

UCH-FC
DOC-B
M736
C. 1

MECANISMO CINETICO DE LA GLUCOQUINASA

ESTUDIOS EN VELOCIDAD INICIAL CON 2-DESOXIGLUCOSA
COMO SUSTRATO Y EFECTO DE INHIBIDORES; MODIFICA-
CIONES QUIMICAS E INTERACCIONES ENZIMA-LIGANDOS

Tesis

Entregada 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

OCTAVIO HERNAN MONASTERIO OPAZO

Diciembre, 1980

Profesor Patrocinante: DR. HERMANN NIEMEYER

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

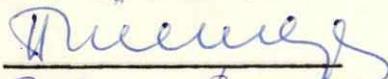
T E S I S D E D O C T O R A D O

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

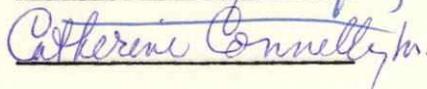
Octavio H. Monasterio Opazo

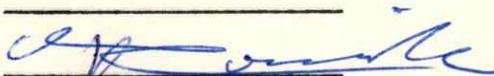
ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Junio de 1980.

Patrocinante de Tesis



Comisión Informante de Tesis


Catherine Connelly M.





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

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a las siguientes personas:

Al Dr. Hermann Niemeyer, quien me brindó su orientación oportuna en el desarrollo de esta tesis. La diaria interacción con su personalidad como científico y como formador ha dejado huellas indelebles en mi visión de la ciencia.

A la Srta. Eliana Rabajille por su colaboración generosa y efectiva en la realización de todos los experimentos cinéticos.

A Cristina Rose, Oscar León y Ulrike Heberlein quienes contribuyeron con partes experimentales de esta tesis y que siempre supieron brindarme su confianza.

Al Dr. Osvaldo Alvarez por su contribución en la elaboración y procesamiento de los programas de computación.

A todas las personas del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Concepción quienes en los comienzos de esta tesis contribuyeron a su realización y me brindaron su apoyo.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Sede Norte, por permitirme realizar la tesis mientras pertenecía a ese Departamento.

A la Sra. Serena Mann por la confección de los dibujos y a la Sra. Titina Cerda por transcribir el texto de esta tesis.

Por último, a todos los integrantes del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de esta Facultad por brindarme su amistad y mantener una constante y crítica discusión durante la realización de esta tesis.

Octavio Monasterio O.

Diciembre, 1980

A mis padres

A mi esposa

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xxiv
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	11
REACTIVOS	11
PREPARACION DE LA GLUCOQUINASA	11
1. Fuente de la enzima	11
2. Purificación de la enzima	12
DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOTRANSFERASICA	14
1. Ensayo espectrofotométrico para determinar glucosa-6-fosfato	14
2. Ensayo espectrofotométrico para determinar ADP	16
3. Ensayo radiactivo para la determinación de ADP	17
CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS	19
1. Preparación de resinas y columnas cromatográficas ..	19
2. Preparación de Separosa-6-aminohecanoil-2-amino- 2-desoxiglucopiranososa	19
MODIFICACION QUIMICA	20
1. Modificación de grupos tioles con DTNB	20
2. Modificación de residuos de histidina por foto- oxidación	21

	Pág.
DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS	21
DETERMINACION DE LA PUREZA Y CONCENTRACION DE LOS REACTIVOS	23
ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS	25
RESULTADOS	28
PURIFICACION DE LA GLUCOQUINASA	28
Cromatografía de afinidad de la glucoquinasa	28
Estudios sobre la estabilidad de la glucoquinasa	38
Glicerol como estabilizante	41
Efecto estabilizante del bisulfito de sodio	46
MODIFICACION QUIMICA	46
Fotooxidación de residuos de histidina	48
Cinética de la fotooxidación	49
Protección por los sustratos	50
Estudio de los residuos de cisteína	55
Oxidación espontánea	55
Reactivación por DTT y protección por sustratos	56
Protección por glicerol	59
Modificación por DTNB	62
Cinética de la inactivación	62
Pérdida de la susceptibilidad a la acción del DTNB	70
Efecto de los sustratos y productos sobre la inac- tivación por DTNB	74
CINETICA	83
Efecto de los sustratos sobre la velocidad inicial	83
Análisis de la velocidad inicial en presencia de inhibidores de punto muerto, análogos de los sustratos....	95
Inhibición por N-acetilglucosamina al variar dGlc y MgATP..	96

	Pág.
Inhibición por AMP al variar MgATP y dGlc	103
Análisis de la velocidad inicial en presencia de los productos	113
Curva de progreso de la fosforilación de dGlc	113
Inhibición por 2-desoxiglucosa-6-fosfato	114
Inhibición por MgADP respecto a MgATP	117
Inhibición por MgADP respecto a dGlc	121
 DISCUSION	 124
Validez de las constantes de disociación gluco- quinasa-ligandos	125
Validez de las determinaciones de K_d y K_p cuando no se utiliza una preparación de enzima homogénea	128
Relación entre el mecanismo cinético y la protec- ción por ligandos contra la inactivación por DTNB	131
Orden de adición de los sustratos	134
 APENDICE A	 140
CINETICA ENZIMATICA	140
ANALISIS DE LA REACCIÓN EN CONDICIONES DE VELOCIDAD INICIAL	142
Ecuación de velocidad inicial	142
MÉTODOS DE LINEARIZACIÓN DE LA ECUACION DE VELOCIDAD INICIAL	143
1. Método de Lineweaver-Burk	143
2. Método de Eadie-Hofstee; 3. Método de Hanes-Woolf	144
DIFERENCIAS EN LAS RELACIONES DE VELOCIDAD INICIAL PARA MECANISMOS EN SECUENCIA Y PING-PONG	146
ANALISIS DE LA REACCIÓN CONSIDERANDO LA PARTICIPA- CIÓN DE LOS PRODUCTOS	148

	Pág.
INHIBICION DE PUNTO MUERTO CON INHIBIDORES DE ES- TRUCTURA SEMEJANTE A LOS SUSTRATOS	150
Análisis del efecto de los inhibidores de punto muerto	152
I. Mecanismo en secuencia ordenada	152
a. Inhibición competitiva con respecto al sustrato A	152
b. Inhibición no competitiva para el sustrato B	155
c. Inhibición competitiva para el sustrato B	159
d. Inhibición incompetitiva para el sustrato A.....	162
II. Mecanismo en secuencia al azar en equilibrio rápido	164
a. Inhibición competitiva para el sustrato A	164
b. Inhibición no competitiva para el sustrato B	166
c. Inhibición competitiva para B e inhibición no competitiva para A	167
Análisis del efecto de un inhibidor de punto muerto, análogo de B, que se une débilmente al sitio A	168
Inhibición respecto al sustrato A	169
Inhibición respecto al sustrato B	170
MODIFICACION QUIMICA	172
Fotooxidación con rosa de bengala	172
Cálculo de las constantes de velocidad de inactivación...	172
Reacción de los grupos tioles con DTNB	174
Cinética de inactivación por DTNB	175
Mecanismos de inactivación	175
Cinética de inactivación por DTNB en presencia de un ligando protector	178
Mecanismo a	179
Mecanismo b	183

	Pág.
APENDICE B	187
<i>PROGRAMAS DE COMPUTACION</i>	187
<i>Programa 1</i>	187
<i>Programa 2</i>	188
LISTA DEL PROGRAMA 1	190
LISTA DEL PROGRAMA 2	192
BIBLIOGRAFIA	194

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Purificación de la glucoquinasa de hígado de rata	40
Tabla II. Protección por sustratos de la fotooxidación de glucoquinasa de hígado de rata	52
Tabla III. Protección por ligandos de la inactivación de la glucoquinasa producida por DTNB	84
Tabla IV. Constantes cinéticas para glucoquinasa determinadas en estudios de velocidad inicial	93
Tabla V. Constantes de inhibición para glucoquinasa de terminadas desde los estudios de inhibición por N-acetil-glucosamina	101
Tabla VI. Constantes de inhibición para glucoquinasa de terminadas desde los estudios de inhibición por AMP	107

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

	Pág.
Esquema I. Sistema para la fotooxidación	22
Esquema II. Secuencia de adición de los sustratos a la glucoquinasa	135
Fig. 1. Cromatografía de glucoquinasa en Sefarosa III y elución mediante un gradiente de KCl	30
Fig. 2. Recromatografía de glucoquinasa en Sefarosa III	31
Fig. 3. Cromatografía de afinidad de glucoquinasa de rana en Sefarosa III (acetilada)	32
Fig. 4. Cromatografía de GlcNAc-quinasa en Sefarosa III	33
Fig. 5. Cromatografía de GlcNAc-quinasa en Sefarosa III y eluida mediante un gradiente de KCl...	35
Fig. 6. Cromatografía de glucoquinasa y GlcNAc-quinasa en Sefarosa III	36
Fig. 7. Estabilidad de la glucoquinasa de hígado de rata después de su purificación mediante cromatografía de afinidad	42
Fig. 8. Efecto del glicerol sobre la actividad de la glucoquinasa obtenida desde columnas de DEAE-celulosa	43
Fig. 9. Efecto del glicerol sobre la actividad glucoquinásica	43
Fig. 10. Efecto protector de bisulfito de sodio sobre la actividad de la glucoquinasa	47

	Pág.
Fig. 11	Cinética de inactivación de la glucoquinasa por fotooxidación con rosa de bengala, en presencia y ausencia de los sustratos 51
Fig. 12	Efecto protector de los sustratos sobre la fotooxidación de la glucoquinasa por rosa de bengala 54
Fig. 13	Cinética de la inactivación espontánea de la glucoquinasa en ausencia de protectores de los grupos tioles 57
Fig. 14	Cinética de inactivación espontánea en ausencia de DTT y recuperación de la actividad de glucoquinasa 58
Fig. 15	Efecto de los sustratos sobre la cinética de inactivación espontánea de la glucoquinasa 60
Fig. 16	Efecto del glicerol sobre la cinética de inactivación espontánea de la glucoquinasa en ausencia de protectores de grupos tioles 61
Fig. 17	Inactivación de glucoquinasa de hígado de rata con DTNB 63
Fig. 18	Reactivación por DTT de la glucoquinasa inactivada por DTNB 65
Fig. 19	Inactivación de la glucoquinasa a diferentes temperaturas 68
Fig. 20	Variación en el tiempo de la actividad de la glucoquinasa y de su susceptibilidad a la acción del DTNB 71
Fig. 21	Modificación de la glucoquinasa en presencia de los sustratos de la reacción que cataliza 75
Fig. 22	Modificación de la glucoquinasa en presencia de los productos de la reacción que cataliza 77

	Pág.
Fig. 23 Efecto de la concentración de glucosa sobre la constante de velocidad de inactivación por DTNB	78
Fig. 24 Efecto de la concentración de 2-desoxiglucosa sobre la constante de velocidad de inactivación por DTNB	79
Fig. 25 Efecto de la concentración de ADP sobre la constante de velocidad de inactivación por DTNB ...	81
Fig. 26 Efecto de la concentración de AMP sobre la constante de velocidad de inactivación por DTNB ...	82
Fig. 27 Gráfico de Hill de la función de saturación de glucoquinasa usando 2-desoxiglucosa como sustrato	85
Fig. 28 Gráficos de dobles recíprocos donde 2-desoxiglucosa es el sustrato variable a diferentes concentraciones fijas de MgATP	87
Fig. 29 Gráfico de dobles recíprocos donde MgATP es el sustrato variable a diferentes concentraciones fijas de 2-desoxiglucosa	88
Fig. 30 Efecto de la concentración de 2-desoxiglucosa sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por glucoquinasa	90
Fig. 31 Efecto de la concentración de MgATP sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por glucoquinasa	91
Fig. 32 Gráfico de dobles recíprocos donde las concentraciones de 2-desoxiglucosa (o glucosa) y MgATP se variaron en razón constante	94
Fig. 33 Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por N-acetilglucosamina cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable	97

	Pág.
Fig. 34	Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por N-acetilglucosamina cuando MgATP es el sustrato variable 99
Fig. 35	Inhibición de glucoquinasa por N-acetilglucosamina 100
Fig. 36	Gráfico de Dixon para la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando MgATP es el sustrato variable 104
Fig. 37	Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando MgATP es el sustrato variable 106
Fig. 38	Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable a bajas concentraciones de MgATP 109
Fig. 39	Gráficos de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable a altas concentraciones de MgATP 110
Fig. 40	Gráficos secundarios de la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable 112
Fig. 41	Curvas de progreso de la reacción de fosforilación de 2-desoxiglucosa 115
Fig. 42	Gráfico de Dixon para la inhibición de glucoquinasa por el producto de la reacción 2-desoxiglucosa-6-fosfato cuando MgATP es el sustrato variable 116
Fig. 43	Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por el producto MgADP cuando MgATP es el sustrato variable 119

	Pág.
Fig. 44. <i>Inhibición de glucoquinasa por el producto MgADP cuando MgATP es el sustrato variable</i>	120
Fig. 45. <i>Inhibición de glucoquinasa por el producto MgADP cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable</i>	122
Fig. A-1 <i>Diagramas de inhibición de punto muerto para un mecanismo en secuencia ordenada Bi Bi</i>	154
Fig. A-2 <i>Diagramas de inhibición de punto muerto para un mecanismo en secuencia ordenada Bi Bi, donde I se combina con E</i>	156
Fig. A-2 <i>(continuación)</i>	157
Fig. A-3 <i>Diagramas de inhibición de punto muerto para un mecanismo en secuencia ordenada Bi Bi, donde I se combina con EA</i>	161
Fig. A-4 <i>Diagramas de inhibición de punto muerto para un mecanismo en secuencia ordenada Bi Bi, donde I se combina con EA</i>	163

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	: Adenosina 5' difosfato
AMP	: Adenosina 5' monofosfato
ATP	: Adenosina 5' trifosfato
CH-Sepharose	: 6-aminohexanoil Sepharose
DE-81	: Dietil aminoetil celulosa (papel)
DEAE-celulosa	: Dietil aminoetil celulosa
DTNB	: 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato)
DTT	: Ditiotreitól
dGlc	: 2-desoxiglucosa
dGlc-6-P	: 2-desoxiglucosa-6-fosfato
EDC	: Hidroclorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
GlcNAc	: N-acetilglucosamina
GlcNAc-quinasa	: N-acetilglucosamina-quinasa
NAD	: Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH ₂	: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP	: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH ₂	: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
PEP	: Fosfoenol piruvato

PMSF : Fenilmetilsulfonil fluoruro
POPOP : (1,4-bis 2(5-feniloxazolil) benceno
PPO : 2,5-difeniloxazol
TNB : 5-tio (2-nitrobenzoato)
TNBS : Trinitrobencenosulfonato
Tris : Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

La glucoquinasa (ATP:D-glucosa-6-fosfotransferasa EC 2.7.1.2.), una de las cuatro isoenzimas fosforilantes de glucosa presentes en el hígado de rata, fue purificada parcialmente. Una etapa importante fue la cromatografía de afinidad con Sepharose-6-amino-hexanoil-2-amino-2-desoxiglucopiranososa, mediante la cual se eliminó la N-acetilglucosamina-quinasa. El comportamiento cinético de la glucoquinasa de esta preparación (actividad específica 36 U/mg de proteína) con 2-desoxiglucosa (dGlc) como sustrato glucídico, fue similar al de la enzima proveniente de Sephadex G-100 (actividad específica 2 U/mg de proteína). Sin embargo, la enzima de esta última preparación era más estable y se prefirió para realizar la mayoría de los estudios presentados en esta tesis.

La glucoquinasa es una enzima monomérica que presenta cinética sigmoidea para glucosa y manosa; la sigmoidicidad desaparece a bajas concentraciones de MgATP. Sin embargo, con dGlc la cinética es hiperbólica en un amplio rango de concentraciones de dGlc (0,1 a 9 veces K_m) y de MgATP (0,5 a 40 veces K_m). Los valores de K_m para dGlc y MgATP fueron $19,2 \pm 2,3$ mM y $0,56 \pm 0,05$ mM respectivamente. En vista de la conducta cinética con 2-desoxiglucosa, se estudió el mecanismo cinético de la glucoquinasa con este sustrato.

Los gráficos primarios de dobles recíprocos ($1/v$ en función de $1/S$) y de S/v en función de S , como asimismo los gráficos secundarios,

fueron lineales para ambos sustratos en un rango de concentraciones de 1 a 9 veces K_m para el azúcar y 0,5 a 6,5 veces K_m para el nucleótido. En ambos gráficos primarios las líneas se intersectaron en un punto a la izquierda de la ordenada, indicando una adición consecutiva de los sustratos a la enzima. Cuando se usó una razón constante de concentración de ambos sustratos y se hizo el gráfico de dobles recíprocos con respecto a cualquiera de ellos, se obtuvo una parábola, lo que apoyó el mecanismo en secuencia. La velocidad máxima con dGlc fue 73% de la obtenida con glucosa (Glc).

Para conocer el orden de interacción de los sustratos con la enzima se usaron los inhibidores de punto muerto N-acetilglucosamina (GlcNAc) y AMP. GlcNAc, inhibidor competitivo de dGlc ($K_i = 0.63 \pm 0,04$ mM), se comportó como inhibidor mixto respecto a MgATP en un amplio rango de concentraciones de ambos sustratos. Por otro lado, AMP un inhibidor competitivo respecto a MgATP ($K_i = 10,56 \pm 0,52$ mM), fue incompetitivo respecto a dGlc en presencia de MgATP 0,41 mM. Estas observaciones son compatibles con un mecanismo ordenado en el cual dGlc es el primer sustrato. Sin embargo, la inhibición de AMP respecto a dGlc cambió de carácter cuando la concentración de MgATP fue aumentada por encima de su K_m . Así, con MgATP 1,2 y 3,6 mM la inhibición fue claramente mixta. El conjunto de resultados podría ser compatible con un mecanismo al azar, donde ocurriría un flujo principal con dGlc como primer sustrato y solo al aumentar el nucleótido se haría reconocible la vía, en la que

MgATP pasaría a ser el primer sustrato. Una explicación alternativa, que no hemos encontrado descrita, puede ofrecerse para el cambio del tipo de inhibición por AMP. El AMP se uniría a la enzima libre, a pesar de la operación de un mecanismo ordenado estricto, con dGlc como primer sustrato. De este modo AMP competiría tanto con ATP como con dGlc.

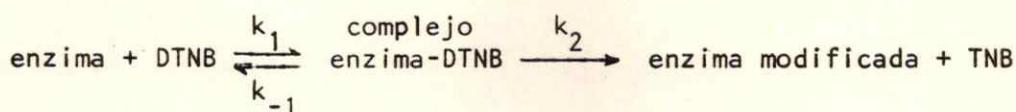
Los estudios de inhibición por el producto 2-desoxiglucosa-6-fosfato no fueron posibles debido a su baja afinidad por la enzima. El producto MgADP mostró inhibición no competitiva pura respecto a MgATP e inhibición mixta, con un considerable componente competitivo, respecto a dGlc. Esto sugiere que ADP es el último producto en un mecanismo ordenado, o uno de los productos en un mecanismo al azar en equilibrio rápido, con formación de complejo de punto muerto.

Con el propósito de apoyar los resultados cinéticos se hicieron estudios de protección contra la inactivación de la enzima por modificación química por medio de sustratos, productos y análogos. La cinética de la inactivación por fotooxidación de la glucoquinasa más purificada fue bifásica, con una k_i^1 correg. (constante de inactivación de pseudo-primer-orden de la primera fase, corregida por la segunda fase) de $0,14 \text{ min}^{-1}$. ATP y MgATP, pero no glucosa, protegieron a la enzima de la fotooxidación. En esta misma preparación se observó que, en ausencia de protectores de tioles, se perdía espontáneamente la actividad glucoquinásica. Esta inactivación era dependiente de la concentración de proteínas y, por ser revertida por DTT, se interpreta como consecuencia de

la formación de puentes de disulfuros intramoleculares.

En la modificación con DTNB se utilizó la glucoquinasa de actividad específica de 2 U/mg de proteína, por su mayor estabilidad en ausencia de protectores de tioles. La cinética de inactivación era multifásica y cada fase seguía una cinética de pseudo-primer-orden. La primera fase era responsable de un 70 a 80% de pérdida de la actividad en 1 - 3 min. La reactivación completa por DTT señala que la reacción de modificación se producía mediante la oxidación de los grupos sulfhidrilos a disulfuros. La linealidad del gráfico de Arrhenius en un rango de 0° a 30° sugiere que una población homogénea de grupos tioles es responsable de la primera fase de la inactivación.

El carácter saturable de la inactivación de la glucoquinasa se mostró por la linealidad del gráfico de dobles recíprocos de k_i^1 en función de la concentración de DTNB. La reacción puede entonces ser descrita como sigue:



Durante el almacenamiento de la enzima se observó una inactivación de la glucoquinasa y una pérdida de la susceptibilidad a DTNB. La pérdida de la susceptibilidad al DTNB precedía a la inactivación, la cual comenzaba aparentemente cuando k_i^1 alcanzaba un valor cero. La susceptibilidad al DTNB y la actividad catalítica eran parcialmente recuperadas

al incubar la enzima con DTT. Estos resultados sugieren que la pérdida de reactividad hacia DTNB es debida a la formación de enlaces disulfuros intramoleculares en el sitio reaccionante, probablemente por oxidación con el oxígeno atmosférico. La disociación entre la actividad catalítica y la susceptibilidad a reaccionar con DTNB, indica que los grupos tiolés comprometidos en la primera fase de inactivación no participan directamente en la función catalítica. No obstante, ellos serían importantes para estabilizar una estructura catalíticamente activa. El efecto protector ejercido por diversos ligandos se interpreta por esto como la alteración de una cierta conformación que impediría la formación del complejo enzima-DTNB o la subsecuente formación del disulfuro mixto enzima-TNB.

Los experimentos de protección por sustratos, productos y otros ligandos, permitieron calcular las constantes de disociación aparentes ($K_{D \text{ app}}$) de los complejos enzima-ligandos. Así para Glc, dGlc y ADP, se obtuvieron valores de 2,53 mM, 28,94 mM y 3,10 mM, respectivamente a una concentración de DTNB de 2×10^{-3} mM. A diferencia de los otros ligandos, el AMP tuvo un efecto protector no lineal, por lo cual no se calculó la constante de disociación. Glucosa-6-fosfato 100 mM, aumentó levemente la inactivación por DTNB. ATP y MgATP a concentraciones saturantes tenían un pequeño, pero reproducible efecto protector (alrededor de 10%). Experimentos en que se estudió la acción simultánea de ADP o AMP con ATP, en ausencia de Mg^{2+} , mostraron que el nucleósido-trifosfato no

influya en la protección por ADP o AMP, lo que sugiere que no actúan de igual manera. Parece que el glucosa-6-fosfato también interactúa con la enzima, pues provoca un pequeño aumento (20%) de la velocidad de inactivación por DTNB. Si se acepta que la protección por los ligandos estudiados corresponde a una interacción en el sitio catalítico de la enzima, la eficiente protección por los sustratos glucídicos y ADP sugiere la operación de un mecanismo cinético ordenado, donde los azúcares actuarían como primer sustrato y ADP como último producto. Sin embargo, si los efectos de MgATP o ATP solo y de glucosa-6-fosfato son considerados, todos los resultados serían compatibles con la operación de un mecanismo al azar con una ruta preferencial, donde dGlc sería el primer sustrato.

ABSTRACT

Glucokinase (ATP:D-glucose-6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2.), one of the four glucose phosphorylating isozymes present in rat liver, was partially purified. A key purification step was affinity chromatography on Sepharose-6-aminohexanoil-2-amino-2-deoxyglucopyranose, which eliminated N-acetylglucosamine kinase activity. Using 2-deoxyglucose (dGlc) as sugar substrate the kinetic behavior of glucokinase purified through this step (specific activity 36 U/mg protein) was similar to that of the preparations obtained at the Sephadex G-100 step (specific activity 2 U/mg protein). The last one was preferred for most studies since it was more stable.

Glucokinase is a monomeric enzyme exhibiting sigmoidal saturation function for glucose and mannose; the sigmoidicity disappears at low concentrations of MgATP. However, dGlc shows hyperbolic kinetics through a wide range of concentrations of both dGlc (0.1 to 9 times K_m) and MgATP (0.5 to 40 times K_m). The K_m values for dGlc and MgATP were 19.2 ± 2.3 mM and 0.56 ± 0.05 mM, respectively. In view of this kinetic behavior, a study on the kinetic mechanism with dGlc as substrate was performed.

Double reciprocal plots ($1/v$ versus $1/S$) and S/v versus S plots, as well as the secondary plots, showed straight lines for both substrates in a concentration range of about 1 to 9 times K_m for dGlc and 0.5 to

6.5 times K_m for the nucleotide. The lines of both primary plots intersected around a point situated at the left of the vertical axis, indicating a sequential mechanism. When a constant ratio of concentrations of both substrates was used, a parabolic double reciprocal plot was obtained, which further supported this view. V_{max} was 73% for dGlc as compared to glucose (Glc).

The dead-end inhibitors N-acetylglucosamine (GlcNAc) and AMP were used to know the order of addition of substrates in the enzyme reaction. GlcNAc, a competitive inhibitor for dGlc ($K_i = 0.63 \pm 0.04$ mM) behaved as a mixed inhibitor relative to MgATP in a wide range of concentrations of both substrates. On the other hand, AMP acted as competitive inhibitor for MgATP ($K_i = 10.56 \pm 0.52$ mM) and as uncompetitive inhibitor with respect to dGlc at 0.41 mM MgATP. These observations were compatible with an ordered mechanism in which dGlc is the first substrate. However, the inhibition of AMP against dGlc changed in character as the MgATP concentration increased over its K_m . Thus, at 1.2 and 3.6 mM MgATP, the inhibition was clearly mixed. All these results could be compatible with a random mechanism, with a principle reaction flux through dGlc as the first substrate. Only, when the nucleotide substrate concentration is relatively high, the alternative path in which MgATP is bound before dGlc would become recognizable. A non described alternative explanation for the change on the type of inhibition by AMP may be offered. AMP would binds to the free enzyme, in spite of the operation of a

compulsory ordered mechanism with dGlc as the first substrate. Thus AMP could compete with both AMP and dGlc.

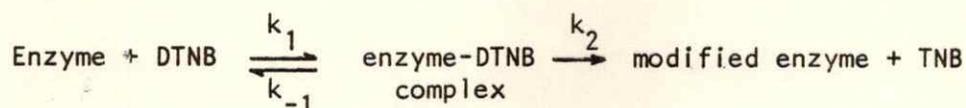
Product inhibition studies with 2-deoxyglucose-6-phosphate were not possible due to its very low affinity for the enzyme. The product MgADP showed pure noncompetitive inhibition relative to MgATP, and mixed inhibition, with an important competitive component, respect to dGlc. This result suggests that ADP is the last product in an ordered mechanism, or is one of the products in a rapid equilibrium random mechanism, with dead-end complex formation.

In order to support the kinetic results, studies on protection by substrates, products and analogs against inactivation of the enzyme by chemical modification were performed. The kinetic of the inactivation by photooxidation of the most purified glucokinase, was biphasic with a k_i^1 cor. (pseudo first order rate constant of the first phase, corrected by the second phase) of 0.14 min^{-1} . ATP and MgATP but not glucose, protected against photooxidation. The same enzyme preparation spontaneously lost the activity in the absence of thiol protectors, and the inactivation was dependent on the protein concentration. The activity was recovered with DTT, suggesting the formation of intramolecular disulfides bridges.

DTNB modification was carried out with partially purified glucokinase (specific activity 2 U/mg protein) because of its stability in the absence of thiol containing reagents. The kinetics of the inactivation

was multiphasic, each phase following pseudo-first-order kinetics. The first phase was responsible for about 70-80% of the inactivation in 1-3 min. The full reactivation by DTT indicated that the modification involved oxidation of the enzyme sulfhydryl groups to disulfides bridges. The linearity of the Arrhenius plot in the range of 0° to 30° pointed out that a single population of thiol groups might be involved in the first phase of inactivation.

The saturable character of the enzyme inactivation was shown by the linearity of double reciprocal plot of k_i^1 versus DTNB concentrations. The reaction of glucokinase with DTNB could thus be described as follows:



Inactivation of glucokinase and loss of susceptibility to DTNB were observed during storage. The loss of susceptibility to DTNB preceded the inactivation. In fact, it appears that inactivation commenced when k_i^1 attained a value of zero. Both the sensitivity to DTNB and the catalytic function were partially recovered by incubating the enzyme with DTT. These results suggest that the spontaneous loss of reactivity towards DTNB is due to the formation of intramolecular disulfides at the reacting site, probably through oxidation by atmospheric oxygen. The dissociation

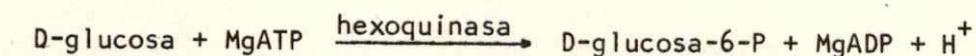
of the catalytic activity and susceptibility to react with DTNB provides evidence that the first phase-reacting thiol groups of glucokinase do not directly participate in the catalytic function. Notwithstanding, they would be important for stabilizing a structure catalytically active. The protection exerted by several ligands is thus interpreted as the alteration of a given conformation that would present either the formation of the enzyme-DTNB complex or the subsequent formation of the mixed disulfide enzyme-TNB.

Apparent dissociation constant (K_{Dapp}) could be estimated for various ligands due to their protective effect on DTNB inactivation. Thus, for Glc, dGlc and ADP the K_{Dapp} values were 2.53, 28.94 and 3.10 mM, respectively, at 2×10^{-3} mM DTNB. AMP had also a protective effect which was not linear and the K_{Dapp} value was not estimated. 100 mM glucose-6-phosphate increase slightly the inactivation by DTNB. ATP and MgATP at saturating concentrations had a small but reproducible effect (about 10%). Experiments performed in the absence of Mg^{2+} showed that ATP did not alter the protective effect of AMP or ADP when they were present together, suggesting that there is no interference of ATP on putative changes of conformation induced by the other nucleotides. It appears that glucose-6-phosphate interacts also with the enzyme, since a slight increase (20%) in the rate of inactivation by DTNB was observed. If it is accepted that the ligand protection correspond to the interaction on the active site of the enzyme, the protective effect of the sugar

substrate and MgADP is compatible with an ordered mechanism in which dGlc is the first substrate and MgADP the last product. However, if the effects of MgATP or ATP alone and glucose-6-phosphate are also considered, all results would be compatible with the operation of random mechanism, with a preferred ordered path, where dGlc is the first substrate.

INTRODUCCION

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



Poco después del reconocimiento de dos enzimas fosforilantes de glucosa en el hígado de rata en los laboratorios de Weinhouse (Di Pietro y col., 1962), Walker (Walker, 1963) y Sols (Viñuela y col., 1963), en nuestro laboratorio González y col. (1964) describieron cuatro isoenzimas fosforilantes de glucosa que, según su orden de elución en cromatografía en DEAE-celulosa, denominaron A, B, C y D. Se llaman también I, II, III y IV de acuerdo con su migración electroforética (Katzen, Soderman y Nitowsky, 1965). La isoenzima D se ha encontrado también en el hígado de la mayoría de los mamíferos, en los anfibios y en los reptiles inferiores (Ureta, 1975). La isoenzima D ha sido denominada glucoquinasa (E.C. 2.7.1.2.) debido a su especificidad algo más restringida para la glucosa (y manosa) (Salas y col., 1965) que la especificidad de las otras isoenzimas llamadas en grupo hexoquinasas (Viñuelas y col.,

1963) y que utilizan muy bien fructosa (González y col., 1964; González y col., 1967). Usaremos esta nomenclatura aunque adolece de serios defectos (Ureta, 1975).

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

La glucoquinasa difiere de las otras isoenzimas en su localización tisular y en sus características cinéticas y estructurales. Las hexoquinasa A y B se encuentran en todos los tejidos de la rata, aunque en forma predominante en algunos, por ejemplo hexoquinasa A en cerebro y hexoquinasa B en músculo (Katzen y Schimke, 1965). La cinética de saturación con glucosa de las isoenzimas A y B es de tipo hiperbólica, con valores de K_m de alrededor de 10^{-5} y 10^{-4} M respectivamente, y fosforilan fructosa con eficiencia (González y col., 1964, 1967). Presentan un peso molecular de alrededor de 100.000 (para revisión ver Purich y col., 1973). La isoenzima C ha sido bien identificada en sólo algunos tejidos como hígado riñón y músculo cardíaco, su K_m es alrededor de 10^{-5} M y es inhibida por exceso de sustrato glucídico; el peso molecular es como el de las hexoquinasa A y B de 100.000 (para revisión ver Ureta, 1975). La glucoquinasa, en cambio, parece ser una típica enzima del hepatocito y presenta una cinética de saturación sigmoidea con respecto a glucosa (n_H 1,5),

su $K_{0.5}$ es alto, de $7,5 \times 10^{-3}$ M, (pH 7,5) (Niemeyer y col., 1975b) posee aparentemente una baja capacidad fosforilante de fructosa (González y col., 1967) y un peso molecular de alrededor de 50.000 (Cárdenas y col., 1978; Holroyde y col., 1976b). Además de glucosa, la glucoquinasa y las hexoquinasas son capaces de fosforilar otros azúcares como manosa y 2-deoxiglucosa (para revisión ver Niemeyer y col., 1975a).

La purificación de la glucoquinasa ha sido un problema durante cerca de 15 años debido, por una parte, a su inestabilidad y, por otra, a la pequeña cantidad existente; se añade la dificultad de separarla de otras enzimas fosforilantes de glucosa. Si bien la cromatografía en DEAE-celulosa y la filtración en Sephadex G-100 permiten una satisfactoria separación de la glucoquinasa con respecto a las hexoquinasas, la contaminación por N-acetilglucosamina-quinasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, (Cárdenas y Rabajille, no publicado), capaces de fosforilar glucosa, no se evita del todo con estos procedimientos. Las etapas más avanzadas de purificación se han conseguido en el último tiempo al utilizar cromatografía de afinidad (Maccioni, 1975; Holroyde y col., 1976b).

La difícil obtención de glucoquinasa homogénea, estable y en cantidades suficientes, ha sido el gran escollo para obtener información sobre la relación entre su estructura y su función.

Los objetivos de esta tesis han sido:

a) Estudiar la reacción de fosforilación de 2-desoxiglucosa, para intentar dilucidar el orden de interacción de los sustratos glucídicos y del MgATP con la glucoquinasa, a través de estudios cinéticos en velocidad inicial y de inhibición de punto muerto.

b) Procurar conocer a través de la modificación química (de residuos histidina y cisteína) las interacciones que se establecen entre la enzima y los sustratos, productos e inhibidores análogos de los sustratos. Además de contribuir a explicar las propiedades cinéticas de la glucoquinasa, este estudio permitirá conocer la naturaleza de su sitio activo, en cuanto a los aminoácidos esenciales para la catálisis.

c) Estudiar las interacciones de la glucoquinasa con derivados de la glucosamina unidos a Sepharose, que eventualmente conducirían al perfeccionamiento de los métodos de purificación.

Comentaremos brevemente estos objetivos y las principales conclusiones derivadas de esta tesis.

El mecanismo cinético de la glucoquinasa se ha tratado de dilucidar desde el descubrimiento de la enzima (González y col., 1967; Parry y Walker, 1967). Sin embargo, sólo cuando en este laboratorio se descubrió que la saturación de la enzima con glucosa era sigmoidea (Niemeyer y col., 1975b), se comprendieron las anomalías que se encontraban al analizar la glucoquinasa como enzima michaeliana. Otros investigadores han confirmado este comportamiento sigmoideo de la glucoquinasa (Storer y Cornish-Bowden, 1976). La explicación del comportamiento sigmoideo de la glucoquinasa para glucosa y manosa no ha sido tarea fácil, ya que es una enzima monomérica y la sigmoidicidad depende de la concentración de MgATP. Así, a bajas concentraciones de MgATP la cinética se hace hiperbólica (Storer y Cornish-Bowden, 1976; Cárdenas y col., 1979). Además, la presencia de sustratos alternativos y análogos de glucosa también

hace hiperbólica la función de saturación (Cárdenas y col., 1979).

Para explicar el carácter sigmoideo de la glucoquinasa se han propuesto dos mecanismos de reacción. Una interpretación ha sido dada por Storer y Cornish-Bowden (1977), quienes, al realizar estudios cinéticos a concentraciones de glucosa mayores que la concentración de semisaturación ($K_{0.5}$), concluyen que operaría un orden estricto de interacción de los sustratos y los productos, siendo glucosa el primer sustrato y MgADP el último producto. Un cambio conformacional favorecido por el proceso de catálisis daría cuenta de la sigmoidicidad. La otra interpretación de la cinética sigmoidea de la glucoquinasa ha sido dada por Cárdenas y col. (1977), quienes después de estudios cinéticos en un amplio rango de concentraciones de glucosa, postulan un mecanismo cinético consecutivo al azar en régimen estacionario, en el cual existiría una ruta preferencial. El modelo fue modificado posteriormente con la postulación de al menos dos conformaciones de enzima (Cárdenas y col., 1979). En ambas interpretaciones mecanísticas se postula la presencia de más de una forma de enzima, diferenciándose fundamentalmente en la manera como los sustratos interactúan con la enzima. De aquí que conocer el orden de adición de los sustratos a la enzima podría ser clave para aplicar uno u otro modelo al comportamiento sigmoideo. Para tratar de resolver el problema, en este trabajo se usó 2-desoxiglucosa, aprovechando la observación de que la glucoquinasa presenta una función de saturación hiperbólica con este sustrato (Cárdenas y col., 1979)

El análisis en velocidad inicial de la reacción de la fosforilación de la glucosa por hexoquinasas, ha demostrado que la interacción de los sustratos con la enzima es consecutiva (para revisiones ver Crane, 1962; Walker, 1966; Colowick, 1973; Purich y col., 1973). Saber si existe un orden estricto o al azar de entrada de los sustratos y salida de los productos ha sido un tema de controversia. Para diferenciar entre un mecanismo ordenado y uno al azar en el caso de varias quinasas, se ha empleado la inhibición de punto muerto, por inhibidores competitivos análogos de los sustratos (Bartana y Cleland, 1974; Brostrom y Browning, 1973; Danenberg y Cleland, 1975; Raushel y Cleland, 1977). N-acetilglucosamina, un inhibidor competitivo respecto a glucosa y AMP, un inhibidor competitivo respecto a MgATP, han sido usados como inhibidores de punto muerto en el caso de hexoquinasa de cerebro de bovino (Fromm y Zewe, 1962b) y de hexoquinasa de levadura (Bachelard y col., 1971).

Nuestros resultados no han sido de fácil interpretación, por cuanto han escapado a los esquemas simples descritos en la literatura. En efecto, si bien los estudios en velocidad inicial son claramente compatibles con un mecanismo consecutivo, sea al azar u ordenado, el análisis de la acción de los inhibidores de punto muerto (N-acetilglucosamina y AMP) y de la inhibición por un producto (ADP) es complicado. En efecto, los resultados pueden interpretarse si se acepta un orden de adición obligatorio, con dGlc como primer sustrato y probablemente ADP como último producto, siempre que AMP sea capaz de unirse a la enzima

en ausencia de 2-desoxiglucosa. También pueden explicarse si existe un orden variable de adición de los sustratos: preferentemente ordenado, con 2-desoxiglucosa como primer sustrato, cuando las concentraciones de MgATP son bajas (alrededor de la K_m) y al azar, en presencia de concentraciones altas de ATP (mayor que la K_m).

El papel de los grupos tioles en la actividad fosfotransferásica ha sido estudiado ampliamente en hexoquinasas de mamíferos y de levadura (para revisión ver Colowick, 1973). Las hexoquinasas de mamíferos más estudiadas son la de cerebro de bovino (Redkar y Kenkare, 1972; Redkar y Kenkare, 1975) y de cerebro de rata (Chou y Wilson, 1974). Los grupos tioles de estas enzimas fueron caracterizados utilizando DTNB, que es un reactivo altamente selectivo para residuos SH (Ellman, 1959). La titulación de la enzima bovina mostró tres poblaciones de tioles de diferente reactividad y sólo los de reactividad intermedia fueron importantes para la actividad catalítica, pues su velocidad de reacción con DTNB era semejante a la de la inactivación de la enzima (Redkar y Kenkare, 1975).

Para investigar el papel de los grupos tioles en la hexoquinasa A de cerebro (Kenkare y Swamp, 1978) y en la hexoquinasa B de músculo (Connolly y Trayer, 1979a), se ha utilizado la marcación por afinidad con N-bromoacetil-D-glucosamina, que es un análogo de la glucosa. En ambos casos se concluyó que existía un único residuo de cisteína esencial para la actividad catalítica. En estudios similares se demostró que en la hexoquinasa de levadura también existía un grupo tiol esencial

para la catálisis (Otieno y col., 1977; Otieno y col., 1977).

La modificación química de residuos de aminoácidos no sólo ha sido útil para el conocimiento del número y la naturaleza de los residuos involucrados en la actividad catalítica. También ha sido utilizada con éxito en el cálculo de constantes de disociación enzima-ligandos de preparaciones semipurificadas (Mildvan y Leigh, 1964) y en la detección de cambios conformacionales inducidos por la interacción de la enzima con sus sustratos u otros ligandos (Wilson, 1978; Wilson, 1979). Esto es posible ya que un pequeño cambio en la estructura de la proteína puede producir un cambio en la reactividad de algunos grupos que se desea modificar. La protección contra uno u otro de varios agentes inactivantes, (quimiotripsina, glutaraldehído, calor y DTNB), por los sustratos y productos, ha permitido a Wilson (1978, 1979) relacionar diferentes conformaciones inducidas por estos ligandos con el mecanismo cinético de la reacción catalizada por la hexoquinasa de cerebro.

Existe muy poca información acerca de la importancia de los grupos tioles para la actividad catalítica de glucoquinasa. Se sabe que hay 9 residuos de cisteína, tanto en la glucoquinasa de hígado de rata (Holroyde y col., 1976b) como en la de hígado de perro (Maccioni, (1975). Además, se sabe que preparaciones semipurificadas de glucoquinasa hepática pierden su actividad al ser tratadas con reactivos modificadores de grupos tioles, como organomercuriales (p-cloromercuriobenzoato, acetato-fenilmercúrico y p-cloromercuriofenilsulfonato) y reactivos alquilantes (iodobenzoato y N-etilmaleimida) (Salas y col., 1965; Parry y Walker, 1977;

Pilkis, 1972). Recientemente se ha comunicado la modificación de glucoquinasa de hígado de rata con reactivos alquilantes de estructura semejante a la de la glucosa (Connolly y Trayer, 1979b). La enzima pierde la actividad en presencia de alguno de estos reactivos y la inactivación es evitada por la presencia de glucosa y análogos en el medio de reacción. Sin embargo, la relativa independencia de la reacción de modificación con respecto al pH en que se realiza, hace suponer que los residuos de cisteína no son los modificados (Connolly y Trayer, 1979b).

En nuestro trabajo hemos detectado que la reacción con el oxígeno y con DTNB conducen a una inactivación parcial de la glucoquinasa, que es revertida por ditiotreitól. El estudio con DTNB permitió postular su mecanismo de reacción y determinar las constantes de disociación aparentes de algunos ligandos, sustratos y productos, que protegen con diferente eficiencia a la enzima de la inactivación. Los resultados contribuyeron a la mejor comprensión del mecanismo cinético de la reacción glucoquinásica.

La modificación de los residuos de histidina ha sido muy poco estudiada en las hexoquinasas de mamíferos. Se ha observado que tanto la hexoquinasa C de hígado de rana (Ureta, 1976), como la glucoquinasa soluble (Cárdenas y col., 1977) y la glucoquinasa microsomal (Berthillier y Got, 1972) de hígado de rata, pierden actividad al fotooxidarlas en presencia de azul de metileno. La fotooxidación de la glucoquinasa microsomal produce además un cambio en el coeficiente de Hill para glucosa de 2,8 a 1,2, y elimina la inhibición por ATP; disminuyendo el peso molecular desde 120.000 a 55.000 (Berthillier y Got, 1972). La disociación de

la enzima parecería ser la causa de la pérdida de la cooperatividad y del efecto inhibitorio del ATP (Berthillier y Got, 1972). La fotooxidación con azul de metileno y el tratamiento con anhídrido etoxifórmico llevan a una inactivación parcial de la hexoquinasa de levadura, lo que sugiere a Menezes y Pudles (1976) que los residuos de histidina no son esenciales para la actividad de la enzima.

MATERIALES Y METODOS

REACTIVOS

Clorhidrato de glucosamina, hidroclorehidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, CH-Sepharose, CNBr-Sepharose-4B, Sephadex G-100, 2-mercaptoetanol, Ditiotreitól, ATP, ADP, AMP, NADH, NADP, Tris, ácido etilendiaminotetraacético, fosfoenolpiruvato, glucosa-6-fosfato, glucosa 2-desoxiglucosa, N-acetilglucosamina, ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico), glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (tipo VII de levadura), piruvato-quinasa (tipo II de músculo de conejo) y lactato-deshidrogenasa (tipo II de músculo de conejo), fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA.). Anhídrido acético, etilendiamina y las sales inorgánicas fueron obtenidos por Merck AG Darmstadt. Trinitrobenzenosulfonato fue obtenido de Eastman Chemical. DEAE-celulosa (DE-52) y papel cromatográfico DEAE-celulosa (DE-81) fueron obtenidos de Whatman Biochemicals. Tetra-iodo-tetracloro-fluoresceína como sal de potasio (rosa de bengala) fue obtenida de Aldrich Chemical Co., Inc., [U-¹⁴C] ATP (50 µC/mmol) se obtuvo de New England Nuclear.

PREPARACION DE LA GLUCOQUINASA

1. *Fuente de la enzima.* La glucoquinasa fue obtenida de hígado de rata. Las ratas utilizadas eran albinas, de origen Wistar. 24 horas antes

del sacrificio se sometía a las ratas a una dieta rica en hidratos de carbono, adicionando al agua de bebida sacarosa o glucosa (100 g/l). El número de ratas sacrificadas variaba según los requerimientos de enzima, pero normalmente se mataban entre 30 y 60 ratas, por decapitación con una guillotina y se extraía la mayor cantidad de sangre posible. Una vez obtenidos los hígados se depositaban sobre papel filtro para sacarles el máximo de tejido conectivo y se almacenaban en un vaso de precipitados en hielo.

2. *Purificación de la enzima.* Los hígados se homogeneizaban al 50% peso/volumen, en una juguera Waring Blender por 2 minutos con una solución que contenía: fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; KCl 150 mM; DTT 1 mM ó 2-mercaptoetanol 10 mM; glucosa 100 mM (solución A). El homogeneizado se centrifugaba por 30 minutos en una centrífuga Sorvall a 14.600 x g a 4°. El sobrenadante se filtraba a través de lana de vidrio y se centrifugaba por 60 minutos en una centrífuga Spinco a 105.000 x g a 4°. En esta etapa de purificación, la enzima poseía una actividad específica de alrededor de 0,0128 U/mg de proteína. La actividad en esta etapa se calculó con cierta aproximación restando la actividad hexoquinásica de baja Km (determinación de la actividad con 0,5 mM glucosa) a la actividad hexoquinásica de alta Km (determinación de la actividad con 100 mM glucosa). La actividad resultante se dividió por 2 (factor calculado que corresponde a la actividad 6-fosfogluconato-deshidrogenasa) (Babul, 1966).

El sobrenadante se sometía a una cromatografía a través de una columna de DEAE-celulosa (53 cm de altura por 3,6 cm de diámetro), equilibrada con solución A sin glucosa (solución B). La muestra retenida en una columna se lavaba con la solución de equilibrio, aproximadamente con 4 volúmenes de columna, con un flujo de 112 ml/h. La actividad enzimática se eluía con un gradiente de KCl entre 150 y 500 mM con un volumen de 4,3 veces el volumen de resina, al mismo flujo anterior. En esta etapa de purificación se determinaba además de la actividad hexoquinásica, la actividad N-acetilglucosamina-quinasa que aparece habitualmente como contaminante de la glucoquinasa con actividad fosforilante de glucosa; esta actividad es del orden del 15%, determinada con N-acetilglucosamina como sustrato.

La fracción con actividad glucoquinásica obtenida del fraccionamiento en DEAE-celulosa se sometía a una precipitación con sulfato de amonio entre 50 y 80% de saturación en presencia de glucosa 100 mM. El precipitado se guardaba a 4°, quedando como reserva de enzima para ser utilizada durante un período de aproximadamente 3 meses. Este fraccionamiento eliminaba en gran parte la actividad N-acetilglucosamina-quinasa.

La enzima precipitada con sulfato de amonio se disolvía en un mínimo de volumen de solución B y se filtraba a través de una columna de Sephadex G-100, equilibrada con la misma solución B y con KCl variable. La actividad específica de esta etapa dependía de la concentración

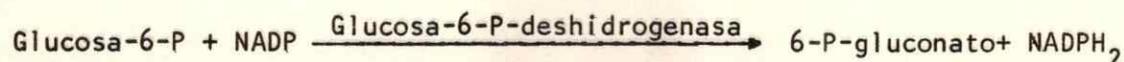
de KCl utilizada: para 100 y 300 mM se obtenía una actividad específica de 0,4 y 2,0 U/mg de proteína, respectivamente. La estabilidad de la enzima también dependía de la concentración de KCl: a baja concentración la actividad de la enzima caía bruscamente en un mes y a alta concentración (300 mM) sólo a los tres meses no presentaba actividad. Parte de la actividad era recuperada, en ambos casos, al tratar la enzima con DTT, entre 5 y 10 mM.

La enzima obtenida de la etapa anterior se diluía con solución B sin KCl hasta una concentración final de KCl 50 mM y se cromatografiaba en una columna de Sepharose-6-aminohexanoil-glucopiranosa (sefarosa-glucosamina), eluyendo la actividad con una concentración de glucosa 1 M. La purificación de la enzima en esta etapa se describirá con mayor detalle en la sección correspondiente a Resultados.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFOTRANSFERASICA

La actividad de la enzima se determinó por medio de tres métodos y en todos, la reacción se inició al agregar la preparación enzimática.

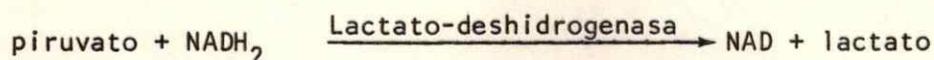
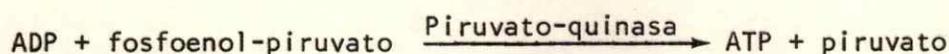
1. *Ensayo espectrofotométrico para determinar glucosa-6-fosfato.* Este ensayo aprovecha la propiedad del glucosa-6-fosfato de ser sustrato de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, la cual cataliza la siguiente reacción:



La producción de un mol de NADPH_2 por mol de glucosa-6-fosfato se aprovecha para cuantificar la cantidad de producto de la reacción catalizada por la glucoquinasa (Slein y col., 1950). Esto se hace midiendo el aumento de absorbancia a 340 nm y calculando el número de moles de NADPH_2 producidos, utilizando el coeficiente de extinción molar ($6220 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$) (Kornberg y Horecker, 1953). Al ser utilizado en la primera etapa de purificación, este ensayo se afecta por la presencia de 6-fosfogluconato-deshidrogenasa que también utiliza NADP como segundo sustrato, teniendo como productos ribulosa-5-fosfato, CO_2 y NADPH_2 .

