de un coeficiente de extinción molar para el complejo PCMB-enzima a 250 nm de $7,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y considerando un peso molecular de 48.000 para la glucoquinasa.

Los moles de PCMB agregados al sistema por mol de enzima se obtuvieron de la determinación de la concentración de este reactivo por medición de absorbancia a 233 nm ($A_{233}^{1\text{M}} = 1,69 \times 10^4$).

O. HIDROLISIS QUIMICA CON CNBr

La glucoquinasa (0,8 mg) dializada contra fosfato de potasio 2 mM se acidificó con ácido fórmico concentrado (103) hasta llegar a una concentración de 70 % (v/v) y se hidrolizó con CNBr agregando cristales de este reactivo sobre 1 ml de solución de enzima en una relación molar de 300 : 1 respecto a la enzima. La reacción se hizo a 25° durante 40 horas y se detuvo diluyendo con agua y evaporando a sequedad. Se agregó 5 ml de H₂O y se repitió la evaporación 8 veces hasta obtener el residuo seco con eliminación total del ácido.

El residuo se disolvió en agua y con una fracción de éste se hizo la reacción de la ninhidrina cuantitativa.

II. MATERIALES

A. REACTIVOS

ATP, NADP, NAD, DTT, EDTA, Tris (Trisma base), glucosa, glucosa 6-fosfato, fructosa, arabinosa, 2-desoxiglucosa, glucosamina, manosa, N-acetilglucosamina, galactosa, xilosa, α -metilglucósido, ninhidrina (hidrato de tricetiltriniteno), riboflavina, azul dextrano 2000, glicina, azul brillante de Coomassie R, Amido Schwarz, nitroblue tetrazolium, fenazina metasulfato y 1 etil-3-(3 dimetilaminopropil) carbodiimida provenían de Sigma Chemical Company (St. Louis, U.S.A.). NaCl, NaOH, HCl, piridina, $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KCl, tartrato de sodio, acetona, etanol absoluto, butanol, etilenglicol monometil eter, tolueno, arena de mar, MgSO_4 , ácido fosfórico provenían de Merck. NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 , NH_4OH y HCOOH provenían de Matheson y Coleman. p-cloromercuribenzoato y urea (grado A) provenían de Calbiochem. Sacarosa y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (grado enzimático) provenían de Mann Research Labs. (New York, U.S.A.)! Ampholines R (anfolitos) provenían de LKB, Produkter AB (Stockholm, Sweden), glucosa- C^{14} y leucina- C^{14} provenían de New England Nuclear. Acrilamida, bisacrilamida, TEMED (grado de electroforesis), persulfato de amonio provenían de Polysciences. Todos los otros reactivos químicos usados fueron del mejor grado analítico.

B. PROTEINAS

Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa provenia de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), manosa 6-fosfato isomerasa, Glucosa 6 fosfato isomerasa, Tripsina (TPCK), ribonucleasa, pepsina provenian de Sigma Chemical Company. Citocromo c, Quimotripsinógeno, ovoalbúmina, seroalbúmina de bovino provenian de Schwarz Mann (New York, U.S.A.). 6-fosfogluconico deshidrogenasa se obtuvo de hígado de rata según el método de Glock y McLean (104).

C. MATERIALES CROMATOGRAFICOS

Sephadex G-100, DEAE Sephadex A-25, Sephadex G-25, CM-Sephadex 4 B provenian de Pharmacia Fine Chemical Inc. DEAE celulosa (DE-52) provenia de Whatman. Fosfocelulosa provenia de Serva. CM-Sephadex provenia de Sigma Chemical Company y DEAE celulosa (0,6 m equiv/g) e hidroxilapatita provenian de Bio-Rad.

CAPITULO II

R E S U L T A D O S

I. ELECCION DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACION

En este laboratorio se había estudiado la purificación de la glucoquinasa de hígado de rata, sin lograrse altos niveles de pureza debido principalmente a la gran inestabilidad de la enzima durante los diferentes tratamientos y a su bajo contenido en el hígado.

En el comienzo de este trabajo se realizaron estudios de purificación en hígado de rata y también en hígado de cerdo puesto que los extractos crudos de estos animales presentaban altos niveles de actividad glucoquinásica por gramo de tejido. Muchos de los estudios preliminares de purificación se realizaron en el hígado de cerdo debido a la mayor cantidad de tejido que aportaba el hígado de estos animales en relación con la rata. Sin embargo, la mantención y alimentación de los cerdos resultó dificultosa y por lo tanto se decidió finalmente utilizar el hígado de perro, que presentaba apreciables niveles de glucoquinasa. Los niveles de la glucoquinasa por gramo de tejido en el hígado de perro eran entre 1,5 y 1,6 veces superiores a los del hígado de cerdo cuando los perros se alimentaban 48 horas antes de sacrificarlos con la doble ración de la dieta (ver METODOS).

II. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA ISOENZIMATICO EN EL HIGADO DE

PERRO

En esta parte se presentan los resultados que permiten obtener información acerca de las características generales del sistema isoenzimático fosforilante de glucosa, la determinación del conjunto de estas isoenzimas y los efectos de la dieta en los niveles de éstas.

A. PERFIL CROMATOGRAFICO DE LAS ISOENZIMAS FOSFORILANTES DE GLUCOSA EN EL HIGADO DE PERRO

La cromatografía de extractos crudos de hígado de distintas especies en columnas de DEAE celulosa da como resultado un perfil cromatográfico de isoenzimas fosforilantes de glucosa característico según la especie, lo que ha permitido realizar estudios filogenéticos de esta familia de isoenzimas. La cromatografía de los extractos hepáticos en una columna de DEAE-celulosa (microgranular) de 20 x 0,9 cm revela la existencia de tres isoenzimas (fig. 1). El perfil es similar al de algunos primates con la diferencia que la isoenzima C de estos animales reemplaza a la isoenzima B del perro (105).

El primer pico de actividad hexocuinásica eluye con una concentración de KCl de 62 mM y presenta una relación de actividades con concentraciones de glucosa de 100 y 0,5 mM (relación a/b) de

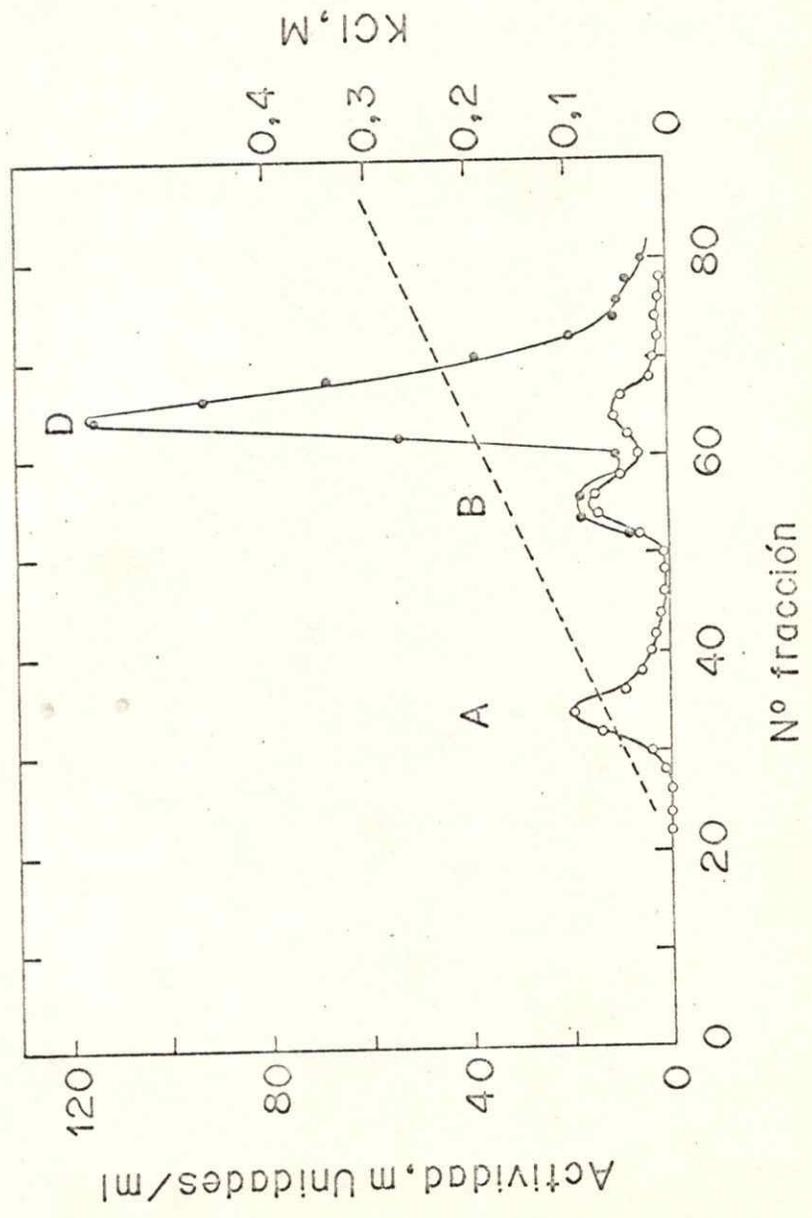
Figura 1. Perfil de elución de las isoenzimas fosforilantes de glucosa en el hígado de perro.

Se colocó un extracto de hígado resultante de la homogeneización al 50 % de 5,2 g de hígado en Tris-HCl 10 mM, 1 mM EDTA y 1 mM DTT pH 7,0.

La cromatografía se hizo en una columna de 20 x 0,9 cm de DEAE celulosa (DE-52).

El volumen de la gradiente fue de 240 ml y se colectaron fracciones de 2 ml. O—O: actividades determinadas por el método radioactivo; ●—●: actividades determinadas por el Método I espectrofotométrico utilizando una concentración de glucosa de 100 mM en el medio de ensayo, — : gradiente de concentración de KCl.

Para simplificar la figura no se muestran las mediciones de proteínas.



1,03*, lo cual está de acuerdo con las características de elución de la isoenzima A en este tipo de cromatografía. El segundo pico de actividad hexoquinásica que eluye con una concentración de KCl de 165 mM presenta una relación a/b de 1,2, valor característico para esta isoenzima. El pico de mayor actividad corresponde a la glucocinasa, enzima que eluye de la columna con una concentración de KCl de 240 mM. La isoenzima C, que es inhibida por exceso de sustrato, no se encuentra presente en el perro.

De acuerdo con este perfil de elución las hexoquinastas representan un 20 % de la actividad fosfotransferásica, correspondiendo a un 11 % de isoenzima A y un 9 % de isoenzima B. De un conjunto de 12 determinaciones de actividades fosfotransferásicas en el hígado de perro se ha encontrado que las hexoquinastas representan entre un 14 y un 20 % de la actividad fosfotransferásica total.

El perfil de elución de la figura 1 concuerda con los resultados obtenidos por Ureta (105); sin embargo, Brown et al (106) han descrito la presencia de un sistema de 5 isoenzimas fosforilantes de glucosa en el hígado de perros bien alimentados, mediante tinción de actividad fosfotransferásica en geles de almidón según la técnica de Katzen y Schinke (11). Según los autores, cuatro de ellas corresponden a las isoenzimas A, B, C y D y la

* El cociente de las actividades medidas a ambas concentraciones de sustrato se expresa como relación a/b

restante a una proteína que migra hacia el cátodo en la electroforesis.

B. EFECTO DE LA DIETA EN LOS NIVELES DE GLUCOQUINASA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS

Actualmente se sabe que la glucoquinasa de rata decae con una vida media de 33 horas cuando los animales se mantienen en ayunas o con una dieta libre de carbohidratos y la enzima es inducida por la administración de glucosa (20). Existen también pruebas experimentales de que la actividad de esta enzima en el hígado de perro depende de la composición de la dieta (107) aunque no se han hecho mayores estudios acerca de la cinética de la inducción.

En este estudio se determinaron las actividades glucoquinásicas y hexoquinásicas en el hígado de perros alimentados con una dieta control, sobrealimentados y ayunados con el objeto de establecer algunas condiciones dietarias básicas para obtener niveles altos de glucoquinasa en el hígado.

En la tabla I se muestra que los niveles de glucoquinasa por gramo de tejido en los extractos crudos de hígado de perros alimentados con la dieta control y los sobrealimentados, eran significativamente superiores a los niveles de animales ayunados. Los niveles mayores de glucoquinasa se encontraron en los hígados de animales sobrealimentados. Las variaciones experimentadas en los niveles de hexoquinasa son significativamente inferiores a la

T A B L A I

EFECTO DE LA ALIMENTACION EN LOS NIVELES DE
GLUCOQUINASA DE EXTRACTOS⁽¹⁾ DE HIGADO
DE PERRO⁽²⁾

Tratamiento	Número de Preparaciones	Glucocuinasa mU/g tejido	Hexocuinasa mU/g tejido
CONTROL	5	897 ± 315	182 ± 64
AYUNADOS	4	125 ± 32	82 ± 29
SOBREALIMENTADOS	8	1960 ± 282	218 ± 66

(1) Para el método de preparación de los extractos, ver más adelante en III. PURIFICACION DE LA GLUCOQUINASA.

(2) Equivale al número de hígados de perro con los cuales se hicieron diferentes extractos.

considerable variación experimentada en los niveles de la glucoquinasa de perros controles y sobrealimentados en relación a los animales en ayuno.

Por otra parte, los niveles de glucoquinasa por gramo de hígado de los perros sobrealimentados son mayores que los encontrados para la rata por algunos autores (6,56,108,109), en tanto que los niveles de los perros alimentados con la dieta control no son significativamente diferentes a los que presenta el hígado de rata.

III. PURIFICACION DE LA GLUCOQUINASA DE HIGADO DE PERRO

Los primeros estudios para lograr la purificación de esta enzima se hicieron utilizando técnicas cromatográficas de intercambio iónico y filtración en geles de Sephadex. Se ensayaron también en este estudio, múltiples métodos alternativos que consistieron en el uso de fraccionamientos en las etapas iniciales, variaciones en la naturaleza de los métodos cromatográficos (en cuanto al tipo de columna, fuerza iónica, pH de las soluciones de elución) y en cambios en la cantidad de proteína cromatografiada. Todos los estudios realizados en este trabajo tuvieron como punto de partida la metodología de Bahul y Niemyer para la purificación de la glucoquinasa de hígado de rata.

En este trabajo se logró purificar la glucoquinasa de hígado de perro, obteniendo preparaciones homogéneas según diferentes criterios de pureza.

A. ETAPAS DE LA PURIFICACION

1. Preparación de los Extractos Crudos

Los hígados convenientemente lavados provenientes de dos perros tenían un peso aproximado de 1 Kg. Luego de quitarles la vesícula biliar y el tejido adiposo se trozaban finamente y se trituraban para ser homogeneizados en una juguera Warring blender (1 minuto a su máxima velocidad). El homogeneizado se hacía al 50 % en una solución de fosfato de potasio 10 mM pH 7,0, glucosa 100 mM, EDTA 1 mM y 2-ME 5 mM (solución 1) que tenía además KCl 0,18 M. Todas estas operaciones y las siguientes etapas de la purificación se efectuaban a 4°. La inclusión de glucosa, 2-ME y el KCl en la solución de los homogeneizados tenía por objeto estabilizar la enzima como se describirá más abajo.

El pH resultante del homogeneizado era de 6,5 - 6,7 por lo cual era necesario ajustarlo en 7,0 con NH_4OH diluido. El homogeneizado se centrifugaba a 16.300 g (en una centrifuga Sorvall RC 2B, rotor GSA), durante 40 minutos. El líquido sobrenadante de esta centrifugación se filtraba a través de lana de vidrio para eliminar principalmente la grasa y se recentrifugaba a 78.410 g durante

40 minutos (en una centrífuga refrigerada Spinco, modelo L). El líquido sobrenadante de esta centrifugación, de un color rojo y semitransparente, se aspiraba cuidadosamente con una jeringa de 20 ml que tenía adosado un terminal de polietileno en la aguja, cuidando de no remover la capa de grasa. El extracto crudo obtenido de esta manera (fracción S₁) se utilizaba en las etapas de purificación que se describen para obtener la glucoquinasa hepática.

La glucoquinasa parece constituir un bajo porcentaje de las proteínas totales del hígado (menor que un 0,01 %) (70), de manera que desde el comienzo de este trabajo se hizo imprescindible disponer de una metodología que permitiera preparar el extracto inicial a partir de la mayor masa de tejido posible. El método que aquí se ha descrito constituye el mejor resultado en cuanto a actividad específica y rendimiento, de una serie de estudios acerca de esta etapa de purificación.

Se ensayaron también otros métodos con el fin de simplificar el procedimiento de purificación sin obtenerse resultados favorables. Entre los métodos ensayados en los extractos crudos están:

- a) precipitaciones fraccionadas con solventes orgánicos como etanol y acetona,
- b) precipitaciones por cambios de pH,
- c) fraccionamientos por calor, y
- d) fraccionamientos con sulfato de amonio.

Estos fraccionamientos se ensayaron en el homogeneizado, la fracción sobrenadante de 16.300 g y en la fracción S₁ y solamente el fraccionamiento con sulfato de amonio del sobrenadante de 16.300 g tuvo resultados favorables al hacer un corte desde 35 a 65 % de saturación con esta sal.

La disminución de pH con ácido diluido desde 7 a 4,5 se traducía en la precipitación de una gran cantidad de proteínas y partículas celulares que permitían obtener sobrenadantes claros luego de centrifugar a baja velocidad. Sin embargo, al aumentar el pH a los valores usuales de 7,0 no se obtenía una recuperación importante de la actividad, perdiéndose entre un 75 a un 80 % de la actividad glucoquinásica inicial, en cambio la recuperación de la actividad hexoquinásica era muy superior (60-64 %).

Muchos de estos métodos se ensayaron además en los homogeneizados, fundamentalmente para evitar la centrifugación a 78.410 g y así disminuir el tiempo de purificación, al centrifugar el homogeneizado una sola vez a 16.300 g. Aunque se lograba con estos métodos obtener un líquido sobrenadante libre de partículas celulares luego de la centrifugación de baja velocidad, los resultados de rendimiento y actividad específica fueron significativamente inferiores a los del método que se ha descrito más arriba.

2. Cromatografía de Intercambio Iónico en DEAE Celulosa

Alrededor de 700 ml de la fracción S₁ se hacían pasar por una columna de DEAE celulosa de 60 x 4,8 cm previamente equilibrada con

la solución 1. La fracción S₁ (700 ml) se hacía pasar por esta columna a medida que se iban obteniendo fracciones de 140 ml del extracto. Después se hacía un lavado con 1,5 l de KCl 0,18 M en la solución 1 para arrastrar las proteínas no retenidas a esa concentración de sal, que correspondían al 95 % de las proteínas del extracto crudo y entre ellas las hemoproteínas visibles por su color rojo, las hexoquinetas y la 6-fosfogluconico deshidrogenasa.

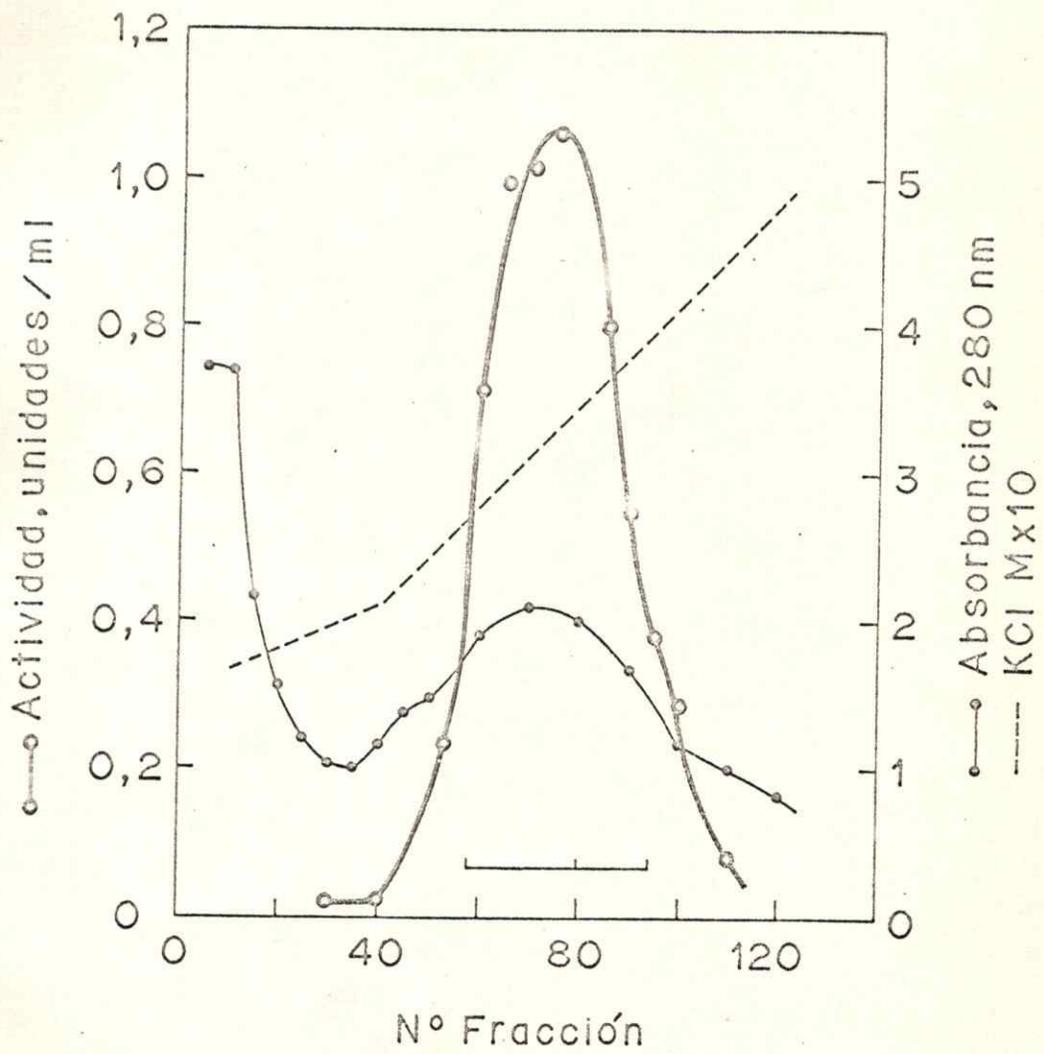
La enzima se eluía conectando una gradiente lineal de concentración de KCl, preparada en la solución 1, desde 0,18 hasta 0,75 M KCl. El volumen total de la gradiente era de 3 l y se recogían fracciones de 20 ml a un flujo aproximado de 8 ml por minuto. Se medía la actividad enzimática y absorbancia a 280 nm en las fracciones eluidas y se seleccionaban las que tenían más de 0,5 unidades por ml (fig. 2). En este conjunto seleccionado se recuperaba el 56 ± 5 % de la actividad glucoquinásica colocada en la columna, valor estimado sobre la base de 12 preparaciones consecutivas. La actividad específica promedio del conjunto de tubos seleccionados de estas preparaciones era de $0,37 \pm 0,06$ unidades /mg de proteína se lograba una excelente reproducibilidad en las diferentes cromatografías y un aumento de 51,3 veces en la actividad específica:

Al eluir la glucoquinasa con una gradiente lineal que difería de la antes mencionada solamente en la concentración máxima de KCl, que era de 0,5 M, se obtenía un rendimiento de 50 % para el conjunto de tubos seleccionados (900-1000 ml), con una actividad específica

Figura 2 Cromatografía de intercambio iónico del extracto
crudo (S_1) en DEAE-celulosa

El extracto crudo fresco que contenía 1.144 unidades de glucoquinasa y 142.000 mg de proteínas en 720 ml se hizo pasar por una columna de DEAE-celulosa de 60 x 4,8 cm equilibrada con la solución 1. La columna se lavó con 1,5 l de KCl 0,18 M en la solución 1 y se eluyó la enzima con una gradiente lineal de 3 l desde 0,18 a 0,75 M de KCl en la solución 1 con un flujo de 8 ml/minuto. Se colectaron fracciones de 20 ml y se seleccionaron aquellas fracciones indicadas en la figura.

En el conjunto de las fracciones indicadas se recuperó un 64,3 % de las unidades de glucoquinasa colocadas en la columna y se obtuvo una preparación con una actividad específica de 0,41 unidades/mg.



de 0,33 - 0,35 unidades/mg de proteína y no se lograba obtener un pico simétrico para la actividad enzimática (110). Es conveniente recalcar que en el estudio de esta etapa cromatográfica se reemplazó el Tris por fosfato de potasio 10 mM en la solución de elución, lográndose una mejor resolución de los picos cromatográficos y una mayor estabilidad de la preparación. Luego, el empleo de fosfato en las soluciones se generalizó para la mayor parte del procedimiento de purificación.

B. PRECIPITACION FRACCIONADA CON SULFATO DE AMONIO

En un experimento en el cual se tomó una fracción de 30 ml del eluido seleccionado de la cromatografía en DEAE celulosa y se hicieron precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio se observó que gran parte de la proteína con actividad precipitaba entre un 55 y un 80 % de saturación con esta sal (fig. 3). Esta fracción corresponde a un 58 % de la actividad inicial del eluido seleccionado de DEAE celulosa, pero representa un 32 % de la actividad total recuperada en los diferentes fraccionamientos. Solamente un 39 % de las proteínas del eluido de DEAE se encuentra en esta fracción.

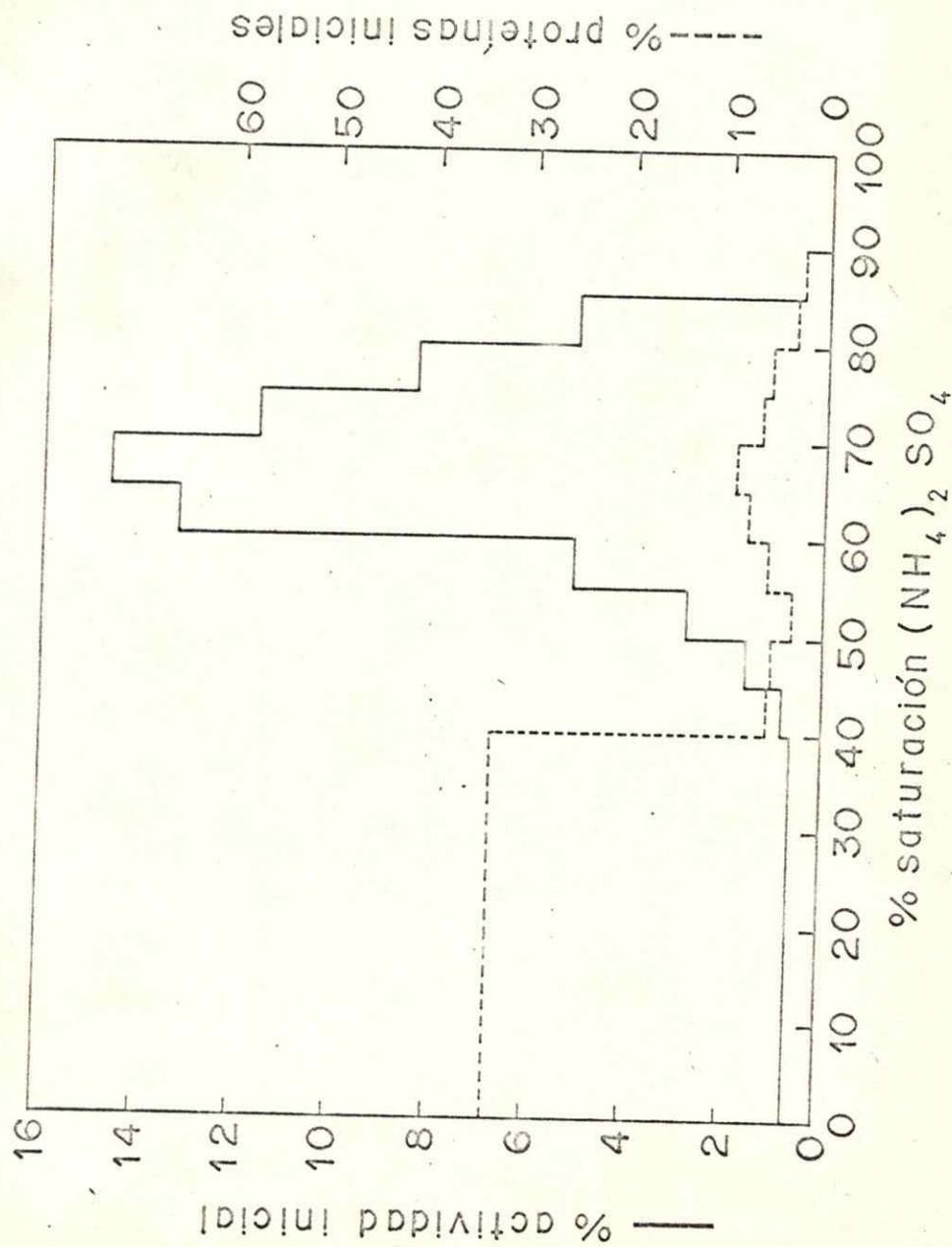
En los experimentos de fraccionamiento con sulfato de amonio en el eluido total de DEAE celulosa se encontró que al fraccionar en dos etapas, entre un 55 y 80 % de saturación con la sal, la actividad que precipitaba sobre 80 % de saturación correspondía sólo al 4 % de la actividad inicial. Debido a esto se decidió utilizar el

Figura 3 Precipitaciones fraccionadas con sulfato de amonio de una muestra de eluido seleccionado de DEAE celulosa

A una muestra de 30 ml de eluido seleccionado de la cromatografía en DEAE celulosa con una actividad de 16,8 unidades y 52,2 mg de proteínas se agregó lentamente y con agitación suave, sulfato de amonio sólido hasta alcanzar el porcentaje de saturación indicado en la figura.

Se dejó reposar la suspensión durante 15 minutos y se centrifugó a 16.300 g por minuto.

Las fracciones precipitadas se disolvieron en 5 ml de KCl 0,3 M en la solución 1 y se midió actividad enzimática (—) y absorbancia a 280 nm (---).



fraccionamiento entre 55 y 80 % de saturación, pese a que en la fig. 3 aparece que un fraccionamiento adecuado hubiese sido hasta un 85 % de saturación.

En el procedimiento total de purificación se agregaba lentamente y con agitación suave, sulfato de amonio sólido al eluido seleccionado de la cromatografía en DEAE celulosa, hasta alcanzar una saturación de un 55 %. Se dejaba reposar durante 30 minutos, se ajustaba el pH en 7,0 y se centrifugaba a 16.300 g por 30 minutos. Al sobrenadante se agregaba de la misma manera, sulfato de amonio sólido hasta alcanzar un 80 % de saturación y se centrifugaba 30 minutos después a 16.300 g por 30 minutos. Esta fracción precipitada entre un 55 y 80 % de saturación con la sal se disolvía en KCl 0,3 M en la solución 1 y se recuperaba alrededor de un 75 % de la actividad del eluido seleccionado de DEAE celulosa lográndose obtener una actividad específica de 0,62 unidades/mg.

En algunos casos se observaba que después de esta segunda precipitación, la mayor parte de la proteína floculaba después de centrifugar sin obtenerse un precipitado compacto. Este problema se solucionaba filtrando luego el precipitado entre 55 y 80 % a través de papel Whatmann 22.

