

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

FUNCION DE LAS ISOENZIMAS DE
HEXOQUINASA EN LA UTILIZACION
DE GLUCOSA EN OOCITOS DE ANFIBIO

ANA FRANCISCA PRELLER SIMMONS

1988

LABORATORIO
DE NIEMEYER

FUNCION DE LAS ISOENZIMAS DE
HEXOQUINASA EN LA UTILIZACION
DE GLUCOSA EN OOCITOS DE ANFIBIO

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

ANA FRANCISCA PRELLER SIMMONS

Enero 1988

Director de Tesis: Dr. Tito Ureta A.

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 la candidata

Ana Francisca Preller Simmons

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 11 de Marzo de 1988.

Director de Tesis

Dr. Tito Ureta

Comisión Informante de Tesis

Dra. Catherine Connelly

Dr. Jaime Eyzaguirre

Dr. Arturo Ferreira

Dr. Hermann Niemeyer

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile bajo la dirección del Dr. Tito Ureta A. (Departamento de Biología, Facultad de Ciencias) y fue financiada por la Dirección de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile (actualmente Departamento Técnico de Investigación: Proyectos B-705 y B-1989), por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo PNUD-UNESCO (Proyecto CHI-81/001), por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Proyectos 1138 y 1451/86), por la Fundación Volkswagen (Alemania) y por el Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la O.E.A.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, al Dr. Hermann Niemeyer y a los integrantes del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias el haberme aceptado en este grupo. La excelente calidad académica y gran calidez humana que aquí existen han sido fundamentales en mi formación científica y personal.

Agradezco en forma especial a las siguientes personas:

A los doctores Jorge Babul, Octavio Monasterio, María de la Luz Cárdenas, Victoria Guixé y Rosalba Lagos por la crítica oportuna, los consejos siempre útiles y el estímulo constante recibido durante el desarrollo de este trabajo.

A Jasna Radojković, Eliana Rabajille, Ximena Espinosa, Patricia Varela, Claudio Retamal y Sergio Zepeda por su ayuda desinteresada, apoyo y amistad.

Al Dr. Alfredo de Ioannes, quien me facilitó su laboratorio, equipo y reactivos para la preparación de anticuerpos monoclonales.

A Soledad Luzanto por mecanografiar gran parte de esta Tesis.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud al Dr. Tito Ureta, director de esta Tesis. Su amistad, su inestimable apoyo científico y generosa ayuda fueron decisivos en la realización de esta Tesis.

A mis padres

A Cristian y a Constanza

INDICE DE MATERIAS

	pág.
Lista de Tablas	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xx
INTRODUCCION	1
El problema	1
Un modelo susceptible de poner a prueba	2
Pruebas en favor del modelo	4
Compartimentación en las vías de utilización de glucosa	5
Enfoque experimental del problema	8
MATERIALES Y METODOS	12
Reactivos	12
Animales de experimentación	13
Composición de algunas soluciones de uso frecuente	14
Medición de la actividad hexoquinásica	15
Determinación de proteínas	16
Determinación de la concentración de sales	16
Preparación y regeneración de los materiales cromatográficos	17
Electroforesis en geles de poliacrilamida	18

	pág.
Purificación de hexoquinasa B	19
1. Preparación de extractos crudos	19
2. Cromatografía en DEAE-celulosa	20
3. Cromatografía en hidroxilapatita	20
4. Cromatografía en Cibacron Blue-Sepharose	21
5. Recromatografía en DEAE-celulosa	21
6. Filtración en Sephacryl S-200	21
Purificación de hexoquinasa C	22
1. Preparación de extractos crudos	22
2. Cromatografía en DEAE-celulosa	23
3. Cromatografía en hidroxilapatita	23
4. Filtración en Sephacryl S-300	23
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida	24
Preparación de sueros inmunes anti-hexoquinasas B y C	25
1. Suero anti-hexoquinasa B	25
2. Suero anti-hexoquinasa C	25
Purificación de las inmunoglobulinas	26
Caracterización de los antisueros	27
1. Microinmunoensayo con el ensayo ELISA	27
2. Efecto del suero sobre la actividad enzimática	29
Obtención y microinyección de oocitos	29
Medición de la actividad hexoquinásica en oocitos	30
1. Actividad hexoquinásica <u>in vitro</u>	30
2. Actividad hexoquinásica <u>in vivo</u>	32

	pág.
Determinación de glicógeno	33
Medición de CO ₂	33
RESULTADOS	35
Purificación de hexoquinasa B	35
1. Preparación del extracto crudo	35
2. Cromatografía en DEAE-celulosa	36
3. Cromatografía en hidroxilapatita	36
4. Cromatografía de pseudo-afinidad en Cibacron Blue-Sepharose	38
5. Recromatografía en DEAE-celulosa	40
6. Filtración en Sephacryl S-200	42
Purificación de hexoquinasa C	42
1. Preparación de extractos crudos	45
2. Cromatografía en DEAE-celulosa	45
3. Cromatografía en hidroxilapatita	47
4. Filtración en Sephacryl S-300	47
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida	50
Purificación de los sueros	50
Caracterización de los antisueros	51
1. Microinmunotitulación	51
2. Efecto de los antisueros sobre la actividad enzimática de hexoquinasas B y C de rana	51
3. Reactividad inmunológica cruzada de hexoquinasas B y C	60

	pág.
Condiciones apropiadas para el funcionamiento de los oocitos	66
1. Influencia de la perturbación mecánica producida por la microinyección	66
2. Efecto del tiempo de preincubación	69
3. Comparación de las formas de administración de la glucosa	71
Actividad hexoquinásica de los oocitos	73
1. Actividad hexoquinásica <u>in vitro</u>	73
2. Actividad hexoquinásica <u>in vivo</u>	74
Reactividad inmunológica de las hexoquinasas de oocito con los sueros anti-hexoquinasas B y C	78
1. Estudios <u>in vitro</u>	78
2. Estudios <u>in vivo</u>	79
Efecto de la microinyección de anticuerpos anti-hexoquinasas B y C sobre la incorporación de glucosa en glicógeno y CO ₂ .	81
DISCUSION	86
Isoenzimas fosforilantes de glucosa en vertebrados	86
Purificación de hexoquinasas B y C de rana	87
Caracterización inmunológica de las hexoquinasas B y C de rana	91
1. Reconocimiento de hexoquinasas B y C por los antisueros respectivos	91
2. Reacción inmunológica cruzada	94
El oocito de rana como modelo experimental	96

	pág.
Actividad hexoquinásica de los oocitos	99
Efecto de los sueros inmunes sobre las vías de utilización de glucosa.	100
Consideraciones finales	103
REFERENCIAS	106
ANEXO 1	117

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Purificación de hexoquinasa B de músculo de rana	44
Tabla 2. Purificación de hexoquinasa C de hígado de rana	49
Tabla 3. Incorporación de [^{14}C] glucosa en glicógeno en oocitos microinyectados con anticuerpos anti-hexoquinasa C	85
Tabla 4. Designación, clase y subclase, título y concentración de 6 anticuerpos monoclonales dirigidos contra hexoquinasa B de músculo de rana	125

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Hexoquinasa B: cromatografía en DEAE-celulosa.	37
Figura 2. Hexoquinasa B: cromatografía en hidroxilapatita.	39
Figura 3. Hexoquinasa B: cromatografía en Cibacron Blue-Sepharose.	41
Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida de hexoquinasa B en distintas etapas de purificación.	43
Figura 5. Hexoquinasa C: cromatografía en DEAE-celulosa.	46
Figura 6. Hexoquinasa C: cromatografía en hidroxilapatita.	48
Figura 7. Titulación del suero anti-hexoquinasa B.	52
Figura 8. Titulación del suero anti-hexoquinasa C.	53
Figura 9. Inhibición de la actividad de hexoquinasa B por suero anti-hexoquinasa B.	55
Figura 10. Inhibición de la actividad de hexoquinasa B por suero anti-hexoquinasa B: efecto de la purificación del suero.	56
Figura 11. Inhibición de la actividad de hexoquinasa B por suero anti-hexoquinasa B en diferentes condiciones de incubación.	58

Figura 12.	Inhibición de la actividad de hexoquinasa B por suero anti-hexoquinasa B: efecto de protectores de la actividad enzimática.	59
Figura 13.	Inhibición de la actividad de hexoquinasa C por suero anti-hexoquinasa C: efecto de protectores de la actividad enzimática.	61
Figura 14.	Inhibición de la actividad de hexoquinasa C por suero anti-hexoquinasa C en diferentes condiciones de incubación.	62
Figura 15.	Especificidad de la inhibición de hexoquinasas B y C por los antisueros respectivos.	64
Figura 16.	Reacción inmunológica cruzada de hexoquinasas B y C.	65
Figura 17.	Incorporación de [^{14}C] glucosa en oocitos: efecto de la perturbación mecánica producida por la microinyección.	68
Figura 18.	Incorporación de [^{14}C] glucosa en oocitos: efecto del tiempo de preincubación a diferentes temperaturas.	70
Figura 19.	Microinyección de [^{14}C] glucosa en oocitos.	72
Figura 20.	Actividad hexoquinásica en extractos de oocitos.	75
Figura 21.	Hexoquinasas de oocitos: cromatografía en DEAE-celulosa.	76

Figura 22.	Actividad hexoquinásica en oocitos: medición <u>in vivo</u> .	77
Figura 23.	Inhibición de la actividad de hexoquinasa C de oocitos por suero anti-hexoquinasa C.	80
Figura 24.	Efecto de la microinyección de anticuerpos anti-hexoquinasas B y C sobre la síntesis de glicógeno y CO_2 .	83
Figura 25.	Efecto de la microinyección de anticuerpos anti-hexoquinasa C sobre la síntesis de glicógeno y CO_2 .	84
Figura 26.	Titulación por ELISA del suero anti-hexoquinasa B de ratón.	119
Figura 27.	Inhibición de la actividad de hexoquinasa B de rana por suero anti-hexoquinasa B de ratón.	120

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	:	Adenosina 5'difosfato
ATP	:	Adenosina 5' trifosfato
BSA	:	Seroalbúmina de bovino
CM-Sephadex	:	Carboximetil-Sephadex
DEAE-celulosa	:	Dietilaminoetil-celulosa
DTT	:	Ditiotreitol
EDTA	:	Acido etilendiaminotetracético
ELISA	:	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
HEPES	:	Acido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IgG	:	Inmunoglobulina G
NADP	:	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NADPH ₂	:	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato-reducido
PMSF	:	Fenilmetil-sulfonilfluoruro
PPO	:	2,5-difeniloxazol
POPOP	:	1,4 bis [2-(5-feniloxazolil)] benceno
SDS	:	Dodecilsulfato de sodio
Sefarosa-azul	:	Cibacron Blue-Sepharose
TEMED	:	N,N,N,N', tetrametiletildiamina

RESUMEN

Para la gran mayoría de las enzimas que catalizan reacciones del metabolismo de los hidratos de carbono existen formas moleculares múltiples, es decir, proteínas diferentes que catalizan la misma reacción en la misma célula u organismo. Estas proteínas, productos de genes diferentes, se conocen como isoenzimas.

La función de las isoenzimas en el metabolismo es desconocida. El problema se ha enfrentado en nuestro laboratorio a través del estudio de las formas múltiples de la hexoquinasa (ATP: D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1.)

En esta tesis se ha abordado el estudio de la función de las hexoquinasas en oocitos de la rana chilena Caudiverbera caudiverbera en el estadio VI de maduración. La aproximación experimental consistió en inhibir selectivamente cada una de las dos hexoquinasas del oocito (isoenzimas B y C) microinyectando en las células antisueros específicos para cada una de ellas. Con este objeto fue necesario disponer de las isoenzimas B y C puras.

Se diseñó un protocolo de purificación para la hexoquinasa B de músculo de rana que combina técnicas convencionales de purificación de proteínas con una cromatografía de pseudo-afinidad en Cibacron Blue-Sepharose. Se logró una purificación de 2900 veces y se obtuvo una enzima con una actividad específica que variaba entre 12 y 18 U/mg de proteína. Cuando la preparación se sometía a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se obtenía una sola banda de proteína.

La purificación de hexoquinasa C resultó más difícil, en parte debido a que no se encontraron las condiciones adecuadas para una etapa de cromatografía de pseudo-afinidad. La enzima pura se obtuvo a partir de hígado de rana mediante técnicas cromatográficas usadas tradicionalmente en nuestro laboratorio seguidas por una electroforesis preparativa en geles de poliacrilamida.

Los sueros anti-hexoquinasas B y C se prepararon en conejo y se caracterizaron por microinmuno-ensayo (ELISA) y por su efecto sobre la inhibición de la actividad de las enzimas que se usaron como antígenos.

El suero anti-hexoquinasa B sólo inactiva a la hexoquinasa B y no tiene efecto sobre la actividad de la isoenzima C. De igual manera, el suero anti-hexoquinasa C sólo inhibe la actividad de hexoquinasa C sin afectar la actividad de la isoenzima B.

La actividad hexoquinásica total del oocito medida en extractos diluidos, corresponde a 700 pmoles de glucosa transformada/min/oocito. En las mismas condiciones, con 2-desoxiglucosa como sustrato, la actividad medida es igual a 120 pmoles de 2-desoxiglucosa 6-P/min/oocito.

La reacción hexoquinásica in vivo se midió microinyectando 2-desoxiglucosa radiactiva en los oocitos. Después de las incubaciones se aisló el producto 2-desoxiglucosa 6-P marcado. La actividad hexoquinásica medida en estas condiciones es de 40-50 pmoles de 2-desoxiglucosa-6-P/min/oocito.

Al cromatografiar un extracto de oocitos en DEAE-celulosa se obtienen 2 picos de actividad enzimática que se han denominado C

y B por analogía con las isoenzimas aisladas de hígado de rana. La fracción mayoritaria (isoenzima C) es inactivada en un 70% cuando se incuba dos horas a temperatura ambiente con suero anti-hexoquinasa C. En las mismas condiciones experimentales, el suero anti-hexoquinasa B no tiene efecto sobre las hexoquinasas del oocito.

Cuando se microinyectó en las células suero anti-hexoquinasa C, preincubándolas dos horas a temperatura ambiente antes de la microinyección de 2-desoxiglucosa marcada, la reacción hexoquinásica se inhibió entre 30 y 40%. La microinyección de suero anti-hexoquinasa B no alteró la actividad hexoquinásica de los oocitos.

Finalmente, se estudió el efecto de la microinyección de los sueros en oocitos sobre la incorporación de glucosa marcada en glicógeno y CO_2 , productos de las dos vías de utilización de glucosa en estas células.

En oocitos microinyectados con suero anti-hexoquinasa C se produjo una inhibición drástica de la incorporación de glucosa radiactiva en glicógeno (70-80%). La incorporación en CO_2 no fue afectada. La microinyección de suero anti-hexoquinasa B, en cambio, no tuvo efecto sobre ninguna de las dos vías.

Los resultados de estos experimentos indican que de las dos formas con actividad hexoquinásica presentes en los oocitos, la fracción mayoritaria es hexoquinasa C. La identidad de la forma minoritaria es un problema no resuelto. Nuestros resultados ponen

en duda que se trate de hexoquinasa B.

Los experimentos de microinyección de antisueros muestran claramente que en oocitos la hexoquinasa C participa solamente en la vía que conduce a la síntesis de glicógeno. Ellos sugieren además que no existe un "pool" único de glucosa-6-fosfato. Como consecuencia de estos hechos se desprende que las dos vías que utilizan glucosa en el oocito están funcionalmente compartimentadas.

ABSTRACT

Multiple molecular forms exist in the great majority of enzymes involved in carbohydrate metabolism; that is, different proteins catalyzing the same reaction in the same cell or organism. These proteins, products of different genes, are known as isozymes.

The role of isozymes in metabolism is unknown. An effort has been made in our laboratory to approach this problem by studying multiple forms of hexokinase (ATP: D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1.).

In the present work the study of the role of hexokinases has been attempted in oocytes from the chilean frog Caudiverbera caudiverbera. The experimental approach attempted to selectively inhibit each of the two oocyte hexokinases (isozymes B and C) by microinjecting the cells with specific antibodies directed against each hexokinase. For this purpose it became necessary to purify isozymes B and C.

A procedure for the purification of hexokinase B from frog muscle was designed. It consists of conventional techniques for protein purification combined with pseudo-affinity chromatography on Cibacron Blue-Sepharose. The final preparation was purified 2900 fold and had a specific activity between 12 and 18 U/mg of protein. When subjected to electrophoresis in SDS polyacrylamide gels a single band of protein was obtained.

Purification of hexokinase C was rather difficult, basically because of the absence of a suitable step of pseudo-affinity chromatography. The pure enzyme was obtained from frog liver applying chromatographic techniques used traditionally in our laboratory, followed by preparative electrophoresis in polyacrylamide gels.

Immune serums directed against hexokinases B and C were prepared in rabbits and were characterized by the ELISA procedure and by its capacity to inhibit the activity of the enzymes used as antigens.

Sera directed against hexokinase B only inactivated hexokinase B and had no effect on the activity of isozyme C. On the other hand, immune serum anti-hexokinase C only inhibited hexokinase C activity without affecting the activity of hexokinase B.

The total hexokinase activity of oocytes measured under in vitro conditions was equal to 700 pmoles of transformed glucose/min/oocyte. Under the same conditions, using 2-deoxyglucose as substrate, the activity was 120 pmoles of 2-deoxyglucose 6-P/min/oocyte.

The hexokinase reaction was measured in vivo by microinjecting the oocytes with radioactively labeled 2-deoxyglucose. After incubation, the product 2-deoxyglucose 6-P was isolated. Hexokinase activity measured under these conditions varied between 40 and 50 pmoles of 2-deoxyglucose 6-P/min/oocyte.

Two peaks of hexokinase activity were found when oocyte extracts were subjected to chromatography in DEAE-celullose. They were identified as hexokinases C and B by analogy with the frog liver hexokinases. The predominant fraction (isozyme C) was inactivated up to 70% when incubated two hours at room temperature with serum directed against hexokinase C. The same serum did not affect the activity of the second fraction (isozyme B). Under identical experimental conditions, a serum directed against hexokinase B had no effect upon oocyte hexokinases.

When oocytes were microinjected with antibodies anti-hexokinase C and preincubated two hours at room temperature before microinjection of labeled 2-deoxyglucose, the hexokinase reaction was inhibited about 30-40%. Microinjection of antibodies directed against hexokinase B did not alter oocyte hexokinase activity at all.

Finally, we studied the effect of immunoglobulins microinjections on the incorporation of labeled glucose into glycogen and CO_2 , the products of the two pathways that utilize glucose in oocytes.

Microinjection of anti-hexokinase C antibodies resulted in a 70-80% decrease of labeled glucose incorporation into glycogen. Microinjection of anti-hexokinase B antibodies, however, had no effect in any of the two pathways.

The results of these experiments show that of the two forms with hexokinase activity present in oocytes, the major one

corresponds to hexokinase C. The identity of the minor form is not clear. Our results cannot confirm that it is hexokinase B.

Experiments dealing with immune serum microinjections clearly demonstrates that in oocytes, hexokinase C is involved in glycogen synthesis only. We conclude also that glucose 6-P does not exist as a unique pool in oocytes. These findings suggests that the two pathways utilizing glucose in oocytes are functionally compartmentalized within the cell.

INTRODUCCION

El problema

La existencia de isoenzimas, vale decir, formas moleculares múltiples de enzimas que catalizan la misma reacción en la misma célula u organismo, fue establecida hace ya varios años (Markert y Moller, 1959). Desde entonces, el estudio de un gran número de sistemas isoenzimáticos ha permitido usarlo como marcadores de los procesos de diferenciación celular, expresión génica, regulación metabólica y evolución molecular. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de información existente acerca de las propiedades de muchos sistemas constituidos por formas moleculares múltiples, su participación en la operación o regulación del metabolismo no es clara. Sólo pocos intentos se han hecho para conocer cuál es la función biológica de las isoenzimas, en otras palabras, para averiguar cuál es su razón de ser en la célula.

La visión convencional del metabolismo pone énfasis en la plasticidad que la presencia de isoenzimas confiere a la función celular. Las diferencias en constantes cinéticas, especificidad de sustrato, respuesta a modificadores alostéricos, localización subcelular, etc., podrían servir para explicar su función fisiológica en términos de tales diferencias. Así por ejemplo, las tres aspartato-quinasas de Escherichia coli son inhibidas, respectivamente, por lisina, metionina y treonina. Las vías metabólicas que conducen a la biosíntesis de esos aminoácidos comienzan con la

fosforilación del aspartato y por lo tanto la existencia de las tres isoenzimas permite a la bacteria mantener la síntesis de cualquiera de esos aminoácidos aún en presencia de los otros (Stadtman et al., 1961).