La determinación de la actividad enzimática para hexoquinasas y glucoquinasa se hacía en cubetas de 1 ml con una mezcla de reacción que contenía: Tris-HCl 80 mM, pH 8,0; MgCl_2 12 mM; EDTA 1 mM; DTT 2,5 mM; KCl 100 mM; NADP 0,5 mM; glucosa a concentración variable; ATP 5 mM; 0,2 unidades internacionales de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa y enzima, para ensayar en un volumen final de 0,5 ml (Niemeyer y col., 1975b). Para la determinación de la actividad hexosa-fosfotransferasa total en extractos crudos, la concentración de glucosa era de 100 mM, y para medir hexoquinasas era de 0,5 mM. La diferencia daba una medida aproximada de la glucoquinasa. Este método se utilizó para determinar la actividad enzimática en las etapas de purificación de la enzima. Para caracterizar la enzima por sus propiedades cinéticas, con glucosa como sustrato glucídico, también se prefirió este método, variando, cuando correspondía, la concentración de los sustratos.

2. *Ensayo espectrofotométrico para determinar ADP.* Este ensayo aprovecha el hecho que el ADP, formado en la reacción hexosa-fosfotransferasa, es sustrato de la piruvato-quinasa, reacción a la cual se le acopla la reacción catalizada por lactato-deshidrogenasa, que tiene como cosustrato NADH_2 (Kornberg y Pricer, 1951). La concentración de este último se conoce al medir espectrofotométricamente la absorbancia a 340 nm. Las reacciones son las siguientes:



El cálculo de la concentración se hace de manera similar al del ensayo descrito anteriormente.

La mezcla de reacción sin la enzima fue preincubada por 3 minutos a 30° para convertir el ADP contaminante en ATP, en un preincubador diseñado por Niemeyer, Cárdenas y Díaz (no publicado). La mezcla de reacción, en un volumen final de 0,5 ml, contenía: Tris-HCl 100 mM; pH 8,0; MgCl_2 12 mM; EDTA 1 mM; KCl 100 mM; PEP 2,5 mM; NADH 0,4 mM; DTT 2,5 mM; 0,4 unidades de lactato-deshidrogenasa y 1 unidad de piruvato-quinasa; las hexosas y el ATP estaban a concentraciones variables de acuerdo con los propósitos del ensayo. Para la determinación de la actividad de la N-acetilglucosamina-quinasa en extractos semipurificados se utilizaba normalmente ATP 5 mM y GlcNAc 2 mM.

La determinación de la actividad enzimática en ambos ensayos espectrofotométricos se hacía en cubetas de 1 ml en un espectrofotómetro Gilford 2400 provisto de aditamentos que permiten trabajar a temperatura constante de 30°.

3. *Ensayo radiactivo para la determinación de ADP.* La separación de ADP desde la mezcla de reacción se hacía por medio de una cromatografía en papel de intercambio aniónico (DE-81). Se cuantificaba directamente desde el papel, para lo cual se contaba su radiactividad en un contador de centelleo líquido (Morrison y Cleland, 1966).

La enzima se incubada a 30° en una mezcla de reacción con un volumen final de 0,25 ml, que contenía: Tris-HCl 80 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; KCl 100 mM; dGlc y ¹⁴C-ATP en concentración variable de acuerdo a los requerimientos del ensayo; la concentración de MgCl₂ se mantuvo constante 1 mM sobre la concentración de los nucleótidos. Durante el transcurso de la reacción se tomaban muestras de 10 µl a tiempos variables y se sembraban en papel, deteniendo la reacción con etanol. La cromatografía se corría a continuación con un solvente que contenía formiato de amonio 0,6 M, pH 3,1, y EDTA 5 mM, a temperatura ambiente. La corrida de las muestras duraba normalmente entre dos y tres horas.

Los valores de R_f encontrados en estas condiciones fueron: 0,16, 0,44 y 0,70 para ATP, ADP y AMP, respectivamente. La región del papel que contenía el ADP se visualizaba mediante luz ultravioleta de onda corta. Los trozos de papel (2,2 x 3,5 cm) que contenían el ADP se

secaban por 10 minutos en una estufa, se ponían en mezcla de centelleo (10 ml) que contenía 4 g de PPO y 50 mg de POPOP por litro de tolueno y se contaban. El tamaño y la forma del papel no influía en el número de cuentas obtenidas. Para calcular la velocidad se restaba al valor obtenido para un tiempo t el valor a tiempo cero minuto. Se hacía la conversión a nanomoles de ADP de acuerdo a la radiactividad específica usada. De cada curva de progreso se calculaba la velocidad a partir de la pendiente.

Para observar si bajo las condiciones del ensayo el ATP se hidrolizaba espontáneamente, se sometió una muestra de ^{14}C -ATP a incubación en presencia de Tris-HCl 100 mM, pH 9,0, a 80° . Hasta los 20 minutos de incubación las cantidades de ATP, ADP y AMP presentes inicialmente, se mantuvieron constantes. Una muestra típica presentaba la siguiente composición: ATP 93%; ADP 4,5%; AMP 2,5%, calculados a partir de la radiactividad encontrada luego de separar los componentes por cromatografía en las condiciones ya descritas. Los resultados obtenidos con esta nueva técnica para determinar actividad glucoquinásica serán presentados en la sección correspondiente a Resultados.

Una unidad de enzima corresponde a la forforilación de 1 μmol de sustrato en 1 minuto en las condiciones de ensayo.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNAS

1. *Preparación de resinas y columnas cromatográficas.* En la preparación y regeneración de las resinas se siguieron las instrucciones señaladas por los fabricantes.

2. *Preparación de Sepharose-6-aminohexanoil-2-amino-2-desoxiglucopiranososa.* 4 g de CH-Sepharose 4B (matriz de Sepharose que ya posee unido el ácido 6-aminohexanoico) se lavaron sucesivamente con un litro de NaCl 1 M y un litro de agua destilada a pH 4,5 y se mezclaron con 20 ml de agua destilada (volumen final 40 ml) que contenía glucosamina y EDC, ambas 0,1 M a pH 4,5. La reacción se dejó transcurrir por 24 horas a 30° con agitación suave. El gel se lavó con una solución de acetato de sodio 0,1 M, pH 3,5 en NaCl 1 M, y luego con NaCl 1 M (100 ml). Esta preparación dió reacción positiva con trinitrobenzeno sulfonato (TNBS) y se denominó Sefarosa I. Con el objeto de acetilar los grupos amino libres, que reaccionaban con TNBS, el gel se suspendió en 20 ml de agua (volumen final 40 ml) y se trató con anhídrido acético (2 ml de anhídrido acético por ml de gel aproximadamente), manteniendo el pH sobre 6,0 con NaOH al 20% y la temperatura a 4°, agregando hielo al baño de reacción. Finalizada la reacción el gel fue lavado con NaOH 0,2 M. La acetilación se repitió hasta que el gel no dió reacción positiva con TNBS y se lavó posteriormente con un litro de HCl 0,2 M durante 30 a 60 minutos. A este derivado se le llamó Sefarosa III (León, 1977).

MODIFICACION QUIMICA

1. *Modificación de grupos tioles con DTNB.* Para eliminar el DTT presente en la preparación de enzima se usaba una columna de DEAE-celulosa (DE-52) (volumen de resina entre 0,5 y 1 ml) equilibrada con una solución que contenía: glicil-glicina 20 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM y KCl 150 mM. Se cargaba la columna normalmente con 0,4 unidades de enzima y se lavaba con 20 ml de la solución de equilibrio. La enzima se eluía con una solución semejante a la de equilibrio, pero con 300 mM de KCl. Se colectaban fracciones de 0,75 ml.

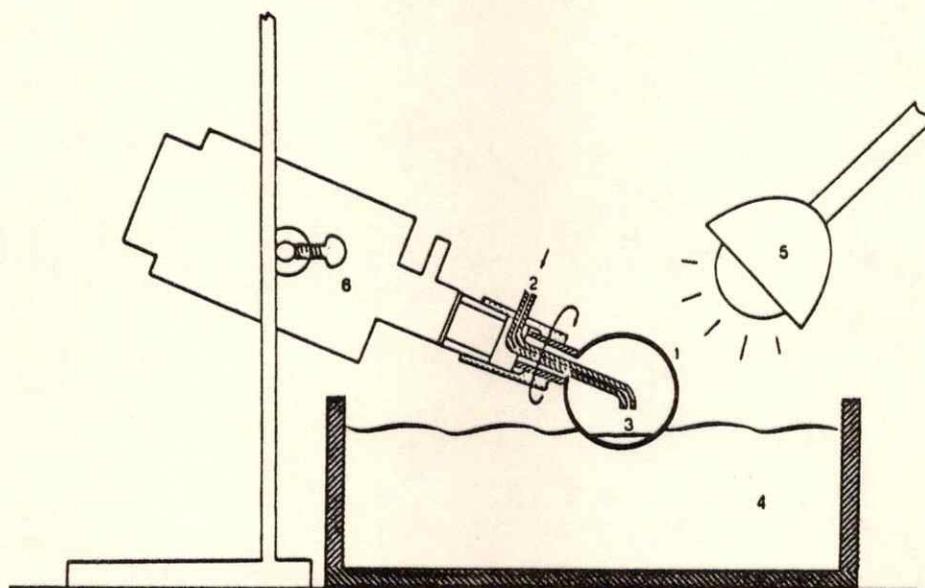
La mezcla de reacción para modificar la enzima contenía en un volumen final de 1 ml: glicil-glicina 50 mM, pH 8,0; KCl 400 mM; EDTA 0,22 mM; aproximadamente 0,4 unidades de enzima; concentraciones variables de DTNB y de algunos ligandos cuando se señala. A diferentes tiempos de iniciada la reacción se retiraban alícuotas (50 μ l) para medir la glucoquinasa remanente por el método de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, utilizando glucosa 100 mM y ATP 5 mM. La curva de progreso de la actividad enzimática era lineal durante los primeros 8 minutos de la reacción a todas las concentraciones de DTNB usadas, lo que constituía una prueba de que la dilución de 10 veces del medio de modificación para el ensayo de actividad y la alta concentración de sustratos determinan la acción del DTNB.

2. *Modificación de residuos de histidina por fotooxidación.* La fotooxidación de residuos de histidina fue efectuada en presencia de rosa de bengala (tetraiodo-tetracloro-fluoresceína) como catalizador (Westhead, 1965). La modificación se efectuó en el aparato descrito en el esquema 1, que corresponde a la adaptación de un evaporador rotatorio. La fuente luminosa (ampolleta de 150 watts) se situó a 10 cm de la solución y la temperatura se mantuvo a 0° con hielo fundente. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; fosfato de potasio 2 mM; KCl 60 mM; DTT 0,2 mM; EDTA 0,3 mM; rosa de bengala y concentraciones variables de glucosa y ATP donde se indica. Las muestras (aproximadamente 100 µl) tomadas a los diferentes tiempos eran extraídas con una jeringa (0,5 ml) a través de la conexión al exterior del aparato. Las muestras se depositaban en un tubo mantenido en hielo y desde allí se tomaban alícuotas de 50 µl para determinar la actividad de la enzima. Para la medición de la actividad enzimática se utilizaba glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa como enzima auxiliar. Las curvas de progreso en el ensayo eran lineales, indicando que durante la medición de la actividad no continuaba el proceso de inactivación.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas se determinó por los métodos de:

1. Lowry y col. (1951) y Miller (1959) y 2. Warburg y Christian (1941).



Esquema 1. Sistema para la fotooxidación. Las partes del sistema son las siguientes: 1. Matraz de reacción (15 ml); 2. Conexión al exterior; 3. Solución reaccionante; 4. Baño con hielo fundente; 5. Fuente luminosa (150 watts); 6. Motor de evaporador rotatorio.

DETERMINACION DE LA PUREZA Y CONCENTRACION DE LOS REACTIVOS

1. *Ditiotreitol (DTT)*. La eventual presencia de la forma oxidada se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro Gilford. El coeficiente de extinción utilizado fue de 273 M^{-1} (Cleland, 1964). La contaminación por DTT oxidado era de aproximadamente 5% en soluciones recién preparadas.
2. *ATP*. Su pureza fue determinada a través de cromatografía en papel de intercambio iónico (DEAE-celulosa, DE-81), descrita anteriormente. Su concentración se determinó espectrofotométricamente a 259 nm, pH 7,0 utilizando un coeficiente de extinción molar de $15,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ (Dawson y col., 1972), en el espectrofotómetro Gilford. La contaminación por ADP y AMP era aproximadamente de un 5% y 3% respectivamente.
3. *Rosa de bengala*. Este reactivo se purificó pasándolo a través de una columna de Dowex 50-X-4 (10 ml) (Hoffee y col., 1967). El colorante eluye en el frente. El espectrograma de la solución eluída desde la columna mostró un máximo a 545 nm, leído contra agua en un espectrofotómetro Cary 17, lo que corresponde al compuesto puro. El coeficiente de extinción molar utilizado fue de $9,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ a 545 nm para determinar la concentración del reactivo (Westhead, 1965).

4. *Acido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB)*. Para caracterizarlo se hizo un espectrograma en la zona ultravioleta (220-340 nm) y del visible (340-600 nm), observándose un máximo a 323 nm como en el compuesto puro. Su concentración se determinaba espectrofotométricamente a 412 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ (Janatova y col., 1968), después de tratarlo con DTT 10 mM.

5. *1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)*. La pureza de este reactivo se determinó registrando su espectro en el infrarrojo y comparándolo con el del reactivo puro y del derivado de urea correspondiente. (Sadtler Standard Spectra). No se encontró contaminación del reactivo por su derivado de urea. El espectrograma se registró en un espectrofotómetro Cary 17.

6. *Glucosa*. Se determinó su concentración con el método de Somogy-Nelson (Somogy, 1945).

7. *2-desoxiglucosa*. Las diferentes concentraciones del azúcar fueron obtenidas por dilución a partir de una solución concentrada (1 M) preparada por pesada del reactivo. La concentración de cada una de las soluciones se comprobó con el método del 3,5 dinitrosalicilato (Bernfeld, 1955).

8. *N-acetilglucosamina y AMP*. Las soluciones de estos compuestos también se prepararon a partir de una solución 1 M. La concentración de AMP se confirmó espectrofotométricamente, midiendo su absorbancia a 259 nm (pH 7,0), utilizando un coeficiente de extinción molar de $15,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}/\text{cm}$ (Dawson y col., 1972) en el espectrofotómetro Gilford.

9. *Glucocuinasa*. Antes de usar la enzima se comprobaban sus parámetros cinéticos con glucosa como sustrato variable y a una concentración de MgATP 5 mM.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La mayoría de las determinaciones experimentales están sometidas a fluctuaciones impredecibles dadas por los aparatos de medida utilizados o por la variabilidad inherente al fenómeno que se está investigando. Por esto se puede decir que las determinaciones experimentales "varían al azar". Para obtener estimaciones seguras con sus medidas de precisión se ha empleado el análisis de la varianza. El método más empleado es ajustar los datos experimentales para dos variables por el método de los mínimos cuadrados. La principal crítica que se puede hacer a este método es que supone una población normalmente distribuida (Cornish-Bowden y Eisenthal, 1974).

En nuestros estudios cinéticos, las medidas de la velocidad fueron hechas en triplicado y siempre tratando de obtener una pendiente en la curva de progreso de alrededor de 45° , para calcular la velocidad inicial directamente desde el papel. Las velocidades también fueron estimadas directamente desde el espectrofotómetro por medio de un microcomputador Altair 8800b, provisto de un programa con el método de regresión lineal, que permitía estimar el valor de la pendiente con su error estándar.

En cada preparación se analizaron las características cinéticas de la enzima, con glucosa como sustrato, estimando el coeficiente de Hill (n_H) y el valor de semisaturación ($K_{0,5}$) a través de un programa, para el microcomputador, que calculaba estos valores por un método iterativo (ver programa 1 del Apéndice B). Se aceptó como normal un valor para el n_H entre 1,4 y 1,6 y un valor para el $K_{0,5}$ entre 3,5 y 5 mM.

El análisis de los resultados cinéticos con dGlc como sustrato, se hizo a través de métodos gráficos, empleando las transformaciones lineales de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934) y de Hanes-Woolf (Woolf, 1932) y sus respectivos gráficos secundarios. Las curvas se ajustaron a los valores experimentales por medio del método de regresión lineal (Wilkinson, 1961), y de aquí se estimaron los valores de las constantes cinéticas. El análisis a través del método de regresión se hizo empleando un programa de computación (ver programa 2 del Apéndice B). En todos los casos se le asignó al peso de los puntos un

valor 1 (Dowd y Riggs, 1965).

El análisis anterior permitió seleccionar la ecuación para cada uno de los resultados cinéticos obtenidos en velocidad inicial, tanto en ausencia como en presencia de los productos y de inhibidores de punto muerto.

El cálculo de las constantes de disociación enzima-ligando, en los estudios de protección a la inactivación por DTNB, se hizo empleando el método de regresión lineal, adaptando el programa 2 (ver Apéndice B) para la ecuación de velocidad de inactivación utilizada en cada caso.

RESULTADOS

PURIFICACION DE LA GLUCOQUINASA

La necesidad de contar con una enzima que no tuviese contaminación con otras actividades enzimáticas que interfirieran en el ensayo de la glucoquinasa, nos llevó a hacer los estudios en las etapas avanzadas de purificación, para eliminar la contaminación con hexoquinasas, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, adenilato-quinasa, adenosina-trifosfatasa y N-acetilglucosamina-quinasa (GlcNAc-quinasa), enzimas que en el laboratorio se ha mostrado que acompañan frecuentemente a la glucoquinasa en el proceso de purificación (Oguchi y col., 1975; Vera y col., 1976; Davagnino y Ureta, 1980; C. Toro y X. Espinoza, comunicación personal). La enzima obtenida después de la etapa de Sephadex G-100 (ver Materiales y Métodos) mostró ocasionalmente una contaminación con GlcNAc-quinasa y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Para eliminar actividades contaminantes se establecieron las condiciones que se describen a continuación para la purificación por cromatografía de afinidad, preocupándonos especialmente de la eliminación de GlcNAc-quinasa.

Cromatografía de afinidad de la glucoquinasa. Con el objeto de establecer la fuerza iónica óptima para la retención de glucoquinasa, se hacía la elución de la enzima retenida con un gradiente de KCl entre 0 y 0,3 M.

En la figura 1 se puede apreciar que con el frente aparecen proteínas sin actividad glucoquinásica en tanto que a una concentración aproximada de KCl de 60 mM comienza la elución de la enzima junto con un pico de proteínas. El pico máximo de actividad (KCl 150 mM), no coincide con el de las proteínas, lo que sugiere un probable arrastre de la glucoquinasa por esas proteínas. La recromatografía del pico de proteínas, contaminado con glucoquinasa confirmó esta suposición, ya que, la actividad glucoquinásica podía separarse parcialmente de las proteínas restantes (Fig. 2).

En la figura 3 se muestra que la glucoquinasa de rana (*Caudiverbera caudiverbera*), enzima también estudiada en el laboratorio (Ureta, 1976), era retenida por el derivado acetilado equilibrado con KCl 50 mM y era eluido con glucosa 1 M. La enzima eluida se purificó bastante llegando a una actividad específica de 33,1 U/mg de proteína. La elución con KCl 0,5 M hace aparecer proteínas sin actividad glucoquinásica. Un comportamiento semejante se observa con glucoquinasa de hígado de rata, por lo que se ha adaptado el método como rutina en la purificación de esta enzima en el laboratorio.

En la figura 4 se observa que la GlcNAc-quinasa también era retenida en Sefarosa III equilibrada con KCl 50 mM. La elución se intentó con varios procedimientos. Con glucosa 1 M eluía tardíamente una pequeña porción de la enzima y con GlcNAc 0,02 M eluía una fracción mayor. Sólo al agregar KCl 0,5 M a la columna, eluía el resto de la enzima retenida. Para analizar mejor el efecto del KCl sobre la elución de la enzima

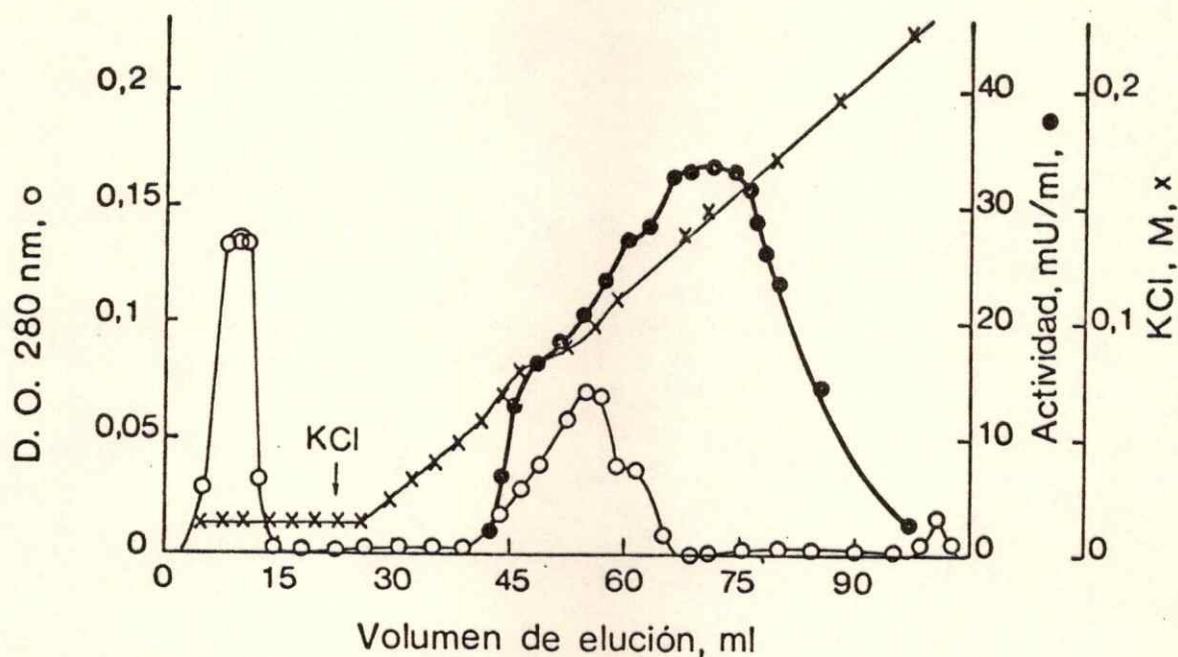


Figura 1. Cromatografía de glucoquinasa en Sefarosa III y elución mediante un gradiente de KCl. 0,62 unidades de glucoquinasa (actividad específica 0,2 U/mg de proteína) en 7 ml de solución A (fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM) fueron cromatografiadas en una columna de Sefarosa III, equilibrada con la misma solución. La enzima fue eluída aplicando un gradiente de KCl de 0 a 0,3 M en solución A.

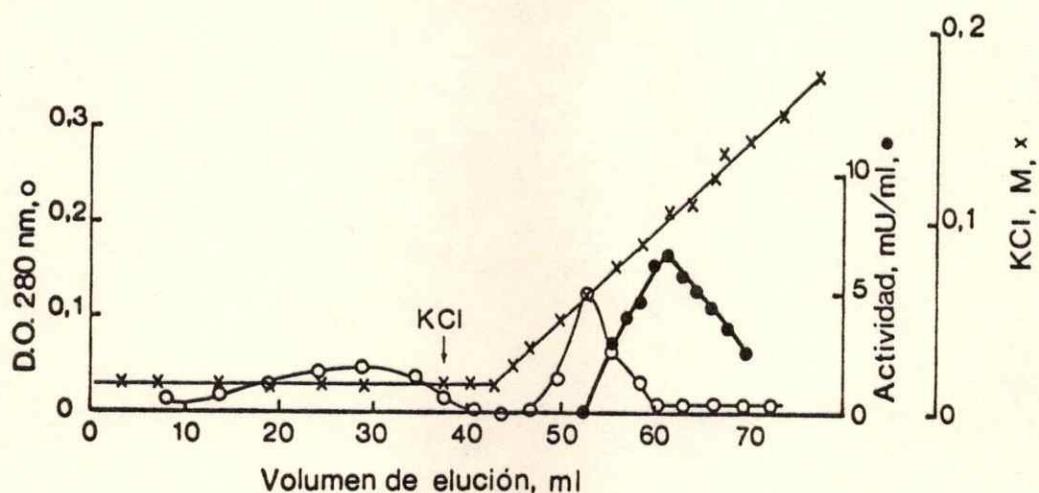


Figura 2. Recromatografía de glucoquinasa en Sefarosa III. 0,23 unidades de glucoquinasa provenientes del pico proteico eluido con el gradiente de KCl (ver figura 1), fueron desaladas en una columna de Sephadex G-25 equilibrada en solución A y cromatografiadas en Sefarosa III equilibrada con la misma solución. La enzima fue eluida aplicando un gradiente de KCl como se describe en la figura 1.

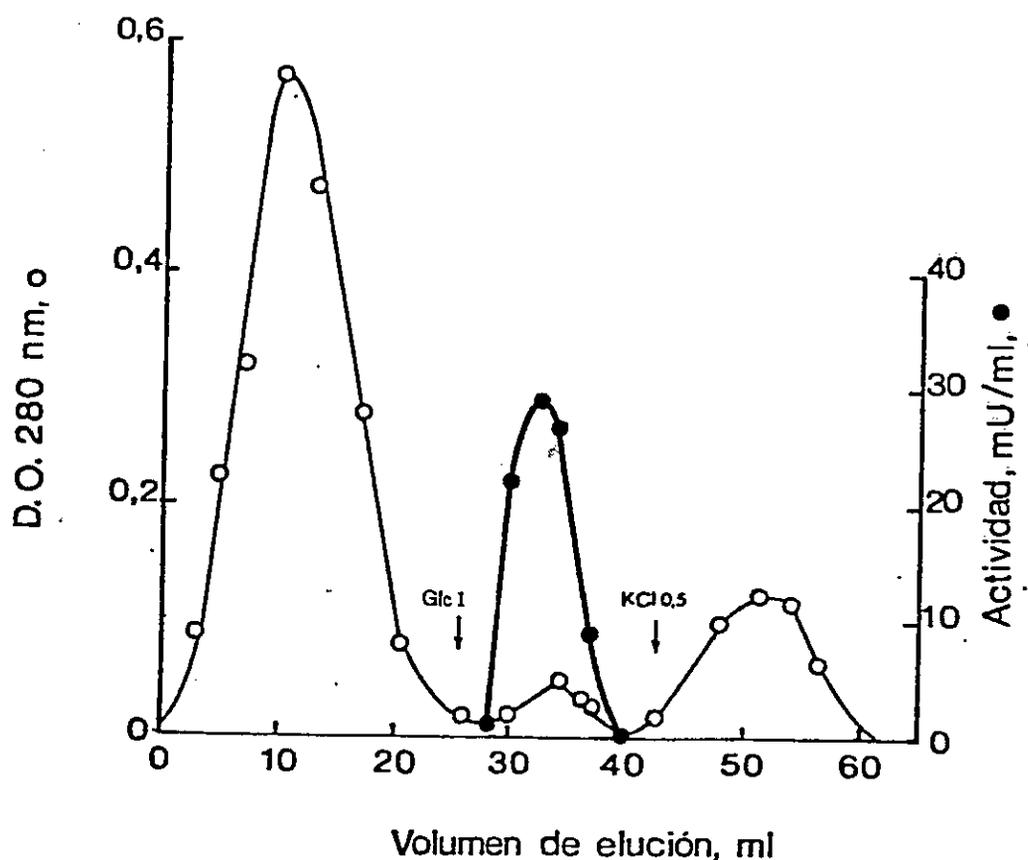


Figura 3. Cromatografía de afinidad de glucoquinasa de rana en Sefarosa III (acetilada). 0,5 unidades de glucoquinasa (actividad específica 0,2 U/mg de proteína) en 12 ml de solución A (ver figura 1) conteniendo KCl 50 mM, fueron cromatografiadas en Sefarosa III equilibrada con la misma solución. Glucosa 1 M y KCl 0,5 M se incluyeron en la solución de equilibrio como eluyentes, donde se indica.

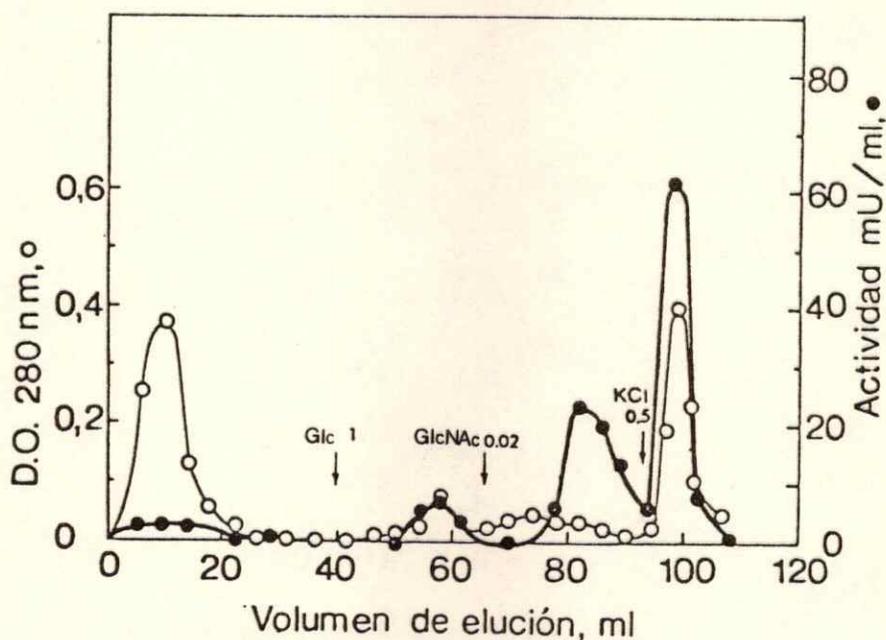


Figura 4. *Cromatografía de GlcNAc-quinasa en Sefarosa III.* 0,5 unidades de GlcNAc-quinasa (actividad específica 0,26 U/mg de proteína) en 8,5 ml de solución A (ver figura 1) conteniendo KCl 50 mM fueron cromatografiadas en una columna de Sefarosa III, equilibrada con la misma solución. Glucosa 1 M, GlcNAc 0,02 M y KCl 0,5 M se incluyeron en la solución de equilibrio como eluyentes, donde se indica.

se aplicó, en otro experimento, un gradiente de KCl de 0 a 0,3 M, observándose que la elución de la GlcNAc-quinasa se iniciaba con KCl 80 mM aproximadamente y salía en un pico muy amplio con un máximo a 150 mM KCl (Fig. 5).

Con el objeto de conocer el comportamiento de una mezcla, a 0,5 unidades de glucoquinasa se agregaron 0,2 unidades de GlcNAc-quinasa y el conjunto se cromatografió. En la figura 6 se observa que ambas enzimas fueron retenidas a una concentración de KCl 50 mM. Pero mientras la glucoquinasa era eluída con glucosa 1 M, la GlcNAc-quinasa quedaba retenida y era eluída en una pequeña proporción con GlcNAc 0,2 M y en su totalidad con KCl 0,3 M.

Resultados que no se muestran probaron que en las condiciones en que la glucoquinasa y la GlcNAc-quinasa eran retenidas en la columna, las hexoquinasas A y B no lo eran (León y col., 1977), de modo que el procedimiento servía también para purificar glucoquinasa de estos contaminantes.

La glucoquinasa obtenida de la etapa de Sefarosa presentó en electroforesis en acrilamida al menos tres bandas nítidas. Al ensayar la actividad fosfotransferásica se observó que sólo una de estas bandas presentaba actividad.

La etapa de cromatografía de afinidad ha sido clave en la purificación de la glucoquinasa (Holroyde y col., 1976b; León, 1977) y se ha seguido separarla de las hexoquinasas y de la GlcNAc-quinasa (Monasterio y col., 1977).

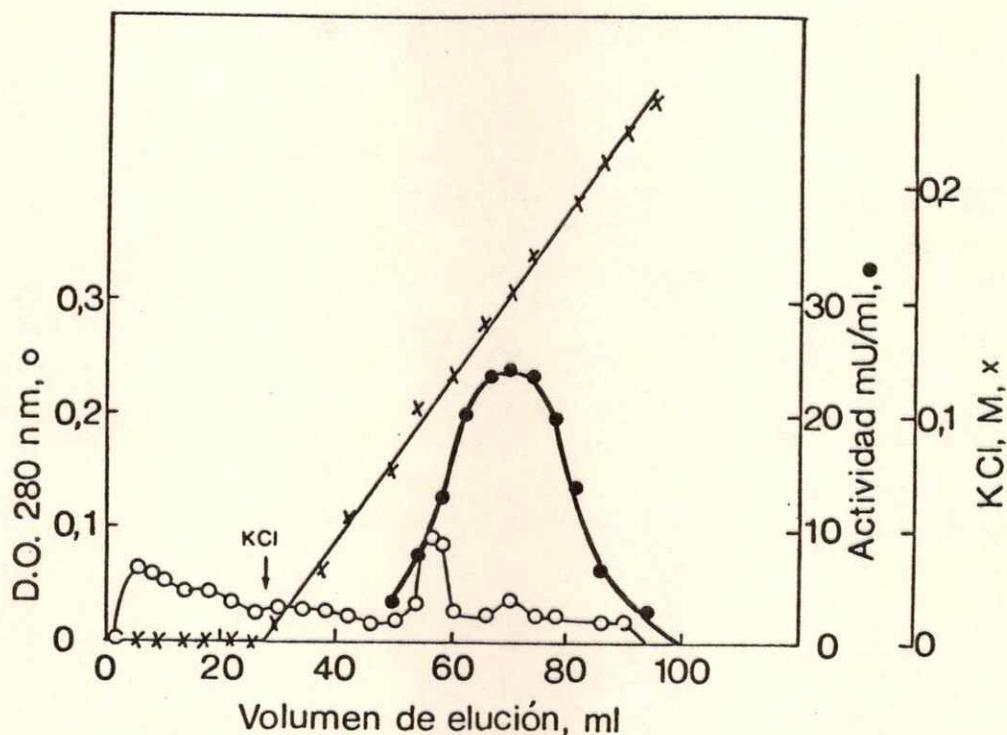


Figura 5. Cromatografía de GlcNAc-quinasa en Sefarosa III y elución mediante un gradiente de KCl. 0,75 unidades de GlcNAc-quinasa (actividad específica 0,7 U/mg de proteína) en 8,5 ml de solución A (ver figura 1), fueron cromatografiadas en una columna de Sefarosa III equilibrada con la misma solución. Luego se aplicó un gradiente de concentración de KCl preparado en solución A.

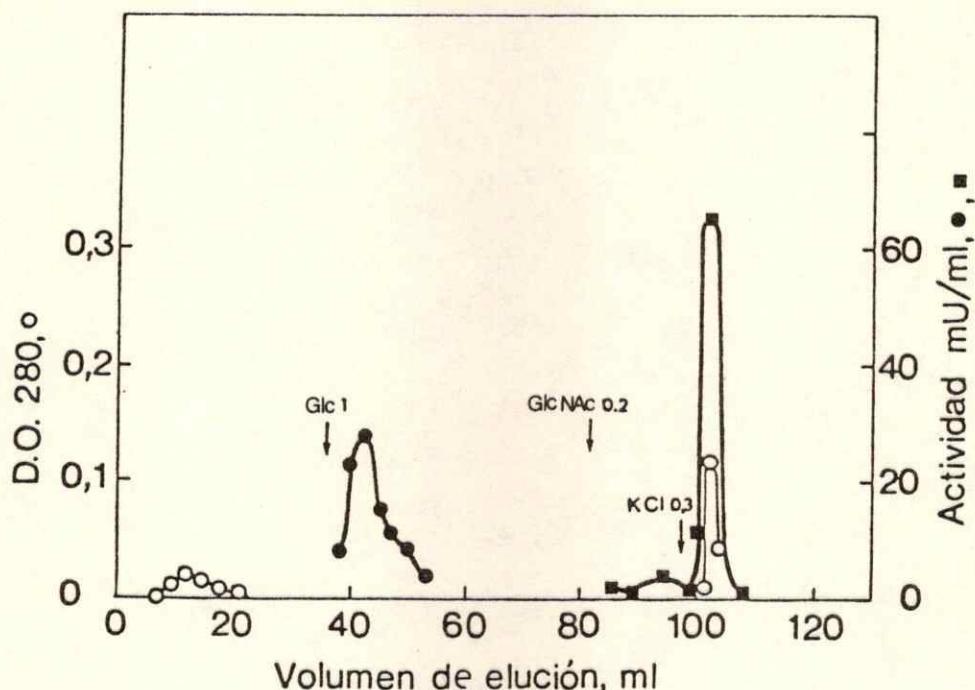


Figura 6. *Chromatografía de glucoquinasa y GlcNAC-quinasa en Separosa III.* 0,5 unidades de glucoquinasa (actividad específica aproximada 33 U/mg de proteína) y 0,2 unidades de GlcNAC-quinasa (actividad específica aproximada 38,4 U/mg de proteína) en 15 ml de solución A (ver figura 1) conteniendo KCl 50 mM fueron cromatografiadas en una columna de Separosa III equilibrada con la misma solución. Glucosa 1 M, GlcNAC 0,2 M y KCl 0,3 M fueron incluidos en la solución de equilibrio como eluyentes, donde se indica. (●) glucoquinasa, (■) GlcNAC-quinasa.

Las hexoquinasas, glucoquinasa y GlcNAc-quinasa poseen en común la propiedad de unir GlcNAc específica y reversiblemente, lo que se ha aprovechado para estudiar el comportamiento de estas enzimas frente a columnas de Sefarosa que poseen glucosamina inmovilizada a través de espaciadores polimetilénicos (Holroyde y col., 1976a).

Los resultados cromatográficos en Sefarosa I muestran interferencias, que causan una retención inespecífica de la glucoquinasa, que hace que la enzima no se eluya con glucosa, pero sí con altas concentraciones de KCl. (León y col., 1976). Las reacciones efectuadas en la preparación de Sefarosa I, permiten la presencia de grupos de amino en el derivado si los grupos carboxilos de la CH-Sepharose reaccionan con los hidroxilos en lugar del amino de la glucosamina. La reacción de la Sefarosa I con TNBS, reactivo específico para aminas primarias, comprobó la presencia de tales grupos. Al acetilar la Sefarosa I con anhídrido acético se obtuvo la Sefarosa III, en la cual la enzima, luego de ser retenida, era eluible con glucosa. La Sefarosa III se comporta como el derivado utilizado por Holroyde y col (1976b), lo que se explica porque estos investigadores hicieron la unión de ligando (glucosamina) al espaciador (ácido 6-aminohexanoico) libre y sólo después unieron el compuesto espaciador-ligando a la matriz.

La fuerte adsorción de la glucoquinasa en Sefarosa III y la sensibilidad a la concentración de sales no pueden ser explicadas sólo por la afinidad de la enzima por el ligando 6-aminohexanoil-2-amino-2-desoxiglu copiranososa (Holroyde y col., 1976a), lo que sugiere la presencia de

fuerzas inespecíficas que contribuyen a reforzar la unión de la enzima a la matriz sustituida. Los resultados con espaciadores menos hidrofóbicos, ácido N-etilsuccinámico (León, 1977) y diglicina (Holroyde y col., 1976b) sugieren que la naturaleza hidrofóbica del espaciador es importante para la unión de la glucoquinasa. Una diferencia de las diversas Sefarosas empleadas debida a posibles interacciones iónicas que pueden establecerse entre la proteína y los grupos iminos resultantes del acoplamiento de los espaciadores (Nishikawa y Bailon, 1975), no parece probable. A pH 7.0 tales grupos se encontrarían cargados en los tres derivados que comentamos.

La retención de GlcNAc-quinasa en Sefarosa III no parece ser sólo por afinidad respecto a su sustrato, sino más bien el resultado de una mezcla de efectos. En efecto, la enzima no es eluída con glucosa (un mal sustrato) y sólo una fracción de ella lo es con GlcNAc, requiriéndose alta concentración de KCl (0,5 M) para eluir el resto. Esto indicaría probables interacciones con el espaciador de la Sefarosa.

Las hexoquinasas A y B no son retenidas en Sefarosa III a una concentración de KCl 50 mM (León y col., 1977). Este comportamiento permite fácilmente separar ambas hexoquinasas de glucoquinasa y de GlcNAc-quinasa, pues éstas últimas son retenidas a esta concentración de KCl.

Estudios sobre la estabilidad de la glucoquinasa. La rápida desaparición de la actividad glucoquinásica en las primeras etapas de purificación podría deberse a la acción de enzimas proteolíticas. Sin embargo, la

adición a extractos crudos de hígado de cerdo de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMFS), que es un inhibidor de las serina-peptidasas, no fue efectivo en la protección de la glucoquinasa (Rose, 1976). Para mantener la actividad de la glucoquinasa es necesaria la presencia de KCl, de glucosa y de protectores de grupos tioles (DTT, 2-mercaptoetanol ó N-acetilcisteína) (Salas y col., 1965; Parry y Walker, 1966; Babul y Niemeyer, 1966; González y col., 1967; Maccioni, 1975). Sin embargo, la enzima es estable hasta por 3 meses cuando se guarda precipitada en sulfato de amonio a 4°, en presencia de glucosa. Otros investigadores (Babul y Niemeyer, 1966; Parry y Walker, 1966), registrando la actividad sólo durante algunos días, también han encontrado una buena estabilidad de la enzima en estas condiciones. Debe tenerse cuidado en esta etapa de observar las propiedades cinéticas y de peso molecular de la enzima almacenada, ya que Niemeyer y col. (1975b) describieron polimerización y cambios en los parámetros cinéticos (n_H para glucosa) de la enzima envejecida.

En la etapa de purificación en Sephadex G-100 (ver Tabla I), la enzima es estable hasta por tres meses, si se almacena a 4° en la solución de elución de la enzima (ver Materiales y Métodos). La estabilidad es dependiente de la concentración de KCl; si esta se baja a 100 mM, la actividad se pierde en un mes. Preparaciones enzimáticas en esta etapa envejecidas por uno o dos meses presentaban insensibilidad al DTNB, aunque conservaban su actividad (Monasterio y col., 1979a).

TABLA I

Purificación de la glucoquinasa de hígado de rata

Procedimiento	Unidades totales	Proteínas totales	Actividad específica	Rendimiento %
Homogeneizado	-	-	-	-
Extracto crudo	287,0	22370	0,013 ¹	-
DEAE-celulosa	142,8	608	0,24	50
Sulfato de amonio 45-80%	-	-	-	-
Sephadex G-100	77,5	101	0,77	-
Sefarosa ³	6,5	-	- ²	83
Concentración DEAE-celulosa	5,4	0,15	36	71

¹La actividad glucoquinásica en esta etapa es sólo aproximada, pues se determina como la diferencia entre la actividad con glucosa 100 y 0,5 mM.

²La actividad específica no se determinó en esta etapa debido a la baja concentración de proteínas.

La glucoquinasa era obtenida de hígado de rata, como se indicó en Materiales y Métodos. Las tres primeras etapas de purificación eran consecutivas y la enzima se almacenaba en la etapa de sulfato de amonio. La actividad de la fracción enzimática en sulfato de amonio no se medía. En la etapa de Sephadex G-100 la actividad específica variaba entre 0,4 y 2 U/mg de proteína de una preparación a otra. La cantidad de enzima purificada por Sefarosa era usualmente entre 7 y 8 unidades.

³Sepharose-6-aminohexanoil-2-amino-2-desoxiglucopiranososa.

En etapas más avanzadas de purificación aumentaba la inestabilidad de la glucoquinasa. Así, después de Sefarosa (Tabla I), la enzima diluída (0,15 U/ml) era estable sólo por pocas horas, aún en presencia de glucosa. En la figura 7 se muestra la curva de estabilidad correspondiente a una preparación concentrada proveniente de Sefarosa la cual se inactivaba rápidamente. En 15 días de almacenamiento a 4° perdió un 30% de la actividad inicial y al mes estaba totalmente inactiva. En otra preparación, en la cual se midió por primera vez la actividad luego de una semana de almacenamiento en las mismas condiciones, se encontró sólo un 1% de pérdida de actividad, en vez del 17% de pérdida en el mismo tiempo en la enzima de la figura 7. Estos resultados y otros que se presentarán más adelante, parecen indicar que la aireación de la enzima, al sacar las alícuotas para hacer las determinaciones de la actividad, aceleraba su inactivación.

Glicerol como estabilizante. El glicerol ha mostrado ser un excelente estabilizante de la enzima. La figura 8 ilustra el efecto del glicerol sobre la estabilidad de una glucoquinasa de hígado de cerdo (actividad específica 0,68 U/mg de proteína). La enzima fue purificada en columnas de DEAE-celulosa, equilibradas con soluciones salinas que contenían concentraciones variables de glicerol (de 0 a 20%). Las fracciones con actividad enzimática se guardaron por 8 días a 4°, haciéndose determinaciones periódicas (Rose, 1976). A los 8 días la muestra con 5% de glicerol mantuvo aproximadamente el 68% de su actividad, mientras que en la con 20%

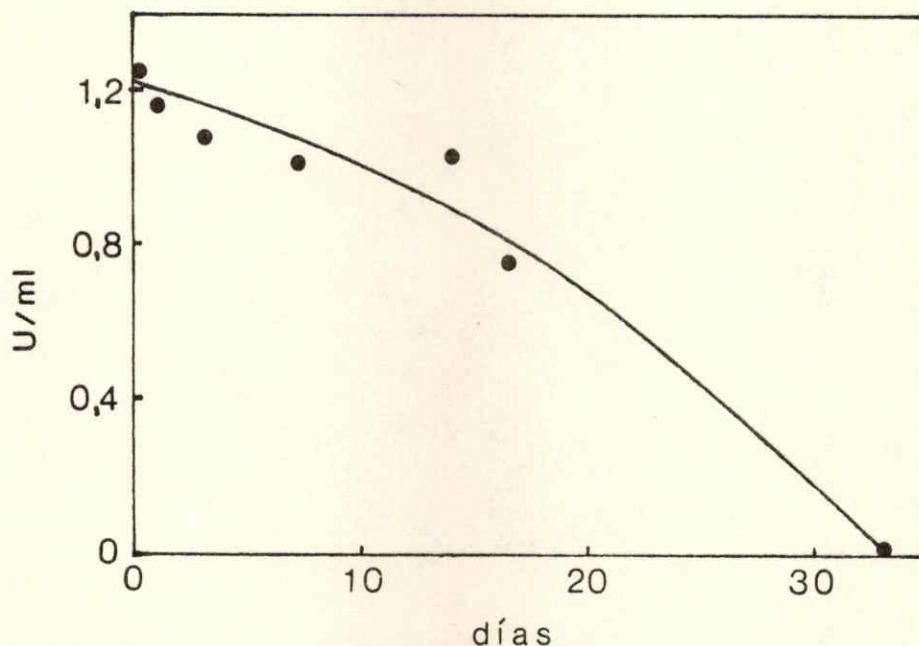


Figura 7. Estabilidad de la glucoquinasa de hígado de rata después de su purificación mediante cromatografía de afinidad. La glucoquinasa proveniente de esta etapa de purificación (actividad específica 35,5 U/mg de proteína) se concentró hasta 1,24 U/ml en una columna de DEAE-celulosa (DE-52) (volumen de resina 5 ml), y se mantuvo a 4° en una solución que contenía: fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0; KCl 300 mM; EDTA 1 mM y DTT 1 mM. La actividad enzimática se detectó espectrofotométricamente, usando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (ver Materiales y Métodos).

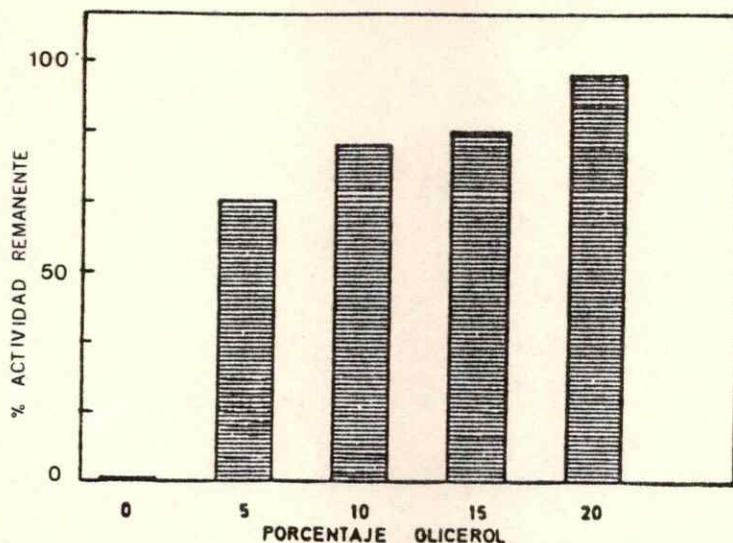


Figura 8. Efecto del glicerol sobre la actividad de la glucoquinasa obtenida desde columnas de DEAE-celulosa. Se prepararon 5 columnas equilibradas en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; $MgSO_4$ 4 mM; 2-mercaptoetanol 4 mM; EDTA 1 mM, conteniendo 0, 5, 10, 15 y 20% glicerol respectivamente. El gráfico indica el porcentaje de actividad remanente respecto al tiempo cero, al octavo día de haber obtenido las fracciones activas de dichas columnas y de permanecer guardadas a 4°.

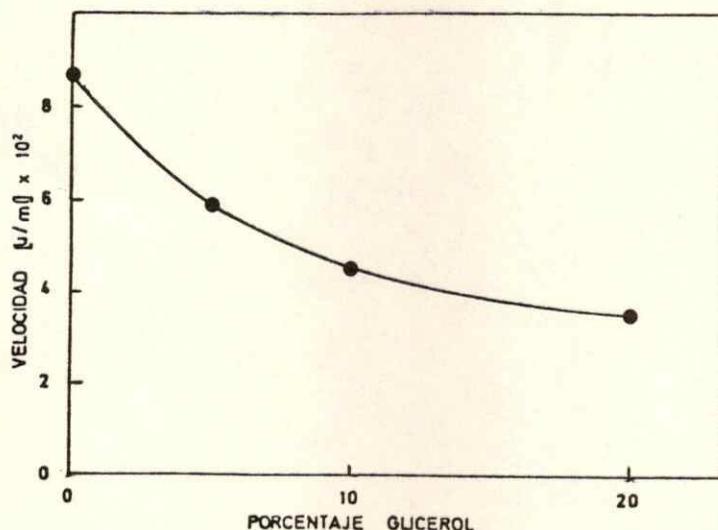


Figura 9. Efecto del glicerol sobre la actividad glucoquinásica. Al medio de reacción de medida de la actividad (con gluco-6-fosfato-deshidrogenasa) descrito en Materiales y Métodos, se agregó glicerol para obtener concentraciones finales en la cubeta de 5, 10 y 20%, determinándose la velocidad inicial de la reacción.

de glicerol su actividad no varió mayormente con respecto al tiempo cero. En las muestras con 10 y 15% de glicerol se obtuvieron valores intermedios. El control sin glicerol no presentó actividad.