Esta etapa, aunque no presentaba un factor de purificación conveniente (1,65 veces) resultaba útil puesto que permitía concentrar el eluido de DEAE celulosa y mantenerlo bastante estable durante algunas semanas si se guardaba congelado o a 4°.

4. Cromatografía de Exclusión en Geles

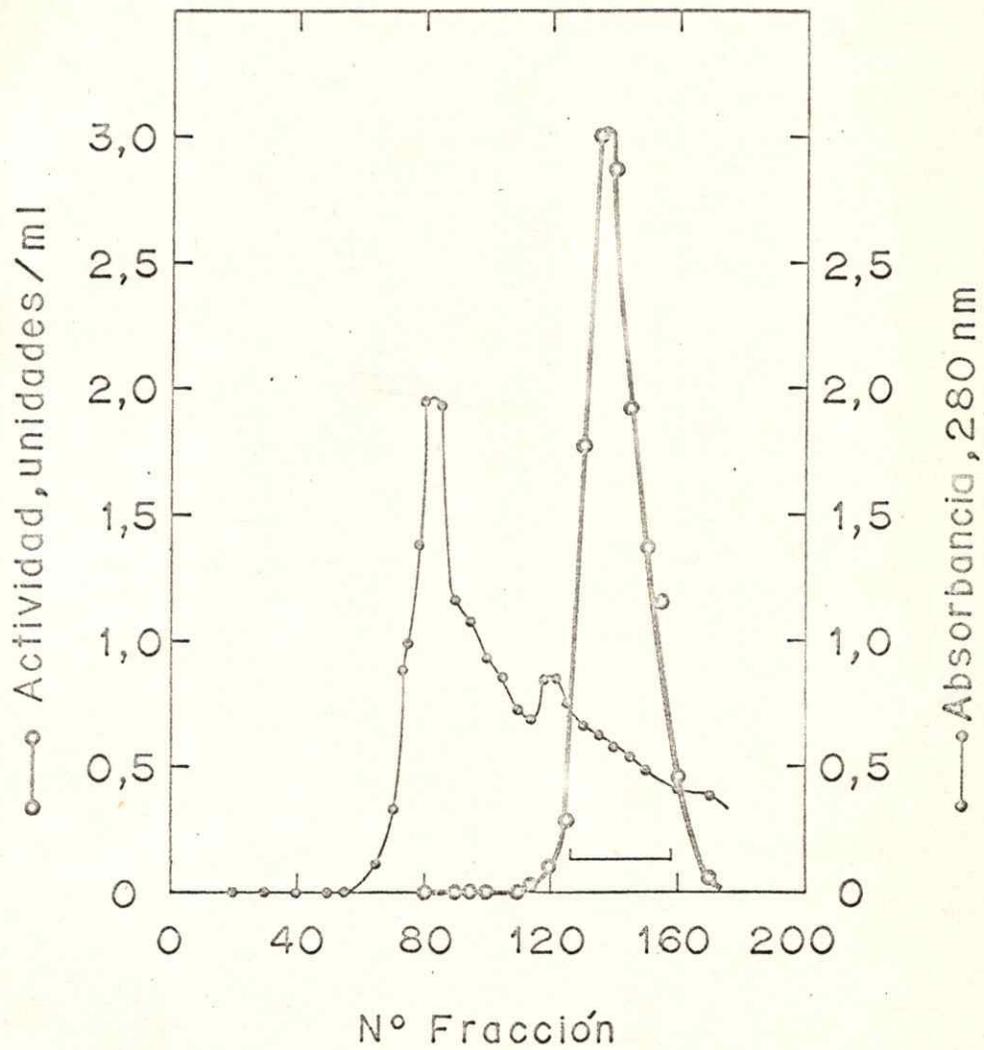
El precipitado proveniente del fraccionamiento entre 55 - 80 % de sulfato de amonio se suspendía en 28 ml de KCl 0,3 M en la solución 1 y se dializaba contra un litro de esta solución que contenía además sacarosa al 50 %, durante una hora y media. Durante la diálisis se completaba la disolución del precipitado por la disminución de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La enzima, en un volumen de 28 ml, se colocaba sobre una columna de 120 x 5 cm de Sephadex G-100 previamente equilibrada con KCl 0,3 M en la solución 1. La muestra se dejaba escurrir desde una altura de 2 cm sobre el nivel del gel cubierto por la solución con la cual se equilibró, operación que se hacía con ayuda de una jeringa de 20 ml que tenía en su extremo un terminal de polietileno. La elución de la enzima se hacía con esta misma solución de equilibrio aplicando una presión hidrostática de 25 cm de agua. Se colectaban fracciones de 8,5 ml con un flujo de salida de 0,4 ml por minuto. En el eluido se medía absorbancia a 280 nm y actividad enzimática (fig. 4). Se seleccionaban las fracciones con una actividad superior a 0,65 unidades por ml y este conjunto se diluía al doble con la solución 1 con el objeto de disminuir la concentración de KCl a 0,15 M necesaria para realizar la cromatografía siguiente.

Las características más sobresalientes de esta etapa cromatográfica son la buena reproducibilidad y el considerable aumento en la

Figura 4 Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción precipitada entre 55 y 80 % de saturación con sulfato de amonio

La fracción enzimática precipitada entre 55 y 80 % de saturación de sulfato de amonio se disolvió en 28 ml de KCl 0,3 M y sacarosa 30 % en la solución 1. La solución que contenía 568 unidades de glucoquinasa y 902 mg de proteínas se colocó sobre una columna de Sephadex G-100 de 120 x 5 cm y las diferentes fracciones se eluyeron con KCl 0,3 M en la solución 1. Se colectaron 8,5 ml por tubo con un flujo de 0,4 ml por minuto.

En el conjunto de las fracciones que se indican se recuperó el 81 % de la actividad colocada en la columna y se obtuvo una preparación con una actividad específica de 5,2 unidades/mg de proteína.



actividad específica, que era de 8 veces en relación a la etapa anterior. En esta etapa el rendimiento era de $74,9 \pm 12,1$ %, tomado sobre la base de 12 preparaciones que presentaban una actividad específica promedio de 4,25 unidades/mg con una dispersión de 0,95. El alto rendimiento alcanzado en las cromatografías en Sephadex G-100 es una prueba de la estabilidad de la enzima durante la cromatografía que duraba alrededor de 40 horas.

5. Cromatografía de Intercambio Iónico en DEAE Celulosa (microgranular).

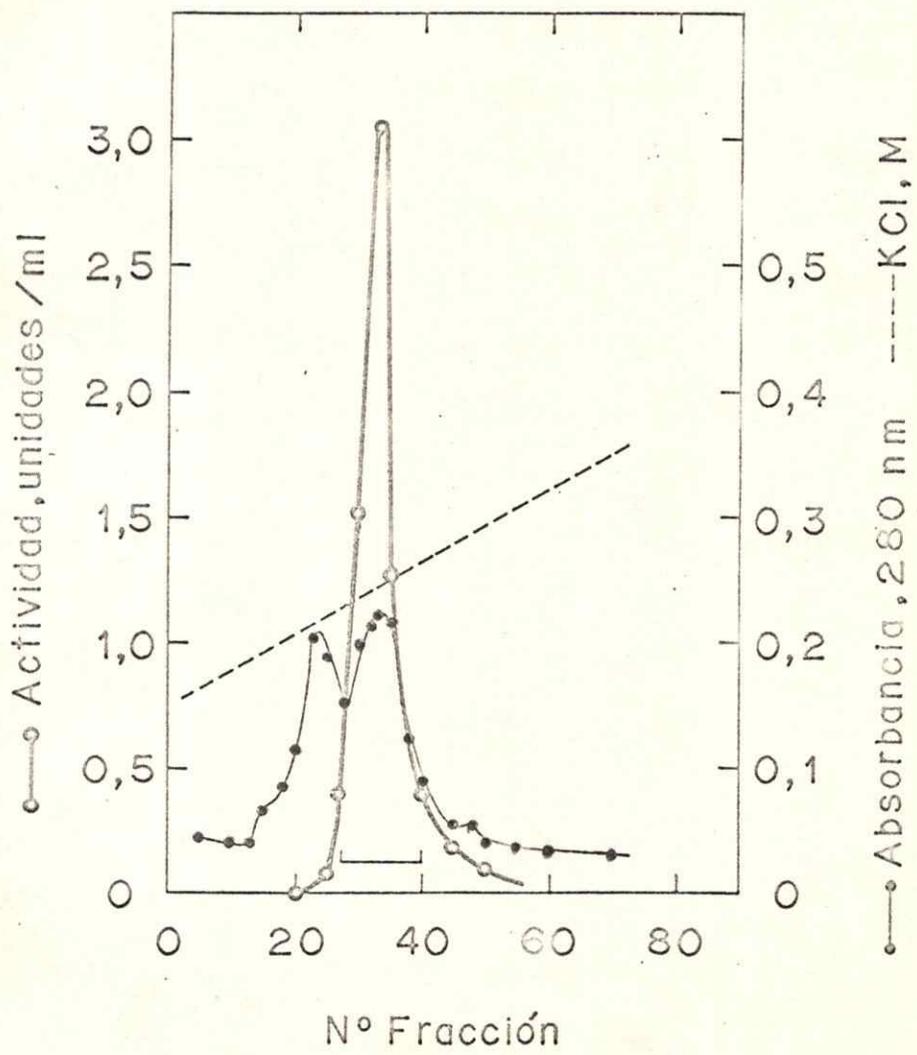
El eluido del conjunto de las fracciones seleccionadas de la etapa anterior, después de diluirse al doble con la solución 1 se aplicaba sobre una columna de DEAE celulosa (microgranular) de 35 x 2 cm, la cual se había equilibrado con la solución 1. Después de adsorber la enzima se hacía un lavado con 200 ml de KCl 0,18 M en la solución 1 y se desarrollaba la cromatografía con una gradiente lineal de concentración de KCl desde 0,18 hasta 0,45 M KCl en la solución 1. El volumen total de la gradiente era de 800 ml y se recogían fracciones de 7 ml por tubo a un flujo de 0,8 ml por minuto. En el eluido se medía actividad enzimática, absorbancia a 280 nm y concentración de cloruro (fig. 5).

Una vez obtenido el perfil de elución se seleccionaban los tubos con más de 0,43 unidades por ml (tubos 27 al 40) y se medía actividad enzimática y absorbancia a 280 nm en el eluido seleccionado.

Figura 5 Cromatografía en DEAE-celulosa microgranular del eluido seleccionado de Sephadex G-100

El eluido seleccionado de una cromatografía en Sephadex G-100 con una actividad de 421 unidades y 82 mg de proteína en 185 ml se diluyó al doble con la solución 1 y se hizo pasar por una columna de 35 x 2 cm. Se lavó con 150 ml de KCl 0,18 M en la solución 1 y luego se eluyó la enzima con un gradiente lineal de 800 ml desde 0,18 a 0,45 M de KCl en la solución 1.

Se coleccionaron fracciones de 7,0 ml y se seleccionaron las fracciones indicadas en la figura. El conjunto seleccionado tenía un 61 % de las unidades colocadas en la columna y una actividad específica de 22,4 unidades/mg.



El eluido seleccionado en esta etapa tenia una actividad específica de $23,8 \pm 3,7$ unidades/mg, obteniéndose una recuperación de un $68,15 \pm 10,5$ % y un factor de purificación algo superior a 4 en relación a la etapa anterior. Los controles de pureza de este eluido indicaban que presentaba entre 4 y 5 bandas de proteínas en geles de poliacrilamida (ver fig. 9).

6. Etapas Cromatográficas Alternativas

El eluido seleccionado de la cromatografía en DEAE celulosa (microgranular) se sometió a dos procedimientos finales de purificación para lograr una preparación homogénea. Uno de ellos consistió en una cromatografía de filtración iónica en columnas de DEAE Sephadex A-25 y el otro procedimiento empleado fue la cromatografía de afinidad en pequeñas columnas de Sepharosa a la cual se había ligado glucosamina. Este último procedimiento ha sido el que se ha empleado mayormente en forma rutinaria para la obtención de la glucoquinasa.

6.1. Cromatografía de filtración iónica

Esta etapa consistió en una cromatografía de filtración iónica en columnas de DEAE Sephadex (111), según la cual la enzima se colocaba en la columna en condiciones tales que la relación de concentraciones de KCl entre la solución de equilibrio, la solución de la enzima y la elución era: $(KCl) \text{ solución de equilibrio de la columna} < (KCl) \text{ solución de la enzima} < (KCl) \text{ solución de elución de la enzima de la columna}$. Los cambios de concentración de KCl se hacían en un mismo medio que consistía en

fosfato de potasio 10 mM, EDTA 1 mM, glucosa 100 mM, 2-ME 5 mM
pH 7,4 (solución 2).

Las fracciones del eluido seleccionado de la cromatografía en DEAE celulosa (microgranular) se diluían al doble con la solución 1 con el objeto de disminuir la fuerza iónica y luego concentrar la preparación. La concentración se hacía en una jeringa de 2 ml con DEAE celulosa y luego de adsorber la enzima en esta resina se eluía aumentando la concentración de KCl a 0,5 M en la solución 1. Los estudios en esta cromatografía demostraron que se lograba separar la glucoquinasa de sus contaminantes cuando las condiciones de concentración de KCl en la solución 2 eran las siguientes: la columna se equilibraba con 0,15 M en KCl, la enzima se equilibraba en 0,25 de KCl y la elución de la glucoquinasa se hacía con 0,35 M de KCl en la solución 2. El eluido de la etapa 5, concentrado en DEAE celulosa (4 ml) se equilibraba hasta 0,25 M de KCl en la solución 2 mediante una diálisis y se colocaba sobre una columna de 80 x 1,5 cm de DEAE Serhadex A-25 preequilibrada con KCl 0,15 M en la solución 2. La proteína con actividad glucoquinásica se eluía con KCl 0,35 M en la solución 4, con un flujo de 8 ml/hora y se colectaban fracciones de 1 ml a las cuales se medía actividad enzimática y absorbancia a 280 nm.

En la figura 6 se observa que existe una correspondencia entre el pico de actividad enzimática y un pico de proteínas. El

conjunto de las fracciones del eluido donde aparece la mayor parte de la actividad enzimática (indicada en la figura) presenta una actividad específica de 76,2 unidades/mg lográndose recuperar en esta etapa el 43,2 % de la actividad en relación a la etapa anterior (datos obtenidos de un total de 4 preparaciones). Mediante el empleo de esta etapa dentro del procedimiento de purificación total de la glucoquinasa se lograba obtener 1,1 mg de una enzima 9.640 veces purificada con una recuperación de 4,4 % en relación a la actividad inicial (tabla II). La proteína obtenida corresponde a la glucoquinasa según el método de detección de la actividad glucoquinásica en geles de poliacrilamida y presenta además una banda por tinción de proteínas en geles de poliacrilamida al 7 % (fig. 10).

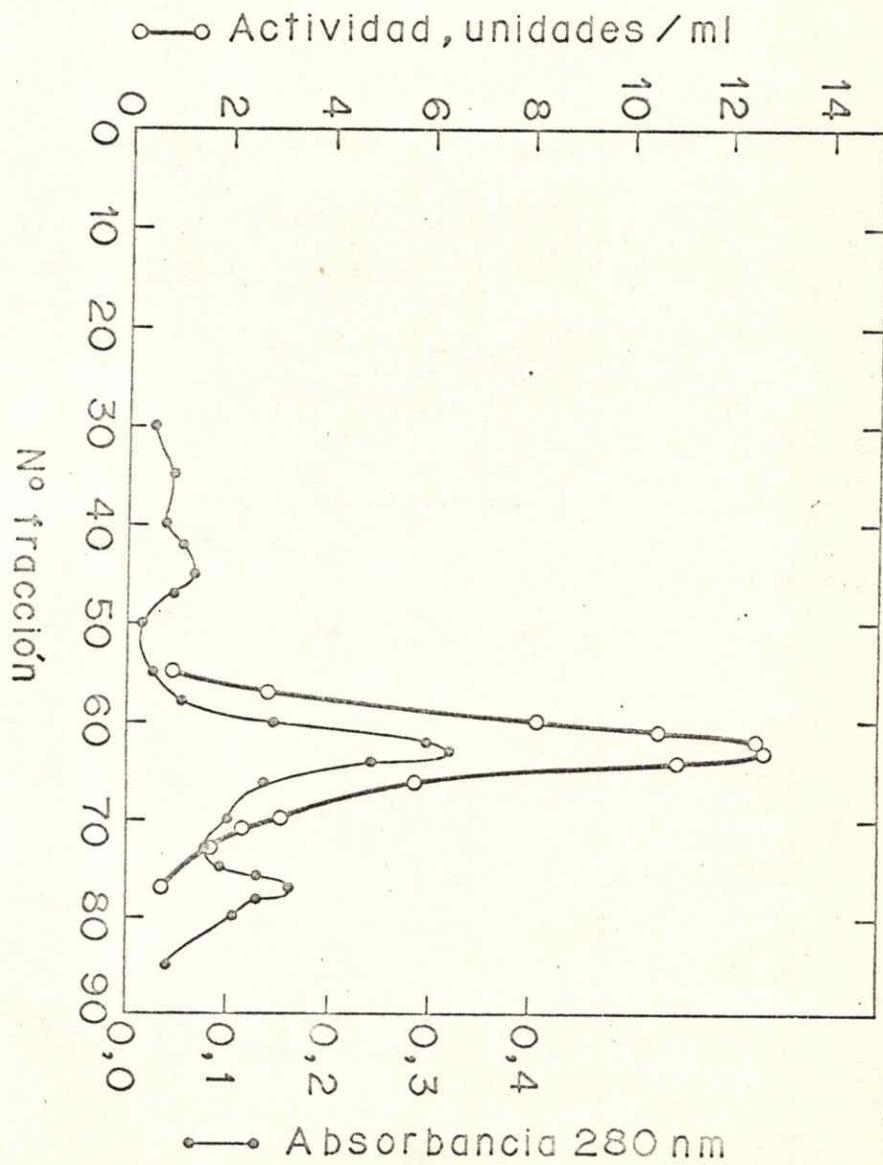
De acuerdo con la secuencia de etapas señaladas, la purificación total de la glucoquinasa se completaba en 8 o 9 días. Como la glucoquinasa es una proteína que se encuentra en muy baja proporción en relación al total de las proteínas del hígado y los estudios de caracterización estructural así como la preparación de anticuerpos contra la enzima requieren de varios miligramos de la glucoquinasa, se decidió buscar un método más simple, rápido y en el que se obtuviera mayor rendimiento para ser desarrollado en forma rutinaria.

Los primeros estudios en la cromatografía de afinidad dieron resultados promisorios que abrieron las puertas hacia la utilización sistemática de esta técnica cromatográfica para los fines

Figura 6 Cromatografía de filtración iónica en columna de DEAE Sephadex del eluido seleccionado de la recromatografía en DEAE celulosa.

El eluido seleccionado de la recromatografía en DEAE celulosa se concentró en una columna de 2 ml de DEAE celulosa según se indica en Resultados. La preparación concentrada (4 ml) se equilibró con KCl 0,25 M en la solución 2 y se colocó sobre una columna de 80 x 1,5 cm de DEAE Sephadex A-25 equilibrada con KCl 0,15 en la solución 2. Las proteínas se eluyeron con KCl 0,3 M en la solución 2 colectándose fracciones de 1 ml con un flujo de 8 ml/hora. En las fracciones se midió actividad enzimática (0) y absorbancia a 280 nm (a).

En el conjunto de las fracciones indicadas se recuperó un 44,5 % de las unidades de glucoquinasa colocadas en la columna y se obtuvo una preparación con una actividad específica de 76,2 unidades/mg.



T A B L A II

Purificación de Glucoquinasa

Método 1

Procedimiento	Volumen ml	Unidades totales	Proteínas totales mg	Actividad específica U/mg	Rendimiento etapa %	Rendimiento total %	Purificación
Homogeneizado	1.950						
Extracto crudo	842	1.820	226.000	0,008	45,4	45,4	42,5
DEAE-celulosa	760	826	2.430	0,340	71,4	32,4	58,75
Sulfato amonio (0,55-0,80)	25	590	1.245	0,470	66,9	21,7	481,25
Sephadex G-100	128	395	103	3,850	52,4	11,4	3.610
DEAE-celulosa microgranular	82	207	7,2	28,20	87,0	10,0	3.660
DEAE-celulosa (concentración de la enzima)	4,1	182	6,2	29,3	44,5	4,5	9.525
DEAE-Sephadex	10,8	81	1,06	76,2			

expuestos.

6.2. Cromatografía de afinidad en glucosamina acoplada a Sepharosa

Se utilizaba glucosamina como ligando en la matriz de afinidad puesto que este aminoazúcar puede unirse a la glucocuinasa comportándose como inhibidor competitivo con respecto a glucosa siendo su $K_i = 8 \times 10^{-4}$ M (112).

La Sepharosa utilizada era del tipo CH Sepharosa 4B y tenía unido covalentemente a la matriz el ácido 6-aminohexanoico. Este ligando es también un inhibidor competitivo en la reacción de la glucocuinasa cuando se encuentra libre (72) y tiene una K_i similar a la de la glucosamina libre. El gel de glucosamina ligado a Sepharosa se preparaba mediante una reacción de formación de una unión amídica entre el grupo amino de la glucosamina y el grupo carboxilo del ácido aminohexanoico, según se describe en METODOS.

Los estudios preliminares para establecer las condiciones para la cromatografía de afinidad lograron demostrar que la enzima se retenía en la matriz de glucosamina ligada a Sepharosa y que las condiciones más apropiadas consistían en equilibrar la columna de afinidad y hacer pasar la enzima en un medio que contenía Tris-HCl pH 7,2 20 mM, EDTA 1 mM, 2-ME 5 mM (solución 3) y KCl con una concentración inferior a 100 mM. Luego se encontró que una concentración de KCl de 50 mM era la más apropiada puesto que permitía la retención total de la enzima proveniente

del eluido seleccionado de la etapa 5 a la vez que facilitaba la elución de algunas proteínas contaminantes que no se retenían en esas condiciones de fuerza iónica.

El eluido seleccionado de la recromatografía en DEAE celulosa se hacía pasar por una columna de glucosamina unida a Sepharosa de 8 x 1,5 cm, previamente equilibrada con un volumen igual a 8 veces el volumen de la columna, de solución 3 con KCl 50 mM y se eluía después de acuerdo a la siguiente secuencia de etapas:

- a) la columna se equilibraba con KCl 50 mM en la solución 3, haciendo pasar un volumen de esta solución igual a 8 veces el volumen de la columna,
- b) el eluido seleccionado de la etapa 5 se equilibraba en KCl 50 mM en la solución 3 mediante una diálisis de 4 horas en esta solución con 3 cambios de 2 l de solución. Al equilibrar la enzima en este medio se retiraba la glucosa y el exceso de KCl que impedía la retención de la glucoquinasa en la columna de glucosamina ligada a Sepharosa. Un procedimiento utilizado en los primeros estudios de esta cromatografía consistía en concentrar el eluido seleccionado de la 5a etapa hasta 4 ml mediante el uso de una columna de 2 ml de DEAE celulosa y después se colocaba sobre una columna de Sephadex G-25 equilibrada con KCl 50 mM en la solución 3 eluyéndose la enzima con esta misma solución. La proteína

con actividad enzimática se eluía con un valor de K_d diferente del de glucosa y el KCl en exceso, por lo que era posible separarla de estas moléculas,

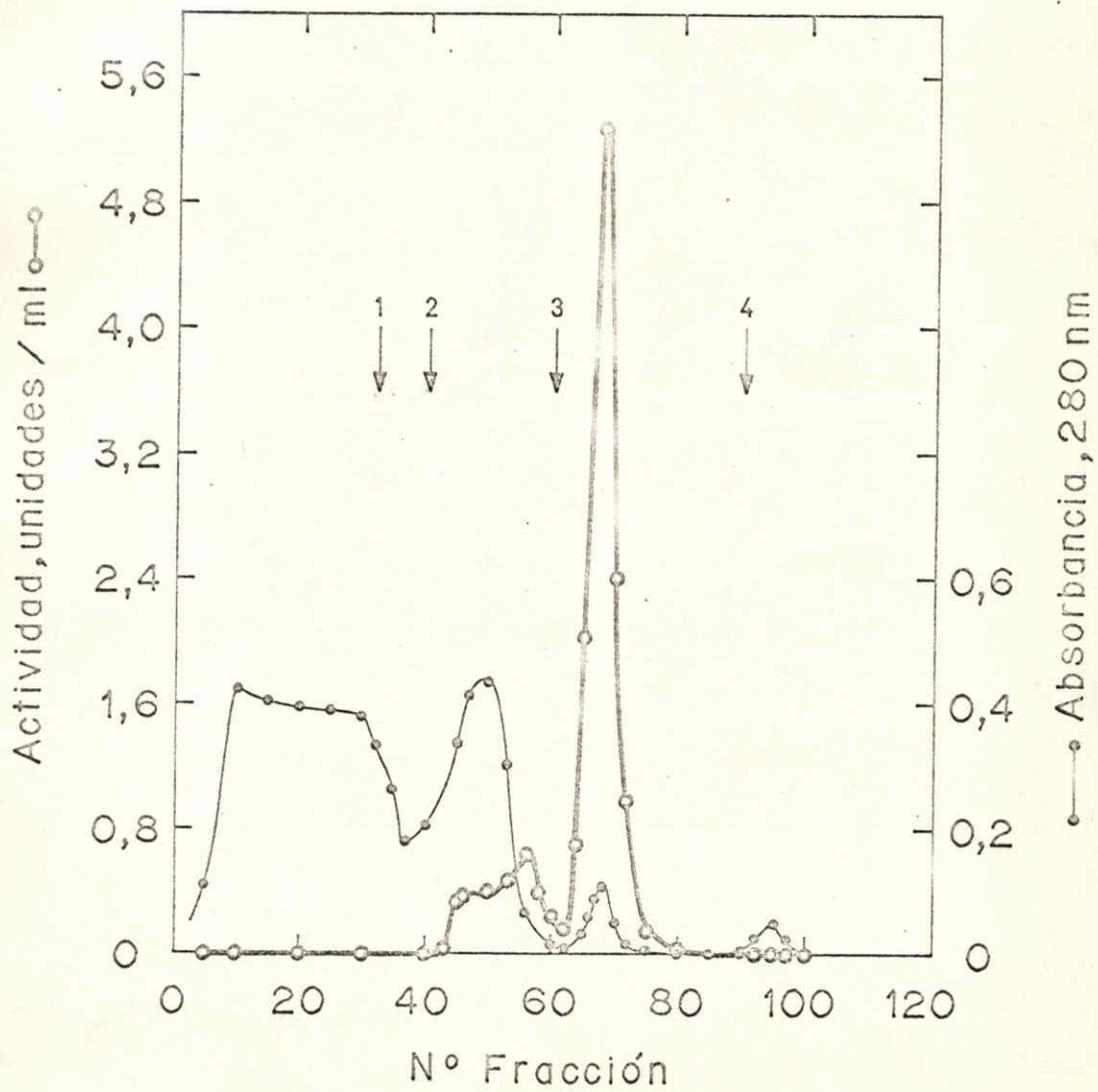
- c) la enzima en un volumen de alrededor de 150 ml (después de la diálisis) se hacía pasar por la columna de glucosamina ligada a Sepharosa,
- d) se lavaba la columna con 4 volúmenes de KCl 0,1 M en la solución 3. Este lavado tenía por objeto retirar las proteínas retenidas inespecíficamente durante la etapa c) de esta cromatografía y facilitar la elución posterior de la enzima,
- e) se eluía la proteína con actividad glucoquinásica con glucosa 0,3 M en la solución de lavado.

En las fracciones eluidas en las diferentes etapas de la cromatografía de afinidad se medía absorbancia a 280 nm y actividad enzimática.

En la figura 7 se observa la elución de una familia de proteínas no retardadas en la matriz de afinidad durante la entrada de la preparación a la columna, en tanto que una fracción importante de las proteínas cromatografiadas se adsorbe y solamente eluye al aumentar la concentración de KCl a 0,1 M en la solución 5. Con KCl 0,1 M eluye también entre un 10 y un 20 % de la actividad glucoquinásica, lo que depende de la cantidad de proteínas cromatografiadas.

Figura 7 Cromatografía en columna de glucosamina ligada a Sepharosa del eluido seleccionado de la cromatografía en DEAE celulosa microgranular.

El eluido seleccionado de la cromatografía en DEAE celulosa con 257 unidades de glucoquinasa y 12 mg de proteínas en 132 ml se equilibró en KCl 50 mM en la solución 3 y se colocó sobre la columna de 8 x 1,5 cm de Sepharosa-glucosamina. La columna se lavó sucesivamente con KCl 50 mM (flecha 1) con 100 ml de KCl 100 mM (flecha 2) y se eluyó la enzima con KCl 100 mM glucosa 300 mM (flecha 3). Finalmente se hizo pasar KCl 1 M (flecha 4). En todos los casos las soluciones de sal y/o glucosa se prepararon en solución 3. Se colectaron fracciones de 2,8 ml a un flujo de 0,9 ml/min. En el eluido seleccionado de esta cromatografía (tubos 64-72) se recuperó 52 % de la actividad del eluido seleccionado de la etapa anterior y se obtuvo 1,5 mg de glucoquinasa con una actividad específica de 88,8 unidades/mg.



Una tercera zona de proteínas corresponde con la zona de elución de la actividad enzimática y aparece una cuarta zona de baja concentración de proteínas que corresponde a las proteínas muy fuertemente adsorbidas y que solamente eluyen al agregar KCl 1 M al tampón de elución.

De acuerdo a este procedimiento cromatográfico se obtiene 1,5 mg de la enzima con una actividad específica de 88,8 y un rendimiento de 11,7 %, lográndose aumentar la actividad específica en 11.093 veces en relación al extracto inicial.

En la tabla III se resume el método de purificación que utiliza la cromatografía en la matriz de glucosamina unida a Sepharosa.

Un estudio para establecer las condiciones de elución de glucoquinasa, de la matriz de glucosamina-Sepharosa reveló que la enzima se puede eluir también mediante una gradiente de glucosa desde 0 a 0,75 M en la solución de lavado. Se empleaba una gradiente lineal de 400 ml y se lograba retirar la enzima cuando la concentración de glucosa era de 0,15 M. En reemplazo de glucosa es posible eluir la enzima con KCl 1 M después del lavado descrito en d), pero se obtenía una preparación de menor actividad específica que la del método descrito arriba. Cuando la glucoquinasa era eluida por etapas, con concentraciones crecientes de glucosa se recuperó la mayor parte de la actividad al eluir con glucosa 400 mM (113).

T A B L A III
Purificación de Glucoquinasa

Método 2

Procedimiento	Unidades totales		Proteínas totales	Actividad específica	Rendimiento total		Purificación
	Volumen ml	U/mg			etapa	total	
Homogeneizado	1.860						
Extracto crudo	720	1.144*	142.200	0,008			
DEAE-celulosa	680	736	1.790	0,41	64,3	64,3	51,3
Sulfato amonio (0,55-0,80)	28	552	820	0,67	74,9	48,2	33,8
Sephadex G-100	185	421	82	5,10	76,3	36,7	638
DEAE-celulosa microgranular	132	257	12	21,2	61,1	22,4	2.650
Sepharosa-glucosamina	22	134	1,5	88,8	52,2	11,7	11.093

* Relación entre la actividad fosfotransferásica del extracto con glucosa 100 mM y 0,5 mM = 8,4.