En el caso de la familia de hexoquinasas en mamíferos, las diferencias en los valores de K_m para glucosa pueden correlacionarse con algunas propiedades de los tejidos en que esas isoenzimas predominan. En el hígado, en que no hay barrera de transporte para glucosa, la concentración intracelular de glucosa sería similar a la glicemia portal y el valor de $K_{0.5}$ para glucosa de la hexoquinasa D es precisamente de la misma magnitud (Niemeyer et al., 1975). Esta isoenzima, por lo tanto, funcionaría con alta eficiencia en situaciones de sobrecarga de glucosa como las que ocurren después de una alimentación rica en glúcidos. Por el contrario, la existencia de una barrera de transporte en el cerebro concuerda con la presencia de la hexoquinasa A de K_m baja ($\sim 60 \mu M$) que estaría funcionando permanentemente a velocidad máxima por estar saturada con el sustrato (Wilson, 1985).

Razonamientos similares pueden aplicarse para muchos otros sistemas isoenzimáticos como los de las fosfofructoquinasas (Vora, 1982), piruvato-quinasas (Seubert y Schoner, 1971) y lactato-deshidrogenasas (Kaplan et al., 1968).

Un modelo susceptible de poner a prueba

Sin embargo, la presencia de isoenzimas en la mayoría si no en todas las etapas del metabolismo y la ausencia de diferen-

cias relevantes en muchas de ellas, junto al problema de la compartimentación, sugirieron a Ureta (1978) una hipótesis que da cuenta tanto de la presencia de isoenzimas, como de la función biológica que ellas tendrían, proposición que se resume en los siguientes términos:

Las vías metabólicas son secuencias de reacciones unidireccionales, catalizadas por isoenzimas específicas asociadas en complejos poli-isoenzimáticos

Tal planteamiento requiere que los intermediarios, los productos, o ambos, en una reacción catalizada por isoenzimas estén compartimentados e implica, además, a diferencia del postulado clásico de vía metabólica, que cada isoenzima participa sólo en una vía. Así, los componentes de cada complejo unidireccional serían isoenzimas de los componentes de otros complejos. Si las fuerzas que estabilizan tales complejos son débiles, al romper la célula sus componentes se disociarían, apareciendo entonces el número de isoenzimas característico del tejido. La expresión "complejo poli-isoenzimático" se ha propuesto con el objeto de diferenciar este tipo de asociación de los complejos multienzimáticos clásicos como el de la piruvato-deshidrogenasa y el de la sintetasa de ácidos grasos, entre otros.

El modelo de los complejos poli-isoenzimáticos ha llamado positivamente la atención de varios investigadores (Masters, 1981; Clegg, 1984a, 1984b; Wilson, 1985).

Pruebas en favor del modelo

Aunque no existen hasta el momento pruebas directas que validen el modelo se han acumulado en la literatura algunos datos que sugieren la presencia de este tipo de complejos. Wolpert y Ernst-Fonberg (1975) aislaron un complejo multienzimático implicado en la fijación de CO_2 en Euglena. La malato-deshidrogenasa que forma parte del complejo resultó ser una de tres isoenzimas de malato-deshidrogenasa presentes en la célula, lo que sugiere que sólo una de las isoenzimas se usa para la formación del complejo. MacGregor y colaboradores (1980) demostraron asociación entre aldolasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa sólo cuando se mezclaban enzimas que habían sido aisladas del hígado. En estos experimentos se calcularon los coeficientes de distribución al equilibrio (K_D) en Ultrogel para mezclas de aldolasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa provenientes de hígado y músculo. Sólo se forma un complejo cuando ambas enzimas provienen de hígado: no se produce disminución de K_D (es decir aumento del peso molecular) cuando a la aldolasa de hígado se agrega fructosa-1,6-bisfosfatasa de músculo ni cuando a la fructosa-1,6-bisfosfatasa de hígado se agrega aldolasa de músculo. Estas observaciones sugieren que las asociaciones entre las enzimas son posibles in vitro sólo cuando se mezclan las isoenzimas apropiadas, es decir, las que son vecinas en un complejo.

Como ya se mencionó anteriormente, el modelo predice la existencia de conjuntos de metabolitos o intermediarios separados

e independientes que no son compartidos por otras vías metabólicas relacionadas. Por lo tanto un corolario esencial de la hipótesis es la existencia de "compartimentación metabólica". El término "compartimiento" se usará en un sentido amplio para indicar que no se mezclan los intermediarios producidos por las diversas isoenzimas.

Actualmente comienza a generalizarse la idea de que la compartimentación metabólica se puede lograr también mediante de complejos multienzimáticos (Srere y Mosbach, 1974; Stebbing, 1980; Wombacher, 1983; Welch, 1987).

Compartimentación en las vías de utilización de glucosa

Una larga historia de controversias ha estado asociada a la búsqueda de un complejo glicolítico y de la existencia de compartimentación de la síntesis de glicógeno, vía de las pentosas y ciclo de Krebs. Nos referiremos especialmente al caso de la vía glicolítica.

La mayor parte de las pruebas en favor de la idea de compartimentación para el metabolismo de la glucosa proviene de experimentos en los cuales se usan sustratos radiactivos y se miden las actividades específicas y distribución de la marca en intermediarios, productos finales o en ambos. Experimentos de este tipo se han realizado en E. coli (Ottaway y Mowbray, 1977), músculo liso (Lynch y Paul, 1983), hígado de rata (Kalant et

al., 1987; Christ y Jungermann, 1987), y oocitos de rana (Ureta y Radojković, 1987). Los resultados se han interpretado como indicativos de la presencia de "pools" independientes de algunos intermediarios glicolíticos. Se usa el término inglés "pool" en ausencia de un término castellano que indique este concepto sin ambigüedades.

Los experimentos de Lynch y Paul (1983) realizados en células intactas en anillos de arteria carótida demuestran en forma convincente que las vías glicolítica y glicogenolítica son funcionalmente independientes. Las unidades de glucosilo provenientes de la degradación del glicógeno no entran al mismo "pool" de intermediarios glicolíticos que se usan en la producción de lactato a partir de glucosa exógena. De estos experimentos los autores concluyen que existen vías separadas para la glicólisis y glicogenolisis, esto es, que el metabolismo hidrocarbonado "citosólico" opera, al menos, en dos compartimientos que funcionan independientemente.

La diferente localización subcelular de los componentes de un sistema isoenzimático constituye otra buena prueba que indica compartimentación metabólica. Estudios en este sentido usando anti-sueros específicos para las distintas isoenzimas de un sistema se han realizado con isoenzimas de lactato-deshidrogenasa y creatina-quinasa. Yamashita et al., (1979), describieron una distribución diferente para las lactato-deshidrogenasas M_4 y H_4 en el hígado de rata. La isoenzima H_4 se encontró cerca de la membrana

celular en tanto que la isoenzima M_4 estaba localizada preferencialmente en zonas ricas en glicógeno. Con respecto a las isoenzimas de creatina-quinasa, Walliman y colaboradores (1983) encontraron, en células derivadas de músculo esquelético de pollo, que sólo la isoenzima MM estaba asociada a la banda M, mientras que la isoenzima BB aparecía en la banda Z.

Por otra parte numerosos autores han postulado que las enzimas de la glicólisis estarían organizadas como complejos por interacciones específicas entre enzimas vecinas en la vía o bien se asociarían entre ellas a través de la interacción con elementos del citoesqueleto o por unión a membranas. La información existente al respecto se encuentra en las revisiones de Ottaway y Mowbray (1977), Masters (1981), Ureta (1985) y Srere (1987).

Otro tipo de pruebas proviene de experimentos en los cuales se puede aislar directamente un complejo glicolítico. Resultados de esta clase han sido comunicados para E. coli (Mowbray y Moses, 1976). En Trypanosoma está muy clara la existencia de glicosomas, partículas semejantes a organelos que contienen siete enzimas glicolíticas además de dos enzimas implicadas en el metabolismo del glicerol (Oppendoes y Borst, 1977).

En resumen, distintas pruebas apuntan a la compartimentación de intermediarios glicolíticos y vías metabólicas, a la existencia de interacciones específicas entre enzimas glicolíticas e interacciones de enzimas glicolíticas con actina y con membranas. Para referencias véase Srere (1987).

Enfoque experimental del problema

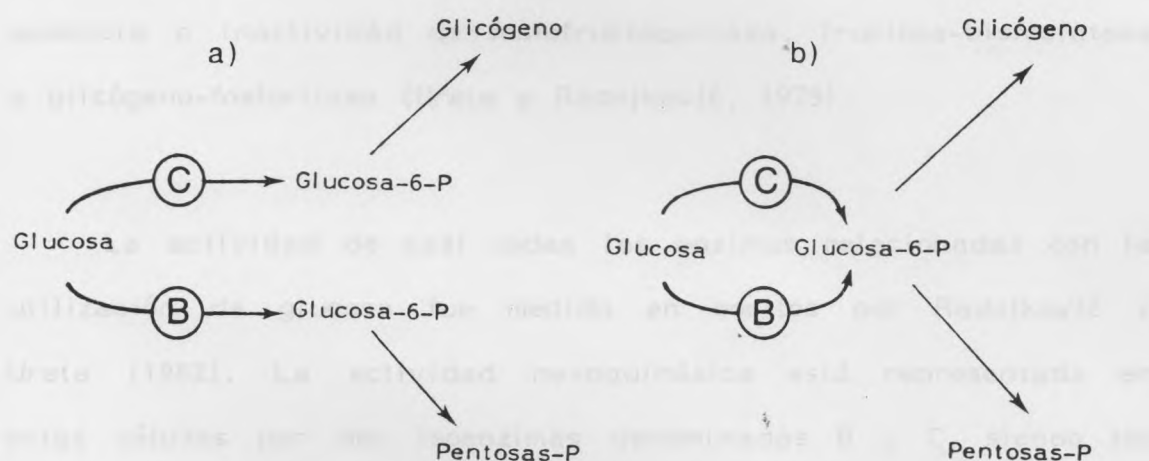
La prueba más directa para el modelo propuesto sería el aislamiento de complejos poli-isoenzimáticos que catalizan vías unidireccionales y la demostración de que las isoenzimas que los componen son específicas para ese complejo. Sin embargo, ésta parece ser una tarea muy difícil de abordar. Por una parte, las asociaciones entre las isoenzimas del complejo pueden ser lábiles y no resistir los métodos drásticos usados para romper la célula. Por otra, la existencia del complejo puede ser de carácter transitorio, dependiendo de la concentración de metabolitos específicos, pH o condiciones celulares aún no conocidas (Ureta, 1985).

Una buena aproximación al problema de la existencia de complejos poli-isoenzimáticos consiste en estudiar la participación específica de isoenzimas en una y sólo una de las vías metabólicas en que la reacción está implicada.

El caso de la utilización de glucosa se presta muy bien para el análisis del problema planteado. Por una parte todas sus etapas son catalizadas por sistemas isoenzimáticos y, por otra, la glucosa es un sustrato del cual divergen varias vías con productos finales diferentes, en las que los flujos de carbonos son fácilmente identificables.

Como el planteamiento central de la hipótesis postulada por Ureta indica que cada isoenzima participa en una sola vía

metabólica, dicho postulado podría probarse por inactivación selectiva de las isoenzimas participantes. Se desprende del esquema siguiente que la inactivación de una isoenzima significa la supresión de una de las vías de utilización de glucosa (a).



Tal supresión no se observaría en un sistema en el cual el producto de la reacción no está compartimentado (b).

Entre los diversos sistemas que pueden usarse para estudiar in vivo los mecanismos de regulación metabólica, los oocitos de anfibio representan un sistema ideal (Ureta y Radojković, 1985). Ellos constituyen una población celular homogénea en la cual cada célula se puede inyectar con los compuestos adecuados, modificando rápida y cuantitativamente los niveles intracelulares de sustratos, intermediarios, cofactores y enzimas. Además, el tamaño de los oocitos de la rana chilena (2,2 mm de diámetro) permite hacer mediciones metabólicas en una sola célula.

Experimentos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que en los oocitos de anfibio la utilización de glucosa está restringida a la síntesis de glicógeno (99%) y a la vía de los fosfatos de pentosas (1%); la glicólisis, glicogenolisis y gluconeogénesis se encuentran en estado no funcional, posiblemente por ausencia o inactividad de fosfofructoquinasa, fructosa-bisfosfatasa y glicógeno-fosforilasa (Ureta y Radojković, 1979).

La actividad de casi todas las enzimas relacionadas con la utilización de glucosa fue medida en oocitos por Radojković y Ureta (1982). La actividad hexoquinásica está representada en estas células por dos isoenzimas denominadas B y C, siendo los niveles de ambas los más bajos de entre las enzimas medidas. Desde luego, la correlación entre la presencia de dos hexoquinasas y dos vías de utilización de glucosa concuerda muy bien con el modelo. Ambas características hacen de ellas un sistema adecuado para estudiar las vías en las cuales participan.

En este trabajo se abordó el problema de la participación de las isoenzimas de hexoquinasa del oocito de rana en las dos vías que utilizan glucosa en dichas células, intentando la inactivación selectiva de las isoenzimas participantes (véase esquema de la pág. 9).

Con este objeto se purificaron las hexoquinasas B y C para inyectarlas posteriormente en conejos y obtener así anticuerpos

específicos para cada isoenzima. Los antisueros se inyectaron en los oocitos y se estudió su efecto sobre la síntesis de glicógeno y CO_2 a partir de glucosa radiactiva.

Los resultados obtenidos indican que en el oocito de rana la hexoquinasa C sólo participa en la vía que sintetiza glicógeno.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos usados

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., E.E.U.U.) se obtuvieron los siguientes reactivos: ATP, NADP, D-glucosa, 2-desoxi-D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, Tris, acrilamida, bis-acrilamida, glicina, fenazina-metosulfato, azul de nitrotetrazolio, monotioglicerol, glicerol, dodecilsulfato de sodio, PMSF, azul de Coomassie R, azul de Coomassie G, Tritón X-100, DTT, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (tipo VII de levadura y tipo XXIII de Leuconostoc mesenteroides), glicógeno, seroalbúmina de bovino, anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina, p-nitrofenilfosfato, protein A-sepharose CL-4B, Sepharose 4B-200, Sephacryl S-200 y S-300, Dowex-1.

De Merck (Darmstadt, Alemania Federal) se obtuvieron: HEPES, EDTA, todas las sales inorgánicas, hidróxido de sodio y de potasio, ácidos clorhídrico, acético, ortofosfórico, perclórico, fórmico y ácido 5,5'-dietilbarbitúrico, metanol y azul de bromofenol.

De Polysciences (Washington, E.E.U.U.) provenían TEMED y persulfato de amonio.

De Amersham (Searle Illinois, E.E.U.U.) se obtuvieron PPO y POPOP.

De Amersham Laboratories (Buckinghamshire, Inglaterra) se obtuvieron D-[^{14}C] glucosa y D-[^{14}C] 2-desoxiglucosa.

Hidroxilapatita Bio-Gel HTP se obtuvo de Bio-Rad (Richmond, California, E.E.U.U.).

Celulosa CF1 provenía de Whatman Biochemicals (E.E.U.U.).

DEAE-celulosa microgranular provenía de Whatman (Maidstone, Inglaterra).

CM-Sephadex se adquirió de Pharmacia (Uppsala, Suecia).

Coadyuvante de Freund completo e incompleto se obtuvo de Difco Laboratories (Detroit, Michigan, E.E.U.U.)

Cibacron Blue F3GA provenía de Ciba-Geigy (Greensboro, NC. E.E.U.U.).

Tween-20 se adquirió en Droguería Michelson (Santiago, Chile).

Etanol y tolueno se obtuvieron de Sudelab Ltda. (Santiago, Chile).

Animales de experimentación

Ejemplares de rana chilena (Caudiverbera caudiverbera) se adquirieron a un proveedor de la zona de Melipilla y se mantuvieron en el laboratorio en un estanque de agua dulce; se alimentaban con renacuajos vivos de la misma especie o bien con hígado de vacuno. De ranas hembras se obtenían oocitos para el estudio del metabolismo de la glucosa in vivo. Se usaba músculo e hígado de rana como material de partida para la purificación de las hexoquinasas B y C respectivamente.

Los antisueros anti-hexoquinasas B o C se obtuvieron en conejos albinos hembras de 6 meses de edad de raza Nueva Zelanda adquiridos en el Instituto Bacteriológico.

Composición de algunas soluciones de uso frecuente

1. Solución A:

fosfato de potasio 20 mM (pH 7,5), glucosa 50 mM, EDTA 1 mM, monotioglicerol 10 mM y glicerol 5%.

2. Solución B:

fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5), glucosa 10 mM, monotioglicerol 10 mM y glicerol 5%.

3. Solución C:

Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), glucosa 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 20 mM, monotioglicerol 10 mM y glicerol 10%.

4. Solución D:

Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), glucosa 10 mM, EDTA 1 mM, monotioglicerol 10 mM y glicerol 10%.

5. PBS:

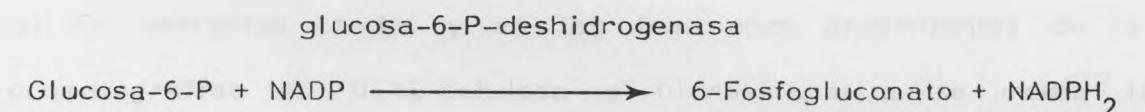
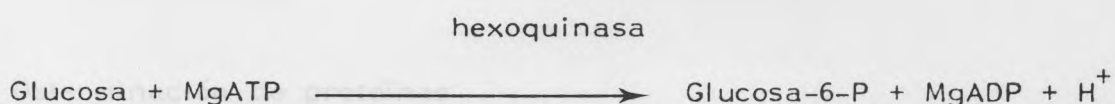
NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, amortiguador fosfato 8 mM, pH 7,5).

6. Solución Barth modificada:

NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO_3 2,4 mM, MgSO_4 0,82 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,33 mM, CaCl_2 0,41 mM en amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7,6.

Medición espectrofotométrica de la actividad hexoquinásica.

La actividad fosforilante de glucosa se determinaba midiendo el cambio de absorbancia que se produce a 340 nm al acoplar la reacción de fosforilación de glucosa con la reacción de deshidrogenación del glucosa-6-P (Slein et al., 1950), de acuerdo con el siguiente esquema de reacciones:



La velocidad de formación de NADPH_2 se registraba en un espectrofotómetro Zeiss modelo PM QII a 30°. El medio de reacción tenía en un volumen final de 0,5 ml la siguiente composición (concentraciones finales): Tris-HCl 80 mM (pH 7,5), KCl 100 mM, MgCl_2 12,6 mM, ATP 5 mM, glucosa 0,5mM, EDTA 1,6 mM, NADP 0,5 mM y 0,5 U/ml de glucosa-6-P-deshidrogenasa. La reacción se iniciaba agregando la preparación enzimática. Un sistema sin ATP o sin glucosa se utilizaba como blanco. La unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la fosforilación de 1 μmol de glucosa en 1 min a 30° en las condiciones descritas.

Con el objeto de identificar la banda de proteína que correspondía a la hexoquinasa se usaba una reacción de tinción de actividad hexoquinásica en los geles de poliacrilamida (Katzen et al., 1965). Para ello se sumergía el gel en una mezcla que tenía la misma composición de la mezcla que se usaba en el método espectrofotométrico a la cual se agregaba fenazina-metosulfato 0,04 mg/ml y azul de nitrotetrazolio 0,96 mg/ml. El control se hacía sumergiendo el gel en mezcla sin ATP.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinaba mediante dos procedimientos:

- a) En extractos crudos y en las fracciones provenientes de las cromatografías en DEAE-celulosa e hidroxilapatita se medía la absorbancia a 280 nm. Con el objeto de calcular la concentración de proteínas se aceptó que una solución que contiene 1 mg de proteína/ml tiene una absorbancia igual a 1.
- b) En fracciones purificadas se utilizaba el método de Bradford (1976). Se usaba BSA como proteína patrón.

Estos métodos se usaron también para medir la concentración de proteínas de los sueros de conejo.

Determinación de la concentración de sales

La conductividad de las fracciones que contenían fosfato y KCl, eluidas de las diferentes columnas usadas en la purificación

de las hexoquinasas, se determinaba usando un conductímetro Radiometer modelo CDM2f. De igual manera se controlaba la conductividad de todas las soluciones que se usaban en los procedimientos de purificación. Mediante una curva de calibración se podían calcular las concentraciones de fosfato y KCl.

Preparación y regeneración de los materiales cromatográficos

1. DEAE-celulosa

Se preparó y regeneró según el método descrito por los fabricantes.