La presencia de glicerol, en el ensayo de la actividad glucoquinásica producía inhibición, como se observa en la figura 9. Una concentración de glicerol de 20% producía una inhibición de un 41% con respecto al control. Hay que hacer notar que la concentración de glicerol que se obtendría en el medio de ensayo no sobrepasaría el 1% si la preparación a ensayar tuviera glicerol al 20% y se tomaran 25 μ l para la medición. A esta concentración la inhibición es despreciable.

El glicerol como agente estabilizante de enzimas es ampliamente conocido, sin embargo, el mecanismo de protección ha sido poco estudiado en cada caso. En la ribonucleasa, una enzima de estructura muy conocida, ha sido posible estudiar el efecto de este polialcohol a través de la desnaturación reversible de la enzima (Gerlisma, 1968). El estudio ha permitido postular que el efecto estabilizante del glicerol se debería principalmente al reforzamiento de las interacciones hidrofóbicas y a la menor ruptura de enlaces de hidrógeno de la proteína ocasionada por el medio.

La estabilización de la glucoquinasa por glicerol fue observada por primera vez en una preparación de hígado de cerdo por Rose (1976). Este efecto protector también ha sido observado en la glucoquinasa de hígado de rata por Holroyde y col. (1976b). En sus preparaciones más

purificadas (actividad específica 150 U/mg de proteína) observan sólo un 10% de pérdida de la actividad después de almacenar la enzima de 6 a 8 semanas a 4° en 20% de glicerol. En nuestro laboratorio se ha encontrado que el glicerol al 5% no mejora el rendimiento de la etapa de purificación en DEAE-celulosa de la glucoquinasa de hígado de rata, pero es capaz de mantener su actividad aproximadamente durante una semana. El glicerol al 20% ha sido probado durante la purificación en las etapas de Sefarosa, concentración a través de membranas de Amicon y cromatografía en DEAE-Sephadex, etapa posterior a la de Sefarosa, encontrándose en todos los casos que el rendimiento es casi de un 100% (comunicación personal de C. Toro y X. Espinoza).

Si se acepta que el efecto del glicerol sobre la glucoquinasa reside en un reforzamiento de las interacciones hidrofóbicas y de los puentes de hidrógenos, se comprende que se favorezca una conformación más estable de la enzima que podría, por ejemplo, hacer a los grupos tioles menos susceptibles a una oxidación espontánea y a la acción del DTNB (ver más adelante el efecto del glicerol en "Modificación Química"). La estabilización de una única forma de la enzima podría explicar el cambio en el coeficiente de Hill para glucosa de 1,45 a 1 en presencia de glicerol al 30% (Connolly y Trayer, 1979b).

Efecto estabilizante del bisulfito de sodio. En etapas tempranas de la purificación, el bisulfito de sodio, en presencia de N-acetilcisteína, se comportó como estabilizante de la glucoquinasa. En la figura 10 se muestra el porcentaje de actividad remanente de una preparación cruda de glucoquinasa de hígado de perro en presencia de bisulfito 10 mM y en su ausencia. Se observa que en presencia del reactivo se alcanzó a las 30 horas una activación de aproximadamente un 20% y luego decayó la actividad de la enzima con un $t_{1/2}$ aproximado de 22 hr. Este valor fue mayor que el del control, de alrededor de 11 h., indicando que aún después de la activación hay protección de la enzima.

La activación de la enzima puede ser explicada por el aumento del poder reductor en la solución de almacenamiento, que podría producir la ruptura de puentes S-S de la enzima oxidada durante la preparación del extracto. Ha sido descrito que el bisulfito en presencia de cantidades catalíticas de reactivos tioles y O_2 produce la ruptura de enlaces disulfuros intramoleculares con la formación de derivados S-sulfonados (Cole, 1967). La posible formación de estos derivados en la glucoquinasa podría explicar la mayor estabilidad de la enzima luego de la reactivación.

MODIFICACION QUIMICA

La modificación química de residuos de aminoácidos ha sido empleada ampliamente en la investigación de la estructura de proteínas, así como de las interacciones entre macromoléculas y de los mecanismos

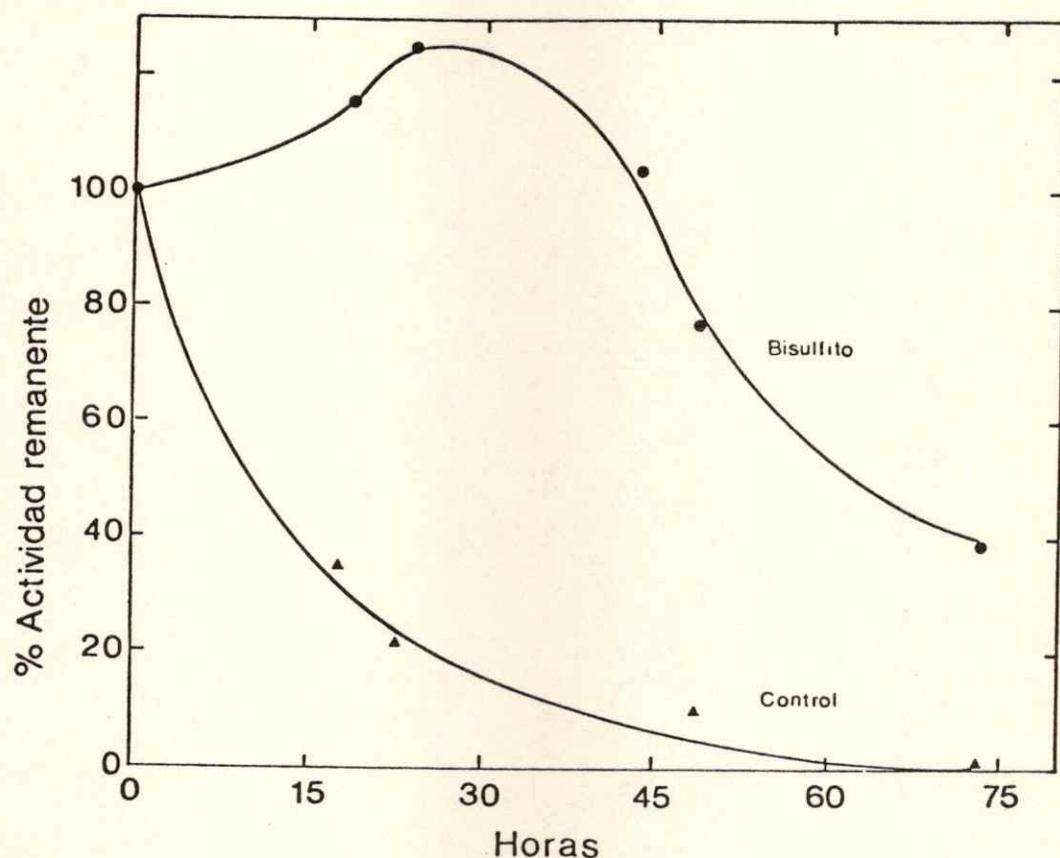


Figura 10. Efecto protector de bisulfito de sodio sobre la actividad de la glucoquinasa. Se utilizó el líquido sobrenadante después de la centrifugación a $105.000 \times g$ de un homogeneizado al 50% v/v de hígado de perro que contenía: Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; KCl 100 mM; EDTA 1 mM; N-acetilcisteína 4 mM; bisulfito de sodio 10 mM. En el control se omitió el bisulfito de sodio. El sobrenadante se mantuvo a 4° durante el transcurso del experimento.

catalíticos de las enzimas. Ella ha permitido, mediante el uso de reactivos selectivos, identificar residuos de aminoácidos en el sitio activo o en sitios regulatorios de las enzimas (para revisiones ver: Shaw, 1970; Cohen, 1970; Sigman y Mooser, 1975). Además, la protección por ligandos de la inactivación por modificación química de enzimas, ha sido aprovechada para precisar el mecanismo cinético de la reacción (Südi, 1970; Wilson, 1978; Wilson, 1979).

Fotooxidación de residuos de histidina. El cambio de velocidad máxima y de $K_{0.5}$ de la glucoquinasa en función del pH (González y col., 1967; Cárdenas y col., 1979) sugiere la presencia de un grupo ácido de pK aproximadamente 7, importante para la actividad enzimática que podría ser histidina. Uno de los métodos para modificar residuos de histidina en una proteína consiste en su oxidación, catalizada por un colorante. Algunas enzimas fosforilantes de glucosa han sido estudiadas en cuanto a los efectos de la fotooxidación, catalizada por medio del colorante catiónico azul de metileno, sobre algunas propiedades cinéticas. Así, la hexoquinasa C de hígado de anfibio pierde la capacidad a ser inhibida por exceso de glucosa (Ureta, 1976); la forma pesada de la glucoquinasa microsomal (PM 120.000) de hígado de rata se convierte en la liviana (PM 55.000) y pierde la capacidad de ser inhibida por ATP y la sigmoidicidad para glucosa (Berthillier y Got, 1972); y la glucoquinasa soluble de hígado de rata disminuye la velocidad máxima, aumenta el $K_{0.5}$ y no varía el

coeficiente de Hill (Cárdenas y col., 1979).

El azul de metileno y otros reactivos han sido usados ampliamente con la intención de modificar residuos de histidina en varias enzimas (para revisión, ver Cohen, 1968). Sin embargo, su selectividad ha sido cuestionada, pues otros residuos, como cisteína, metionina, triptófano y tirosina, pueden también oxidarse, dependiendo de las condiciones del ensayo en cuanto a pH, temperatura, bloqueo de algunos grupos funcionales, etc. Otro inconveniente es la producción de reacciones laterales con reactivos del medio, como el amortiguador Tris-HCl y el EDTA, que pueden oxidarse lentamente, llevando a una interpretación errónea de los resultados (Westhead, 1972). El colorante rosa de bengala muestra gran selectividad hacia histidina, debido a su carácter aniónico, especialmente si se opera a pH neutro. A pH sobre 8 los grupos sulfhidrilos son especialmente susceptibles a la oxidación y la tirosina comienza a ser oxidable. Por otro lado, la forma protonada de la histidina es resistente a la oxidación (Westhead, 1965).

Cinética de la fotooxidación. La cinética de fotooxidación de la glucoquinasa con rosa de bengala se estudió con una enzima purificada hasta la etapa de Sefarosa. Para analizar la cinética de fotooxidación se colocaban los datos experimentales en gráficos semilogarítmicos de la actividad remanente en función del tiempo. Tanto en presencia como en ausencia del colorante, se observaba una rápida inactivación, que conducía hasta un 50% de pérdida de la actividad en aproximadamente tres minutos. La rápida

inactivación inicial puede deberse al efecto de algún metal pesado, pues al diluir la enzima en el medio de reacción sin EDTA, bajaba la concentración del quelante desde 1 mM en la preparación enzimática, a 0,06 mM. Resultados que no se muestran indicaron que al aumentar la concentración de EDTA en el medio de reacción a 1 mM la inactivación casi desaparecía. Por esta razón se omitió esta rápida inactivación inicial en el análisis de la cinética de inactivación por fotooxidación. El uso de amortiguador fosfato pH 7 o Tris-HCl pH 8 no tuvo influencia sobre la cinética de inactivación. La figura 11 muestra que al iluminar en ausencia del colorante hay una ligera inactivación de la enzima, que es de pseudo-primer orden hasta los 60 minutos y tiene una constante de inactivación de $0,01 \text{ min}^{-1}$. El minuto cero corresponde al tiempo en que había concluido la rápida inactivación inicial dependiente de la concentración de EDTA. En presencia del colorante se observa una cinética bifásica, donde la primera fase dura aproximadamente 25 minutos y tiene una constante de inactivación de pseudo-primer orden $k_i^1 \text{ obs}$, sin corregir por la segunda, de $0,045 \text{ min}^{-1}$ y la segunda fase tiene una constante de inactivación de pseudo-primer orden de $k_i^2 \text{ obs}$ de $0,018 \text{ min}^{-1}$. Al corregir la primera fase por la segunda, se obtiene un valor para $k_i^1 \text{ correg.}$ de $0,14 \text{ min}^{-1}$.

Protección por los sustratos. La presencia simultánea de ambos sustratos de la enzima, glucosa y MgATP, a concentraciones saturantes, tenía un efecto protector, tanto sobre el control sin colorante como sobre la fotooxidación de la enzima (Fig. 11). En la tabla II se resumen los valores

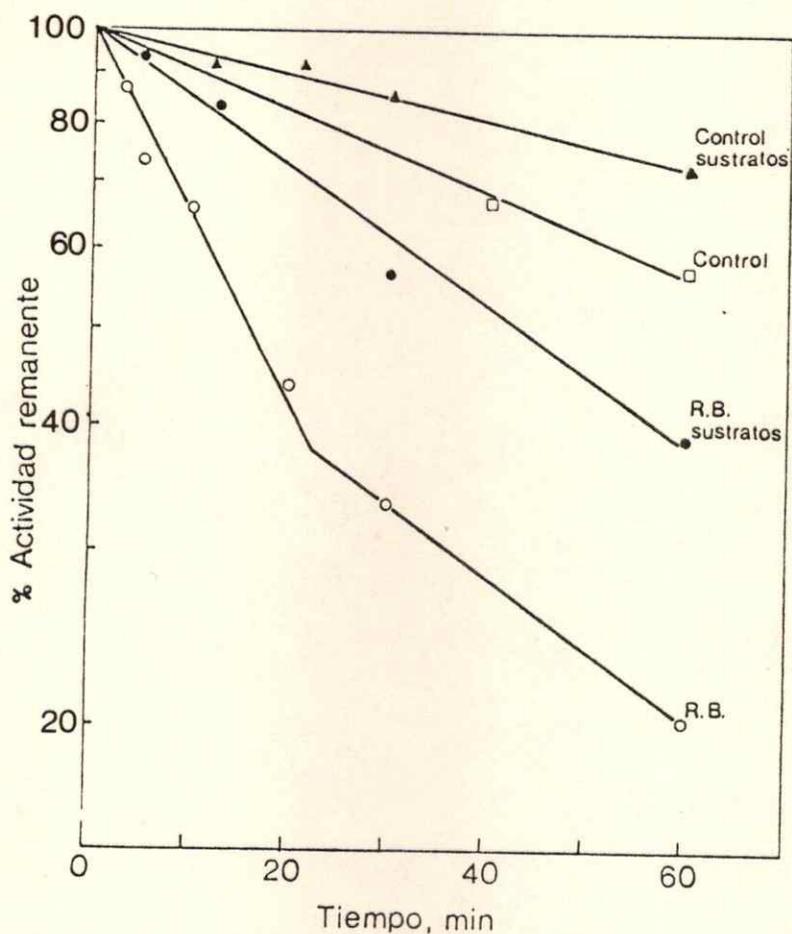


Figura 11. Cinética de inactivación de la glucoquinasa por fotooxidación con rosa de bengala, en presencia y ausencia de los sustratos. La mezcla de reacción contenía: Tris-HCl 90 mM, pH 8,0; rosa de bengala (R.B.) 6×10^{-5} mM; EDTA 0,06 mM; DTT 0,06 mM; KCl 60 mM y 0,1 unidades de glucoquinasa provenientes de la etapa de Sefarosa (actividad específica 31,1 U/mg de proteína). Las concentraciones de los sustratos MgATP y glucosa fueron 5 y 100 mM respectivamente. En los controles se hacía la iluminación en ausencia del colorante. El procedimiento experimental se detalla en Materiales y Métodos.

TABLA II

Protección por sustratos de la fotooxidación de glucoquinasa de hígado de rata.

Adición	Constante de inactivación k_i^1 obs en min^{-1}
Nada	0,010
MgATP + Glc	0,005
R.B. ¹	0,045
R.B. + MgATP + Glc	0,016

Los ensayos de actividad fueron realizados como se describe en la figura 11. Las concentraciones de ATP y glucosa fueron 5 y 50 mM respectivamente. La concentración de MgCl_2 fue de 5 mM.

¹R.B. = rosa de bengala.

de las constantes de inactivación de pseudo-primer-orden (k_i^1 obs). La protección por los sustratos [$100 (k_i^1$ obs con sustr. - k_i^1 obs sin sustr.) / k_i^1 obs sin sustr.] fue de 65%.

Para precisar si la protección se debía a sólo uno de los sustratos, se estudió la inactivación en ausencia de sustrato y en presencia de cada uno por separado y en conjunto, comparándose los valores de la actividad residual a los 60 minutos de inactivación, con respecto a los controles con los mismos componentes en ausencia de rosa de bengala. En la figura 12 se observa que ATP, pero no glucosa tiene efecto protector. Mg^{2+} parece no influir sobre la fotooxidación, pues MgATP presenta un efecto protector similar al de ATP. En otras quinasas no ha sido estudiado, a nuestro conocimiento, el efecto del ATP sobre la fotooxidación. Sin embargo, se ha encontrado que la fosfofructoquinasa (Setlow y Mansour, 1970) y la glucoquinasa microsomal (Berthillier y Got, 1972), al ser fotooxidadas pierden su capacidad de ser inhibidas por ATP. Esto podría sugerir una relación entre el residuo de aminoácido oxidado y la unión del ATP.

Como la glucoquinasa necesita para su estabilidad de la presencia de KCl y de protectores de tioles, entre otros, se probó si la baja concentración de estos protectores en el medio de reacción podía contribuir a la inactivación de la enzima por la fotooxidación. La concentración de KCl entre 60 y 300 mM no tuvo efecto significativo sobre la cinética de inactivación. La incubación de la enzima con DTT 10 mM por 30 minutos,

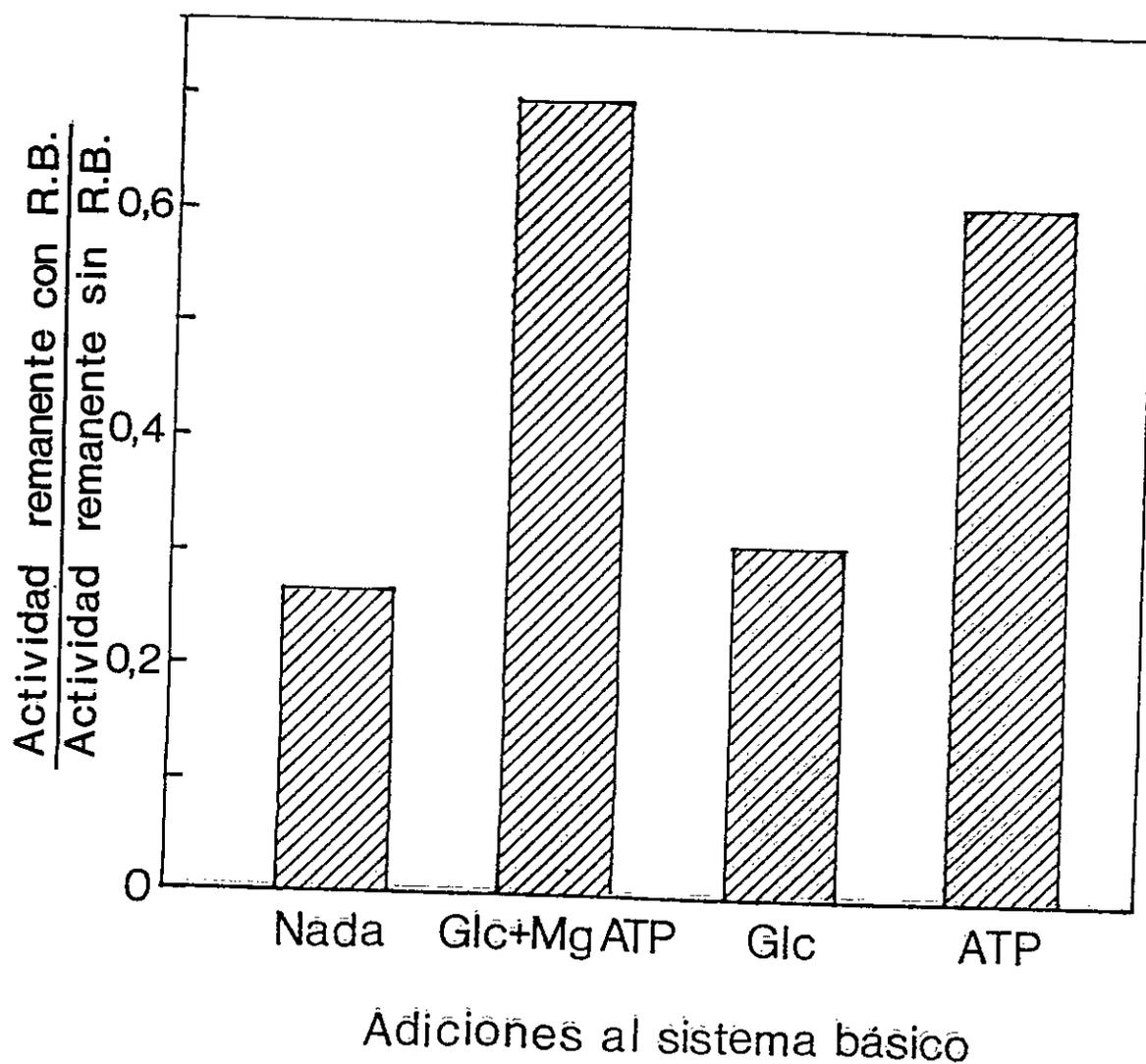


Figura 12. Efecto protector de los sustratos sobre la fotooxidación de la glucoquinasa por rosa de bengala. El medio de reacción y la concentración de los sustratos fueron iguales a los descritos en la figura 11. La actividad remanente fue medida a los 60 minutos de iniciada la reacción. El efecto de la fotooxidación se expresa como el cociente entre las actividades remanentes en soluciones de igual composición con rosa de bengala (R.B.) y sin R.B.

al tiempo cero y después de 80 minutos de fotooxidación, no produjo reactivación de la enzima, indicando la ausencia de grupos tioles oxidados que fuesen reducidos por el DTT.

Estudio de los residuos de cisteína. Este estudio se realizó utilizando dos preparaciones con diferente actividad específica. Inicialmente se usó una enzima proveniente de la etapa de cromatografía de afinidad (Sefarosa) (actividad específica alrededor de 30 U/mg de proteína), y más tarde, preparaciones provenientes de la etapa de purificación de Sephadex (actividad específica alrededor de 1,5 U/mg de proteína). Esto resultó del hecho que la enzima más pura se inactivaba espontáneamente al diluir la enzima en ausencia de los protectores de grupos tioles (DTT o 2-mercaptoetanol) que habían acompañado a la enzima durante su purificación. Se decidió entonces realizar la modificación de residuos de cisteína con DTNB, en la preparación de menor actividad específica. En otros estudios sobre modificación química, probablemente de residuos de cisteína, de glucoquinasa y de hexoquinasa B, altamente purificadas, ha debido realizarse el tratamiento de la enzima en presencia de glicerol (Connolly y Trayer, 1979b) o glucosa (Connolly y Trayer, 1979a), respectivamente. Mostraremos primero los resultados sobre inactivación por dilución, que parecen corresponder a una oxidación por oxígeno.

Oxidación espontánea. En estos estudios preliminares se usó la glucoquinasa purificada hasta la etapa de Sefarosa. En ausencia de protectores

de grupos tioles, se observa con esta preparación una rápida pérdida de la actividad glucoquinásica al diluir la enzima en un medio en que se haría eventualmente el tratamiento con reactivos de tioles. Esta inactivación se sobrepone a la inactivación de la enzima concentrada, como se observa en la figura 13. La reacción sigue una cinética donde puede distinguirse una fase rápida, de 4 a 5 minutos de duración, seguida de al menos otra fase lenta hasta alcanzar aproximadamente un 40% de la actividad inicial. Las constantes de inactivación de la primera fase ($k_{i \text{ obs}}^1$), obtenidas de las diluciones hechas a los 9, 35, 61 y 86 minutos después de la eliminación del DTT, fueron 0,058, 0,058, 0,048 y 0,070 min^{-1} , respectivamente.

Reactivación por DTT y protección por sustratos. La inactivación espontánea en ausencia de protector de tioles era revertida completamente al agregar DTT, lo que es un buen indicio de que ella corresponde a una oxidación de residuos de cisteína de la enzima. En la figura 14 se observa que la inactivación realizada en presencia como en ausencia de glucosa es revertida por DTT. El ensayo de inactivación se hizo según un protocolo similar al de la figura 13, lo que explica que en ausencia de glucosa la recuperación supere el 100% pues hubo una inactivación previa al ensayo, que también es revertida por el DTT. La inactivación fue bifásica, con una constante de inactivación $k_{i \text{ obs}}^1$ en presencia de glucosa de 0,095 min^{-1} y una $k_{i \text{ obs}}^1$ del control de 0,088 min^{-1} . Estos resultados

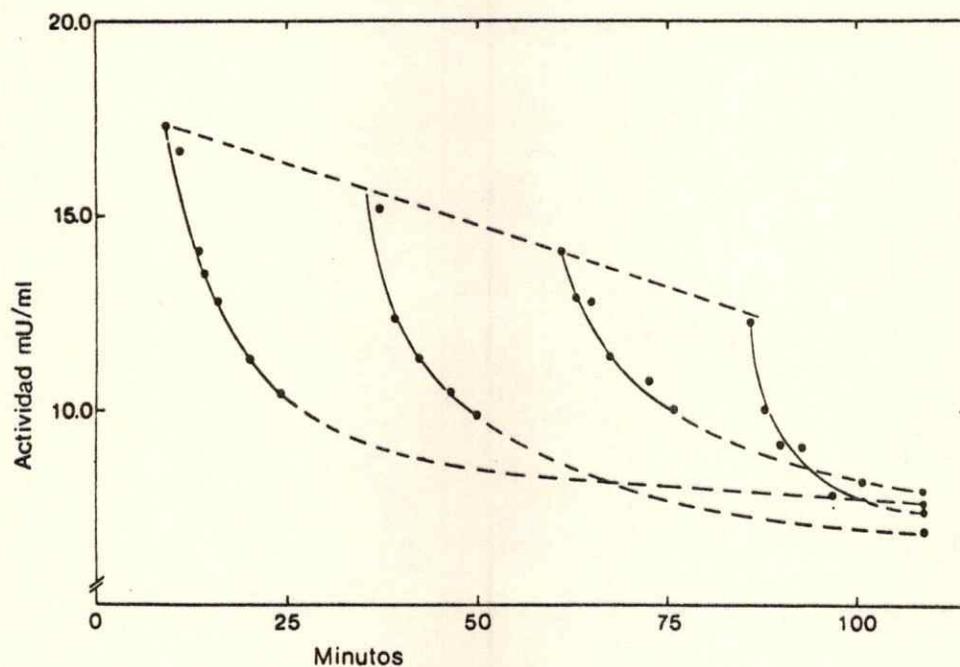


Figura 13. Cinética de la inactivación espontánea de la glucoquinasa en ausencia de protectores de grupos tioles. El medio de incubación contenía: glicil-glicina 64,8 mM, pH 8,0; EDTA 0,7 mM; KCl 570 mM y aproximadamente 0,2 unidades de enzima proveniente de la etapa de Sefarosa (actividad específica 31,1 U/mg de proteína). La detección de actividad enzimática se realizó como está descrito en Materiales y Métodos para la inactivación por DTNB. La cinética de inactivación se inició por dilución (3,3 veces) de la enzima en los tiempos indicados por el punto inicial de cada curva, luego de haber eliminado el DTT. La línea punteada que une los puntos iniciales muestra la cinética de inactivación de la enzima sin diluir y es el tiempo cero para cada experimento en que se diluyó la enzima.

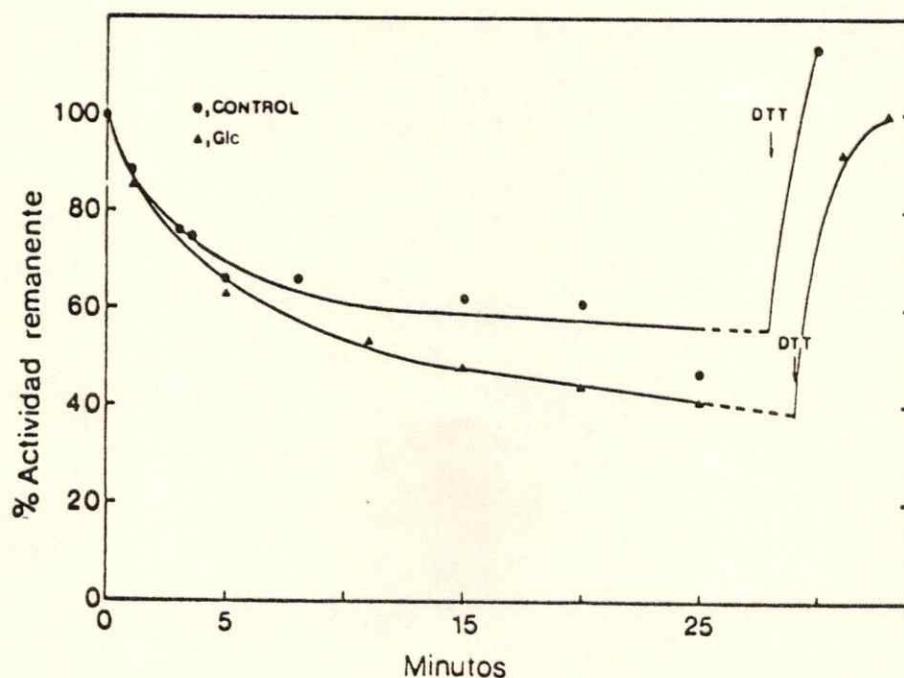


Figura 14. Cinética de inactivación espontánea en ausencia de DTT y recuperación de la actividad de glucoquinasa. El protocolo experimental y el medio de reacción fueron similares a lo descrito en la figura 13, excepto que en uno de los ensayos se usó glucosa 100 mM, y que en ambos ensayos se agregó DTT 10 mM al tiempo indicado. El minuto cero corresponde al momento de la dilución, como en la figura 13. El control corresponde a la dilución hecha 9 minutos después de eliminar el DTT y el experimento con glucosa 25 minutos más tarde.

muestran que no hubo protección debida al sustrato glucídico, lo que se confirmó en otros experimentos en los que se alternó el orden, haciendo primero el experimento con glucosa y a continuación el control sin sustrato.

Se estudió también el posible efecto protector del sustrato nucleotídico. En la figura 15 se muestra que la adición simultánea de MgATP y glucosa no modifica la inactivación espontánea de la glucoquinasa, siendo igual la constante de inactivación k_i^1 obs ($0,09 \text{ min}^{-1}$) a la del control sin los sustratos. El ATP solo y el ATP sin Mg^{2+} más glucosa tuvieron un efecto protector, revelado por una k_i^1 obs menor, $0,05$ y $0,03 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. El efecto del Mg^{2+} no fue especialmente estudiado.

Protección por glicerol. Como el glicerol es un estabilizante de la enzima, se probó su efecto sobre la enzima diluída en ausencia de DTT. En la figura 16 se observa que el glicerol protege a la enzima de la inactivación espontánea, en su primera fase. Las k_i^1 obs aproximadas fueron de $0,08$, $0,05$ y $0,02 \text{ min}^{-1}$ para el control y para 10 y 20% de glicerol, respectivamente. Estos resultados sugieren que el mecanismo estabilizante del glicerol es, al menos en parte, favorecer una conformación donde queden menos expuestos los grupos sulfhidrilos susceptibles a la oxidación.

Como resumen de este conjunto de experimentos podemos concluir que la inactivación espontánea de la glucoquinasa altamente purificada, en

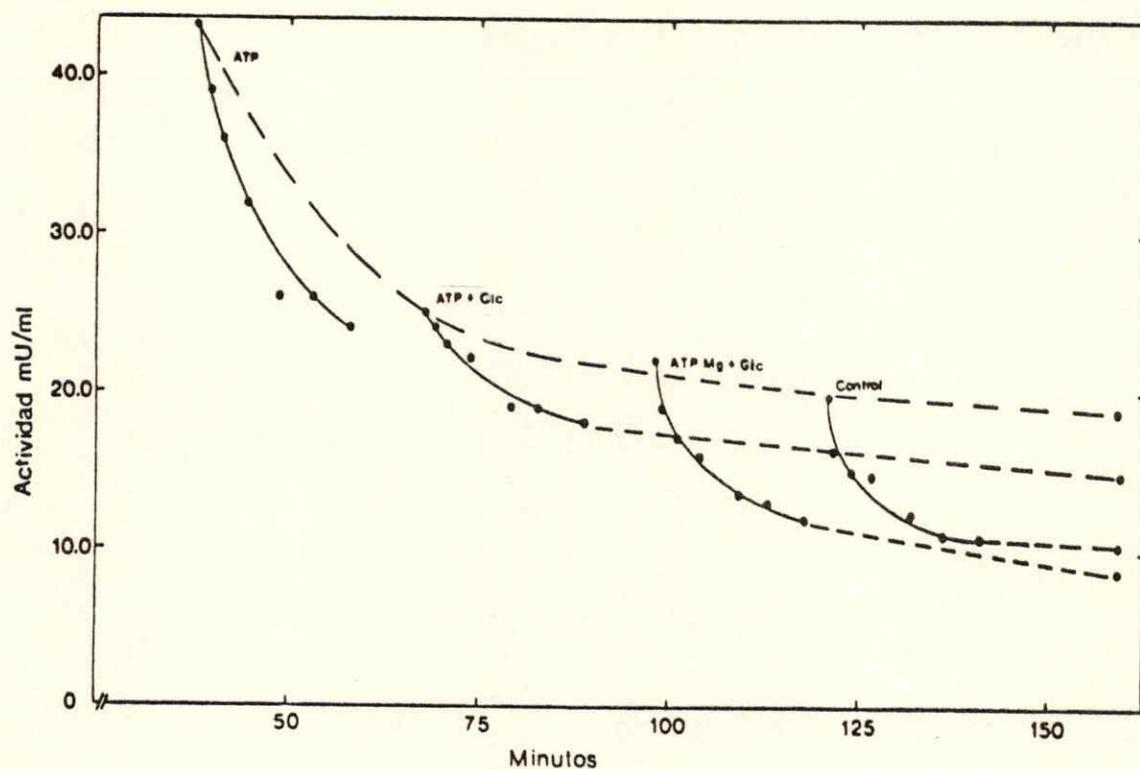


Figura 15. Efecto de los sustratos sobre la cinética de inactivación espontánea de la glucoquinasa. El medio de reacción fue similar al descrito en la figura 13, excepto que se agregaron a éste, donde se indica, glucosa, ATP y $MgCl_2$ en concentraciones de 50, 2,5 y 10 mM respectivamente. La cinética de inactivación se inició igual como se describe en la figura 13.

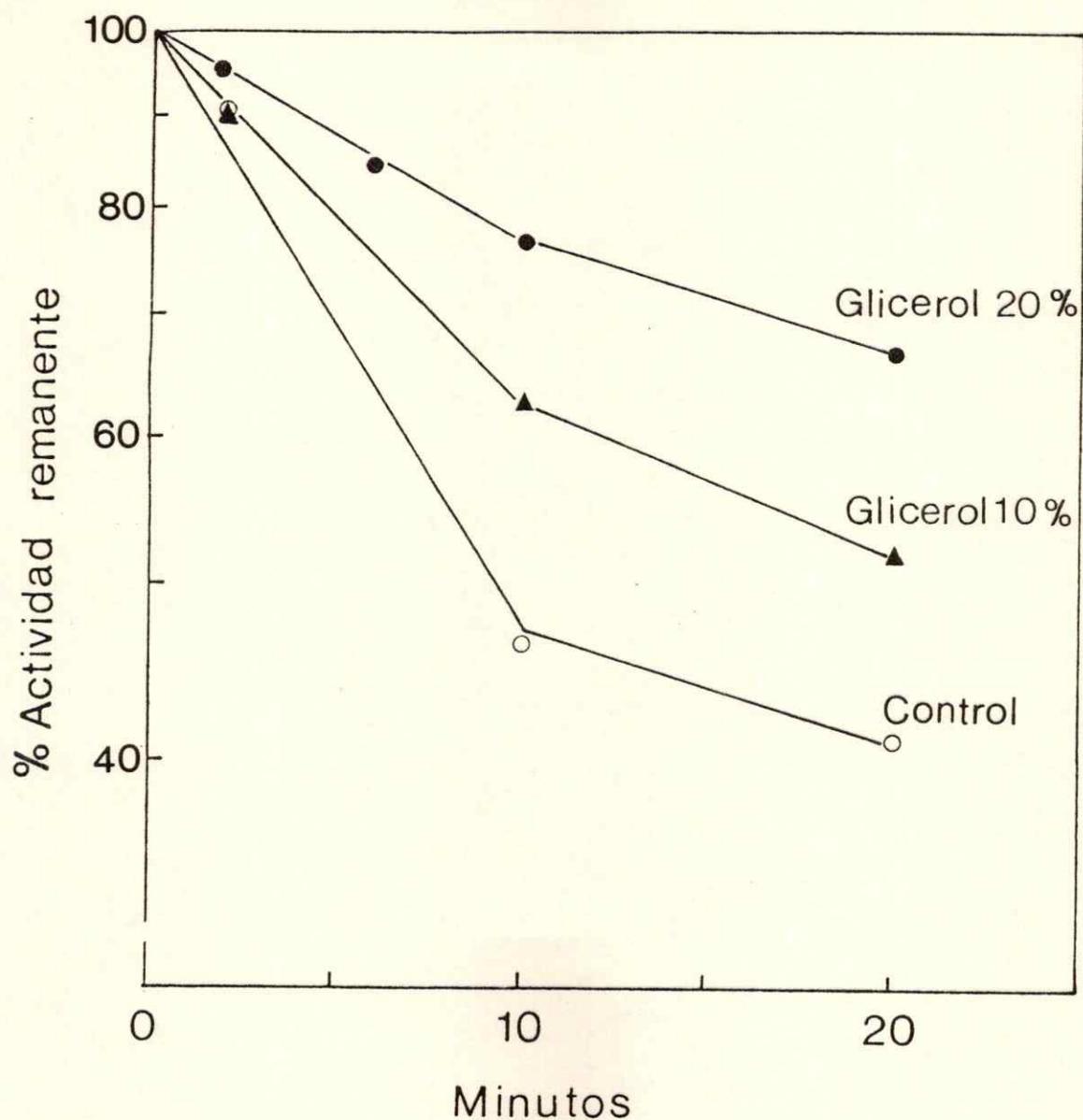


Figura 16. Efecto del glicerol sobre la cinética de inactivación espontánea de la glucoquinasa en ausencia de protectores de grupos tioles. El medio de reacción fue similar al descrito en la figura 13, excepto que se agregó glicerol en las concentraciones que se indican. La cinética de inactivación se inició al diluir la enzima 3,3 veces en el medio de reacción.

ausencia de protectores de grupos tioles, se debe a la oxidación, posiblemente por el oxígeno atmosférico, de algunos residuos de cisteína. Algunos de ellos estarían especialmente accesibles y serían responsables de la fase de inactivación rápida. Los sustratos glucosa y MgATP, a concentraciones saturantes, no son capaces de proteger a la enzima de esta oxidación, en cambio el ATP (sin Mg^{2+}) parece disminuir la inactivación. En forma dependiente de su concentración, el glicerol puede disminuir la fase de inactivación rápida.

Modificación por DTNB. Como se explicó antes, estos estudios se hicieron con preparaciones de glucoquinasa purificada hasta la etapa de Sephadex (actividad específica alrededor de 1,5 U/mg de proteína), que eran bastante estables, pues no perdían actividad al ser guardadas hasta dos meses en el refrigerador en las condiciones de elución (mezcla salina con KCl 0,3 M y DTT 1 mM).

Cinética de la inactivación. Se realizó el tratamiento de la enzima con DTNB en un rango de concentraciones de 10^{-3} a 2×10^{-1} mM. En un gráfico semilogarítmico de actividad remanente en función del tiempo (Fig.17a), se observa que la cinética de inactivación observada es multifásica y que cada fase es de pseudo-primer-orden con respecto a la concentración de enzima activa. En la primera fase se alcanza entre un 70 y un 80% de inactivación en los dos primeros minutos de la reacción con concentraciones de DTNB entre 10^{-3} y 2×10^{-1} mM. La segunda fase sería

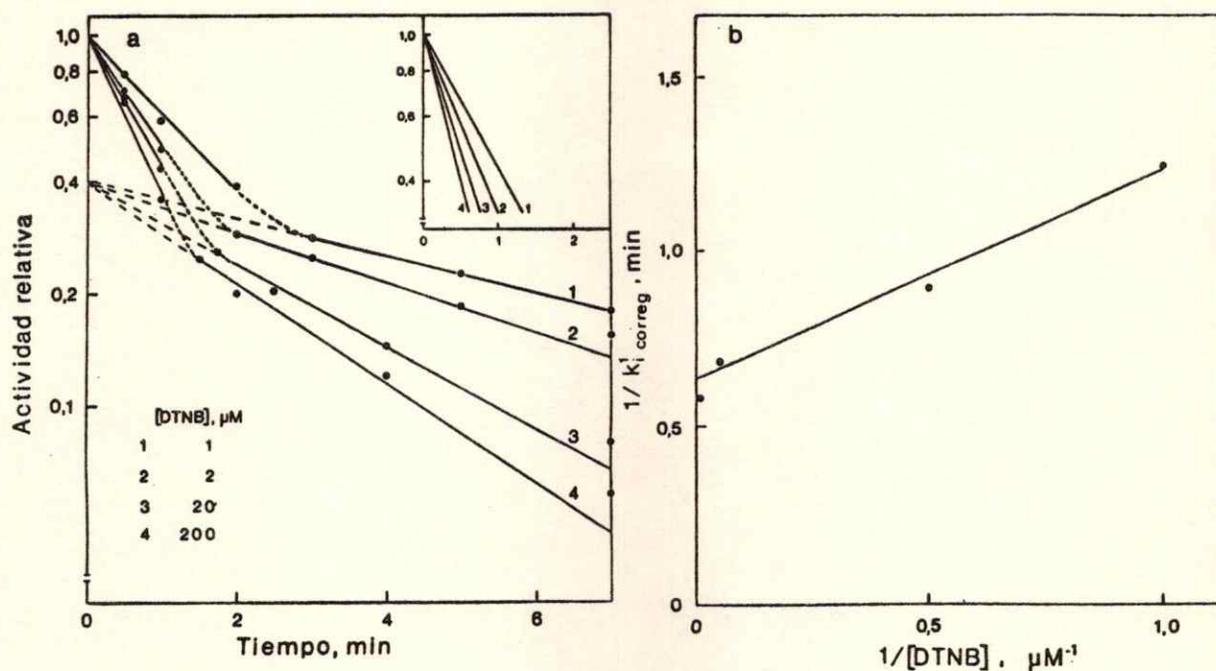
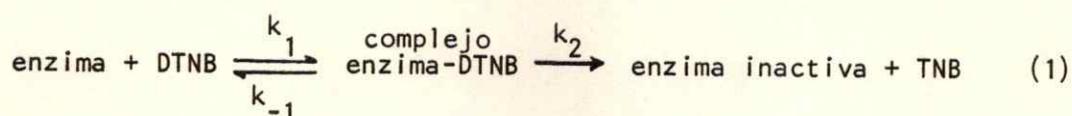


Figura 17. Inactivación de glucoquinasa de hígado de rata con DTNB. Alícuotas correspondientes a 114 mU de glucoquinasa se trataron con diferentes concentraciones de DTNB bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La reacción se inició con la adición de la enzima. a) Gráfico directo del logaritmo de la fracción de actividad residual en función del tiempo, a diferentes concentraciones de DTNB. b) Gráfico de dobles recíprocos de la constante de inactivación de la primera fase ($k_i^1 \text{ correg}$) calculada a partir de los datos del recuadro del gráfico a en función de la concentración de DTNB.

responsable de un 10 a 15% de inactivación de la enzima original en el período estudiado. Esta fase es aproximadamente cuatro veces más lenta que la primera y la tendencia parece ser llegar a la inactivación completa.

La inactivación por DTNB es revertida por DTT (Fig. 18), al menos en la primera y segunda fase, lo que indica la formación de disulfuros.

Al estudiar la variación de la constante de velocidad de inactivación de la primera fase (k_i^1 obs) en función de la concentración de DTNB, se observó una relación hiperbólica, que sugiere saturación de la enzima por DTNB. Esta situación permite establecer una analogía entre el fenómeno de inactivación y el fenómeno general de interacción enzima-ligando. La formación del complejo reversible enzima-DTNB llevaría posteriormente a la liberación de enzima inactiva, irreversiblemente modificada, y del anión TNB. Se puede, entonces, describir la reacción de inactivación de la siguiente manera:



donde k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad de formación y de disociación del complejo enzima-DTNB, respectivamente, y k_2 es la constante de velocidad de la inactivación del complejo enzima-DTNB, para dar enzima irreversiblemente modificada (Glazer y col., 1975; Connolly y Trayer, 1979a).

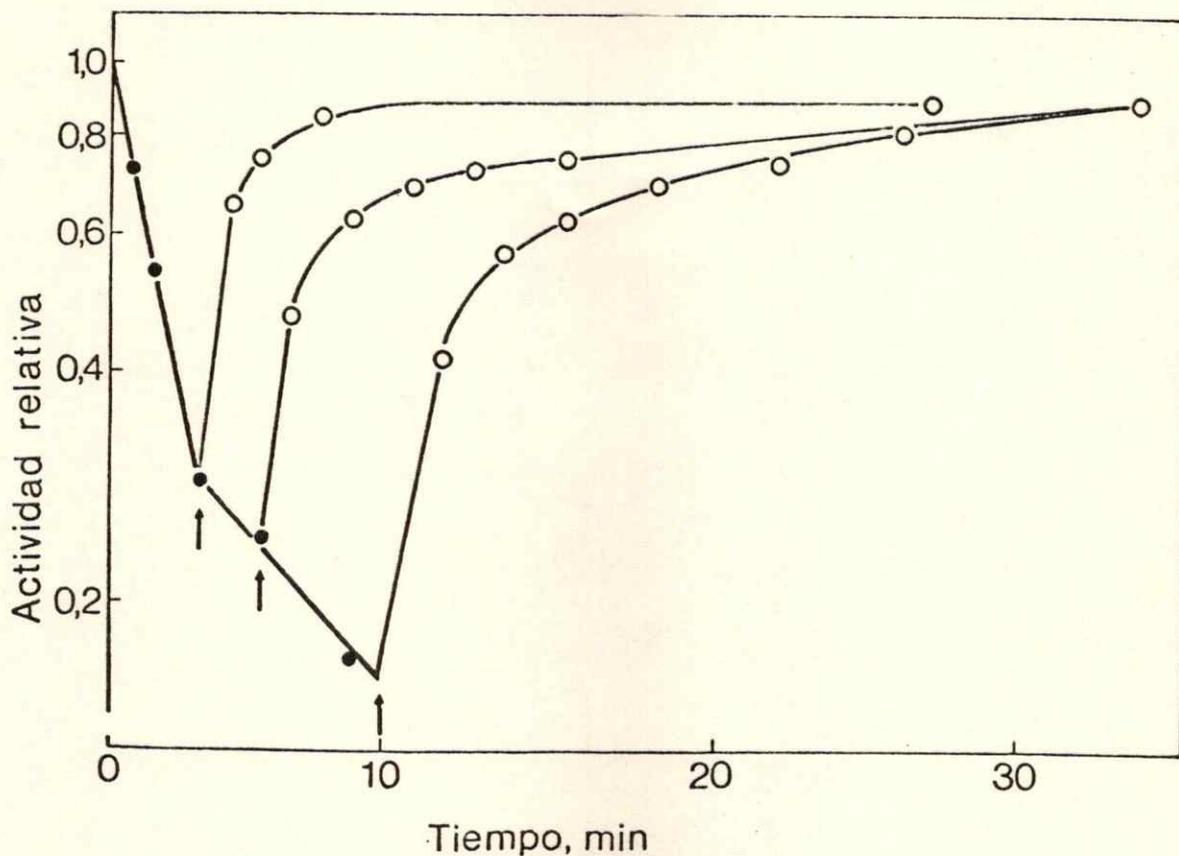


Figura 18. Reactivación por DTT de la glucoquinasa inactivada por DTNB. En cada experimento se inactivaron 108 mU de glucoquinasa con DTNB 2×10^{-3} mM, como se describe en Materiales y Métodos. En tres experimentos consecutivos se agregó DTT 10 mM (concentración final) después de 3, 5 y 10 minutos de inactivación (se indica con flechas en la figura). (●), experimento control en ausencia de DTT; (○), reactivación con DTT de la enzima parcialmente inactivada.

Este mecanismo se describe por la ecuación siguiente, cuya derivación se encuentra en el Apéndice A, p. 176.

$$k_i = \frac{k_2 \cdot (\text{DTNB})}{K_d + (\text{DTNB})} \quad (2)$$

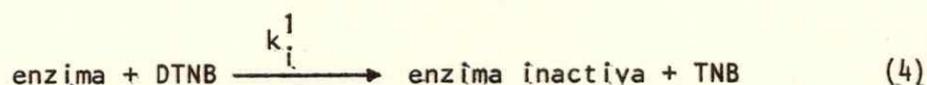
donde $K_d = k_{-1}/k_1$

Para el cálculo de los valores de las constantes se puede usar la ecuación linearizada:

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_d}{k_2} \times \frac{1}{(\text{DTNB})} \quad (3)$$

El gráfico del recíproco de k_i^1 obs en función del recíproco de la concentración de DTNB mostró una relación lineal, que permitió calcular la constante de velocidad de la inactivación k_2 , cuyo valor fue $0,833 \text{ min}^{-1}$. Este gráfico también permitió calcular la constante de disociación (K_d) del complejo enzima-DTNB, que fue de $6,67 \times 10^{-7} \text{ M}$ (Heberlein, 1979). Estos valores están alterados por la contribución de las otras fases de inactivación a k_i^1 . Al suponer que la inactivación llega a ser total, se puede corregir la k_i^1 observada (k_i^1 obs) (Ray y Koshland, 1962) y los valores de k_2 y K_d resultantes del gráfico de dobles recíprocos (fig. 17b) son $1,62 \text{ min}^{-1}$ y $9,1 \times 10^{-7} \text{ M}$, respectivamente.

Si el mecanismo de inactivación fuera el siguiente:



le correspondería una ecuación en que al colocar en un gráfico $1/k_i^1$ en función de $1/\text{DTNB}$ resultaría una línea recta que parte desde el origen, lo cual no es nuestro caso (ver Apéndice A, p. 175).