Con el objeto de estudiar la naturaleza de la interacción entre la glucoquinasa y la matriz derivada de glucosamina se colocó la enzima proveniente de una preparación de la etapa 4 previamente equilibrada en la solución 3 con KCl 50 mM, sobre una columna de CH-Sepharosa 4B a la cual no se había ligado glucosamina. La glucoquinasa no se retuvo en la matriz pasando sin retardo junto con la mayor parte de la proteína. El lavado con KCl 0,1 M en la solución 3 prácticamente retiraba muy poca proteína con actividad glucoquinásica y ésta era casi despreciable al colocar glucosa 0,3 M en la solución de elución. Este experimento y la elución específica de la glucoquinasa con glucosa 0,3 M en la solución de lavado son pruebas experimentales de que la enzima se une a la glucosamina en la matriz de Sepharosa-glucosamina.

B. METODO ABREVIADO DE PURIFICACION

Se realizaron estudios para lograr la purificación de la glucoquinasa mediante cromatografía de afinidad de preparaciones enzimáticas provenientes de etapa de menor purificación que el eluido seleccionado de la cromatografía en DEAE celulosa microgranular. Los resultados de estos estudios indican que la glucoquinasa se obtiene en forma pura luego que el eluido seleccionado de la etapa de Sephadex G-100 se hacía pasar por la columna de afinidad y se eluía la proteína con actividad glucoquinásica de acuerdo al método descrito arriba.

Para realizar esta cromatografía se equilibraba la mitad del eluido seleccionado de la etapa de Sephadex G-100 (75 ml) en la solución 3 con KCl 50 M y se hacía pasar por la columna de glucosamina unida a Sepharosa (8 x 1,5 cm) previamente equilibrada en esta solución. Después de lavada con 80 ml de KCl 100 mM en la solución 3 y posteriormente se eluía la enzima con glucosa 0,3 M en la solución 3 con KCl 100 mM (fig. 8). Luego se repetía este procedimiento con la otra fracción de 75 ml del eluido de la etapa de Sephadex G-100.

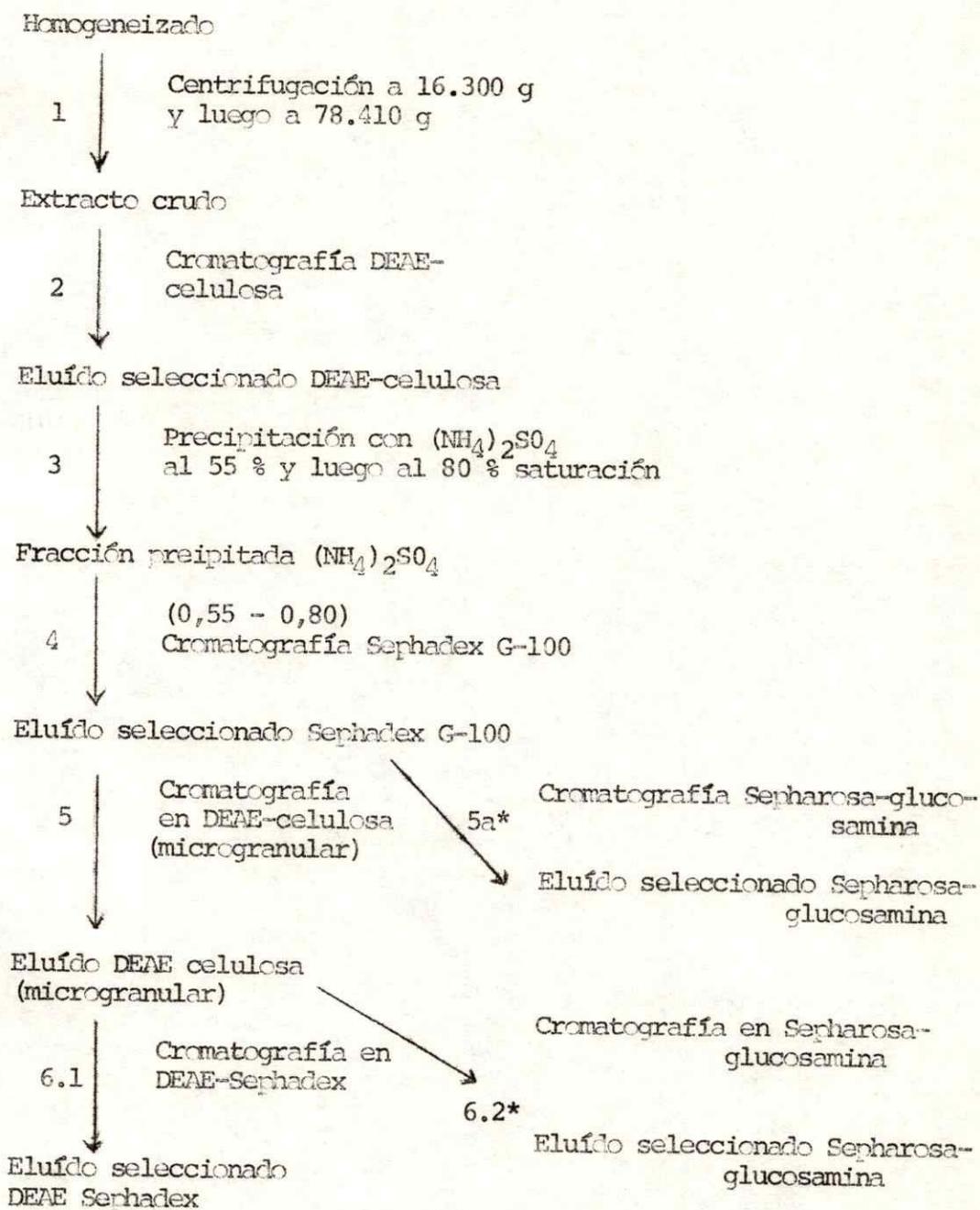
En el eluido del lavado se retiraba el 66 % de las proteínas colocadas en la columna y una fracción no superior al 19 % de las unidades de glucoquinasa colocada. El eluido seleccionado de esta cromatografía (fracciones 58-64) presentaba una actividad específica de 89,5 unidades/mg de proteína (promedio de las dos cromatografías) y se lograba recuperar un 64 % de las unidades de enzima colocadas en la columna.

Mediante este método abreviado se lograba obtener 2,1 mg de glucoquinasa con un rendimiento total de 14,8 %.

La gran ventaja que ofrece este método abreviado es la disminución de tiempo y la simplicidad del método al suprimir la recromatografía en DEAE celulosa (etapa 5).

Esta cromatografía de afinidad en el método abreviado puede simplificarse si se logra disminuir la elución de proteína con actividad enzimática en el lavado, lo cual podría hacerse por una parte, modificando la fuerza iónica de las soluciones de lavado y elución y por otra, aumentando el tamaño de la columna para cromatografiar

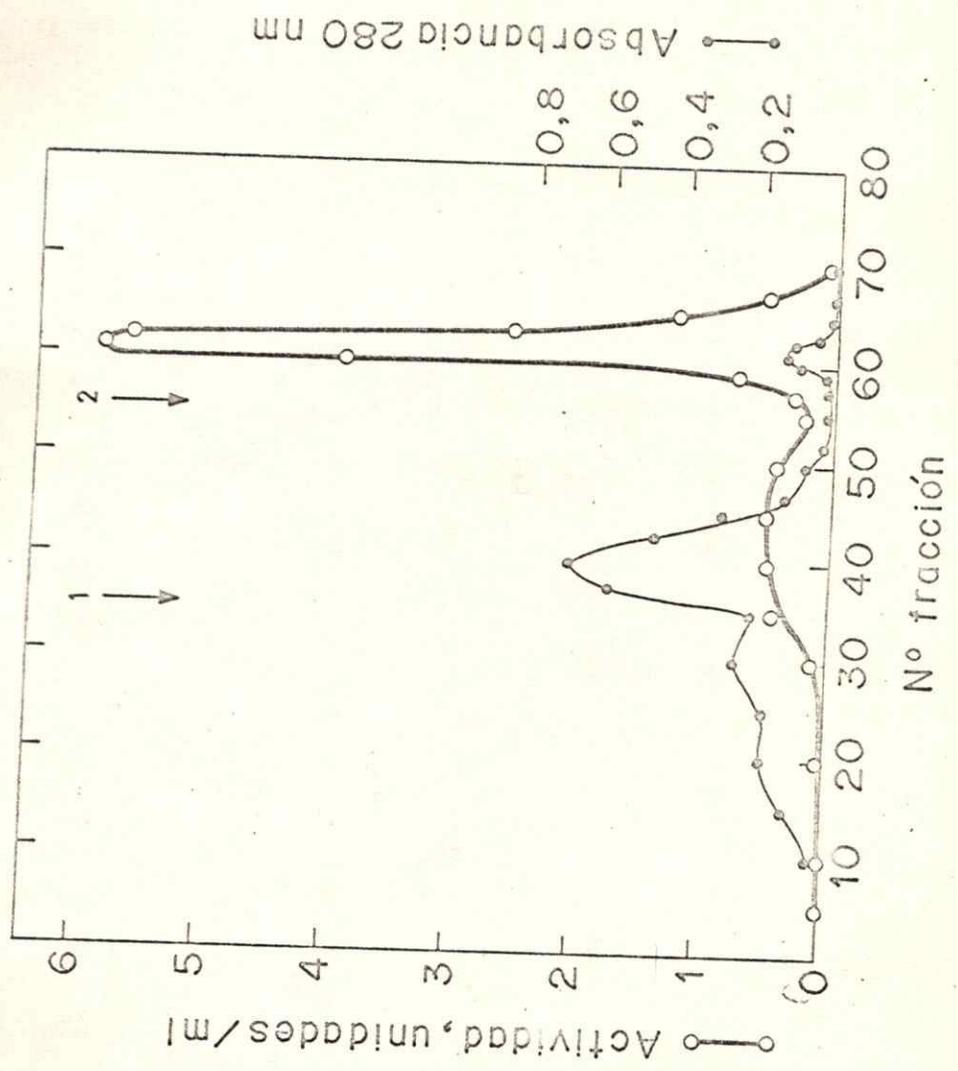
CUADRO RESUMEN DE LOS METODOS ALTERNATIVOS USADOS PARA PURIFICAR
LA GLUCOQUINASA



* Los métodos con los procedimientos alternativos 6.1 y 6.2 y el método abreviado 5a se efectuaron utilizando la totalidad de la preparación en las diferentes etapas de purificación.

Figura 8 Cromatografía en columna de Sepharosa-glucosamina del eluido seleccionado de Sephadex G-100

Una alícuota del eluido seleccionado de la etapa Sephadex G-100 (75 ml) con una actividad de 188 unidades y 38 mg de proteínas se dializó contra 3 x 2 l de KCl 50 mM en la solución 3 y se colocó sobre una columna de 8 x 1,5 cm de la matriz de Sepharosa-glucosamina. Se lavó con 80 ml de KCl 100 mM en la solución 3 (flecha 1) y luego se eluyó la enzima con glucosa 300 mM en la solución del lavado (flecha 2). Se colectaron fracciones de 3 ml a un flujo de 0,9 ml/minuto. El conjunto de las fracciones seleccionadas presentaba una actividad específica de 89,5 unidades/mg y se recuperaba el 64 % de las unidades de glucoquinasa colocadas en la columna.



una mayor cantidad de proteínas, puesto que el eluido seleccionado de la etapa de Sephadex G-100 tiene cerca de 7 veces la cantidad de proteínas del eluido de la recromatografía en DEAE celulosa.

C. TIEMPO EMPLEADO EN LA PURIFICACION DE LA GLUCOQUINASA

El tiempo empleado en el desarrollo del método que utiliza la cromatografía de afinidad era de 7 días. El procedimiento se comenzaba con dos hígados de perro (aprox. 1000 g en total), los cuales se obtenían el mismo día que se comenzaba la purificación. Durante el primer día se realizaba la preparación de los extractos, luego se hacían pasar por la columna de DEAE celulosa. Durante la noche se completaba el lavado con KCl 0,18 M en la solución 1 y la elución de las proteínas adsorbidas en la columna se hacía durante el segundo día. En la tarde del segundo día de trabajo se hacía el fraccionamiento con sulfato de amonio. La disolución del precipitado y la cromatografía de filtración en Sephadex se realizaba durante el tercer y parte del cuarto día y en la mañana del quinto día se mezclaban las fracciones de mayor actividad de esta cromatografía y el conjunto de ellas se hacía pasar por la columna de DEAE celulosa microgranular. En la tarde del sexto día se seleccionaban las fracciones con la mejor actividad del eluido de esta cromatografía y el conjunto de éstas se dializaba para realizar la cromatografía de afinidad durante el séptimo día.

Quando no se efectuaba la cromatografía en DEAE celulosa microgranular, el procedimiento de purificación se podía completar solamente en 5 días obteniéndose una glucoquinasa pura, disponible para estudios ulteriores.

D. VENTAJAS DEL METODO QUE UTILIZA LA CROMATOGRAFIA EN LA MATRIZ DE SEPHAROSA GLUCOSAMINA

Los métodos de purificación descritos en este trabajo a la vez de simplificar la metódica de Grossman et al (70) para la enzima de rata permiten obtener la enzima pura en la tercera parte del tiempo empleado por estos autores.

En relación a los métodos propuestos en este trabajo para la purificación de la glucoquinasa de perro, resulta más conveniente el método que utiliza cromatografía en la matriz de Sepharosa glucosamina. La purificación mediante el empleo de cromatografía en Sepharosa glucosamina puede completarse en 7 días, lo cual puede reducirse a 5 si se emplea el método abreviado; en cambio el método alternativo de la columna de DEAE Sephadex requiere de dos días adicionales de trabajo a la vez que resulta más complejo técnicamente.

El método de la columna de Sepharosa glucosamina permite además obtener las mayores actividades específicas a la vez que rendimientos alrededor de 2,5 veces superiores al método de la columna de DEAE Sephadex.

E. CONTROL DE PUREZA DE LAS PREPARACIONES

El control de pureza de las diferentes preparaciones obtenidas en el estudio de la purificación de glucoquinasa se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida por el método de Davis según se describió en METODOS. Esta técnica se utilizó como control de pureza de las preparaciones provenientes de las diferentes etapas del procedimiento de purificación descrito en este trabajo. En la figura 9 se ilustra la disminución en el número de bandas en geles de poliacrilamida a medida que se progresa en la purificación.

La preparación obtenida mediante el procedimiento que utiliza la cromatografía de afinidad presenta una banda de proteínas según el criterio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 7 y 10 % (fig. 11). Además, otra característica de esta preparación es la constancia en la actividad específica en las diferentes fracciones del eluido cromatográfico donde aparece la actividad (ver figs. 7 y 8). La pureza de esta preparación se confirma al hacer geles al 10 % de acrilamida en presencia de urea como agente desnaturante, observándose además que la migración de esta banda única es similar a la de la banda obtenida en geles al 10 % de acrilamida sin la presencia de este agente desnaturante (fig. 12). La electroforesis en presencia de SDS como agente desnaturante, utilizando geles al 5 % de poliacrilamida permitió demostrar también la presencia de una única banda (fig. 12). La existencia de una especie molecular con un punto

isoceléctrico de 5,1 fue observada en los experimentos de electroforesis en geles de poliacrilamida (ver fig. 23). El conjunto de estos resultados hacen posible establecer la pureza de esta preparación.

La preparación obtenida por el método que utiliza DEAE Sephadex en la última etapa se presenta también como una preparación homogénea sobre la base del criterio de electroforesis en geles en presencia y ausencia de agentes desnaturalantes (fig. 10) y por el criterio de actividad específica constante en las fracciones del eluido cromatográfico donde aparece la actividad. La preparación obtenida por el método abreviado de la cromatografía de afinidad también presenta una banda de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia y ausencia de urea 8 M como agente desnaturalante. Se ha calculado además que la actividad específica promedio de las diferentes fracciones donde eluye selectivamente la glucoquinasa es de $78,5 \pm 14,1$ unidades/mg de proteína.

F. TINCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La demostración de que la banda presente en los geles de poliacrilamida corresponde a la glucoquinasa se obtuvo por tinción de la actividad enzimática en geles. Se logró identificar una banda de

proteínas que corresponde con la banda obtenida por tinción de la actividad enzimática, en geles de poliacrilamida al 10 % después de una electroforesis en las condiciones descritas en METODOS (fig. 13).

También se logró detectar actividad enzimática por tinción en geles usando preparaciones semipurificadas.

Se hicieron muchos intentos para extraer la proteína con actividad glucoquinásica de geles no teñidos después de electroforesis de preparaciones semipurificadas de la enzima. Se logró detectar una banda de glucoquinasa mediante determinación espectrofotométrica de la actividad del eluido de uno de los trozos del gel, pero se recuperaba menos del 10 % de la actividad colocada. Estos eluidos se obtenían luego de incubar los trozos de gel triturados y posterior filtración del líquido de incubación (114).

IV. CARACTERIZACION DE LA GLUCOQUINASA DE HIGADO DE FERRO

La enzima pura se caracterizó en relación a sus propiedades fisicoquímicas, estructurales y cinéticas. Se estudiaron la estabilidad térmica, la resistencia a agentes desnaturalantes, características espectrales, tamaño y forma de la enzima, el punto isoelectrico y se obtuvo información en relación a la composición de aminoácidos, las características de los grupos sulfhidrilos y la estructura cuaternaria. Se estudiaron además algunas características cinéticas básicas.

Figura 9 Electroforesis en geles de poliacrilamida de preparaciones de diferentes etapas del método de purificación.

Se prepararon geles con acrilamida al 7 % según se describe en METODOS (E) y las proteínas convenientemente dializadas contra la solución de electroforesis con sacarosa al 60 % se colocaron sobre los geles para hacer electroforesis en las condiciones indicadas en METODOS. Los geles muestran las bandas de proteínas teñidas con Amido Schwarz al 0,2 %. A. Gel de poliacrilamida después de la electroforesis de la preparación proveniente de la cromatografía en DEAE celulosa (160 ug). B. Gel de poliacrilamida después de la electroforesis de una preparación proveniente de la cromatografía en Sephadex G-100 (160 ug). C. Gel de poliacrilamida después de electroforesis de una preparación proveniente de la cromatografía en DEAE celulosa microgranular (100 ug). D. Gel de poliacrilamida después de la electroforesis de una preparación de la cromatografía en Sepharosa glucosamina (70 ug).

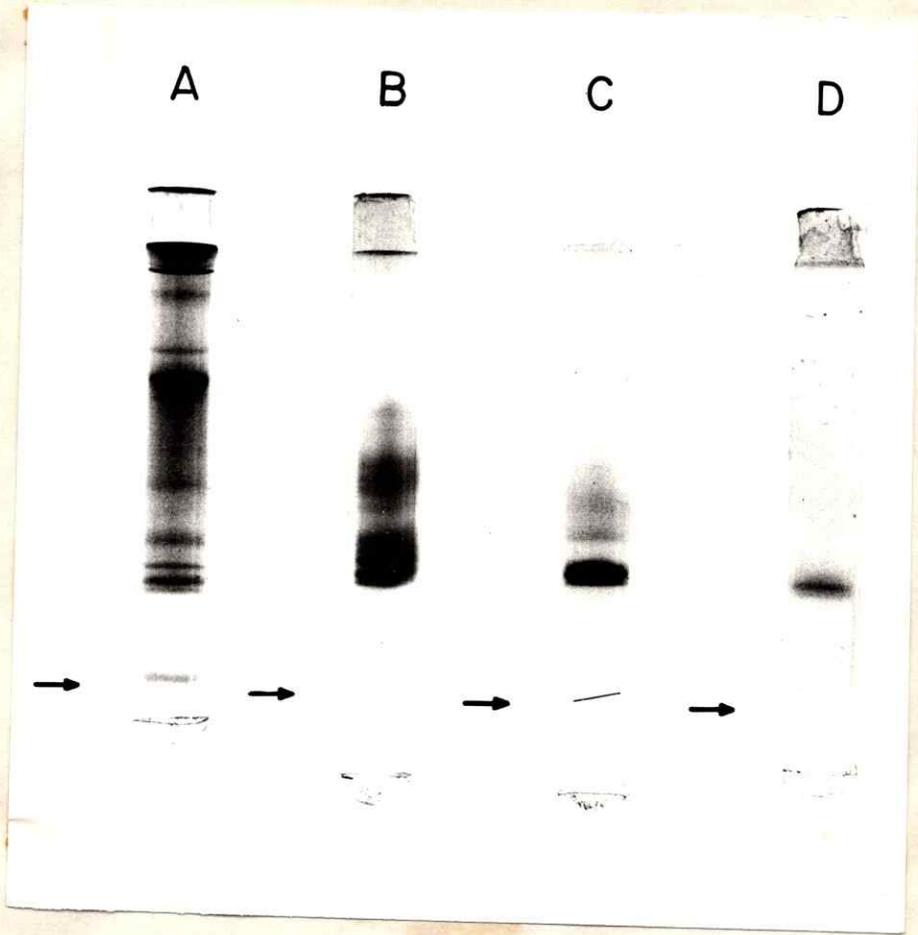


Figura 10 Electroforesis en geles de poliacrilamida de la glucoquinasa obtenida por el método que emplea la cromatografía en DEAE Sephadex.

A. Electroforesis de la enzima (160 ug) en geles con acrilamida al 10 % según se describe en METODOS (H). B. Electroforesis de la enzima (80 ug) en geles con acrilamida al 7 % según se describe en METODOS (E). C. Electroforesis de la enzima (100 ug) en geles con acrilamida al 5 % y SDS 0,1 % según se describe en METODOS (C).

Las flechas indican la posición del colorante de referencia después de la electroforesis.

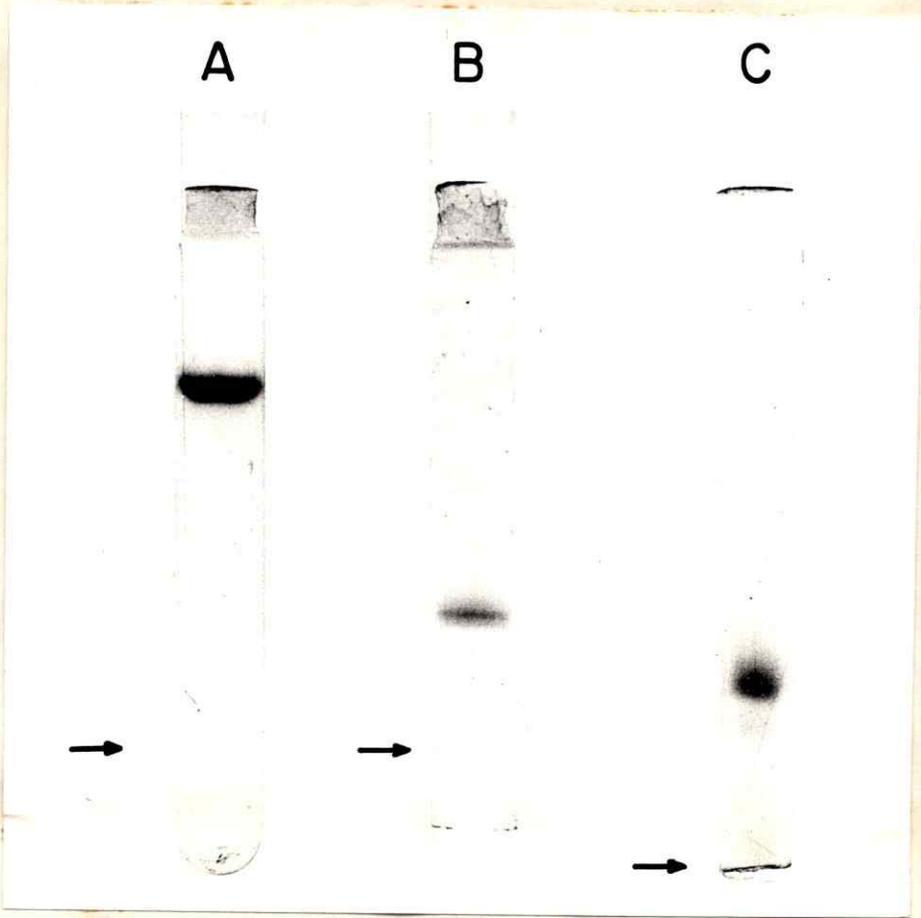


Figura 11 Electroforesis en geles de poliacrilamida de la glucoquinasa obtenida por el método que utiliza la cromatografía en Sepharosa glucosamina en dos condiciones experimentales diferentes.

A. Electroforesis de la glucoquinasa (160 ug) en geles con acrilamida al 10 % según se describe en METODOS (H). B. Electroforesis de la glucoquinasa (120 ug) en geles de poliacrilamida al 7 % según se describe en METODOS (E).

Debajo de esta figura se muestra la curva densitométrica realizada a 550 nm en un Gilford.

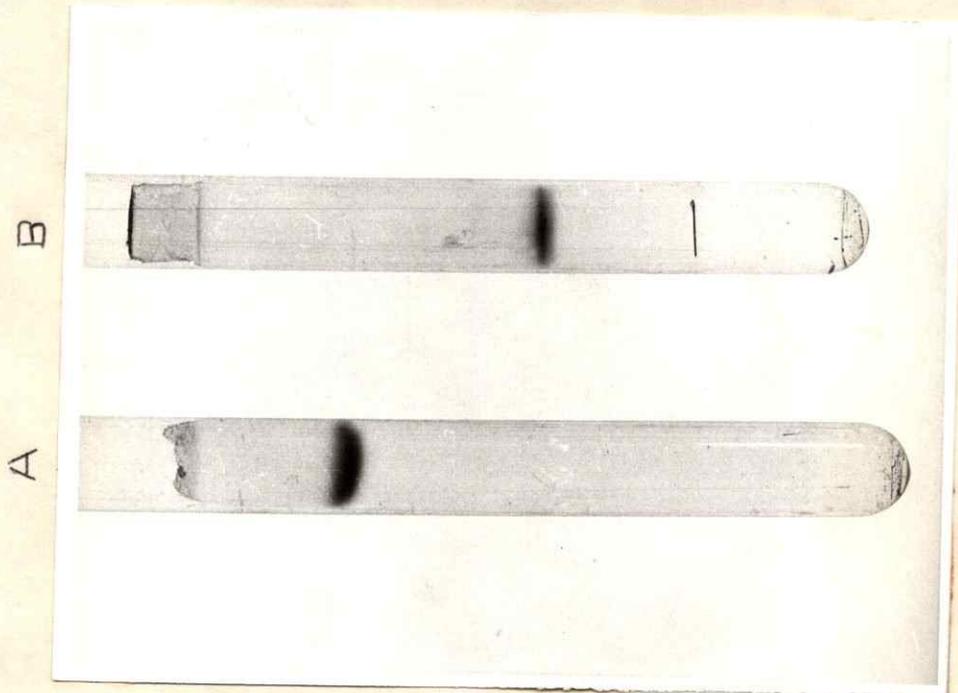
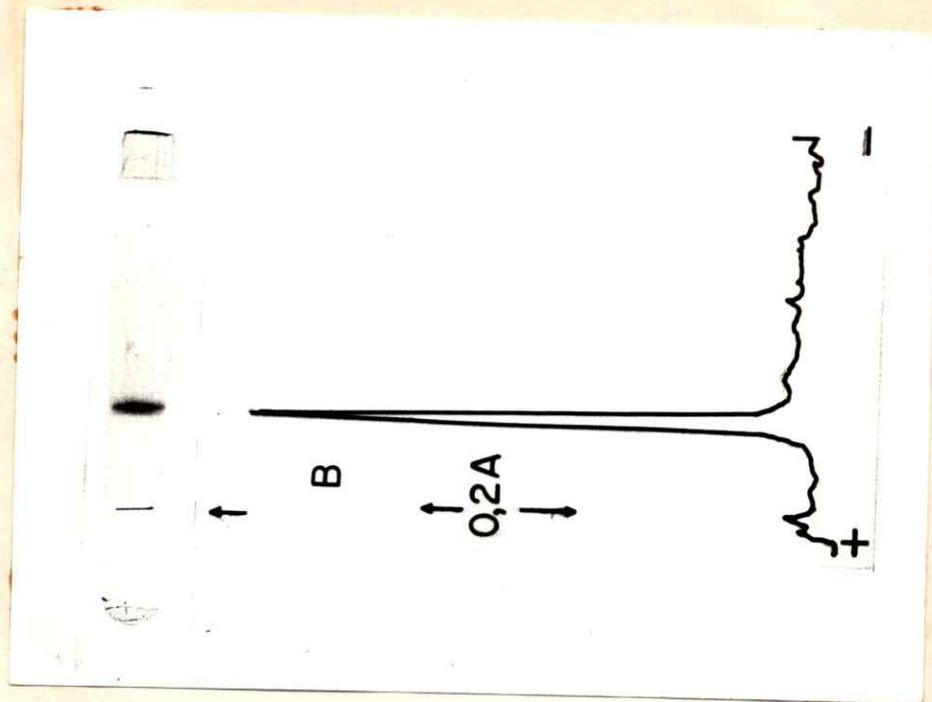


Figura 12 Electroforesis de la glucoquinasa en geles de poliacrilamida en presencia de agentes desnaturantes.

A. Electroforesis de la glucoquinasa (200 ug) obtenida por el método que emplea la cromatografía en Sepharosa-glucosamina, en geles con acrilamida al 10 % y urea 6,2 M. La electroforesis se realizó en las condiciones indicadas en METODOS (F).

B. Electroforesis de la glucoquinasa (160 ug) obtenida por el método que emplea la cromatografía en Sepharosa-glucosamina, en geles con acrilamida al 5 % y SDS al 0,1 %, según se describen en METODOS (G).

Debajo de las figuras con el gel se presenta la curva densitométrica obtenida por medición de absorbancia a 550 nm.