2. Hidroxilapatita

Se mezclaba hidroxilapatita Biogel HTP y celulosa Whatman CF1 en partes iguales (g/g). La mezcla se suspendía en agua y se dejaba decantar para remover el material fino. Esta operación se repetía varias veces. Posteriormente se resuspendía la mezcla en el amortiguador adecuado. Después de ser usada, la hidroxilapatita se regeneraba lavándola con solución de fosfato de potasio 0,4 M y posteriormente con agua.

3. Cibacron Blue-Sepharose

La preparación de este material se hizo por una modificación del método de Rindernecht y col. (1967) de acuerdo a comunicación personal del Dr. Jorge Babul. A 500 ml de suspensión de Sepharose 4B-200 Sigma se agregaban 12,5 g de Cibacron Blue F3GA Ciba

disueltos en agua a 50° y se completaba el volumen a 1250 ml. Se añadían 250 g de Na_2SO_4 en varias porciones durante 45 min manteniendo la temperatura a 50° y con agitación constante. Después se agregaban 12,5 g de Na_3PO_4 y se continuaba la agitación durante 75 min. El gel se lavaba con agua y con etanol al 5% hasta que el líquido de lavado fuera incoloro. Después de ser usada, la sefarosa-azul se regeneraba por lavados sucesivos con KCl 2 M, KCl 2 M-urea 6 M y finalmente agua. Este proceso de regeneración se reemplazó posteriormente por lavado con NaOH 20 mM.

4. Sephacryl S-200 y S-300

El gel se hidrataba en agua y luego se equilibraba en amortiguador C. Después de usar se lavaba exhaustivamente con el amortiguador que contenía KCl 100 mM.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó en ausencia y en presencia de SDS.

a) Cuando la electroforesis se hacía en ausencia de SDS se preparaban geles cilíndricos de acuerdo al método de Grossman y Potter (1974). El gel separador contenía en este caso acrilamida 7%. Esta receta es especialmente apropiada para la tinción de actividad hexoquinásica porque las soluciones contienen glucosa y la polimerización se realiza con riboflavina en vez de persulfato de amonio.

b) La electroforesis en presencia de SDS se realizó según la metodología de Laemmli (1970). Los geles se preparaban en placas con un gradiente de acrilamida entre 6 y 10%. Las bandas de proteína se detectaban con azul de Coomassie.

Purificación de la hexoquinasa B

La hexoquinasa B se purificó a partir de músculo de rana. Las etapas que se describirán a continuación corresponden a un protocolo de purificación al cual se llegó después de varios experimentos en los cuales se probaron diversas condiciones. A menos que se especifique otra condición, todas las etapas del proceso se realizaron a 4°.

1. Preparación de extractos crudos

Alrededor de 300 a 400 g de músculo de rana se desmenuzaban con tijeras y luego se homogeneizaban al 50% (p/v) en una juguera Oster a velocidad máxima durante 4 min. La solución de homogeneización (solución A) contenía: fosfato de potasio 20 mM (pH 7,5), glucosa 50 mM, EDTA 1 mM, monotioglicerol 10 mM y glicerol 5%. La suspensión obtenida se centrifugaba a 8000 x g durante 1 h en una centrífuga Sorvall Modelo RC-2B y el líquido sobrenadante resultante se filtraba a través de lana de vidrio. El precipitado que quedaba de la centrifugación se lavaba con solución A que contenía Tritón X-100 0,1% en una relación de volumen 1:1 y se volvía a centrifugar a 8000 rpm durante 15

min. Se filtraba el líquido sobrenadante y se juntaba con el anterior.

2. Cromatografía en DEAE-celulosa

El líquido sobrenadante obtenido en la etapa previa se hacía pasar por una columna de DEAE-celulosa equilibrada con solución A. Las dimensiones de la columna (5,5 x 7 cm) permitían una gran superficie de contacto entre la celulosa y el líquido que se pasaba y un flujo rápido. Después de la aplicación de la enzima, la columna se lavaba con un volumen de amortiguador A, que contenía KCl 50 mM, igual a 5 veces el volumen de la columna. Finalmente se eluía la enzima con 300 ml de amortiguador que contenía KCl 0,3 M. Se colectaban fracciones de 15 ml.

3. Cromatografía en hidroxilapatita

La fracción con actividad enzimática proveniente de la etapa anterior se concentraba por ultrafiltración en un aparato Amicon con membrana PM 10. A continuación se dializaba en solución B que tenía la siguiente composición: fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5), glucosa 10 mM, monotioglicerol 10 mM y glicerol 5%. La fracción dializada se aplicaba a una columna de hidroxilapatita de 1,8 x 18,5 cm equilibrada en amortiguador B. La columna se lavaba con 200 ml de amortiguador y la actividad hexoquinásica se eluía con fosfato de potasio en un gradiente lineal desde 50 a 200 mM, en solución B. El volumen total era de

680 ml y las fracciones colectadas eran de 5,8 ml.

4. Cromatografía en Cibacron Blue-Sepharose

La enzima que se obtenía de la etapa de cromatografía en hidroxilapatita se concentraba por ultrafiltración y se dializaba en solución C. Esta solución contenía: Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), glucosa 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 20 mM, monotioglicerol 10 mM y glicerol 10%. La sefarosa se empacaba en una columna de 1 x 3 cm y se equilibraba con amortiguador C. Se hacía pasar la enzima y luego la columna se lavaba con 20 ml de solución C que contenía KCl 90 mM. La actividad enzimática se eluía con amortiguador C que contenía ATP 5 mM.

5. Recromatografía en DEAE-celulosa

La enzima proveniente de la cromatografía en sefarosa-azul se recromatografiaba y concentraba en una mini-columna de DEAE-celulosa de 1 o 2 ml. Las condiciones de esta cromatografía eran similares a las descritas en la etapa 2, excepto que la enzima se eluía con KCl en un gradiente lineal de 0 a 0,5 M cuyo volumen total era de 16 ml. Las fracciones colectadas tenían un volumen de 0,2 ml.

6. Filtración en Sephacryl S-200

El conjunto de fracciones con actividad hexoquinásica obtenido en la etapa anterior se aplicaba a una columna de Sephacryl

S-200 cuyas dimensiones eran de 1,5 x 52 cm. Se usaba amortiguador C que contenía glucosa 10 mM y KCl 100 mM para equilibrar el Sephacryl y para eluir la enzima. Se colectaban fracciones de 0,5 ml.

Purificación de la Hexoquinasa C

La hexoquinasa C se purificaba a partir de hígado de rana. Todas las etapas del proceso de purificación, a menos que se especifique otra condición, se hicieron a 4°. Las etapas del procedimiento completo se describen a continuación.

1. Preparación de extractos crudos

Aproximadamente 60 a 80 g de hígado de rana se desmenuzaban con tijeras y después se homogeneizaban al 50% en solución D en un homogeneizador Omni Mixer Sorvall a velocidad máxima durante 2 min. La solución amortiguadora D contenía: Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), glucosa 10 mM, EDTA 1 mM, monotioglicerol 10 mM y glicerol 5%. El tejido homogeneizado se centrifugaba a 28.000 x g durante 1 h en una centrífuga Spinco modelo L. El líquido sobrenadante se filtraba a través de lana de vidrio. Posteriormente se pasaba por una columna de CM-Sephadex de 5,5 x 7 cm equilibrado en solución D. La enzima no era retenida en las condiciones utilizadas.

2. Cromatografía en DEAE-celulosa

Se empacaba una columna de 2,5 x 14 cm con DEAE-celulosa equilibrada en amortiguador D. Por esta columna se pasaba el líquido sobrenadante filtrado en CM-Sephadex. Después de lavar con 500 ml de amortiguador la enzima se eluía con KCl en un gradiente lineal de 0 a 0,5 M en solución D. El volumen total del gradiente era de 1600 ml y se colectaban fracciones de 10 ml.

3. Cromatografía en hidroxilapatita

Las fracciones con actividad hexoquinásica provenientes de la etapa anterior se juntaban y el conjunto se concentraba por ultrafiltración. Posteriormente se hacía una diálisis en solución B modificada, que tenía amortiguador fosfato 5 mM. La muestra dializada se pasaba por una columna (1 x 18 cm) de hidroxilapatita equilibrada en el amortiguador modificado. La columna se lavaba con 100 ml de la misma solución y la enzima se eluía con fosfato en un gradiente lineal de 5 a 100 mM preparado en el amortiguador modificado. El gradiente tenía un volumen de 340 ml y las fracciones colectadas eran de 3 ml.

4. Filtración en Sephacryl S-300

La enzima obtenida de la cromatografía en hidroxilapatita se concentraba por ultrafiltración y se dializaba contra solución C. La enzima concentrada y dializada se pasaba por una columna

de Sephacryl cuyas dimensiones eran de 75 x 2,5 cm. El gel se equilibraba en amortiguador C con KCl 100 mM y la enzima se eluía con la misma solución. Se colectaban fracciones de 2 ml.

5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se preparaban placas de poliacrilamida al 7%, las cuales se cargaban con muestra de enzima proveniente de la cromatografía en Sephacryl. Se siguió esencialmente el procedimiento usado por Toro (1982). La banda correspondiente a hexoquinasa C se identificaba tiñendo el gel con el método específico para actividad enzimática que se describió anteriormente. Una vez identificada la banda, ésta se cortaba, se lavaba en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,5 y se guardaba durante la noche a 4° en la misma solución a la cual se había agregado glucosa 10 mM, DTT 1 mM y glicerol 5%. Al día siguiente los trozos de gel se molían en un mortero, se agregaba coadyuvante de Freund y se preparaba la emulsión que se inyectaría al conejo para la producción de anticuerpos.

Con el objeto de controlar la pureza de la enzima inyectada, un pequeño trozo de la banda cortada del gel se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, encontrándose una sola banda de proteína después de teñir con el colorante. Junto con esto se detectó actividad enzimática en la solución amortiguadora en que se guardaban los trozos cortados del gel nativo. Por otra parte se detectó inmunológicamente la presencia de la enzima mediante el ensayo ELISA.

Preparación de sueros inmunes anti-hexoquinasas B y C

1. Suero anti-hexoquinasa B.

Se utilizó un conejo hembra albino al cual se inyectó una emulsión con volúmenes iguales de hexoquinasa B pura y coadyuvante de Freund completo en la primera inyección e incompleto en las siguientes. Todas las inyecciones fueron por vía subcutánea en el dorso y muslos. El protocolo de inmunización fue el siguiente: Primera inyección, aproximadamente 0,2 mg de enzima.

Segunda inyección, se realizó 4 meses después con la misma cantidad de proteína.

Tercera inyección, en el octavo mes se inyectaron alrededor de 0,3 mg de la enzima.

Cuarta inyección, 50 μ g de enzima 11 meses después de la primera inyección.

En cada ocasión se controló la capacidad del suero para inhibir la actividad de hexoquinasa B y se midió el título del suero por ELISA. A los 12 días de la última inyección se sangró el conejo por punción cardíaca. La sangre extraída se dejó durante la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se separó el suero del coágulo por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min. El suero así obtenido se fraccionó en alícuotas de 1 ml y se guardó congelado a -40° .

2. Suero anti-hexoquinasa C.

Se usó un conejo hembra albino para la inmunización. La obtención de la enzima se describió anteriormente en Purificación

de hexoquinasa C (pág. 22). Se hicieron 3 inyecciones por vía subcutánea de hexoquinasa C de aproximadamente 0,1 mg cada una, con intervalos de 30 días. La formación de anticuerpos se controló durante este tiempo igual que para el caso del conejo inmunizado con hexoquinasa B. Después de 11 días de la última inyección se sangró el conejo por punción cardíaca y se obtuvo el suero como se describió anteriormente.

Los intervalos entre las inyecciones solo corresponden a razones de conveniencia. No se hicieron estudios especiales para optimizar estos protocolos.

Como el rendimiento obtenido al purificar las hexoquinasas B y C era bajo, nos pareció difícil en un comienzo obtener las cantidades de enzima requeridas para la preparación de sueros inmunes convencionales. Por esta razón se prepararon anticuerpos monoclonales. Sin embargo, dado que no se obtuvieron monoclonales inhibidores de la actividad enzimática, no fueron utilizados en este trabajo. La obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales se describirá en el Anexo 1.

Purificación de las inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas de tipo G se separaron del resto de las proteínas séricas mediante cromatografía en Protein A-Sepharose CL-4B (comunicación personal Dr. A. de Ioannes). Las columnas contenían 1,5 ml de sefarosa equilibrada con amortigua-

por fosfato de sodio 50 mM a pH 8,0. Por las columnas se pasaba 1 ml de suero inmune o de suero control y después de lavar con la solución de equilibrio se eluían las IgG con ácido acético 0,1 N-NaCl 0,15 M. Se colectaban fracciones de 0,6 ml. Los tubos en los cuales se recogía el eluido contenían 0,1 ml de Tris 1 M pH 7,0 con el objeto de neutralizar el medio ácido. Se medía la absorbancia de las distintas fracciones a 280 nm y se juntaban aquellas cuya absorbancia alcanzaba valores iguales o superiores a 0,5. Las inmunoglobulinas purificadas se dializaban en solución Barth modificada (Gurdon, 1976) a la que en adelante llamaremos solución Barth. Luego, las IgG se concentraban en unidades Centricon 30 hasta el volumen original del suero crudo y luego por evaporación bajo corriente de nitrógeno gaseoso para los experimentos de microinyección.

Caracterización de los antisueros

1. Microinmunoensayo con el ensayo ELISA.

Se usó la técnica ELISA que consiste en adsorber el antígeno a la superficie de los pocillos de una placa de plástico; posteriormente se agrega el antisuero y se cuantifican los anticuerpos unidos específicamente al antígeno por adición de anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. La enzima unida se detecta por adición del sustrato p-nitrofenilfosfato y medición espectrofotométrica del p-nitrofenol liberado. Como controles en

todos los experimentos se usaron sueros pre-inmune como primer anticuerpo y seroalbúmina de bovino como antígeno. Se siguió básicamente la técnica descrita por Engvall y Perlmann (1972). Se cebaban placas con una solución que contenía 10 $\mu\text{g/ml}$ de hexoquinasa en PBS (NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, amortiguador fosfato 8 mM, pH 7,5) colocando 50 μl de la solución de antígeno por pocillo e incubando las placas a temperatura ambiente durante toda la noche. Después de recuperar el antígeno se agregaban a cada pocillo 0,1 ml de una solución que contenía BSA 1%-azida 0,02% en PBS y se incubaba 1 h a temperatura ambiente con el objeto de bloquear sitios remanentes para proteína en el plástico. Posteriormente se lavaba 3 veces con Tween-20 0,1% en PBS. A la placa así tratada se agregaban diluciones seriadas de suero en PBS-BSA-azida, siendo el volumen final de 50 μl . Después de incubar 2 h a temperatura ambiente se repetía el lavado con Tween-20 y se agregaban a cada pocillo 25 μl de anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (diluido 1:1000 en PBS-BSA-azida). Se incubaba la placa 3 h en una estufa a 37° y se lavaba nuevamente. La actividad de la fosfatasa alcalina se medía agregando 50 μl del sustrato p-nitrofenilfosfato (1 mg/ml en amortiguador carbonato 0,05 M con MgCl_2 1 mM, pH 9,6). Se incubaba durante 30 min a temperatura ambiente y la reacción enzimática se detenía agregando 50 μl de NaOH 3 M. El contenido de cada pocillo se diluía con 0,15 ml de agua destilada y el p-nitrofenol formado se cuantificaba midiendo la absorbancia a 405 nm.

2. Efecto del suero sobre la actividad enzimática.

Se incubaba una cantidad constante de la enzima correspondiente con cantidades variables de suero inmune o suero control. Las diluciones se hacían en PBS-BSA. La concentración de BSA era de 2 g o 0,15 g por 100 ml de solución, según se usara el suero completo o IgG purificadas, respectivamente. La incubación se realizaba 30 min a 30° y se prolongaba durante la noche a 4° o durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaba durante 10 min en una microcentrífuga Gelman-Hawksley y se medía la actividad enzimática remanente en el líquido sobrenadante. Los sueros no presentaban actividad hexoquinásica.

Obtención y microinyección de oocitos.

Se usaban oocitos de C. caudiverbera en el estadio VI de maduración de acuerdo con el criterio de clasificación de Dumont (1972). El ovario recién extraído de la rana se colocaba en solución salina de Barth que tiene la siguiente composición: NaCl 88 mM, KCl 1 mM, NaHCO_3 2,4 mM, MgSO_4 0,82 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,33 mM, CaCl_2 0,41 mM en amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7,6. Los oocitos individuales se aislaban manualmente utilizando pinzas finas. Posteriormente se microinyectaban usando micropipetas de vidrio de alrededor de 50 nl de volumen, siguiendo esencialmente el procedimiento descrito por Gurdon (1974). Las microinyecciones se hacían bajo una lupa y siempre en la zona ecuatorial de la

célula. Mediante un micromanipulador se sujetaba la micropipeta y se controlaban sus movimientos. Cuando se microinyectaban compuestos radioactivos como [^{14}C]-glucosa, [^{14}C]-2-desoxiglucosa u otros, éstos se concentraban previamente a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se disolvían después en solución Barth hasta alcanzar la concentración deseada. En los experimentos de microinyección siempre se usaban anticuerpos purificados, los que se dializaban en solución Barth y se concentraban en unidades Centricon 30.

Medición de la actividad hexoquinásica en oocitos.

La actividad hexoquinásica de los oocitos se medía in vivo en oocitos intactos y además in vitro, utilizando en ambos casos un radioensayo descrito por Radojković y colaboradores (1978). En algunas ocasiones se usaba el método espectrofotométrico en condiciones in vitro, que ya fue descrito anteriormente.

1. Actividad hexoquinásica in vitro.

Se preparaban homogeneizados de oocitos al 33,3% (v/v) en amortiguador Hepes 100 mM pH 8,4 que contenía además DTT 2 mM. El homogeneizado se centrifugaba durante 1 h a 30.000 x g en una centrífuga Spinco modelo L. Se descartaba el precipitado y al líquido sobrenadante se agregaban cristales de bicarbonato de potasio hasta alcanzar valores de pH entre 7,2 y 7,4. Se preparaba una mezcla de reacción que tenía los siguientes compo-

nentes (concentraciones finales): Hepes 75 mM, ATP-Mg 4,5 mM, [^{14}C]-2 desoxiglucosa 1 mM y un volumen del líquido sobrenadante que permitía alcanzar una dilución de 26 veces. Esta mezcla se incubaba a temperatura ambiente y a ciertos intervalos de tiempo se sacaban alícuotas de 0,25 ml que se recibían en tubos Eppendorf con HCOOH 0,1 N en frío con el objeto de detener la reacción enzimática. Después de centrifugar la mezcla de reacción durante 5 min los líquidos sobrenadantes se filtraban en columnas de Dowex-1 formiato. Las columnas se lavaban con 7 ml de HCOOH 0,1 N y después se eluía el éster fosfórico con 2,5 ml de formiato de amonio 0,4 N pH 5,3. Se tomaban alícuotas de 0,5 ml, tanto del lavado como del eluido, a las cuales se agregaban 5 ml de líquido de centelleo constituido por una mezcla de PPO (4g/l) - POPOP (50 mg/l) en tolueno y Triton X-100 (2:1 v/v). La radiactividad de las muestras se contaba en un espectrómetro de centelleo líquido Philips. Todas las determinaciones se hacían por duplicado y como blanco se preparaban mezclas que no contenían ATP.

También se medía actividad hexoquinásica en preparaciones semipurificadas obtenidas por cromatografía en DEAE-celulosa. El líquido sobrenadante obtenido como se describió anteriormente se dializaba durante 1 h en solución C y posteriormente se aplicaba a una mini-columna de 2 ml de volumen que se empacaba con DEAE-celulosa equilibrada en solución amortiguadora C que no contenía KCl. La columna se lavaba con 10 ml del amortiguador C

y la actividad enzimática se eluía con un gradiente lineal de KCl de 0 a 0,35 M preparado en el mismo amortiguador. El gradiente tenía un volumen total de 34 ml y se colectaban fracciones de 0,2 ml. La actividad hexoquinásica de las distintas fracciones se determinaba por el método espectrofotométrico ya descrito.