Al inactivar la glucoquinasa con DTNB 2×10^{-3} mM a distintas temperaturas se observó que la velocidad de inactivación se hacía mayor al aumentar la temperatura desde 0° hasta 30° (Fig. 19a). Al hacer un gráfico del logaritmo de k_i^1 corregida (k_i^1 correg) en función del recíproco de la temperatura absoluta, gráfico de Arrhenius, se obtiene una relación lineal (Fig. 19 b) que permite calcular la energía de activación del proceso, cuyo valor es 15,17 kcal/mol.

La cinética de inactivación multifásica indica que el fenómeno no es simple. En estudios recientes de inactivación por DTNB de la hexoquinasa A de cerebro se dice que el proceso es complejo, con al menos tres fases aparentes de pseudo-primer-orden en presencia y en ausencia de ligandos (Wilson, 1979); en un trabajo anterior Chou y Wilson (1974) (del mismo laboratorio) no mencionan el fenómeno para la inactivación en ausencia de ligandos. El tratamiento de la misma enzima con DTNB ha mostrado la existencia de varias poblaciones de grupos SH, que se diferencian entre sí por su reactividad con DTNB, medida no ya por la inactivación de la enzima sino por la absorbancia del TNB resultante de los grupos modificados (Redkar y Kenkare, 1975).

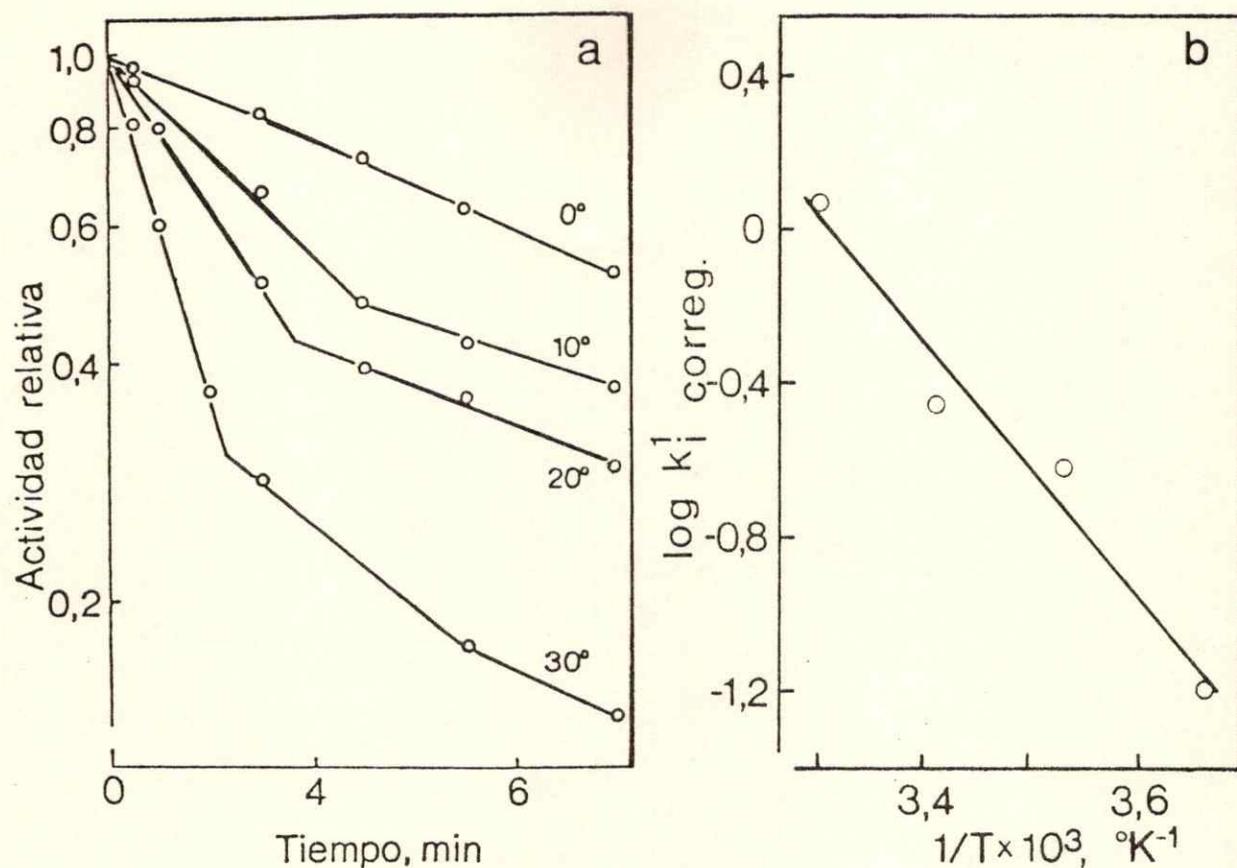


Figura 19. Inactivación de la glucoquinasa a diferentes temperaturas. Se modificaron 96 mU de glucoquinasa por experimento, como se indica en Materiales y Métodos, con DTNB 2×10^{-3} mM, en baños termoregulados a diferentes temperaturas entre 0° y 30° . a) Gráfico semilogarítmico de la fracción de actividad residual en función del tiempo, a diferentes temperaturas de modificación, que se indican en la figura. b) Gráfico del logaritmo de $k_i^1 \text{ correg.}$, expresada en min^{-1} , en función de $1/T$, según Arrhenius. La energía de activación para el proceso de inactivación obtenida de la pendiente de este gráfico es de 15,17 kcal/mol.

La velocidad de inactivación es una medida cinética indirecta de la reactividad de los grupos tioles y sólo se puede concluir que la primera fase de inactivación corregida correspondería a una población de grupos tioles que reaccionan rápidamente y que son responsables del 60% de inactivación. Las otras fases de inactivación no han sido estudiadas, pero se podría especular diciendo que éstas se deberían a la reacción de grupos tioles no expuestos y que sólo aparecerían después de la primera fase de reacción por cambios conformacionales simultáneos o secuenciales de la enzima que distorcionarían el sitio activo. También es posible pensar que parte de la inactivación lenta sea ocasionada por los cambios conformacionales mismos que son la consecuencia de la modificación inicial de grupos tioles. La reactivación por DTT de la enzima modificada con DTNB (Heberlein y col., 1979) prueba en todo caso, que la inactivación se debe esencialmente a la modificación de grupos tioles.

La variación de la constante de inactivación de la primera fase con la temperatura, a una concentración habitual de DTNB (2×10^{-3} mM), muestra que esta fase corresponde a un fenómeno homogéneo, si se considera la linealidad del gráfico de Arrhenius. La existencia de más de un proceso simultáneo sólo podría aceptarse si éstos poseyeran igual energía de activación. La energía de activación de este proceso resultó baja (15,17 kcal/mol), si se compara con los valores obtenidos para la inactivación de la hexoquinasa de levadura por 2-(N-bromoacetyl)-D-galactosamina (5 a 60 kcal/mol en dos rangos de temperatura) (Otieno y col.,

1977). Sin embargo, esta super-reactividad de los grupos tioles de la primera fase, no sería tan excepcional. En efecto, en otras enzimas, como fosfofructoquinasa y papaína (Cohen, 1970), se ha observado que ciertos residuos tioles reaccionan con DTNB a una velocidad hasta 20.000 veces mayor en la enzima nativa que en la enzima desnaturalizada.

Pérdida de la susceptibilidad a la acción del DTNB. Como ya se dijo, la glucoquinasa purificada hasta la etapa de Sephadex es estable aproximadamente dos meses, si se mantiene a 4°. Sin embargo, la susceptibilidad a ser inactivada por DTNB permanece estable sólo alrededor de un mes, produciéndose entonces el hecho, aparentemente no descrito, de una clara disociación entre la pérdida de la actividad catalítica y la posibilidad de que la enzima sea inactivada por el reactivo de grupos sulfhidrilos. En la figura 20 se ilustra una de dos preparaciones en la que se observó el mismo fenómeno. Después de aproximadamente treinta días desde su obtención, la enzima comenzaba más o menos abruptamente a perder la susceptibilidad a la acción del DTNB (2×10^{-3} mM), lo que se manifestaba como una disminución del valor de k_i^1 obs a partir de su valor inicial de $0,5 \text{ min}^{-1}$. Alrededor del día 60, la k_i^1 obs llegaba a cero y la enzima comenzaba a inactivarse con rapidez. (Fig. 20). Es importante hacer notar que en el momento en que la enzima se hace inerte a la acción del DTNB, aún mantiene alrededor de un 90% de su actividad catalítica.

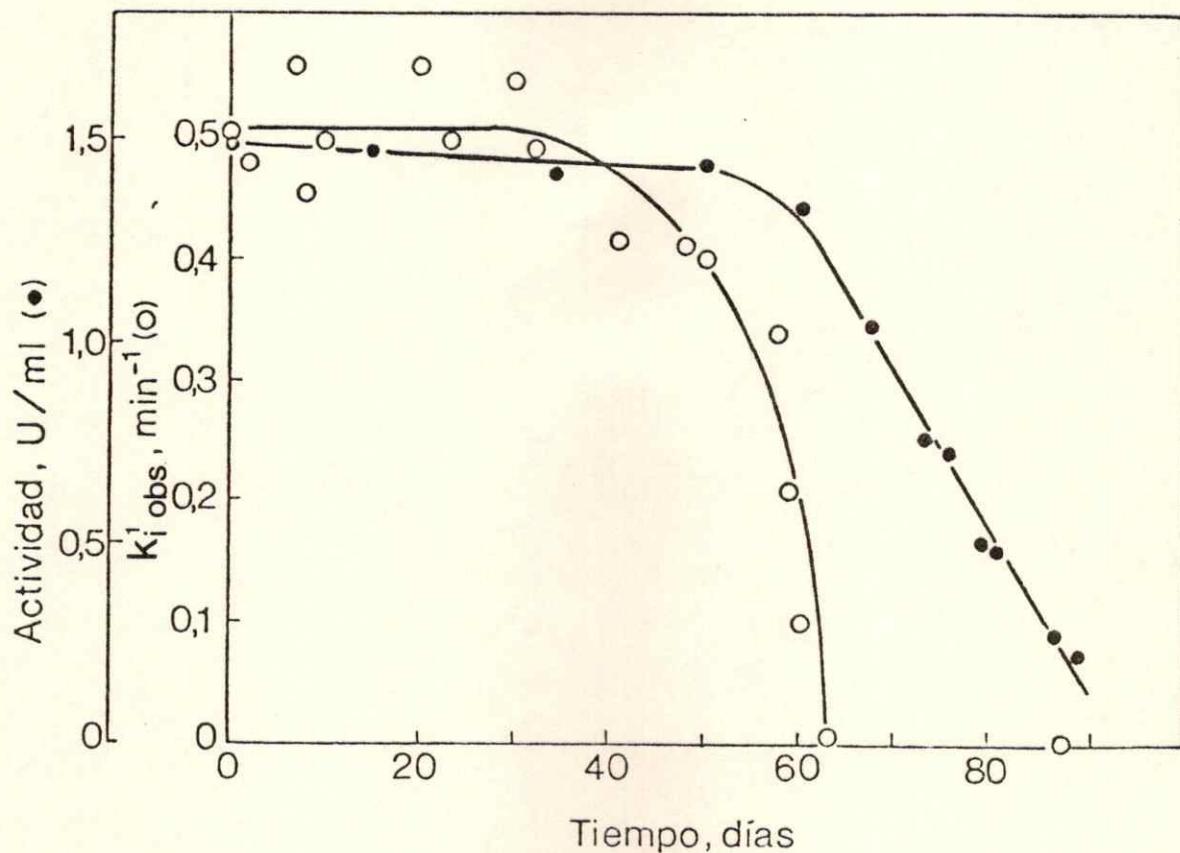


Figura 20. Variación en el tiempo de la actividad de la glucoquinasa y de su susceptibilidad a la acción del DTNB. La susceptibilidad al modificador se expresa como el valor de $k_i^1 \text{ obs}$ con DTNB 2×10^{-3} mM. El tiempo corresponde a los días de almacenamiento desde la preparación de la enzima. (●), actividad enzimática; (○), constante de inactivación $k_i^1 \text{ obs}$.

En la glucoquinasa envejecida ha sido descrita una oligomerización, acompañada de una desaparición de la sigmoidicidad de la función de saturación con glucosa (Niemeyer y col., 1975 b). En consideración a esto, en la enzima insensible al DTNB se midieron los valores del coeficiente de Hill (n_H) y de $K_{0.5}$ que fueron 1,42 y 4,65 mM, respectivamente (Heberlein y col., 1979). Ellos son similares a los valores que caracterizan a la enzima fresca (1,5 y 5 mM) (Cárdenas y col., 1979). Los experimentos se realizaron durante la fase de inactivación de la enzima, en el momento en que aún se mantenía un 50% de su actividad inicial (día 68 en la figura 20). Por lo demás, la enzima envejecida no cambió su peso molecular, a juzgar por el comportamiento en columnas de Sephadex (Heberlein, 1979). La enzima en estado de avanzada purificación (etapa de Sefarosa) tampoco experimentó cambios en la filtración en gel al inactivarse parcialmente por oxidación espontánea.

La pérdida de la susceptibilidad al DTNB puede resultar de una oxidación de los grupos tioles en estudio, o de una distorsión en la estructura terciaria de la enzima, que impediría la reacción de esos tioles con DTNB. Para diferenciar entre estas posibilidades se trató con DTT a la enzima no susceptible al DTNB. En dos preparaciones diferentes de enzima se observó una recuperación de la susceptibilidad al DTNB, después de haber sido incubadas con DTT 10 mM durante 90 minutos y posteriormente tratadas de la manera habitual para eliminar el DTT. Simultáneamente hubo reactivación de la enzima. Sin embargo, la recuperación de la

susceptibilidad no era completa, obteniéndose valores de k_i^1 _{obs} aproximadamente iguales a un medio ($0,25 \text{ min}^{-1}$) de los originales (Heberlein y col., 1979). Tampoco la recuperación de la actividad fue completa en las preparaciones envejecidas durante tiempos prolongados.

Los estudios realizados con la glucoquinasa que había perdido la susceptibilidad a ser inactivada por DTNB, tales como medición de peso molecular, reactivación y resensibilización por DTT, indican que el fenómeno se debería a la formación de uno o varios puentes de disulfuros intramoleculares, descartándose la posibilidad de formación de agregados moleculares con enlaces S-S intermoleculares. Al estar los grupos tioles en forma de disulfuros, no estarían disponibles para reaccionar con DTNB y, por lo tanto, no se produciría la inactivación de la enzima por causa de la modificación química. La oxidación de los residuos SH para formar enlaces disulfuros durante el almacenamiento podría deberse al oxígeno atmosférico, a pesar de que la solución de enzima contenía inicialmente DTT 1 mM. Esto está de acuerdo con los resultados discutidos anteriormente.

La disociación entre la actividad de la enzima y la susceptibilidad al DTNB nos indica que los grupos tioles responsables de la primera fase de inactivación no participan directamente en la función catalítica, aunque pudieran ser importantes para estabilizar una estructura enzimática activa.

Efecto de los sustratos y productos sobre la inactivación por DTNB. Para la detección y cuantificación de las interacciones entre la glucoquinasa y diversos ligandos, se trató la enzima con DTNB 2×10^{-3} mM, en ausencia y en presencia de cada uno de los sustratos y productos de la reacción que cataliza. La glucosa 100 mM tuvo un fuerte efecto protector de la inactivación por DTNB (Fig. 21), pues disminuyó k_i^1 obs desde 0.54 min^{-1} (experimento control) hasta $0,02 \text{ min}^{-1}$, lo que equivale a 96% de protección. El efecto residual que se observa con glucosa 100 mM es del mismo orden que la inactivación espontánea en ausencia de modificador, y corresponde a un proceso aparentemente monofásico que se extiende al menos hasta los 20 minutos de tratamiento con DTNB y glucosa (Monasterio y col., 1979 b).

El sustrato nucleotídico tiene sólo un leve efecto sobre k_i^1 obs el MgATP 5 mM disminuye k_i^1 obs hasta 0.42 min^{-1} , lo que equivale a un 22% de protección. El ATP sin Mg^{2+} , tiene un efecto semejante al del MgATP, sin embargo la contaminación por ADP (5,9% determinado por titulación con la reacción acoplada de piruvato-quinasa y lactato-deshidrogenasa, (Materiales y Métodos) podría dar cuenta de aproximadamente un 10% de protección. El Mg^{2+} no tendría efecto protector. La presencia simultánea de glucosa 100 mM y ATP 5 mM ejerce una protección ligeramente mayor que la de glucosa sola (Fig. 21).

El efecto de los productos de la reacción sobre la cinética de inactivación se estudió realizando el tratamiento con DTNB en presencia de glucosa-6-fosfato 100 mM o de MgADP 5 mM (o ADP 5 mM), como se

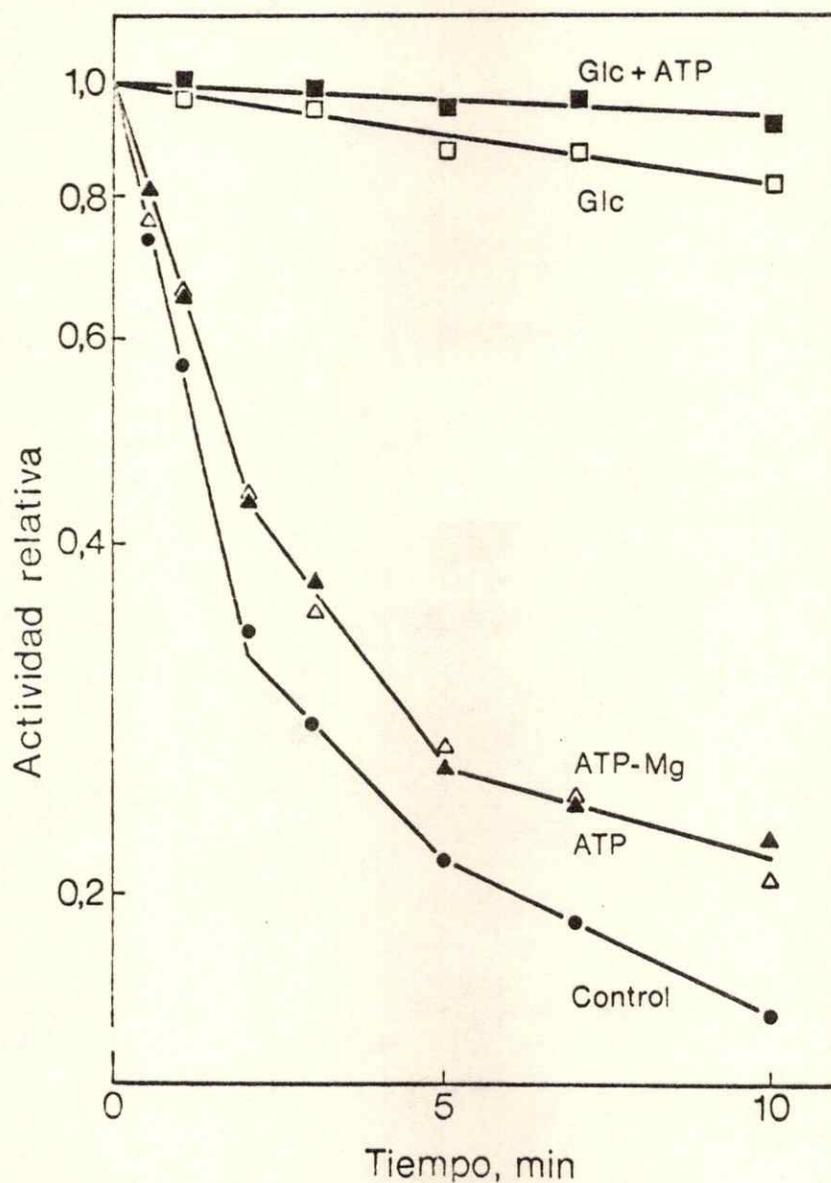


Figura 21. Modificación de la glucoquinasa en presencia de los sustratos de la reacción que cataliza. Se modificaron 120 mU de glucoquinasa por experimento, como se describe en Materiales y Métodos, con DTNB 2×10^{-3} mM, en ausencia (●) y en presencia de ATP 5 mM (▲), MgATP 5 mM (△), glucosa 100 mM (□), y glucosa 100 mM más ATP 5 mM (■).

observa en la figura 22. El glucosa-6-fosfato no tiene efecto protector; aún más, produce un leve aumento de k_i^1 obs desde $0,51 \text{ min}^{-1}$ (experimento control) hasta $0,63 \text{ min}^{-1}$. Sin embargo, el MgADP y el ADP disminuyen k_i^1 obs hasta $0,17 \text{ min}^{-1}$ (67% de protección). Como el efecto protector de un ligando (L) es dependiente de la concentración de éste, se pudo determinar la constante de disociación (K_D) del complejo enzima-ligando con una concentración subsaturante de DTNB (M), de acuerdo a la siguiente ecuación, cuya derivación se da en el Apéndice A (p. 180).

$$\frac{1}{k_i \text{ obs}} = \frac{1}{k_2} \left(1 + \frac{K_d}{M} \right) + \frac{K_d}{k_2 K_D M} \times L \quad (5)$$

Con este fin se trató la enzima con DTNB $2 \times 10^{-3} \text{ mM}$ y en presencia de diferentes concentraciones de ligandos, que variaron en un rango entre cero y cinco a diez veces el valor de las K_D resultantes de experimentos preliminares. Resultados preliminares obtenidos recientemente (Monasterio et al., 1980) indican que, al menos para glucosa y 2-desoxiglucosa, puede calcularse un valor único de constante de disociación del complejo que contiene el ligando, debido a que en gráficos semejantes a los de las figuras 23 y 24, al usar concentraciones variables de DTNB, las rectas concurren en un punto situado en la abscisa. Esto indicaría una interacción del ligando tanto con la enzima libre como con el complejo

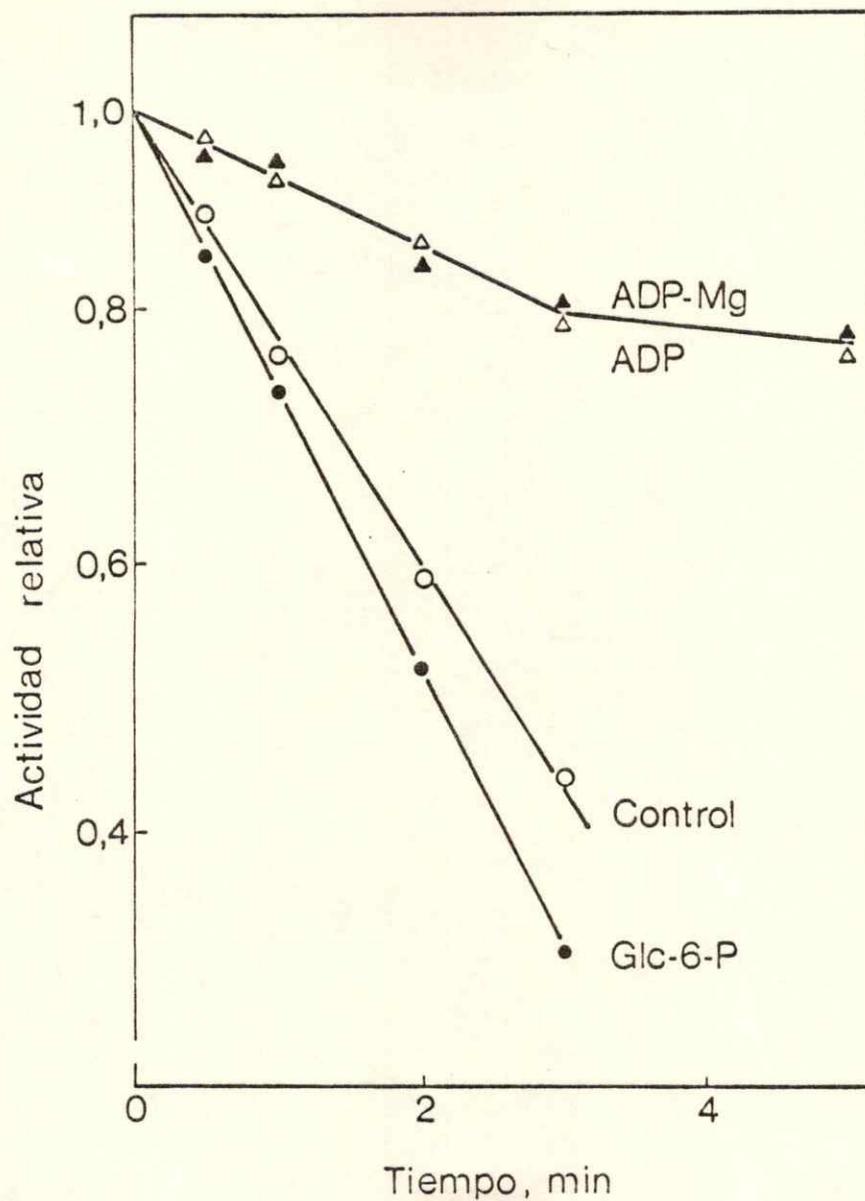


Figura 22. Modificación de la glucoquinasa en presencia de los productos de la reacción que cataliza. Se modificaron 116 mU de glucoquinasa por experimento con DTNB 2×10^{-3} mM, como se describe en Materiales y Métodos, en ausencia (○) y en presencia de glucosa-6-fosfato 100 mM (●), ADP 5 mM (△) y MgADP 5 mM (▲).

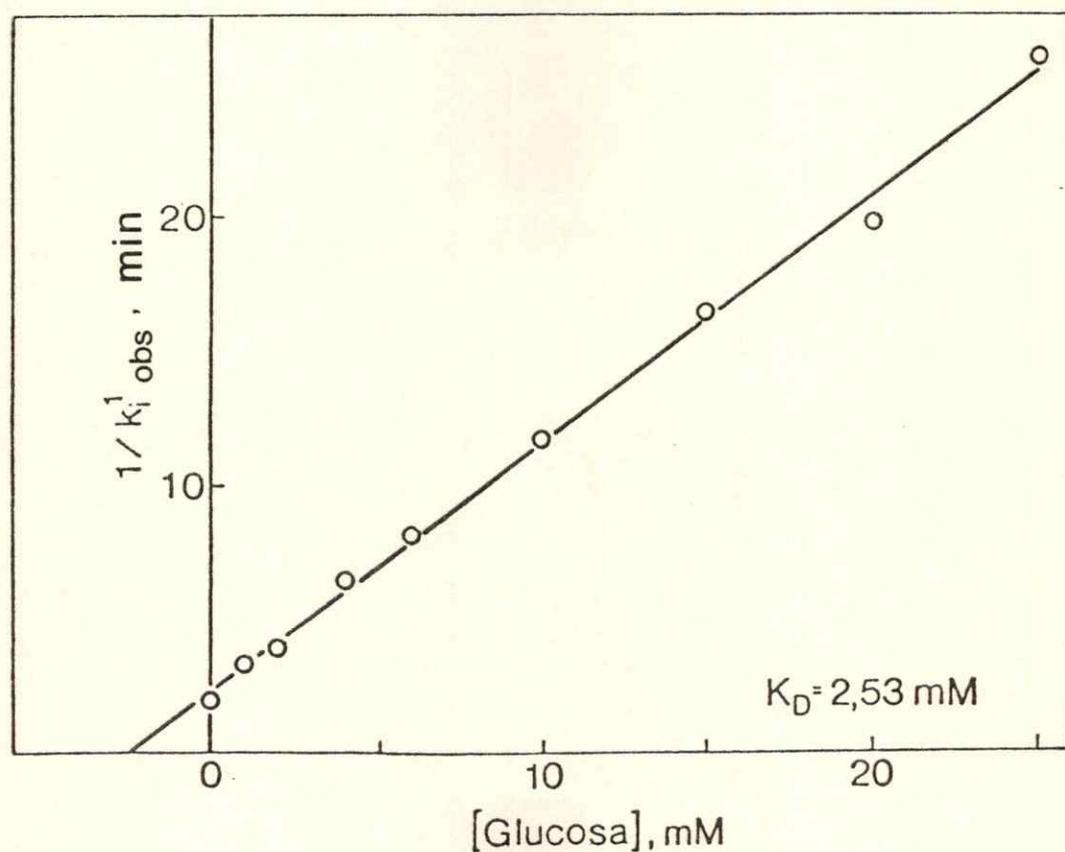


Figura 23. Efecto de la concentración de glucosa sobre la constante de velocidad de inactivación por DTNB. Se inactivó la glucoquinasa (95 μU por experimento) con DTNB 2×10^{-3} mM, como se indica en Materiales y Métodos, en presencia de diferentes concentraciones de glucosa. Las constantes de velocidad (k_{obs}^1) respectivas se graficaron en función de la concentración de glucosa.

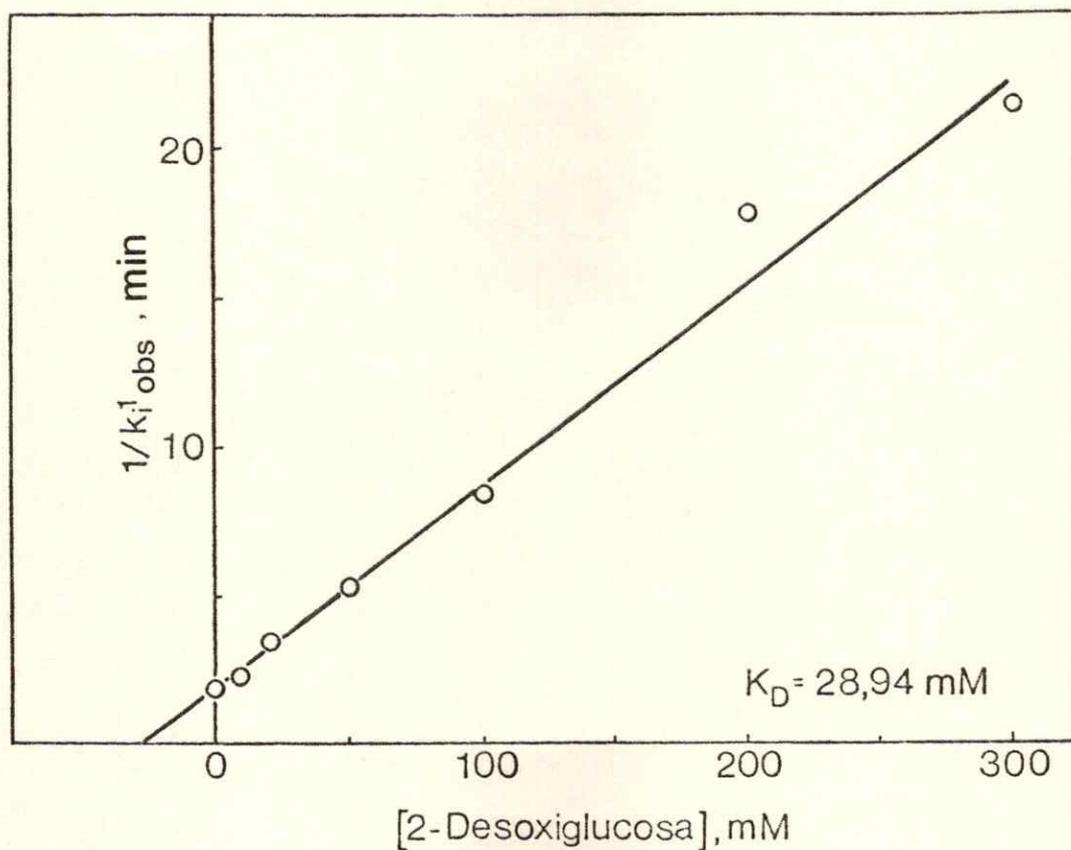


Figura 24. Efecto de la concentración de 2-desoxiglucosa sobre la constante de velocidad de inactivación por DTNB. Se inactivaron 112 mU de glucoquinasa por experimento según la metódica descrita en la figura 23.

enzima-DTNB, con igual constante de disociación, la que denominamos K_D .

En las figuras siguientes se ilustran los resultados típicos que permitieron calcular las $K_{D_{ap}}$ para glucosa (Fig. 23), 2-desoxiglucosa (Fig. 24) y ADP (Fig. 25), cuyos valores en estos experimentos fueron 2,53 mM, 28,94 mM y 3,10 mM, respectivamente.

Si en lugar de la constante de inactivación observada ($k_i^1_{obs}$) se utilizan los valores corregidos por la participación de la segunda fase (y siguientes), se obtienen valores iguales dentro de las variaciones estadísticas esperadas.

El AMP, que es un análogo estructural del ATP y del ADP mostró efecto protector de la inactivación. A diferencia de todos los ligandos protectores anteriores, el AMP mostró un comportamiento parabólico al dibujar el gráfico del recíproco de la constante de inactivación $k_i^1_{obs}$ en función de la concentración del AMP (Fig. 26). Este resultado fue reproducible y sugiere que la acción del AMP resulta de la unión a la enzima de más de una molécula ligando. Al linearizar el comportamiento parabólico, en un gráfico del recíproco de la constante de inactivación en función del cuadrado de la concentración de AMP, el valor de la intersección de la recta en la abscisa fue de 10,5 mM.

En un intento por conocer mejor las interacciones de la enzima con los diferentes ligandos en su papel protector, y establecer si existe un sitio común para los nucleótidos y otro para los azúcares, se realizaron estudios preliminares en que se hacían actuar combinaciones

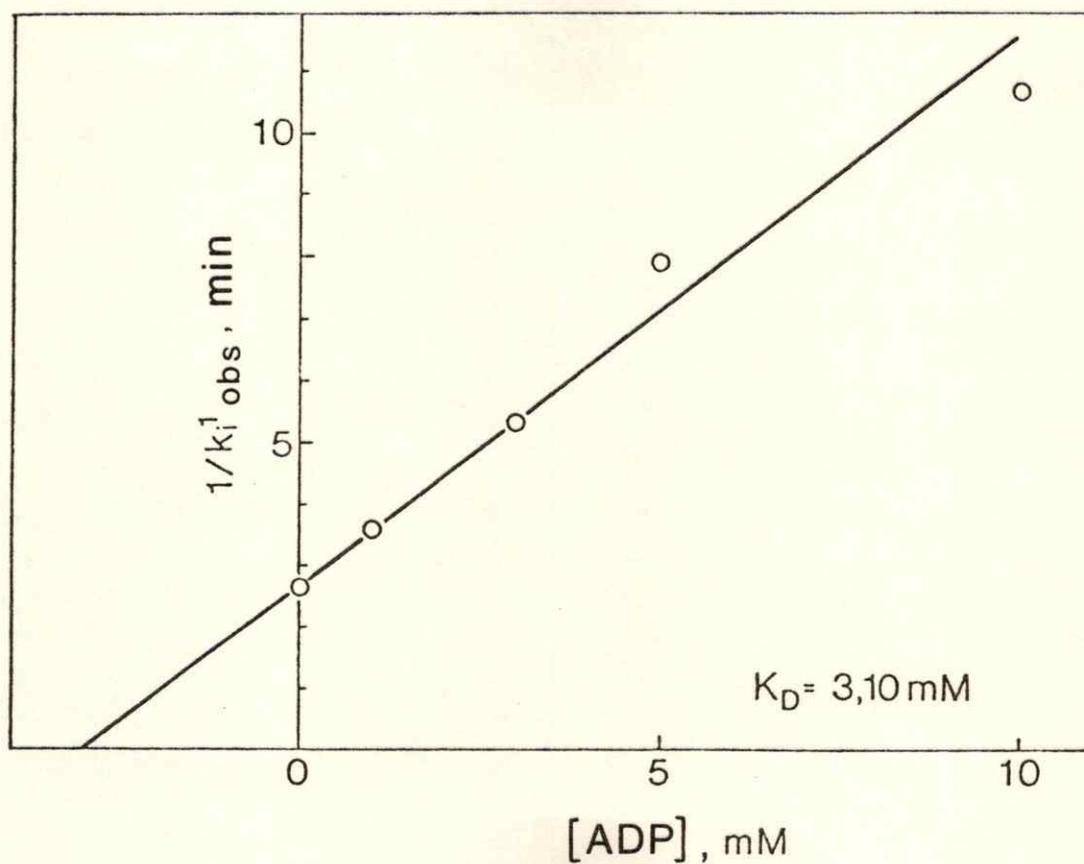


Figura 25. Efecto de la concentración de ADP sobre la constante de velocidad de inactivación por DTNB. Se inactivaron 90 mU de glucoquinasa por experimento según la metodología descrita en la figura 23.

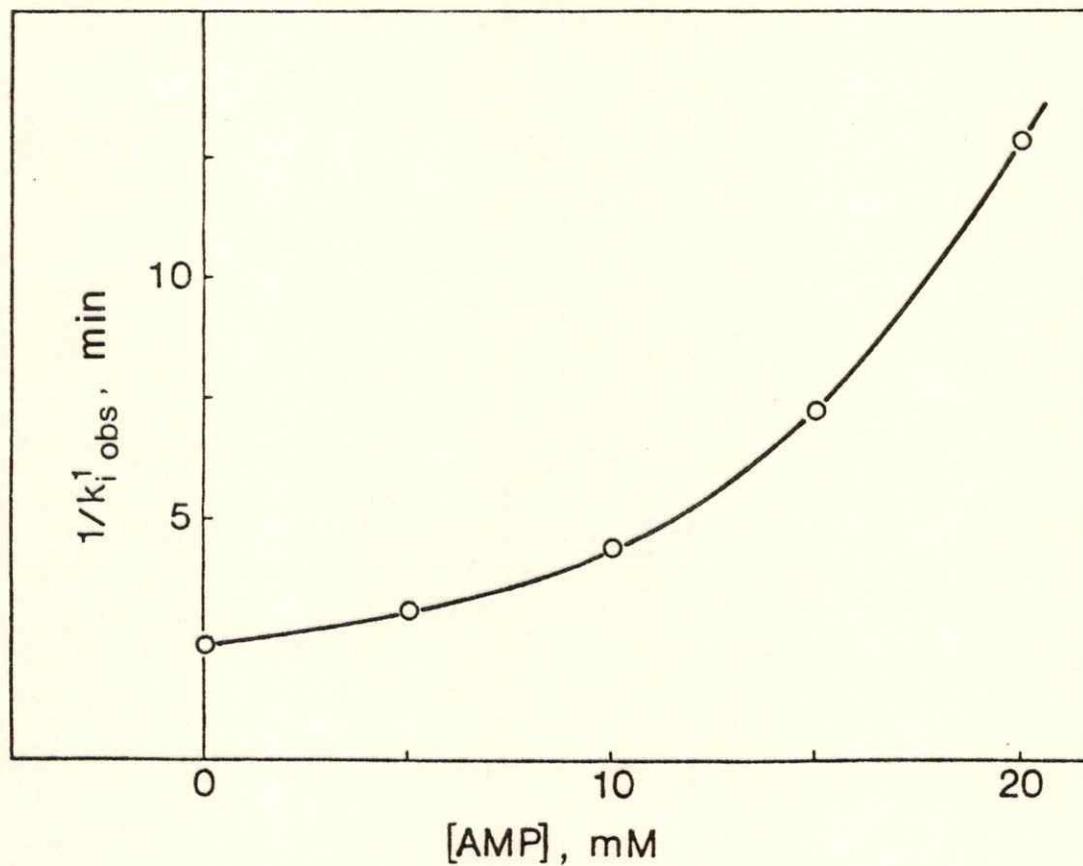


Figura 26. Efecto de la concentración de AMP sobre la constante de velocidad de inactivación por DTNB. Se inactivaron 108 mU de glucoquinasa por experimento según la metodología descrita en la figura 23.

de ligandos. Por ejemplo se usó ATP junto con ADP o con AMP y, entre los azúcares, glucosa junto con glucosa-6-fosfato. En la tabla III se muestra que el efecto del AMP es igual al de AMP más ATP, en cambio, la protección ejercida por ADP + ATP es mayor que la de ADP solo. Por otro lado, glucosa 4 mM (concentración no saturante) presenta un 63% de protección y en presencia de glucosa-6-fosfato 5 mM este efecto es incrementado hasta un 79%. Discutiremos más adelante estos resultados preliminares en relación con la información obtenida de los experimentos de cinética (ver Discusión).

CINETICA

Efecto de los sustratos sobre la velocidad inicial. Se estudió la influencia de la concentración de dGlc en un rango de concentraciones de 4 a 100 mM, sobre la velocidad inicial, a diferentes concentraciones fijas de MgATP. En la figura 27 se observa que al hacer un gráfico de la variación de la velocidad en función de la concentración de dGlc, de acuerdo a Hill (1913), a dos concentraciones de MgATP, 0,2 y 10 mM, la pendiente no varía y el valor del coeficiente de Hill es igual a 1, confirmando observaciones de este laboratorio (Niemeyer y col., 1978).

TABLA III

Protección por ligandos de la inactivación de la glucoquinasa producida por DTNB.

Ligando	Concentración (mM)	% Protección
AMP	20	65
AMP + ATP	20 y 5	66
ADP	5	45
ADP + ATP	5 y 5	77
Glc	4	63
Glc + Glc-6-P	4 y 5	79

Se muestra el porcentaje de protección producido por los diferentes ligandos, calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Protección} = \left[1 - \frac{k_i^1 \text{ obs en presencia del ligando}}{k_i^1 \text{ obs del control}} \right] \times 100$$

Las condiciones experimentales fueron similares a las empleadas en la figura 21.

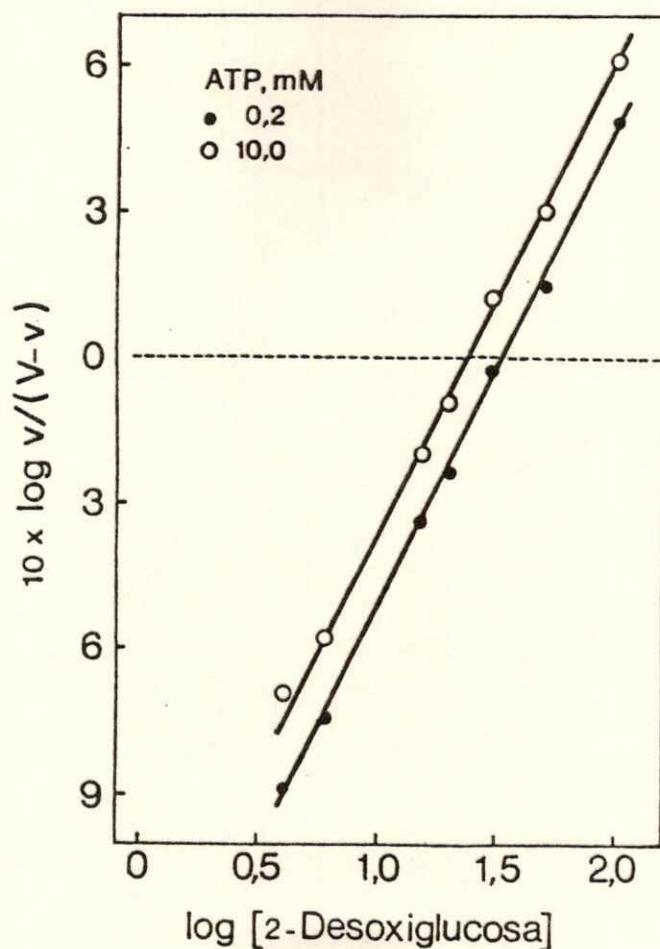


Figura 27. Gráfico de Hill de la función de saturación de glucoquinasa usando 2-desoxiglucosa como sustrato. Las velocidades iniciales fueron medidas a 30° en Tris-HCl 80 mM, pH 8,0, conteniendo NADH 0,37 mM; KCl 100 mM; MgCl₂ 12 mM; DTT 1 mM; 2-desoxiglucosa (entre 4 y 100 mM); 0,021 U/ml de glucoquinasa; 0,97 U/ml de piruvato-quinasa y 0,41 U/ml de lactato-deshidrogenasa. Las concentraciones de ATP corresponden a la del nucleótido libre. Las velocidades iniciales se expresan en todos los gráficos de cinética (hasta la figura 45) como mU/20 por ml.

Para estudiar el orden de interacción de los sustratos con la enzima se variaron las concentraciones de dGlc y MgATP simultáneamente, entre valores iguales a las K_m y 9 veces la K_m , y con los mismos datos se hicieron los gráficos del recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración de cada uno de los sustratos. Se obtuvieron líneas rectas que se intersectaron a la izquierda de la ordenada y por sobre la abscisa (Figs. 28 y 29). En los gráficos secundarios de las pendientes e intersecciones en función del recíproco de la concentración de los sustratos, se obtuvieron en ambos casos relaciones lineales (recuadros de las figuras 28 y 29). Estos resultados están de acuerdo con un mecanismo de tipo en secuencia, en que ambos sustratos se unen a la enzima antes que aparezca el primer producto, pero no lo están con un mecanismo ping-pong.

Los datos experimentales fueron adaptados a la ecuación de velocidad inicial para un mecanismo en secuencia al azar en equilibrio rápido u ordenado en régimen estacionario:

$$v = \frac{VAB}{K_{ia} + K_a B + K_b A + AB} \quad (6)$$

donde A representa la concentración de dGlc y B la concentración de MgATP; K_a y K_b son las respectivas constantes de Michaelis para A y B o las constantes de disociación de los complejos ternarios en complejo binario y cada uno de los sustratos y K_{ia} la constante de disociación del

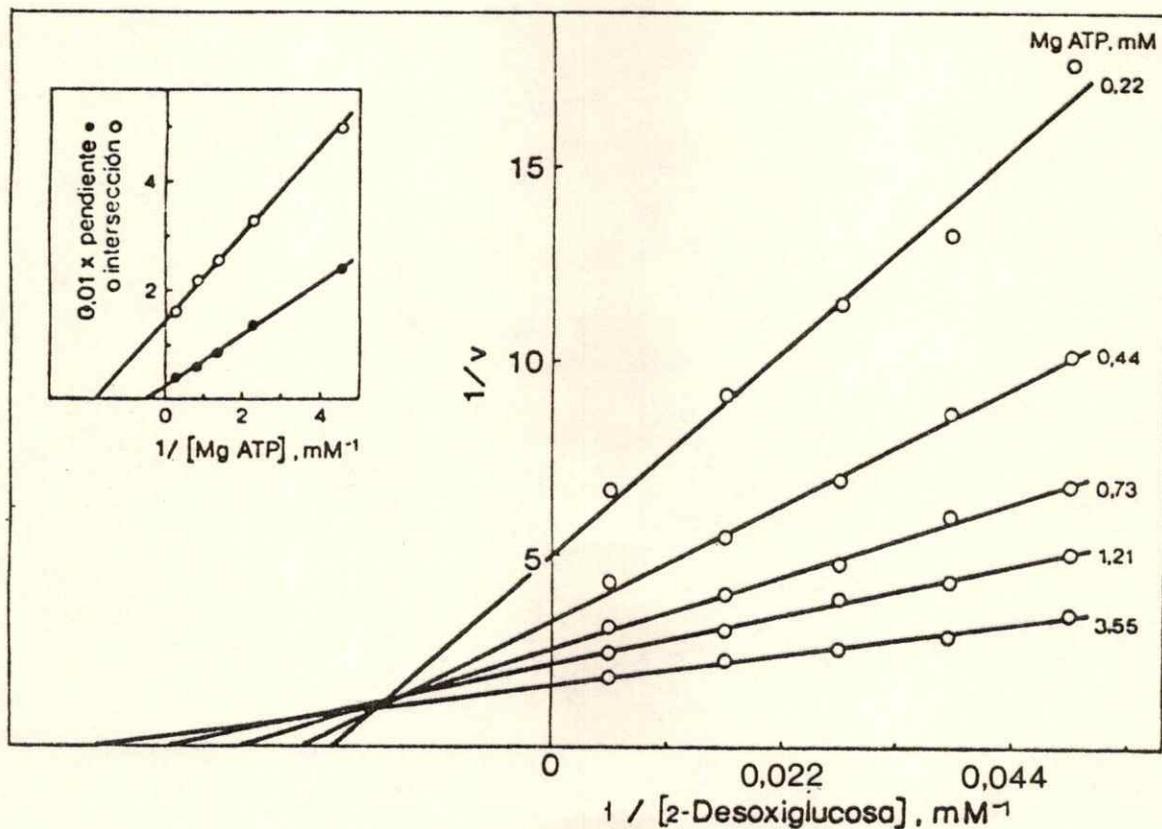


Figura 28. Gráficos de dobles recíprocos donde 2-desoxiglucosa es el sustrato variable a diferentes concentraciones fijas de MgATP. Las condiciones experimentales son las que se describieron en la figura 27, con otras concentraciones de sustratos y mínima diferencia en la cantidad de glucoquinasa. En el recuadro se muestra el gráfico secundario de las pendientes e intersecciones en función del recíproco de la concentración de MgATP.

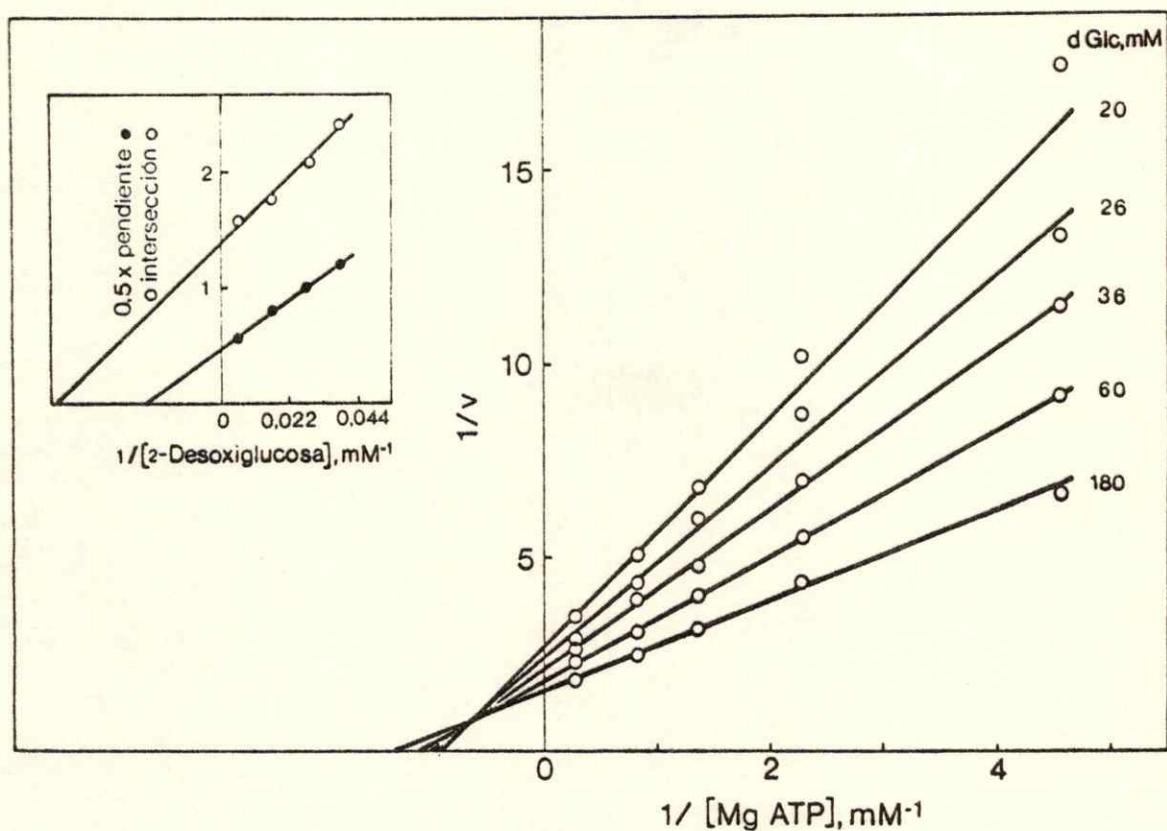


Figura 29. Gráfico de dobles recíprocos donde MgATP es el sustrato variable a diferentes concentraciones fijas de 2-desoxiglucosa. Las condiciones experimentales son las de la figura 28. En el recuadro se muestra el gráfico secundario de las intersecciones verticales y las pendientes en función del recíproco de la concentración de 2-desoxiglucosa, omitiendo los valores correspondientes a 2-desoxiglucosa 20 mM.

complejo E-A, llamada también constante de inhibición para A (Cleland, 1963a).