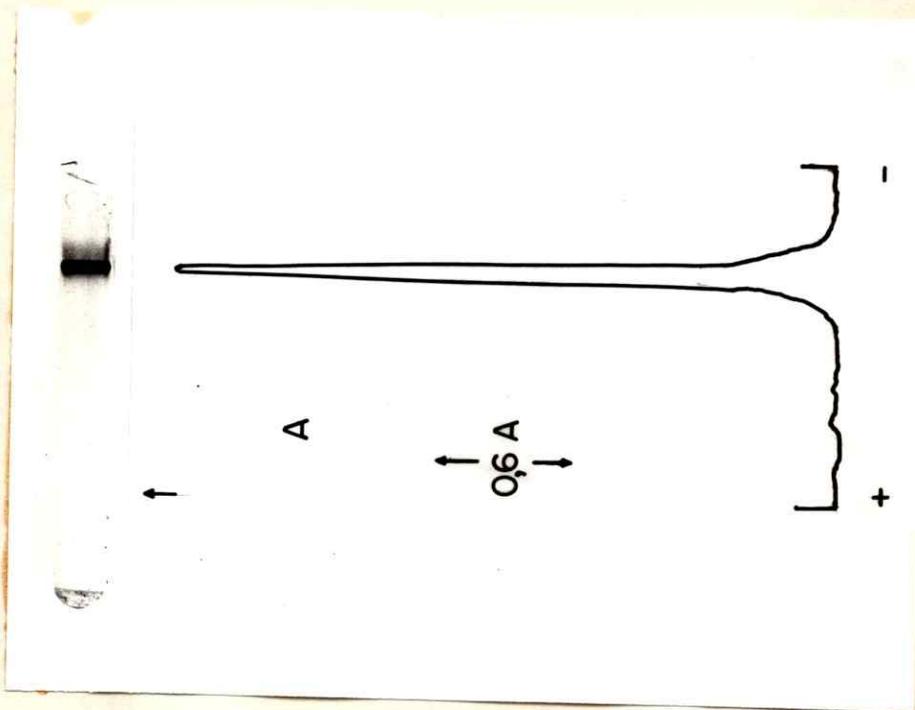
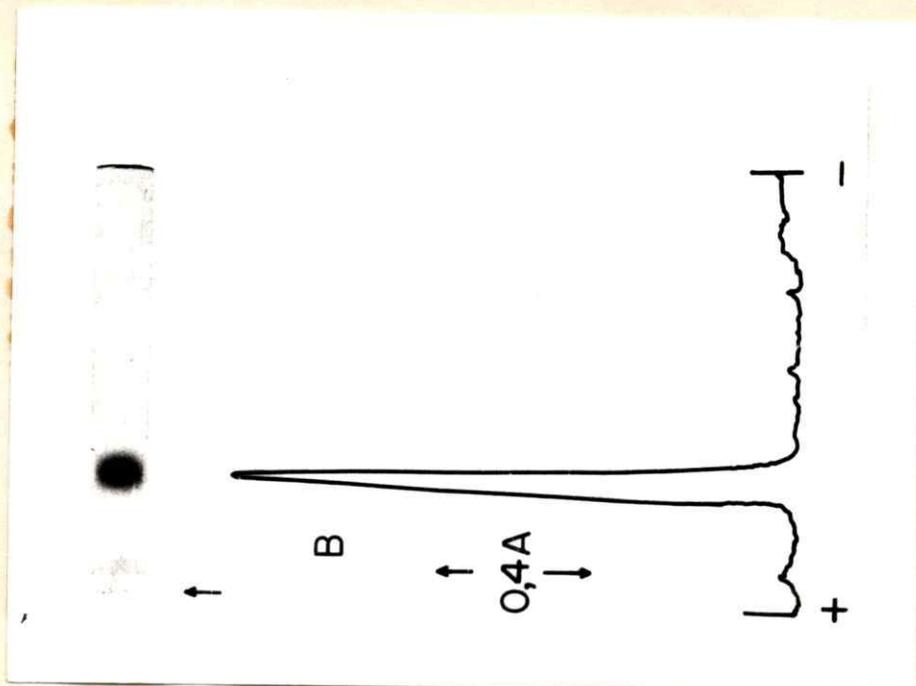
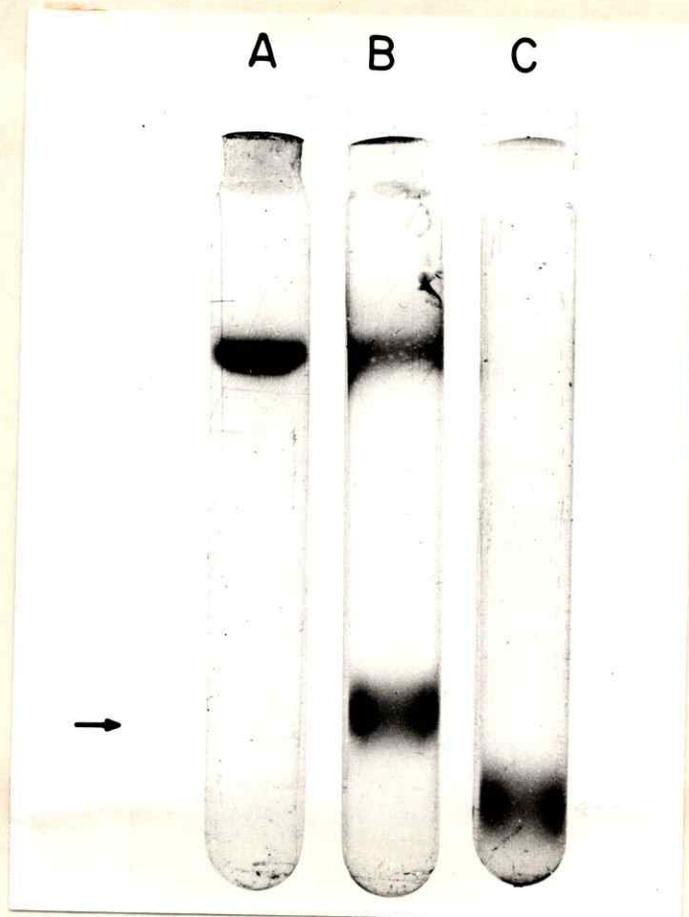


Figura 13 Electroforesis en geles de poliacrilamida para tinción de la actividad glucoquinásica.

La glucoquinasa obtenida por el método que emplea la cromatografía en Sepharosa glucosamina, se dializó convenientemente contra la solución de electroforesis, se colocó sobre geles con acrilamida al 10 % y se hizo electroforesis según se describe en METODOS (H). A. Gel de poliacrilamida después de la electroforesis de la enzima (140 ug) y tinción con amido Schwarz al 0,2 %. B. Gel de poliacrilamida después de la electroforesis de la enzima (5 ug) y tinción de la actividad glucoquinásica por el método de Schinke (11) con el medio completo de reacción. C. Gel de poliacrilamida después de electroforesis de la enzima (5 ug) y tinción de la actividad glucoquinásica por el método de Schinke (11), sin ATP en el medio de reacción.

Las flechas indican la posición del colorante de referencia que no desaparece después de la tinción por el método de Schinke (B y C).



A. ESTABILIDAD DE LA GLUCOQUINASA

1. Estabilidad de los Extractos Crudos

Una de las principales dificultades que han aparecido al intentar purificar la glucoquinasa de diferentes fuentes ha sido la gran inestabilidad de esta enzima en las fracciones crudas aún en presencia de moléculas protectoras de la actividad. En los comienzos de este trabajo se utilizaba, luego de la obtención de los extractos, una etapa adicional en la cual se mezclaba la preparación enzimática con Carboximetil Sephadex basado en estudios hechos en el laboratorio que demostraban que esta etapa lograba aumentar considerablemente la estabilidad de la enzima al eliminarse un conjunto de proteínas intercambiadas. Posteriormente se decidió prescindir de esta etapa al lograr un aumento notable en la estabilidad de los extractos, haciendo el homogeneizado en presencia de fosfato de potasio 10 mM pH 7,0 y KCl 0,18 M además de glucosa 100 mM, EDTA 1 mM y 2-ME 5 mM. El KCl a la vez que protege la actividad permite una mayor y más rápida aglutinación de partículas celulares y algunas proteínas durante las centrifugaciones iniciales.

La medición de la estabilidad de los extractos a 4° resultó imprescindible debido al largo tiempo (cerca de 16 horas) que demoraba la cromatografía de ellos en DEAE celulosa. Un estudio de la estabilidad de la fracción S₁ a 4° demostró que la actividad glucoquinásica disminuyó a un 24 % después de 7 días de incubación a esa

temperatura, en tanto que la actividad de las hexoquinetas disminuyó solamente a un 45 % (fig. 14). Al incubar a 4° la fracción S₁ diluida 10 veces se observó que la actividad decafa solamente a un 63 % en 7 días (fig. 14).

Una explicación posible de este hecho reside en suponer que la inactivación de los extractos se deba principalmente a la acción de proteasas inespecíficas cuya actividad disminuiría al mantener diluido el extracto.

2. Estabilidad de las Preparaciones de Mayor Purificación

La glucoquinasa de hígado de perro es relativamente estable en presencia de glucosa, 2-ME y KCl en la solución de fosfato 10 mM pH 7,0. Las preparaciones provenientes de las cromatografías en Sephadex G-100 y DEAE celulosa microgranular no perdían actividad durante dos semanas cuando se guardaban a 4° en el mismo medio en que fueron eluidas (con glucosa, KCl y 2-ME) y la actividad bajaba sólo a un 75 % después de un mes.

Al no estar presentes en conjunto, la glucosa, el 2-ME y el KCl, la actividad experimenta una caída abrupta cuando la enzima se incuba durante algunas horas a 37° (fig. 15). Este efecto de inactivación térmica es mayor cuando la preparación tiene un menor grado de pureza, haciéndose más sensible la enzima a la presencia o ausencia de moléculas protectoras de la actividad. La resistencia a la inactivación es mayor en las preparaciones puras de la glucoquinasa, lo cual se aprecia claramente porque en ausencia de agentes

protectores la actividad disminuye solamente a un 47 % luego de 30 horas de incubación a 37° (fig. 15). En forma comparativa, los datos de la figura 15 revelan que en ausencia de agentes protectores, el período de semidecaimiento de la actividad de 3,4 horas para la preparación de Sephadex G-100 aumenta a 10 horas en el eluido seleccionado de DEAE celulosa microgranular y es de 22,5 horas para la preparación pura obtenida por cromatografía de afinidad. Sin embargo, al estar presentes estas moléculas protectoras de la actividad, el efecto diferencial en la caída de la actividad no es significativo, observándose una inactivación en el tiempo, levemente superior en la preparación proveniente de la cromatografía en DEAE celulosa microgranular en relación con la enzima pura. El eluido de Sephadex G-100 muestra una pequeña activación de un 10 % de la actividad inicial a las 4 horas de incubación y posteriormente la inactivación sigue una cinética similar al eluido seleccionado de DEAE celulosa microgranular. El fenómeno de activación en las primeras horas de incubación se observó también en preparaciones provenientes de la primera cromatografía en DEAE celulosa.

En la figura 16 se muestra la importancia de la glucosa y del KCl en la estabilidad de preparaciones de los eluidos seleccionados de las cromatografías en Sephadex G-100 y DEAE celulosa microgranular y se observa una mayor inactivación al retirar el KCl que al retirar la glucosa del medio en el que se encuentra la enzima. Esta gran sensibilidad a la presencia de KCl constituye una base sólida para su utilización en las soluciones de elución de los diferentes métodos

Figura 14 Inactivación de la glucoquinasa de un extracto crudo de hígado de perro por incubación a 4°.

El extracto crudo fresco (2 ml) obtenido según se indica en RESULTADOS se incubó a 4°. Se tomaron alícuotas de 10 μ l que se diluyeron convenientemente y se midió la actividad enzimática (0).

Una fracción de este extracto (0,2 ml) se diluyó 10 veces con KCl 0,18 M en la solución 1 y se incubó a 4°. Se tomaron alícuotas de 10 μ l que se diluyeron convenientemente y se midió actividad enzimática (e).

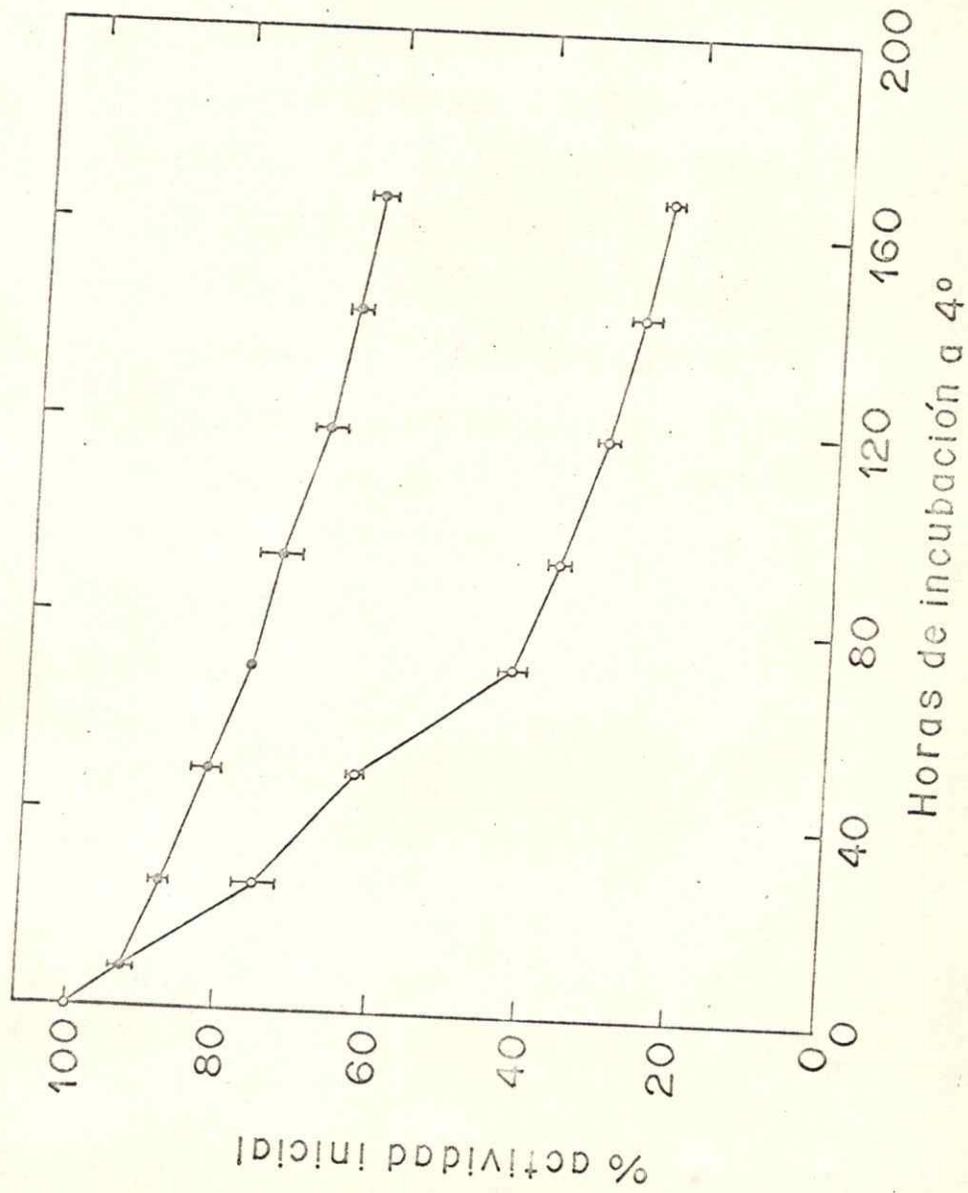
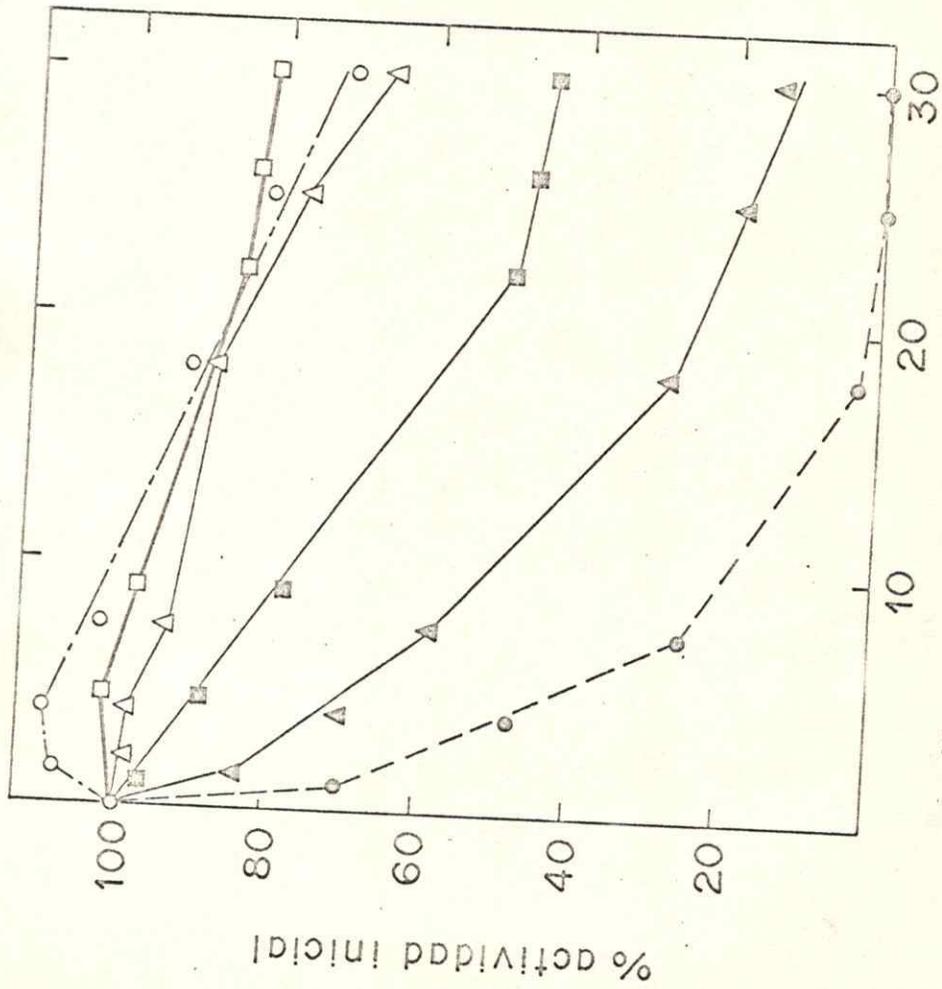


Figura 15 Estabilidad térmica de la glucoquinasa en tres estados de pureza.

Las preparaciones de la enzima (2 ml) en un medio que contenía fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM (excepto el eluido seleccionado de la columna de Sepharosa-glucosamina que contenía Tris 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM) se incubaron en presencia y ausencia de glucosa 100 mM, KCl 0,3 M y 2-mercaptoetanol 5 mM a 37° durante el tiempo indicado en la figura. Se tomaron alícuotas de 10 ul y se incubaron a 4° para luego medir actividad enzimática. Eluido seleccionado de la columna de Sephadex G-100; más glucosa, KCl y 2-mercaptoetanol, (○); menos glucosa, KCl y 2-mercaptoetanol (●). Eluido seleccionado de DEAE-celulosa microgranular: más glucosa, KCl y 2-mercaptoetanol (△). Menos glucosa, KCl y 2-mercaptoetanol (▲). Eluido seleccionado de la columna de Sepharosa-glucosamina: más glucosa, KCl y 2-mercaptoetanol (□); y menos glucosa, KCl y 2-mercaptoetanol (■).



Horas de incubación a 37°C

Figura 16 Efecto de la glucosa y el KCl en la velocidad de inactivación térmica de la glucoquinasa en dos estados de pureza

Las preparaciones de la enzima (2 ml) en un medio que contenía fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, glucosa 100 mM KCl 0,3 M y 2-mercaptoetanol 5 mM se incubaron en presencia y ausencia de KCl y glucosa a 37° durante el tiempo indicado en la figura. Se tomaron alícuotas de 10 ul y se enfriaron a 4° para luego medir la actividad enzimática. Figura A: eluido seleccionado de la columna de Sephadex G-100, medio completo (O); menos glucosa (■) y menos KCl (Δ). Figura B: eluido seleccionado de la columna de DEAE celulosa microgranular, medio completo (●); menos glucosa (▣) y menos KCl (▲).

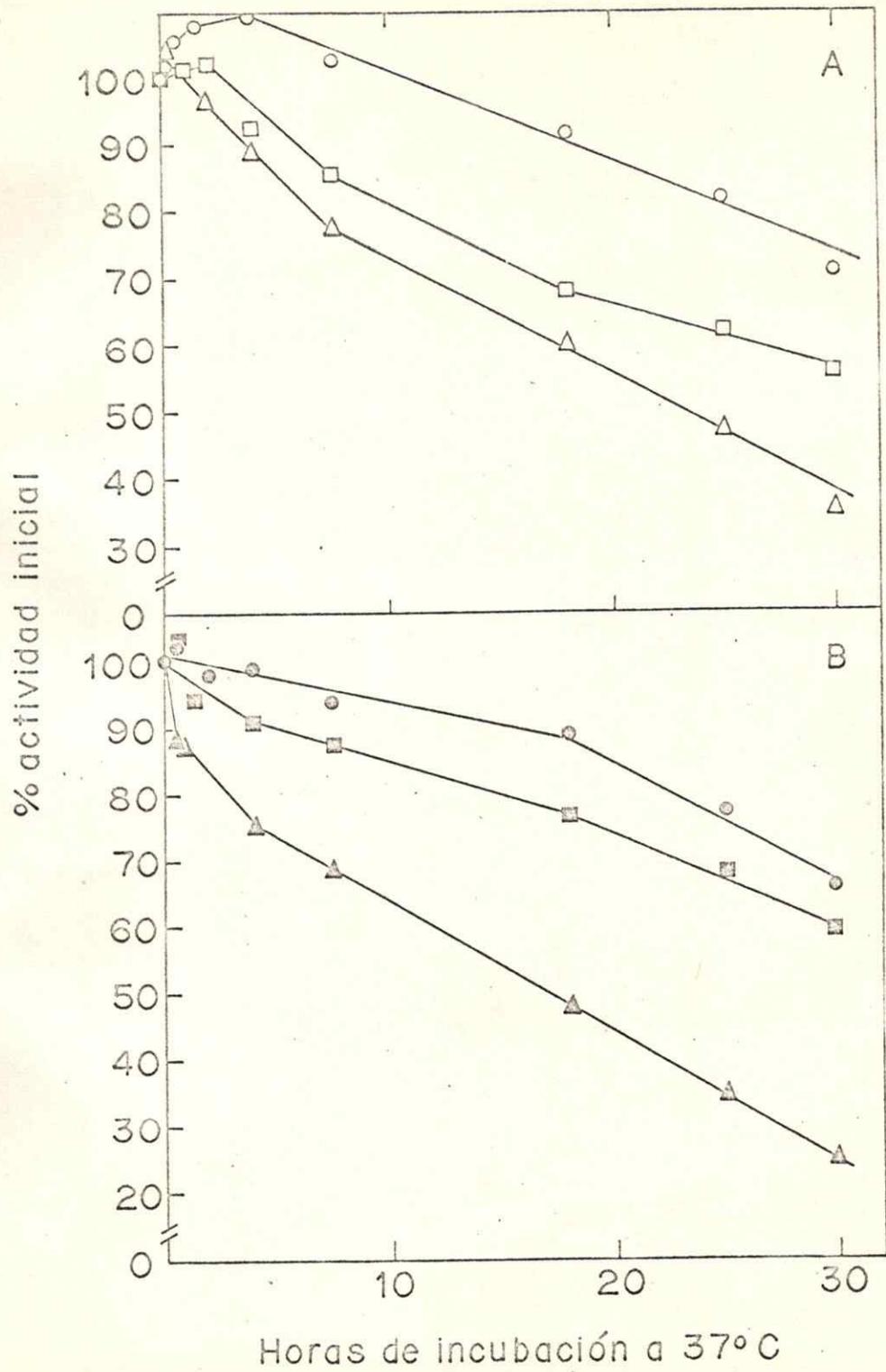
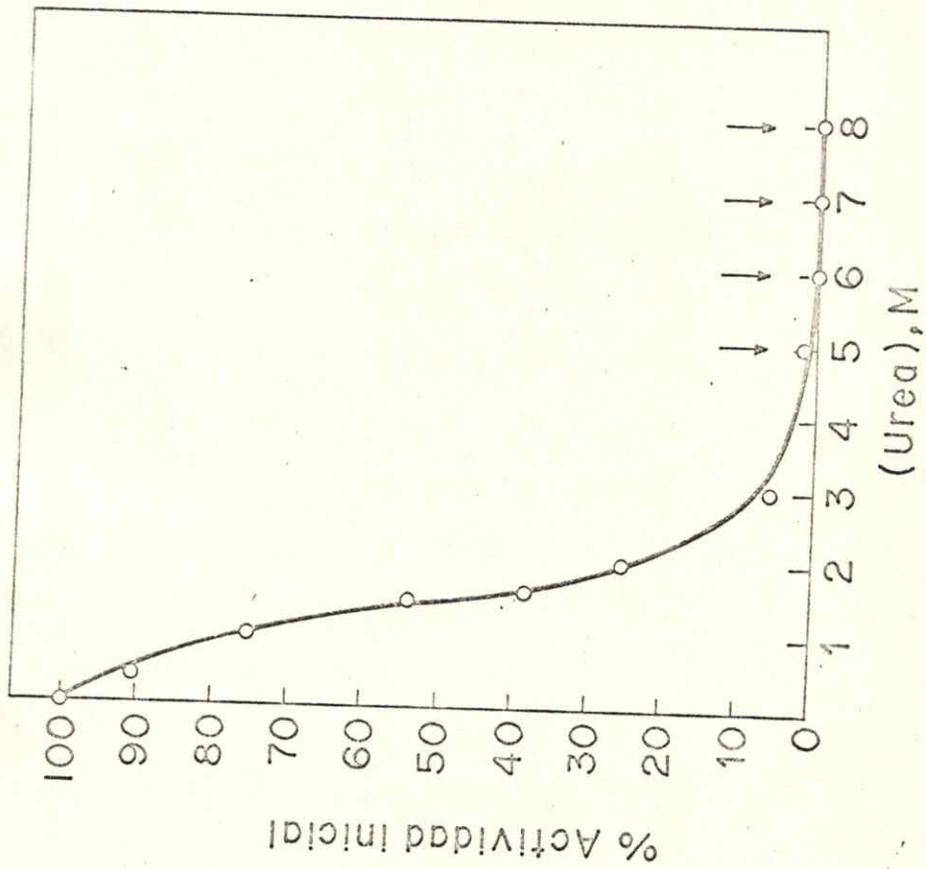


Figura 17 Resistencia de la glucoquinasa de hígado de perro a la inactivación por urea.

La glucoquinasa (0,015 unidades) obtenidas por el método que utiliza cromatografía en Sepharosa-gluco-samina se mezcló con los reactivos del ensayo enzimático y urea en las concentraciones indicadas en la figura y se midió actividad enzimática según el Método I. No se detectaron variaciones de la actividad de G-6-PDH en presencia de las concentraciones de urea empleadas. Para concentraciones superiores a 3 M de urea (valor indicado con una flecha), la actividad enzimática se determinó por medición de la glucosa 6-fosfato formada según el siguiente método: a) se incubó la enzima (0,4 unidades) durante 1,3,5,10 y 15 minutos a 30° en presencia de urea en las concentraciones indicadas y de los componentes del ensayo enzimático con excepción de NADP y G-6-PDH. b) se tomaron alícuotas de este medio de incubación, se agregó NADP y G-6-PDH a las concentraciones usadas en el ensayo enzimático y se midió el aumento de absorbancia a 340 nm durante 9 minutos a 30°. El control de 100 % de actividad tenía la misma composición del medio de incubación pero se omitía la urea.



cromatográficos y también en las preparaciones de extractos crudos.

3. Resistencia a la Acción de Urea

En la figura 17 se puede apreciar que la actividad glucoquinásica disminuye en un 50 % a una concentración de aproximadamente 1,5 M de urea, perdiéndose totalmente a concentraciones de urea mayores que 5 M. Un estudio realizado con la glucoquinasa de rata demostró que la actividad disminuye en un 50 % a una concentración de urea de 1,1 M (115).

En un experimento en el cual se inculó la enzima en presencia y ausencia de glucosa durante 15 minutos a 30° con urea 8 M en el medio de reacción y luego se midió la actividad diluyendo 10 veces la concentración de urea en el medio de ensayo, se demostró la recuperación de un 80-100 % de la actividad glucoquinásica. Este experimento abre las puertas a un estudio más completo de la reversibilidad en la inactivación por urea.

B. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES

La información acerca del peso molecular de la enzima en presencia y ausencia de agentes desnaturantes es fundamental para el conocimiento de su estructura cuaternaria.

1. Determinación del Peso Molecular de la Enzima Nativa

Se obtuvo un peso molecular de 47.000 ± 2.500 mediante filtración analítica en columna de Sephadex G-100 calibrada con las proteínas de peso molecular conocido que se indican en la figura 18. El rango de variación para esta estimación se obtuvo sobre la base de 2 mediciones. El pico de actividad glucoquinásica eluido de esta columna era simétrico y se obtuvo un volumen de elución promedio de 49,45 ml de la zona de mayor actividad del pico.

Si se grafican los valores de K_d en función del logaritmo del peso molecular se obtiene un valor de 48.000 para el peso molecular.

También se midió el peso molecular de la enzima nativa por medio de filtración en Sephadex G-100 en capa fina de acuerdo al método de Andrews (96) y se obtuvo un P.M. de 55.000 (fig. 19).

2. Determinación del Peso molecular de la Enzima Desnaturada

Para la determinación del peso molecular de la enzima en presencia de agentes desnaturalantes se utilizó electroforesis en geles de poli-acrilamida con SDS al 0,1 % de acuerdo al método de Shapiro et al (92) (fig. 20). Se detectó la presencia de una sola especie molecular con un peso molecular de 49.000 ± 2.500 , valor estimado sobre la base de 3 determinaciones.

C. CARACTERISTICAS HIDRODINAMICAS DE LA GLUCOQUINASA

Para tener información acerca del tamaño y forma de la glucoquinasa se calcularon los siguientes parámetros: radio de Stokes, radio molecular, coeficiente de difusión, razón friccional, volumen parcial específico y la razón axial de esta proteína.

1. Cálculo del Radio de Stokes

El radio de Stokes (a) de la glucoquinasa se obtuvo a partir del experimento de filtración en geles para la determinación de pesos moleculares.

Sobre la base del volumen de elución de la glucoquinasa y el de las proteínas de referencia de peso molecular conocido, estimando el volumen libre (V_0) con azul dextrano, se calculó el radio de Stokes mediante dos métodos gráficos:

- a) al graficar V_e/V_0 en función del radio de Stokes se obtiene por interpolación un valor de $29,7 \text{ \AA}$ (fig. 21a),
- b) se graficaron los valores de K_2 en función del radio de Stokes de acuerdo a Porath (116), según la siguiente ecuación:

$$1) \quad \sqrt[3]{K_2} = A + B a$$

donde A y B son constantes y a es el radio de Stokes.

Según este método se obtiene un valor de $30,1 \text{ \AA}$ para la glucoquinasa de hígado de perro (fig. 21b).

2. Cálculo del Volumen Parcial Específico (\bar{v})

La determinación del volumen parcial específico de la enzima se hizo sobre la base de la composición de aminoácidos de acuerdo al método de Cohn y Edsall (117) utilizando la ecuación:

$$2) \quad \bar{v} = \frac{\sum v_i w_i}{\sum w_i}$$

donde w_i y v_i son la fracción en peso y el volumen parcial específico de un residuo i de la proteína. Se obtuvo un valor de 0,729 para el volumen parcial específico de la glucocuinasa (ver tabla IV).

3. Cálculo del Radio Molecular

El radio molecular se calculó suponiendo que la enzima en solución se comporta como una esfera anhidra aplicando la ecuación:

$$3) \quad r_0 = \left[\frac{3 M_r}{4 \pi N} (\bar{v} + d_1 v_1^0) \right]^{1/3} \quad (118)$$

donde M_r es el peso molecular, \bar{v} es el volumen parcial específico en ml/g, N es el número de Avogadro, v_1^0 es el volumen parcial específico del agua y d_1 es la hidratación de la partícula en g de solvente/g de proteína. El

factor $d_1 v_1^0$ se hace igual a cero al considerar que la enzima es una esfera anhidra. De la ecuación se obtuvo un valor de 23,9 Å para el radio molecular, usando un peso molecular de 46.000 y un valor de \bar{v} de 0,729.