2. Actividad hexoquinásica in vivo.

Se inyectaban oocitos con aproximadamente 50 nl de [^{14}C]-2-desoxiglucosa. Como controles se usaban oocitos sin inyectar o microinyectados con solución Barth. Después de la inyección se incubaban grupos de 4 oocitos durante tiempos variables en tubos que contenían 75 μl de solución Barth bajo una atmósfera de 100% O_2 a temperatura ambiente con agitación continua. Una vez completado el tiempo de incubación deseado, cada grupo de 4 células se trasladaba a tubos Eppendorf que contenían ácido perclórico. Después de homogeneizar se obtenía un extracto perclórico al 3%. El extracto obtenido se centrifugaba durante 5 min, se guardaba el líquido sobrenadante y el precipitado se lavaba una vez con ácido perclórico 3%. Los líquidos sobrenadantes se juntaban, se neutralizaban con KOH 1 N y se dejaban precipitar las proteínas y el perclorato durante la noche. Posteriormente se centrifugaba 5 min para descartar el precipitado y los líquidos sobrenadantes se filtraban en columnas que contenían 1 ml de Dowex-1 formiato, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Determinación de glicógeno

La incorporación de [^{14}C]-glucosa en glicógeno en oocitos en diferentes situaciones experimentales se medía como sigue. Después de microinyectar [^{14}C]-glucosa, precursor en la síntesis de glicógeno, grupos de 4 oocitos se incubaban en la forma previamente descrita. Terminado el período de incubación, cada oocito era separado y colocado individualmente en un tubo de ensayo y sometido a digestión con 0,5 ml de KOH al 30% durante 30 min a 100°. Posteriormente se agregaba a cada tubo 0,1 ml de sulfato de sodio 2%, 40 μ l de una solución de glicógeno (~50 mg en 8 ml de H_2O) y 2,1 ml de etanol 75% y se dejaba precipitar durante la noche. Al día siguiente los tubos se centrifugaban durante 10 min en una centrífuga clínica a velocidad máxima. Se descartaba el líquido sobrenadante y se dejaba secar el precipitado. Este se resuspendía en 2 ml de agua tibia y se agregaban 6 ml de etanol para precipitar el glicógeno. Los precipitados se colectaban en filtros de fibra de vidrio, se lavaban con etanol 75% y luego se secaban bajo una lámpara de luz infraroja. Los filtros secos se colocaban en frascos de vidrio que contenían 5 ml de líquido de centelleo y se medía su radiactividad.

Medición de CO_2

Los tubos en los cuales se incubaba cada grupo de oocitos poseían un sistema de desprendimiento que conectaba los tubos de

incubación con viales de centelleo que contenían 0,6 ml de NaOH 0,3 N y Tritón X-100 0,01% lo que permitía colectar el CO_2 radiactivo a medida que éste se iba liberando de los oocitos (Brendel y Meezan, 1974). La radiactividad presente en el CO_2 se medía igual que en los casos anteriores en un espectrómetro de centelleo líquido.

RESULTADOS

Purificación de hexoquinasa B

El protocolo de purificación de hexoquinasa B de músculo de rana ha sido el resultado de numerosos ensayos en los cuales se variaban una serie de condiciones. La enzima se encuentra en pequeña cantidad en el tejido y es bastante inestable, razón por la cual hubo que diseñar un procedimiento de purificación que fuera rápido y encontrar además condiciones en las cuales la actividad enzimática fuera estable. Se probaron varias técnicas cromatográficas en diferente orden, en las cuales se variaba el pH, la fuerza iónica y el tamaño de las columnas. Se estudió la estabilidad de la enzima durante el proceso de purificación en presencia y ausencia de algunos protectores como glucosa, DTT, monotioglicerol y glicerol. Se estudió también el efecto del inhibidor de proteasas PMSF. Los resultados que se mostrarán a continuación corresponden a un protocolo de purificación para hexoquinasa B que se ha repetido varias veces, obteniéndose esencialmente el mismo resultado.

1. Preparación del extracto crudo

Normalmente se procesaban alrededor de 300 g de músculo de rana. La actividad hexoquinásica presente en el citosol (obtenido después de homogeneizar el músculo y centrifugar) era aproximadamente 12 unidades. Después de lavar el precipitado con Tritón

X-100 al 0,1% y volver a centrifugar se obtenía una actividad equivalente a 6 unidades de enzima. En general se obtenían como promedio 0,07 unidades de enzima/g de tejido. El líquido sobrenadante total (conjunto de las fracciones con y sin Tritón) contenía de 10 a 12 mg de proteína/ml y tenía una actividad específica de 0,004 unidades/mg de proteína.

2. Cromatografía en DEAE-celulosa

Un solo pico de actividad hexoquinásica se encuentra cuando se cromatografía en DEAE-celulosa el líquido sobrenadante proveniente de la centrifugación de un extracto crudo de músculo de rana. Esta actividad corresponde a la isoenzima B, que es la hexoquinasa típica del músculo (Fig. 1). En el protocolo de purificación se modificó la cromatografía eliminando el gradiente de KCl y eluyendo la enzima con KCl 0,3 M. Asimismo se utilizó una columna de vidrio que era muy ancha y de flujo rápido. Se eligió este procedimiento puesto que, dada la inestabilidad de la enzima, las dos primeras etapas del proceso de purificación deben ser rápidas y efectuarse en un mismo día. La concentración de proteínas disminuye 5 veces, lo cual produce un aumento de 5 veces en la actividad específica. La recuperación era aproximadamente 50%.

3. Cromatografía en hidroxilapatita

Con esta etapa se logra siempre una muy buena purificación de la enzima. Toda la actividad hexoquinásica es retenida en

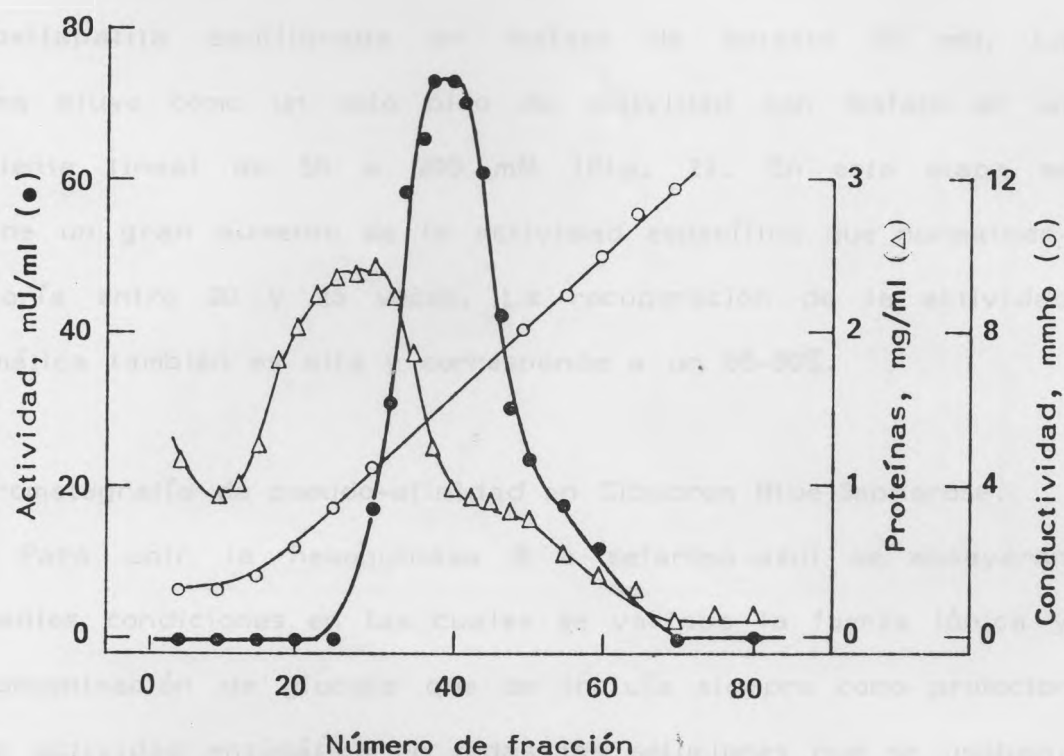


Figura 1. Hexoquinasa B: cromatografía en DEAE-celulosa. 242 ml de citosol que contenían 9 unidades de hexoquinasa B se colocaron en una columna (1,8 cm x 18,5) de DEAE-celulosa equilibrada con solución A. Se lavó con 250 ml de la misma solución A y las proteínas se eluyeron con KCl en un gradiente lineal de 0 a 0,5 M en solución A. Se colectaron fracciones de 5 ml. La actividad enzimática se midió espectrofotométricamente con glucosa 0,5 mM como se describió en Materiales y Métodos.

hidroxilapatita equilibrada en fosfato de potasio 50 mM. La enzima eluye como un solo pico de actividad con fosfato en un gradiente lineal de 50 a 200 mM (Fig. 2). En esta etapa se obtiene un gran aumento de la actividad específica que normalmente varía entre 20 y 25 veces. La recuperación de la actividad enzimática también es alta y corresponde a un 85-90%.

4. Cromatografía de pseudo-afinidad en Cibacron Blue-Sepharose.

Para unir la hexoquinasa B a sefarosa-azul se ensayaron diferentes condiciones en las cuales se variaba la fuerza iónica y la concentración de glucosa que se incluía siempre como protector de la actividad enzimática en todas las soluciones que se usaban. Así se logró determinar que la enzima se une a la sefarosa en presencia de KCl 20 mM y glucosa 1 mM, en amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7,5. No hay unión cuando se aumenta la concentración de glucosa ni cuando se reemplaza el Tris por fosfato. La capacidad máxima de unión es aproximadamente 1 unidad de enzima/ml de suspensión de sefarosa-azul.

Se probaron también distintas condiciones para lavar la columna y para eluir la hexoquinasa por afinidad con un ligando específico. La columna cargada con la enzima se sometió a lavados sucesivos con Tris en los cuales se iba aumentando en forma paulatina la concentración de KCl. La enzima comienza a

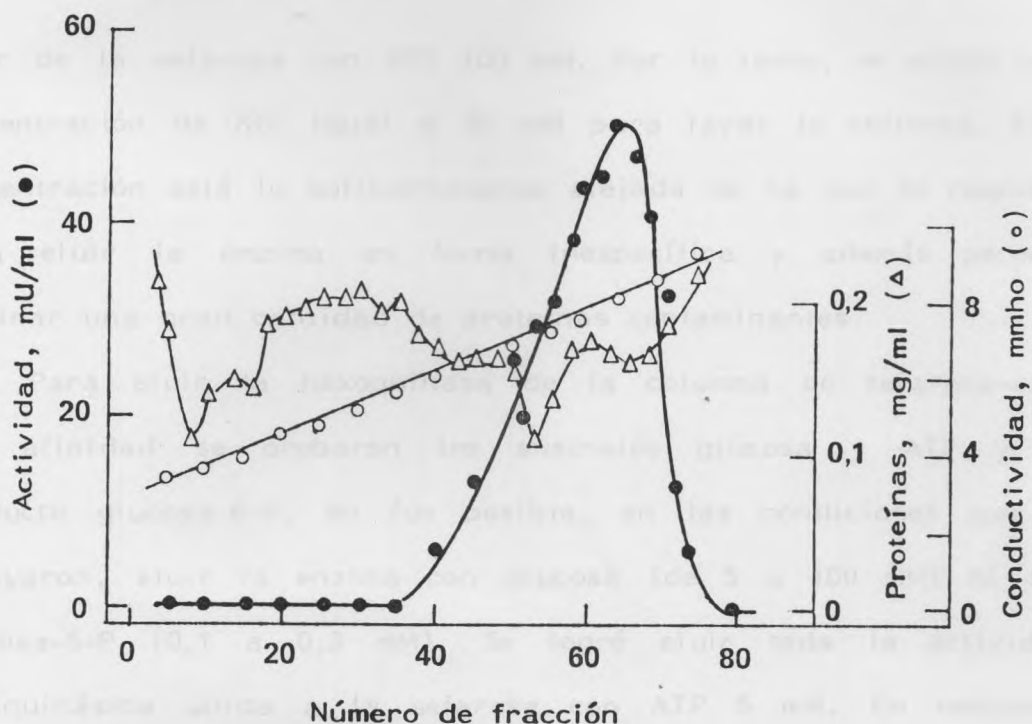


Figura 2. Hexoquinasa B: cromatografía en hidroxilapatita. 176 ml de la preparación proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa, previamente concentrada y dializada, se colocaron en una columna (1,8 x 18,5 cm) de hidroxilapatita equilibrada con solución B. La preparación tenía 6,7 unidades de hexoquinasa B. Se lavó con 200 ml de la misma solución y las proteínas se eluyeron con fosfato de potasio en un gradiente lineal de 50 a 200 mM en solución B. Se colectaron fracciones de 5,8 ml. Otros detalles como en la figura 1.

eluir de la sefarosa con KCl 100 mM. Por lo tanto, se eligió una concentración de KCl igual a 90 mM para lavar la columna. Esta concentración está lo suficientemente alejada de la que se requiere para eluir la enzima en forma inespecífica y además permite eliminar una gran cantidad de proteínas contaminantes.

Para eluir la hexoquinasa de la columna de sefarosa-azul por afinidad se probaron los sustratos glucosa y ATP y el producto glucosa-6-P. No fue posible, en las condiciones que se ensayaron, eluir la enzima con glucosa (de 5 a 100 mM) ni con glucosa-6-P (0,1 a 0,3 mM). Se logró eluir toda la actividad hexoquinásica unida a la sefarosa con ATP 5 mM. En resumen, como consecuencia de estos estudios, la hexoquinasa B se pasaba por la columna de sefarosa-azul en amortiguador Tris pH 7,5 que contenía KCl 20 mM y glucosa 1 mM. Se lavaba con Tris que contenía KCl 90 mM y finalmente se eluía la enzima con el amortiguador que contenía KCl 20 mM y ATP 5 mM (Fig. 3). En esta etapa la actividad específica de la preparación aumenta de 8 a 10 veces. Se recupera aproximadamente el 50% de la actividad enzimática.

5. Recromatografía en DEAE-celulosa

A diferencia de la primera cromatografía en DEAE-celulosa, en esta ocasión la actividad enzimática se eluyó con KCl en un gradiente lineal de 20 a 500 mM. La concentración de proteínas disminuye a la mitad con respecto a la etapa anterior y consecuen-

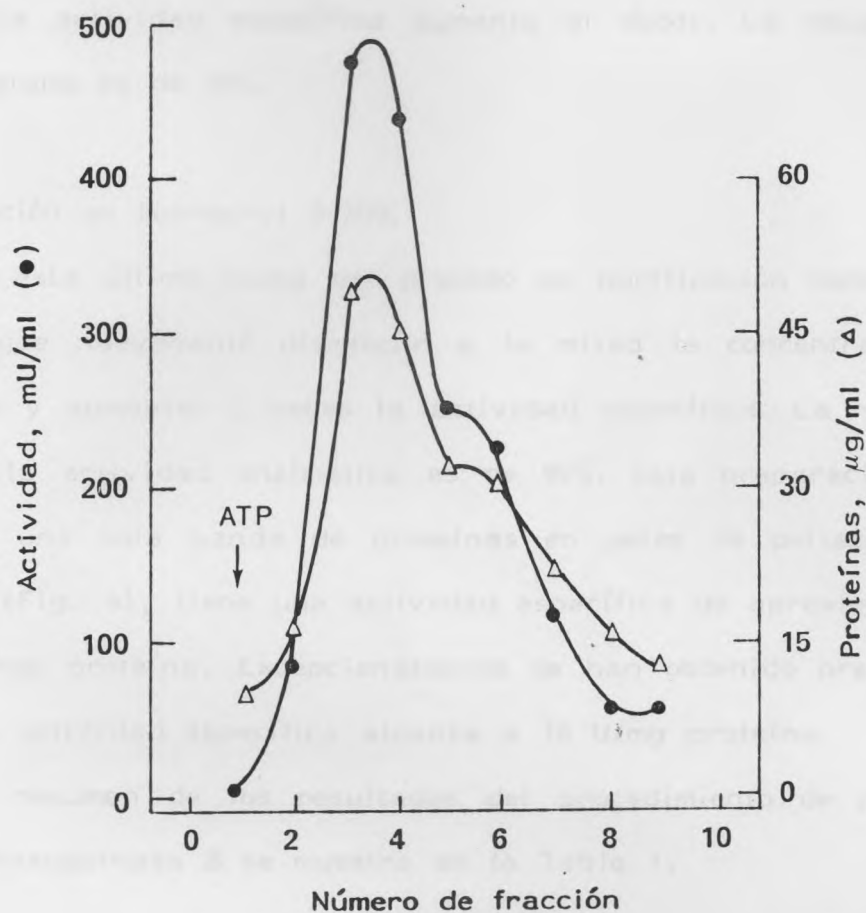


Figura 3. Hexoquinasa B: cromatografía en Cibacron Blue-Sepharose. 138 ml de muestra provenientes de la cromatografía en hidroxilapatita, previamente concentrada y dializada, se colocaron en una columna de Cibacron Blue-Sepharose (1 x 3 cm) equilibrada en solución C. La muestra contenía 6,2 unidades de hexoquinasa B. Se lavó con 20 ml de solución C que contenía KCl 90 mM. Las proteínas se eluyeron con solución C que contenía KCl 20 mM y ATP 5 mM. Se colectaron fracciones de 1 ml. Otros detalles como en la figura 1.

temente la actividad específica aumenta el doble. La recuperación en esta etapa es de 50%.

6. Filtración en Sephacryl S-200.

En esta última etapa del proceso de purificación normalmente se consigue nuevamente disminuir a la mitad la concentración de proteínas y aumentar 2 veces la actividad específica. La recuperación de la actividad enzimática es de 90%. Esta preparación, que presenta una sola banda de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS (Fig. 4), tiene una actividad específica de aproximadamente 12 U/mg proteína. Excepcionalmente se han obtenido preparaciones cuya actividad específica alcanza a 18 U/mg proteína.

Un resumen de los resultados del procedimiento de purificación de hexoquinasa B se muestra en la Tabla 1.

Con el objeto de conocer algunas características de la hexoquinasa B de rana y compararlas con otras hexoquinasas, se hizo una caracterización cinética preliminar de la enzima. Los valores de la K_m para glucosa (0,100 mM) y para ATP (0,7 mM) son similares a los obtenidos para otras hexoquinasas de músculo de vertebrados (Wilson, 1985).

Purificación de la hexoquinasa C

No fue posible obtener hexoquinasa C pura aún después de haber ensayado numerosas técnicas usadas tradicionalmente para purificación de proteínas. Como se requería la enzima homogénea

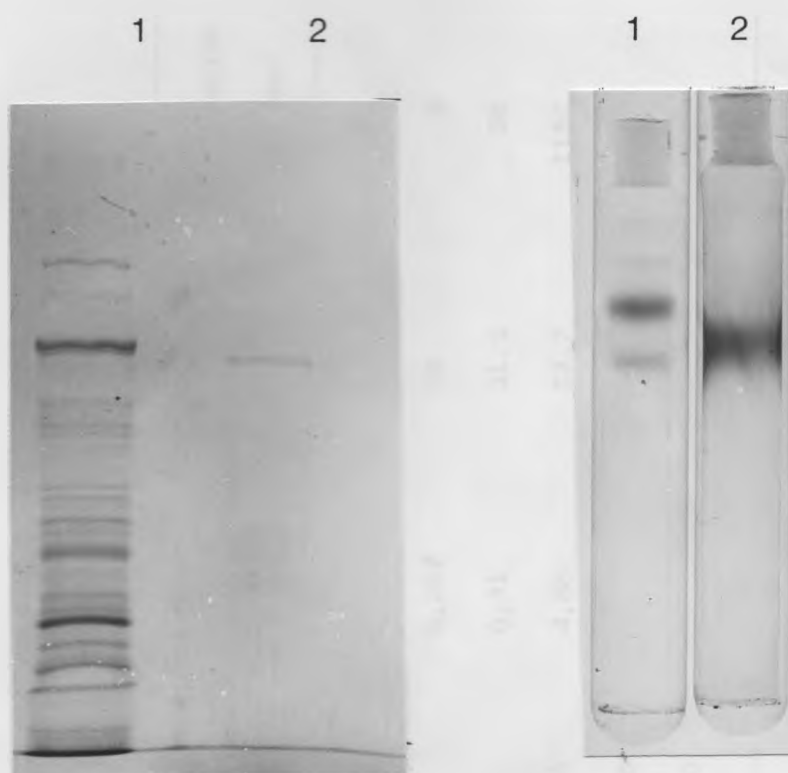


Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida de hexoquinasa B en distintas etapas de purificación.

Panel izquierdo: gel en presencia de SDS; proteínas teñidas con azul de Coomassie. Canal 1: 50 μ g de la preparación obtenida de la 1a cromatografía en DEAE-celulosa; canal 2: 5 μ g de enzima provenientes de la filtración en Sephacryl S-200.

Panel derecho: gel en condiciones nativas en el cual se colocó en cada canal 20 μ g de proteína proveniente de la preparación obtenida de la cromatografía en Cibacron Blue-Sepharose.

Canal 1: tinción de proteínas; canal 2: tinción de actividad enzimática como se describió en pág. 16. La preparación de los geles se describió en Materiales y Métodos en la pág. 18.