Los resultados no son compatibles con un mecanismo ordenado en e equilibrio rápido, en cuyo caso falta el término $K_a B$ (Cleland, 1970).

Si bien usamos los gráficos de dobles recíprocos y los gráficos secundarios de ellos para diferenciar los mecanismos, como es habitual (Cleland, 1963b; Fromm, 1975), para el cálculo de las constantes cinéticas se empleó el método de Hanes de linearización para la ecuación 6, en que se trazan en un gráfico las líneas correspondientes a S/v en función de S (Hanes, 1932). Por consideraciones estadísticas diversos autores han insistido en la conveniencia de este método cuando no se da peso a los puntos (Wilkinson, 1961; Dowd y Riggs; 1965; Cornish-Bowden y Eisen-thal, 1974). En nuestro caso los puntos experimentales se adaptaron me jo r a las líneas de regresión y los valores de las constantes eran más semejantes de un experimento a otro con este linearización que con la de Lineweaver-Burk. Las figuras 30 y 31 corresponden al mismo experimento de las figuras 28 y 29. Las constantes se obtuvieron a partir de los gráficos secundarios de los valores de las pendientes o de las intersecci o ne s en función de los valores recíprocos de las concentraciones variabl e s de los sustratos fijos (recuadros de las figuras 30 y 31). Los gráfi co s secundarios de las pendientes suministran los valores de K_a y K_b , ya que las intersecciones de las rectas con las abscisas dan directamente

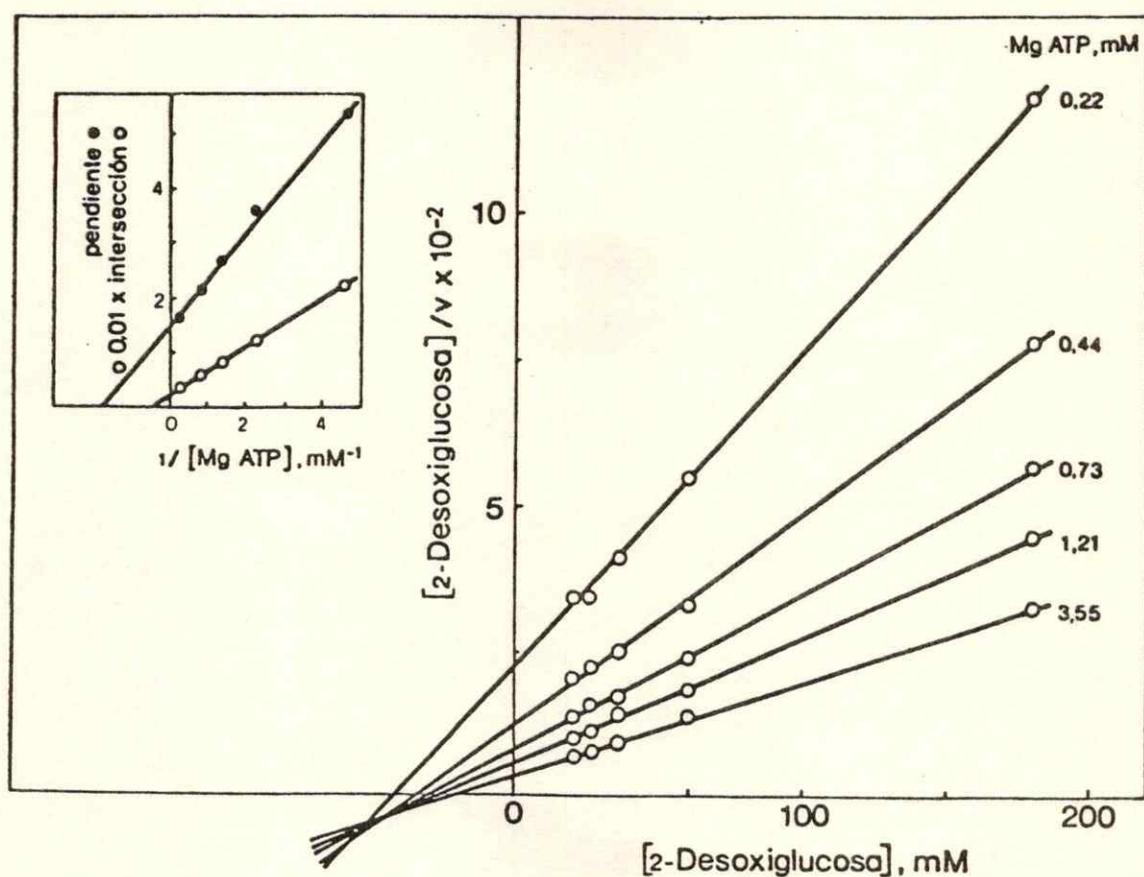


Figura 30. Efecto de la concentración de 2-desoxiglucosa sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por glucoquinasa. Las condiciones del medio de ensayo son las de la figura 28. En el recuadro se muestra el gráfico secundario de las intersecciones verticales y las pendientes en función del recíproco de la concentración de MgATP.

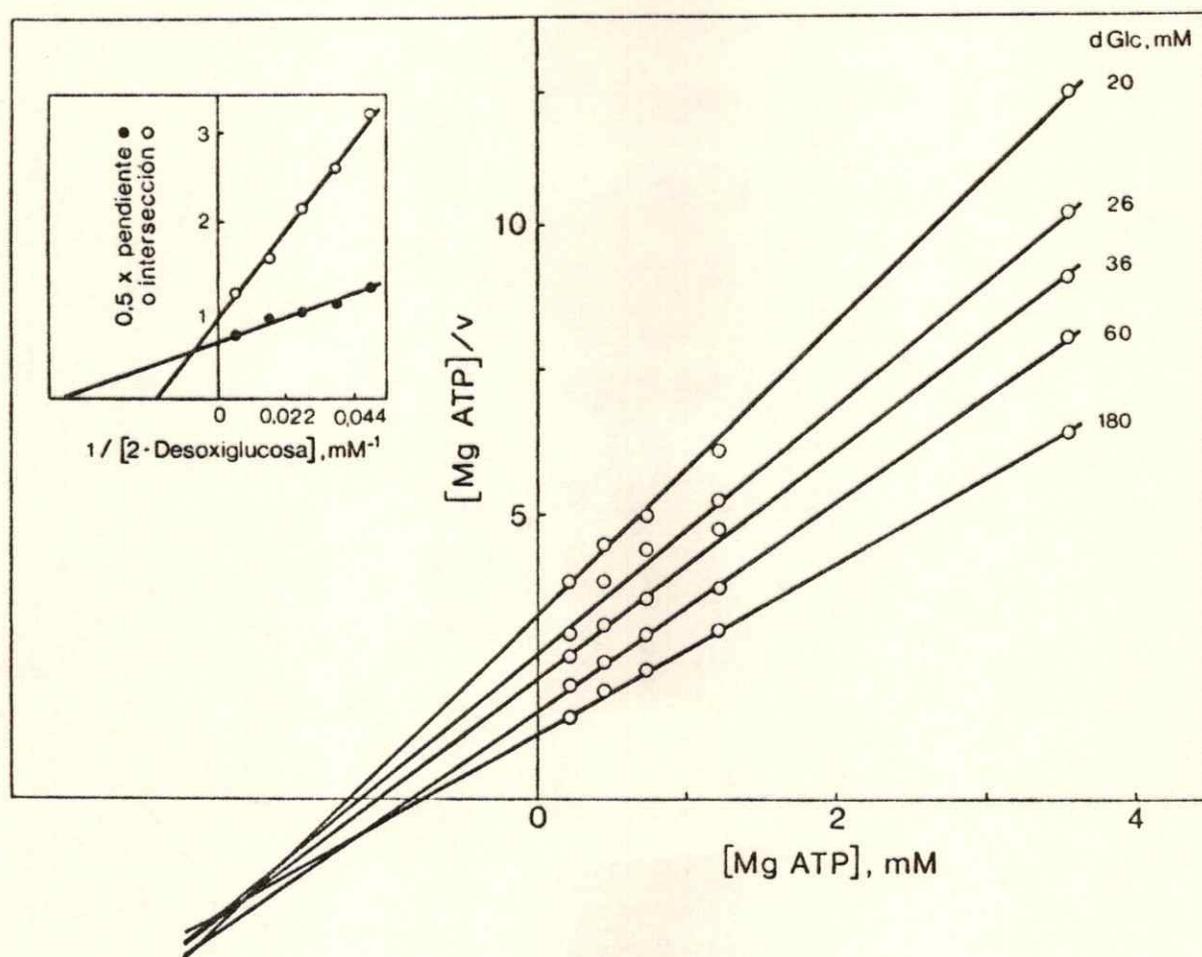


Figura 31. Efecto de la concentración de MgATP sobre la velocidad inicial de la reacción catalizada por glucoquinasa. Las condiciones del medio de ensayo son las de la figura 28. En el recuadro se muestra el gráfico secundario de las intersecciones verticales y las pendientes en función del recíproco de la concentración de 2-desoxiglucosa.

- $1/K_a$ y $-1/K_b$, cuando las abscisas son $1/dGlc$ y $1/MgATP$, respectivamente. Los gráficos secundarios de las intersecciones proporcionan los valores de K_{ia} y $K_a/K_{ia}K_b$, pues las intersecciones de las rectas con las abscisas corresponden a $-1/K_{ia}$ y $-K_a/K_{ia}K_b$ cuando las abscisas son $1/dGlc$ y $1/MgATP$, respectivamente. Los valores de las constantes correspondientes al promedio de tres experimentos se muestran en la tabla IV. En un mecanismo en secuencia al azar en equilibrio rápido se cumple la relación $K_a K_{ib} = K_b K_{ia}$ por la cual puede conocerse el valor de K_{ib} .

Se utilizó también como criterio para postular un mecanismo en secuencia, en contraposición a un mecanismo ping-pong, el hecho que existe una relación parabólica entre el recíproco de la velocidad y el recíproco de la concentración de sustrato, cuando ambos se mantienen en una relación constante (Gulbinsky y Cleland, 1968; Garcés y Cleland, 1969; Tsopanakis y Herries, 1975) (Fig. 32). El valor de la velocidad máxima en este experimento se obtuvo como el valor inverso de la ordenada a concentración infinita de los sustratos. En comparación con el valor obtenido con glucosa como sustrato, la velocidad máxima con $dGlc$ fue sólo el 73% utilizando de una misma preparación igual cantidad de enzima (recuadro de la figura 32). Las preparaciones y las cantidades de enzima utilizadas en el recuadro y en la figura fueron diferentes.

TABLA IV

Constantes cinéticas para glucoquinasa determinadas en estudios de velocidad inicial.

Constante cinética ¹	Valores ² (mM)
K_a	$19,16 \pm 2,33$
K_b	$0,56 \pm 0,05$
K_{ia}	$40,67 \pm 3,30$
$K_a/K_{ia} K_b^3$	$1,37 \pm 0,24$

¹ Identificación de los subíndices: a, dGlc; b, MgATP.

² Los valores son el promedio de tres conjuntos de datos y su error estándar. Los valores de velocidad máxima para los tres conjuntos fueron 17,7, 21,08 y 14,16 mU/ml.

³ Corresponde a K_{ib} si el mecanismo es al azar en equilibrio rápido.

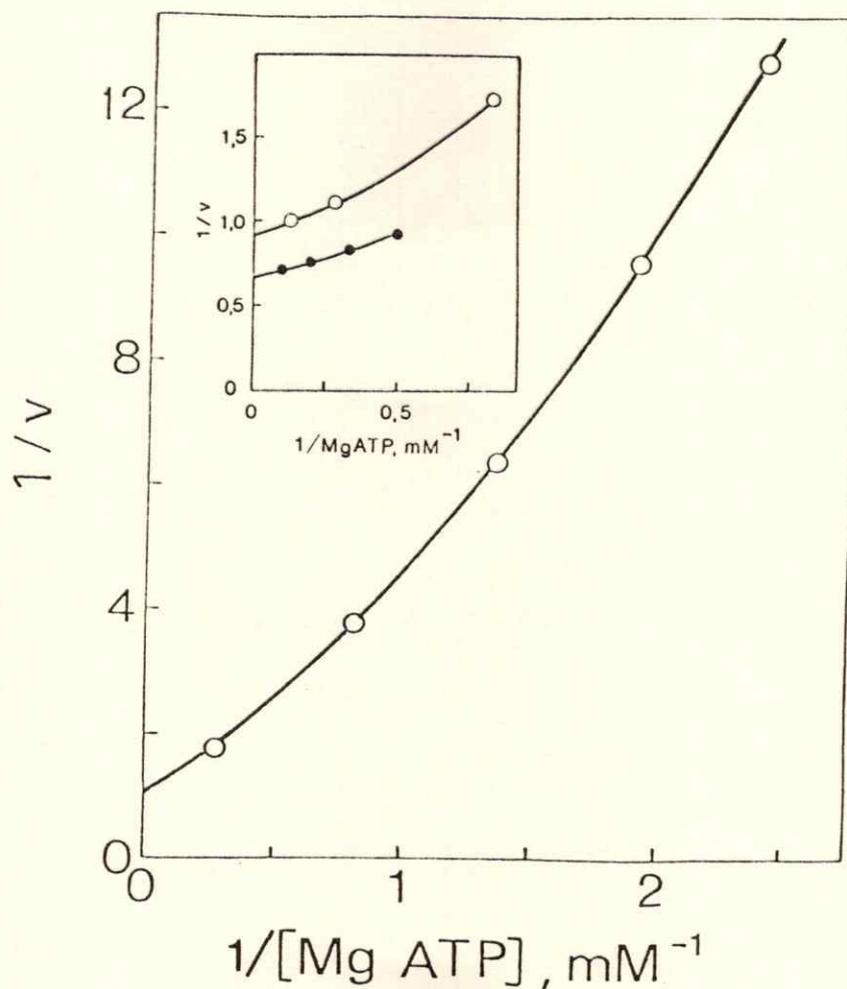


Figura 32. Gráfico de dobles recíprocos donde las concentraciones de 2-desoxiglucosa (o glucosa) y MgATP se variaron en razón constante. Las condiciones del medio de ensayo son similares a las descritas en la figura 27. La razón entre la concentración de 2-desoxiglucosa y MgATP (○) fue 50 y la razón entre glucosa y el nucleótido (●) fue 10. Los experimentos del recuadro se hicieron con la misma preparación enzimática y en el mismo día; la concentración de $MgCl_2$ estuvo presente en un exceso constante de 5 mM sobre la concentración del nucleótido.

Análisis de la velocidad inicial en presencia de inhibidores de punto muerto, análogos de los sustratos.

Para conocer el orden de interacción de los sustratos con la enzima, es decir, para diferenciar entre mecanismos al azar y ordenado, se estudió el efecto de N-acetilglucosamina y de AMP sobre la velocidad inicial al variar la concentración de ambos sustratos, de acuerdo con el protocolo experimental habitual en estos trabajos. Se sabe de estudios cinéticos con glucoquinasa que la GlcNAc es un inhibidor de tipo competitivo con respecto a glucosa (Salas y col., 1965; González y col., 1967). Por otra parte, AMP ha sido utilizado como inhibidor de punto muerto, análogo de ATP, para dilucidar el orden de interacción de los sustratos con la hexoquinasa de levadura (Fromm y Zewe, 1962b) y con la hexoquinasa de cerebro de bovino (Bachelard y col., 1971).

La inhibición por estos análogos de punto muerto puede ser analizada de acuerdo con la siguiente ecuación, que vale para una inhibición lineal mixta y que incluye todos los tipos comunes de inhibición (competitiva, no competitiva e incompetitiva) como casos especiales o asintóticos:

$$v = \frac{VS}{K_m(1 + I/K_{i,s}) + S(1 + I/K_{i,t})} \quad (7)$$

donde V, velocidad máxima aparente; K_m , constante de Michaelis aparente; I, concentración del inhibidor; S, concentración del sustrato variable;

K_{is} y K_{ii} , constantes de inhibición como las define Cleland (1963b) y que son obtenidas de los gráficos secundarios de las pendientes (slope) y de las intersecciones (intercept) en función de la concentración del inhibidor, respectivamente. Ver en el apéndice A, "Análisis del efecto de inhibidores" p. 152 para fundamentación de las ecuaciones correspondientes a un mecanismo secuencial BiBi.

Si al usar el inhibidor competitivo de cada sustrato se logra identificar el tipo de inhibición (no competitiva pura, mixta, incompetitiva) en relación con el otro sustrato, se puede tener cierto grado de certeza sobre el mecanismo cinético de la reacción en la generalidad de los casos.

Inhibición por N-acetilglucosamina al variar dGlc y MgATP. Se estudió el efecto inhibitorio de GlcNAc con dGlc como sustrato variable, a diferentes concentraciones fijas de MgATP. Al trazar un gráfico del recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración del azúcar (concentraciones aproximadamente entre K_a y 3 veces K_a) a diferentes concentraciones fijas de GlcNAc y con MgATP 1,2 mM (2,1 veces K_b) se obtuvieron líneas rectas que se intersectaron en el eje de la ordenada (Fig. 33). Esto se interpreta como una inhibición competitiva de GlcNAc con respecto a dGlc. El mismo comportamiento se observó al trabajar con concentraciones de MgATP menores (0,7 veces K_b) o mayores (6,4 veces K_b).

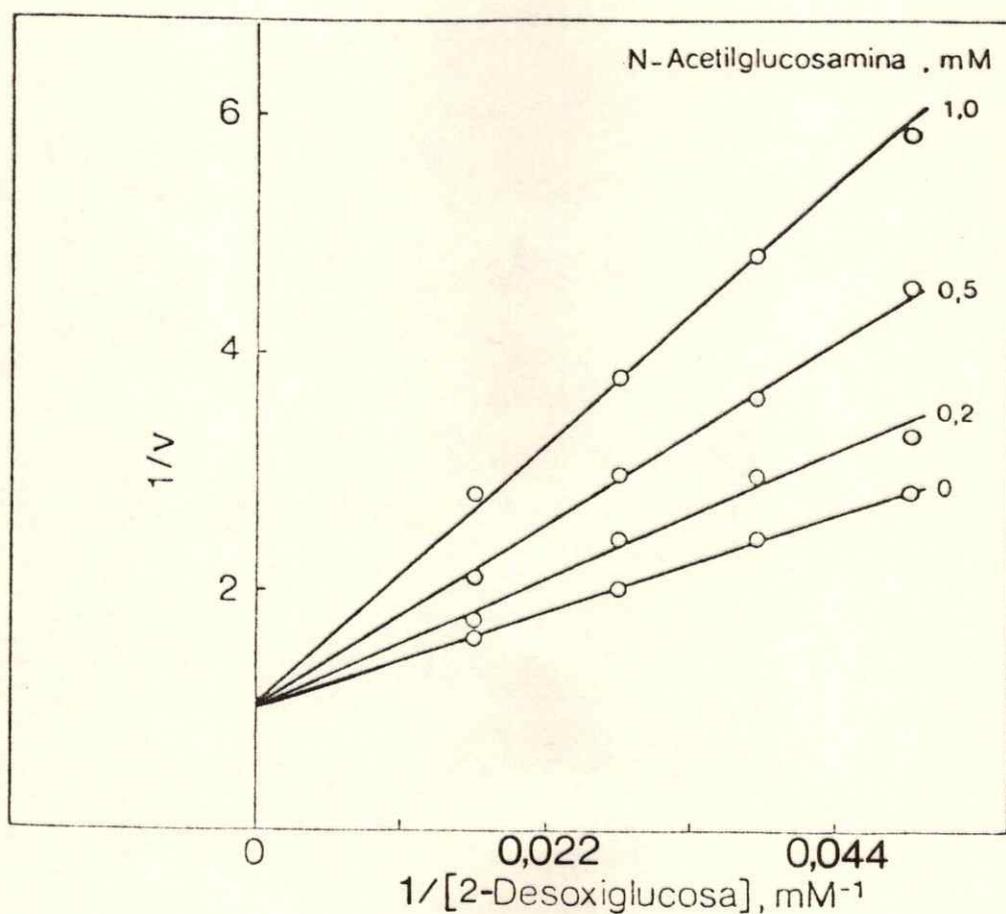


Figura 33. Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por N-acetilglucosamina cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable. Las condiciones del ensayo son similares a las descritas en la figura 27. La concentración de 2-desoxiglucosa varió en un rango de 20 a 60 mM y MgATP se mantuvo constante (1,2 mM).

Cuando el sustrato variable fue MgATP, la inhibición fue de tipo mixto en un rango amplio de concentraciones de dGlc (entre una y tres veces K_a) (Fig. 34). Ambos tipos de inhibición fueron confirmados en gráficos de Dixon (1953) ($1/v$ en función de I) y de Cornish-Bowden (1974) (S/v en función de I) (Fig. 35). La K_i suministrada por el gráfico de Dixon corresponde numéricamente a K_{is} y la K_i^{\dagger} de Cornish-Bowden a K_{ii} .

Los resultados de inhibición con GlcNAc son aplicables tanto a un mecanismo en secuencia ordenada, en que el primer sustrato que interacciona con la enzima es dGlc, como a un mecanismo en secuencia al azar.

En la tabla V se han calculado los valores de las constantes de inhibición para glucoquinasa a partir de los experimentos con GlcNAc, y utilizando los gráficos secundarios de las pendientes y de las interacciones obtenidas de los gráficos de dobles recíprocos (no ilustrados). Se observa que en la inhibición competitiva por GlcNAc con respecto a dGlc, K_{is} (obtenida del gráfico secundario de las pendientes), no varía en función de la concentración del sustrato fijo MgATP. Esto es de esperar en un mecanismo ordenado, en que dGlc es el primer sustrato, y donde $K_i = K_{is}$. Si dGlc fuera el segundo sustrato, el valor de K_{is} debería depender de la concentración de MgATP. Este resultado también es compatible con un mecanismo al azar en equilibrio rápido, sólo si K_i obtenida de K_{is} es igual a K_i obtenida de K_{ii} , es decir, si hay igual afinidad de la enzima libre y del complejo E-MgATP por el inhibidor. Si no se cumple esta condición, K_{is} debería ser dependiente de la

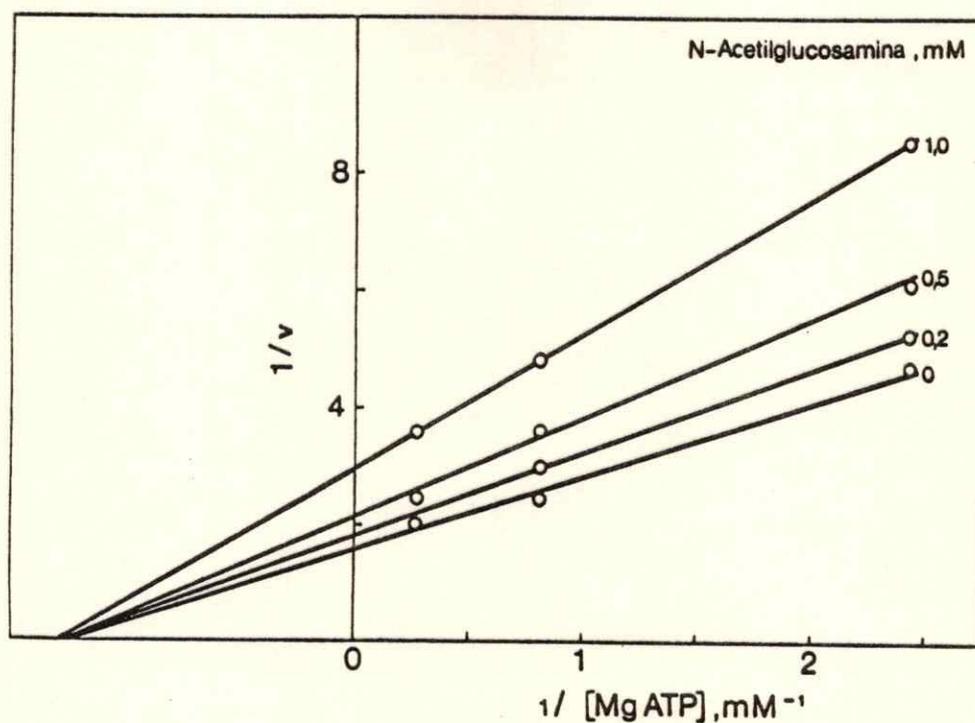


Figura 34. Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por N-acetilglucosamina cuando MgATP es el sustrato variable. Las condiciones del ensayo son similares a las descritas en la figura 27. La concentración de MgATP varió en un rango de 0,41 a 3,55 mM y la concentración de 2-desoxiglucosa se mantuvo fija en 26 mM.

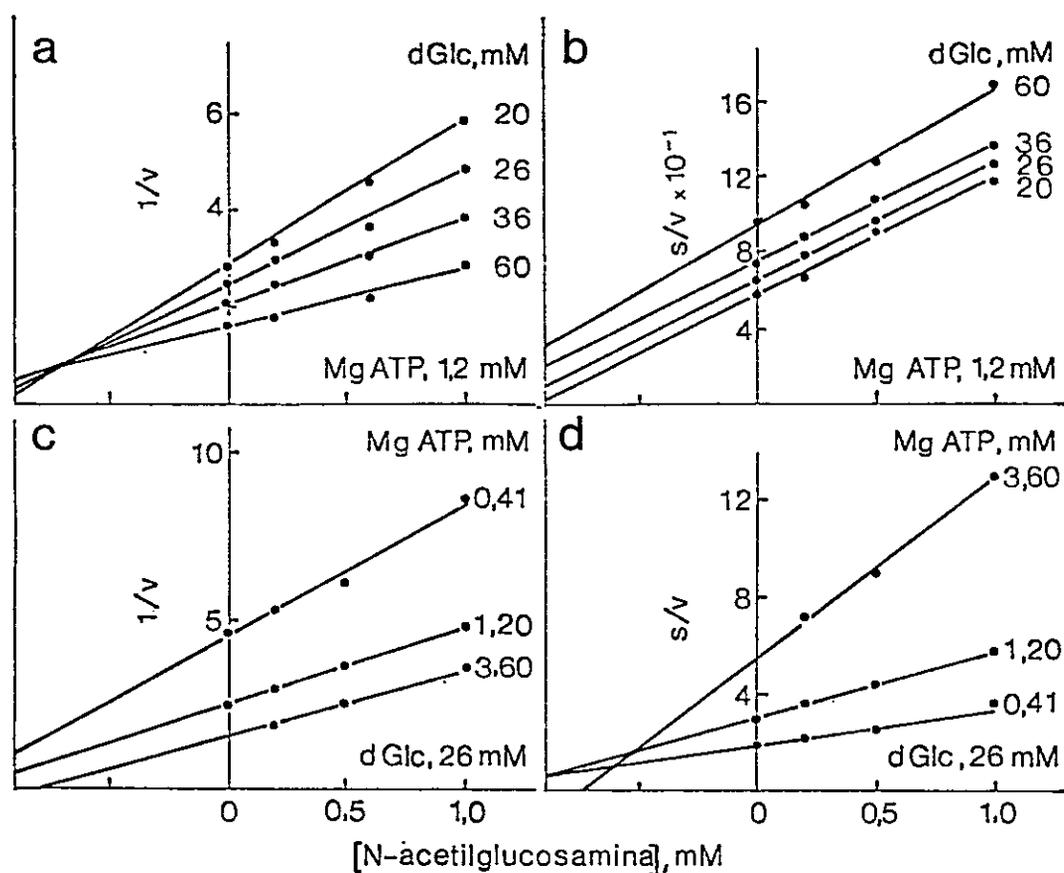


Figura 35. Inhibici3n de glucoquinasa por N-acetilglucosamina. Gr1ficos de Dixon (a, c) y de Cornish-Bowden (b, d) correspondientes a los resultados de las figuras 33 (a, b) y 34 (c, d).

TABLA V

Constantes de inhibición para glucoquinasa determinadas desde los estudios de inhibición por N-acetilglucosamina.

Sustrato fijo (mM)	Constantes de inhibición (mM)			
	K_{is}	$K_i (K_{is})^1$	K_{ii}	$K_i (K_{ii})^1$
MgATP				
0,41	0,57 ± 0,06	0,57 ± 0,06	-	-
1,20	0,70 ± 0,15	0,70 ± 0,15	-	-
3,60	0,62 ± 0,09	0,62 ± 0,09	-	-
Promedio	-	0,63 ± 0,04	-	-
dGlc				
20	1,47 ± 0,16	0,99 ± 0,27	0,60 ± 0,14	0,29 ± 0,14
26	1,25 ± 0,12	0,76 ± 0,10	0,99 ± 0,10	0,42 ± 0,14
36	1,22 ± 0,10	0,65 ± 0,16	0,83 ± 0,10	0,29 ± 0,10
Promedio	-	0,80 ± 0,10	-	0,39 ± 0,04

¹Los valores de K_i fueron calculados a partir de K_{is} [$K_{is} = K_i(1+A/K_{ia})$] o de K_{ii} [$K_{ii} = K_i(1+A/K_{ia})$] para cada concentración del sustrato fijo dGlc. Cuando MgATP fue el sustrato fijo, $K_i = K_{is}$. Para el cálculo de los errores de las constantes se utilizaron las desviaciones estándares de las intersecciones y de las pendientes de la línea de regresión. El error de los promedios de las constantes de inhibición se calculó como la desviación estándar de la media (E.S. = s/\sqrt{n}), donde E.S. y s son la desviación estándar de la media y de los valores de K_i respectivamente, y n es el número de constantes.

concentración de MgATP y su valor (numéricamente igual a la K_i del gráfico de Dixon) es complejo. En efecto, K_{is} contiene los valores de la concentración del sustrato fijo, además de K_{ia} , K_a , K_b y las constantes de inhibición de I al interactuar con la enzima libre ($E \times I/EI$) y con el complejo binario ($ES \times I/ESI$).

Al comparar los valores promedios de K_i calculados de la inhibición competitiva con dGlc y de la inhibición mixta con MgATP, no resultan estadísticamente diferentes ($p > 0.05$).

Si de los experimentos de inhibición por GlcNAc con MgATP variable y dGlc fijo, se calculan los valores de K_i a partir de K_{is} y de K_i a partir de K_{ii} , tomando en cuenta los valores de K_{ia} y K_a de la tabla IV, se observa que a cualquier concentración de dGlc, K_i de K_{is} es mayor que K_i de K_{ii} ($p < 0,001$ en prueba de datos pareados). El promedio de los valores de K_i de K_{is} es $0,80 \pm 0,10$ y es significativamente mayor que el de K_i de K_{ii} que es de $0,39 \pm 0,04$ ($p < 0,01$). Estas diferencias serían compatibles con un mecanismo al azar en que K_i de K_{is} fuera la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor y K_i de K_{ii} la constante de disociación del inhibidor desde el complejo ternario E-MgATP-inhibidor (ver Apéndice A "Inhibición de punto muerto.., Mecanismo en secuencia al azar en equilibrio rápido" p. 164). En un mecanismo ordenado con dGlc como primer sustrato, en que GlcNAc interactuara sólo con la enzima libre, la diferencia de los valores no tendría otro significado que el efecto acumulativo de los errores

experimentales en la determinación de K_{is} , K_{ii} , K_{ia} y K_a .

Inhibición por AMP al variar MgATP y dGlc. Los valores obtenidos con AMP 40 mM se escapan con frecuencia de la linealidad en diversos gráficos, especialmente a concentraciones bajas de MgATP (< 1,2 mM). Pensamos que no se trata de funciones no lineales, sino que de error en la medida de la actividad. En efecto, en un gráfico de Dixon de inhibición por AMP, con concentraciones del inhibidor que variaron entre 5 y 30 mM, se obtuvieron líneas rectas muy bien definidas como se observa en la figura 36. Por otra parte, cuando las concentraciones de AMP son altas (40 mM) y especialmente si las concentraciones de sustratos son relativamente bajas, es decir, cuando se miden actividades pequeñas, hay tres indicaciones de poca confiabilidad de esos datos:

- i) el trazado de las líneas de regresión de la curva de progreso en la inscripción del espectrofotómetro tiene en estas condiciones una diferencia más grande, aproximadamente un 15%, con respecto a la línea calculada directamente con el microcomputador.
- ii) Las líneas calculadas para estas condiciones tienen un coeficiente de correlación muy inferior al correspondiente a determinaciones con menores concentraciones de AMP (ca. 0,95 contra 0,99).
- iii) Los errores estándares son generalmente mayores para cada valor de la intersección o de la pendiente de los gráficos de dobles recíprocos en presencia de AMP 40 mM. En vista de esto, se eliminaron los puntos con AMP 40 mM de los cálculos

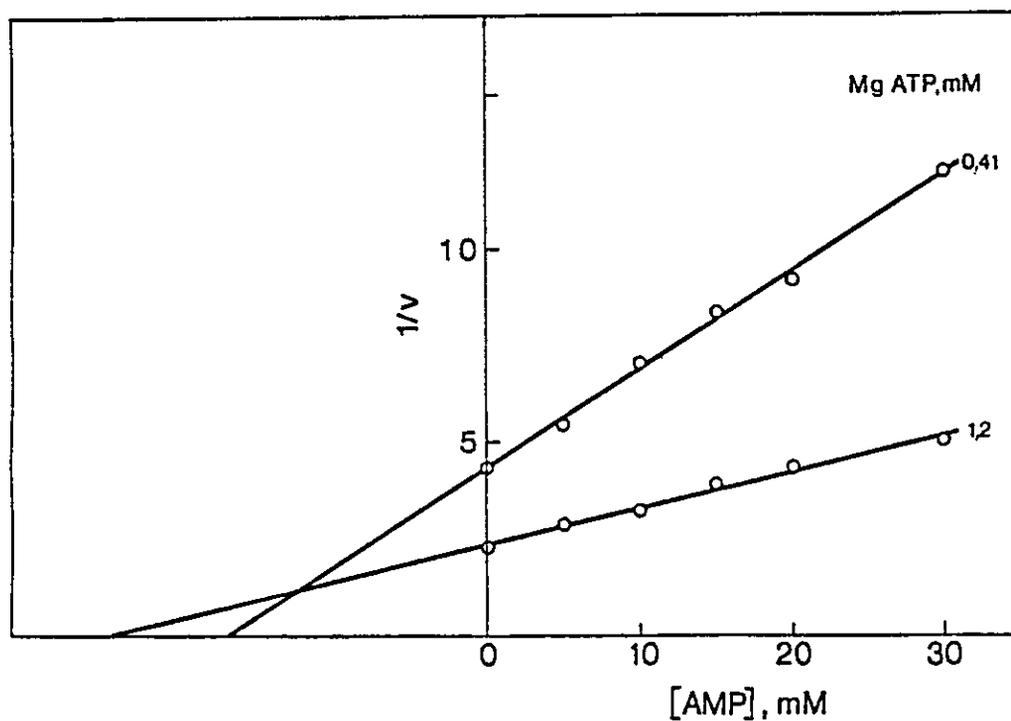


Figura 36. Gráfico de Dixon para la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando MgATP es el sustrato variable. Las condiciones experimentales son similares a las descritas en la figura 27. La concentración de AMP varió en un rango de 0 a 30 mM y la concentración de 2-desoxíglucosa se mantuvo fija en 180 mM.

de las líneas de regresión en los gráficos secundarios (Fig. 40) y, por lo tanto, de la determinación de las constantes. Se dejan sin embargo, en diferentes gráficos como ilustración.

Se estudió el efecto inhibitorio de AMP cuando el sustrato variable era MgATP, a diferentes concentraciones fijas de dGlc. Al colocar en un gráfico el recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración del nucleótido (concentraciones entre 0,7 veces K_b y 6,4 veces K_b), a diferentes concentraciones de AMP, se obtenían líneas rectas que intersectaban en el eje de la ordenada (Fig. 37). Esto significa que la inhibición por AMP fue competitiva respecto a MgATP. El comportamiento se mantenía igual al trabajar con concentraciones de dGlc cuyos valores estaban entre 1,4 veces K_a y 9,4 veces K_a . Este tipo de inhibición fue confirmado en gráficos de Dixon y de Cornish-Bowden (no se muestran).

En la tabla VI se muestra que los valores de K_{is} son dependientes de la concentración de dGlc, el sustrato fijo. Esta dependencia no ocurriría si se tratara de un mecanismo ordenado en que MgATP fuera el primer sustrato, pero sí al ser MgATP el segundo sustrato. En este último caso se puede calcular la constante de inhibición como constante de disociación del complejo ternario E-dGlc-I (K_i), cuyo valor promedio sería $10,56 \pm 0,52$ mM. Si se tratara de un mecanismo al azar, K_{is} sería también dependiente de la concentración del sustrato fijo, en forma compleja, como se comentó antes para la inhibición de GlnAc

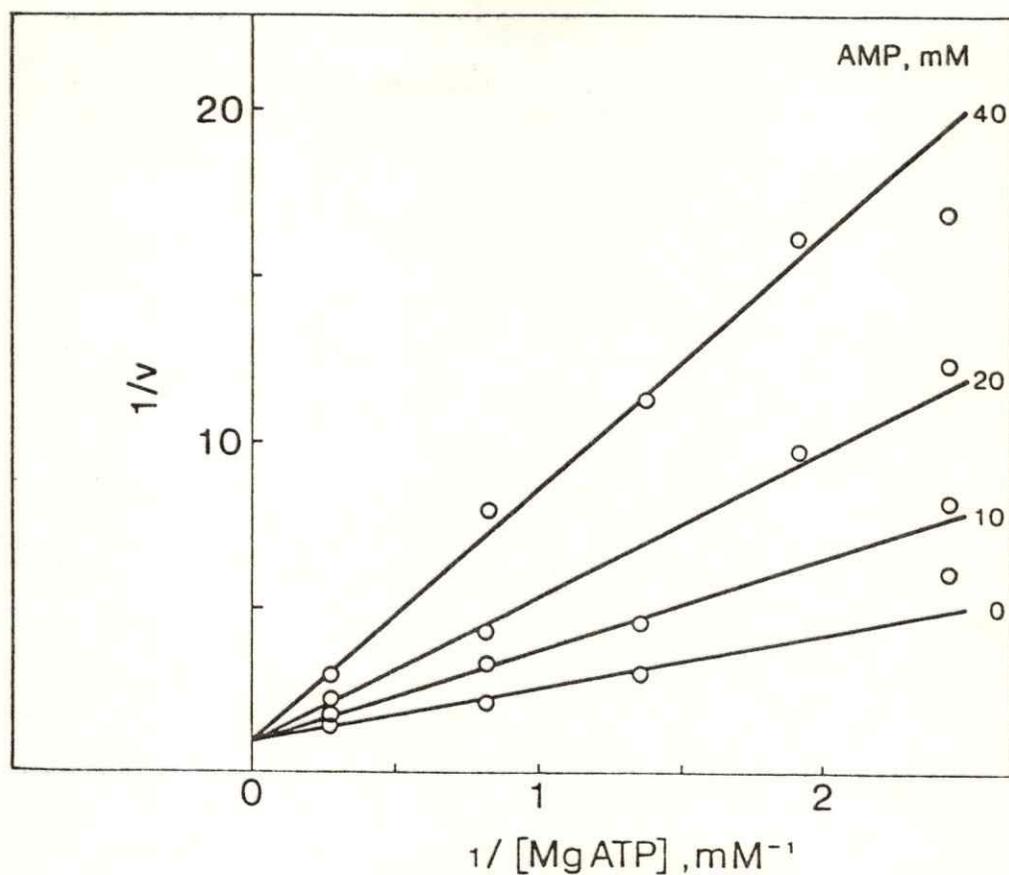


Figura 37. Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando MgATP es el sustrato variable. Las condiciones del ensayo son similares a las descritas en la figura 27. La concentración de MgATP varió en un rango de 0,41 a 3,55 mM y 2-desoxíglucosa se mantuvo constante a 36 mM.

TABLA VI

Constantes de inhibición para glucoquinasa determinadas desde los estudios de inhibición por AMP¹.

Sustrato fijo (mM)	Constantes de inhibición (mM)			
	K_{is}	$K_i (K_{is})^2$	K_{ii}	$K_i (K_{ii})^2$
dGlc				
26	27,64 ± 2,43	10,80 ± 1,82	-	-
36	19,23 ± 3,79	9,03 ± 2,51	-	-
60	18,44 ± 2,44	10,99 ± 2,34	-	-
180	13,99 ± 1,33	11,41 ± 2,01	-	-
Promedio	-	10,56 ± 0,52		
MgATP				
0,41	∞	∞	13,29 ± 1,30	7,67 ± 1,44
0,52	92,61 ± 54,1	67,13 ± 50,9	16,20 ± 1,06	8,40 ± 1,30
0,73	51,58 ± 45,3	36,65 ± 38,6	15,18 ± 1,80	6,59 ± 1,37
1,20	26,08 ± 7,37	13,90 ± 6,36	19,63 ± 0,77	6,25 ± 0,80
3,60	35,44 ± 8,87	9,77 ± 4,16	34,44 ± 3,05	4,64 ± 0,82

¹Para todos los cálculos se omitieron los valores de AMP 40 mM.

²Los valores de K_i fueron calculados a partir de K_{is} [$K_{is}=K_i(1+K_{ia}/A)$] para cada concentración del sustrato fijo dGlc y de K_{is} [$K_{is}=K_i(1+B/K_{ib})$] o K_{ii} [$K_{ii}=K_i(1+B/K_b)$] para cada concentración del sustrato fijo MgATP. Para el cálculo de $K_i (K_{is})$ con sustrato fijo ATP se supuso un mecanismo al azar en equilibrio rápido donde $K_i (K_{is}) = E \times I/EI$ y $K_i (K_{ii}) = EA \times I/EAI$.

respecto a dGlc. Sólo si la constante de inhibición es igual para los dos sitios (enzima libre y complejo enzima-dGlc), K_i sería independiente de la concentración de dGlc, lo que no es nuestro caso.

Cuando el sustrato variable era dGlc, el tipo de inhibición por AMP era dependiente de la concentración de MgATP utilizada. A concentraciones de MgATP ligeramente inferiores a la K_b (0.41 mM) la inhibición era de tipo incompetitiva, pues en un gráfico de dobles recíprocos resultan líneas paralelas (Fig. 38). Para confirmar este tipo de inhibición se hizo el gráfico de Hanes (1932) (S/v en función de S), a diferentes concentraciones fijas del inhibidor, resultando líneas que se intersectan en el eje de la ordenada (recuadro de la figura 38). A altas concentraciones de MgATP (1,2 y 3,6 mM) se observaba una inhibición de tipo mixto, pues se producía un punto de intersección de las líneas rectas, ubicado a la izquierda del eje de la ordenada, como se ilustra en la figura 39 para una concentración de MgATP de 3,6 mM (6,4 veces K_b). En esta figura se incluye un recuadro con el gráfico de Hanes, que confirma el tipo de inhibición. Otros gráficos como el de Dixon y el de Cornish-Bowden (no ilustrados), también apoyan esta conclusión.

La diferencia del tipo de inhibición que se observa al cambiar la concentración de ATP, el sustrato fijo, no la hemos visto descrita. Esto podría tener una explicación en el hecho que en los estudios cinéticos se trabaja habitualmente con una sola concentración no saturante de sustrato fijo, generalmente alrededor de la K_m .

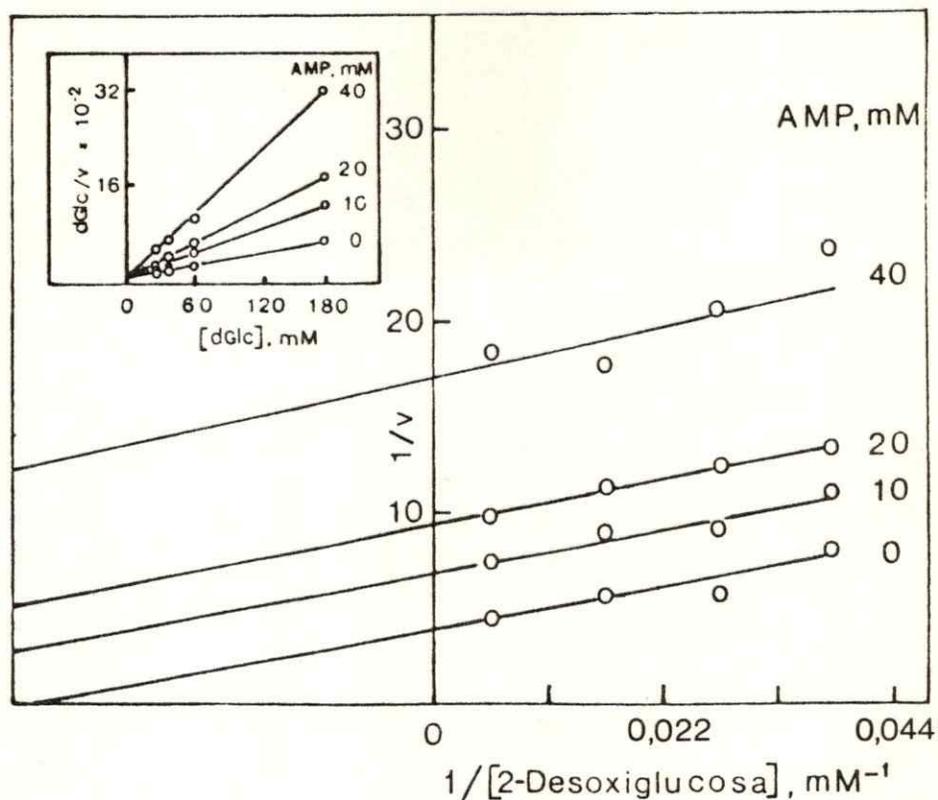


Figura 38. Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable a bajas concentraciones de MgATP. Las condiciones de ensayo son similares a las descritas en la figura 27. La concentración de 2-desoxiglucosa varió en un rango de 26 a 180 mM y la concentración de MgATP se mantuvo fija en 0,52 mM. En el recuadro se incluye el gráfico de Hanes (S/v en función de S) con diferentes concentraciones de AMP.

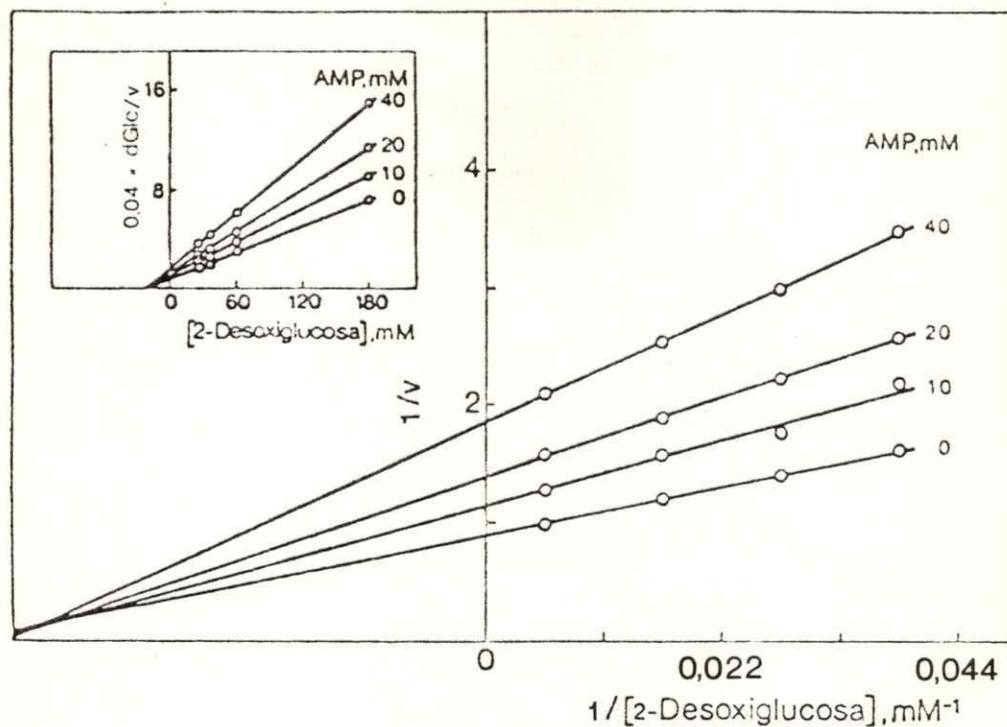


Figura 39. Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable a altas concentraciones de MgATP. Las condiciones del ensayo fueron similares a las descritas en la figura 27. La concentración de MgATP se mantuvo fija a 3,6 mM. En el recuadro se muestran los mismos valores en un gráfico de Hanes (S/v en función de S) con diferentes concentraciones de AMP.

El análisis de los resultados de la inhibición por AMP a concentraciones intermedias de ATP (0,52 y 0,73 mM) muestra que las pendientes tienen a concurrir en un punto hacia la izquierda, más distante de la ordenada que a las concentraciones mayores. Se tiene, entonces, una situación intermedia entre lo que ocurre a las concentraciones extremas de ATP utilizadas (0,41 y 3,6 mM). Esta situación se refleja muy bien en el gráfico secundario de las pendientes (Fig. 40), que muestra el aumento del valor de K_{is} al disminuir la concentración de MgATP, haciéndose infinito cuando MgATP es 0,41 mM. Los valores de K_{is} , junto con los de K_i calculados sobre la base de una inhibición mixta se encuentran en la Tabla VI.