4. Cálculo de la Razón Friccional

El valor de la razón friccional (f/f_{\min}) se estimó de acuerdo a la ecuación:

$$4) \quad f/f_{\min} = f/f_0 \left(\frac{\bar{v} + d_1 v_1^0}{\bar{v}} \right)^{1/3} \quad (110)$$

$$5) \quad f/f_0 = a / \left(\frac{3 \bar{v} M}{4 N \pi} \right)^{1/3}$$

donde se consideró un valor de 29,7 Å para el radio de Stokes, un valor de \bar{v} de 0,729 y un peso molecular de 48.000.

Al suponer que la enzima es una partícula anhidra, el valor de $d_1 v_1^0$ se hace cero y f/f_{\min} es igual a f/f_0 de acuerdo a la ecuación 4. El valor de f/f_{\min} calculado sobre esta base es de 1,24 y corresponde a la determinación de la razón friccional para asimetría máxima. De acuerdo a esta estimación se obtiene un valor de relación

axial máxima de 4,7 (110) al considerar la molécula como un prolató anhidro.

Al suponer que la enzima es una partícula esférica, se puede calcular la hidratación máxima que resulta ser de 0,65 g de agua/g de proteína al usar el valor de 1,24 para f/f_{\min} .

Al suponer que la hidratación es de 0,2 g de agua/g de proteína, entre estos dos extremos de máxima hidratación y máxima asimetría, se obtiene un valor de f/f_{\min} de 1,14.

5. Cálculo del Coeficiente de Difusión ($D_{20,w}$)

El coeficiente de difusión se estimó mediante dos métodos:

- a) se graficó V_e/v_0 obtenido del experimento de filtración en geles con el cual se determinó el peso molecular y el radio de Stokes, como función del coeficiente de difusión de las proteínas de referencia utilizadas (fig.22) obteniéndose un valor de $74 \mu\text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$,
- b) se calculó directamente a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$6) \quad D_{20,w} = \frac{kT}{6\pi\eta a} \quad (119)$$

donde k es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad del agua a 20° . Se obtuvo un valor de $D_{20,w}$ de $72 \mu\text{m}^2 \times \text{s}^{-1}$.

Figura 18 Determinación del peso molecular de la glucoquinasa de hígado de perro por filtración en columna de Sephadex G-100.

La glucoquinasa pura, obtenida por el método que utiliza la cromatografía en DEAE-Sephadex (2 unidades en 0,5 ml) y las proteínas de referencias (2 mg en 0,5 ml) se colocaron sobre una columna de Sephadex G-100 (95 x 1 cm) equilibrada con fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, KCl 0,3 y 2-mercaptoetanol 5 mM y se eluyó con este solvente colectando fracciones de 1 ml con un flujo de 6,2 ml/hora. Las proteínas de referencia utilizadas fueron (con pesos moleculares en paréntesis): 1. Ribonucleasa (13.600), 2. Quimotripsinógeno (25.700), 3. Ovoalbúmina (43.000) y 4. Seroalbúmina de bovino (68.000).

Las curvas de calibración se grafican de acuerdo a Andrews (96).

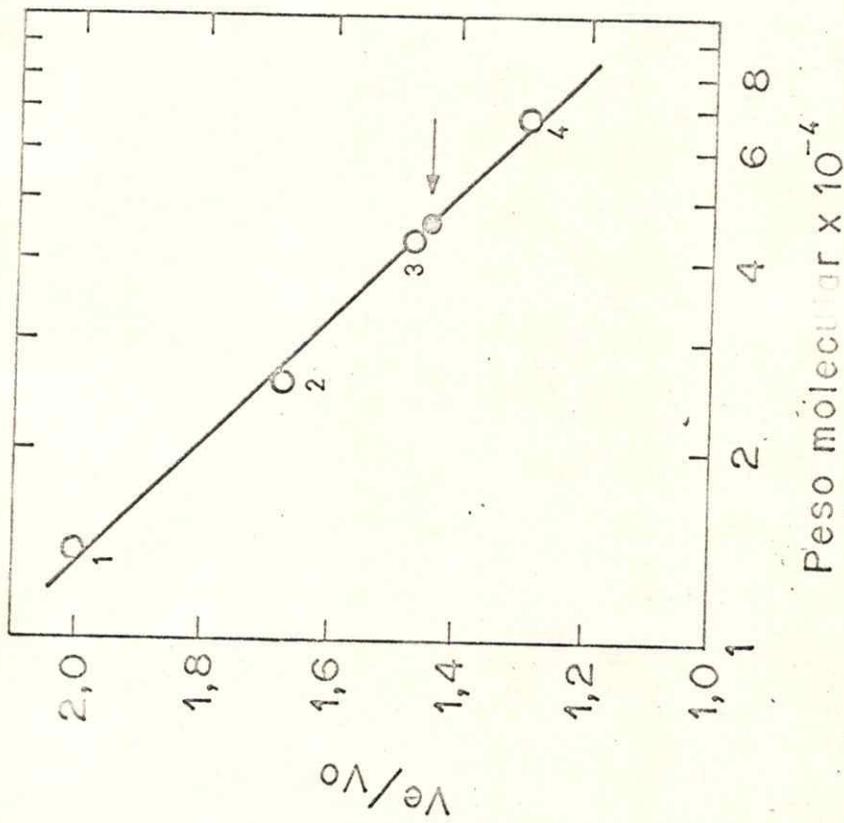


Figura 19 Determinación del peso molecular de la glucoquinasa de hígado de perro por filtración en capa fina de Sephadex G-100.

La glucoquinasa pura (40 ug), obtenida por el método que utiliza la cromatografía en DEAE-Sephadex, y las proteínas de referencia (40 ug) se colocaron en el extremo superior de la placa fina de Sephadex G-100 superfino (40 x 20 cm) equilibrada en KCl 0,3 M en la solución 1 y se hizo la cromatografía descendente con un ángulo de 20° durante 44 horas. Se usó azul dextrano como marcador de referencia. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie como se indica en METODOS. Las proteínas de referencia utilizadas fueron (con pesos moleculares en los paréntesis):

1. Citocromo c (12.500),
2. Mioglobina (17.200),
3. Quimotripsinógeno (25.700),
4. Ovoalbúmina (43.000)
5. Seroalbúmina de bovino (68.000).

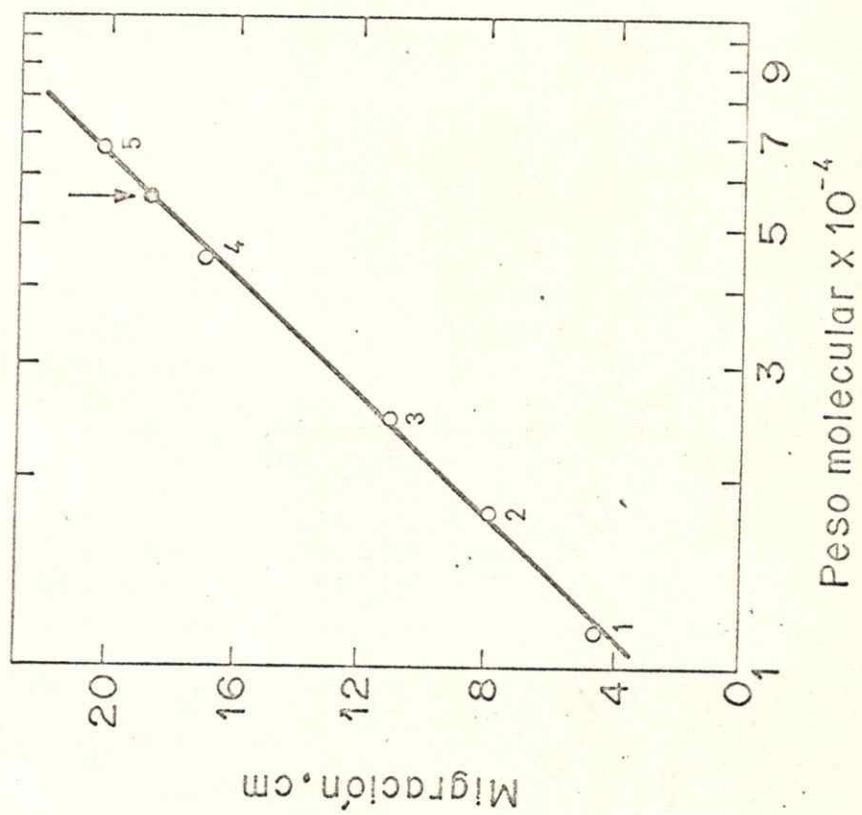


Figura 20 Determinación del peso molecular de la subunidad de la glucoquinasa mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 5 % en presencia de SDS al 0,1 %.

La glucoquinasa pura (80 ug) obtenida por el método que utiliza DEAE Sephadex en la última etapa de purificación y las proteínas de referencia (80 ug) fueron sometidas a electroforesis a pH 7,1 según se describe en METODOS. El gráfico semilogarítmico muestra el peso molecular de las cadenas polipeptídicas de las proteínas de referencia en función de su migración relativa al colorante de referencia. La flecha indica la movilidad relativa de la glucoquinasa (*). Las proteínas de referencia utilizadas fueron (con pesos moleculares en los paréntesis): 1. Quimotripsinógeno (25.700), 2. Pepsina (35.000), 3. Ovalbúmina, monómero (43.000), 4. Seroalbúmina de bovino, monómero (68.000), 5. Ovalbúmina, dímero (86.000), 6. Seroalbúmina de bovino, dímero (136.000).

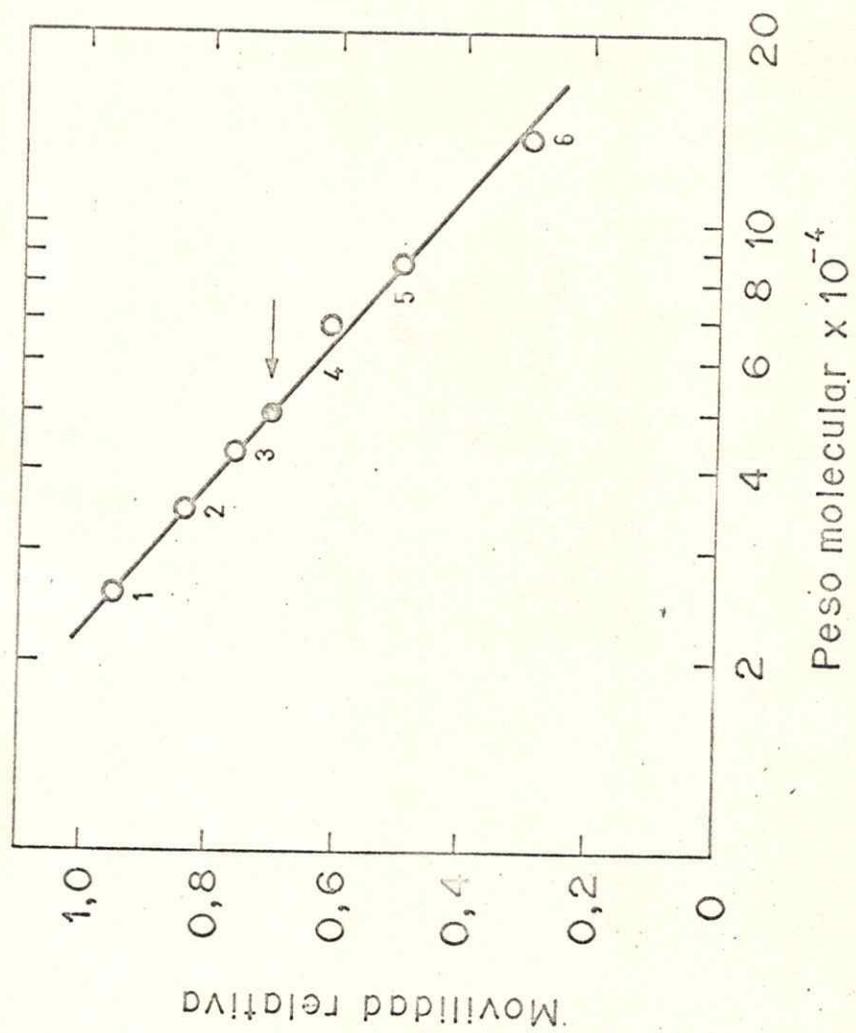
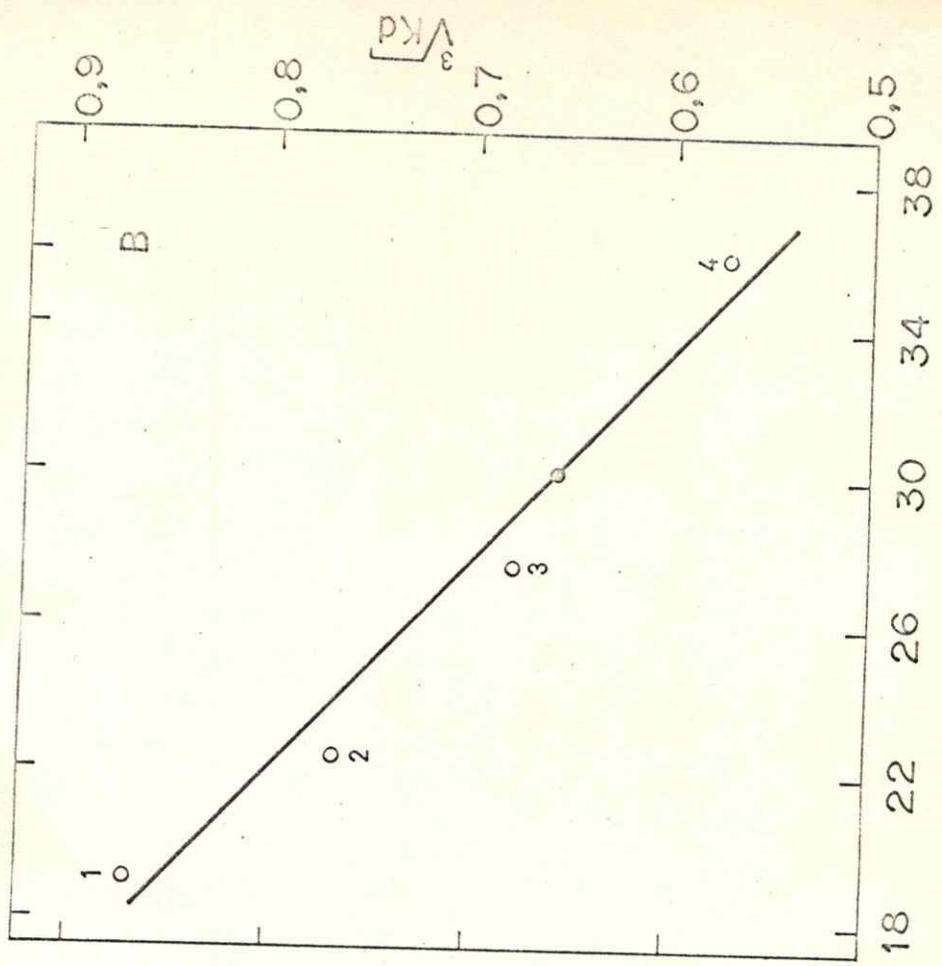
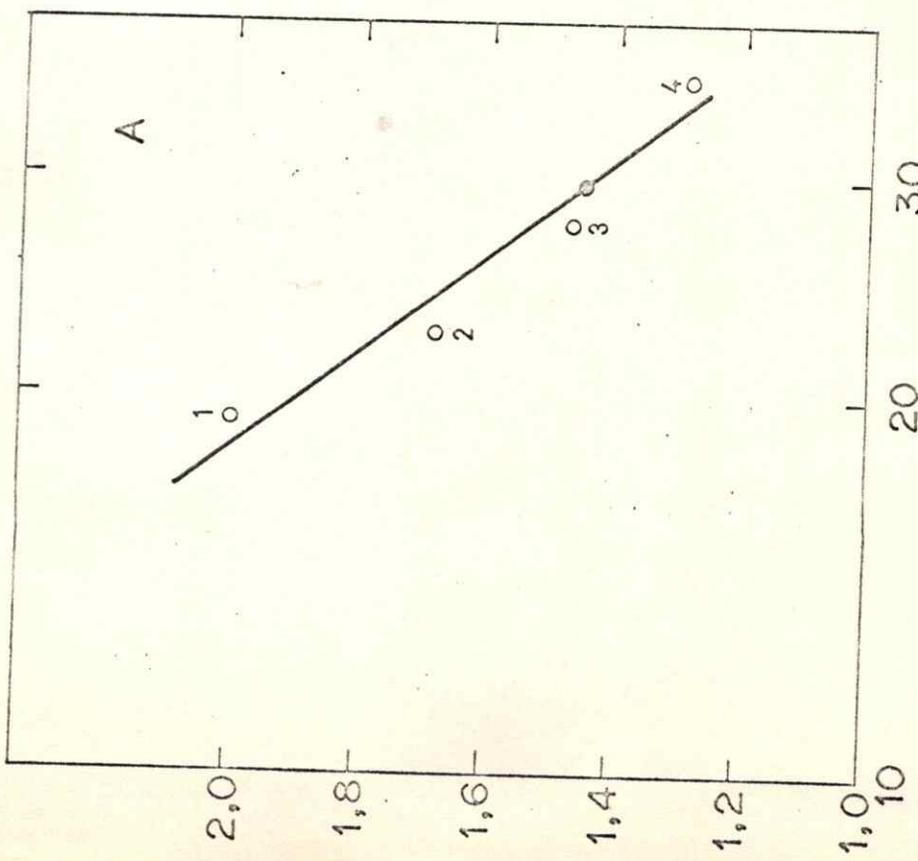


Figura 21 Determinación del radio de Stokes de la glucoquinasa por filtración en Sephadex G-100.

Las condiciones experimentales fueron como en la figura 18. Las proteínas de referencias utilizadas fueron (con radios de Stokes en Å, en los paréntesis): 1. Ribonucleasa (19,2), 2. Quimotripsinógeno (22,5), 3. Ovoalbúmina (27,6), 4. Seroalbúmina de bovino (36,1).

Las curvas de calibración se graficaron de acuerdo con Andrews (97) en la figura A y a Porath (116) en la figura B. Los valores de K_d se calculan mediante la ecuación:

$$K_d = V_e - V_o/V_i - V_o$$

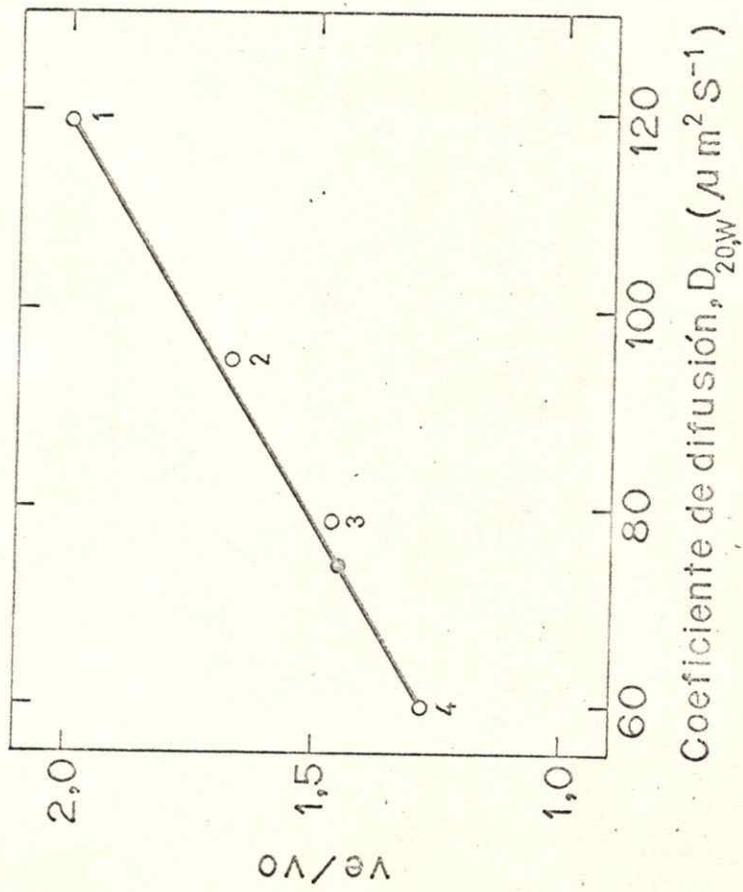


radio de Stokes (A°)

Figura 22 Determinación de coeficiente de difusión de la glucosa de hígado de perro por filtración en Sephadex G-100.

Las condiciones experimentales fueron como en la figura 18.

Las proteínas de referencia usadas (con coeficientes de difusión $D_{20,w}$ en los paréntesis) fueron (0): 1. Ribonucleasa ($119 \text{ } \mu\text{m}^2 \text{ x s}^{-1}$), 2. Quimotripsinógeno ($95 \text{ } \mu\text{m}^2 \text{ x s}^{-1}$), 3. Ovealbúmina ($77,8 \text{ } \mu\text{m}^2 \text{ x s}^{-1}$), 4. Seroalbúmina ($60 \text{ } \mu\text{m}^2 \text{ x s}^{-1}$). Los valores experimentales de V_e/V_o se graficaron en función de $D_{20,w}$.



D. PUNTO ISOELECTRICO DE LA GLUCOQUINASA

El punto isoelectrico de la glucoquinasa se determinó mediante electroenfoque en geles de poliacrilamida en presencia de una solución al 1 % de Ampholine^R con un rango de pH de 3 - 10 unidades de pH. En la figura 23 se muestra la gradiente de pH y la posición de la banda correspondiente a la glucoquinasa. De acuerdo con este método se determinó un punto isoelectrico de 5,1 para la glucoquinasa de hígado de perro.

Los resultados de las características fisicoquímicas de la glucoquinasa se resumen en la tabla IV.

E. ESTUDIOS ESPECTRALES

1. Espectro Ultravioleta-visible

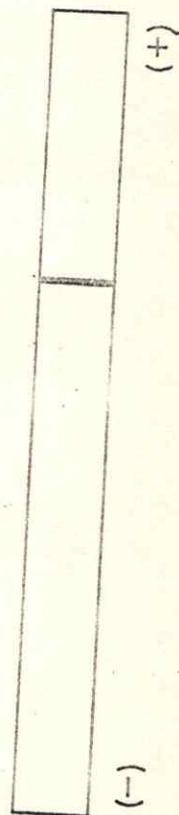
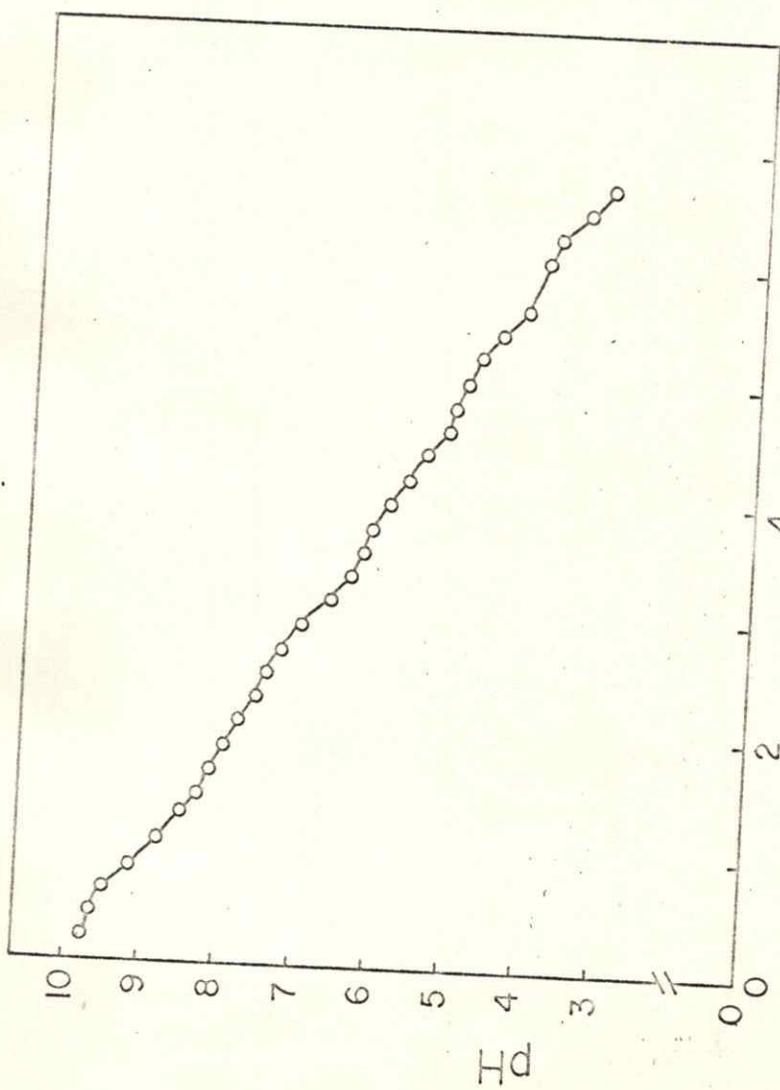
La glucoquinasa de hígado de perro no adsorbe la luz en el rango entre 350 y 800 nm cuando se encuentra nativa o desnaturalada. El espectro ultravioleta se muestra en la figura 24. Se presenta un máximo a 278 nm y un mínimo a 255 nm.

El espectro ultravioleta realizado en presencia de HCl 0,1 N presenta un corrimiento hacia el violeta con un máximo de absorción de 275 nm y un mínimo de 254 nm (fig. 25).

Figura 23 Electroforesis de la glucoquinasa en geles de poliacrilamida.

La electroforesis de la glucoquinasa (100 ug) se realizó según se describe en METODOS (I).

En la figura se muestra la gradiente de pH y abajo un dibujo del gel después de la electroforesis.



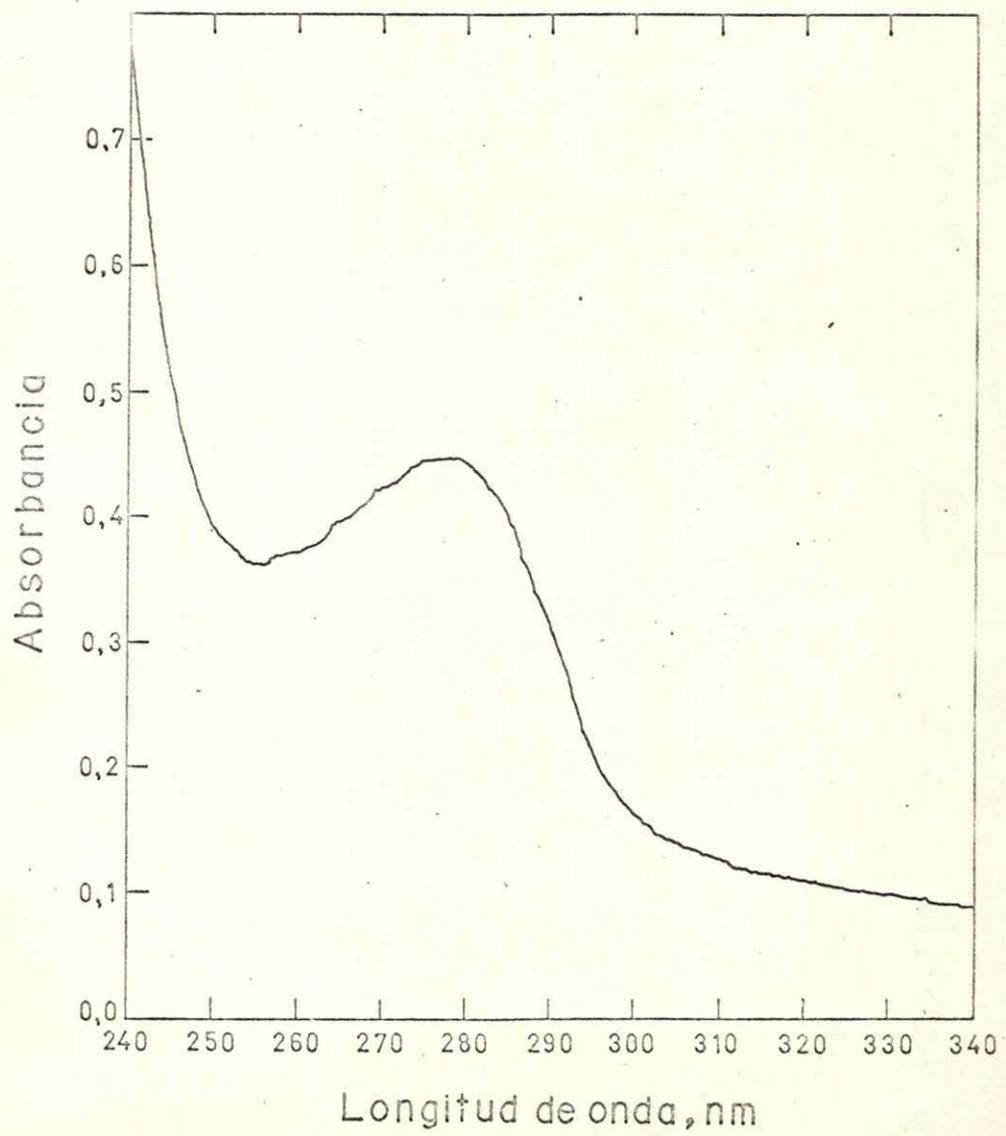
T A B L A IV

RESUMEN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA GLUCOQUINASA DE
HIGADO DE PERRO

Propiedad	Método	Valor
Radio molecular (r_0)	Análisis de aminoácidos y filtración en Sephadex G-100 (118)	23,9 Å
Radio de Stokes (a)	Filtración en Sephadex G-100 (116)	29,7 Å
	Filtración en Sephadex G-100 (97)	30,1 Å
Coeficiente Difusión ($D_{20,w}$)	Filtración en Sephadex G-100 (método gráfico)	74,0 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
	Stokes - Einstein	72,1 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
Razón friccional (f/f_0)	Hidratación despreciable (f/f_{min})	1,24
	Hidratación de 0,2 g $\text{H}_2\text{O/g}$ proteína	1,14
Relación axial máxima (a/b)		4,7
Grado hidratación máxima (d_1)		0,65 g $\text{H}_2\text{O/g}$ proteína
Volumen parcial específico aparente (\bar{v})		0,729
Punto isoelectrico	Electroenfocue en geles de poliacrilamida	5,1
Peso molecular	Filtración en columna Sephadex	47.000
	Filtración en capa delgada Sephadex G-100	55.000
	Electroferesis en geles de poliacrilamida, SDS 0,1 %	49.000

Figura 24 Espectro ultravioleta de la glucoquinasa nativa.