Tabla 1

Purificación de hexoquinasa B de músculo de rana

Etapa	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
1. Citosol*	470	0,042	9,6	0,004	100	1
2. DEAE-celulosa	176	0,038	1,7	0,022	34	5
3. Hidroxilapatita	138	0,045	0,11	0,41	31,5	98
4. Sefarosa-azul	8	0,317	0,065	4,88	12,7	1162
5. DEAE-celulosa	3	0,343	0,036	9,53	5,1	2269
6. Sephacryl S-200	6,5	0,122	0,010	12,2	4,1	2905

*Conjunto de las fracciones con y sin Tritón obtenidas después de centrifugar el homogeneizado de músculo.

para ser inyectada en conejo y obtener el anticuerpo correspondiente, ésta se obtuvo sometiendo una preparación enzimática semipurificada a electroforesis en geles de poliacrilamida. Los resultados obtenidos en las diferentes etapas del proceso de purificación se describen a continuación.

1. Preparación de extractos crudos

Generalmente se procesaban alrededor de 80 g de hígado. Después de homogeneizar al 50% el tejido y centrifugar, la actividad hexoquinásica en el citosol era de 0,3 U/ml. La actividad hexoquinásica total era igual a 30 U, lo que equivale a 0,4 U/g de tejido. Es necesario recalcar sin embargo que en hígado de rana la hexoquinasa C representa alrededor de un 44% de la actividad hexoquinásica total (la actividad remanente corresponde a hexoquinasas B y D), por lo tanto la actividad enzimática correspondiente a hexoquinasa C sería aproximadamente 13,2 U. La actividad específica de esta preparación era aproximadamente 0,011 U/mg proteína.

2. Cromatografía en DEAE-celulosa

Cuando se cromatografía en DEAE-celulosa un extracto crudo de hígado de rana se obtienen 3 picos de actividad hexoquinásica que corresponden a las isoenzimas C, B y D, respectivamente (Fig. 5). Estos resultados coinciden con los comunicados por Ureta (1976). El primer pico corresponde a la hexoquinasa C, que

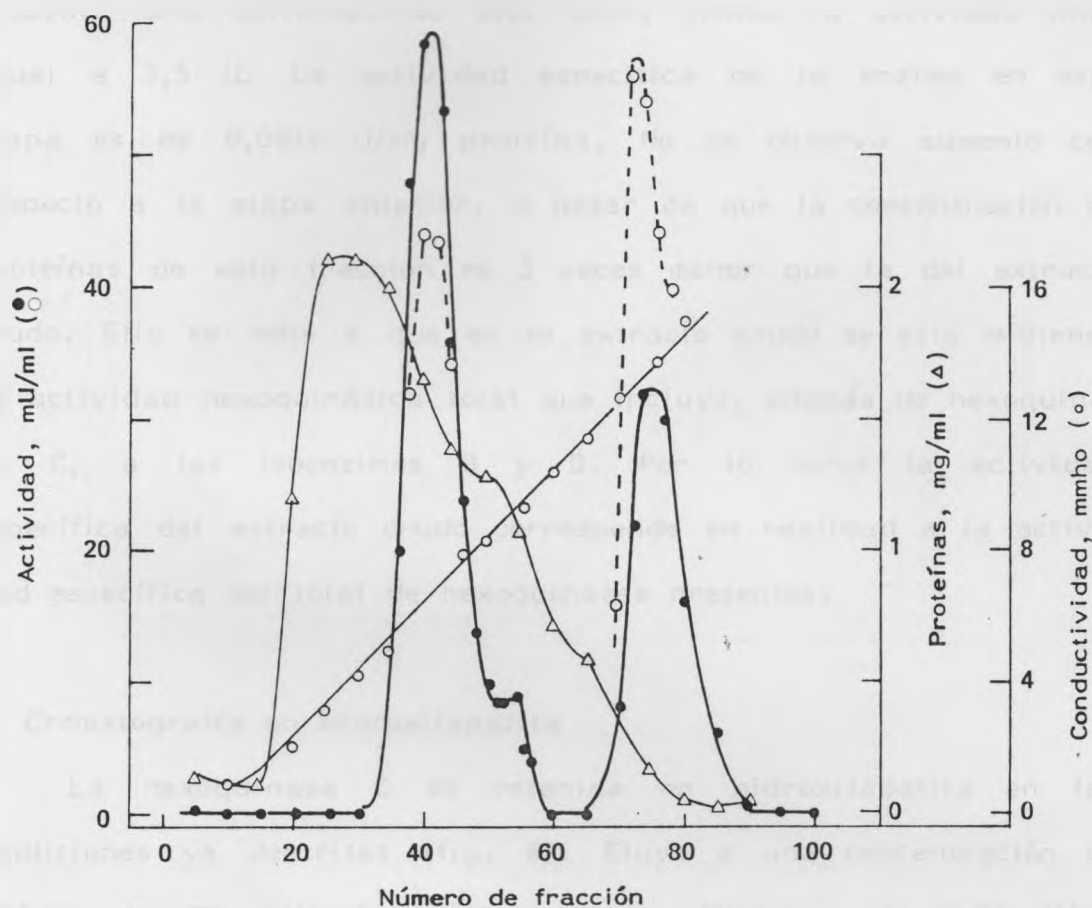


Figura 5. Hexoquinasa C: cromatografía en DEAE-celulosa. 78 ml de citosol que contenían 11,9 unidades de hexoquinasa se colocaron en una columna (2,5 x 14 cm) equilibrada con solución D. Se lavó con 500 ml de la misma solución y las proteínas se eluyeron con KCl en un gradiente lineal de 0 a 0,5 M en solución D. Se colectaron fracciones de 10 ml. La actividad enzimática se midió espectrofotométricamente con glucosa 0,5 mM (●) o 100 mM (○).

eluye a una concentración de KCl igual a 90 mM. Esta fracción presenta una actividad de 0,04 U/ml, siendo la actividad total igual a 3,5 U. La actividad específica de la enzima en esta etapa es de 0,0034 U/mg proteína. No se observa aumento con respecto a la etapa anterior, a pesar de que la concentración de proteínas de esta fracción es 3 veces menor que la del extracto crudo. Ello se debe a que en el extracto crudo se está midiendo la actividad hexoquinásica total que incluye, además de hexoquinasa C, a las isoenzimas B y D. Por lo tanto la actividad específica del extracto crudo corresponde en realidad a la actividad específica del total de hexoquinasas presentes.

3. Cromatografía en hidroxilapatita

La hexoquinasa C es retenida en hidroxilapatita en las condiciones ya descritas (fig. 6). Eluye a una concentración de fosfato de 50 mM. La actividad específica es de 0,23 U/mg proteína y la recuperación de la actividad enzimática en esta etapa es de un 50%.

4. Filtración en Sephacryl S-300

La fracción con actividad enzimática obtenida en la etapa anterior se concentraba y dializaba en solución C para pasarla por una columna de Sephacryl. Después de la filtración se obtiene un solo pico de actividad hexoquinásica cuya actividad

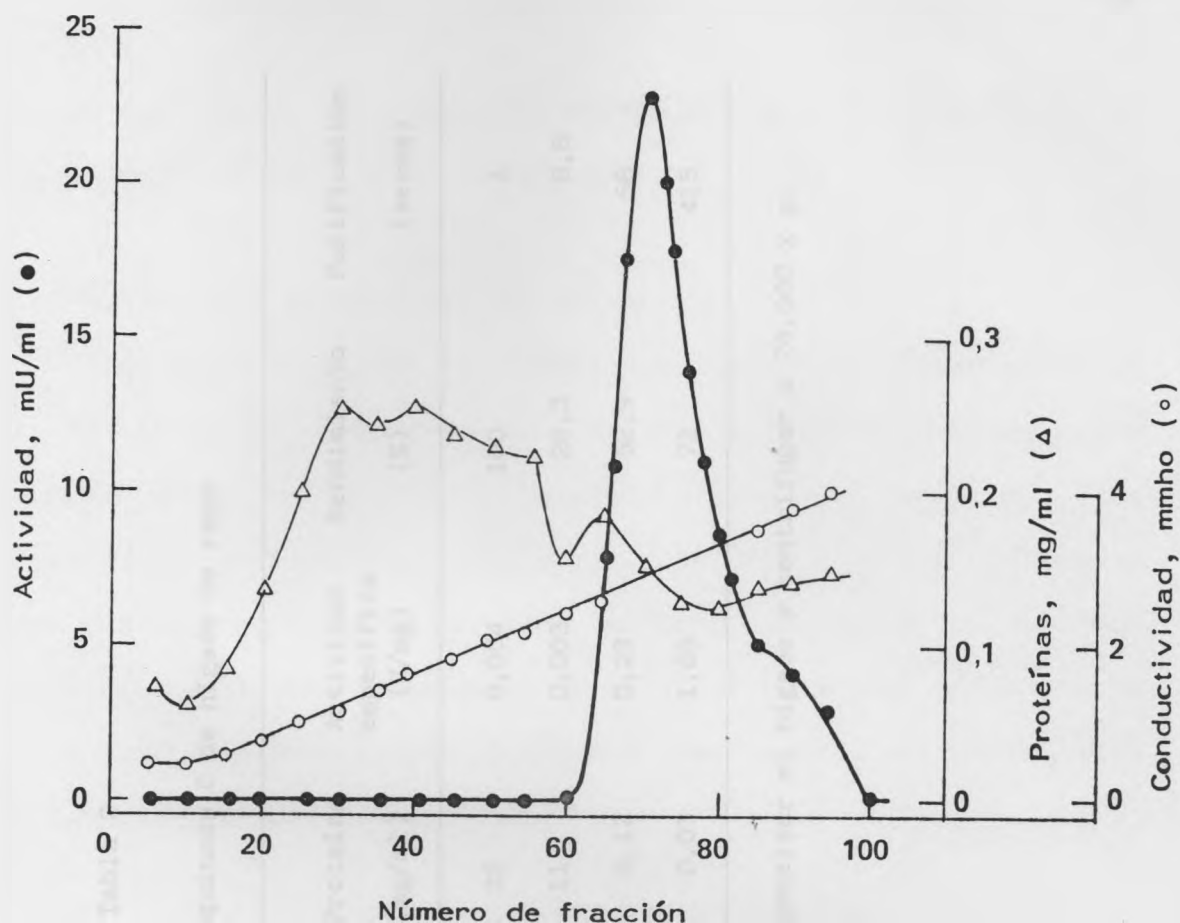


Figura 6. Hexoquinasa C: cromatografía en hidroxilapatita. 95 ml de la preparación proveniente de la cromatografía en DEAE-celulosa, previamente concentrada y dializada, se colocaron en una columna de hidroxilapatita (1 x 18 cm) equilibrada con solución B modificada (con amortiguador fosfato 5 mM en vez de 50 mM). La preparación tenía 3,4 unidades de hexoquinasa C. Se lavó con 100 ml de solución B modificada y las proteínas se eluyeron con fosfato en un gradiente lineal de 5 a 100 mM en la misma solución. Se colectaron fracciones de 3 ml. Otros detalles experimentales como en la figura 1.

Tabla 2

Purificación de hexoquinasa C de hígado de rana

Etapa	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Proteína (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Purificación (veces)
1. Citosol*	78	0,153	32	0,004	100	1
2. DEAE-celulosa	95	0,036	11	0,003	28,3	0,8
3. Hidroxilapatita	66	0,028	0,12	0,23	52,9	58
4. Sephacryl S-300	25	0,05	0,03	1,66	72	415

*Líquido sobrenadante obtenido después de homogeneizar el hígado y centrifugar a 28.000 x g.

es de 0,05 U/ml. La actividad específica de esta fracción es de 1,6 U/mg de proteína y la recuperación es de 80%.

5. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las fracciones con actividad hexoquinásica provenientes de la filtración en Sephacryl se juntaron y se concentraron por ultrafiltración en Amicon y posteriormente en Centricon. Esta preparación se sometió a electroforesis en placa de poliacrilamida. Como se describió anteriormente, se cortó la banda de gel que presentaba actividad hexoquinásica para ser inyectada en conejo.

La Tabla 2 muestra un resumen del proceso de purificación de hexoquinasa C.

Purificación de los sueros

Debido a la alta concentración de proteínas existente en los sueros, fue necesario purificar las inmunoglobulinas con el objeto de poder microinyectar en los oocitos una concentración de anticuerpos que permitiera asegurar la inhibición de la actividad hexoquinásica dentro de la célula. Con este procedimiento se lograba disminuir la concentración de proteína alrededor de 80 veces. Los sueros completos tienen aproximadamente 10 g de proteína por 100 ml, valor que bajaba a 0,13 g/100 después de la purificación.

Caracterización de los antisueros

De acuerdo con los protocolos correspondientes descritos en Materiales y Métodos, se prepararon en conejos sueros inmunes anti-hexoquinasa B y C de rana. Se usaron los sueros completos o bien se purificaron las inmunoglobulinas de tipo G por cromatografía en Proteína A-Sefarosa. Los antisueros se caracterizaron mediante los procedimientos que se describen a continuación.

1. Microinmunotitulación

Las curvas de titulación obtenidas por el procedimiento ELISA para sueros anti-hexoquinasa B, obtenidos 10 días después de cada inyección del antígeno aparecen en la figura 7. Se puede apreciar que las curvas de titulación de los sueros obtenidos después de inmunizaciones sucesivas son prácticamente iguales. El título es el mismo para todos los sueros y es igual a 1024, valor que corresponde al valor recíproco de la dilución del suero con la cual se alcanza la mitad de la absorbancia máxima.

La curva de titulación correspondiente al suero anti-hexoquinasa C se muestra en la figura 8. Para este experimento se utilizó el suero obtenido después de la última inyección de antígeno. El título de este suero tiene un valor de 16.384.

2. Efecto de los antisueros sobre la actividad enzimática de las hexoquinasas B y C de rana.

Ambos sueros, anti-B y anti-C, son capaces de inhibir la

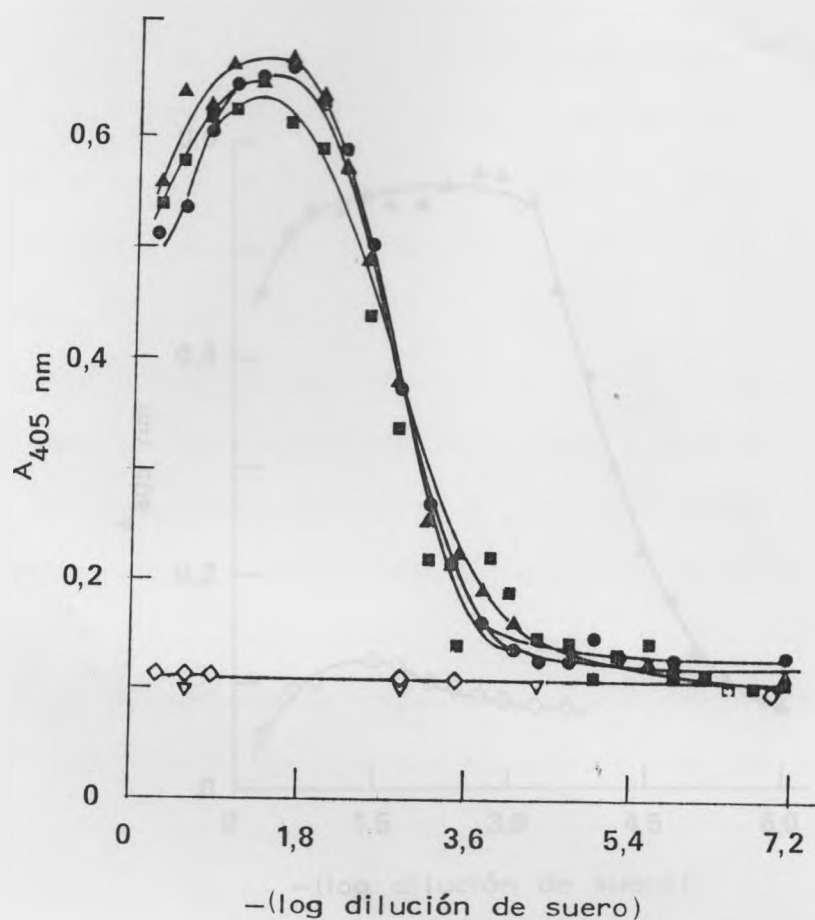


Figura 7. Titulación del suero anti-hexoquinasa B. Sueros anti-hexoquinasa B obtenidos después de inmunizaciones sucesivas se caracterizaron por el método ELISA (véase Materiales y Métodos, pág. 27). Los sueros se identifican como sigue: ● : 2a inmunización; ▲ : 3a inmunización; ■ : 4a inmunización; ◇ : Suero control; ▽ : BSA. Se usaron diluciones seriadas de los sueros.

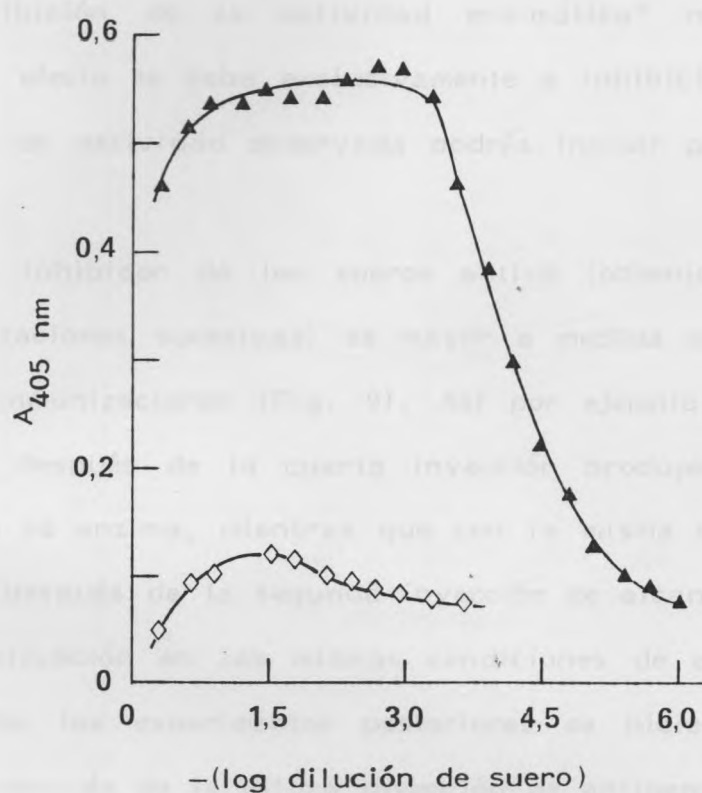


Figura 8. Titulación del suero anti- hexoquinasa C. El suero anti-hexoquinasa C se caracterizó por el método ELISA (véase Materiales y Métodos, pág. 27). $\blacktriangle$: suero inmune; $\diamond$: suero control. Se usaron diluciones seriadas de los sueros.

actividad de las enzimas B y C, respectivamente. Al usar la expresión "inhibición de la actividad enzimática" no queremos sugerir que el efecto se deba exclusivamente a inhibición, ya que la disminución de actividad observada podría incluir precipitación de la enzima.

El efecto inhibidor de los sueros anti-B (obtenidos después de tres inmunizaciones sucesivas) es mayor a medida que aumenta el número de inmunizaciones (Fig. 9). Así por ejemplo, 10 μ l del suero obtenido después de la cuarta inyección produjeron 65% de inactivación de la enzima, mientras que con la misma cantidad de suero obtenido después de la segunda inyección se alcanzó solamente 20% de inactivación en las mismas condiciones de ensayo. Por esta razón todos los experimentos posteriores se hicieron con el suero obtenido después de la última inyección de antígeno.

La inhibición de la actividad enzimática por el antisuero depende de varios factores: estado de purificación del suero, tiempo de incubación del suero con el antígeno y las condiciones en las cuales se encuentra la enzima, especialmente la presencia o ausencia de protectores de la actividad enzimática en la preparación que se usa.