En cuanto al gráfico secundario de las interacciones en función de la concentración de AMP, se puede observar en la figura 40 que las líneas rectas (excluidos los valores de 40 mM) se cortan con muy buena aproximación en un punto. Este punto tiene como ordenada el valor recíproco de la velocidad máxima (la pendiente tiende a cero cuando la concentración de MgATP tiende a infinito), y como abscisa un valor de $-(AMP)$ igual al de la K_i de K_{ii} . El cálculo de la K_i da un valor de $11,72 \pm 0,92$ mM, que es sensiblemente igual al de la K_i obtenido de K_{is} cuando MgATP es el sustrato variable y dGlc es fijo a diferentes niveles (Tabla VI). Este valor de K_i y de K_{ii} , obtenido a concentración infinita de dGlc y a cualquiera de ATP, difiere sin embargo, de los valores que se pueden calcular a partir de los datos experimentales

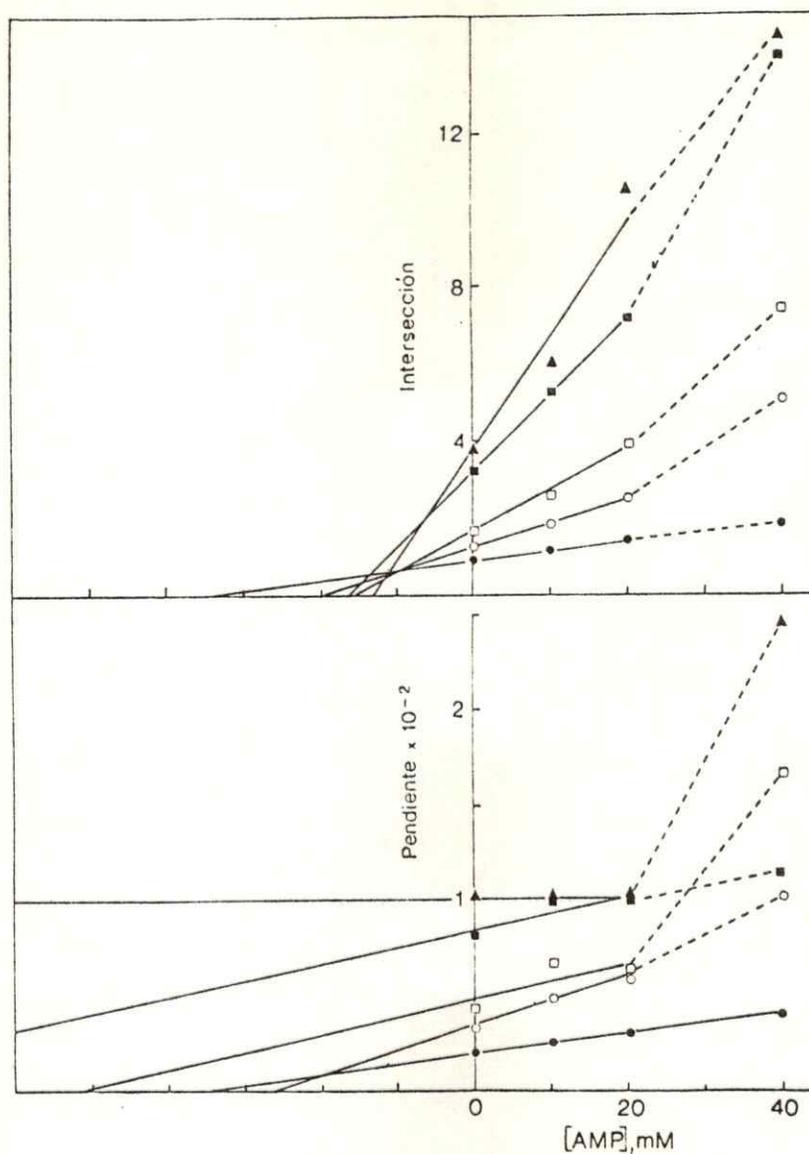


Figura 40. Gráficos secundarios de la inhibición de glucoquinasa por AMP cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable. Los valores de las intersecciones y de las pendientes para concentraciones de MgATP 0,52 (■) y 3,6 (●) mM provienen de las figuras 38 y 39, y para las concentraciones 0,41 (▲), 0,73 (□) y 1,2 (○) mM de gráficos similares no mostrados. Los valores de AMP 40 mM no se consideraron para las líneas de regresión. En la figura la línea punteada une los valores de AMP 40 mM con la línea de regresión correspondiente.

de K_{ii} a cada una de las concentraciones de ATP (Tabla VI).

Intuitivamente el cambio de tipo aparente de mecanismo de inhibición podría esquematizarse como sigue. La reacción glucoquinásica operaría, a baja concentración de ATP, con un mecanismo ordenado en que dGlc sería el primer sustrato. Al aumentar ATP a niveles subsaturantes podría este sustrato constituir un complejo binario productivo, creándose un segundo sitio detectable cinéticamente de competencia con el inhibidor AMP. En forma alternativa, se podría considerar la posibilidad de que el AMP fuera capaz de interactuar con la enzima libre, aún tratándose de un mecanismo ordenado con dGlc como primer sustrato. Este sitio podría ser por ejemplo, el ADP, con el cual el AMP competiría. Un análisis de estas posibilidades lo efectuaremos en la Discusión y en el Apéndice A (p.168).

Análisis de la velocidad inicial en presencia de los productos

Curva de progreso de la fosforilación de dGlc. El progreso de la reacción se siguió a través de la aparición de ^{14}C -ADP o de la desaparición de ^{14}C -ATP del medio de ensayo. Una curva de progreso para una reacción enzimática obedece a una cinética de orden cero si la concentración inicial del sustrato es aproximadamente 100 veces su K_m o a una cinética de orden uno si la concentración de sustrato es aproximadamente 0,01 veces la K_m . Con concentraciones intermedias de sustrato debe esperarse una

cinética entre orden cero y orden uno. En la figura 41 se observa que ambas curvas de progreso son simétricas y que una cierta linealidad se conserva hasta los ocho minutos de reacción aproximadamente, en que se alcanza un 19% de consumo del sustrato inicial (MgATP 1,2 mM; 2,1 veces K_b).

Inhibición por 2-desoxiglucosa-6-fosfato. En la figura 42 se muestran los resultados de la inhibición producida por dGlc-6-P, en gráficos de Dixon y de Cornish-Bowden, usando MgATP como sustrato variable. En am los gráficos las rectas se intersectan a la izquierda del eje de la ordenada, por encima (Dixon) o por debajo (Cornish-Bowden) de la abscisa, indicando una inhibición de tipo mixto. Por otra parte, la inhibición de dGlc-6-P con respecto a dGlc como sustrato variable, a concentración saturante de ATP, parecía indicar una inhibición incompetitiva. Sin em bargo, la inhibición producida por una concentración de NaCl de fuerza iónica semejante a la de dGlc-6-P fue muy similar, lo que invalida los resultados. La inhibición por KCl de la glucoquinasa de hígado de rata, utilizando glucosa como sustrato fue descrita por Weiser y col. (1971). Una vez corregida por el efecto de fuerza iónica, la inhibición es muy baja, lo que sugiere una baja afinidad del dGlc-6-P por cualquier forma de enzima. En consideración a esto, no se continuaron los estudios.

La inhibición por el producto glucosa-6-fosfato de la glucoquinasa cuando glucosa es el sustrato glucídico ha sido de diversa

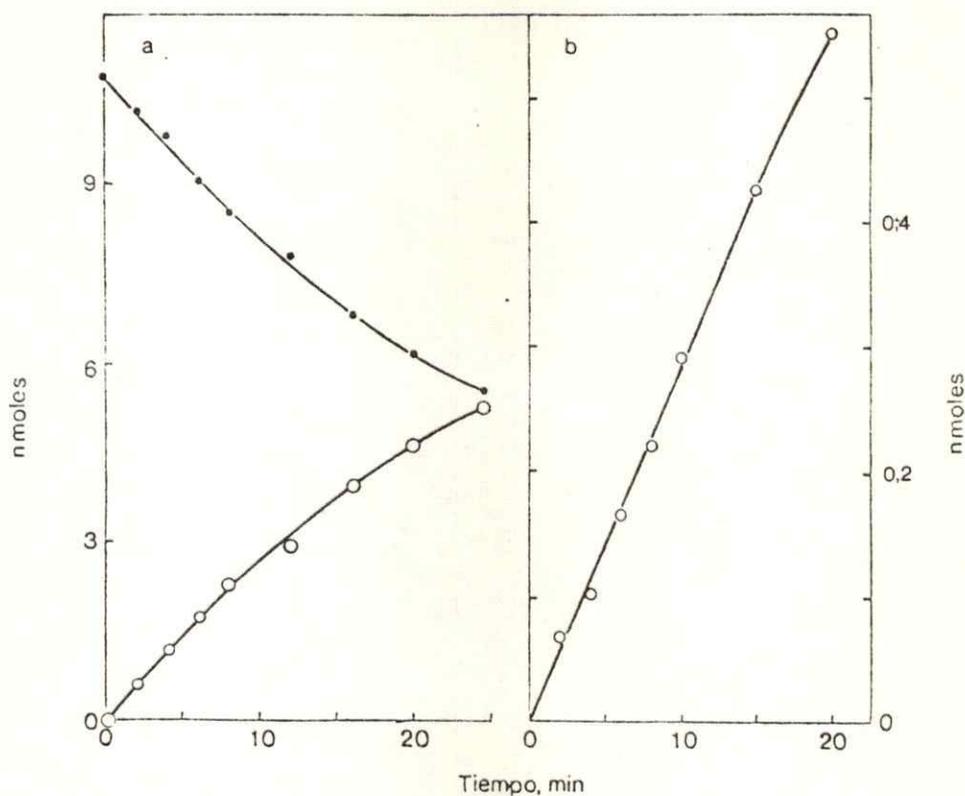


Figura 41. Curvas de progreso de la reacción de fosforilación de 2-desoxiglucosa. Las mezclas de reacción contenían en un volumen final de 0,25 ml: a) Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; KCl 100 mM; DTT 1 mM; MgCl_2 2,2 mM; 2-desoxiglucosa 20 mM; ATP 1,2 mM (radiactividad específica 0,756 cpm/pmol) y 23 mU de glucoquinasa. b) MgCl_2 1,41 mM; ATP 0,41 mM (radiactividad específica 6,32 cpm/pmol) y todos los demás componentes iguales a la mezcla anterior. En ambos casos la mezcla de reacción se incubó a 30° . (\bullet), ^{14}C -ATP; (\circ), ^{14}C -ADP. Los valores se corrigieron con los controles realizados en ausencia de 2-desoxiglucosa. La reacción se detuvo en los tiempos señalados sembrando alícuotas de 10 μl sobre papel DE-celulosa como se indica en Materiales y Métodos.

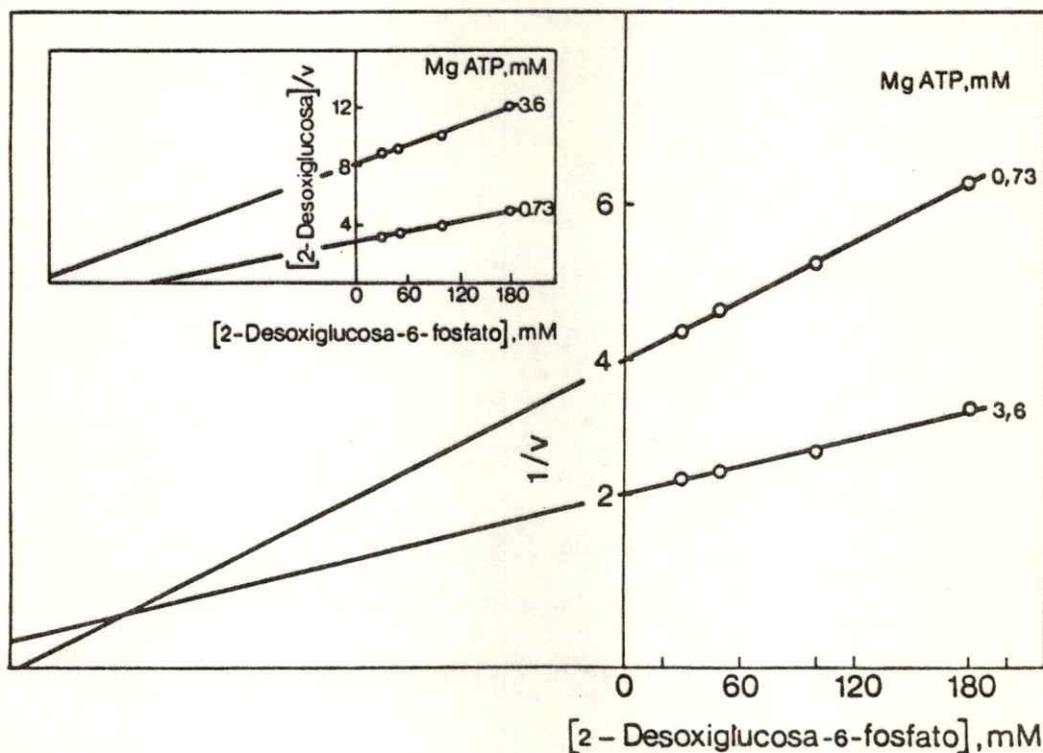


Figura 42. Gráfico de Dixon para la inhibición de glucoquinasa por el producto de la reacción 2-desoxiglucosa-6-fosfato cuando MgATP es el sustrato variable. Las condiciones del ensayo fueron similares a las descritas en la figura 27. Las concentraciones de MgATP fueron 0,73 y 3,6 mM. La concentración de 2-desoxiglucosa se mantuvo fija en 180 mM y el inhibidor varió en un rango de concentración de 0 a 180 mM. El recuadro muestra el gráfico de Cornish-Bowden ($d\text{Glc}/v$ en función de $d\text{Glc} - 6 - \text{P}$) a las dos concentraciones de MgATP.

naturaleza según las comunicaciones de autores, posiblemente debido a que las condiciones de estudio no son comparables y debido a la complejidad introducida por el carácter sigmoideo de la función de saturación con glucosa, no conocida en los primeros trabajos. Así, con respecto al ATP como sustrato variable González y col. (1967) y Storer y Cornish-Bowden (1977) encuentran una inhibición competitiva, en cambio para Parry y Walker (1966) sería mixta. La inhibición por glucosa-6-fosfato con respecto a glucosa como sustrato variable ha sido de difícil clasificación. Parece ser de tipo mixto en ciertas condiciones, como concentración alta de glucosa (> 10 mM) (Storer y Cornish-Bowden, 1977) y en las preparaciones envejecidas (González y col. 1967), es decir, cuando la función de saturación con glucosa aparece como hiperbólica. Por el contrario, para Parry y Walker (1966) el glucosa-6-fosfato actuaría como inhibidor competitivo de glucosa, a concentración saturante de ATP (5 mM).

Inhibición por MgADP respecto a MgATP. Para probar el efecto inhibitorio de MgADP, su concentración se varió entre 0 y 8 mM, mientras las concentraciones de MgATP eran variadas entre 0,7 y 6,4 veces K_b y la concentración de dGlc se mantenía fija en 100 mM (5 veces K_a). En un gráfico del recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración de MgATP, a diferentes concentraciones del inhibidor, se obtuvieron líneas rectas intersectantes en el eje de la abscisa y a la

izquierda de la ordenada (Fig. 43), lo que es propio de una inhibición no competitiva simple. Cuando estos mismos resultados se colocaron en un gráfico de Dixon (Fig. 44 A) y en uno de Cornish-Bowden (Fig. 44 B) se obtuvieron líneas rectas intersectantes en el eje de la abscisa y a la izquierda de la ordenada, confirmando el carácter no competitivo puro de la inhibición.

Estos resultados son compatibles con un mecanismo ordenado en que dGlc es el primer sustrato y ADP es el primero o segundo producto. También estos resultados serían compatibles con un mecanismo al azar en equilibrio rápido, si se formara un complejo de punto muerto E-dGlc-ADP.

Nuestros resultados concuerdan en líneas generales con los obtenidos por Storer y Cornish-Bowden (1977) quienes encuentran un tipo mixto de inhibición. Sin embargo, la inhibición por MgADP con glucosa 50 mM como sustrato glucídico no es lineal en un rango de concentraciones del nucleósido-trifosfato entre 0,088 y 1,76 mM, en un gráfico de Dixon. Esta diferencia puede atribuirse a que la función de saturación es sigmoidea con glucosa y hiperbólica con 2-desoxiglucosa. Una condición que dificulta el estudio de la acción del ADP y la comparación de los resultados de diversos grupos es la concentración de Mg^{2+} empleada. Nosotros usamos un exceso de Mg^{2+} de 1 mM, mientras Storer y Cornish-Bowden (1977) utilizan 5 mM, que asegura una mayor proporción de ADP como MgADP (76 a 82%). El magnesio libre es un inhibidor de la glucoquí-nasa, lo que crea un grado de incertidumbre en estos análisis. La

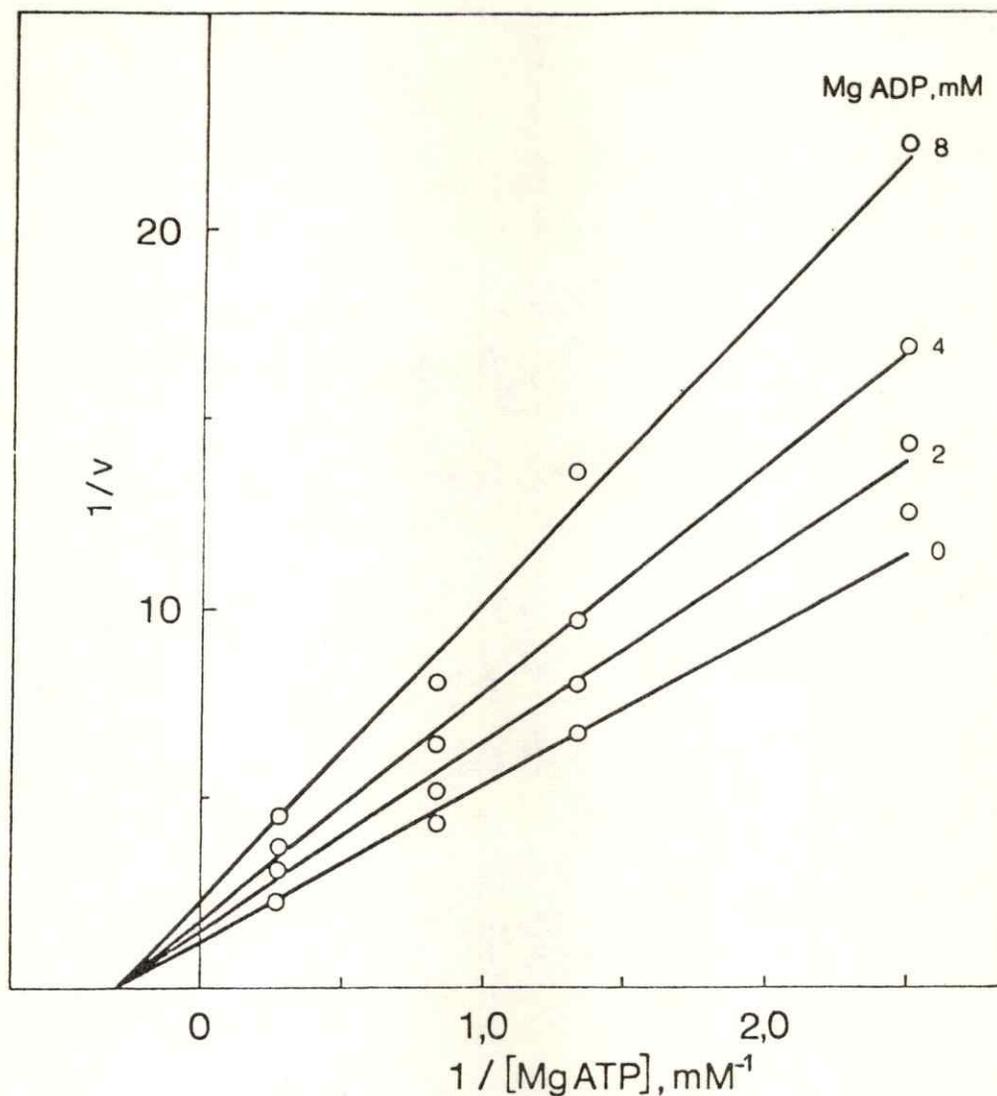


Figura 43. Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por el producto MgADP cuando MgATP es el sustrato variable. Las condiciones del ensayo fueron similares a las descritas en la figura 41. La concentración de MgATP varió entre 0,41 y 36 mM y la concentración de MgADP varió en un rango de 0 a 8 mM. La concentración de $MgCl_2$ se mantuvo 1 mM sobre la suma de las concentraciones de los nucleótidos y la concentración de 2-desoxiglucosa se mantuvo fija en 100 mM.

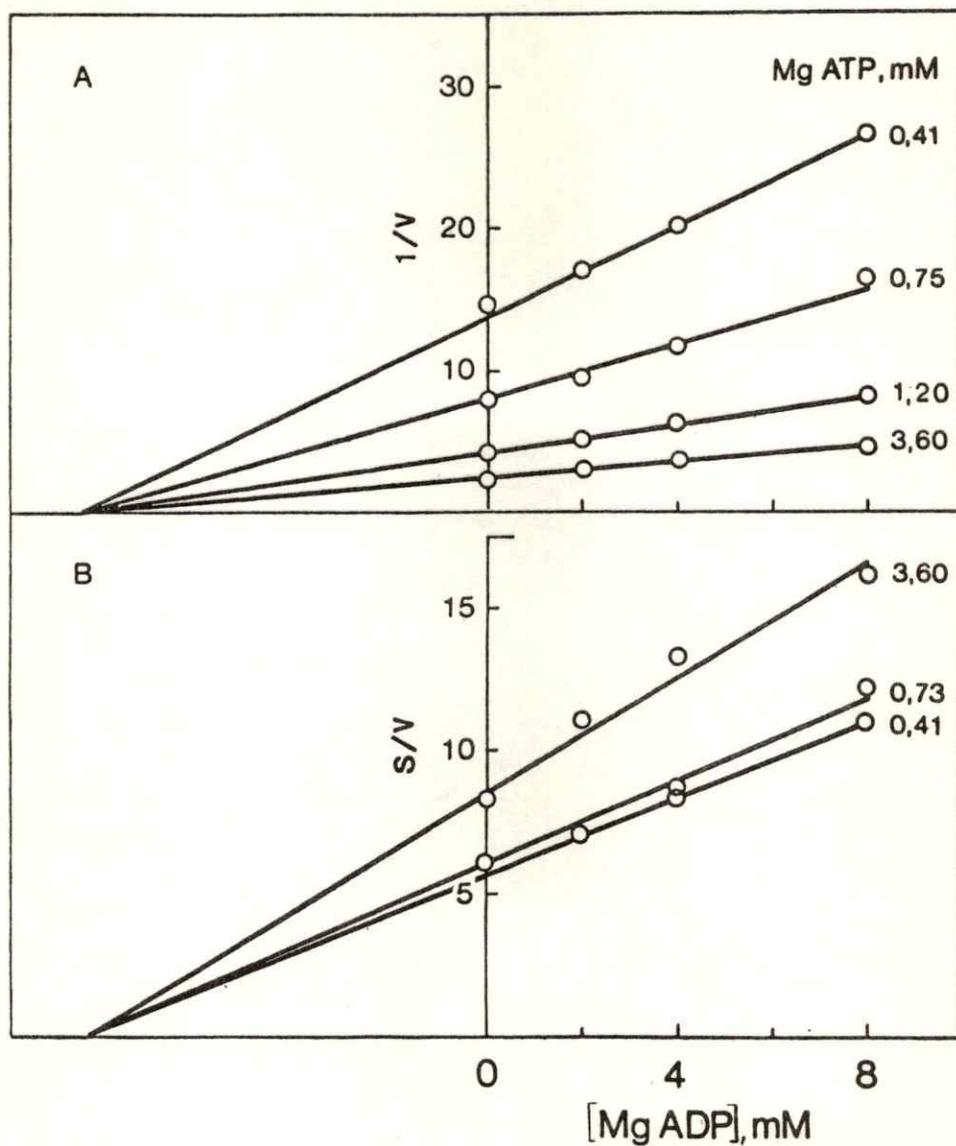


Figura 44. Inhibición de glucoquinasa por el producto MgADP cuando MgATP es el sustrato variable. Gráficos según Dixon (A) y según Cornish-Bowden (B) del experimento de la figura 43.

complejidad de la situación se ejemplariza en las antiguas observaciones de Parry y Walker (1966), quienes encontraron diferentes tipos de inhibición por ADP, con ATP y con glucosa como sustratos variables, dependiendo de la concentración de Mg^{2+} en el medio. Estos autores no usaron en ningún experimento un exceso molar de magnesio sobre la suma de ambos nucleótidos.

Inhibición de MgADP con respecto a dGlc. Para analizar el efecto inhibitorio de MgADP respecto a dGlc se hicieron los gráficos de Dixon y de Cornish-Bowden. Se ha hecho un experimento a concentración alta de ATP (3,6 mM) y uno con ATP 1.2 mM y los resultados no fueron muy satisfactorios, pues hay puntos que se escapan a las líneas razonables trazadas a ojo en ambos gráficos, dentro de conjuntos relativamente pequeños de puntos. Eliminando estos puntos y calculando las líneas de regresión por el método de los mínimos cuadrados pueden obtenerse gráficos que sugieren una inhibición de tipo mixto, con un componente competitivo predominante. En efecto, en el gráfico de Dixon (Fig. 45 A) el punto de concurrencia estaría en el segundo cuadrante (súpero-izquierdo), mientras en el de Cornish-Bowden (Fig. 45 B) las líneas se intersectan en el tercer cuadrante (ínfero-izquierdo), razonablemente en un punto. Las constantes de inhibición serían las siguientes: K_{is} , del gráfico de Dixon, igual a $2,95 \pm 0,25$ y K_{ii} , según Cornish-Bowden, igual a $36,84 \pm 8,97$. Resultados parecidos y con iguales

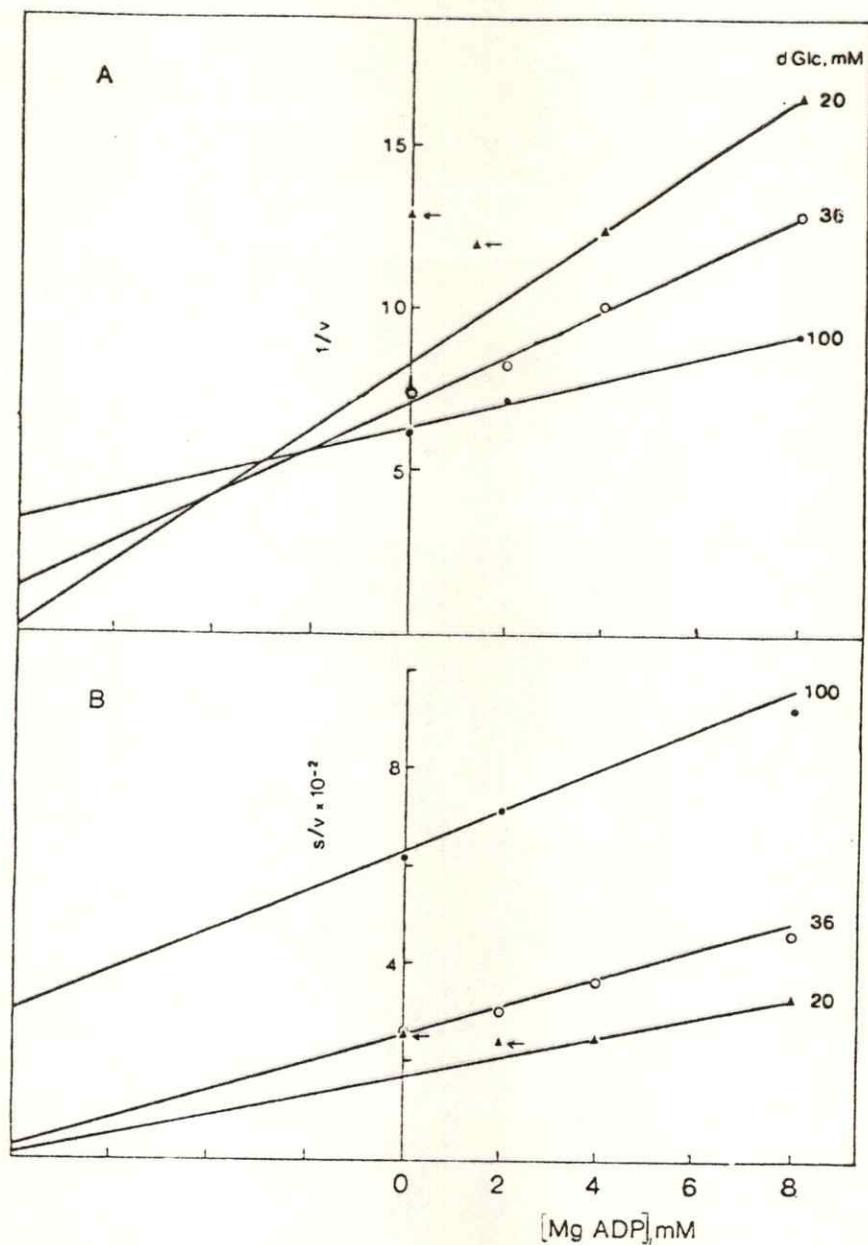


Figura 45. Inhibición de glucoquinasa por el producto MgADP cuando 2-desoxiglucosa es el sustrato variable. Gráficos según Dixon (A) y según Cornish-Bowden (B). Las condiciones del ensayo fueron similares a las descritas en la figura 43. La concentración de dGlc varió entre 20 y 100 mM y la concentración de MgATP se mantuvo fija a 3,6 mM. Las flechas indican los puntos eliminados para el cálculo de las líneas de regresión.

incertidumbres se obtuvieron con ATP 1,2 mM. Es obvio que habrá que repetir estos experimentos para dar mayor fuerza a las conclusiones.

Los resultados serían compatibles con la operación de un mecanismo ordenado con dGlc como primer sustrato, y MgADP como último producto y la formación de un complejo de punto muerto E-dGlc-MgADP, por lo que el componente competitivo sería muy importante. Sin embargo, también sería compatible con un mecanismo al azar en equilibrio rápido, donde habría también que considerar la posible formación de un complejo de punto muerto.

DISCUSION

El comportamiento cinético de la glucoquinasa con glucosa es sigmoideo (Niemeyer y col., 1975b; Storer y Cornish-Bowden, 1976). Para explicar este comportamiento se han presentado dos modelos. En uno se postula un orden estricto de interacción de los sustratos (glucosa como primer sustrato) y de los productos con la enzima, la que experimentaría transiciones conformacionales mnemónicas (Storer y Cornish-Bowden, 1977). En otro se propone que el orden de interacción de los sustratos es al azar con rutas preferenciales según la concentración relativa de los sustratos y la enzima se encontraría al menos en dos conformaciones (Cárdenas y col., 1979).

Los estudios en velocidad inicial, así como los de inhibición con inhibidores de punto muerto y con productos, utilizando 2-desoxiglucosa como sustrato glucídico, no han permitido conocer en forma inequívoca el orden de interacción de los sustratos con la enzima. En efecto, algunos resultados pudieron interpretarse como si operara un mecanismo al azar, en que hubiera una ruta preferente de acuerdo con la concentración de ATP: a menor concentración del nucleótido, el camino cinético preferido sería la unión de la enzima libre a la dGlc, mientras que a altas concentraciones relativas de ATP, este podría ser el primer sustrato. Sin embargo, otros experimentos más bien apoyan un orden estricto de adición

de sustratos a la enzima, con dGlc como primer sustrato. Es por esto, que hemos utilizado la protección por sustratos, productos y análogos contra la inactivación de la enzima por DTNB y por rosa de bengala como complemento de los estudios cinéticos, que contribuiría a su mejor interpretación.

Discutiremos primero la validez de las constantes de disociación calculadas a partir de los experimentos de protección en contra de la modificación química y la relación entre estos experimentos y el mecanismo cinético. Luego discutiremos los resultados cinéticos, apoyándolos con los de protección.

Validez de las constantes de disociación glucoquinasa-ligandos. Como se comentó anteriormente (p. 64) existiría una interacción reversible entre el DTNB y la glucoquinasa, previa a la modificación irreversible. Esta situación permite postular un modelo para explicar el efecto protector de los sustratos glucídicos (dGlc y Glc) y del producto ADP, en el cual la formación de un complejo glucoquinasa-ligando, impediría la unión del DTNB a la enzima o desplazaría al DTNB reversiblemente unido a ella. El modelo es válido para el tratamiento cinético de la inactivación de enzimas por diversos reactivos, incluyendo los modificadores de afinidad (Kitz y Wilson, 1962; Fahrney y Gold, 1963; Mares-Guía y Shaw, 1967; Meloche, 1967; Malcolm y Radda, 1970; Connolly y Trayer, 1979a) y autoriza adaptar los resultados a ecuaciones, en que se formula una competencia

entre el ligando y el reactivo modificador por la misma forma de enzima, como ocurre en la inhibición competitiva de una reacción enzimática. Sin embargo, nuestros resultados no descartan otros modelos de inactivación, en que se postule, por ejemplo la formación de un complejo enzima-DTNB-ligando, que podría permitir un tratamiento algebraico similar a los otros tipos frecuentes de inhibición de una reacción enzimática incompetitiva, no-competitiva, pura o mixta. Como ya mencionamos (p. 76) algunos experimentos preliminares indican que una conducta similar al de una inhibición no-competitiva pura explica la interacción del DTNB y los sustratos glucídicos con la glucoquinasa (Monasterio y col., 1980).

La protección por los ligandos glucídicos y por ADP fue dependiente de la concentración de éstos, lo que nos permitió estimar las constantes de disociación enzima-ligando.

Tanto si el DTNB y el ligando compiten por una misma forma de enzima, como si el DTNB y el ligando se unen simultáneamente a la enzima sin modificarla covalentemente, la relación entre el recíproco de la constante de inactivación y la concentración del ligando es lineal, como en un gráfico de Dixon. Los valores de la intersección en la abscisa difieren según sea el modelo de interacción que mejor se adapte a los resultados experimentales, de acuerdo a las ecuaciones correspondientes (Apéndice A; p. 181). En efecto, si se formula una competencia en la unión del modificador y el ligando con la enzima, vale la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_2} \left(1 + \frac{K_d}{(\text{DTNB})} \right) + \frac{1}{k_2} \left(\frac{K_d}{K_D (\text{DTNB})} \right) \times L$$

donde k_i es la constante de inactivación observada; K_d y K_D son las constantes de disociación enzima-DTNB y enzima-ligando respectivamente; k_2 es la constante de velocidad del paso E-DTNB a $E_i + \text{TNB}$ y L es la concentración del ligando (ecuación correspondiente al modelo a, según se deriva en el Apéndice A, p. 181). En este caso la intersección de la recta con la abscisa corresponde a una K_d aparente, y depende de la concentración del modificador DTNB, pues $K_{d \text{ ap}} = K_d \left(1 + \frac{\text{DTNB}}{K_d} \right)$. Se puede conocer el valor verdadero de K_D al realizar los experimentos de protección a diferentes concentraciones de DTNB (ver Apéndice A, p.182) en cuyo caso se produce un punto de concurrencia de las diversas rectas por encima de la abscisa y K_D está dada por la proyección del punto a la abscisa (Apéndice A, p.182).

Los resultados de Monasterio y col. (1980) señalan que en la protección por glucosa (y 2-desoxiglucosa) contra la inactivación de la glucoquinasa por DTNB, operaría una interacción del tipo no-competitivo puro, cuya expresión algebraica corresponde a la siguiente ecuación (Apéndice A, ec.53 p.185), en la que los términos tienen el mismo significado que en la ecuación anterior:

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_2} \left(1 + \frac{K_d}{(\text{DTNB})}\right) + \frac{1}{k_2 K_D} \left(1 + \frac{K_d}{(\text{DTNB})}\right) \times L$$

Esta clase de interacción no la hemos visto descrita y ofrece el interés de permitir calcular directamente las constantes de disociación enzima-ligando, en forma independiente de la concentración del agente modificador y de la constante de disociación enzima-modificador. En un estudio semejante al de esta tesis, en que se ha empleado el DTNB como modificador de la hexoquinasa de cerebro de bovino, se han calculado constantes de disociación de los complejos enzima-ligandos, suponiendo, sin probarlo, que opera un mecanismo competitivo y, por lo tanto, se ha introducido el factor de corrección, en el cual se consideran la concentración de DTNB y la constante de disociación enzima-DTNB (Redkar y Kenkare, 1975).

Validez de las determinaciones de K_d y K_D cuando no se utiliza una preparación de enzima homogénea. El valor de la constante de disociación enzima-DTNB se calculó a partir de la relación entre el recíproco de la constante observada y el recíproco de la concentración de DTNB de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_d}{k_2} \times \frac{1}{(\text{DTNB})}$$

donde k_i es la constante de inactivación observada; K_d la constante de disociación del complejo E-DTNB y k_2 la constante de velocidad máxima de inactivación obtenida cuando DTNB es infinito (ver Apéndice A, p.185). Si hay otras proteínas presentes que unan DTNB el valor de la constante de disociación enzima-DTNB será sobreestimado, es por esto que nuestra constante de disociación es sólo aparente. Más importante nos parece analizar, aunque brevemente, la influencia que tendrían las proteínas contaminantes y por lo tanto la concentración de DTNB libre, sobre las constantes de disociación de los complejos enzima -ligandos. Un análisis algebraico en que se considera al DTNB como el sustrato de una enzima y al ligando como un inhibidor, permite llegar a la conclusión que son varias las posibilidades teóricas. Ellas requieren sin embargo, para ser exactas, que la desaparición de DTNB debida a las proteínas contaminantes, sea proporcional a la concentración de DTNB, lo que sólo se cumple si: las constantes cinéticas de segundo orden del DTNB con las otras proteínas son menores que las de la glucoquinasa con DTNB y si la constante de disociación de las proteínas contaminantes con DTNB son valores tales que permiten reacciones de pseudo-primer-orden. Estas dos circunstancias harían que no se titulen las proteínas contaminantes con el DTNB, antes que termine la primera fase de inactivación de la glucoquinasa con DTNB.

La interacción del ligando y del DTNB pueden resultar, según el análisis algebraico, como interacciones competitivas, no-competitivas y de tipo mixto. Sólo en el caso en que es de tipo no-competitivo puro

bastaría una concentración no saturante de DTNB cercana a su K_d , para determinar la constante de disociación enzima-ligando. Sin embargo, si es de tipo competitivo o mixto, se requiere al menos dos concentraciones de DTNB para determinar K_d . Los experimentos pertinentes mostraron que al menos para la glucosa y la 2-desoxiglucosa la protección por ligandos contra la inactivación por DTNB es de tipo no-competitivo puro (Monasterio y col., 1980).

Esta situación explica que los valores de K_D _{ap} obtenidos en los experimentos de inactivación sean extraordinariamente semejantes a los valores de las constantes cinéticas. La gran disparidad entre los valores cinéticos y los valores deducidos de experimentos de inhibición por DTNB en hexoquinasa A de cerebro, podrían tener una explicación en el tipo de interacción de la enzima con el ligando y el DTNB para analizar los resultados experimentales.

Así Wilson (1978) encuentra valores de K_d para glucosa de alrededor de 0,25 mM que son más de diez veces superiores a las constantes cinéticas estimadas en velocidad inicial por Thompson y Bachelard (1977). Su discusión se hace alrededor de la validez de los mecanismos cinéticos propuestos para hexoquinasa. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, Redkar y Kenkare (1975), calcularon valores para la constante de disociación hexoquinasa-glucosa, que fueron menores que las constantes cinéticas, pero en este caso los autores supusieron una interacción competitiva y corrigieron por tanto los valores experimentales con los

de la concentración de DTNB empleado y la constante de disociación enzima-DTNB estimada por ellos. Estas correcciones disminuyen apreciablemente los valores experimentales.

Relación entre el mecanismo cinético y la protección por ligandos contra la inactivación por DTNB. La relación entre la protección por sustratos y productos contra un agente modificador de una enzima y el orden de interacción de los ligandos en el mecanismo cinético, fue demostrada por Südi (1970) en estudios sobre la inactivación por calor de la lactato-deshidrogenasa. Esta metodología le permitió a Wilson (1978, 1979) establecer una relación entre los cambios conformacionales putativos inducidos por ligandos (sustratos, inhibidores y productos) y el mecanismo cinético de la hexoquinasa de cerebro de bovino, dando apoyo a la operación de un mecanismo al azar de adición de sustratos y productos.

Con el mismo enfoque analizaremos el efecto protector de glucosa, 2-desoxiglucosa, ADP y AMP sobre la inactivación por DTNB. Como se mostró la protección producida por los azúcares no es afectada por la presencia de MgATP. Una interpretación muy probable es que la glucosa sea capaz de unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-ATP para producir un cambio conformacional de la enzima que impida la unión del DTNB como ya se comentó. Se daría así apoyo a la postulación de un cambio conformacional propuesto en los estudios cinéticos de Storer y Cornish-Bowden (1977) y de Cárdenas y col. (1978; 1979).

La protección ejercida por los diversos nucleótidos es diferente. Así, mientras ATP ejerce una muy pequeña protección, AMP y ADP tienen un franco efecto protector y la presencia simultánea de ATP parece no reducir este efecto. La protección por nucleótidos es improbable que corresponda a un impedimento estérico, por superposición del sitio de unión de ellos, con el del DTNB. Sin embargo, puede proponerse un cambio conformacional, similar al postulado para glucosa aunque todavía no se han efectuado experimentos que permitan clarificar la situación. La conformación insensible al DTNB, explicaría la protección producida tanto por el ADP como por AMP.

La dependencia parabólica de la protección con respecto a la concentración de AMP indica que su efecto protector no es simple. Este comportamiento de AMP sugiere que se puede unir a más de un sitio. Suponiendo que esto es verdad, y linearizando este efecto, el valor de la interacción en la abscisa cuando $1/k_i^1$ _{obs} es cero ($K_{D\ ap}$) fue de 10,5 mM, igual que la constante de disociación obtenida a partir de los estudios cinéticos.

Es curioso que ATP y MgATP no tengan el mismo efecto que AMP y ADP, si tienen una estructura parecida. La causa parece deberse a la presencia del fosfato gama en el ATP. Gran controversia ha existido para explicar la inhibición competitiva entre glucosa-6-fosfato y MgATP en las hexoquinasas de levadura y de cerebro bovino (Fromm y Zewe, 1962b; Grossbard y Schimke, 1966; Wettermark y col., 1968). La

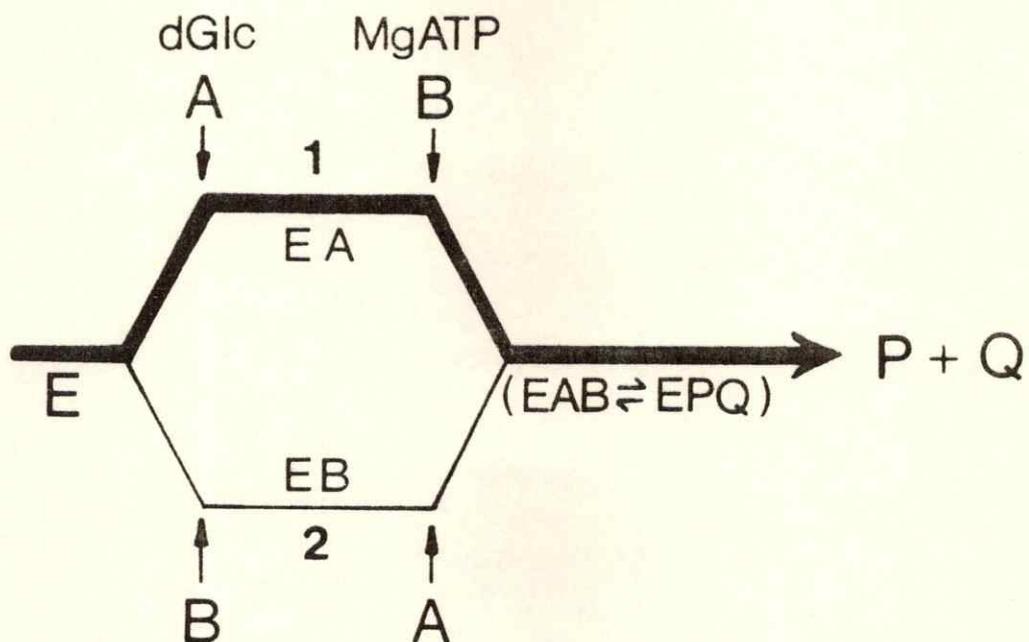
explicación más aceptada es la existencia de un sitio para el fosfato gama en el sitio activo que sería reconocido por el azúcar-fosfato y el ATP (Casazza y Fromm, 1976). Basándose en este hecho y en que Glc-6-P es un inhibidor competitivo respecto a MgATP también para glucoquinasa (Storer y Cornish-Bowden, 1977), podríamos decir que la unión de glucosa-6-P y de MgATP al sitio del fosfato no sería capaz de producir el cambio conformacional necesario para impedir completamente la reacción del DTNB con la enzima y en el caso de glucosa-6-fosfato, más bien induciría un cambio que la favorecería. El 10% de protección por ATP indica una interacción entre la enzima y el nucleótido. Los resultados de protección por ATP de la inactivación de la glucoquinasa por rosa de bengala también lo indican y abren la posibilidad de estudiar la unión de ATP a la enzima de manera similar a como se ha hecho con los azúcares a través de la inactivación por DTNB. Una explicación alternativa es que el MgATP y Glc-6-P sólo puedan unirse y dar la conformación insensible al DTNB cuando Glc y MgADP ya estén unidos, respectivamente. Este último comportamiento es el que corresponde a un mecanismo cinético con una secuencia ordenada de interacción de los sustratos y de los productos, en el cual el azúcar es el primer sustrato y ADP el último producto, como propusieron Storer y Cornish-Bowden, (1977). La operación de un mecanismo al azar con ruta preferencial (Niemeyer y col., 1978; Monasterio, 1978), en el cual la unión de MgATP a la enzima libre sería menos favorable que la unión al complejo enzima glucosa, también podría explicar

la baja protección ejercida por el MgATP.

Orden de adición de los sustratos. Los diagramas de intersecciones, de los resultados cinéticos en velocidad inicial, obtenidos con dGlc y MgATP como sustratos, indican claramente que el mecanismo de adición de los sustratos es en secuencia. Tanto para un mecanismo en secuencia ordenada en régimen estacionario, como al azar en equilibrio rápido, se cumple la ec. 2 (ver Apéndice A, p. 143). Los valores de las constantes cinéticas K_a y K_{ia} para dGlc, obtenidos de esta ecuación son concordantes con los que pueden calcularse a partir de los estudios de inhibición por los análogos GlcNAc y AMP. El valor de K_{ia} ($40,67 \pm 3,3$ mM) que corresponde a la constante de disociación del complejo binario enzima-dGlc es similar al de $K_{D_{ap}}$ (30 mM) calculado a partir de los estudios de protección contra la inactivación de la enzima por DTNB.

Los resultados de inhibición con GlcNAc, análogo de dGlc, indican que dGlc no puede ser el segundo sustrato en un mecanismo ordenado estricto. Sólo son compatibles con un mecanismo en secuencia ordenada de adición de sustratos donde dGlc fuese el primer sustrato, (vía superior en el esquema II) o con un mecanismo al azar (operación simultánea de las dos rutas mostradas en el esquema II).

La constancia de K_{is} (Tabla V) para la inhibición de GlcNAc respecto a dGlc, es compatible con un mecanismo ordenado estricto. Sin embargo, si las constantes de disociación de GlcNAc desde los



Esquema 11. Secuencia de adición de los sustratos a la glucocinasa. La vía 1 indica la ruta principal de adición de los sustratos a la enzima. El significado de las abreviaturas se encuentra descrito en el texto.

complejos enzima-GlcNAc y enzima-Mg-ATP-GlcNAc tuviesen el mismo valor, nuestros resultados serían compatibles con un mecanismo al azar en equilibrio rápido (Thompson y Bachelard, 1976). Los valores de K_i calculados para GlcNAc cuando MgATP fue el sustrato variado tampoco nos permiten discriminar entre un mecanismo ordenado con dGlc como primer sustrato y uno al azar en equilibrio rápido (Resultados, p. 98). Sin embargo, sus valores son consistentes con los de K_i (K_{is}), cuando dGlc era el sustrato variado, al suponer un mecanismo ordenado (Tabla V).

La inhibición incompetitiva de AMP respecto a dGlc, a bajas concentraciones de MgATP, es propia de un mecanismo ordenado, donde el nucleótido es el segundo sustrato. Sin embargo, la inhibición mixta a altas concentraciones de MgATP es propia de un mecanismo al azar. La inhibición incompetitiva descarta un mecanismo al azar en que ambas rutas operen durante el ciclo catalítico. Así, una explicación para estos resultados, sería la operación de un mecanismo al azar con una ruta preferencial muy marcada (vía 1 en el esquema II) donde se forzaría la otra vía al aumentar la concentración de MgATP. Por otro lado, estos resultados también serían compatibles con la operación de un mecanismo ordenado estricto (vía 1 del esquema II), donde AMP se uniera débilmente al sitio de la 2-desoxiglucosa. Este comportamiento, cuando dGlc es el sustrato variado, obedecería a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_b}{B} \left(1 + \frac{I}{K_i'} \right) \right) + \frac{1}{V} \left(\left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \left(K_a + \frac{K_{ia} K_b}{B} \right) \right) \times \frac{1}{A}$$

donde K_i y K_i' son las constantes de disociación de los complejos E-AMP y E-dGlc-AMP respectivamente (Apéndice A, p. 169).

Por medio de la ecuación podemos interpretar los resultados de la siguiente manera: A bajas concentraciones de MgATP, el AMP se uniría principalmente a la especie E-dGlc, afectando sólo la intersección (inhibición incompetitiva). A concentraciones saturantes de MgATP, el AMP sólo podría unirse a la enzima libre, afectando principalmente la pendiente (componente competitivo). Con concentraciones intermedias de MgATP se afectarían tanto la intersección como la pendiente (inhibición mixta). (Para una mayor explicación ver Apéndice A, págs. 168 - 171).

La constante de inhibición ($K_i(K_{is}) = 10,57 \pm 0,52$ mM) para AMP respecto a MgATP (Tabla VI) fue similar a la calculada cuando dGlc fue el sustrato variado ($K_i(K_{is}) = 11,72 \pm 0,92$ mM). Estos valores son consistentes con el valor de 10,5 mM obtenido del experimento de protección por AMP contra la inactivación por DTNB, al suponer que AMP se une a dos sitios simultáneamente sobre la misma forma de enzima. Estos resultados darían apoyo a la suposición que AMP puede unirse al menos a dos formas de enzima diferentes.

Los resultados de inhibición por el producto MgADP dan apoyo a un mecanismo ordenado con dGlc como primer sustrato y MgADP como último producto. No se puede descartar, sin embargo, un mecanismo al azar en equilibrio rápido con la posible formación de un inhibidor de punto muerto. El valor de K_{is} ($2,95 \pm 0,25$ mM) para la inhibición de MgADP respecto a dGlc fue similar al valor de $K_{D_{ap}}$ (3,1 mM) de ADP en los experimentos de protección contra la inactivación por DTNB. Este resultado apoya el hecho que ADP pueda unirse a la enzima libre durante el ciclo catalítico.

Recientes estudios de inhibición con CrATP, análogo de MgATP, muestran que la inhibición respecto a dGlc fue más bien incompetitiva en todo el rango de concentraciones de MgATP usado (entre 0,5 y 6,7 veces K_m). Estos resultados apoyan un mecanismo ordenado en el cual dGlc es el primer sustrato. Sin embargo, el pequeño componente competitivo observado, podría ser consecuencia de un flujo reducido a través de la vía donde MgATP es el primer sustrato.