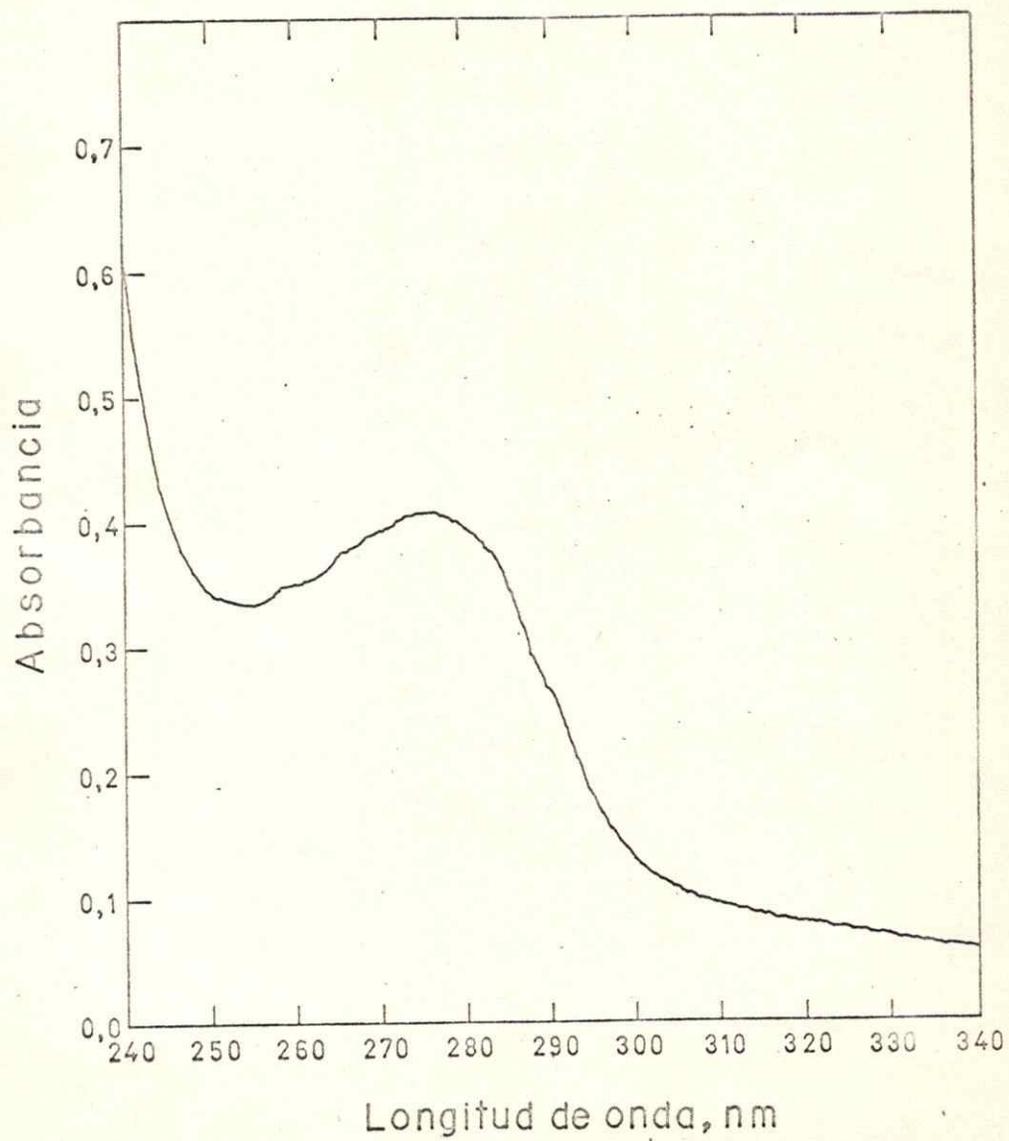
El espectro ultravioleta de la glucoquinasa en solución de fosfato de potasio 2 mM, pH 7,0 se hizo en un Cary 18 utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm a la temperatura ambiente. La concentración de proteínas fue de 0,35 mg/ml.



4.50
130

Figura 25 Espectro ultravioleta de la glucoquinasa de hígado de perro en HCl 0,1 N.

El espectro ultravioleta de la glucoquinasa en solución de fosfato de potasio 2 mM y HCl 0,1 N se hizo en un Cary 18 utilizando cubetas de 1 cm. La concentración de proteínas fue de 0,318 mg/ml.



2. Coefficiente de Extinción de la Glucoquinasa

El coeficiente de extinción a 280 nm era de 1,25 para una solución al 0,1 % de glucoquinasa en fosfato de potasio 2 mM pH 7,0. La concentración de proteínas para calcular este coeficiente se determinó por el método de Webster que consiste en medir la absorbancia a 210 nm donde el valor de $A_{210}^{0,1\%} = 29$ para la gran mayoría de las proteínas.

3. Contenido de Tirosinas

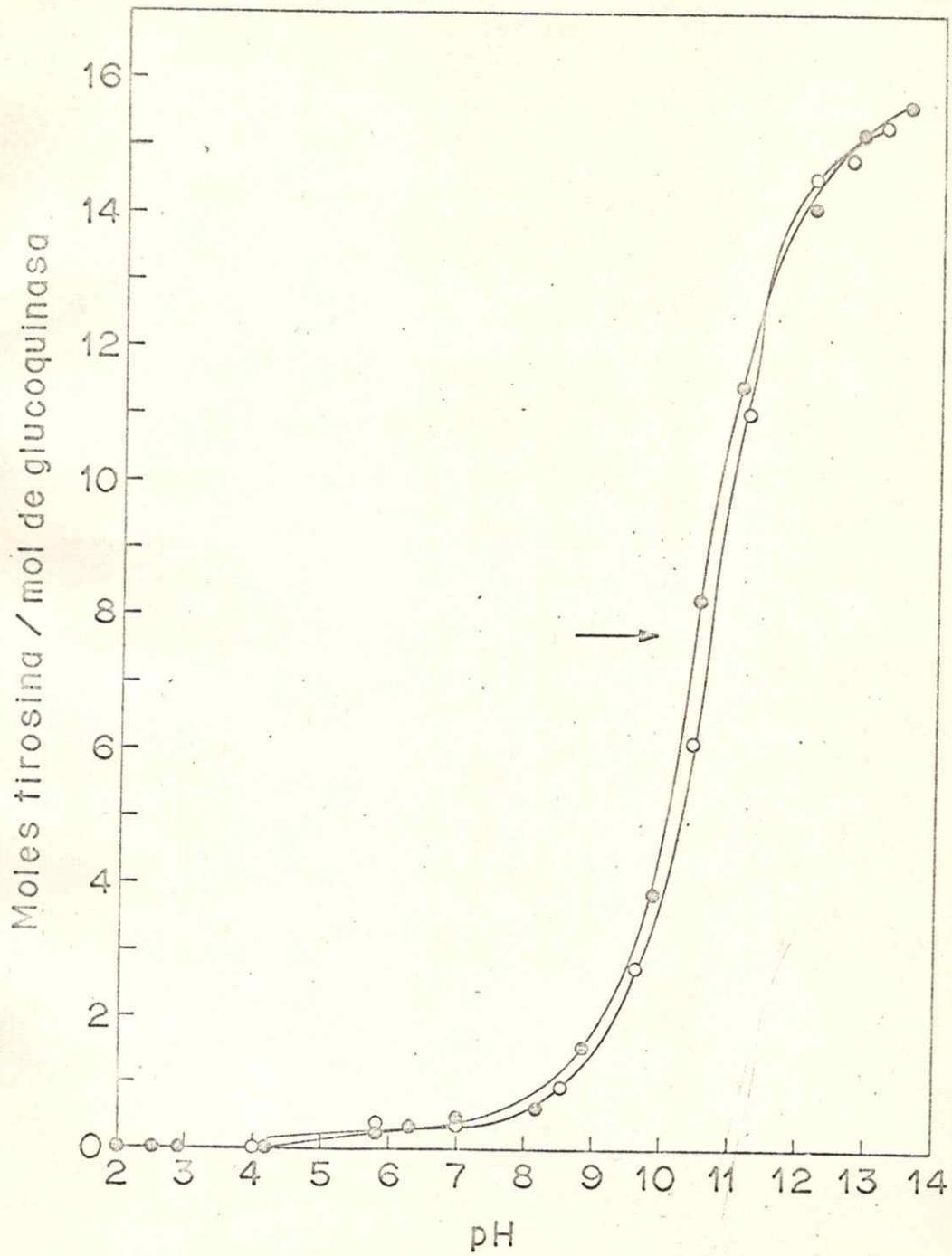
El contenido de tirosinas se determinó por titulación espectrofotométrica a 243 nm en presencia y ausencia de urea en un rango de 2 - 13,5 unidades de pH. Se obtuvo una curva de titulación muy similar en presencia y ausencia de urea 8 M, con valores de pK de 10,4 y 10,5 respectivamente (fig. 26). Se obtuvo un valor de 15,4 moles de tirosina/mol de enzima al utilizar el valor de $11.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el coeficiente de extinción molar de la tirosina (120).

4. Contenido de Triptofano

El contenido de triptofano se obtuvo por el método de Bencze y Schmid (98) al hacer el espectro ultravioleta de la enzima en presencia de NaOH 0,1 N, obteniéndose un valor de 6,6 moles de triptofano por mol de enzima. Este valor se estimó sobre la base de 15,4 residuos de tirosina. En medio alcalino la glucoquinasa presenta una

Figura 26 Titulación espectrofotométrica de las tirosinas de la glucoquinasa a 243 nm.

La glucoquinasa ($1,42 \times 10^{-6}$ M) obtenida por el método que utiliza Sepharosa-glucosamina, en fosfato de potasio 2 mM se tituló en presencia de urea 8 M (●) y en ausencia de urea 8 M (○). Se utilizó un coeficiente de absorción molar para la tirosina de 11.000.



T A B L A V

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE GLUCOQUINASA DE HIGADO DE PERRO

BASADA EN UN PESO MOLECULAR DE 48.000

Aminoácidos	Residuos por mol ^a	Residuos por mol (valores redondeados)
Lisina	13,5 ± 1,2	14
Histidina	5,1 ± 0,1	5
Arginina	16,4 ± 1,1	16
Acido cisteico	0,8 ± 1,5	9
Aspártico	44,5 ± 0,9	45
Treonina	18,3 ± 1,3	18
Serina	22,5 ± 2,1	23
Glutámico	54,3 ± 2,0	54
Prolina	7,2 ± 0,1	7
Glicina	40,0 ± 0,6	40
Alanina	26,5 ± 0,7	27
Valina	27,2 ± 2,2	27
Metionina	8,8 ± 1,6	9
Isoleucina	25,3 ± 2,0	26
Leucina	32,1 ± 1,1	32
Tirosina	15,2 ± 0,2	15
Fenilalanina	23,5 ± 1,4	24
Triptofano ^b	6,6	7

a Valores promedio de 3 análisis obtenidos después de 24 horas de hidrólisis.

b Determinado por espectrofotometría (98).

relación entre tirosina y triptofano de 2,34 un máximo a 282 nm y otro a 290 nm, no bien diferenciados entre ellos.

F. COMPOSICION DE AMINOACIDOS

La composición de aminoácidos de la glucoquinasa de hígado de perro se muestra en la tabla V, en la cual se indica también la proporción relativa de cada uno de los residuos. Se desprende de este estudio el carácter ácido de la enzima que tiene un alto contenido de aminoácidos como glutámico y aspártico en relación a un menor contenido de lisinas y argininas. Los aminoácidos ácidos corresponden a un 24,9 % del total de residuos de la proteína. Esta determinación está de acuerdo con la naturaleza ácida de la enzima demostrada por la gran retención en columna de DEAE celulosa (eluye con 0,25 M de KCl en la solución 1) y por el valor de 5,1 para el punto isoelectrico. La alta proporción de aminoácidos aromáticos explicaría un valor de 1,25 para el $A_{1\text{ cm}}^{0,1\%}$, el cual es superior al de muchas proteínas estudiadas.

La determinación de triptofano permitió obtener un valor de 6,6 moles de triptofano por mol de enzima como se indicó más arriba y la determinación espectrofotométrica de tirosinas permitió obtener un valor de 15,4 lo cual está de acuerdo con la estimación de 15 residuos por molécula de enzima del análisis de aminoácidos.

El valor de 3,8 moles/mol de enzima de medias cistinas obtenido en el análisis de aminoácidos está de acuerdo con las determinaciones

de 8,6 y 8,4 moles de residuos con grupo sulfhidrilo por mol de enzima por titulación con p-cloromercuribenzoato en presencia y ausencia de urea.

6. Determinación de Grupos Sulfhidrilos

La glucoquinasa tiene 9 residuos de medias cistinas como se deduce del análisis de aminoácidos. Los grupos sulfhidrilos de la enzima se titularon con p-cloromercuribenzoato de acuerdo al método de Boyer (102) en presencia y ausencia de urea 3 M en el medio de reacción como se describe en METODOS.

En la figura 27 se muestra la titulación de 8,4 grupos sulfhidrilos de la glucoquinasa nativa en Tris-HCl pH 7,0 KCl 50 mM y glucosa 100 mM, con pequeños incrementos de PCMB, encontrándose que la disminución de la actividad corresponde con el número de grupos SH titulados, lográndose la inactivación total cuando se han titulado todos los grupos sulfhidrilos. Cuando la enzima se ha inactivado totalmente, la adición de Ditiotreitól hasta una concentración de 10 mM en el medio de reacción produce una recuperación de un 100 % de la actividad inicial, lo que prueba la reversibilidad de la inactivación. Estos resultados entregan una primera información acerca de la importancia de los grupos sulfhidrilos en la actividad catalítica de la enzima.

En este experimento de titulación de los grupos sulfhidrilos de la enzima nativa se encontró que después de cada adición de una alícuota de p-cloromercuribenzoato la absorbancia a 250 nm variaba

Figura 27 Influencia de la modificación de los grupos SH en la actividad de la glucoquinasa.

Se determinó el grado de modificación de los grupos SH de la enzima nativa y su influencia en la actividad enzimática por adición de alícuotas de PCMB. Se agregaron alícuotas de 5 μ l de solución fresca de PCMB ($3,6 \times 10^{-4}$) a 1,0 ml de solución de glucoquinasa ($2,2 \times 10^{-6}$ M) en Tris 50 mM, pH 7,0 KCl 100 mM y glucosa 100 mM. Se midió el cambio de absorbancia a 250 nm y se calculó la magnitud de la asociación entre PCMB y la enzima. A partir de estos datos se calcularon las magnitudes porcentuales de asociación (% de inhibición) (0). Además se midió de inmediato la actividad enzimática en alícuotas de 5 μ l del medio de reacción y se expresaron (a) como porcentaje de la actividad en ausencia de PCMB.

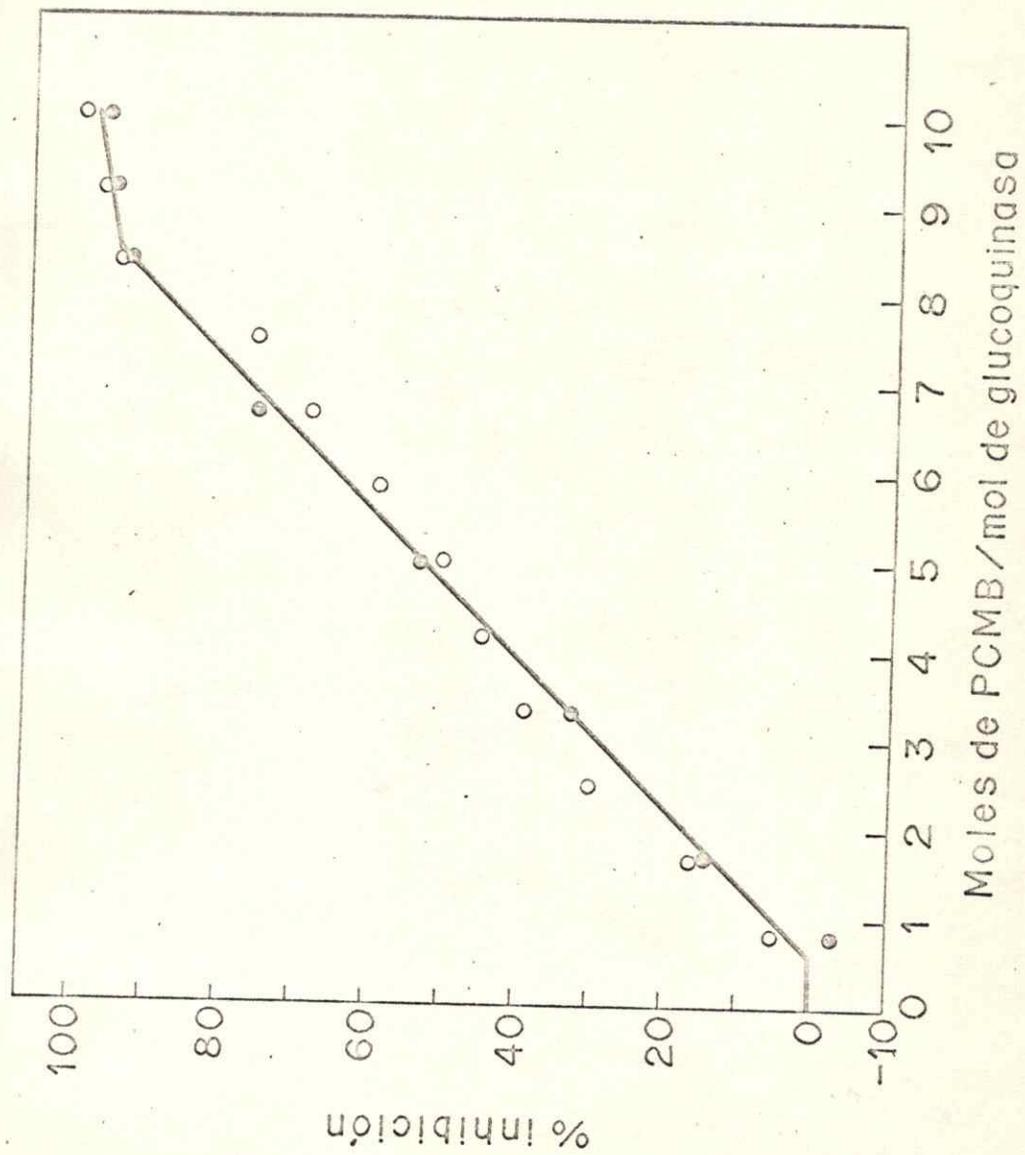


Figura 28 Cinética de modificación de los grupos sulfhidrilos con PCMB.

Se agregó 0,072 μ moles de PCMB a 0,0028 μ moles de glucocuinasa (3 μ moles de PCMB por μ mol de grupo sulfhidrilo de la enzima) en un volumen final de 1,0 ml de Tris 50 mM, pH 7,0 y KCl 100 mM.

Se midieron los cambios de absorbancia a 250 nm en los tiempos indicados. (SH) representa el número máximo de grupos sulfhidrilos modificados por moléculas de enzima.

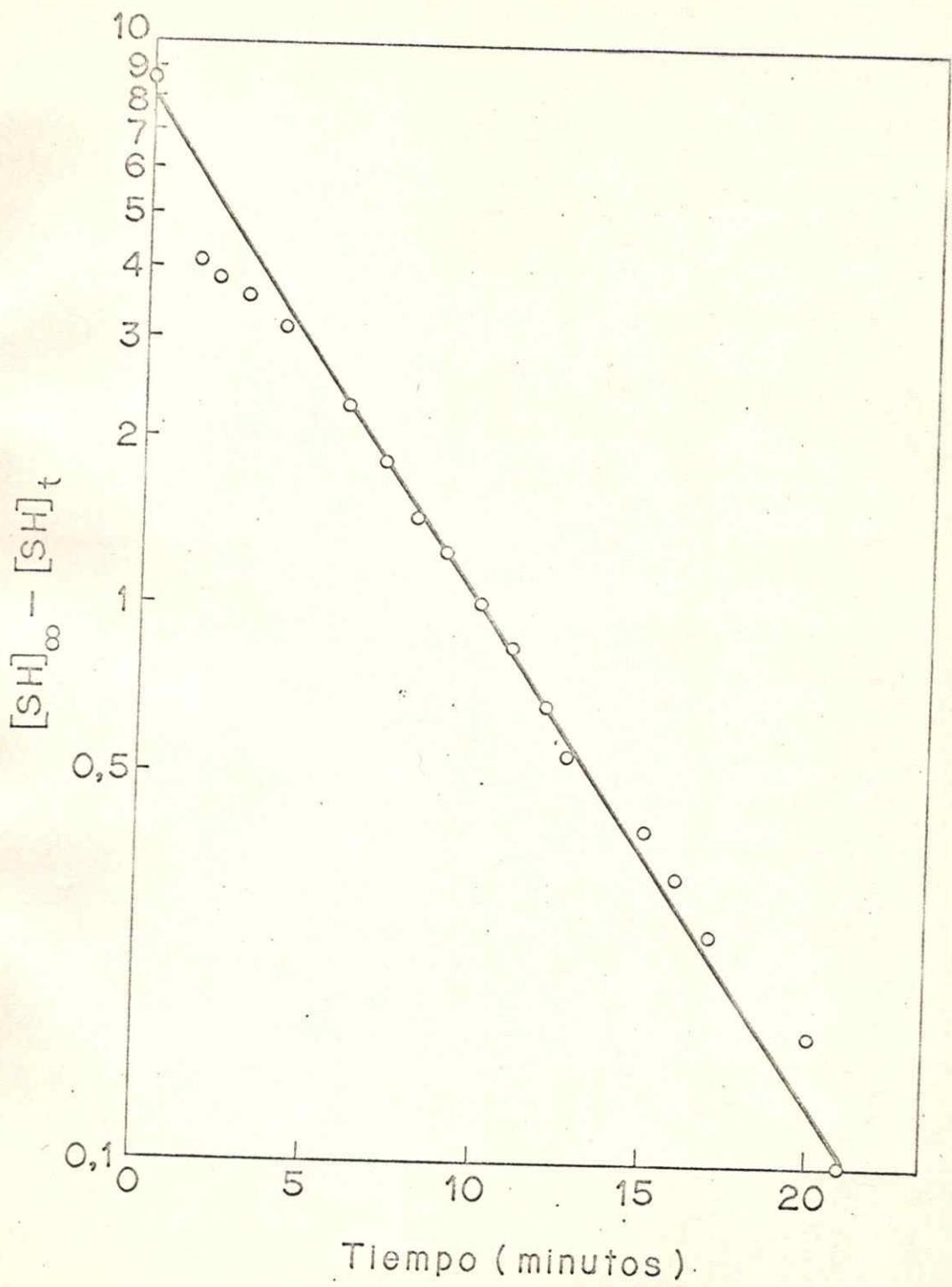
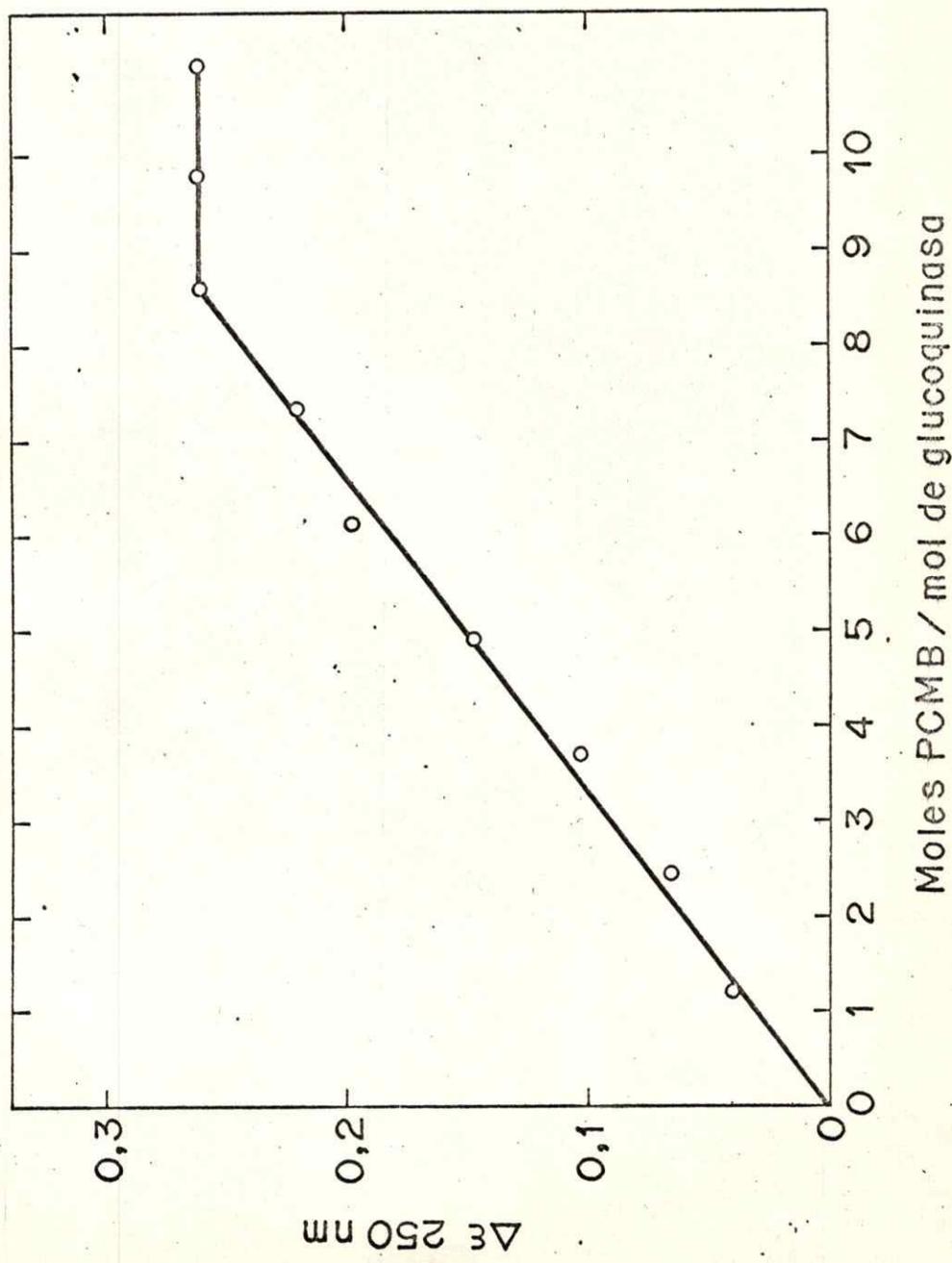


Figura 29 Modificación de los grupos sulfhidrúlicos de la glucocuinasa con PCMB en presencia de urea 8 M.

La glucocuinasa (4×10^{-6} M) en 1 ml de Tris 50 mM, pH 7,0 y urea 8 M se tituló por adición de alícuotas de 15 μ l de PCMB ($3,3 \times 10^{-4}$ M).

Se midió el cambio de absorbancia a 250 nm 15 minutos después de cada adición de PCMB.



durante un tiempo no mayor que 15 minutos para luego estabilizarse en el tiempo. La rapidez de la reacción hizo necesario estudiar la cinética de la titulación de los grupos sulfhidrilos, encontrándose que luego de la adición de 3,0 μ moles de PCMB/ μ mol de grupo sulfhidrilo de la enzima, la reacción ocurre con un período de semidecaimiento de 3 minutos (fig. 28). Este resultado sugiere que los grupos sulfhidrilos están expuestos o que el desplegamiento de la proteína por la titulación de los primeros grupos sulfhidrilos favorece la exposición de aquellos previamente más innaccesibles.

En la titulación con PCMB de la enzima desnaturada en presencia de urea 8 M (fig. 29) se hacen reaccionar 3,6 grupos sulfhidrilos por molécula de enzima, lo cual está de acuerdo con el valor determinado para la titulación de la enzima nativa.

H. MAPA PEPTIDICO

El mapa peptídico se realizó con el objeto de conocer la estructura cuaternaria de la glucoquinasa. Además se hizo este experimento para aportar una información al estudio filogenético de las isoenzimas fosforilantes de glucosa sobre la base de la similitud de los mapas peptídicos que se hagan con estas isoenzimas.

Se hicieron dos mapas peptídicos de la glucoquinasa. Uno de ellos se hizo aplicando un digerido triptico de 1,2 mg de enzimas, obtenido por 30 horas de incubación a 25°, sobre una lámina de papel Whatman para la posterior cromatografía y electroforesis. La

cromatografía en la primera dirección se hizo en una mezcla de butanol, piridina, ácido acético y agua en una relación de 15:10:3:12 y la electroforesis en la segunda dirección en una solución de piridina-acetato de pH 3,4 (fig. 30).

El segundo mapa peptídico se hizo aplicando un digerido tróptico de 0,8 mg de enzima, obtenido por 16 horas de incubación a 25°, sobre una lámina de papel Whatman. La cromatografía en la primera dirección se hizo en una solución de n-butanol, ácido acético y agua en una relación de 4:1:5 y la electroforesis en la segunda dirección en una solución de piridina-acetato de pH 3,5.

Como se muestra en la figura 30, el mapa peptídico del digerido tróptico de la glucoquinasa revela la presencia de 30 manchas, lo cual está de acuerdo con el valor de 31 péptidos esperados de acuerdo al número de argininas y lisinas obtenido de la composición de aminoácidos.

I. HIDROLISIS QUÍMICA CON CNBr

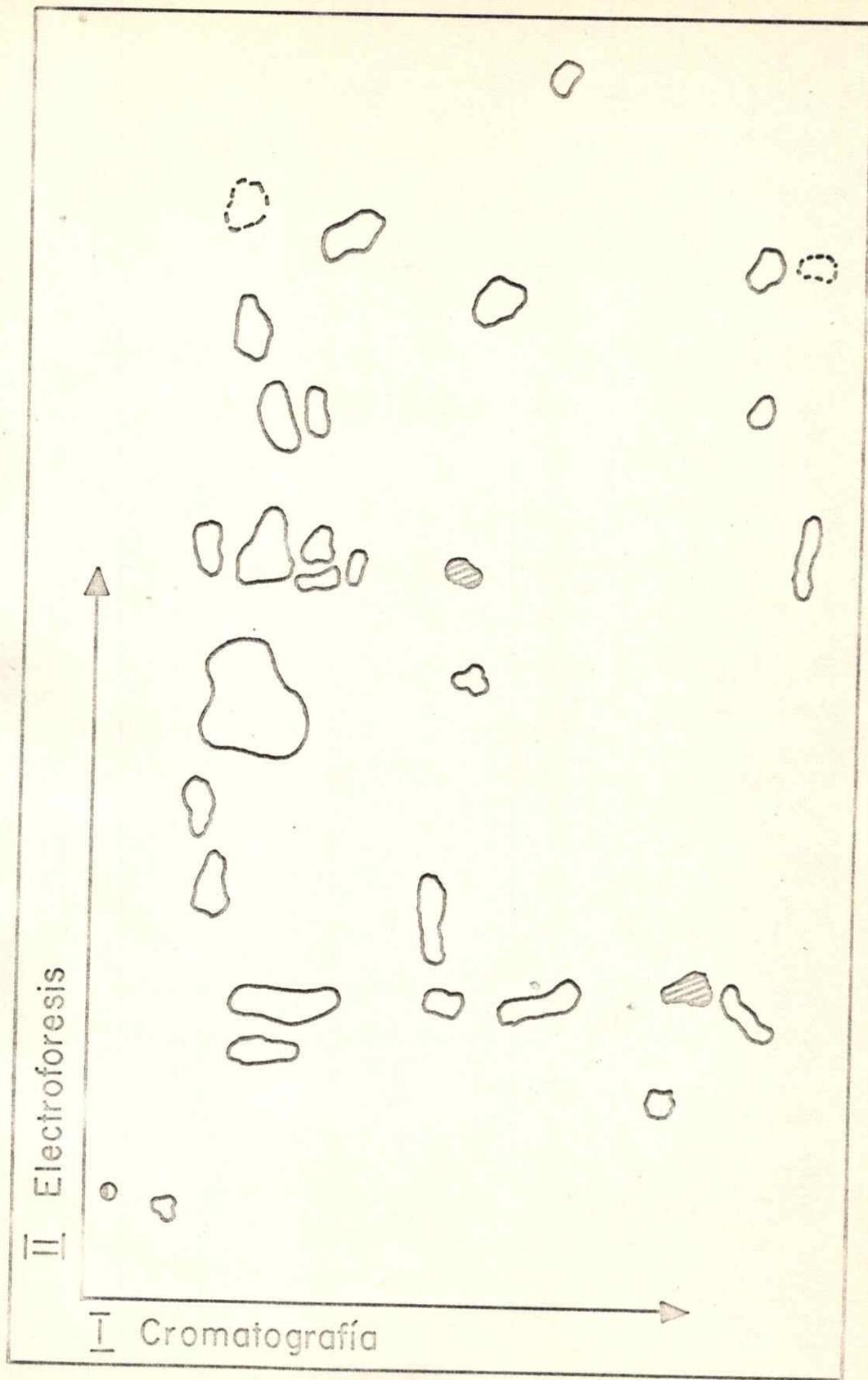
Los estudios de hidrólisis química en las condiciones indicadas en METODOS Y MATERIALES demuestran que este reactivo es capaz de hidrolizar la proteína en presencia de ácido fórmico al 70 % y luego de una hidrólisis de 48 horas a 20°.