La influencia del estado de purificación del antisuero sobre la capacidad de éste para inhibir la actividad de hexoquinasa B se ilustra en la figura 10, en la que se comparan los resultados obtenidos después de incubar hexoquinasa B con suero completo y

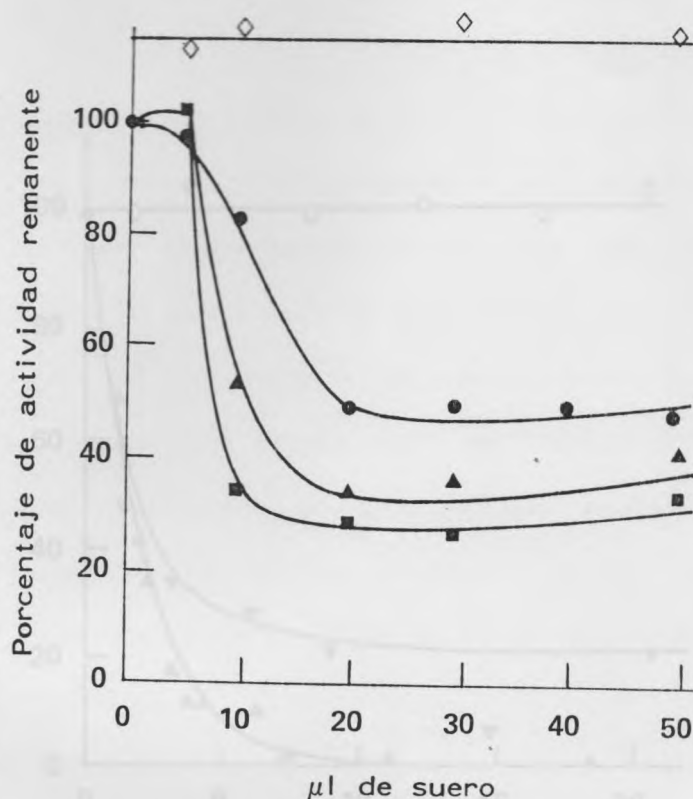


Figura 9. Inhibición de la actividad de hexoquinasa B por suero anti-hexoquinasa B. Cantidades variables de sueros obtenidos después de inmunizaciones sucesivas se incubaron con 2,3 mU de hexoquinasa B semipurificada proveniente de la etapa de DEAE-celulosa, en un volumen final de 0,12 ml. La incubación se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de centrifugar 10 min se midió actividad enzimática en el líquido sobrenadante mediante el método espectrofotométrico. Los sueros obtenidos después de cada inmunización (véase Materiales y Métodos pág. 25) se identifican como sigue: ● : 2a inmunización; ▲ ; 3a inmunización; ■ : 4a inmunización. ◇ : suero control.

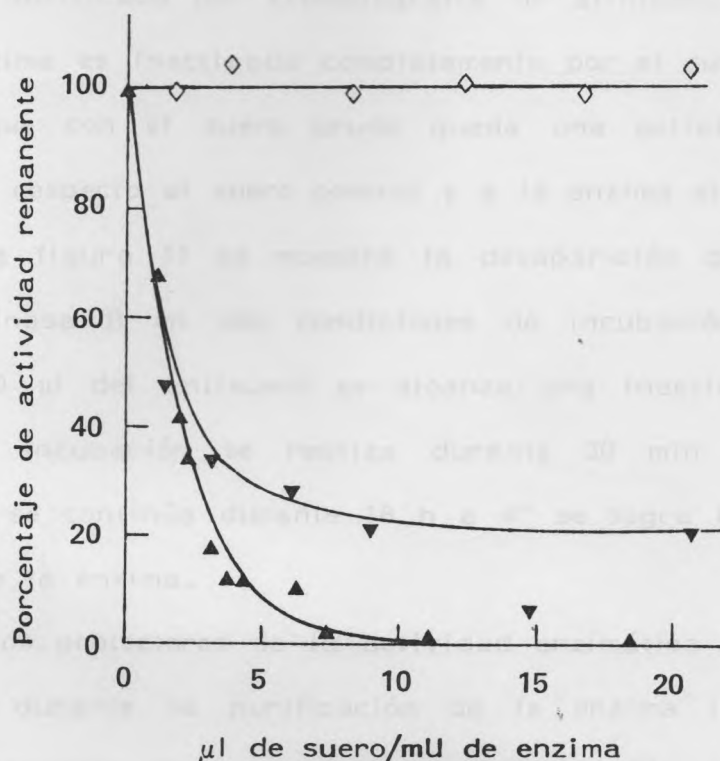


Figura 10. Inhibición de la actividad de hexoquinasa B por suero anti-hexoquinasa B: efecto de la purificación del suero. Cantidades variables de suero o de IgG purificadas (5-100 μ l) se incubaron con 2,7 o 2,4 mU de hexoquinasa B semipurificada proveniente de la etapa de hidroxilapatita en un volumen final de 0,4 ml. La incubación se realizó durante 30 min a 30° y 18 h a 4°. Después de centrifugar 10 min se midió actividad enzimática en el líquido sobrenadante mediante el método espectrofotométrico. Los sueros inmunes se identifican como sigue. ▲ : IgG purificadas en Protein A-Sepharose CL-4B; ▼ suero completo. ◇ : suero control. La abscisa se expresa como el cociente entre la cantidad de suero y la actividad enzimática, para compensar las diferencias en la cantidad de enzima usada en diferentes experimentos.

con suero purificado por cromatografía de afinidad. Se puede ver que la enzima es inactivada completamente por el suero purificado, mientras que con el suero crudo queda una actividad remanente de 20% con respecto al suero control y a la enzima sin antisuero.

En la figura 11 se muestra la desaparición de la actividad de hexoquinasa B en dos condiciones de incubación. Se observa que con 50 μ l del antisuero se alcanza una inactivación del 50% cuando la incubación se realiza durante 30 min a 30°. Si la incubación se continúa durante 18 h a 4° se logra la inactivación completa de la enzima.

Algunos protectores de la actividad enzimática que se usaban de rutina durante la purificación de la enzima influyen en la inmunoinactivación de hexoquinasa B (Fig. 12). La enzima sin glicerol ni glucosa se inactiva por completo con una cantidad muy pequeña de suero, probablemente menor que 1 μ l de suero por μ l de enzima, aún cuando en este caso se usó el suero completo, sin purificar. Cuando se incluía glicerol y glucosa en la preparación enzimática quedaba una actividad remanente de 20%, valor que ya se había mencionado para el suero no purificado. Resumiendo, se puede lograr la inactivación completa de hexoquinasa B con las inmunoglobulinas purificadas o bien con el suero crudo en ausencia de protectores de la actividad enzimática como glucosa y glicerol. La ausencia de protectores no alteró la actividad del control con suero no inmune.

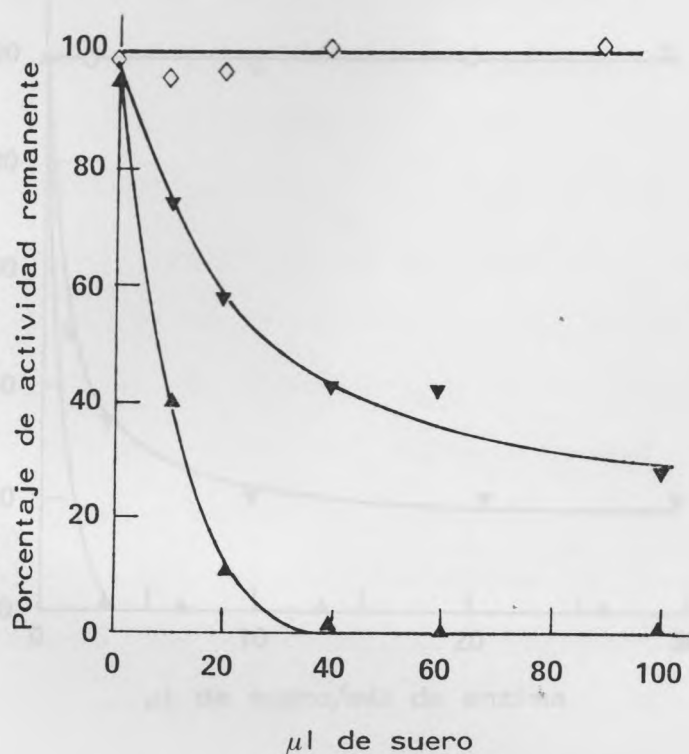


Figura 11. Inhibición de la actividad de hexoquinasa B por suero-hexoquinasa B en diferentes condiciones de incubación. Cantidades variables de IgG purificadas se incubaron con 2,7 mU de hexoquinasa B semipurificada proveniente de la etapa de hidroxilapatita en un volumen final de 0,4 ml. Las incubaciones para el suero inmune fueron como sigue: ▼ : 30 min a 30° ; ▲ 30 min a 30° y 18 h a 4° . ◊ : suero control en ambas condiciones. Después de centrifugar 10 min se midió actividad enzimática en el líquido sobrenadante mediante el método espectrofotométrico.

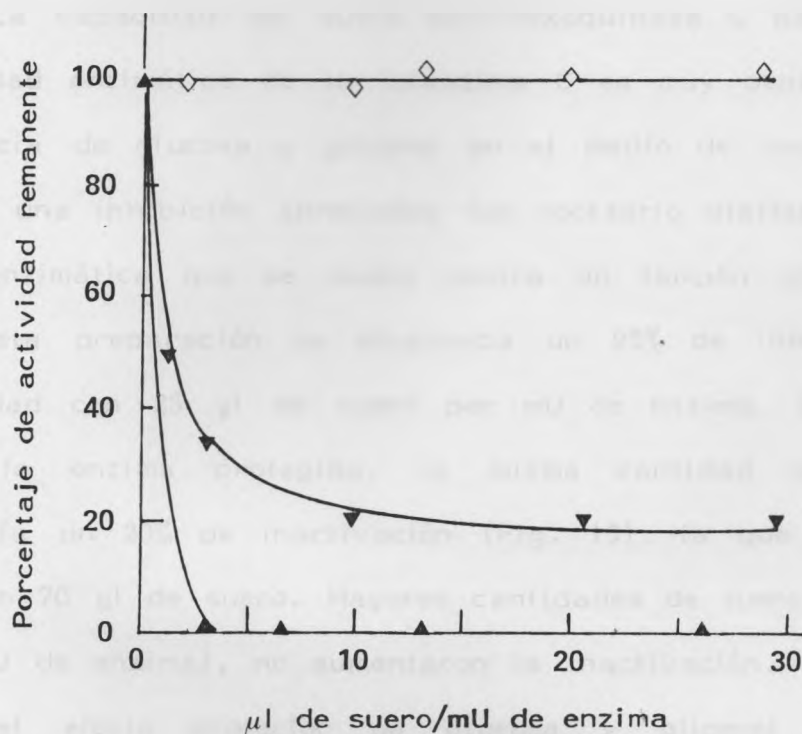


Figura 12. Inhibición de la actividad de hexoquinasa B por suero anti-hexoquinasa B: efecto de protectores de la actividad enzimática. Cantidades variables de suero completo (entre 5 y 100 μ l) se incubaron con 1,5 o 1,7 mU de hexoquinasa B semipurificada proveniente de la etapa de hidroxilapatita en un volumen final de 0,2 ml. La incubación se realizó durante 30 min a 30° y 18 h a 4°. Después de centrifugar 10 min se midió actividad enzimática en el líquido sobrenadante mediante el método espectrofotométrico. La enzima utilizada se identifica como sigue: ▼ : enzima con protectores de actividad (glucosa y glicerol); ▲ : enzima en ausencia de protectores. ◇ : suero control.

La capacidad del suero anti-hexoquinasa C para inhibir la actividad enzimática de la isoenzima C es muy dependiente de la presencia de glucosa y glicerol en el medio de incubación. Para lograr una inhibición apreciable fue necesario dializar la preparación enzimática que se usaba contra un tampón sin protectores. Con esta preparación se alcanzaba un 95% de inhibición de la actividad con 25 μ l de suero por mU de enzima. En cambio, al usar la enzima protegida, la misma cantidad de suero sólo producía un 20% de inactivación (Fig. 13), la que aumentaba al 50% con 70 μ l de suero. Mayores cantidades de suero (100 o 125 μ l por mU de enzima), no aumentaron la inactivación. Como se puede ver, el efecto protector de glucosa y glicerol frente a la inactivación por el suero es mucho más importante para hexoquinasa C que para hexoquinasa B. En la figura 14 se ilustra el efecto de dos condiciones de incubación sobre la inactivación de hexoquinasa C por el antisuero correspondiente. Cuando la incubación se realizaba durante 30 min a 30° la actividad enzimática remanente era 30% de la actividad original, valor que se alcanzaba con 75 μ l de antisuero. Si la incubación se prolongaba durante 18 h a 4° la actividad remanente era 5% de la actividad original.

3. Reactividad inmunológica cruzada de hexoquinasas B y C

El enfoque experimental planteado en este trabajo para abordar el estudio de las vías de utilización de glucosa en los

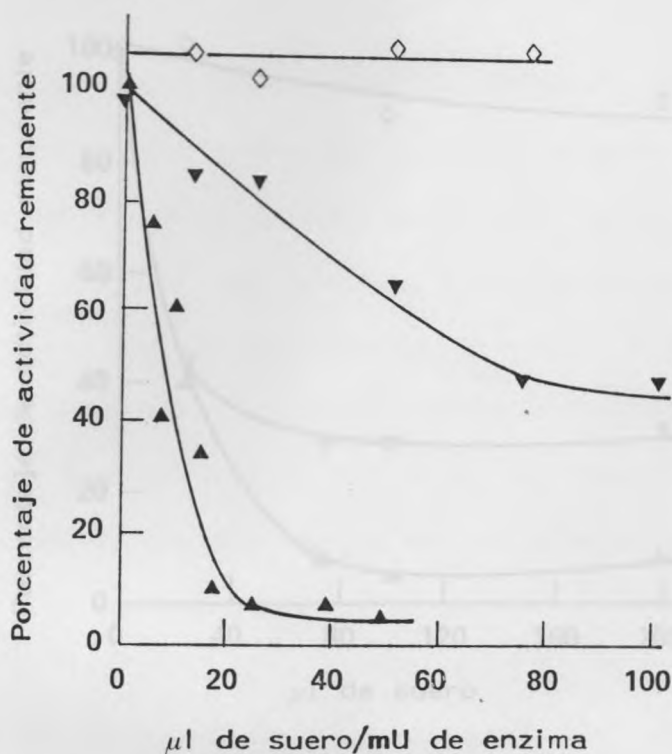


Figura 13. Inhibición de la actividad de hexoquinasa C por suero anti-hexoquinasa C: efecto de protectores de la actividad enzimática. Cantidades variables de suero (entre 10 y 150 μ l) se incubaron con 3,9 o 4,2 mU de hexoquinasa C semipurificada proveniente de la etapa de hidroxilapatita en un volumen final de 0,2 ml. La incubación se realizó durante 30 min a 30° y 18 h a 4°. Después de centrifugar 10 min se midió actividad enzimática en el líquido sobrenadante mediante el método espectrofotométrico. La enzima utilizada se describe como sigue: ▼: enzima con protectores de actividad (glucosa y glicerol); ▲: enzima en ausencia de protectores. ◇: suero control.

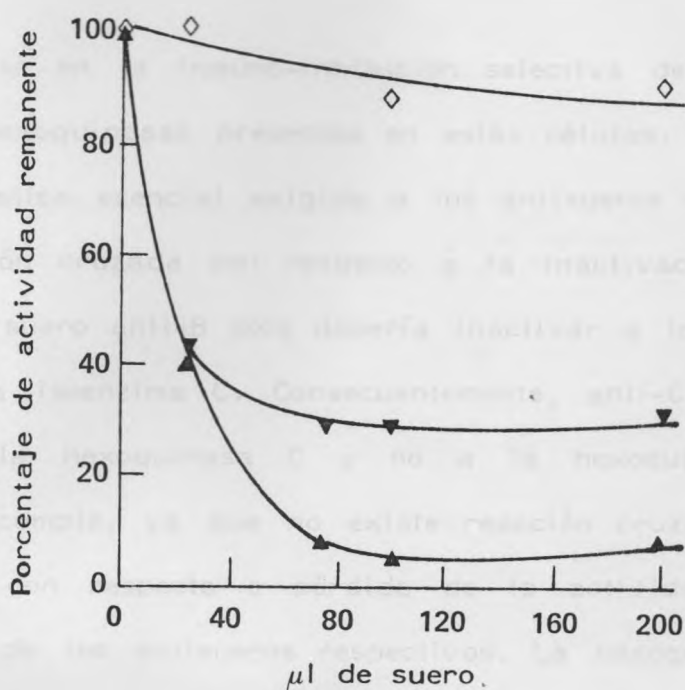


Figura 14. Inhibición de la actividad de hexoquinasa C por suero anti-hexoquinasa C en diferentes condiciones de incubación. Cantidades variables de suero purificado se incubaron con 4,2 mU de hexoquinasa C semipurificada proveniente de la etapa de hidroxilapatita en un volumen final de 0,4 ml. Las incubaciones para el suero inmune fueron como sigue: ▼: 30 min a 30°; ▲: 30 min a 30° y 18 h a 4°; ◇: Suero control. Después de centrifugar 10 min se midió la actividad enzimática en el líquido sobrenadante mediante el método espectrofotométrico.

oocitos se basa en la inmuno-inhibición selectiva de la actividad de las dos hexoquinasas presentes en estas células. Por lo tanto, una característica esencial exigida a los antisueros era la ausencia de reacción cruzada con respecto a la inactivación. En otras palabras, el suero anti-B sólo debería inactivar a la hexoquinasa B y no a la isoenzima C. Consecuentemente, anti-C sólo debería inactivar a la hexoquinasa C y no a la hexoquinasa B. Tal condición se cumple, ya que no existe reacción cruzada entre las hexoquinasas con respecto a pérdida de la actividad enzimática en presencia de los antisueros respectivos. La hexoquinasa B sólo es inactivada por el suero anti-B, no siendo afectada su actividad por el suero anti-C (Fig. 15). De igual manera, la hexoquinasa C se inactiva cuando se incuba con suero anti-C, pero su actividad permanece inalterada en presencia de suero anti-B.

Sin embargo, se detecta reacción cruzada para ambas enzimas cuando se realiza el ensayo ELISA (Fig. 16). El suero anti-B reconoce tanto a hexoquinasa B como a hexoquinasa C, pero la cantidad de suero requerida para reaccionar con la isoenzima C (dilución 1/8) es mucho mayor que la que se requiere para reaccionar con B (dilución 1/256). Asimismo, el suero anti-C también reconoce a ambas hexoquinasas, pero el título para la isoenzima C se alcanza con el suero diluido 8192 veces mientras que para hexoquinasa B se requiere una dilución de 32 veces.

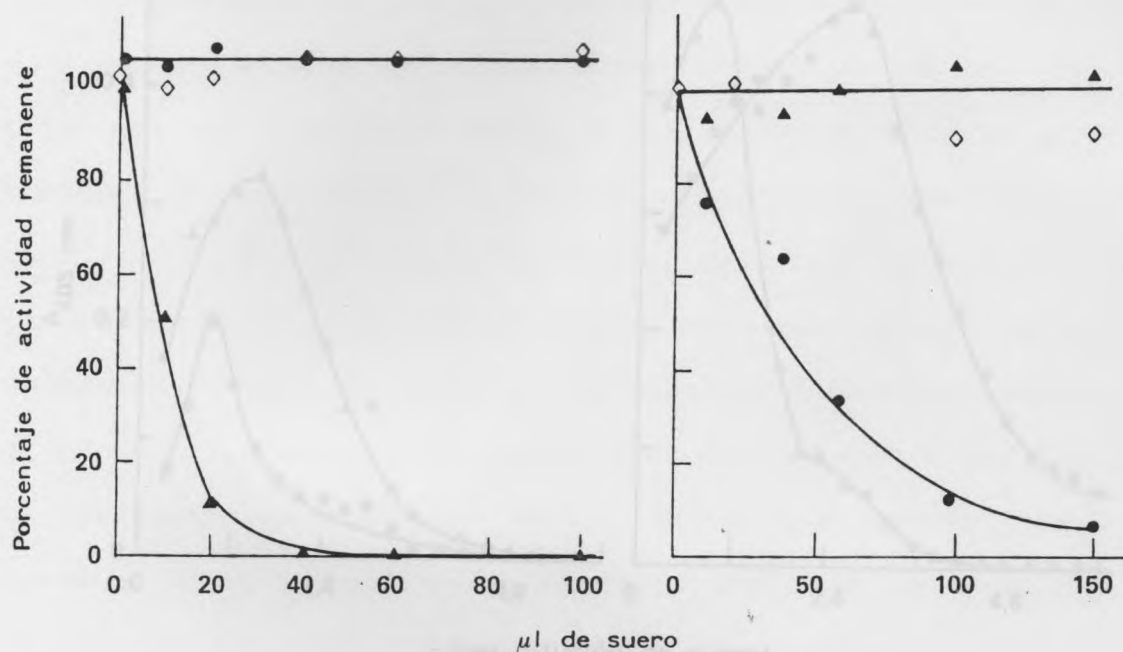


Figura 15. Especificidad de la inhibición de hexoquinasas B y C por los antisueros respectivos. Cantidades variables de suero anti-hexoquinasa B o anti-hexoquinasa C se incubaron con cantidades fijas de hexoquinasas B o C semipurificadas provenientes de la etapa de hidroxilapatita en un volumen final de 0,4 ml. La incubación se realizó durante 30 min a 30° y 18 h a 4°. Después de centrifugar 10 min se midió actividad enzimática en el líquido sobrenadante mediante el método espectrofotométrico.