Como conclusión podríamos decir que nuestros resultados son compatibles con la operación de un mecanismo ordenado en que dGlc es el primer sustrato, pudiendo también ser esta vía la más importante en un mecanismo al azar con ruta preferencial de acuerdo a los siguientes resultados:

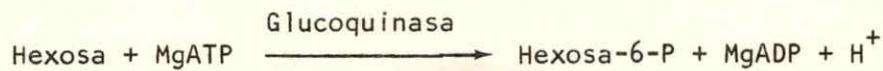
1. Diagramas intersectantes de velocidad inicial.

2. Inhibición competitiva de GlcNAc respecto a dGlc, con un valor de K_{is} independiente de la concentración del segundo sustrato (sólo es compatible con un mecanismo al azar en equilibrio rápido si las constantes de disociación de los complejos E-I y E-S-I son iguales).
3. Inhibición no competitiva de glucosamina respecto a MgATP con valores de K_{is} y K_{ii} dependientes de la concentración del primer sustrato dGlc.
4. Inhibición competitiva de AMP respecto a MgATP, con un valor de K_{is} dependiente de la concentración de dGlc.
5. Inhibición incompetitiva de AMP respecto a dGlc a bajas concentraciones de MgATP, con valores de K_{ii} dependientes de la concentración de dGlc.
6. Inhibición mixta de AMP respecto a dGlc a altas concentraciones de MgATP, con valores de K_{is} y K_{ii} dependientes de la concentración de MgATP.
7. Inhibición mixta, principalmente competitiva, de MgADP respecto a dGlc, y no competitiva respecto a MgATP.

APENDICE A

CINETICA ENZIMATICA

La glucoquinasa (EC 2.7.1.2) cataliza la reacción de transferencia del fosfato gama del ATP al carbono 6 de la hexosa a través de la siguiente reacción:

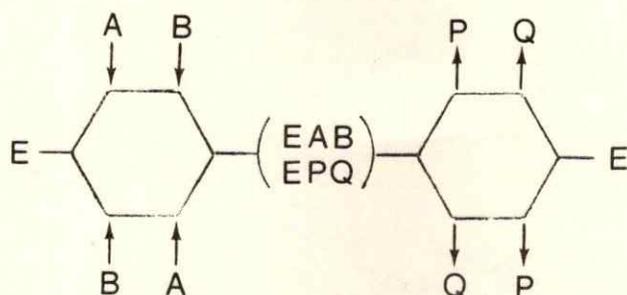


Si la reacción se realiza a pH constante, el protón no se considera como producto y, por lo tanto, el análisis cinético puede limitarse a la unión de dos sustratos y la formación de sólo dos productos (Hexosa-6-P y MgADP).

En la reacción catalizada por la glucoquinasa, los productos pueden aparecer sólo después que ambos sustratos se hayan unido a la enzima (mecanismo de reacción en secuencia) o bien, el primer producto puede aparecer antes de la unión del segundo sustrato (mecanismo ping-pong). Las ecuaciones de velocidad para ambos mecanismos son diferentes y, por lo tanto, un estudio cinético permite descartar uno de ellos para una enzima particular.

Para analizar las ecuaciones de velocidad, consideremos a modo de ejemplo, un mecanismo en secuencia Bi Bi (Cleland, 1970). Este

mecanismo puede representarse de la siguiente manera:



En este esquema, E representa la forma de enzima libre, EA y EB son complejos enzima-sustrato y EP y EQ son complejos enzima-producto; (EAB-EPQ) representa la isomerización del complejo ternario central de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Cleland (1963a).

Como vemos en el esquema anterior, la unión de los sustratos a la enzima puede realizarse en forma ordenada, si la reacción ocurre a través de una de las dos vías señaladas, o bien al azar si la reacción ocurre a través de las dos vías simultáneamente. Para un mecanismo en secuencia ordenada Bi Bi, así como también para un mecanismo al azar en equilibrio rápido (es decir, cuando la etapa limitante de la reacción es la interconversión del complejo central o bien la salida de uno de los productos), la ecuación general de velocidad está dada por la siguiente expresión:

$$v = \frac{V_1 \left[AB - \frac{PQ}{K_{eq}} \right]}{K_{ia}K_b + K_bA + K_aB + \frac{K_{ia}K_bQ}{K_{iq}} + \frac{K_{ia}K_bK_qP}{K_{iq}K_p} + \frac{K_bK_qAP}{K_{iq}K_p} + \frac{K_qBQ}{K_{iq}} + \frac{ABP}{K_{ip}} + \frac{K_{ia}K_bBPQ}{K_pK_{iq}K_{ib}} + \frac{K_{ia}K_bQP}{K_pK_{iq}}} \quad (1)$$

En esta ecuación, V_1 representa la velocidad máxima en el sentido directo de la reacción, K_a , K_b , K_p y K_q son las constantes de Michaelis para los reaccionantes y K_{ia} , K_{ib} , K_{ip} y K_{iq} representan las constantes de inhibición cuando A, B, P y Q respectivamente son usados como inhibidores.

ANÁLISIS DE LA REACCIÓN EN CONDICIONES DE VELOCIDAD INICIAL

Ecuación de velocidad inicial. En condiciones de velocidad inicial la concentración de los productos se hace igual a cero. Por lo tanto, al eliminar los términos de la ecuación general de velocidad que contienen los productos, obtenemos la siguiente ecuación de velocidad inicial:

$$v_i = \frac{V_{AB}}{K_{ia} + K_a B + K_b A + AB} \quad (2)$$

Esta ecuación corresponde a una hipérbola asintótica. Para analizar, por medio de un gráfico, la correspondencia de los resultados experimentales con la ecuación planteada y obtener los valores de las constantes cinéticas, es conveniente linearizar esta ecuación. Para ello pueden emplearse tres métodos basados en el valor recíproco de la ecuación.

MÉTODOS DE LINEARIZACIÓN DE LA ECUACION DE VELOCIDAD INICIAL

1. *Método de Lineweaver-Burk.* Cuando A es el sustrato variable y B se mantiene en concentraciones fijas variables, se obtiene la siguiente ecuación (Lineweaver y Burk, 1934):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_b}{B}\right) + \frac{K_a}{V} \left(1 + \frac{K_{ia} K_b}{K_a B}\right) \frac{1}{A} \quad (3)$$

Cuando B es el sustrato variable y A es fijo se tiene que:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_a}{A}\right) + \frac{K_b}{V} \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right) \frac{1}{B} \quad (4)$$

2. *Método de Eadie-Hofstee.* Cuando A es el sustrato variable y B se mantiene en concentraciones fijas variables, se obtiene la siguiente ecuación (Hofstee, 1959):

$$v = \frac{V}{\left(1 + \frac{K_a}{A}\right)} \cdot \frac{K_a \left(1 + \frac{K_{ia} K_b}{K_a B}\right)}{\left(1 + \frac{K_b}{B}\right)} \cdot \frac{v}{A} \quad (5)$$

Cuando B es el sustrato variable y A es fijo, se tiene que:

$$v = \frac{V}{\left(1 + \frac{K_a}{A}\right)} \cdot \frac{K_b \left(1 + \frac{K_{ia}}{A}\right)}{\left(1 + \frac{K_a}{A}\right)} \cdot \frac{v}{B} \quad (6)$$

3. *Método de Hanes-Woolf.* Cuando A es el sustrato variable y B se mantiene en concentraciones fijas variables, se obtiene la siguiente ecuación (Hanes, 1932; Woolf, 1932):

$$\frac{A}{v} = \frac{K_a}{V} \left(1 + \frac{K_{ia} K_b}{K_a B} \right) + \frac{\left(1 + \frac{K_b}{B} \right)}{V} A \quad (7)$$

Cuando B es el sustrato variable y A es fijo, se tiene que:

$$\frac{B}{v} = \frac{K_b}{B} \left(1 + \frac{K_{ia}}{A} \right) + \frac{\left(1 + \frac{K_a}{B} \right)}{V} B \quad (8)$$

De estos tres métodos el más usado ha sido el de Lineweaver-Burk o de los dobles recíprocos. Sin embargo, después del análisis hecho por Dowd y Riggs (1965) con respecto a la confiabilidad de los valores de las constantes cinéticas obtenidas a partir de cada uno de ellos, el método de los dobles recíprocos ha perdido popularidad. Por esto, tiende a emplearse con mayor frecuencia el método de Hanes, que es el que da mayor confianza a los valores de las constantes (Wilkinson, 1961). Sin embargo, el método de los dobles recíprocos es muy útil, al analizar cualitativamente los resultados, para conocer acerca del mecanismo cinético.

Para obtener los valores de las constantes cinéticas se emplean los gráficos secundarios, es decir, los valores de las pendientes y de

las intersecciones en función de la concentración del sustrato correspondiente. Si se utilizan las tres transformaciones de la ecuación de velocidad inicial, y se comparan los valores obtenidos, se puede tener una mayor confianza en dichos valores.

DIFERENCIAS EN LAS RELACIONES DE VELOCIDAD INICIAL PARA MECANISMOS EN SECUENCIA Y PING-PONG

La ecuación de velocidad inicial para un mecanismo en secuencia (ec. 2) nos muestra que en un gráfico del inverso de la velocidad en función del inverso de la concentración de uno de los sustratos a diferentes concentraciones fijas del otro sustrato, se obtendrán líneas rectas que se intersectarán a la izquierda del eje de la ordenada. En cambio para un mecanismo ping-pong (Cleland, 1963a), se obtendrá una familia de rectas paralelas, como lo demuestra el análisis de la siguiente ecuación de velocidad inicial, que describe a este tipo de mecanismo cinético:

$$v_i = \frac{V A B}{K_b A + K_a B + AB} \quad (9)$$

Por lo tanto, se puede diferenciar un mecanismo en secuencia (líneas intersectantes) de uno ping-pong (líneas paralelas) a través de estudios de velocidad inicial, en que se analice la relación entre el valor recíproco de la concentración de uno de los sustratos, mientras el otro sustrato se mantiene fijo a diferentes concentraciones.

Otro modo de diferenciar entre un mecanismo en secuencia de uno ping-pong es llevar la concentración de los dos sustratos en relación constante y hacer el gráfico del recíproco de la velocidad en función del inverso de la concentración de cualquiera de los dos sustratos (Gulbinsky y Cleland, 1968; Garcés y Cleland, 1969; Tsopanakis y Herries, 1975). Al hacer este gráfico para un mecanismo ping-pong se obtiene una línea recta de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \left[(K_a + x K_b) \frac{1}{A} + 1 \right] / v \quad (10)$$

donde $x = B/A$

En cambio para un mecanismo secuencial se obtiene una parábola que obedece a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \left(\frac{a}{V} + \frac{bA}{V} \right) \frac{1}{A^2} \quad (11)$$

$$\text{donde } a = \frac{K_{ia} K_b}{x}, \quad b = \frac{x K_a + K_b}{x} \quad \text{y } x = B/A$$

Desde la intersección de la parábola con el eje vertical se puede obtener el valor verdadero de la velocidad máxima.

ANÁLISIS DE LA REACCIÓN CONSIDERANDO LA PARTICIPACIÓN DE LOS PRODUCTOS

En presencia de los productos de la reacción aumenta el número de términos en el denominador de la ecuación de velocidad, debido a que aumenta el número de especies de enzima presentes en la reacción. Los productos se comportarán, entonces, como inhibidores de la reacción directa. Para analizar el comportamiento de uno de los productos, se considera en la ecuación la presencia de ese producto haciendo igual a cero la concentración del otro. Si suponemos que la reacción ocurre a través de un mecanismo en secuencia ordenada, la ecuación para los dobles recíprocos cuando está presente Q, y se varía A a diferentes concentraciones fijas de B, es la siguiente:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_b}{B} \right) + \frac{K_a}{V} \left(1 + \frac{K_{ia}K_b}{K_a B} \right) \left(1 + \frac{Q}{K_{iq}} \right) \frac{1}{A} \quad (12)$$

Por otro lado, cuando en presencia de Q se varía la concentración de B a diferentes concentraciones fijas de A, se obtiene la siguiente ecuación para los dobles recíprocos:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_a}{A} \right) \left(1 + \frac{Q}{K_{iq} \left(1 + \frac{A}{K_a} \right)} \right) + \frac{K_b}{V} \left(1 + \frac{K_{ia}}{A} \right) \left(1 + \frac{Q}{K_{iq} \left(1 + \frac{A}{K_{ia}} \right)} \right) \frac{1}{B} \quad (13)$$

Al analizar las ecuaciones, se observa que cuando el sustrato variable es A, el producto Q sólo afecta la pendiente de la recta obtenida, por lo tanto, las líneas obtenidas al dibujar el gráfico de los dobles recíprocos, se intersectarán en un punto común en la ordenada, mostrando un típico gráfico de inhibición competitiva. Por otro lado, cuando el sustrato variado es B, el producto Q afecta tanto a la pendiente como la intersección y las rectas se intersectarán a la izquierda de la ordenada, mostrando una inhibición de tipo mixto.

Del gráfico secundario de las pendientes en función del recíproco de la concentración de B, se obtiene una constante de inhibición aparente $K_{is} = K_{iq}$ cuando A es el sustrato variable. Al hacer el mismo análisis, cuando B es el sustrato variable, se obtiene que $K_{is} = K_{iq} (1 + A/K_{ia})$. Del gráfico de las intersecciones en función del recíproco de la concentración de dGlc se obtiene una constante de inhibición aparente K_{ii} dada por $K_{ii} = K_{iq} (1 + A/K_a)$.

Para analizar la participación del otro producto en la reacción se sigue un procedimiento similar al anterior (Cleland, 1963b).

INHIBICION DE PUNTO MUERTO CON INHIBIDORES DE ESTRUCTURA SEMEJANTE A LOS SUSTRATOS.

Un inhibidor se caracteriza por disminuir la velocidad de la reacción, pues se une a la enzima disminuyendo así el número de especies productivas presentes mientras ocurre la reacción. Si se observa la ecuación de velocidad inicial, al aumentar los términos en el denominador se está disminuyendo la velocidad como en el caso de la inhibición por los productos.

Un inhibidor de punto muerto es aquel que sin ser sustrato o producto de la reacción es capaz de formar complejos reversibles con una o más formas de la enzima. Estos complejos se denominan complejos abortivos, ya que no participan en la reacción y sólo pueden disociarse en $E' + I$, donde E' representa cualquier forma de la enzima e I el

inhibidor. (Cleland, 1970).

De acuerdo al comportamiento de los inhibidores, la inhibición ha sido clasificada en tres tipos: inhibición competitiva, inhibición mixta (un caso particular de ésta es la inhibición no competitiva pura) e inhibición incompetitiva (Fromm, 1975). El análisis de estos tres tipos de inhibición ha sido hecho fundamentalmente para mecanismos de reacción en que participan un sustrato y un producto. En estos casos se dice que la inhibición es de tipo competitivo cuando el inhibidor es capaz de reaccionar sólo con la enzima libre; de tipo incompetitivo cuando el inhibidor reacciona sólo con la especie enzima-sustrato y de tipo mixto cuando el inhibidor puede reaccionar con ambas formas de la enzima.

En una reacción en que participa más de un sustrato y un producto, el análisis se ha hecho más bien desde un punto de vista gráfico, al igual como en el caso de la inhibición por los productos. Como se dijo antes, el método gráfico de los dobles recíprocos ha sido el más común para analizar cualitativamente un mecanismo cinético. De allí que también en el análisis de los inhibidores de punto muerto se haya empleado este método. Así, una inhibición es de tipo competitivo sólo si se modifica la pendiente en un gráfico de dobles recíprocos cuando está presente el inhibidor. La inhibición es incompetitiva si se modifica sólo la intersección, pero si se modifican tanto la pendiente como la intersección la inhibición es de tipo mixto (Cleland, 1963b).

Análisis del efecto de los inhibidores de punto muerto. Recientemente se ha tratado de precisar, tanto el tipo como el mecanismo de la inhibición para reacciones en que participan dos sustratos y dos productos. Es por esto que además del método de los dobles recíprocos, para analizar el efecto de los inhibidores y calcular sus constantes de inhibición, se ha empleado el método de Dixon ($1/v$ en función de I) (Dixon, 1953) y el método de Cornish-Bowden (S/v en función de I) (Cornish-Bowden, 1974). Por medio de gráficos secundarios de pendientes e intersecciones se han obtenido los valores de las constantes de inhibición. El problema que surge de este tipo de cálculos es saber si las constantes de inhibición calculadas son verdaderas constantes termodinámicas. Para resolver este problema, Thompson y Bachelard (1976) han propuesto cómo calcular las verdaderas constantes de disociación, considerando el mecanismo cinético de la reacción.

Analicemos este método para distintos mecanismos en secuencia Bi Bi.

1. *Mecanismo en secuencia ordenada.*

a. *Inhibición competitiva con respecto al sustrato A.* En este caso el inhibidor es capaz de combinarse sólo con la enzima libre, es decir, con la misma especie con la cual se combina el sustrato A. En presencia del inhibidor la ecuación de velocidad tiene la siguiente forma:

$$v = \frac{V_{AB}}{K_{ia}K_b(1 + I/K_i) + K_bA + K_aB(1 + I/K_i) + AB} \quad (14)$$

donde $K_i = E \cdot I / EI$ y todos los otros términos como definidos en la ec.(1).

Consideremos las tres transformaciones lineales de esta ecuación ($1/v$ en función de $1/S$; $1/v$ en función de I y S/v en función de I).

Para los dobles recíprocos, donde A es el sustrato variable, B es mantenido constante y K_i es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K_b/B}{V} + \frac{(1 + I/K_i) (K_{ia} K_b + K_a B)}{V B} \times \frac{1}{A} \quad (15)$$

Un gráfico de $1/v$ en función de $1/A$ a una serie de concentraciones fijas de I , mostrará una serie de líneas rectas que convergirán en la ordenada, pues sólo el término de la pendiente contiene I (Fig. A - 1(a)). Al hacer el gráfico de las pendientes en función de I se obtendrá una línea recta cuyo valor en la intersección con la abscisa ($-I$) será igual a K_i (Fig. A - 1(b)).

En el gráfico de Dixon, es decir $1/v$ en función de I a una serie de valores de A , se observará una serie de líneas rectas cuyo punto de convergencia se encuentra a la izquierda del eje de la ordenada y por sobre la abscisa. La coordenada en la abscisa para este punto

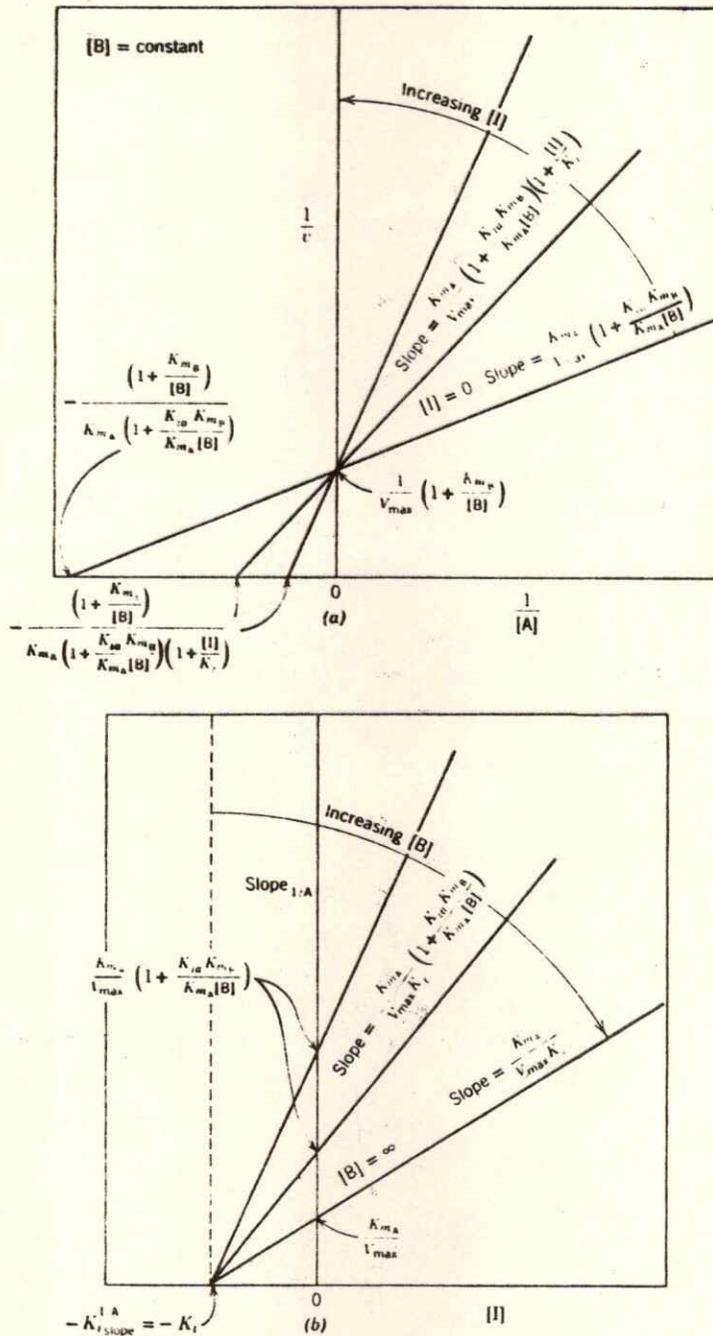


Figura A-1. Diagramas de inhibición de punto muerto para un mecanismo en secuencia ordenada Bi Bi, donde el inhibidor (I) se combina con la enzima libre (E). (a) $1/v$ en función de $1/[A]$. (b) Gráfico secundario de las pendientes en función de la concentración del inhibidor. Los diagramas de las figuras A-1 a A-4 fueron tomados desde las páginas 774 a 778 del libro *Enzyme Kinetics* de I. Segel (Wiley Interscience Publication, 1975).

corresponde a $-I = K_i$.

En el gráfico de Cornish-Bowden, es decir A/v en función de I se obtendrá una serie de líneas paralelas que obedecen a la siguiente ecuación:

$$\frac{A}{v} = \frac{(1 + I/K_i)(K_{ia}K_b + K_a B)}{V B} + \frac{(1 + K_b/B) A}{V} \quad (16)$$

b. *Inhibición no competitiva para el sustrato B.* En este caso I es siempre competitivo para A . Pero B es el sustrato variado y A se mantiene constante. El recíproco de la velocidad inicial en presencia del inhibidor está dado por la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K_a (1 + I/K_i) / A}{V} + \frac{(1 + I/K_i)(K_{ia}K_b) + K_b A}{V A} \frac{1}{B} \quad (17)$$

Se observa que, tanto la pendiente como la intersección se encuentran afectadas por la presencia de I . Por esto en el gráfico de $1/v$ en función de $1/B$ se observará una serie de líneas que se intersectarán a la izquierda del eje de la ordenada (Fig. A-2 (a)). En el

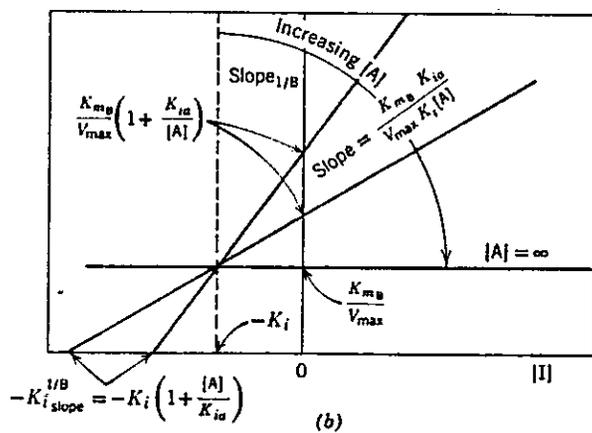
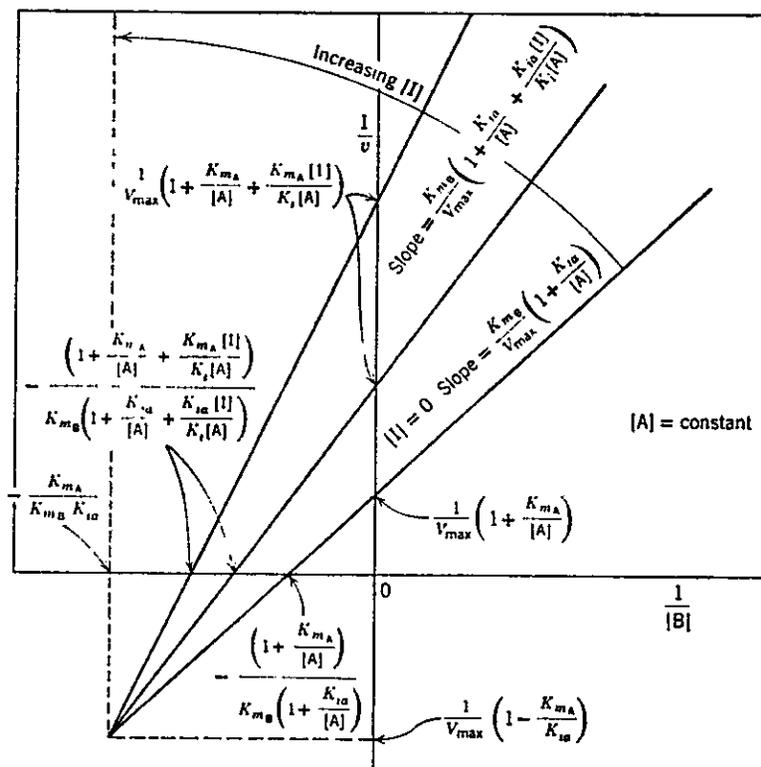


Figura A-2. Diagramas de inhibición de punto muerto para un mecanismo en secuencia ordenada Bi Bi, donde I se combina con E. (a) $1/v$ en función de $1/[B]$. (b) Pendientes en función de la concentración del inhibidor.

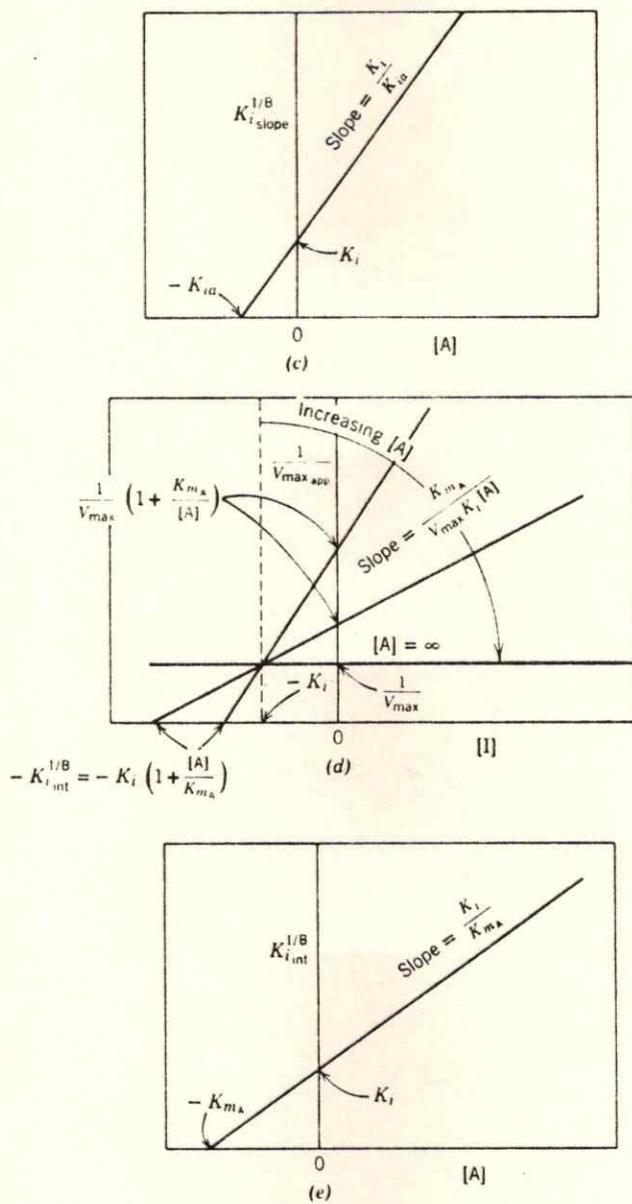


Figura A-2. [Continuación]. (c) K_{is} en función de la concentración de A. (d) Intersecciones en función de la concentración del inhibidor. (e) $K_{i, \text{int}}$ en función de la concentración de A.

gráfico de las pendientes en función de I se obtendrá una línea recta la cual intersectará la abscisa en $-I = K_{is} = K_i(1+A/K_{ia})$ (Fig. A-2 (b)). El gráfico de las intersecciones en función de I mostrará una línea recta la cual intersectará la abscisa en $-I = K_{ii} = (1+A/K_a)$ (Fig. A-2 (d)).

En el gráfico de Dixon, es decir, $1/v$ en función de I a una serie de valores de concentración de B , se obtendrá una serie de líneas que se intersectarán a la izquierda de la ordenada, por bajo, por sobre, o en la abscisa. La coordenada en la abscisa para este punto corresponderá a $-I = K_i(1 + A/K_{ia})$.

El gráfico de Cornish-Bowden, es decir B/v en función de I a una concentración fija de A , estará representado por la siguiente ecuación:

$$\frac{B}{v} = \frac{(1 + I/K_i)(K_{ia}K_b + K_a B)}{V A} + \frac{(K_b + B)}{V} \quad (18)$$

Las líneas convergirán en un punto en el cual los valores de B/v e I son los mismos para todas las líneas y la coordenada en la abscisa para este punto será $-I = K_i(1 + A/K_a)$.

c. *Inhibición competitiva para el sustrato B.* En este caso, I es un inhibidor competitivo de B, y sólo será capaz de unirse a la forma de enzima EA, como lo hace B en un mecanismo ordenado, y no a la enzima libre. La velocidad inicial en presencia del inhibidor estará dada por la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_A B}{K_{ia} K_b + K_b A (1 + I/K_i') + K_a B + AB} \quad (19)$$

En esta ecuación, K_i' es la constante de disociación del complejo enzima-A-I.

Un análisis de la inhibición, se puede hacer, como en el caso anterior (I competitivo para A), considerando las tres transformaciones lineales. Así, para los dobles recíprocos, cuando B es el sustrato variado y A se mantiene constante, el gráfico de $1/v$ en función de $1/B$ será descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{(1 + K_a/A)}{V} + \frac{K_{ia} K_b + K_b A (1 + I/K_i')}{V A} \times \frac{1}{B} \quad (20)$$

Vemos que sólo el término de la pendiente contiene I , por lo tanto, en el gráfico se obtendrán una serie de líneas que convergirán en el eje de la ordenada (Fig. A-3 (a)). Al dibujar en un gráfico las pendientes en función de I , se obtendrá una línea que intersectará la abscisa en $-I = K_i s = K_i' (1 + K_{ia}/A)$ (Fig. A-3 (b)).

En el caso del gráfico de Dixon, es decir $1/v$ en función de I a una serie de valores fijos de B , se obtendrá una serie de líneas que se intersectarán a la izquierda del eje de la ordenada por sobre la abscisa. La coordenada de este punto sobre la abscisa estará dada por $-I = K_i' (1 + K_{ia}/A)$.

El gráfico de Cornish-Bowden, es decir B/v en función de I , a una serie de concentraciones de B , mostrará una serie de líneas paralelas, que obedecen a la siguiente ecuación:

$$\frac{B}{v} = \frac{(1 + I/K_i') K_b A + K_{ia} K_b}{V A} + \frac{(1 + K_a/A) B}{V} \quad (21)$$

En este caso no se puede obtener el valor de K_i' desde el gráfico.

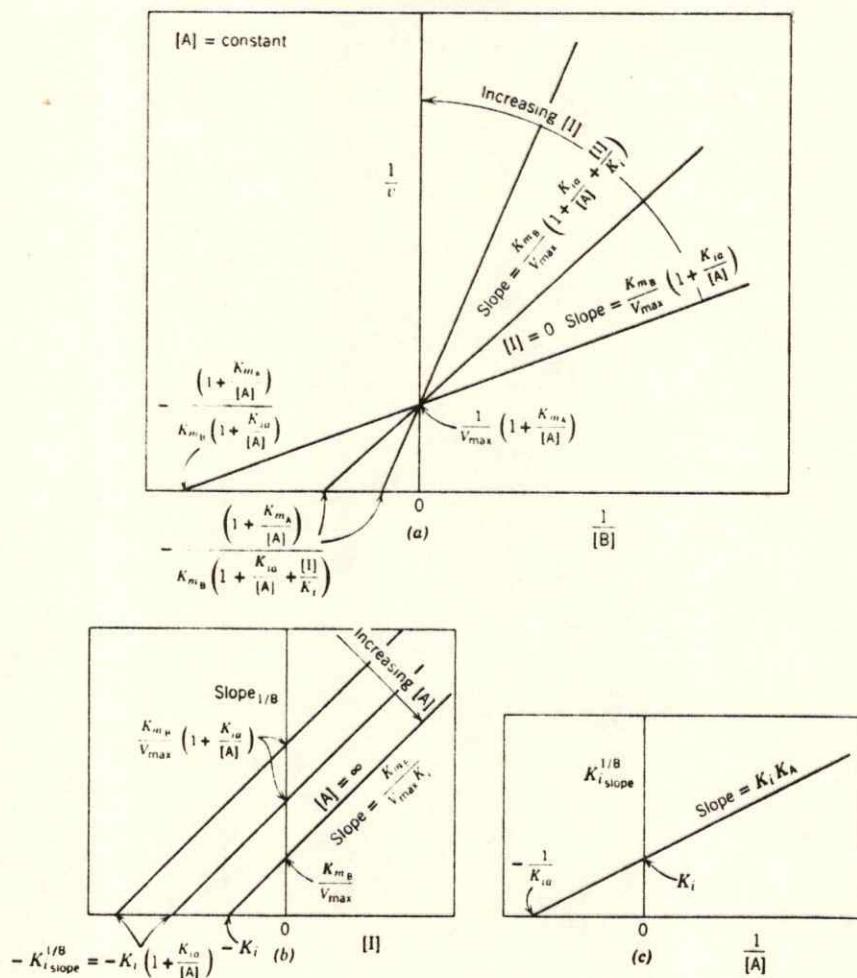


Figura A-3. Diagramas de inhibición de punto muerto para un mecanismo en secuencia ordenada B_i B_i, donde I se combina con EA. (a) 1/v en función de 1/[B]. (b) Pendientes en función de la concentración del inhibidor. (c) K_i^{1/B} en función del recíproco de la concentración de A.

d. *Inhibición incompetitiva para el sustrato A.* En este caso I es siempre competitivo para B . Pero A es el sustrato variado a concentraciones fijas de B . El recíproco de la velocidad inicial en presencia del inhibidor será descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K_b (1 + I/K_i')/B}{V} + \frac{K_{ia}K_b + K_a B}{V B} \times \frac{1}{A} \quad (22)$$

Aquí sólo el término para la intersección está afectado por la concentración del inhibidor y el gráfico de $1/v$ en función de $1/A$ mostrará una serie de líneas paralelas (Fig. A-4 (a)). Al dibujar las intersecciones en función de I se obtendrá una línea recta que intersectará a la abscisa en $-I = K_{ii} = K_i' (1 + B/K_b)$ (Fig. A-4 (b)).

El gráfico de Dixon mostrará una serie de líneas paralelas de las cuales no es posible obtener el valor de K_i' .

El gráfico de Cornish-Bowden, es decir A/v en función de I , a una serie de concentraciones fijas de B , será representado por la siguiente ecuación:

$$\frac{A}{v} = \frac{(1 + I/K_i') K_b A + K_{ia} K_b}{V B} + \frac{(K_a + A)}{V} \quad (23)$$

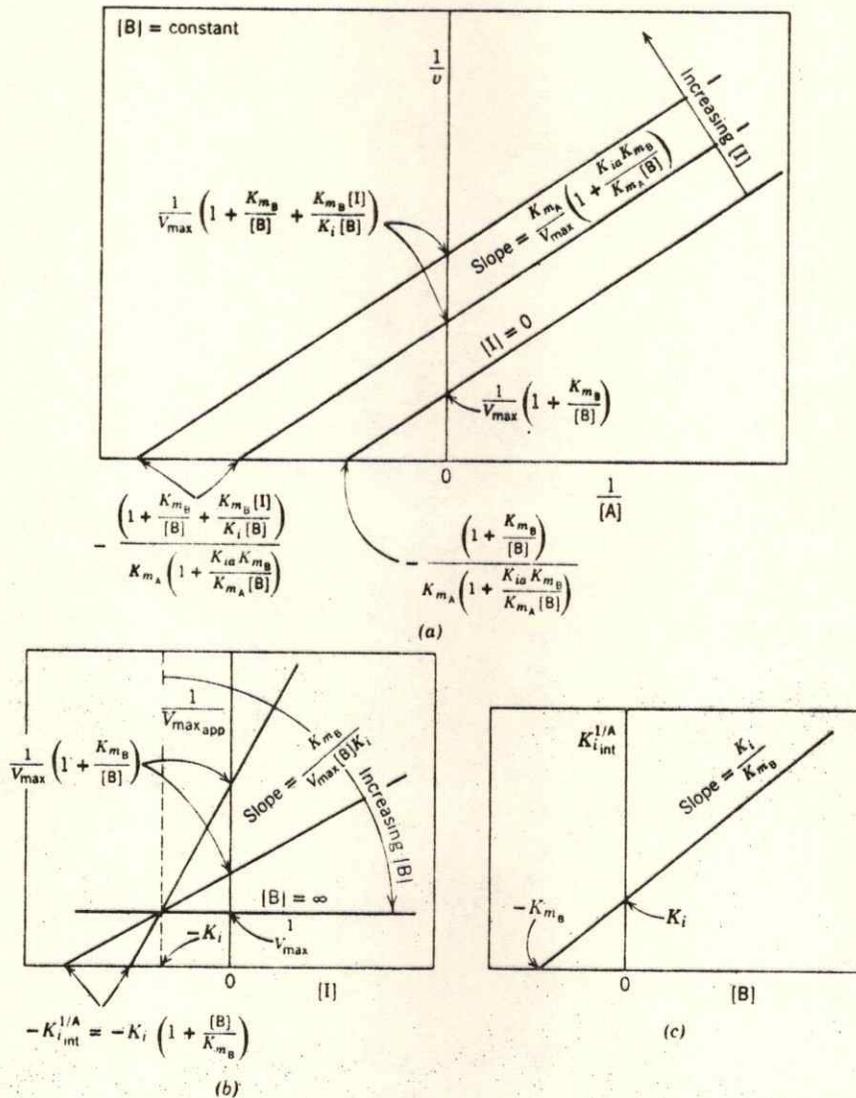


Figura A-4. Diagramas de inhibición de punto muerto para un mecanismo en secuencia ordenada $B_i B_i$, donde I se combina con EA . (a) $1/v$ en función de $1/[A]$. (b) Intersecciones en función de la concentración del inhibidor. (c) K_{ii} en función de la concentración de B .

y las líneas rectas del gráfico convergirán en un punto a la izquierda de la ordenada, por sobre la abscisa, cuya coordenada en la abscisa será $-1 = K_i' (1 + B/K_b)$.

II. Mecanismo en secuencia al azar en equilibrio rápido.

a. Inhibición competitiva para el sustrato A. Un inhibidor de punto muerto análogo del sustrato A será capaz de unirse tanto a E como a EB. La velocidad inicial para la reacción en presencia del inhibidor estará dada por la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V A B}{K_{i_a} K_b (1 + 1/K_i) + K_b A + K_a B (1 + 1/K_i') + AB} \quad (24)$$

K_i y K_i' representan la constante de disociación para el complejo EI y EBI respectivamente. Consideremos nuevamente las tres transformaciones lineales.

El gráfico de los dobles recíprocos ($1/v$ en función de $1/A$) cuando B se mantiene constante, a una serie de valores de concentración de I, será descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{(1 + K_b/B)}{V} + \frac{K_{ia}K_b(1 + I/K_i) + K_aB(1 + I/K_i)}{V B} \times \frac{1}{A} \quad (25)$$

Aquí sólo el término de la pendiente contiene I por lo que las líneas convergirán en el eje de la ordenada. El gráfico de las pendientes en función de I mostrará una línea recta cuya intersección en el eje de la abscisa será:

$$-I = K_{is} = \frac{K_{ia}K_b + K_aB}{K_{ia}K_b / K_i + K_aB / K_i}$$

si $K_i = K_i^i$ entonces $-I = K_i^i$, lo cual no siempre es así.

Al dibujar el gráfico de Dixon ($1/v$ en función de I) para una concentración fija de B y a una serie de valores de concentración de A , las líneas convergirán en un punto por sobre la abscisa, que tendrá como coordenada en la abscisa un valor de $-I$ idéntico al valor de K_{is} descrito arriba.

El gráfico de Cornish-Bowden (A/v en función de I), cuando B se mantiene fijo, mostrará una serie de líneas paralelas, una para cada valor de A .

b. *Inhibición no competitiva para el sustrato B.* Si I es competitivo para el sustrato A y se varía B manteniendo el sustrato A constante, el recíproco de la velocidad inicial en presencia del inhibidor estará dado por:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K_a (1 + I/K_i) / A}{V} + \frac{(1 + I/K_i) (K_{ia} K_b) + K_b A}{V A} \times \frac{1}{B} \quad (26)$$

Como I aparece tanto en la pendiente como en la intersección, las líneas rectas se cortarán a la izquierda de la ordenada. La intersección de la recta con la abscisa en el gráfico de las pendientes en función de I será $-I = K_{is} = K_i (1 + A/K_{ia})$. Del mismo modo, del gráfico de las intersecciones en función de I se obtendrá $-I = K_{ii} = K_i (1 + A/K_{ia})$.

En el gráfico de Dixon ($1/v$ en función de I), a una serie de valores de B, las líneas se intersectarán a la izquierda de la ordenada. El valor del punto de concurrencia en la abscisa será $-I = K_i (1 + A/K_{ia})$.

Gráfico de Cornish-Bowden. Al hacer el gráfico de B/v en función de I de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{B}{v} = \frac{(1 + I/K_i) K_{ia} K_b + (1 + I/K_i') K_a B}{V A} + \frac{K_b + B}{V} \quad (27)$$

el punto de concurrencia de las líneas en la abscisa será $- I = K_i' (1 + A/K_a)$.

c. *Inhibición competitiva para B e inhibición no competitiva para A.*

Como en un mecanismo en secuencia de adición de los sustratos al azar en equilibrio rápido, A o B se pueden adicionar a E, la inhibición para B se puede tratar como para A (tratamiento anterior).

Todo el análisis anterior de la inhibición por inhibidores de punto muerto permite obtener ciertos criterios para diferenciar entre un mecanismo en secuencia ordenada y uno en secuencia al azar en equilibrio rápido, que podemos resumir así:

1. Si un inhibidor competitivo para uno de los sustratos se comporta como incompetitivo para el otro sustrato, se trataría de un mecanismo en secuencia ordenada de adición de los sustratos, en que el sustrato para el cual el inhibidor es competitivo, sería el segundo sustrato en interactuar con la enzima. En un mecanismo en secuencia al azar en equilibrio rápido, siempre la inhibición de un inhibidor competitivo respecto a cualquiera de los sustratos va a ser de tipo mixto respecto al otro sustrato.

2. Si la constante de inhibición K_{is} para la inhibición competitiva de cualquiera de los dos sustratos, no varía con la concentración del sustrato fijo, el sustrato para el cual el inhibidor es competitivo, sería el primero en interactuar con la enzima en un mecanismo ordenado estricto. Esto es válido sólo si K_i (obtenido de K_{is}) no es igual a K_i' (obtenido de K_{iis}) (ver el valor de -1 en la ecuación (25)).

Análisis del efecto de un inhibidor de punto muerto, análogo de B, que se une débilmente al sitio de A.

Analizaremos el efecto de este inhibidor, en un mecanismo en secuencia ordenada de adición de los sustratos, donde A es el primer sustrato.

En la ecuación de velocidad inicial para un mecanismo ordenado (ec. 2 del Apéndice), la concentración del inhibidor afectará los términos que representan tanto a la enzima libre (E) como al complejo enzima primer sustrato (EA), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{AB}}{K_{ia}K_b \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + K_aB \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + K_bA \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + AB} \quad (28)$$

K_i y K_i' son las constantes de disociación de los complejos EAI

y El respectivamente; todos los otros términos fueron definidos en la ec. (1) del Apéndice A.

Inhibición respecto al sustrato A. La relación entre el recíproco de la velocidad y el recíproco de la concentración del sustrato A, cuando B se mantiene constante, es dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_b}{B} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right) + \frac{1}{V} \left(\left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \left(\frac{K_{ia} K_b}{B} + K_a \right) \right) \times \frac{1}{A} \quad (29)$$

Como se observa en la ecuación tanto la pendiente como la intersección están afectadas por la concentración de I. Por esto, un gráfico de $1/v$ en función de $1/A$ a una serie de concentraciones dadas de I, mostrará un conjunto de líneas rectas concurrentes en un punto a la izquierda del eje de la ordenada. Este diagrama es propio de una inhibición de tipo mixto.

El efecto sobre la pendiente como sobre la intersección dependerá de los valores relativos de las constantes de disociación K_i y K_i' del inhibidor. Así, cuando K_i' sea mucho mayor que K_i , predominará el componente competitivo, y cuando K_i sea mucho mayor que K_i' , que es el caso que analizamos, el componente predominante será el incompetitivo.

Analícemos ahora, la influencia del sustrato fijo variable B sobre el tipo de inhibición, cuando $K_i \gg K_i'$. Es decir, el inhibidor es principalmente competitivo respecto al segundo sustrato, como parece ser nuestro caso con AMP. Si hacemos B saturante (alrededor de 10 veces K_m) premodinará el componente competitivo, es decir, un mayor efecto sobre la pendiente, pues B se encuentra en el denominador del término que multiplica a $(1 + I/K_i')$, en la intersección de la ec. 29. Por el contrario, la pendiente se modificará levemente porque B no influye sobre K_a , término que está también multiplicando a $(1 + I/K_i)$ en la misma ecuación. Así a bajas concentraciones de B (alrededor de la K_m) la inhibición será principalmente incompetitiva. A concentraciones intermedias de B será de tipo mixto, tendiendo a ser más competitiva a medida que se aumenta B.

Inhibición respecto al sustrato B. La relación de los dobles recíprocos, cuando B es el sustrato variable y A es mantenido constante, está dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_a}{A} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \right) + \frac{K_b}{V} \left(\frac{K_{ia}}{A} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) + \left(1 + \frac{I}{K_i'} \right) \right) - \frac{1}{B} \quad (30)$$

Suponiendo como en el caso anterior que $K_i \gg K_i'$, el efecto del inhibidor sobre la intersección será despreciable y la inhibición será

más bien de tipo competitivo.

Analizaremos por esto el efecto del inhibidor sobre la pendiente. Si se dibuja la relación entre las pendientes y la concentración del inhibidor, se obtendrá una línea recta, que intersectará en el eje de la abscisa a la izquierda de la ordenada. El valor del punto de intersección en la abscisa será:

$$K_{is} = -I = \frac{1 + \frac{K_{ia}}{A}}{\frac{1}{K_i} + \frac{K_{ia}}{A} \cdot \frac{1}{K_i}}$$

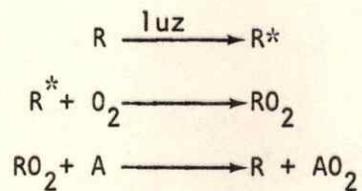
Si aceptamos que $K_i \gg K_i'$ y $\gg K_{ia}$ esta relación se transformará en:

$$K_{is} = -I = K_i' \left(1 + \frac{K_{ia}}{A} \right)$$

La dependencia del valor de K_{is} de K_{ia} y A es igual como la obtenida para un inhibidor competitivo de B, si opera un mecanismo ordenado estricto donde A es el primer sustrato.

MODIFICACION QUIMICA

Fotooxidación con rosa de bengala. El mecanismo de oxidación fotoquímico es complejo y puede variar de un sistema a otro. El siguiente mecanismo ha sido propuesto para una reacción fotoquímica:



donde: R es el reactivo fotooxidante (rosa de bengala); R^* es un estado electrónico excitado del reactivo fotooxidante; A es el sustrato (histidina, de acuerdo a las condiciones del medio de reacción) y AO_2 es uno o varios productos de oxidación de naturaleza desconocida.

Este mecanismo ha sido sugerido por Ray (1967) basado en el propuesto por Oster y col. (1959) para la oxidación fotoquímica de p-toluenodiamina.

Cálculo de las constantes de velocidad de inactivación. La ecuación diferencial que describe el proceso de inactivación de la glucoquinasa es la siguiente:

$$-\frac{d(Ea)}{dt} = k (Ea) (R) \quad (31)$$

donde: Ea es la enzima activa; k la constante de velocidad de inactivación; R es rosa de bengala. La concentración de O₂ se considera constante y está incluida en el valor de k.

Esta ecuación puede simplificarse si se considera que la concentración de R, que actúa como catalizador, no varía en el tiempo, transformándose en una ecuación de pseudo-primer-orden:

$$-\frac{d(Ea)}{dt} = k_i (Ea) \quad (32)$$

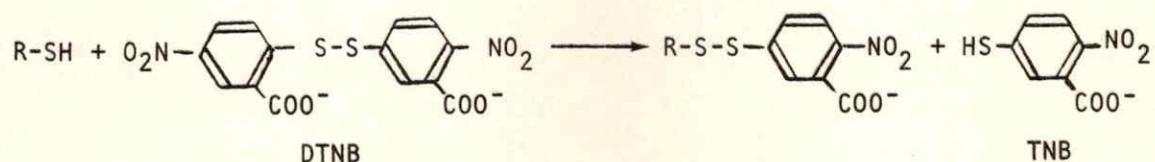
donde $k_i = k (R)$ (constante de pseudo-primer-orden).

Integrando esta ecuación con respecto a Ea, entre el tiempo cero y el tiempo t, se obtiene una relación lineal entre el logaritmo natural de la fracción de actividad remanente y el tiempo.

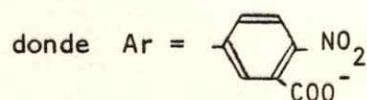
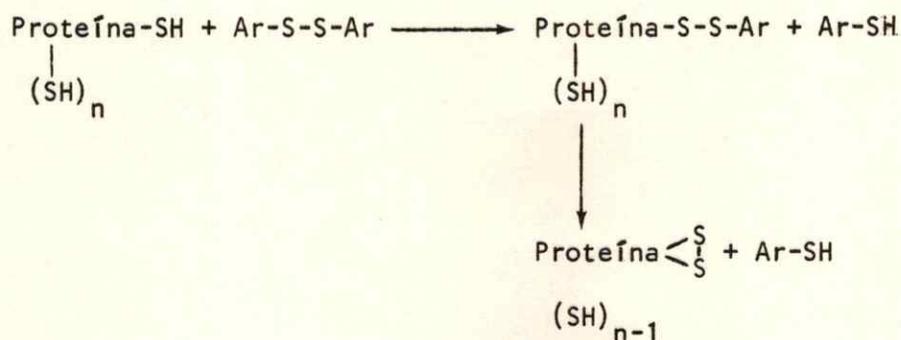
$$\ln \frac{(Ea)_t}{(Ea)_0} = -k_i \cdot t \quad (33)$$

de cuya pendiente se obtiene el valor de la constante de pseudo-primer-orden de la velocidad de inactivación.