Se obtiene mediante titulación por el método de la ninhidrina que la hidrólisis ha producido un total de 9 grupos amino libre por molécula de enzima, estimación que aunque no indica directamente el

Figura 30 Mapa peptídico bidimensional de un digerido triptico de glucoquinasa (copia del original).

La glucoquinasa obtenida por el método que utiliza la Sepharosa-glucosamina (1,2 mg), en fosfato de potasio 2 mM, se desnaturalizó por calentamiento en baño de agua hirviente (15 minutos) y se incubó con un total de 0,03 mg de tripsina a 25° durante 30 horas manteniendo el pH en 8,5. La cromatografía del digerido triptico (primera dirección) se hizo en butanol, ácido acético, piridina y agua en una relación de 15:3:10:12 y la electroforesis (segunda dirección) se hizo en piridina, ácido acético y agua (1:11:288) pH 3,4 aplicando un voltaje de 2000 volts durante 90 minutos. Se utilizó papel Whatman 3 MM como soporte cromatográfico.

Los péptidos se detectaron por tinción con una solución alcohólica de ninhidrina al 0,05 %.



número de péptidos formados constituye una medida de la hidrólisis a nivel de los residuos de metionina. Si la hidrólisis química no ha sido completa cabría esperar un mayor número de péptidos y así el valor obtenido es superior al esperado si la glucoquinasa estuviese formada por dos o más subunidades idénticas.

El valor obtenido es menor que el que debería esperarse de acuerdo con el número de metioninas según el análisis de aminoácidos (10 péptidos) y una información más completa se podría obtener al realizar un estudio cinético de esta reacción, y analizando además el número de péptidos obtenidos mediante una técnica más directa como el mapa peptídico. Sin embargo, un estudio del mapa peptídico de los péptidos de esta hidrólisis demanda la necesidad de encontrar condiciones muy precisas debido a la poca migración que tendrían los péptidos formados por el gran tamaño y la pequeña carga neta a valores de pH entre 3,5 y 6,0.

Los intentos para identificar los péptidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de urea no han dado buenos resultados debido a la escasa migración y la poca separación entre ellos cuando la electroforesis se hacía según la técnica de Chalkley o mediante una modificación de la técnica de Davis, con urea 6,2 M (ver METODOS).

J. ESTUDIOS EN RELACION CON LA ACTIVIDAD CATALITICA

1. Especificidad de Sustrato

Los resultados acerca de la velocidad relativa de fosforilación de varios sacáridos por la glucoquinasa pura se muestran en la tabla VI. Para determinar estos valores se midió la actividad enzimática de concentraciones de 0,1 M del sacárido mediante el Método II de ensayo enzimático. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados en rata (121), observándose una mayor velocidad de fosforilación para manosa y glucosa en relación a fructosa y desoxiglucosa. No se fosforilan las pentosas, la galactosa y la glucosamina, pero este último derivado y la N-acetilglucosamina actúan como inhibidores competitivos. Estos resultados concuerdan con los de Parry y Walker para la enzima de rata (15).

2. Determinación de $K_{0,5}$, V_m y Coeficiente de Hill

Estas determinaciones se hicieron con muestras obtenidas de las preparaciones purificadas por el método que utiliza la cromatografía en DEAE-Sephadex y el que emplea Sepharosa-glucosamina.

Las curvas de la velocidad enzimática en función de las concentraciones de glucosa y manosa se muestran en las figuras 31 y 32. En los gráficos de Hill se muestra que los valores experimentales del coeficiente de Hill (n_H) para glucosa y manosa (1,5 y 1,4 respectivamente) son mayores que el valor de $n_H = 1$ de las curvas teóricas

T A B L A VI

VELOCIDAD RELATIVA DE FOSFORILACION DE VARIOS SACARIDOS
O DERIVADOS POR GLUCOQUINASA*

Monosacárido	V sacarido / V glucosa
α - D - (+) - GLUCOSA	1,00
D - (+) - MANOSA	0,60
D - (-) - FRUCTOSA	0,33
2 - Desoxi- GLUCOSA	0,31
D- (+) - GLUCOSAMINA	0,00
D - (+) - GALACTOSA	0,00
α - METIL - D - GLUCOSIDO	0,00
D - (-) - RIBOSA	0,00
D - (-) - ARABINOSA	0,00
D - (-) - XILOSA	0,00

* Concentración de sustratos: 100 mM.

Figura 31 Actividad de la glucoquinasa de hígado de perro en función de la concentración de glucosa.

En este experimento se utilizó una muestra de la glucoquinasa pura obtenida por el método de la cromatografía en DEAE-Sephadex. La enzima se llevó a un medio que tenía fosfato 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, 2-mercapetanol 5 mM y KCl 100 mM, eliminando la glucosa mediante una cromatografía en Sephadex G-25. Se midió la actividad por el Método I a diferentes concentraciones de glucosa usando 50 μ l de la enzima convenientemente diluida. La figura que se inserta corresponde a una gráfica de Hill, del cual se obtuvo un valor de n_H de 1,5 y $K_{0,5}$ de 4 mM (O—O). Se muestra también la línea calculada para una función teórica de tipo hiperbólico con el mismo $K_{0,5}$ (---).

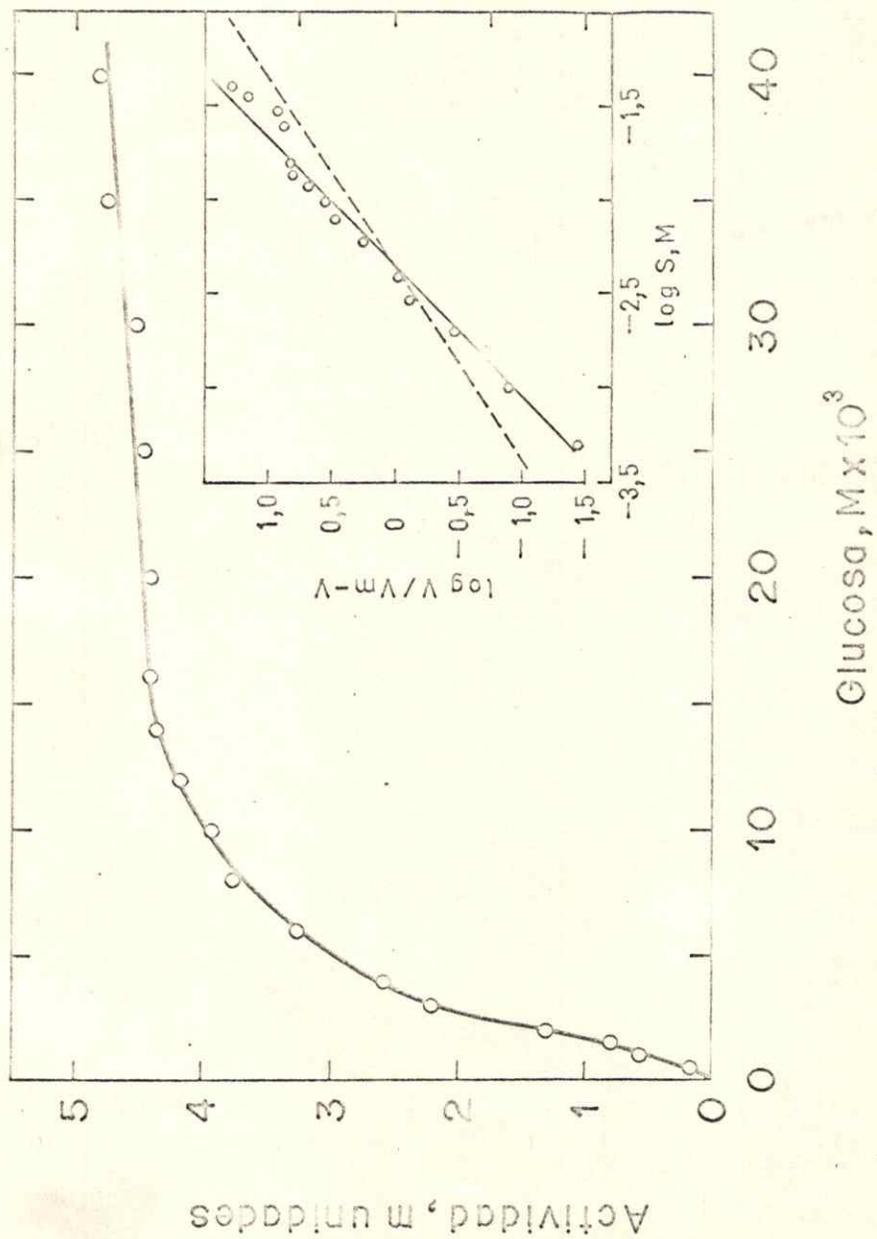
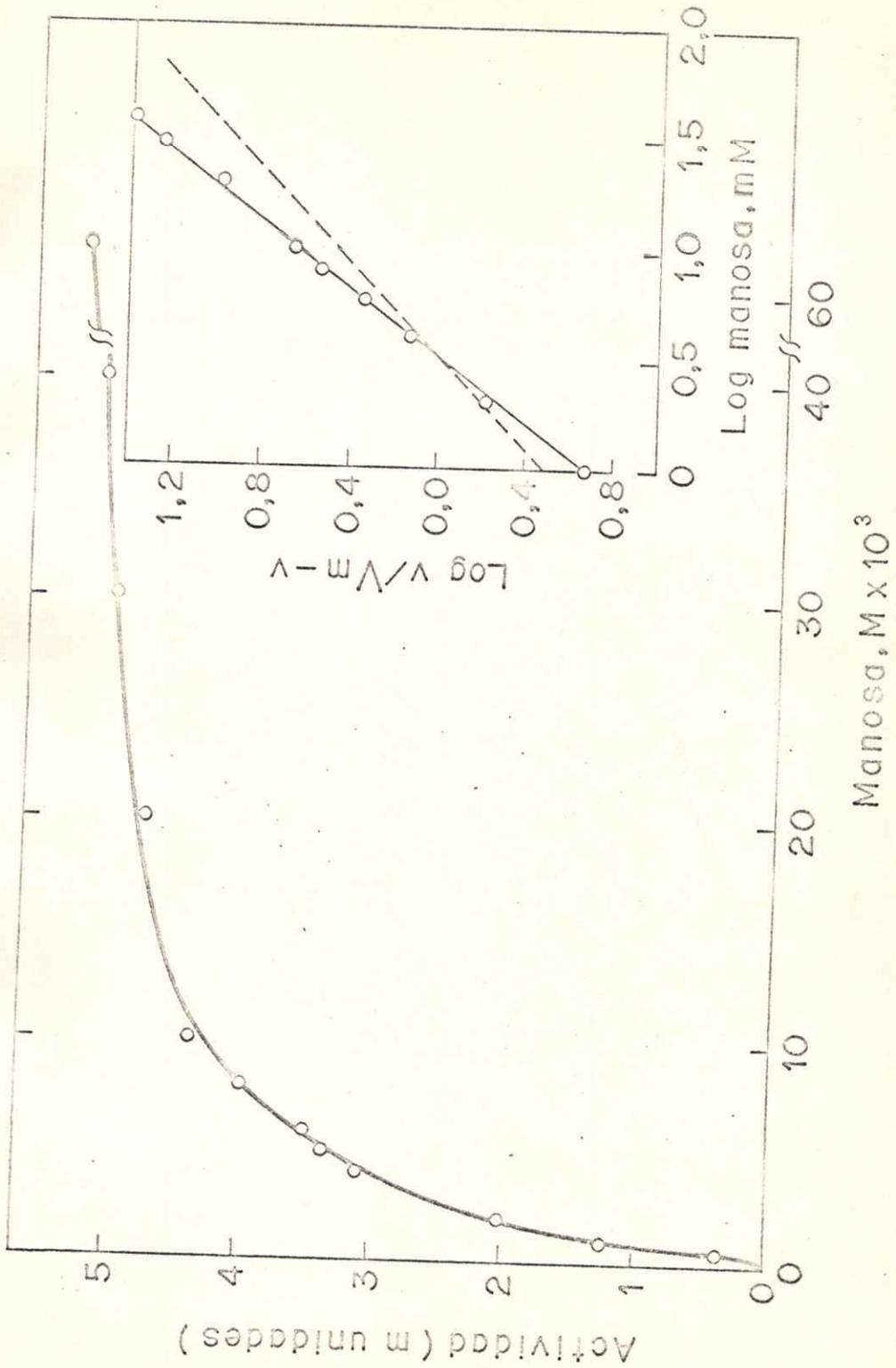


Figura 32 Actividad de la glucoquinasa en función de la concentración de manosa.

En este experimento se utilizó una muestra de la glucoquinasa pura obtenida por el método de la cromatografía en DEAE-Sephadex. La enzima se llevó a un medio que contenía fosfato 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM y KCl 100 mM mediante cromatografía en Sephadex G-25. Se midió la actividad glucoquinásica por el Método III a diferentes concentraciones de Manosa usando 50 μ l de la enzima convenientemente diluida. La figura que se inserta corresponde a una gráfica de Hill, de la cual se obtuvo un valor de n_H de 1,4 y un $K_{0,5}$ de 3,5 mM.



calculadas para una función de saturación hiperbólica con las mismas $K_{0,5}$. Los gráficos de Hill y los gráficos de dobles recíprocos no lineales hacen más notable el carácter sigmoidal de esta cinética.

En la tabla VII se comparan los valores de los parámetros cinéticos entre la enzima de perro y la de rata. Los valores de n_H de la enzima de ambas especies son muy similares en tanto que los de $K_{0,5}$ de la enzima de perro son menores que los de la rata. Los valores de $K_{0,5}$ para la glucosa de la enzima de perro se obtuvieron a partir del gráfico de Hill (fig. 31), el cual se construyó sobre la base de la velocidad máxima experimental determinada a la concentración 0,1 M de glucosa. Del mismo modo se procedió para obtener $K_{0,5}$ para manosa (fig. 32). Se determinó que la V_m obtenida experimentalmente no difería de la obtenida al graficar $1/v$ en función de $1/S^{n_H}$ cuando el valor de n_H no variaba al estimarse a partir de V_m cercanas al valor experimental.

Es conveniente hacer notar que los valores de $K_{0,5}$ para glucosa de las enzimas de rata y perro son inferiores a los valores de 11,8 mM obtenido por Grossman et al (70) y de 18 mM obtenido por González et al (9) al suponer una cinética de tiro michaelino para la glucoquinasa.

No se estudió si la función de saturación para ATP es también sigmoidal. Estudios con la enzima semipurificada de rata (9) indicaron una cinética hiperbólica.

T A B L A VII

Valores comparativos de constantes cinéticas para glucoquinasa
de perro y rata

Animal	Sustrato	$K_{0,5}$	V_m	n de Hill	$\frac{V \text{ sacárido}}{V \text{ glucosa}}$
		mM	U/mg		
Perro	D-glucosa	4	76,8	1,5	1,00
	D-manosa	3,5	46,6	1,4	0,60
Rata	D-glucosa	7,5(a)	11,0(b)	1,5(a)	1,00(c)
	D-manosa	12,0(b)	-	1,5(b)	0,82(c)

(a) Datos obtenidos de H. Niemyer et al (121)

(b) Datos obtenidos de M. Cárdenas, E. Rabajille y H. Niemyer (115)

(c) Datos obtenidos de González et al (9)

Las implicancias regulatorias para este tipo de cinética se estudian con ahinco en este laboratorio (121).

3. Número de Recambio de la Glucoquinasa

La glucoquinasa de hígado de perro tiene un peso molecular de 40.000 que corresponde al de la única cadena polipeptídica. Al suponer la existencia de un sitio catalíticamente activo es posible calcular un número de recambio de 4.261 moles de glucosa fosforilada por el ATP por minuto y por cada mol de la enzima. Este cálculo se hizo sobre la base de una V_m de 80,8 unidades/mg de proteína. Este resultado está de acuerdo con el valor de 4.346 obtenido por Grossman et al para la glucoquinasa de hígado de rata (70).

CAPITULO III

DISCUSION

DISCUSION

A. METODO DE PURIFICACION

La purificación de la glucoquinasa hepática ha sido un problema difícil de resolver, debido principalmente a la baja proporción de la glucoquinasa dentro del conjunto de las proteínas del hígado. Por otra parte, la inactivación de la enzima durante los tratamientos ensayados, ha constituido otro importante escollo para lograr la purificación.

En este trabajo se lograron superar las dificultades en relación a la cantidad de enzima, al emplear perros como animales de experimentación, lo que permitió obtener en forma más fácil una mayor cantidad de tejido (alrededor de 1 Kg) a la vez que niveles apropiados de enzima cuando los perros se alimentaban con una dieta rica en carbohidratos. El problema de la inactivación de la enzima se resolvió al aumentar la estabilidad de las preparaciones de las primeras etapas de purificación con el uso de moléculas protectoras de la actividad y acortando el tiempo empleado en el desarrollo de estas etapas.

En los comienzos de este trabajo se estudió la purificación de la glucoquinasa de hígado de cerdo, obteniéndose preparaciones semi-purificadas, suficientemente estables y con una actividad específica de 11,3 unidades/mg. En este método se utilizaban cromatografías en Carboximetil-Sephadex, DEAE-celulosa, hidroxilapatita y Sephadex

G-100 y se lograba purificar la enzima alrededor de 1000 veces con un rendimiento de 8,5 % (114) (tabla VIII). Con este método se obtenía una preparación que presentaba 4 bandas después de electroforesis en geles de poliacrilamida (114).

Los procedimientos de purificación de la glucoquinasa de hígado de perro que se presentan en este trabajo permiten obtener la glucoquinasa en forma pura. La buena reproducibilidad de estos procedimientos se ha observado al repetir 6 veces el método que utiliza la cromatografía en la matriz de Sepharosa-glucosamina y 4 veces el método que emplea la cromatografía en DEAE-Sephadex. La reproducibilidad de las diferentes etapas comunes a ambos métodos se ha probado al repetir 28 veces las cromatografías en DEAE celulosa y Sephadex G-100 y alrededor de 15 veces la recromatografía en DEAE celulosa.

Una de las modificaciones fundamentales para lograr las condiciones que permitieron la purificación fue el aumento en las dimensiones de las columnas de DEAE celulosa y especialmente la de Sephadex G-100, en relación a las utilizadas en los estudios de purificación de la enzima del cerdo. Sin lugar a dudas que la cromatografía de filtración en Sephadex G-100, después de la etapa de la columna de DEAE celulosa es fundamental dentro de los procedimientos de purificación, debido a su alto rendimiento y al gran aumento en la actividad específica en relación a la etapa anterior. Los métodos de Grosman et al (70) y el de Pilkis (73), aunque utilizan la cromatografía en Sephadex G-100 en una secuencia de etapa muy diferentes a la nuestra, logran también obtener excelentes resultados con esta

cromatografía. En este trabajo se ensayó también una recromatografía en una columna de menor tamaño de Sephadex G-100 después de la primera cromatografía en este gel, lográndose obtener una preparación con una actividad específica de 55 y que presentaba 2 bandas de proteínas en geles de poliacrilamida (114) (fig. 33).

La razón para utilizar DEAE-celulosa de tipo microgranular en la cromatografía que se realiza en la etapa E fue porque con esta resina se logran mejores resoluciones cromatográficas que con DEAE celulosa de tipo amorfo. En la primera etapa cromatográfica se empleaba la resina amorfa principalmente para lograr un mayor flujo, lo cual es fundamental a ese nivel de la purificación.

Durante los estudios de purificación se ensayaron otros métodos alternativos para mejorar el protocolo de purificación, no se obtuvieron resultados favorables en los fraccionamientos con calor, cambios de pH y solventes orgánicos en los extractos crudos y las cromatografías en Carboximetil Sephadex e hidroxilapatita empleadas en el método de Babul y Niemeyer (72), tampoco permitieron mejorar el protocolo de purificación. La cromatografía en hidroxilapatita se ensayó antes y después de la filtración en Sephadex G-100 y en los casos más favorables se obtenían preparaciones con actividades específicas entre 20 y 25 unidades/mg que tenían una menor estabilidad que las preparaciones semipurificadas de los métodos descritos en este trabajo. El tratamiento con Carboximetil Sephadex, aunque producía un aumento de 1,2 veces en la actividad específica y aumentaba

la estabilidad de la glucoquinasa de los extractos, se eliminó para disminuir el tiempo empleado en la metódica.

El método que emplea la cromatografía en la matriz de Sepharosa-glucosamina permite acumular enzima en forma rápida para estudios posteriores, lo cual cumple con uno de los objetivos de este trabajo. Este método es más simple que el empleado por Grosman et al (70) para purificar la glucoquinasa de rata y permite obtener una preparación homogénea en un tiempo menor y con rendimientos muy superiores a los obtenidos por estos autores. El método de Grosman et al (70) requiere de dos meses de trabajo para juntar la misma cantidad de enzima que por el método descrito en este trabajo se obtiene en una semana (ver RESULTADOS). Por otra parte, al eliminar la etapa de la recromatografía en DEAE celulosa se disminuye el tiempo de purificación a 5 días. Si se mejoran las condiciones para la cromatografía en Sepharosa-glucosamina en este método abreviado con el fin de cromatografiar una mayor cantidad de proteínas, se podría aumentar considerablemente el rendimiento de la purificación. Los resultados de este trabajo prueban que es posible llegar a un 15 % de rendimiento total en el método abreviado.

El método de purificación que utiliza la cromatografía de afinidad abre las puertas para lograr preparaciones puras de glucoquinasa de otras especies, lo cual es de gran importancia para realizar estudios estructurales que permitan esclarecer el problema filogenético de esta enzima. Es así como mediante el método abreviado se

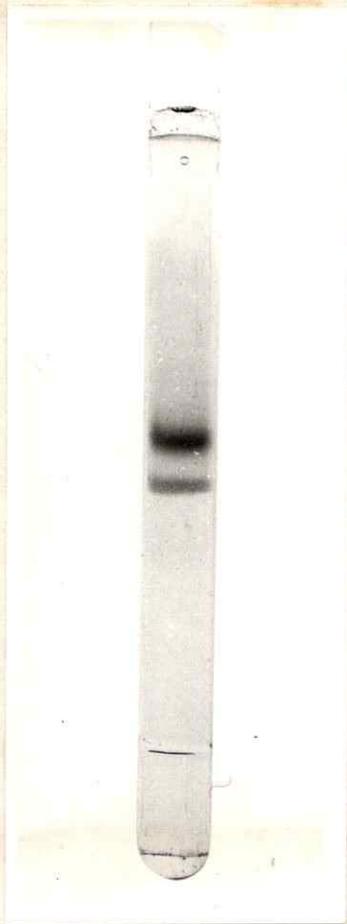
T A B L A VIII

Purificación de la Glucoquinasa de Hígado de Cerdo

Etapa	Volumen ml	U/ml	U/totales	Proteínas totales mg	Actividad Específica U/mg pro- teínas	Rendimiento %	Purificación veces
Extracto ini- cial sobrena- dante 105.000 g	395	1,25	495	42.250	0,012	100	--
CM Sephadex	670	0,49	427	33.500	0,013	86	1,08
DEAE-celulosa	830	0,29	239	585	0,405	48	27,0
DEAE-celulosa (microgranular)	170	0,99	168	175	0,970	34	80,5
Fracción AM con Sulfato amonio (40-80% satu- ración)	60	2,20	132	82	1,60	27	133
H. apatita	145	0,63	88	12	5,85	18	490
Sephadex G-100	32	1,30	42	3,7	11,30	8,5	940

Figura 33 Electroforesis en geles de poliacrilamida de una preparación de glucoquinasa obtenida después de una ~~recromatografía~~ cromatografía en Sephadex G-100.

La glucoquinasa (120 ug) proveniente del eluido seleccionado de una cromatografía en Sephadex G-100 realizada después de la etapa 5, se colocó sobre un gel con un 7 % de acrilamida y se hizo electroforesis según se describe en E. Se utilizó un gel que se había prerrecorrido durante 120 minutos.



~~4635~~ 165

han logrado avances importantes en la purificación de las glucoquin-
nasas de *Calyptocephalella caudiverbera* (122) y de *Geochelone Chi-*
lensis (114).

B. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

Existe la posibilidad de que la matriz de Sepharosa-glucosamina pueda retener la proteína con actividad enzimática según dos mecanis-
mos posibles: uno de ellos consiste en la interacción por afinidad entre la enzima y la glucosamina y el otro consiste en la interac-
ción hidrofóbica de la enzima con el espaciador apolar que es el 6-aminohexanoico (123). La elución específica con glucosa de la enzima retenida en la matriz de Sepharosa-glucosamina y la no reten-
ción de la enzima en la matriz de CH-Sepharosa 4B sin el ligando, sugieren que la interacción se debe a la afinidad de la enzima con glucosamina. Sin embargo, la matriz con o sin glucosamina retiene otras proteínas que en la cromatografía en Sepharosa-glucosamina se eluían en el lavado con KCl 100 mM. Esta adsorción no específica de algunas proteínas contaminantes se debe principalmente a la inter-
acción de éstas con el espaciador apolar.

La glucoquinasa no se logró retener en una columna de la matriz sólida de 5'-AMP ligado a Sepharosa activada sin el espaciador 6-aminohexanoico, cuando el experimento se hizo en las mismas condi-
ciones usadas para la unión de la enzima a Sepharosa-glucosamina (114). Puesto que Walker (74) demostró la necesidad del espaciador

para retener la glucoquinasa en la matriz de Sepharosa-glucosamina, es posible que la carencia del espaciador de la matriz de Sepharosa 5'AMP sea la causa de la no retención de la enzima, por impedimentos de tipo estérico en su interacción con el ligando.

En otros estudios de cromatografía de afinidad no se logró retener la proteína con actividad glucoquinásica en una columna con la matriz de Agarosa-azul dextrano (114). Se pensó en la necesidad de equilibrar la columna con glucosa 0,1 M en la solución de equilibrio, basado en la idea de que la presencia de glucosa podría ser necesaria para la unión de la enzima al azul dextrano. En estas condiciones tampoco se logró retener la enzima (114).

Si se supone que existe una homología estructural entre el nucleótido (ATP) y el colorante de azul dextrano unido a la matriz, estos resultados sugieren que no existiría un plegamiento en la enzima para la unión del nucleótido (124). Walker, en una comunicación preliminar plantea que las hexoquinatas no se unen a la matriz de Sepharosa glucosamina, siendo eluidas durante la etapa de retención de la glucoquinasa proveniente de un extracto crudo de hígado de rata (74). Este resultado no está de acuerdo con los valores de K_m para glucosa de las hexoquinatas, que son inferiores al $K_{0,5}$ de la glucoquinasa y tampoco con los valores de K_1 para glucosamina que presentan las hexoquinatas (10^{-4} - 10^{-3} M). Estudios preliminares que se realizaron durante el desarrollo de este trabajo (114) indicaron que las hexoquinatas de un extracto crudo no se retenían en la columna de Sepharosa-glucosamina, en las condiciones experimentales

en que se logró retener la glucoquinasa. Sin embargo, al disminuir la concentración de KCl a 20 mM se logró retener la isoenzima C de una preparación semipurificada de hígado de *Calyptocephalella caudiverbera*. La retención de la hexoquinasa, con una fuerza iónica inferior a la utilizada para la unión de la glucoquinasa sugiere la posibilidad de estudiar la separación de estas isoenzimas en la columna de Sepharosa-glucosamina.

C. ESTABILIDAD DE LA GLUCOQUINASA

La presencia de glucosa, 2-mercaptoetanol y KCl permiten mantener la actividad enzimática en todas las etapas del método de purificación, sin una importante inactivación. Esto hace posible guardar las preparaciones puras y semipurificadas para realizar estudios posteriores. Una de las modificaciones favorables en la preparación de las soluciones para obtener los extractos fue el empleo de fosfato de potasio en vez de Tris-HCl utilizado en las metodicas de Parry y Walker (15) y la de Babul y Niemyer (72). La utilización del KCl en la preparación de los extractos significó también un progreso importante para mantener la actividad de la glucoquinasa. Además, el empleo sistemático de la solución de fosfato de potasio permitió mejorar las diferentes cromatografías. En relación al KCl, es necesario señalar que su efecto protector de la actividad enzimática en etapas de mayor purificación es más significativo que el de la glucosa.

La mayor estabilidad de los eluidos de etapas de mayor purificación en relación al líquido sobrenadante de la centrifugación de alta velocidad y la estabilización por diferentes moléculas protectoras durante la purificación están de acuerdo con los estudios de estabilidad para la enzima de rata efectuados por Grossman et al (70).

La activación de alrededor de un 10 % observada en algunas preparaciones semipurificadas de la glucoquinasa lleva a sugerir la posibilidad de la existencia de dos estados de la enzima que difieren en su actividad catalítica: uno correspondería a un estado activado y el otro sería el que corresponde a la enzima con su actividad normal. Estudios conformacionales y cinéticos de la enzima cuando se encuentra en el estado de mayor actividad (activación respecto al valor basal), aportarían una valiosa información para discutir más ampliamente el problema y su probable importancia en las propiedades cinéticas de la enzima.

La glucoquinasa de perro parece ser más resistente a la desnaturalización por urea que la enzima de rata (115), puesto que requiere de una concentración de urea de 1,5 M en relación a 1,1 M de la enzima de rata, para disminuir la actividad en un 50 %. Una recuperación de la actividad glucoquinásica, que en algunos casos llegaba a un 100 % se logró al incubar durante 15 y 60 minutos la enzima en presencia de concentraciones entre 6 y 8 M de urea y ensayar la actividad luego de diluir la urea hasta 0,8 M. Este resultado agrega una prueba más para los estudios de reversibilidad en la desnaturalización de algunas proteínas.

D. CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE LA GLUCOQUINASA

Hasta el presente no se ha publicado estudio alguno acerca de la caracterización de la glucoquinasa de perro y los estudios con la enzima de rata son muy escasos.