Panel izquierdo: efecto del suero anti-hexoquinasa B sobre hexoquinasa B: ▲ (2,7 mU, con protectores de la actividad enzimática) y hexoquinasa C: ● (3,2 mU, sin protectores de actividad)

Panel derecho: efecto del suero anti-hexoquinasa C sobre hexoquinasa C: ● (3,9 mU) y hexoquinasa B: ▲ (2,9 mU). ◇ : suero control.

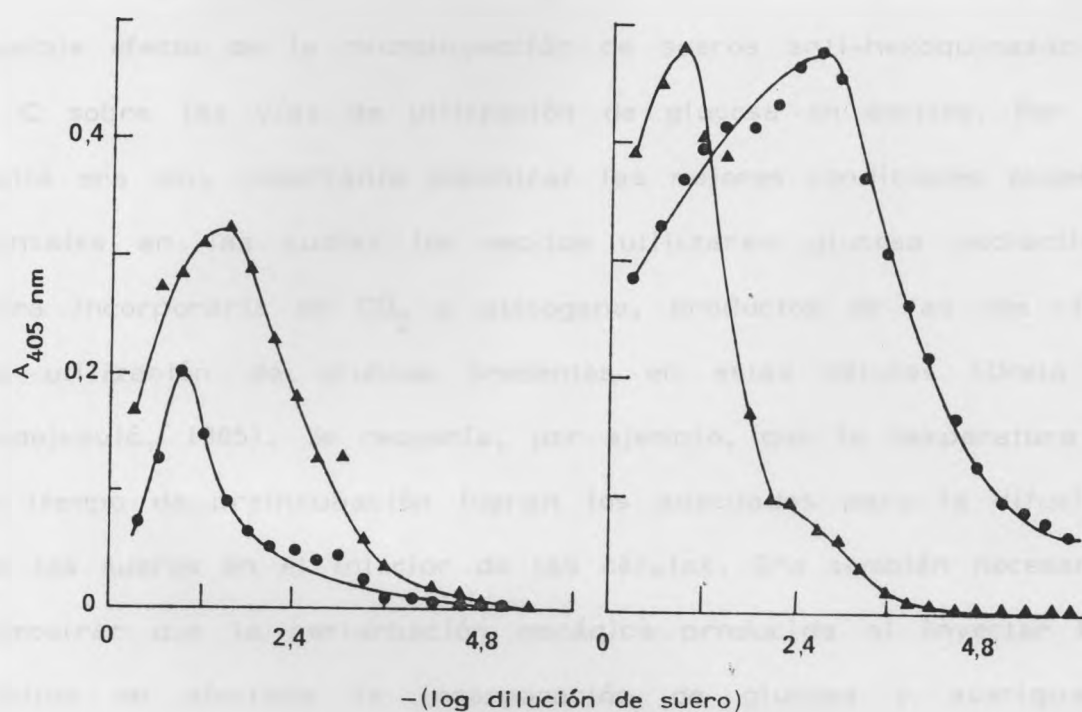


Figura 16. Reacción inmunológica cruzada de hexoquinasa B y C. Se probó la reactividad inmunológica de los sueros anti-hexoquinasa B y anti-hexoquinasa C con las isoenzimas B y C mediante el método ELISA (véase Materiales y Métodos, pág. 27). Se usaron diluciones seriadas de los sueros provenientes de la última inmunización.

Panel izquierdo: suero anti-hexoquinasa B. Panel derecho: suero anti-hexoquinasa C. Hexoquinasa B: ▲ ; hexoquinasa C: ● .

Condiciones apropiadas para el funcionamiento de los oocitos.

El objetivo central de esta parte del trabajo fue estudiar el posible efecto de la microinyección de sueros anti-hexoquinasas B y C sobre las vías de utilización de glucosa en oocitos. Por lo tanto era muy importante encontrar las mejores condiciones experimentales en las cuales los oocitos utilizaran glucosa radiactiva para incorporarla en CO_2 y glicógeno, productos de las dos vías de utilización de glucosa presentes en estas células (Ureta y Radojković, 1985). Se requería, por ejemplo, que la temperatura y el tiempo de preincubación fueran los adecuados para la difusión de los sueros en el interior de las células. Era también necesario demostrar que la perturbación mecánica producida al inyectar los oocitos no afectaba la incorporación de glucosa y averiguar, finalmente, si la mejor incorporación del azúcar se obtenía poniendo la glucosa en el medio externo en que se incubaban los oocitos o microinyectándola después de haber preincubado las células con el antisuero. Los resultados obtenidos en este tipo de experimentos se detallan a continuación.

1. Influencia de la perturbación mecánica producida por la microinyección.

Se midió la incorporación de radiactividad proveniente de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-glucosa en CO_2 y en glicógeno en oocitos aislados que fueron preincubados en solución Barth durante tiempos variables a temperatura ambiente. Una vez cumplido el tiempo de preincuba-

ción los oocitos fueron microinyectados con solución Barth y grupos de 4 oocitos se colocaron en tubos que contenían solución Barth con [^{14}C]-glucosa 2 mM y después de tiempos variables se midió el CO_2 y el glicógeno como se describió en Materiales y Métodos. Los controles eran oocitos preincubados en las mismas condiciones pero no microinyectados. La figura 17 muestra la incorporación de glucosa en glicógeno en función del tiempo. Se observa que la microinyección afecta la incorporación de marca en el glicógeno, puesto que en los oocitos inyectados con Barth la incorporación, después de 1 h de incubación, es un 50% menor que en los controles cuando no hay preincubación. A pesar de ello, la síntesis de glicógeno es lineal con respecto al tiempo al menos durante 1 h, y los niveles de incorporación son lo suficientemente altos como para hacer confiables las mediciones de radiactividad. Con respecto a la incorporación de marca en el CO_2 ésta fue prácticamente nula tanto en los oocitos controles como en los inyectados con solución Barth para todos los tiempos de preincubación que se probaron en estos experimentos. Se puede observar, además, que el tiempo de preincubación al cual se someten las células tiene un efecto drástico sobre la síntesis de glicógeno. Esta disminuye aproximadamente un 90% ya a las 2 h de preincubación, y el nivel bajo es igual en oocitos inyectados como en los controles. De aquí que se hizo necesario estudiar con más atención el efecto que tenía el tiempo de preincubación sobre la actividad de los oocitos.

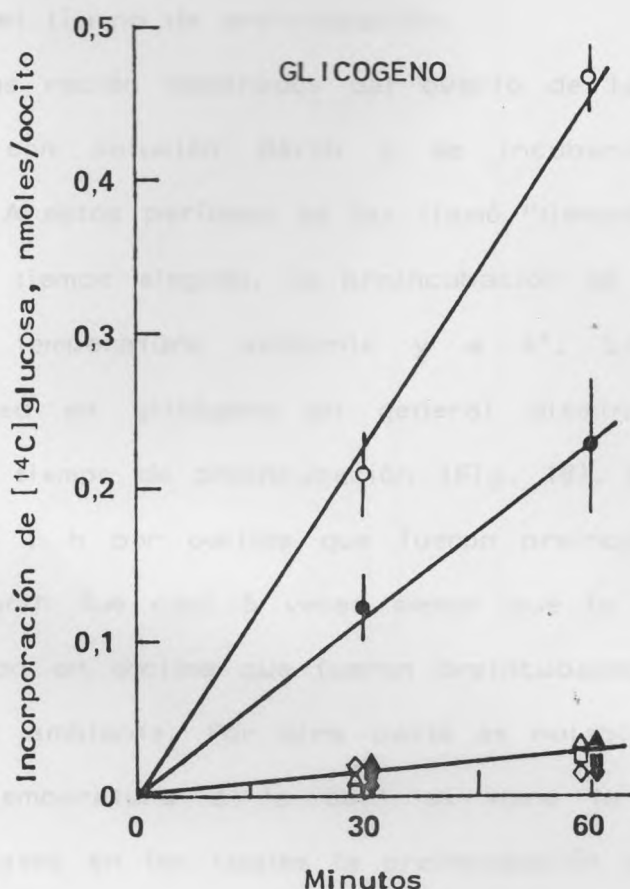


Figura 17. Incorporación de [^{14}C]glucosa en oocitos: efecto de la perturbación mecánica producida por la microinyección. Grupos de 4 oocitos se preincubaron durante tiempos variables a temperatura ambiente en solución Barth que contenía [$\text{U-}^{14}\text{C}$]glucosa 2 mM. La incorporación de glucosa en glicógeno se midió en oocitos individuales como se describió en Materiales y Métodos. Las condiciones de los oocitos fueron las que siguen. Símbolos vacíos: oocitos sin microinyección; símbolos llenos: oocitos microinyectados con 50 nl de solución Barth. Los tiempos de preincubación fueron los siguientes, en horas: ○● : 0; △▲ : 2; □■ : 4; ◇◆ : 20.

2. Efecto del tiempo de preincubación.

Oocitos recién separados del ovario de la rana se colocaron en vasos con solución Barth y se incubaron durante tiempos variables. A estos períodos se les llamó "tiempo de preincubación". Para cada tiempo elegido, la preincubación se hizo con grupos de oocitos a temperatura ambiente y a 4°. La incorporación de radiactividad en glicógeno en general disminuye a medida que aumenta el tiempo de preincubación (Fig. 18). La marca incorporada durante 1 h por oocitos que fueron preincubados 4 h a 4° en solución Barth fue casi 5 veces menor que la incorporación en el mismo tiempo en oocitos que fueron preincubados durante 1 hora a temperatura ambiente. Por otra parte es notable la influencia que tiene la temperatura a la cual se hace la preincubación. En todos los casos en los cuales la preincubación se hizo a temperatura ambiente la síntesis de glicógeno fue muy baja. Por ejemplo, cuando se preincubaron las células durante 1 h a temperatura ambiente, la marca incorporada en glicógeno fue sólo un 15% del valor que se obtuvo cuando la preincubación se hizo durante el mismo tiempo a 4°. Si la preincubación a temperatura ambiente se prolonga durante 4 h, la incorporación de radiactividad en glicógeno es cero, como se vio también en la figura 17.

La producción de CO_2 también era afectada por el tiempo de preincubación y por la temperatura a la cual ésta se realizaba, pero en menor grado que la síntesis de glicógeno. Así por

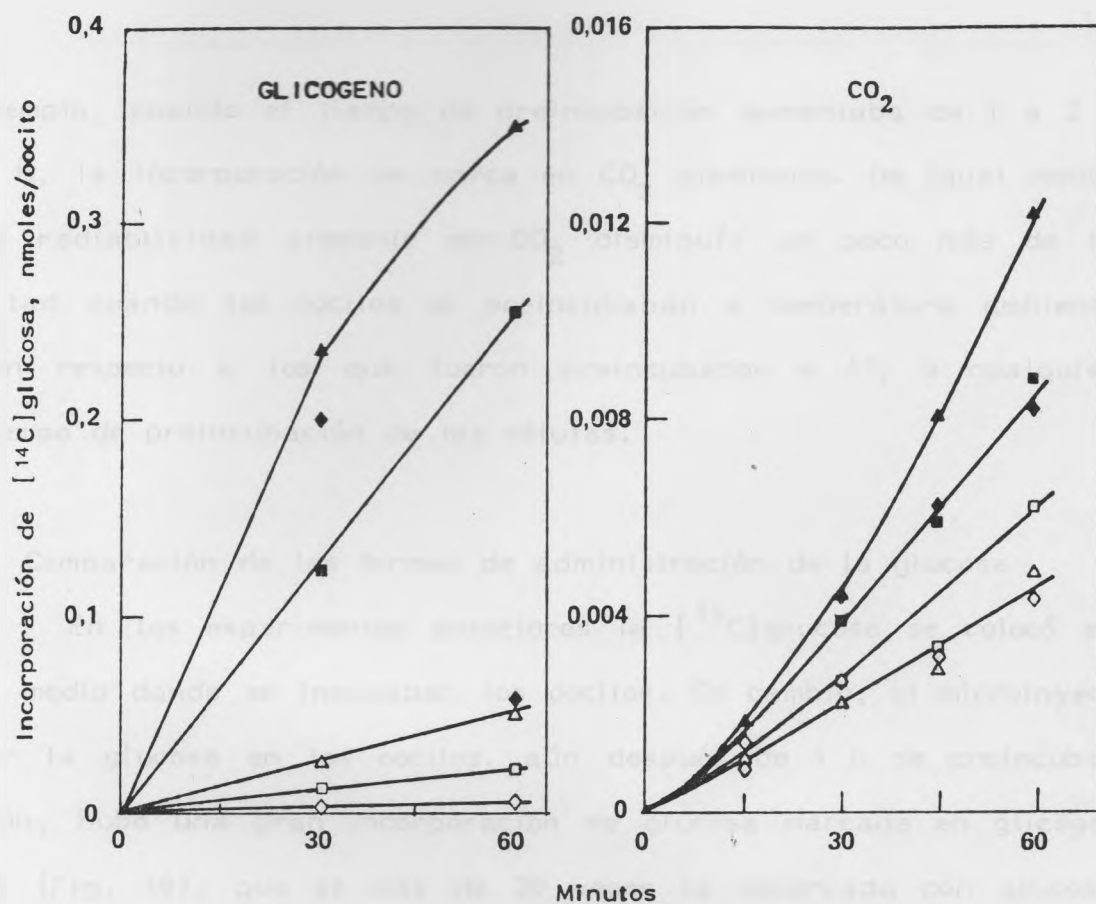


Figura 18. Incorporación de [^{14}C]glucosa en oocitos: efecto del tiempo de preincubación a diferentes temperaturas. Grupos de 4 oocitos se preincubaron en solución Barth que contenía [$\text{U-}^{14}\text{C}$]glucosa 2 mM durante tiempos variables a temperatura ambiente y a 4°. Se midió la incorporación de glucosa en glicógeno y CO_2 . Las condiciones de preincubación fueron las que siguen. Símbolos vacíos: temperatura ambiente; símbolos llenos: 4°. Los tiempos de preincubación fueron los siguientes, en horas: $\blacktriangle$: 1; $\blacksquare$: 2; $\blacklozenge$: 4.

ejemplo, cuando el tiempo de preincubación aumentaba de 1 a 2 o 4 h, la incorporación de marca en CO_2 disminuía. De igual modo, la radiactividad presente en CO_2 disminuía un poco más de la mitad cuando los oocitos se preincubaban a temperatura ambiente con respecto a los que fueron preincubados a 4° , a cualquier tiempo de preincubación de las células.

3. Comparación de las formas de administración de la glucosa

En los experimentos anteriores la [^{14}C]glucosa se colocó en el medio donde se incubaban los oocitos. En cambio, al microinyectar la glucosa en los oocitos, aún después de 4 h de preincubación, hubo una gran incorporación de glucosa marcada en glicógeno (Fig. 19), que es más de 20 veces la observada con glucosa en el medio a temperatura ambiente y alrededor de 10 veces la observada a 4° . Además es menor el efecto de la temperatura de preincubación. Al microinyectar [^{14}C]glucosa también se produce un aumento grande en la producción de CO_2 marcado y disminuye el efecto de la temperatura de preincubación. Estos resultados fueron determinantes para elegir las condiciones en las cuales se trabajaría con los oocitos que serían microinyectados con los anticuerpos. Se eligió el siguiente esquema experimental: los oocitos fueron microinyectados con las inmunoglobulinas purificadas, se preincubaron durante 2 h a temperatura ambiente para facilitar la difusión en el interior de la célula y luego fueron

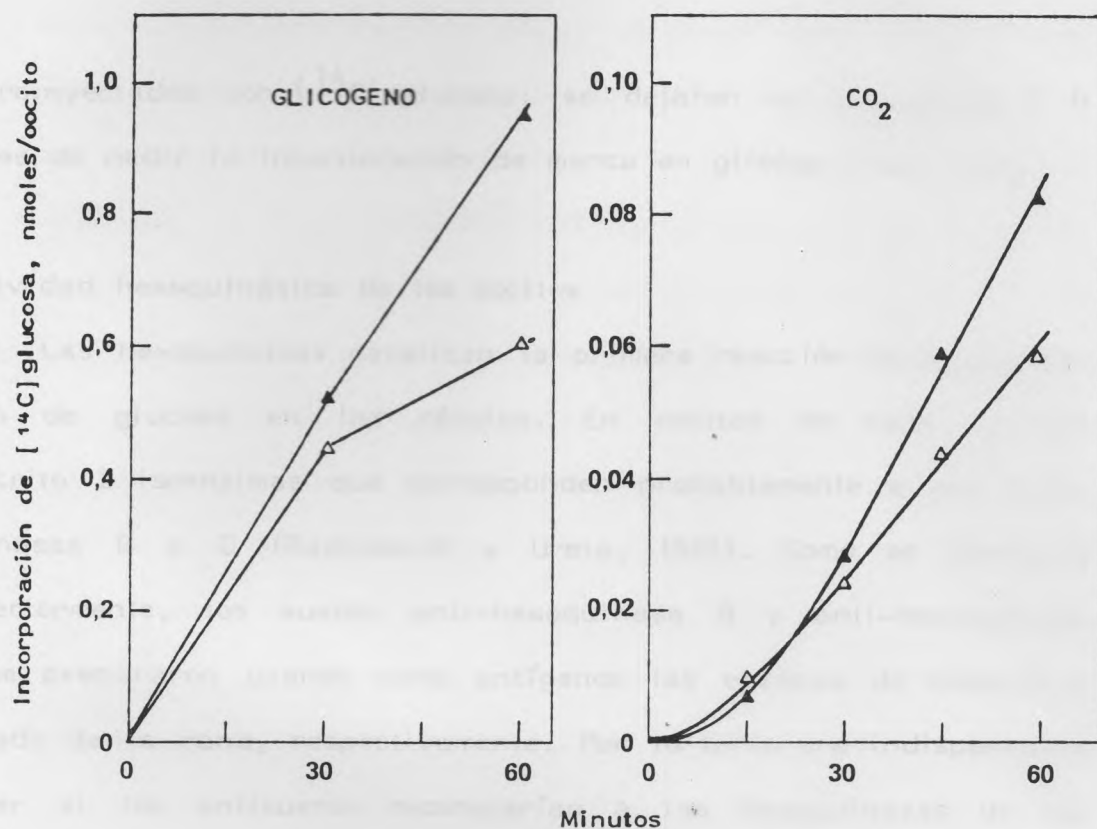


Figura. 19. Microinyección de [¹⁴C]glucosa en oocitos. Grupos de 4 oocitos fueron inyectados con 3 nmoles de [U-¹⁴C]glucosa que contenían alrededor de 50.000 cpm. Las células se preincubaron durante 4 horas a temperatura ambiente a 4°. Se midió la incorporación de glucosa en glicógeno y CO₂. Las condiciones de preincubación fueron las que siguen. Símbolos vacíos: temperatura ambiente; símbolos llenos: 4°.

microinyectados con [^{14}C]-glucosa; se dejaron en incubación 1 h antes de medir la incorporación de marca en glicógeno y en CO_2 .

Actividad hexoquinásica de los oocitos

Las hexoquinasas catalizan la primera reacción de la utilización de glucosa en las células. En oocitos de rana se han descrito 2 isoenzimas que corresponden probablemente a las hexoquinasas B y C (Radojković y Ureta, 1982). Como se describió anteriormente, los sueros anti-hexoquinasa B y anti-hexoquinasa C se prepararon usando como antígenos las enzimas de músculo e hígado de la rana, respectivamente. Por lo tanto era indispensable saber si los antisueros reconocerían a las hexoquinasas de los oocitos. Ello implicó medir la actividad de las enzimas en estas células, y estudiar el reconocimiento de ellas por los antisueros correspondientes. Se midió la actividad hexoquinásica total en líquidos sobrenadantes provenientes de la centrifugación de un homogeneizado de células y en oocitos intactos.

1. Actividad hexoquinásica in vitro.

La medición de actividad hexoquinásica in vitro en extractos crudos de oocitos es difícil, en parte por los bajos niveles de actividad y en parte porque la homogeneización de las células produce extractos muy densos y ácidos. Después de varias pruebas se logró una preparación adecuada mediante el control del pH durante la homogeneización y la obtención del líquido sobrenadante

(ver Medición de la actividad hexoquinásica en oocitos, pág. 30). El líquido sobrenadante se diluyó alrededor de 25 veces en el medio de incubación para lograr una buena fosforilación de [^{14}C] 2-desoxiglucosa. La actividad se midió con 2-desoxiglucosa marcada para poder compararla con la actividad hexoquinásica de oocitos intactos. La reacción es lineal en el tiempo al menos hasta los 60 min (Fig. 20) y en estas condiciones la actividad hexoquinásica es de 120 pmoles de 2-desoxiglucosa-6-P/min/oocito. Cuando la actividad se mide espectrofotométricamente se obtiene la transformación de 700 pmoles de glucosa/min/oocito.