Reacción de los grupos tioles con DTNB. La reacción de un grupo tiol con DTNB es la siguiente:



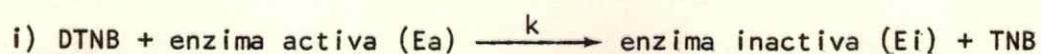
La presencia de dos grupos tioles muy cercanos hace posible que ocurran reacciones intramoleculares que llevan a la formación de enlaces disulfuros (Connellan y Folk, 1969), de acuerdo a las siguientes reacciones:



La formación de puentes disulfuros intermoleculares también ha sido propuesta (Fernández-Diez y col., 1964).

Cinética de inactivación por DTNB. Las constantes de inactivación (k_i) se obtuvieron a partir de la pendiente del gráfico de logaritmo natural de la fracción de actividad remanente en función del tiempo. Se analizará la cinética de inactivación para una reacción mediada por un complejo enzima-modificador. A modo de comparación se muestra la ecuación de velocidad de inactivación para una reacción bimolecular.

Mecanismos de inactivación. La inactivación de la enzima puede ocurrir a través de uno de los siguientes mecanismos:



La velocidad de inactivación para este mecanismo podemos plantearla a través de la siguiente ecuación diferencial:

$$- \frac{d(\text{Ea})}{dt} = k (\text{Ea}) (\text{DTNB}) \quad (34)$$

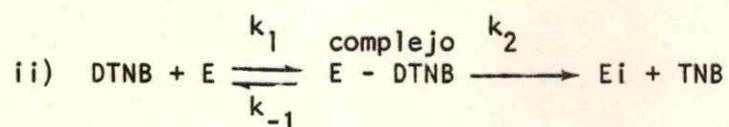
donde Ea es la enzima activa y k la constante de velocidad de inactivación (Mildvan y Leigh, 1964).

Esta ecuación puede simplificarse, si se considera que la concentración de DTNB permanece constante en el tiempo, a la siguiente expresión:

$$- \frac{d(\text{Ea})}{dt} = k_i (\text{Ea}) \quad (35)$$

donde $k_i = k (\text{DTNB})$.

Al integrar esta ecuación respecto a E_a se obtiene el valor de k_i de manera similar a lo descrito para la fotooxidación (ec. 33).



La velocidad de inactivación para esta reacción que ocurre mediada por un complejo enzima-modificador, (Kitz y Wilson, 1962; Pétra, 1971; Redkar y Kenkare, 1975), podemos plantearla a través de la siguiente ecuación diferencial:

$$-\frac{d(E_a)}{dt} = k_2 (E-M) \quad (36)$$

donde $M = \text{DNTB}$; $E_a = \text{enzima activa} = \text{enzima libre (E)} + \text{complejo E-M}$ y k_2 es la constante de velocidad de la etapa limitante irreversible de la reacción ($E-M \rightarrow \text{Ei}$)

Dividiendo la ecuación anterior por $E_a (E + E-M)$ tenemos:

$$-\frac{d(E_a)}{dt(E_a)} = \frac{k_2 (E-M)}{(E) + (E-M)} \quad (37)$$

Si la constante de disociación del complejo E-M es:

$$K_d = \frac{(E) \times (M)}{(E-M)} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

y reemplazamos en la ecuación anterior el valor de (E-M) considerando su disociación y luego simplificamos, tenemos:

$$-\frac{d(Ea)}{(Ea)} = \frac{k_2}{1 + K_d/M} \times dt \quad (38)$$

Si M es constante, es decir $M \gg E$. Al integrar tenemos que:

$$\ln \frac{(Ea)_t}{(Ea)_0} = -\frac{k_2}{1 + K_d/M} \times t \quad (39)$$

donde, $(Ea)_0$ y $(Ea)_t$ son la actividad enzimática al tiempo cero y al tiempo t respectivamente.

Al dibujar en un gráfico el $\ln (Ea)_t / (Ea)_0$ en función del tiempo se obtiene una línea recta cuya pendiente es $-k_2 / (1 + K_d/M)$ y es igual a la constante de inactivación de pseudo-primer-orden (k_i) para cada concentración de modificador. Así:

$$k_i = \frac{k_2 M}{K_d + M} \quad (40)$$

Esta ecuación, que representa a una hipérbola, es importante porque los datos experimentales parecen ceñirse a ella, y por lo tanto se apoya el mecanismo.

El recíproco de k_i es igual a:

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_d}{k_2} \times \frac{1}{M} \quad (41)$$

Al poner en un gráfico el recíproco de la k_i en función del recíproco de la concentración del modificador se obtiene una línea recta donde la intersección con el eje de las ordenadas es $1/k_2$ o sea, la constante de inactivación cuyo valor se obtiene a una concentración infinita del modificador, y la intersección con el eje de la abscisa es $-1/M = 1/K_d$. Si no se cumple la condición que $k_2 \ll k_{-1}$, es decir, que se alcance un cuasi equilibrio de la enzima con el modificador, en lugar de K_d se obtiene una constante que es similar a la de Michaelis e igual a $(k_2 + k_{-1})/k_1$ (Brocklehurst, 1979).

Cinética de inactivación por DTNB en presencia de un ligando protector.

La protección por un ligando contra la inactivación de una enzima por un reactivo modificador se analizará de acuerdo al mecanismo de inactivación. Como describimos anteriormente, la enzima puede inactivarse a

través de una típica reacción bimolecular con el reactivo modificador o a través de la formación de un complejo intermediario previo a la inactivación (Südi, 1970; Lebo y Kredich, 1978).

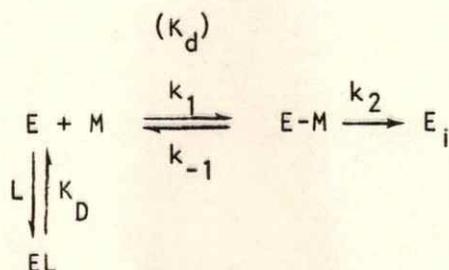
Para una enzima que se inactiva a través de la formación de un complejo intermediario, como parece ser nuestro caso, pueden darse las dos situaciones siguientes:

a) El ligando al unirse a la enzima libre evita totalmente la inactivación (Redkar y Kenkare, 1975), o

b) El ligando al unirse a la enzima libre y al complejo enzima-modificador evita totalmente la inactivación.

Analizaremos en detalle estos casos para mostrar como se puede discriminar entre ellos y como se obtiene el valor de la constante de disociación enzima-ligando.

Mecanismo a. La inactivación ocurre a través de la formación de un complejo enzima-modificador y el complejo enzima-ligando es insensible al modificador. Este proceso sería similar al de inactivación por reactivos modificadores de afinidad (Connolly y Trayer, 1979a), que compiten con el ligando protector por el sitio activo de la enzima. Esta conducta puede esquematizarse de la siguiente manera:



donde E, EL, E-M y Ei son la enzima libre, el complejo enzima-ligando, el complejo enzima-modificador y la enzima inactiva respectivamente; M es el modificador DTNB; L es el ligando (sustrato, producto, análogo del sustrato o producto); k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad de formación y de disociación del complejo E-M, respectivamente; k_2 es la constante de velocidad de la etapa limitante de la reacción de inactivación; K_D la constante de disociación del complejo enzima-ligando y K_d la constante de disociación del complejo enzima-modificador.

Si la etapa limitante de la velocidad del proceso es el paso del complejo enzima-modificador a enzima inactiva, la velocidad de inactivación en presencia del ligando se puede expresar a través de la siguiente ecuación diferencial:

$$-\frac{d(Ea)}{dt} = k_2 (E-M) \quad (42)$$

donde Ea = enzima activa = E + EL + E-M

Dividiendo la ecuación anterior por Ea tenemos:

$$-\frac{d(Ea)}{dt(Ea)} = \frac{k_2 (E-M)}{E + EL + E-M} \quad (43)$$

Reemplazando los términos EL y E-M en función de sus respectivas constantes de disociación y reordenando se tiene que:

$$-\frac{d(Ea)}{(Ea)} = \frac{k_2}{1 + K_d/M + K_d L/K_D M} dt \quad (44)$$

Suponiendo L y M constantes, al integrar entre tiempo cero y tiempo t, se obtiene la siguiente expresión para la constante de inactivación de pseudo-primer-orden (k_i):

$$k_i = \frac{k_2 M}{K_d (1 + L/K_D) + M} \quad (45)$$

Al colocar en un gráfico el recíproco de la k_i en función de la concentración del ligando, se obtiene una línea recta de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_2} \left(1 + \frac{K_d}{M}\right) + \frac{K_d}{k_2 K_D M} \times L \quad (46)$$

En el punto de intersección de la recta con la abscisa, a la izquierda de la ordenada, el valor de $-L (K_D)_{ap}$ es igual a $(K_D(1+M/K_D))$ (constante de disociación aparente).

Esta ecuación es de igual forma a la ecuación de Dixon (1951) para la interacción de una enzima con un inhibidor competitivo; en nuestro caso el inhibidor correspondería al ligando L en la ecuación 43.

Para conocer el valor de la constante de disociación verdadera (K_D) desde la ecuación 46, es necesario conocer la concentración del modificador y la constante de disociación enzima-modificador (K_d) (Redkar y Kenkare, 1975; Connolly y Trayer, 1979a). Otra alternativa es realizar el experimento a más de una concentración del modificador y poner en un gráfico los valores de K_D aparente en función de la concentración del modificador. En este gráfico se obtiene una línea recta de acuerdo a la siguiente ecuación:

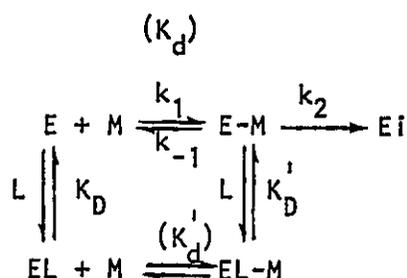
$$K_{D \text{ ap}} = K_D + K_D/K_d \times M \quad (47)$$

donde el valor de la intersección vertical es igual a K_D .

Para conocer si hay competencia entre el ligando y el reactivo modificador por la misma forma de enzima, se puede hacer un gráfico del recíproco de la k_i en función del recíproco de la concentración del modificador, a diferentes concentraciones fijas del ligando. De acuerdo con la ecuación 46, deben obtenerse líneas rectas intersectantes en el eje de la ordenada, típico diagrama de una inhibición competitiva.

Mecanismo b. La inactivación ocurre a través de la formación del complejo enzima-modificador y los complejos enzima-ligando y enzima-ligando-modificador son insensibles al modificador. Por esto el proceso de inactivación podemos tratarlo de manera semejante a la inhibición no competitiva enzimática. En nuestro caso, el modificador se comportaría como el sustrato y el ligando protector como el inhibidor no competitivo.

El mecanismo de inactivación podemos esquematizarlo de la siguiente manera:



donde EL-M es el complejo enzima-ligando-modificador; K'_D y K'_d son las constantes de disociación de L y M a partir del complejo ELM respectivamente. Todos los otros términos son definidos igual como en el mecanismo a.

Si la etapa limitante de la reacción es el paso del complejo E-M a enzima inactiva, la velocidad de inactivación en presencia del ligando, se puede expresar a través de la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{-d(Ea)}{dt} = k_2 (E-M) \quad (48)$$

donde Ea = Enzima activa = $E + EL + EL-M + E-M$

Dividiendo la ecuación anterior por Ea tenemos:

$$\frac{-d(Ea)}{dt(Ea)} = \frac{k_2 (E-M)}{E + EL + EL-M + E-M} \quad (49)$$

Reemplazando los términos EL , $EL-M$ y $E-M$ en función de sus respectivas constantes de disociación y reordenando se tiene que:

$$\frac{-d(Ea)}{(Ea)} = \frac{k_2}{1 + \frac{L \cdot K_d}{M \cdot K_D} + \frac{L}{K_D} + \frac{K_d}{M}} dt \quad (50)$$

Suponiendo que M y L se mantienen constantes, al integrar entre tiempo cero y tiempo t , se obtiene la siguiente expresión para la constante de inactivación de pseudo-primer-orden (k_i):

$$k_i = \frac{k_2 M}{K_d \left(1 + \frac{L}{K_D}\right) + M \left(1 + \frac{L}{K_D}\right)} \quad (51)$$

Al colocar en un gráfico el recíproco de la k_i en función de la concentración del ligando, se obtiene una línea recta de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_2} \left(1 + \frac{K_d}{M}\right) + \frac{1}{k_2} \left(\frac{1}{K_D'} + \frac{1}{M K_D}\right) \times L \quad (52)$$

Si el valor de K_D es igual al de K_D' , es decir, la unión del modificador a la enzima, no altera la afinidad del ligando por la enzima, la ecuación anterior se simplifica a:

$$\frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_2} \left(1 + \frac{K_d}{M}\right) + \frac{1}{k_2 K_D} \left(1 + \frac{K_d}{M}\right) \times L \quad (53)$$

y desde el punto de intersección de la recta con la abscisa, se obtiene el valor verdadero de K_D . Este valor obviamente es independiente

de la concentración del modificador.

El gráfico del recíproco de la k_i en función del recíproco de la concentración del modificador, a diferentes concentraciones fijas del ligando, mostrará una serie de líneas rectas que se intersectarán a la izquierda de la ordenada en la abscisa. Este comportamiento similar al de un inhibidor no competitivo, nos permite diferenciar este mecanismo del anterior.

APENDICE B

PROGRAMAS DE COMPUTACION

Los dos programas de computación que se describen a continuación fueron diseñados para el microcomputador Altair 8800b y escritos en lenguaje BASIC utilizando las instrucciones MITS ALTAIR EXTENDED BASIC (para mayor detalle consultar en "Mits Altair Basic Reference Manual". MITS INC. 1975).

Programa 1. Este programa tiene por objeto calcular las constantes que relacionan dos variables, cuando la función no es lineal (este programa fue una adaptación del programa de Cohen y col. (1957) para el microcomputador Altair 8800b, hecha por el Dr. O. Alvarez). En los resultados mostrados en esta tesis, se usó este programa, cuando la función de saturación (v en función de S) se adaptaba a una hipérbola rectangular y a una sigmoide.

La función podemos representarla de la siguiente manera:

$$v = f (S; a, b, c, \dots, z)$$

donde v es la velocidad, S es la concentración de sustrato y a, b, c, \dots, z son constantes cinéticas (las que pueden ser función de la concentración de otros sustratos, activadores o inhibidores, mantenidos constantes

durante el experimento), por ejemplo, la velocidad máxima, el número de Hill y la K_m o $K_{0.5}$.

Para obtener el mejor valor de las constantes cinéticas, se hizo uso de un método iterativo (método de Gauss-Newton), comparando el valor de la variable dependiente (v), obtenido por medio de la ecuación correspondiente, con el valor de la velocidad experimental.

Para calcular la velocidad, el programa combina una serie de valores para las constantes cinéticas tal que en cada iteración la velocidad calculada sea lo más similar a la velocidad experimental para cada una de las concentraciones de sustrato. La comparación entre las velocidades calculadas y las experimentales se efectúa hasta que la sumatoria de las diferencias de sus cuadrados sea mínima como se expresa por la siguiente relación:

$$Q^2 = \sum [v_i - f(S; a, b, c, \dots, z)]^2 \text{ debe ser mínima.}$$

Programa 2. Este programa fue diseñado para calcular las constantes cinéticas a través de la linearización de la ecuación de Michaelis-Menten por los métodos de Lineweaver-Burk ($1/v$ en función de $1/S$); Eadie-Hofstee (v/S en función de v) y Hanes-Woolf (S/v en función de S) (Dowd y Riggs, 1965).

El programa utiliza una subrutina para la línea de regresión de cada uno de los tres métodos de linearización una vez que ha adaptado los valores de la velocidad y la concentración de sustrato para las coordenadas x e y de cada transformación. A partir de esta línea de regresión se obtienen los valores para las constantes cinéticas con sus respectivos valores de desviación estándar.

Las instrucciones para el microcomputador se incluyen en la lista del *Programa 2*.

LISTA DEL PROGRAMA 1

```

1 READ N:DIMX(N):DIMY(N):DIMIT(2,2):DIMA(2,2):DIMB(2):
  IT=100:Z=0
10 R=1E-03
20 C=.01:FC=C:GOTO 40
40 FORI=1TON:READX(I),Y(I):NEXT
45 A=USR(3)
46 R$(0)="V.MAX."
47 R$(1)="K 05"
48 R$(2)="NH"
50 FORI=0TO2:PRINTR$(I):INPUTK(I):NEXT
60 IFZ=1GOTO 660
70 K0=K(0):K1=K(1):K2=K(2)
80 FORI=0TO2
90 FORJ=0TO2:A(I,J)=0:NEXTJ
100 NEXTI
110 IT=IT-1:IFIT=0GOTO 650
120 FORI=0TO2:B(I)=0:NEXT
130 QQ=0
140FORI=1 TO N
150 S=EXP(K2*LOG(X(I))):F=K0*S/(K1+S):Q=F-Y(I)
160 QQ=QQ+Q*Q
170 S2=EXP((K2+C*K2)*LOG(X(I)))
180 G(0)=-((F-(K0+FC*K0)*S/(K1+S))/FC*K0)
190 G(1)=-((F-(K0*S/((K1+FC*K1)+S)))/FC*K1)
200 G(2)=-((F-(K0*S2/(K1+S2)))/FC*K2)
210 FORK=0TO2:D(K)=G(K):NEXT
220 FORK=0TO2
230 FORL=0TO2:A(L,K)=A(L,K)+G(L)*G(K):NEXT
240 B(K)=B(K)+Q*D(K)
250 NEXTK
260 NEXTI
270 XS=QQ/(N-3)
280 GOSUB 290:GOTO 60
290 D=A(0,0)*A(1,1)*A(2,2)+A(1,0)*A(2,1)*A(0,2)+A(2,0)*
  A(0,1)*A(1,2)
300 D=D-A(0,2)*A(1,1)*A(2,0)-A(1,2)*A(2,1)*A(0,0)
310 D=D-A(2,2)*A(0,1)*A(1,0)
320 IFD=0GOTO 640
330 T(0,0)=(A(1,1)*A(2,2)-A(1,2)*A(2,1))
340 T(0,1)=-(A(0,1)*A(2,2)-A(0,2)*A(2,1))
350 T(0,2)=(A(0,1)*A(1,2)-A(0,2)*A(1,1))
360 T(1,0)=-(A(1,0)*A(2,2)-A(1,2)*A(2,0))
370 T(1,1)=(A(0,0)*A(2,2)-A(0,2)*A(2,0))
380 T(1,2)=-(A(0,0)*A(1,2)-A(0,2)*A(1,0))
390 T(2,0)=(A(1,0)*A(2,1)-A(1,1)*A(2,0))
400 T(2,1)=-(A(0,0)*A(2,1)-A(0,1)*A(2,0))
410 T(2,2)=(A(0,0)*A(1,1)-A(0,1)*A(1,0))
420 FORI=0TO2:D(I)=0

```

```

430 FORJ=0TO2:D(I)=D(I)+(T(J,I)*B(J)/D):NEXTJ
440 NEXTI
450 PRINT " "
460 IFD<0GOTO 480
470 FORI=0TO2:D(I)=-D(I):NEXT
480 A=USR(3)
490 PRINT "V.MAX="";:PRINTUSING"###.###";K0
491 PRINT "K    ="";:PRINTUSING"###.###";K1
492 PRINT "NH   ="";:PRINTUSING"###.###";K2
493 PRINT "SUMA DE CUADRADOS="";:PRINTUSING"#.#####↑↑↑↑";QQ
510 FORI=0TO2:E(I)=SQR(T(I,I)*XS/D):NEXT
520 FORI=0TO2:CH(I)=ABS(D(I))
530 IFCH(I)<E(I)*RTHENZ=1ELSEZ=0
540 NEXT
550 IFZ=1THENRETURN
560 QN=0:RR=4
570 K(0)=K0+D(0):K(1)=K1+D(1):K(2)=K2+D(2)
580 FORI=1TON:QS=EXP(K(2)*LOG(X(I))):QF=K(0)*QS/(K(1)+QS)
590 QN=QN+(Y(I)-QF)*(Y(I)-QF):NEXT
600 PRINT RR;:IFQN<QQTHENRETURN
610 IFRR=0THENRETURN
620 FORI=0TO2:D(I)=.5*D(I):NEXT
630 RR=RR-1:QN=0:GOTO 570
635 A=USR(3)
640 PRINT "ERROR,D=0":STOP
650 PRINT "":PRINT "MAS DE 100 REPETICIONES,...":STOP
660 PRINT "":PRINT "RESULTADOS"
670 FORI=0TO2
675 A=USR(3)
680 PRINTR$(I);"="";:PRINTUSING"###.###";K(I);
690 PRINT "    S.D.="";E(I)
700 NEXT
710 PRINT "SUMA DE CUADRADOS";QQ
720 STOP

```

LISTA DEL PROGRAMA 2

OPCION 1 GRAFICO DE HILL LOG(V/VM-V) VS LOGS
 OPCION 2 GRAFICO DE LINEWEAVER BURK 1/V VS 1/S
 OPCION 3 GRAFICO DE EADIE HOFSTEE V VS V/S
 OPCION 4 GRAFICO DE HANES-WOOLF S/V VS S

```

2010 A=USR(3): E=2.303
2020 READN:DIMS(N):DIMV(N):DIMX(N):DIMY(N)
2030 FORI=0TON-1:READS(I),V(I):NEXTI
2060 INPUT"OPCION";A
2070 ONAGOSUB 2080, 2200, 2300, 2400
2075 GOTO 2060
2080 A=USR(3): PRINT"HILL "
2090 INPUT"V.MAX.=";VM
2100 FORI=0TON-1
2110 Y(I)=LOG(V(I)/(VM-V(I)))
2120 X(I)=LOG(S(I))
2125 NEXT
2130 GOSUB 3000
2140 PRINT "N=";B
2150 PRINT "K=";EXP(-B1)
2155 PRINT "S0.5=";EXP(1/B)*LOG(EXP(-B1/E))
2160 PRINT "S.D. DE N=";C
2170 PRINT "S.D. DE K=";EXP(-C1)
2175 PRINT "COEF.CORR=";:PRINTUSING"#.#####";R
2180 RETURN
2200 A=USR(3)
2210 FORI=0TON-1
2220 Y(I)=1/V(I)
2230 X(I)=1/S(I)
2235 NEXT
2240 GOSUB 3000
2245 PRINT "GRAFICO DE LINEWEAVER BURK"
2250 PRINT "V. MAX=";1/B1
2260 PRINT "KM=" ; (B/B1)
2265 PRINT "INTERSECCION VERTICAL=";B1
2266 PRINT "PENDIENTE=" ;B
2270 PRINT "S.D. DE V.MAX.=" ; ((C1/B1)*(1/B1))
2280 PRINT "S.D. KM=";SQR((C/B)*(C/B)+(C1/B1)*(C1/B1))*B/B1
2281 PRINT "S.D. DE INTERSECCION=";C1
2282 PRINT "S.D. DE PENDIENTE=";C
2285 PRINT "COEF. CORR.=";:PRINTUSING"#.#####";S/SQR(S1*S2)
2290 RETURN
2300 A=USR(3)
2310 FORI=0TON-1
2320 Y(I)=V(I)
2330 X(I)=V(I)/S(I)
2335 NEXT
2340 GOSUB 3000

```

```

2345 PRINT"GRAFICO DE EADIE HOFSTEE"
2350 PRINT"V.MAX.= ";B1
2360 PRINT"KM=";(-B)
2370 PRINT"S.D. DE V.MAX.= ";C1
2380 PRINT"S.D. DE KM=";(C)
2385 PRINT"COEF. CORR.=";:PRINTUSING"#.#####";-R
2390 RETURN
2400 A=USR(3)
2410 FORI=0TON-1
2420 Y(I)=S(I)/V(I)
2430 X(I)=S(I)
2435 NEXT
2440 GOSUB 3000
2445 PRINT"GRAFICO DE HANES-WOOLF"
2450 PRINT"V.MAX.= ";(1/B)
2460 PRINT"KM=";(B1/B)
2470 PRINT"S.D. DE V.MAX=";((C/B)*(1/B))
2480 PRINT"S.D.KM=";SQR((C/B)*(C/B)+(C1/B1)*(C1/B1))*(B1/B)
2485 PRINT"COEF. CORR.=";:PRINTUSING"#.#####";R
2490 RETURN
3000 X1=0:X2=0:Y1=0:Y2=0:Z=0:A=USR(3)
3010 FORI=0TON-1
3020 X1=X1+X(I)
3030 Y1=Y1+Y(I)
3040 X2=X2+X(I)*X(I)
3050 Y2=Y2+Y(I)*Y(I)
3060 Z=Z+X(I)*Y(I)
3070 NEXT
3080 X3=X1/N
3090 Y3=Y1/N
3100 S1=X2-X1*X3
3110 S2=Y2-Y1*Y3
3120 S=Z-X1*Y3
3130 B=S/S1
3140 B1=Y3-B*X3
3150 S3=S2-B*S
3160 S4=S3/(N-2)
3170 C=SQR(S4/S1)
3180 C1=SQR(S4*(1/N+X3*X3/S1))
3190 R=S/SQR(S1*S2)
3200 RETURN

```

BIBLIOGRAFIA

- Babul, J. (1966). Purificación de glucoquinasa de hígado de rata. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Licenciado en Química. Facultad de Tecnología. Universidad Católica.
- Babul, J. y Niemeyer, H. (1966) Purificación de glucoquinasa de hígado de rata. *Arch. Biol. Med. Exper.*, 3, 65-70.
- Bachelard, H. S., Clark, A.G. y Thompson, M.I. (1971). Cerebral-Cortex Hexokinases. Elucidation of Reaction Mechanism by Substrate and Dead-End Inhibitor Kinetic Analysis. *Biochem. J.* 123, 707 - 715.
- Bartana, J. y Cleland, W.W. (1974). Rabbit Muscle Phosphofructokinase. Product and Dead End Inhibition. *J. Biol. Chem.* 249, 1271 - 1276.
- Bernfeld, P. (1955). Amylases α and β . En *Methods in Enzymology*. Vol. 1, p. 149.
- Berthillier, G. y Got, R. (1972). Effets de l'ATP et de la Photooxydation sur l'agrégation de la Glucokinase microsomique du foie de rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 258, 88 - 98.
- Brocklehurst, K. (1979). The Equilibrium Assumption is Valid for the Kinetic Treatment of most Time-Dependent Protein-Modification Reactions. *Biochem. J.* 181, 775-778.
- Brostrom, M.A. y Browing, E.T. (1973). Choline Kinase from Brewer's Yeast. Partial Purification, Properties, and Kinetic Mechanism. *J. Biol. Chem.* 248, 2364 - 2371.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1975). Cinética sigmoideal de la glucoquinasa hepática. Resúmenes del XII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Bogotá, Colombia p. 20.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1977). A kinetic model explaining the sigmoideal saturation function of glucokinase. 11th FEBS Meeting. Copenhagen, Denmark. Proceedings A 1-8-056.

- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1978). Maintenance of the monomeric structure of glucokinase under reacting conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 142-148.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1979). Kinetic Cooperativity of Glucokinase with Glucose. *Arch. Biol. Med. Exper.* 12, 571-580.
- Casazza, J.P. y Fromm, H.J. (1976). Studies on the Mode of Sugar - Phosphate Product Inhibition of Brain Hexokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 480 - 487.
- Cleland, W.W. (1963a). The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions with Two or More Substrates or Products. Nomenclature and Rate Equations. *Biochim. Biophys. Acta.* 67, 104-137.
- Cleland, W.W. (1963b). The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions with Two or More Substrates or Products. Inhibition: Nomenclature and Theory. *Biochim. Biophys. Acta.* 67, 173 - 187.
- Cleland, W.W. (1964). Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry* 3, 480 - 482.
- Cleland, W.W. (1970). Steady State Kinetics. En *The Enzymes*. Vol. II. Third Edition. Ac. Press, New York and London pp. 1- 65.
- Cohen, E.R., Crowe, K.M. y Duthord, I.W.M. (1957). Fundamental Constants of Physics (Interscience Publishers, Inc., New-York).
- Cohen, L.A. (1968). Group-Specific Reagents in Protein Chemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 37, 695 - 726.
- Cohen, L.A. (1970). Chemical Modification as a Probe of Structure and Function. En *The Enzymes* Third Ed, Vol. I pp. 148 - 211, Edited by Paul Boyer. (Academic Press).
- Cole, R.D. (1967). Sulfitolysis. En *Methods in Enzymology*. Vol. XI, pp. 206 - 208.
- Colowick, S.P. (1973). The hexokinase. En *The Enzymes*, 2nd Ed. Vol 9, Part B, pp. 1 - 48. Edited by Paul Boyer (Academic Press).

Connellan, J.M. y Folk, J.E. (1969). Mechanism of the Inactivation of Guinea Pig Liver Transglutaminase by 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). *J. Biol. Chem.* 244, 3173 - 3181.

Connolly, B.A. y Trayer, I.P. (1979a). Affinity Labelling of Rat-Muscle Hexokinase Type II by a Glucose-Derived Alkylating Agent. *Eur. J. Biochem.* 93, 375 - 385.

Connolly, B.A. y Trayer, I.P. (1979b). Reaction of Rat Hepatic Glucokinase with Substrate-Related and Other Alkylating Agents. *Eur. J. Biochem.* 99, 299 - 308.

Cornish-Bowden, A. (1974). A Simple Graphical Method for Determining the Inhibition Constants of Mixed, Uncompetitive and Noncompetitive Inhibitors. *Biochem. J.* 137, 143 - 144.

Cornish-Bowden, A. y Eisenthal, R. (1974). Statistical Consideration in the Estimation of Enzyme Kinetic Parameters by the Direct Linear Plot and Other Methods. *Biochem. J.* 139, 721 - 730.

Crane, R.K. (1962). Hexokinases and Pentokinases. En *The Enzymes*. Vol. 6, pp. 47 - 66. Edited by P. Boyer. Ac. Press. New York.

Chou, A.C. y Wilson, J.E. (1974). A Study of the Sulfhydryl Groups of Rat Brain Hexokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 163, 191 - 199.

Danenberg, K. y Cleland, W.W. (1975). Use of Chromium-Adenosine Triphosphate and Lyxose to Elucidate the Kinetic Mechanism and Coordination State of the Nucleotide Substrate for Yeast Hexokinase. *Biochemistry* 14, 28 - 39.

Davagnino, J. y Ureta, T. (1980). Identification of Extrahepatic "Glucokinase" as N-Acetylglucosamine Kinase. *J. Biol. Chem.* 255, 2633 - 2636.

Dawson, R.M., Elliott, D.C., Elliott, W.H. y Jones, K.M. (1972). En "Data for Biochemical Research", Sd. Ed., Oxford University Press. p. 170.

Di Pietro, D.L., Sharma, C.H. y Weinhouse, S. (1962). Studies on Glucose Phosphorylation in Rat Liver. *Biochemistry* 1, 455 - 462.

Dixon, M. (1953). The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.* 55, 170 - 171.

Dixon, M. y Webb, E.C. (1964). En *Enzymes*, Sd. Ed. Longmans, Green, Co. Ltd., p. 10.

Dowd, J.E. y Riggs, D.S. (1965). A Comparison of Estimates of Michaelis-Menten Kinetic Constants from Various Linear Transformations. *J. Biol. Chem.* 240, 863 - 869.

Ellman, G.L. (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70 - 77.

Fahrney, D.E. y Gold, A.M. (1963). Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase, α -Chymotrypsin, and Trypsin. *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 997 - 1000.

Fernandez, Diez, M.J., Osuga, D.T. y Feeney, R.E. (1964). The Sulfhydryls of Avian Ovalbumins, Bovine β -Lactoglobulin, and Bovine Serum Albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 107, 449 - 458.

Fromm, H.J. y Zewe, V. (1962a). Kinetic Studies of the Brain Hexokinase Reaction. *J. Biol. Chem.* 237, 1661 - 1667.

Fromm, H.J. y Zewe, V. (1962b). Kinetic Studies of Yeast Hexokinase. *J. Biol. Chem.* 237, 3027 - 3032

Fromm, H.J. (1975). En *Initial Rate Enzyme Kinetics*. Edited by Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin. Serie Molecular Biology. Biochemistry. Biophysical 22. pp. 83 - 92.

Garcés, E. y Cleland, W.W. (1969). Kinetic Studies of Yeast Nucleoside Diphosphate Kinase. *Biochemistry*, 8, 633 - 640.

Gerlsma, S.Y. (1968). Reversible Denaturation of Ribonuclease in Aqueous Solutions As Influenced by Polyhydric Alcohols and Some Other Additives. *J. Biol. Chem.* 243, 957 - 961.

Glazer, A.N., Delange, R.J. y Sigman, D.S. (1975). *Chemical Modification of Proteins*. North Holland Publishing Co., First Ed., Amsterdam, Holland. pp. 113 - 126.

González, C., Ureta, T., Sanchez, R. y Niemeyer, H. (1964). Multiple Molecular Forms of ATP: Hexose 6-Phosphotransferase from Rat Liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 347 - 352.

González, C., Ureta, T., Babul, J., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1967). Characterization of isoenzymes of Adenosine Triphosphate: D-Hexose 6-Phosphotransferase from Rat Liver. *Biochemistry* 6, 460 - 468.

Grossbard, L. y Schimke, R.T. (1966). Multiple Hexokinases of Rat Tissues. Purification and Comparison of Soluble Forms. *J. Biol. Chem.* 241, 3546-2560.

Gulbinsky, J.S. y Cleland, W.W. (1968). Kinetic Studies of *Escherichia coli* Galactokinase. *Biochemistry*. 7, 566 - 575.

Hanes, C.S. (1932). Studies on Plant Amylases. The effect of Starch Concentration upon the Velocity of Hydrolysis by Amylase of Germinated Barley. *Biochem. J.* 26, 1406 - 1421.

Heberlein, U. (1979). Inactivación de la glucoquinasa de hígado de rata por 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato). Tesis para optar al título de Bioquímico. Escuela de Química y Farmacia y Bioquímica. U. de Concepción.

Heberlein, U., Monasterio, O. y Niemeyer, H. (1979). Inactivación de glucoquinasa con ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico). Disociación entre la actividad enzimática y la susceptibilidad al reactivo. II Reunión Regional PAABS, Cono Sur y III Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, Viña del Mar, Chile. *Arch. Biol. Med. Exper.* 12, 271.

Hill, A.V. (1913). Citado en: Endrenyi, L., Fajsz, C. y Kwong, F.H. (1975). Evaluation of Hill Slopes and Hill Coefficients when the saturation Binding or Velocity is not Known. *Eur. J. Biochem.* 51, 317 - 328.

Hoffee, P., Lai, C.Y., Pugh, E.L. y Horecker, B.L. (1967). The Function of Histidine Residues in Rabbit Muscle Aldolase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57, 107 - 113.

Hofstee, B.H.J. (1959). Non-Inverted versus Inverted Plots in Enzyme Kinetics. *Nature*. 184, 1296 - 1298.

Holroyde, M.J., Chesher, J.M.E., Trayer, I.P. y Walker, D.G. (1976a). Studies on the Use of Sepharose-N-(6-Aminohexanoyl)-2-Amino-2-Deoxy-D-Glucopyranose for the Large-Scale Purification of Hepatic Glucokinase. *Biochem. J.* 153, 351 - 361.

Holroyde, M.J., Allen, M.B., Storer, A.C., Warsy, A.S., Chesher, J.M.E., Trayer, I.P., Cornish-Bowden, A. y Walker, D.G. (1976b). The purification in High Yield and Characterization of Rat Hepatic Glucokinase. *Biochem. J.* 153, 363 - 373.

- Janatova, J., Fuller, J.K., y Hunter, M.J. (1968). The Heterogeneity of Bovine Albumin with Respect to Sulfhydryl and Dimer Content. *J. Biol. Chem.* 243, 3612 - 3622.
- Katzen, H.M. y Schimke, R.T. (1965). Multiple Forms of Hexokinase in Rat: Tissue Distribution, Age Dependency, and Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 54, 1218 - 1225.
- Kenkare, V.W. y Swamp, G. (1978). Identification of a Single Essential Thiol at the Active Site of Brain Hexokinase Using an Affinity Label. *Fed. Proc.* 37, 1311. Resúmen 239.
- Katzen, H.M., Soderman, D.D. y Nitowsky, H.M. (1965). Kinetic and electrophoretic evidence for multiple forms of glucose-ATP phosphotransferase activity from human cell cultures and rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 377 - 382.
- Kitz, R. y Wilson, I.B. (1962). Esters of Methanesulfonic Acid as Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 237, 3245 - 3249.
- Kornberg, A. y Pricer, W.E. (1951). Enzymatic Phosphorilation of Adenosine and 2,6-Diaminopurine Riboside. *J. Biol. Chem.* 193, 481 - 495.
- Kornberg, A. y Horecker, B.L. (1953). *Biochem Preparations* E.E. Snell Ed. J. Wiley and Sons. N.Y. Vol. 3, p. 27.
- Lebo, R.V. y Kredich, N.M. (1978). Inactivation of Human Glutamylcysteine Synthetase by Cystamine. *J. Biol. Chem.* 253, 2615 - 2623.
- León, O. (1977). Cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y de N-acetil glucosamina en derivados de glucosamina inmovilizados en Sefarosa. Tesis para optar el título de Bioquímico. Escuela de Química y Farmacia y Bioquímica. U. de Concepción.
- León, O., Monasterio, O. y Niemeyer, H. (1977). Cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y N-acetilglucosamina en derivados inmovilizados en Sefarosa. I Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, Talca. Libro de Resúmenes.
- León, O., Monasterio, O. y Niemeyer, H. (1978). Cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y N-acetilglucosamina en derivados de glucosamina inmovilizados. XIX Reunión Anual Soc. Biol. de Chile, Jahuel. Chile. 1976. *Arch. Biol. Med. Exper.* 11, R-85.

- Lineweaver, H. y Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658 - 666.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275.
- Maccioni, R. (1975). Purificación y caracterización de glucoquinasa. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias, U. de Chile.
- Main, A.R., (1964). Affinity and Phosphorylation Constant for the Inhibition of Esterases by Organophosphates. *Science* 144, 992 - 993.
- Malcolm, A.D.B. y Radda, G.K. (1970). The Reaction of Glutamate Dehydrogenase with 4-Iodoacetamido Salicylic Acid. *Eur. J. Biochem.* 15, 555 - 561.
- Mares-Guía, M. y Shaw, E. (1967). The Specific Inactivation of Trypsin by Ethyl p-Guanidinobenzoate. *J. Biol. Chem.* 242, 5782 - 5788.
- Meloche, A. (1967). Bromopyruvate Inactivation of 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase. I. Kinetic Evidence for Active Site Specificity. *Biochemistry* 6, 2273 - 2280.
- Menezes, L.C. y Pudles, J. (1976). Effects of activators on chemically modified yeast hexokinase. *Biochimie*, 58, 51 - 59.
- Mildvan, A.S. y Leigh, R.A. (1964). Determination of Co-Factor Dissociation Constants from the Kinetics of Inhibition of enzyme. *Biochem. Biophys. Acta*, 89, 393 - 397.
- Miller, G.L. (1959). Protein Determination for Large Numbers of Samples. *Anal. Chem.* 31, 964.
- Monasterio, O. y Niemeyer, H. (1977). Modificación química de glucoquinasa. I Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, Talca. Libro de Resúmenes.
- Monasterio, O., León, O. y Niemeyer, H. (1977). Propiedades de los ácidos 6-aminohexanoico y N-acetilsuccinámico como espaciadores de glucosamina unida a sefarosa, en cromatografía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y N-acetilglucosamina. II Reunión de PAABS, Cono Sur y XIII Reunión Nacional de SAIB, Córdoba, Argentina. Resúmenes 90.

Monasterio, O. (1978). Kinetic of glucokinase. Order of addition of the substrates using 2-deoxyglucose as the sugar substrate. International Symposium, Regulatory aspects of the kinases of carbohydrate metabolism. II Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, Santiago, Chile. *Arch. Biol. Med. Exper.* 11, 118.

Monasterio, O., Heberlein, U. y Niemeyer, H. (1979a). Role of Thiol Groups in Glucokinase Activity. XIth. International Congress. Biochemistry, Toronto, Canada, Abstracts 03-4-530.

Monasterio, O., Heberlein, U. y Niemeyer, H. (1979b). Protección por ligandos a la inactivación de glucoquinasa con el ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico). Relación con el ciclo catalítico. International Symposium "Gen and protein behaviour". XXII Reunión Anual Soc. Biol. Chile, Valdivia, Chile. *Arch. Biol. Med. Exper.* 12, 473.

Monasterio, O., Heberlein, U., Orellana, O. y Niemeyer, H. (1980). Mecanismo de la inactivación de la glucoquinasa por 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato). IV Reunión Anual Soc. Bioquím. Chile, XVI Reunión Anual S.A. I.B. y IX Reunión Anual Soc. Argentina de Biofísica. Mendoza, Argentina. *Separata de los Arch. Biol. Med. Exper.* 13, N°2.

Morrison, J.F. y Cleland, W.W. (1966). Isotope Exchange Studies of the Mechanism of the Reaction Catalyzed by Adenosine Triphosphate: Creatine Phosphotransferase. *J. Biol. Chem.* 241, 673 - 683.

Niemeyer, H. y Ureta, T. (1972). Enzyme adaptation in mammals. En: *Molecular basis of biological activity*. Gaede, K., Horecker, B. y Whelan, W. (Ed). PAABS Symp., Vol. 1, pp. 221 - 273 (Academic Press New York).

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

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

Niemeyer, H., Monasterio, O., Cárdenas, M.L. y Rabajille, E. (1978). Kinetic Mechanism of the Phosphorylation of 2-deoxyglucose by Rat Liver Glucokinase. American Society Biological Chemist 69th Annual Meeting, Atlanta, Georgia, USA. *Fed. Proc.* 37, 1421.

- Nishikawa, A.H. y Bailon, P. (1975). Affinity Purification Methods. Non specific Adsorption of Proteins Due to Ionic Groups in Cyanogen Bromide Treated Agarose. *Arch. Biochem. Biophys.* 168, 576 - 584.
- Oguchi, M., Miyatake, Y., Ayabe, J. y Akamatsu, N. (1975). Phosphorylation of D-Glucosamine by Rat Liver Glucokinase. *J. Biochem.* 77, 1117-1121.
- Oster, G., Bellin, J.S., Kimball, R.W. y Shrader, M.E. (1959). Dye Sensitized. Photo-oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 5095 - 5099.
- Otieno, S., Bhargava, A.K., Barnard, E.A. y Ramel, A.H. (1975). Essential Thiols of Yeast Hexokinase: Alkylation by a substrate Like Reagent. *Biochemistry* 14, 2403 - 2409.
- Otieno, S., Bhargava, A.K., Serelis, D. y Barnard, E.A. (1977). Evidence for a Single Essential Thiol in the Yeast Hexokinase Molecule. *Biochemistry* 16, 4249 - 4255.
- Parry, M.J. y Walker, D.G. (1966). Purification and Properties of Adenosine 5'-Triphosphate-D-Glucose 6-Phosphotransferase from Rat Liver. *Biochem. J.* 99, 266 - 274.
- Parry, M.J. y Walker, D.G. (1967). Further Properties and Possible Mechanism of Action of Adenosine 5'-Triphosphate-D-Glucose 6-Phosphotransferase from Rat Liver. *Biochem. J.* 105, 473 - 482.
- Pétra, P.H. (1971). Modification of Carboxyl Groups in Bovine Carboxipeptidase A. I. Inactivation of the Enzyme by N-Ethyl-5-Phenylisoxazolium-3'-Sulfonate (Woodward's Reagent K). *Biochemistry*, 10, 3163 - 3170.
- Pilkis, S.J. (1972). Rat Hepatic Glucokinase: Improved Purification and Some Properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 349 - 360.
- Purich, D.L., Fromm, H.J. y Rudolph, F.B. (1973). The Hexokinases: Kinetic, Physical, and Regulatory Properties. *Adv. Enzymol.* 35, 249-326.
- Raushel, F.M. y Cleland, W.W. (1977). Bovine Liver Fructokinase: Purification and Kinetic Properties. *Biochemistry* 16, 2169 - 2175.
- Ray, W.J. Jr (1967). Photochemical Oxidation. En *Methods in Enzymology*. Vol. 11, 490 - 497.

Redkar, V.D. y Kenkare, U.W. (1972). Bovine Brain Mitochondrial Hexokinase. Solubilization, Purification, and Role of Sulfhydryl Residues. *J. Biol. Chem.* 247, 7576 - 7584.

Redkar, V.D. y Kenkare, U.W. (1975). Effect of Ligands on the Reactivity of Essential Sulfhydryls in Brain Hexokinase. Possible Interaction between Substrate Binding Sites. *Biochemistry*. 14, 4704 - 4712

Rose, M.C. (1976). Purificación de Glucoquinasa de Hígado de Cerdo. Tesis para optar el título de Bioquímico. Escuela de Química y Farmacia y Bioquímica. U. de Concepción.

Sadtler, S. and Sons. *Sadtler Standard Spectra*. Ed. por Sadtler Research Laboratories Inc. Philadelphia. Sin fecha.

Salas, J., Salas, M., Viñuela, E. y Sols, A. (1965). Glucokinase of Rabbit Liver. Purification and Properties. *J. Biol. Chem.* 240, 1014 - 1018.

Setlow, B. y Mansour, T.G. (1970). Studies on Heart Phosphofructokinase. Nature of the Enzyme Desensitized to Allosteric Control by Photooxidation and by Acylation with Ethoxyformic Anhydride. *J. Biol. Chem.* 245, 5524 - 5533.

Shaw, E. (1970). Chemical Modification by Active-Site-Directed Reagents. En *The Enzymes*, Vol. 1, Third Ed., Ac. Press, New York, pp. 91 - 146.

Sigman, D. y Mooser, G. (1975). Chemical Studies of Enzyme Active Sites. *Ann. Rev. Biochem.* 44, 889 - 931.

Slein, M.W., Cori, G.T. y Cori, G.F. (1950). A Comparative Study of Hexokinase from Yeast and Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 186, 763 - 780.

Somogyi, M. (1945). A New Reagent for the Determination of Sugars. *J. Biol. Chem.* 160, 61 - 68. Nelson, N.J. (1944). A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375 - 380.

Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. (1976). Kinetics of Rat Liver Glucokinase. Co-operative Interactions with Glucose at Physiologically Significant Concentrations. *Biochem. J.* 159, 7 - 14.

Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. (1977). Kinetic Evidence for a "Nemotional" Mechanism for Rat Liver Glucokinase. *Biochem. J.* 165, 61 - 69.

Südi, J. (1970). Kinetics of the Protection of Lactate Dehydrogenase by Substrates against Heat Inactivation. *Biochim. Biophys. Acta*, 212, 213 - 224.

- Thompson, M.F. y Bachelard, H.S. (1976). Determination of True K_i Values in Enzyme Dead-End Inhibition Kinetic Studies. *Anal. Biochem.* 71, 507-518.
- Tsopanakis, A.D. y Herries, D.G. (1975). Kinetic Discrimination between Two Types of Enzyme Mechanism. Application to Lactose Synthetase. *Eur. J. Biochem.* 53, 193 - 196.
- Ureta, T. (1975). Phylogeny, Ontogeny, and Properties of the Hexokinases from Vertebrates. En Market, C.L. (Ed.). *Isozymes III. Developmental Biology*. Ac. Press, New York, pp. 575 - 601.
- Ureta, T. (1976). The Allosteric Regulation of Hexokinase C from Amphibian Liver. *J. Biol. Chem.* 251, 5035 - 5042.
- Vera, M.L., Cárdenas, M.L. y Niemeyer, H. (1978). Enzimas fosforilantes de glucosa de mucosa de intestino de rata. XVIII Reunión Anual Soc. Biol. Chile, Jahuel. 1976. *Arch. Biol. Med. Exper.* 11, R-110.
- Viñuela, E., Salas, M. y Sols, A. (1963). Glucokinase and Hexokinase in Liver in Relation to Glycogen Synthesis. *J. Biol. Chem.* 238, PC 1175-1177.
- Walker, D.G. (1963). On the presence of two soluble glucose-phosphorylating enzymes in adult liver and the development of one of these after birth. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 209 - 226.
- Walker, D.G. y Rao, S.H. (1964). The Role of Glucokinase in the Phosphorylation of Glucose by Rat Liver. *Biochem. J.* 90, 360 - 368.
- Walker, D.G. (1966). The Nature and Function of Hexokinase in Animal Tissues. *Essays in Biochemistry*. (Campbell, P.N. y Greville, G.D. Eds.) Vol. 2, pp. 33 - 67.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941). Citado por Dawson, R.M. y col., en *Data for Biochemical Research*, Sd. Ed., Oxford Univeristy Press, p. 625.
- Weinhouse, S. (1976). Regulation of Glucokinase in Liver. *Curr. Top. Cell. Regul.* 11, 1 - 50.
- Weiser, M., Quill, H. e Isselbacher, K. (1971). Isolation and properties of intestinal hexokinases, fructokinase and N-acetylglucosamine kinase. *J. Biol. Chem.* 246, 2331 - 2337.

Westhead, E.W. (1965). Photooxidation with Rose Bengal of a Critical Histidine Residue in Yeast Enolase. *Biochemistry*, 4, 2139 - 2144.

Westhead, E.W. (1972). Dye-Sensitized Photooxidation. En *Methods in Enzymology*, Vol. 25B, 401 - 409.

Wettermark, K.G., Borglund, E. y Brolin, S.E. (1968). A Regenerating System for Studies of Phosphoryl Transfer from ATP. *Anal. Biochem.* 22, 211 - 218.

White, F.H. Jr. (1972). Reduction and Reoxidation at Disulfide Bonds. En *Methods in Enzymology*. Vol. 25B, 387 - 389.

Wilkinson, G.N. (1961). Statistical Estimations in Enzyme Kinetics. *Biochem. J.* 80, 324 - 332.

Wilson, J.E. (1978). Ligand-Induced Conformations of Rat Brain Hexokinase: Studies with Hexoses, Hexose 6-Phosphates, and Nucleoside Triphosphates Leading to Development of a New Model for the Enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 88 - 99.

Wilson, J.E. (1979). Ligand-Induced Conformational Changes of Rat Brain Hexokinase. Their Role in Determining the Substrate Specificity for Hexose and Inhibitory Effectiveness of Hexose 6-Phosphates. *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 79 - 87.

Woolf, B. (1932). Citado en *Allgemeine Chemie der Enzyme* por Haldane, J.B.S. y Stern, K.G. (Dresden y Leipzig, Steinkopff Verlag). p. 119.