En la determinación del peso molecular de la enzima de hígado de rata hay resultados divergentes. Pilkis et al (17) presenta valores de peso molecular aparente de 60.000 daltons, determinado por gradiente de sacarosa y de 65.000 daltons mediante Sephadex G-100, cuando esta cromatografía se hacía en ausencia de KCl. Al utilizar concentraciones de KCl entre 0,15 y 0,4 M en la solución de elución, el peso molecular obtenido por Pilkis et al era de 48.000. Grossmann et al (70) presentan valores de 57.000 para la glucoquinasa de rata cuando la cromatografía de filtración se efectuaba en presencia de fosfato de potasio 0,1 M, glucosa 50 mM y $MgSO_4$ 1 mM. Las mediciones de pesos moleculares obtenidas previamente en este laboratorio mediante la técnica de Andrews (96) con preparaciones semipurificadas de glucoquinasa de rata permitieron llegar a una estimación de 55.000 daltons, encontrándose además que en determinadas condiciones experimentales aparecía una fracción de alrededor de 112.000 daltons con actividad glucoquinásica, la cual podría deberse a una dimerización de la enzima monomérica. En nuestros estudios con la glucoquinasa de hígado de perro, nunca pudimos observar la presencia de esta especie de mayor peso molecular en las fracciones eluidas de las columnas de Sephadex G-100. Berthillier (125) y Got (126) describen

la existencia de dos fracciones proteicas en el hígado de rata con pesos moleculares de 50.000 y 120.000 y sostienen que se trataría de especies con actividad glucoquinásica. Sin embargo, estas proteínas son de naturaleza particulada a diferencia de la glucoquinasa que es una enzima soluble (68) y presentan características cinéticas diferentes a la glucoquinasa.

El valor de 47.000 daltons obtenido para la enzima de perro al utilizar la filtración analítica en columnas de Sephadex G-100 en presencia de KCl 0,3, es similar al valor obtenido por Pilkis et al, por filtración en geles en presencia de KCl (17). Sin embargo, mediante filtración en capa fina de Sephadex G-100 se logró obtener un peso molecular que es un 14 % mayor al obtenido por la cromatografía en columna.

El valor de 49.000 obtenido para la glucoquinasa de perro en forma desnaturalada por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS es similar al de la estimación hecha por filtración en columnas de Sephadex G-100 y coincide además con la estimación hecha sobre la base de la composición de aminoácidos. Una estimación de valor para compararla con las ya efectuadas se deberá realizar mediante el método de equilibrio de sedimentación en el sistema de la ultracentrífuga analítica.

Aunque no se conocen valores de peso molecular para las hexoquinanas de perro, las estimaciones hechas para estas isoenzimas provenientes de diferentes fuentes muestran valores de alrededor de 98.000 daltons (34). La isoenzima A de cerebro de rata presenta un

peso de 96.000 (127) cuando se determinó por electroforesis en el sistema SDS-acrilamida.

La información proveniente de la razón friccional nos permite ubicar a la glucoquinasa como una proteína globular. El valor de 1,24 puede corresponder a un elipsoide anhidro (prolato u oblato) con una razón axial de 4,7, o por otra parte, suponer que se trata de una partícula esférica con 0,65 g de agua por g de proteína.

La determinación de 5,1 para el punto isoelectrico de la glucoquinasa está de acuerdo con el carácter ácido de la glucoquinasa, lo que se demuestra además por la composición de aminoácidos de esta proteína rica en aminoácidos glutámico y aspártico y también por la reducida movilidad cromatográfica en columnas de DEAE celulosa.

E. ESTRUCTURA CUATERNARIA

Al estudiar el comportamiento electroforético de la glucoquinasa en geles de poliacrilamida con SDS se realizaron varios intentos para disociar la enzima por incubación en presencia de agentes desnaturantes, bajo diferentes condiciones experimentales de temperatura, tiempo de incubación y presencia de agentes reductores. Así, el peso molecular obtenido luego de estos tratamientos coincide con las estimaciones hechas para la enzima en su forma nativa. Al efectuarse la electroforesis en geles de poliacrilamida de una preparación pura de la glucoquinasa se observó la presencia de una sola especie molecular. El experimento de electroforesis en geles de poliacrilamida

en presencia de SDS descarta la posibilidad de que la glucoquinasa tenga subunidades de diferentes pesos moleculares y la posibilidad de que la enzima esté compuesta por subunidades diferentes, aunque de igual peso molecular queda descartada por el experimento de electroforesis en presencia de urea donde el efecto de la carga neta de la molécula es importante.

La resistencia de la glucoquinasa a la disociación frente a agentes desnaturalantes sugiere que las proteínas tienen una sola cadena polipeptídica o que las interacciones entre las subunidades son tan fuertes que impiden la disociación en estas condiciones. Esto último es poco probable por lo que se conoce acerca de las interacciones que estabilizan la estructura cuaternaria de la enzima. Por otra parte, las interacciones no covalentes intersubunidades son lábiles bajo la presencia de este tipo de agentes disociantes y una posible presencia de puentes disulfuros no explicaría esta interacción puesto que el 2-mercaptoetanol impide la mantención de este tipo de enlace. Además, los datos de la composición de aminoácidos y de la titulación de grupos sulfhidrilos con PCMB sugieren que no hay puentes disulfuros en la enzima.

Una mejor prueba experimental para demostrar que la glucoquinasa tiene una estructura monomérica se obtuvo del número de péptidos detectados en un digerido triptico de la enzima. El valor esperado para el número de péptidos de este digerido (31 péptidos), de la composición de arginina y lisinas corresponde con la determinación de 30 péptidos encontrados en el digerido mediante dos mapas

peptídicos realizados en condiciones diferentes. Si la enzima estuviese formada por subunidades iguales debería esperarse un número de péptidos significativamente inferior al encontrado.

Los experimentos de hidrólisis química con CNBr en las condiciones experimentales en que se efectuaron revelan la existencia de al menos 9 péptidos, que aunque es un número de péptidos menor que el esperado de la composición de metionina de la proteína (10 péptidos) no acepta la posibilidad de que los péptidos formados provengan de subunidades iguales.

En general, los resultados presentados indican que la glucoquinasa es una enzima monomérica. Si se realizan experimentos de determinación de grupos carboxilos y amino terminales, se tendría una información adicional acerca de la estructura cuaternaria de esta enzima. Así, la glucoquinasa junto con la isoenzima A de cerebro de rata (127) y la 3-fosfoglicérico quinasa (128) parecen ser hasta el presente las únicas enzimas glicolíticas que no están constituidas por subunidades.

F. RELACIONES ENTRE LAS ISOENZIMAS FOSFORILANTES DE GLUCOSA

Los conocimientos de la naturaleza monomérica de la glucoquinasa y el de sus características cinéticas y estructurales permiten esclarecer el cuadro de relación entre estas isoenzimas. Aunque los conocimientos de la estructura de la hexoquinasa son hasta ahora muy limitados, con la información disponible es posible hacer una inferencia

en relación a la codificación para la biosíntesis de estas isoenzimas. La idea de que la información para la biosíntesis de la glucocuinasa y de las posibles subunidades de las hexocuinastas podría estar en un mismo gen carece de apoyo experimental y su única base la constituye la relación de dos es a uno (2:1) entre los pesos moleculares aparentes de las hexocuinastas y la glucocuinasa.

Se ha postulado que la isoenzima A de cerebro es también una enzima monomérica (127) con un peso molecular de 98.000 daltons. La naturaleza monomérica de la isoenzima A y de la glucocuinasa (isoenzima D) y las diferencias encontradas en las características cinéticas, composición de aminoácidos, propiedades espectrales, el punto isoeléctrico y los pesos moleculares de estas isoenzimas apoyan la hipótesis de que son enzimas estructuralmente diferentes y por lo tanto serían el producto de genes independientes. Las diferencias estructurales entre estas isoenzimas se refuerza por el hecho de que el mapa peptídico de la isoenzima A (129), purificada en este laboratorio por el método de Chru y Wilson (127) no presenta similitudes con la glucocuinasa obtenida en las mismas condiciones experimentales.

En este laboratorio se ha encontrado que en ciertas condiciones experimentales aparece una especie molecular con actividad glucocuinástica y que parece corresponder a un dímero de la subunidad (121). Esta especie no presenta la cinética sigmoidal que caracteriza al monómero pero tiene alta K_m para glucosa, a diferencia de las hexocuinastas que son enzimas de baja K_m (121).

Por otra parte, pruebas de tipo inmunológico indican que el anticuerpo contra la hexoquinasa B de músculo de rata no reacciona con la glucocuinasa de hígado de rata ni con la isoenzima A de cerebro y tejido adiposo (130). El anticuerpo contra la glucocuinasa de hígado de rata reacciona con glucocuinasa de diferentes especies pero no inhibe la hexoquinasa de rata (40, 131) de otras especies de animales (40) y la de levadura (4). Más particularmente, las hexocuinastas A y C purificadas de tejidos humanos no presentan reacción cruzada, lo que se ha demostrado mediante estudios de inmunoinhibición y electroinmunodifusión (132, 133).

Otro tipo de prueba experimental en favor de que las isoenzimas fosforilantes de glucosa son enzimas diferentes proviene de los perfiles cromatográficos de estas isoenzimas, los cuales indican que las tres hexoquinastas y la glucocuinasa pueden existir independientemente en el hígado de vertebrados, no encontrándose una presencia constante de dos o más de estas isoenzimas en las diferentes especies estudiadas por Ureta et al (105). Este hecho sugiere que no se forman especies moleculares híbridas entre estas isoenzimas.

El conjunto de estas pruebas experimentales constituye un apoyo a la hipótesis de que la familia de isoenzimas fosforilantes de glucosa está compuesta por proteínas diferentes y solamente las hexoquinastas presentan algunas propiedades comunes.

En otros sistemas isoenzimáticos estudiados, como el de la láctico deshidrogenasa (134) y el de la creatina quinasa (135, 136)

tienen subunidades diferentes y la combinación al azar de estas subunidades explica la heterogeneidad de las especies moleculares encontradas. Las diferentes isoenzimas del sistema de las enzimas fosforilantes de glucosa no pueden ser explicadas sobre la base de una suposición semejante a estos casos puesto que no se han encontrado subunidades y las isoenzimas presentan características estructurales diferentes, de esta manera, el sistema fosforilante de glucosa presenta la particularidad de ser el único, de los estudiados hasta el presente, en el cual las isoenzimas no tienen subunidades comunes y serían codificadas por genes independientes.

C. ACTIVIDAD CATALITICA Y COMPORTAMIENTO CINETICO

Las determinaciones de la velocidad de fosforilación con diferentes sustratos demuestran que la glucocuinasa presenta una mayor velocidad de fosforilación de la glucosa que de manosa, fructosa y 2-desoxiglucosa, decreciendo ésta en el orden señalado para los diferentes sustratos. Además, la glucocuinasa de perro presenta una mayor velocidad de fosforilación de fructosa que la de rata y una menor velocidad para la manosa. La enzima no presenta actividad catalítica frente a las pentosas estudiadas, la glucosamina y metilglucósido.

La demostración de la cinética sigmoidal de la glucocuinasa de hígado de perro encontrada para glucosa y manosa como sustrato está

de acuerdo con los estudios realizados en este laboratorio con preparaciones semipurificadas de la glucoquinasa de hígado de rata (121).

La mayoría de las enzimas regulatorias que presentan una cinética de tipo sigmoideal están constituidas por subunidades y su comportamiento cinético se ha explicado sobre la base de diferentes modelos de interacción cooperativa entre las subunidades (137, 138). Sin embargo, la cinética sigmoideal que representa la glucoquinasa no puede ser explicada sobre esta base puesto que es una enzima monomérica. Se hace necesario recurrir a otros modelos que puedan explicar las funciones de tipo sigmoideal de enzimas monoméricas (139) (140, 141). En este laboratorio se estudian la cinética sigmoideal de la glucoquinasa y si se cumple alguno de los modelos cinéticos para explicar la función sigmoideal de una enzima monomérica.

Puesto que las preparaciones utilizadas para estudiar el comportamiento cinético de la enzima eran preparaciones puras (obtenidas por ambos métodos de purificación), se descarta la posibilidad de que la cinética sigmoideal se deba a interacción de la glucoquinasa con otras proteínas. Una explicación sobre la base de la suposición de algún tipo de interacción entre las especies moleculares monoméricas no parece probable puesto que recientes estudios realizados en este laboratorio indican que la especie activa en las condiciones del ensayo enzimático tiene un peso molecular equivalente al de la subunidad única (115).

El valor de $K_{0,5}$ para glucosa de la glucoquinasa de hígado de rata es de 7,5 mM (121) y está dentro del rango de concentraciones esperadas para la glucosa en la célula hepática (suponiendo que no hay barreras de permeabilidad) que es de 3 - 15 mM, según el tipo de dieta digerida. El valor de 4 mM para la $K_{0,5}$ de la glucoquinasa de hígado de perro está comprendido en este rango, y el valor de $K_{0,5}$ de la glucoquinasa de algunos anfibios es de 1,5 - 3,5 mM, correspondiendo dentro del rango de concentraciones de glucosa (1-3 mM) esperada en el hepatocito de estos animales (142). Las funciones de saturación de la glucoquinasa de algunos anfibios y de tortuga son también de tipo sigmoideal con valores de n_H entre 1,6 y 1,7 (20, 121). De acuerdo a los valores de $K_{0,5}$, n_H y el carácter sigmoideal de la cinética de la glucoquinasa, Niemeier et al (20, 121) plantean que la glucoquinasa sería una enzima capaz de variar la utilización de la glucosa en relación a las concentraciones cambiantes que existen en el hígado. Los valores de los parámetros cinéticos indican una función adaptativa para la glucoquinasa, aumentando la eficiencia de la enzima para actuar en el rango de concentraciones de sustratos de la célula hepática (20, 121).

COMENTARIO

FINAL

COMENTARIO FINAL

En este trabajo se ha logrado purificar la glucoquinasa de perro, obteniéndose una preparación que presenta una banda en geles de poli-acrilamida y una actividad específica de 89 unidades/mg de proteína. Para la purificación se utilizaron dos métodos que difieren solamente en la última etapa cromatográfica: uno de ellos utiliza una cromatografía en DEAE Sephadex y el otro una cromatografía en una matriz de glucosamina ligada a Sepharosa. La enzima purificada es estable en solución cuando se mantiene en presencia de glucosa, 2-mercaptoetanol y KCl.

La glucoquinasa purificada se caracteriza por ser una proteína acídica que contiene una sola cadena polipeptídica de un peso molecular de 48.000 daltons. Se ha descrito que algunas hexoquinasa de mamíferos (127, 143) presentan también una estructura monomérica. La naturaleza monomérica de las isoenzimas fosforilantes de glucosa, las diferencias estructurales encontradas entre ellas y otras características del sistema de isoenzimas sugieren que éstas serían enzimas independientes. De acuerdo con esto, las enzimas fosforilantes de glucosa serían el único sistema enzimático cuya existencia no puede ser explicado como resultado de combinaciones de subunidades básicas, por analogía con otras isoenzimas como las de la lactico deshidrogenasa (134) y de la creatina quinasa (135, 136).

Los conocimientos de la estructura de las hexoquinasa son, hasta el presente, muy limitados y los resultados de este trabajo plantean

la necesidad de lograr la purificación de estas enzimas para llegar a tener un conocimiento de su estructura. Un mayor conocimiento de la estructura de las isoenzimas fosforilantes de glucosa permitirá comprender mejor las relaciones entre éstas y su pariente filogenético.

La metódica de purificación de la glucoquinasa abre las puertas para la obtención de esta enzima, y por lo tanto, a la preparación de anticuerpos contra la enzima pura lo que permitirá completar los estudios de su mecanismo de inducción y también los estudios filogenéticos en diferentes especies.

BIBLIOGRAFIA

1. O. MEYERHOFF, Biochemische Zeitschrift Band 183, 176-215 (1927)
2. S. COLCOWICK, H. KALCKAR, C. CORI, J. Biol. Chem. 137, 343-356 (1941)
3. D. WALKER, Biochem. J., 118 P (1962)
4. S. WALKER, Bioch. Biophys. Acta 77, 209-226 (1963)
5. D. WALKER, S. RAO, Biochem. J., 90, 360 (1964)
6. E. VIÑUELA, M. SALAS, A. SOLS, J. Biol. Chem. 238, DC 1175 (1963)
7. M. SALAS, E. VIÑUELA, A. SOLS, J. Biol. Chem. 200, 145 (1963)
8. C. GONZALEZ, T. URETA, R. SANCHEZ, H. NIEMEYER, Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 347-352 (1964)
9. C. GONZALEZ, T. URETA, J. BABUL, E. PABAJILLE, H. NIEMEYER, Biochemistry 6, 460-463 (1967)
10. M. KATZEN, D. SODERMAN, H. NITOWSKY, Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 377 (1965)
11. H. KATZEN, R. SCHIMKE, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 54, 1218 (1965)
12. L. GROSSBARD, M. WEKSLER, R. SCHIMKE, Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 32 (1966)
13. D. WALKER, Essays in Biochemistry 2, 33 (1966)
14. J. SALAS, E. VIÑUELA, M. SALAS y A SOLS, J. Biol. Chem. 240, 1004 (1965)
15. M. PARRY, D. WALKER, Biochem. Journal 99, 266 (1966)
16. M. PARRY, D. WALKER, Biochem. J., 105, 473 (1967)
17. S. PILKIS, R. HANSEN, M. KRAHL, Bioch. Biophys. Acta 154, 250 (1968)
18. C. GONZALEZ, T. URETA, Abstract of the Fifth Annual Meeting, Soc. Argentina de Investigaciones Bioquímicas, Tucumán, Argentina, p. 31 (1969)

19. H. NIEMEYER, T. URETA, Enzyme adaptation in mammals, en K. Gaede, B. Horecker y W. Whelan (ed), Molecular basis of biological activity, PAABS Symposium, vol. 1, p. 221-273, Acad. Press, N. York and London (1972)
20. H. NIEMEYER, T. URETA, L. CLARK-TURRI, Molecular and Cell Biochem., 6, 109-126 (1975)
21. M. McDONALD en S. Colowick, N. Kaplan, Methods in Enzymology, vol. 1, p. 269 (1955) Acad. Press (ed) New York, London
22. S. COLOWICK en P. Boyer (ed), The enzymes, vol. 1 X, part B Third Ed., p. 1-48 Acad. Press, New York, London (1973)
23. R. DARROW, S. COLOWICK, en S. Colowick, N. Kaplan, Methods in Enzymology, vol. 1, p. 226 Acad. Press (1955)
24. A. KAJI, K. TRAYSER, S. COLOWICK, Ann. N.Y. Acad. Sci. 94, 798 (1961)
25. U. KENKARE, S. COLOWICK, J. Biol. Chem. 240, 4570 (1965)
26. C. CARDINI, Enzymology 14, 362-368 (1951)
27. N. PELLERONI, R. CONIPOULOU, M. DOUDEROFF, J. Bact. 71, 202, (1956)
28. V. SAPICO, R. ANDERSON, J. Biol. Chem. 242, 5086 (1967)
29. J. JACOB, J.D. ANZAC, Comp. Rend. 265, 260 (1967)
30. H. KATZEN, R. SCHIMKE, Proc. Nat. Acad. Sci. 54, 1218 (1965)
31. J.W.VAN DEN BERG, W.C. HULSMANN, FEBS Letter 12, 173 (1971)
32. R. CRANE, P. BOYER, H. LARDY, K. MYSBACH (ed) vol. 6, p. 47-66, Acad. Press, New York (1962)
33. J. HANSON, H. FROMM, J. Biol. Chem. 242, 501 (1967)
34. T. URETA, Isozymes III, p. 575-601, Acad. Press Inc. (1975)
35. M. SLEIN, G. CORI, C. CORI, J. Biol. Chem. 186, 763-780 (1950)
36. R. HANSEN, S. CREIGHTON, G. McGRATH, Comp. Bioch. Physiol. 39 B, 607-615 (1971)

37. T. URETA, C. GONZALEZ, H. NIEMEYER, *Comp. Bioch. Physiol.* 408, 81 (1971)
38. R. CRANE, A. SOLS en S. Colowick, N. Kaplan, *Methods in Enzymol.* vol. 1, p. 277, Acad. Press New York y London (1955)
39. F. BALLARD, L. OLIVER, *Biochem. J.*, 92, 131 (1964)
40. S. PILKIS, R. HANSEN, M. KRAHL, *Comp. Biochem. Physiol.* 25, 903 (1968)
41. V. LAURIS, G. CAHILL, *Diabetes* 15, 475 (1966)
42. T. URETA, J. SLEBE, J. RADOJKOVIC, C. LOZANO, *Comp. Biochem. Physiol.* 50, 515-524 (1975)
43. T. URETA, J. RADOJKOVIC, C. LOZANO, J. BABUL, A. PEREA, R. BRAVO, S. REICHBERG, *Arch. Biol. Med. Exp.* 9, R 31 (1973)
44. J.C. SLEBE, J. RADOJKOVIC, T. URETA, Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, (1971)
45. T. URETA, S. REICHBERG, J. SLEBE, J. RADOJKOVIC, *Arch. Biol. Med. Exp.* 7, R 155 (1969)
46. F. BALLARD, *Comp. Bioch. Physiol.* 14, 437 (1965)
47. T. URETA, Comunicación personal (1975)
48. T. URETA, Formas moleculares múltiples de ATP:D-hexosa 6-fosfo-transferasa. Tesis, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (1965)
49. S. PILKIS, R. HANSEN, *Biochem. Biophys. Acta* 159, 189 (1968)
50. S. ASCHROFT, P. RANDLE, *Biochem. J.*, 119, 5 (1970)
51. G. GERBER, M. SCHULTZE, R. RAPAPORT, *Eur. J. Biochem.* 17, 445 (1970)
52. H. BACHELARD, *Nature (London)* 215, 959 (1967)
53. H. NIEMEYER, *Acta Physiol. Latinoamericana* 12, 173-187 (1962)
54. H. NIEMEYER, N. PEREZ, G. GARCES, F. VERGARA, *Biochem. Biophys. Acta* 62, 411 (1962)

55. N. PEREZ, L. CLARK-TURRY, E. RABAJILLE, H. NIEMEYER, J. Biol. Chem. 239, 2420-2426 (1964)
56. D. DI PIETRO, D. WEINHOUSE, J. Biol. Chem. 235, 2542 (1960)
57. D. VAUGHAN, J. HANNON, L. VAUGHAN, Am. J. Physiol. 199, 1041 (1960)
58. G. CHAMORRO, R. SCHILKRUT, Tesis de Carrera Académica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile (1969)
59. T. URETA, C. GONZALEZ, S. LILLO, H. NIEMEYER, Comp. Biochem. Physiol. 40 B, 71-78 (1971)
60. H. NIEMEYER, L. CLARK-TURRY, E. GARCES, F. VERGARA, Arch. Biochem. Biophys. 98, 77-85 (1962)
61. H. NIEMEYER, N. PEREZ, J. RADOJKOVIC, T. URETA, Arch. Biochem. Biophys. 96, 662-669 (1962)
62. C. SHARMA, R. MANGESHIMAR, S. WEINHOUSE, J. Biol. Chem. 238, 3840-3845 (1963)
63. H. NIEMEYER, L. CLARK-TURRI, E. RABAJILLE, Nature 198, 1096-1097 (1963)
64. H. NIEMEYER, N. PEREZ, R. CODOCEO, J. Biol. Chem. 242, 860 (1967)
65. M. SALAS, E. VIÑUELA, A. SOLS, J. Biol. Chem. 238, 3535 (1963)
66. H. NIEMEYER, N. PEREZ, E. RABAJILLE, J. Biol. Chem. 241, 4055-4059 (1966)
67. T. URETA, J. RADOJKOVIC, H. NIEMEYER, J. Biol. Chem. 245, 4819-4824 (1970)
68. H. NIEMEYER, L. CLARK-TURRI, N. PEREZ, E. RABAJILLE, Arch. Biochem. Biophys. 109, 634 (1965)
69. L. CLARK-TURRI, J. PEÑARANDA, E. RABAJILLE, H. NIEMEYER, FEBS Letter 41, 342 (1974)
70. S. GROSSMAN, C. DORN, VAN R. POTTER, J. Biol. Chem. 249, 3055-3060 (1974)
71. J. BABUL, Purificación de glucoquinasa de hígado de rata. Tesis de Licenciatura, Facultad de Tecnología, Universidad Católica (1966)

72. J. BABUL, H. NIEMEYER, Arch. Biol. Med. Exp. 3, 65-70 (1966)
73. S.J. PILKIS, Arch. Biochem. Biophys. 149, 349 (1972)
74. J. CHESHER, I. TRAYER, D. WALKER, B. Soc. Transactions 1, 876 (1973)
75. H. HENGARTNER, H. ZUBER, FABS Letter 37, 212-216 (1973)
76. H. HOHORST, en Bergmeyer, A.U. (ed), Methods of enzymatic analysis Verlag Chemie GMBH. Weinheim Bergst, p. 134-138 (1963)
77. T. URETA, J. RADOJKOVIC, J.C. SLEBE, Arch. Biol. Med. Exp. (en prensa)
78. A. KORNBERG, W. PRICER, J. Biol. Chem. 293, 481 (1951)
79. B. HORECKER, A. KORNBER, J. Biol. Chem. 175, 385-390 (1948)
80. O. LOWRY, N. ROSENBOUGH, A. FARR, R. RANDALL, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
81. O. WARBURG, W. CHRISTIAN, Bioch. Z. 310, 384 (1941)
82. G.C. WEBSTER, Bioch. Biophys. Acta 207, 371-373 (1970)
83. W. SCHAFFNER, C. WEISSMANN, Analytical Bioch. 56, 502-514 (1973)
84. BIO RAD Laboratories, Chromatography, electrophoresis and membrans technology (1974)
85. Sephadex. Gel filtration theory and practice. Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia (1968)
86. WHATMANN. Ion exchangers (DE 52 (1972)
87. Sephadex. Ion exchangers, Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia (1970)
88. Affinity chromatography, Principles and methods (1974)
89. B.J. DAVIS, Ann. N.Y. Acdd. Sci. 121, 404 (1964)
90. G. FAIRBANKS, T.L. STECK, D. WALLACH, Biochem. 10, 2605-2617 (1971)
91. S. PANYIM, J. CHALKLEY, Arch. Bioch. Biophys. 130, 337 (1969)
92. A. SHAPIRO, E. VIÑUELA, J. MAIZEL, Bioch. Biophys. Res. Commun. 28, 815 (1967)

93. K. WEBER, M. OSBORN, J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
94. H. GROSSMAN, VAN R. POTTER, Analytical Biochemistry 59, 54-62, (1974)
95. J. BABUL, Comunicación personal (1974)
96. P. ANDREWS, Biochem. J. 91, 222-233 (1964)
97. P. ANDREWS, Biochem. J. 96, 595-606 (1965)
98. W.L. BENCZE, K. SCHMID, Analytical Chemistry 29, 1193 (1957)
99. S. MOORE, W. STEIN, Methods Enzymol. 6, 819 (1963)
100. D.H. SPACKMAN, E.H. STEIN, W. MOORE, Analytical Chemistry 30, 1190 (1958)
101. A.M. KATZ, W.J. DREYER, C.B. ANFINSEN, J. Biol. Chem. 234, 2897 (1959)
- 101b. E. MERCK, A.G. DARMSTADT
102. P.D. BOYER, J. Amer. Chem. Soc. 76, 4331 (1954)
103. E. GROSS, en Methods in Enzymology, vol. XI (C. Hirs ed), p. 238-254 Acad Press, N. York, London (1967)
104. G.E. GLOCK, P. McLEAN, Bioch. J. 55, 400-408 (1953)
105. T. URETA, Comunicación personal (1975)
106. J. BROWN, D. MILLER, M. HOLLEWY, G. LEVE, Science 155, 205-207 (1967)
107. R. HORNICHTER, J. BROWN, H. SNOW, Clin. Research 15, 107 (1967)
108. J. SHATTON, A. DONNELLY, S. WEINHOUSE, Cancer Research 22, 1372-1380 (1962)
109. S.S. WEINHOUSE, V. CRISTOFALO, S. SHARMA, H. MORRIS, Adv. Enzyme Res. 1, 363-371 (1963)
110. E. MACCIONI, J. BABUL, Arch. Biol. Med. Exp. R 32 (1975)
111. L. KIRKEGAARD, C. AGEER, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2424-2448 (1973)
112. D. WALKER, S. RAO, Biochem. Biophys. Acta 77, 662-665 (1963)

113. A. VARGAS, Purificación y propiedades de glucoquinasa de hígado de perro. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile (1975)
114. R. MACCIONI, J. BABUL, Trabajos no publicados (1975)
115. M. CARDENAS, E. RABAJILLE, H. NIEMEYER, Comunicación personal (1975)
116. J. PORATH, Pure Appli. Chem. 6, 233-239 (1963)
117. E.J. COHN, J.T. EDSALL, Proteins, amino acids and peptides, Reinhold, New York (1941)
118. C. TRANFORD, en Willey and Sons (ed), Physical Chemistry of macromolecules, p. 365-396 (1967)
119. L.J. GOSTING, Adv. Protein Chemistry 11, 429-554 (1958)
120. J.W. DONOVAN, Biochem. 3, 67 (1964)
121. H. NIEMEYER, M. CARDENAS, E. RABAJILLE, T. URETA, L. CLARK-TURRI, J. PEÑARANDA, Enzyme (en prensa)
122. N. DIAZ, T. URETA, Comunicación personal (1975)
123. P. O'CARRA, S. BARRY, T. GRIFFIN, FEBS Letter 43, 169-175 (1974)
124. S.T. THOMPSON, K.H. CASS, E. STELLWAGEN, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 669-672 (1975)
125. G. BERTHILLIER, Glucokinase microsomique des hepatocytes de rat, Tesis Doctorado, University Claude Bernard, Lyon, France (1971)
126. G. BERTHILLIER, G. COLOBERT, R. GOT, M. RICHARD, Bioch. Biophys. Acta 206, 1-16 (1970)
127. A. CHOU, J. WILSON, Arch. Biochem. Biophys. 151, 48-55 (1972)
128. K. KULBE, M. BOJANOWSKI, W. LAMPRECHT, Eur. J. Biochem. 52, 239-254 (1975)
129. T. URETA, L. NUÑEZ, J. BABUL, Comunicación personal (1975)
130. S. CREIGHTON, A. McCLURE, B. WATROUS, R. HANSEN, Comp. Biochem. Physiol. 42 B, 509-516 (1972)
131. L. CLARK-TURRI, J. PEÑARANDA, E. RABAJILLE, H. NIEMEYER, Comunicación personal (1974)

132. S. NEUMANN, G. PFLEIDERER, *Bioch. Biophys. Acta* 334, 343-353 (1974)
133. S. NEUMANN, F. FALKENBERG, G. PFLEIDERER, *Biochem. Biophys. Acta* 334, 328-342 (1974)
134. C. MARKERT, *Annals of the New York Academy of Sciences* 151, 14-40 (1968)
135. H. EPPENBERGER, D.M. DAWSON, N. KAPLAN, *J. Biol. Chem.* 242, 204-209 (1967)
136. D. DAWSON, H. EPPENBERGER, N. KAPLAN, *J. Biol. Chem.* 242, 210-217 (1967)
137. J. MONOD, J. WYMAN, J.P. CHANGEUX, *J. Mol. Biol.* 12, 88 (1965)
138. D.E. KOSHLAND Jr., G. NEMETHY, D. FILMER, *Biochemistry* 5, 365 (1965)
139. H. RUBSAMAN, R. KHANDKER, H. WITZEL, *Hopper Seyler Z. Physiol. Chem.* 355, 687-708 (1974)
140. W.L. FERDINAND, *Biochem. J.* 98, 275 (1966)
141. C. GRIEDEN, *J. Biol. Chem.* 245, 5788-5799 (1970)
142. J.C. PEMHOS, E. RAMSEY, *Amer. Zool.* 13, 667-698 (1973)
143. J.S. EASTERBY, *FEBS Letter* 18, 23 (1971)