Cuando se cromatografía el líquido sobrenadante en una columna de DEAE-celulosa, se obtiene un pico que representa aproximadamente el 95% de la actividad hexoquinásica del oocito y una segunda fracción que no siempre se separa bien de la primera (Fig. 21). Estas son las formas que corresponderían a las hexoquinasas C y B, respectivamente.

2. Actividad hexoquinásica in vivo.

La actividad hexoquinásica presente en oocitos intactos se midió cuantificando el producto de la reacción, 2-desoxiglucosa-6-P, después de haber microinyectado los oocitos con [^{14}C]-2-desoxiglucosa. Antes de la microinyección del sustrato marcado los oocitos se preincubaron a temperatura ambiente durante tiempos variables. En la figura 22 aparece la curva de progreso para esta reacción. Como se puede ver, la reacción no es lineal en el tiempo, cosa que no ocurriría con el sistema in vitro. Ello podría

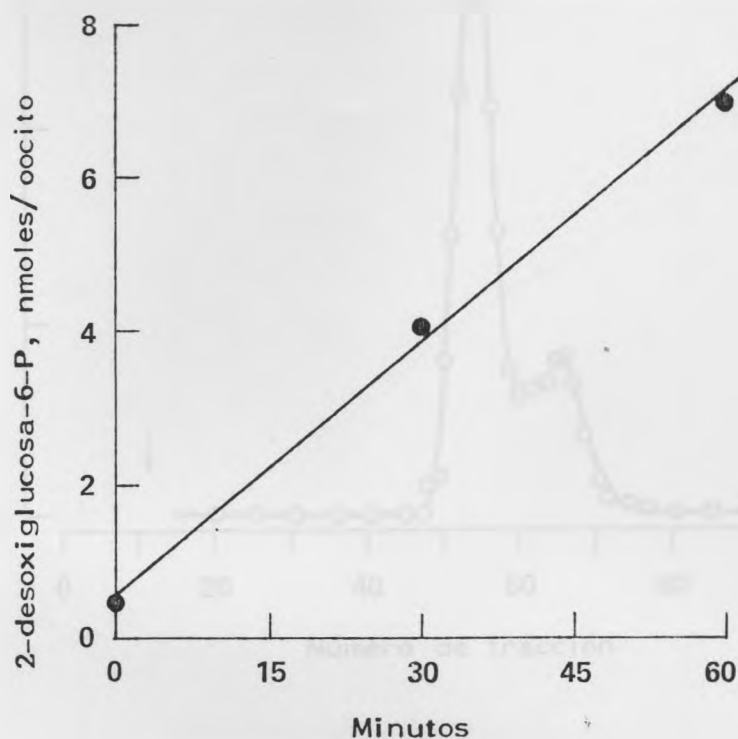


Figura 20. Actividad hexoquinásica en extractos de oocitos. Se preparó un homogeneizado al 33% de 1000 oocitos en amortiguador Hepes. Después de centrifugar a $30.000 \times g$ durante 1 h, se midió la actividad enzimática por el método radiactivo descrito en Materiales y Métodos, pág. 30.

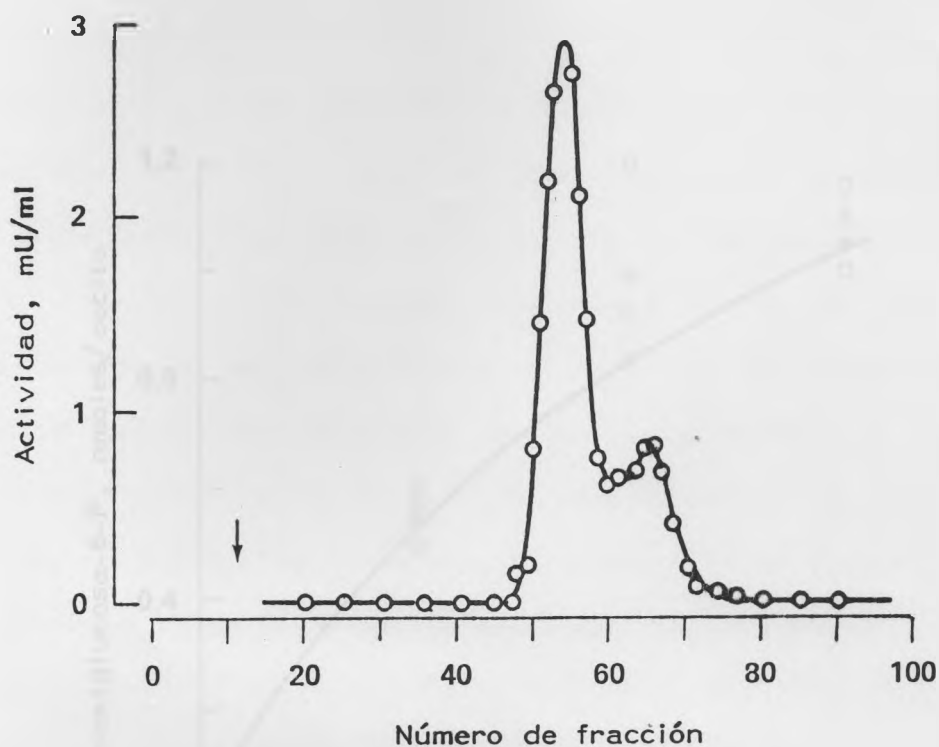


Figura 21. Hexoquinasas de oocitos: cromatografía en DEAE-celulosa. El líquido sobrenadante proveniente de la centrifugación de un homogeneizado de 600 oocitos (ver pág. 30) se colocó en una columna de DEAE-celulosa de 8 ml equilibrada en amortiguador Hepes a pH 7,5. Se lavó con 40 ml de amortiguador y las proteínas se eluyeron con KCl en un gradiente lineal de 0 a 0,35 M en el mismo amortiguador. La actividad enzimática de las fracciones se midió por el método radiactivo descrito en la pág. 30 excepto que se usó [^{14}C]glucosa 0,5 mM como sustrato. La flecha ↓ indica el comienzo del gradiente.

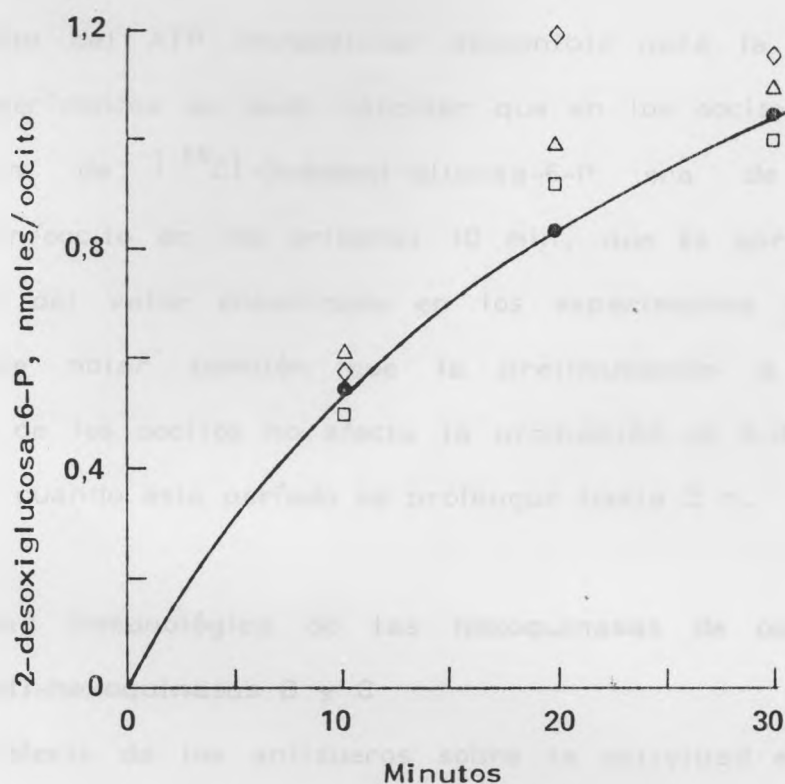


Figura 22. Actividad hexoquinásica en oocitos: medición in vivo.

Grupos de 4 oocitos se preincubaron durante tiempos variables en solución Barth a temperatura ambiente y después se microinyectaron con 50 nl de [^{14}C]2-desoxiglucosa que contenía alrededor de 50.000 cpm. Las células se incubaron durante tiempos variables en solución Barth a temperatura ambiente. La incorporación de radiactividad en [^{14}C]2-desoxiglucosa-6-P se midió por el método radiactivo descrito en Materiales y Métodos, pág.30 . Los tiempos de preincubación fueron como sigue, en horas. ● : 0; ◇ : 0,5; △ : 1; □ : 2.

deberse, entre otras razones, a inactivación de la enzima o agotamiento del ATP intracelular disponible para la reacción. De estos experimentos se pudo calcular que en los oocitos intactos la producción de [^{14}C]-2-desoxi-glucosa-6-P era de 40 a 50 pmoles/min/oocito en los primeros 10 min, que es aproximadamente la mitad del valor encontrado en los experimentos in vitro. Es interesante notar también que la preincubación a temperatura ambiente de los oocitos no afecta la producción de 2-desoxiglucosa-6-P, aún cuando este período se prolongue hasta 2 h.

Reactividad inmunológica de las hexoquinasas de oocito con los sueros anti-hexoquinasas B y C

El efecto de los antisueros sobre la actividad enzimática de las hexoquinasas de oocitos de rana se estudió tanto in vitro como in vivo.

1. Estudios in vitro

Cuando a una alícuota de líquido sobrenadante (1,4 mU de hexoquinasa) obtenido por centrifugación de un homogeneizado de oocitos se agregaba 0,1 ml de suero anti-hexoquinasa C crudo se obtenía aproximadamente un 40% de desaparición de la actividad enzimática después de una incubación de 30 min a 30° y 20 h a 4°. Cuando se agregaba suero anti-hexoquinasa B a la preparación, el resultado obtenido no era significativamente distinto del que se obtenía con el suero control.

El efecto de los sueros también se estudió usando los conjuntos de fracciones con actividad enzimática provenientes de la cromatografía de DEAE-celulosa, que correspondían supuestamente a las hexoquinasas B y C del oocito. El suero anti-hexoquinasa C purificado producía 70% de inactivación de la primera fracción. La actividad hexoquinásica de esta misma fracción no era alterada en cambio por el suero anti-hexoquinasa B (Fig. 23). No fue posible investigar el efecto de los antisueros sobre la segunda fracción (supuestamente hexoquinasa B) que se obtenía de la columna de DEAE-celulosa, ya que la actividad hexoquinásica de ella era muy poca e inestable.

2. Estudios in vivo

El efecto de los anticuerpos sobre la reacción hexoquinásica se estudió microinyectando las inmunoglobulinas en los oocitos y, después de 2 h de preincubación, microinyectando [^{14}C]-2-desoxiglucosa. El producto de la reacción, 2-desoxiglucosa-6-P, se separó en columnas de Dowex-1-formiato como se describió anteriormente. En los oocitos microinyectados con anticuerpos anti-hexoquinasa C se obtenía 30 a 40% de inhibición de la producción de 2-desoxiglucosa-6-P. No fue posible detectar inhibición de la actividad hexoquinásica en los oocitos microinyectados con anticuerpos anti-hexoquinasa B. Así por ejemplo, la producción de 2-desoxiglucosa-6-P era 690 pmoles en 30 min en oocitos microinyectados con IgG control. En cambio, los oocitos microinyectados con anticuerpos

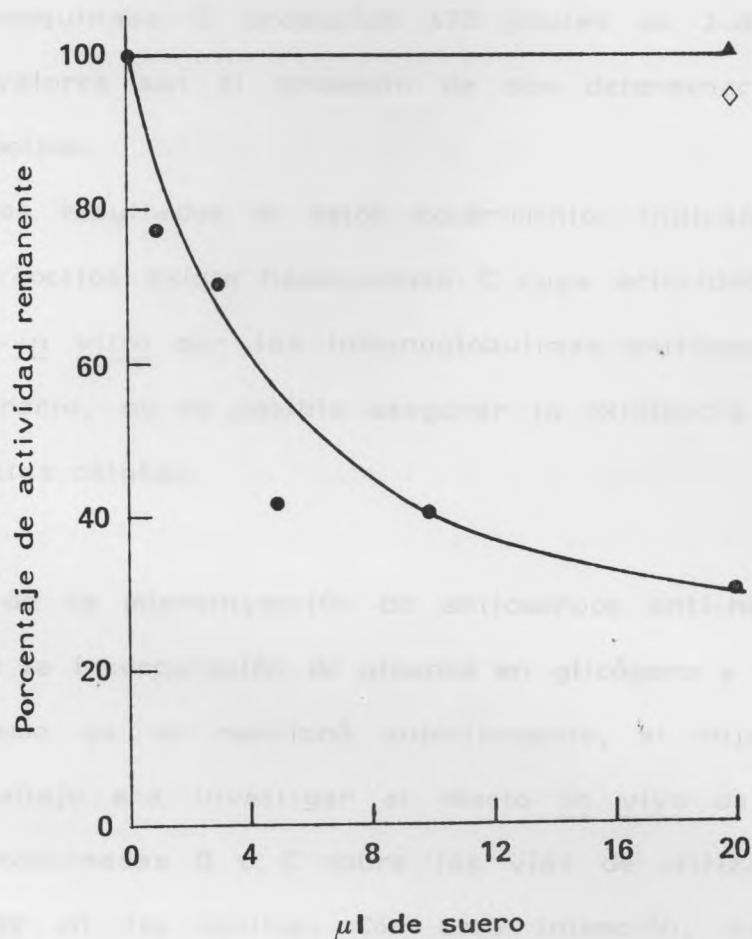


Figura 23. Inhibición de la actividad de hexoquinasa C de oocitos por suero anti-hexoquinasa C. Cantidades variables de IgG purificadas se incubaron con 0,6 mU de hexoquinasa semipurificada de oocitos proveniente de la primera fracción obtenida en la cromatografía de DEAE-celulosa. La incubación se hizo en un volumen final de 0,24 ml durante 2 h a temperatura ambiente. Después de centrifugar 10 min se midió actividad enzimática en el líquido sobrenadante mediante el método espectrofotométrico. Se usaron las IgG que se indican: ● : anti-hexoquinasa C; ▲ : anti-hexoquinasa B; ◇ : control.

anti-hexoquinasa C producían 470 pmoles de 2-desoxiglucosa-6-P. Estos valores son el promedio de dos determinaciones en grupos de 4 oocitos.

Los resultados de estos experimentos indican claramente que en los oocitos existe hexoquinasa C cuya actividad es inhibida in vivo e in vitro por las inmunoglobulinas anti-hexoquinasa C. Por el contrario, no es posible asegurar la existencia de la isoenzima B en estas células.

Efecto de la microinyección de anticuerpos anti-hexoquinasas B y C sobre la incorporación de glucosa en glicógeno y CO_2 .

Como ya se mencionó anteriormente, el objetivo central de este trabajo era investigar el efecto in vivo de los anticuerpos anti-hexoquinasas B o C sobre las vías de utilización de glucosa presentes en los oocitos. Con esta intención, varios grupos de oocitos fueron microinyectados con aproximadamente 50 nl de inmunoglobulina control, anti-hexoquinasa B o anti-hexoquinasa C. Después de un período de preincubación de 2 h a temperatura ambiente, se microinyectaron todos los oocitos con [^{14}C]-glucosa. Luego, grupos de 4 oocitos se dejaron incubando 1 h a temperatura ambiente con agitación para medir posteriormente la incorporación en glicógeno y CO_2 .

El anticuerpo anti-hexoquinasa C provoca una inhibición drástica de la incorporación de marca en el glicógeno, inhibición

que llega a 70-80% en 1 h de incubación (Fig. 24). El anticuerpo anti-hexoquinasa B, en cambio, no tiene efecto sobre la síntesis de glicógeno, siendo los valores de incorporación iguales a los obtenidos en oocitos microinyectados con IgG control. Ninguno de los anticuerpos afecta claramente la incorporación de glucosa en CO_2 . Sin embargo, es posible apreciar que en los oocitos microinyectados con anticuerpos anti-hexoquinasa C, desaparece el período de latencia que se observa para la incorporación de marca en CO_2 . Esta fase de retardo para dicha incorporación es característica de todos los experimentos en los cuales se ha medido la producción de CO_2 a partir de intermediarios marcados (comunicación personal Dr. Tito Ureta).

La desaparición de la fase de retardo se ve también claramente en otro experimento en el que se comparan oocitos inyectados con anticuerpos anti-hexoquinasa C con oocitos inyectados con IgG control (Fig. 25).

Los datos numéricos sobre el efecto del anticuerpo anti-hexoquinasa C se muestran en la Tabla 3. Los experimentos 1 y 2 corresponden a las figuras 24 y 25, respectivamente.

Los experimentos de microinyección de anticuerpos muestran que la hexoquinasa C solo participa en la vía que sintetiza glicógeno. Este resultado sugiere que en las dos vías que utilizan glucosa en el oocito participarían isoenzimas diferentes para fosforilar glucosa.

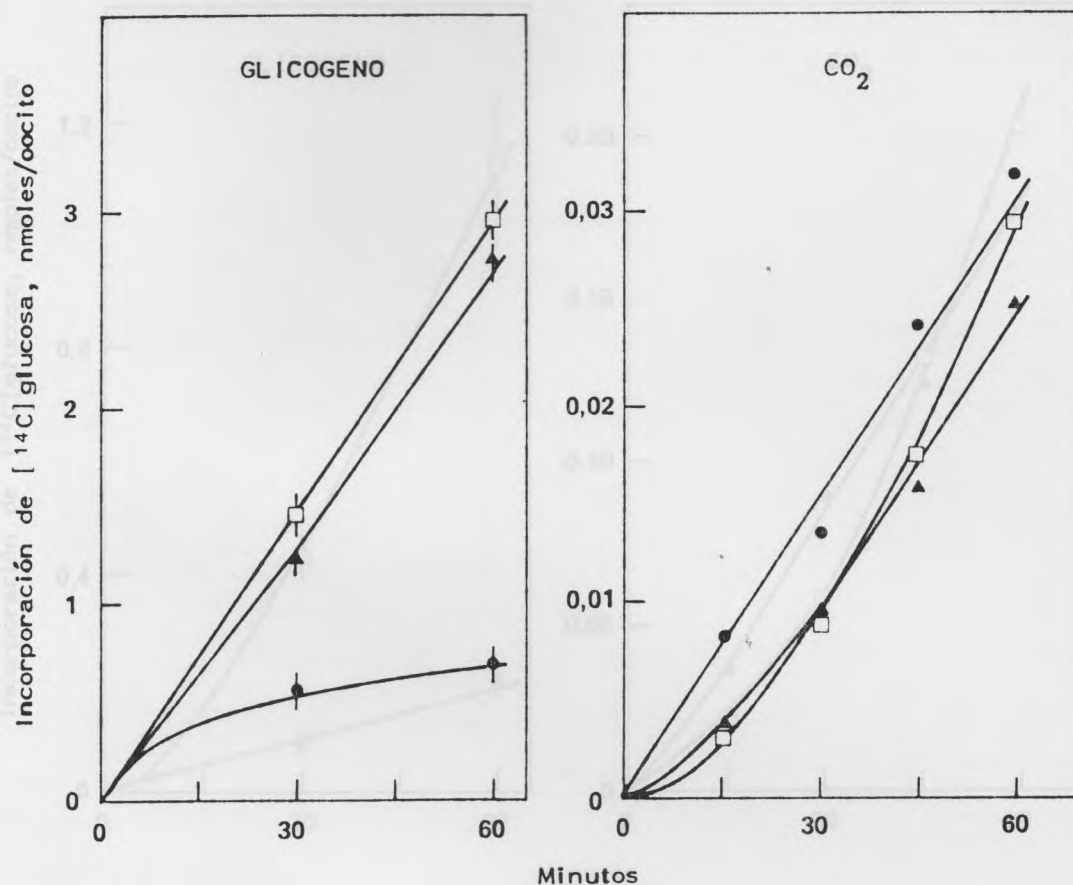


Figura 24. Efecto de la microinyección de anticuerpos anti-hexoquinasas B y C sobre la síntesis de glicógeno y CO_2 . Grupos de 4 oocitos se microinyectaron con 50 nl de IgG y se preincubaron en solución Barth a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente se microinyectaron con 3 nmoles de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucosa (aproximadamente 50.000 cpm) y se incubaron durante tiempos variables en solución Barth a temperatura ambiente. Se midió la incorporación de ^{14}C proveniente de glucosa radiactiva en glicógeno y CO_2 (pág. 33). Los anticuerpos inyectados se identifican como sigue. ●: anti-hexoquinasa C; ▲: anti-hexoquinasa B; □: IgG control. Los resultados son el promedio de determinaciones en 5-7 oocitos $\pm$ E.S.

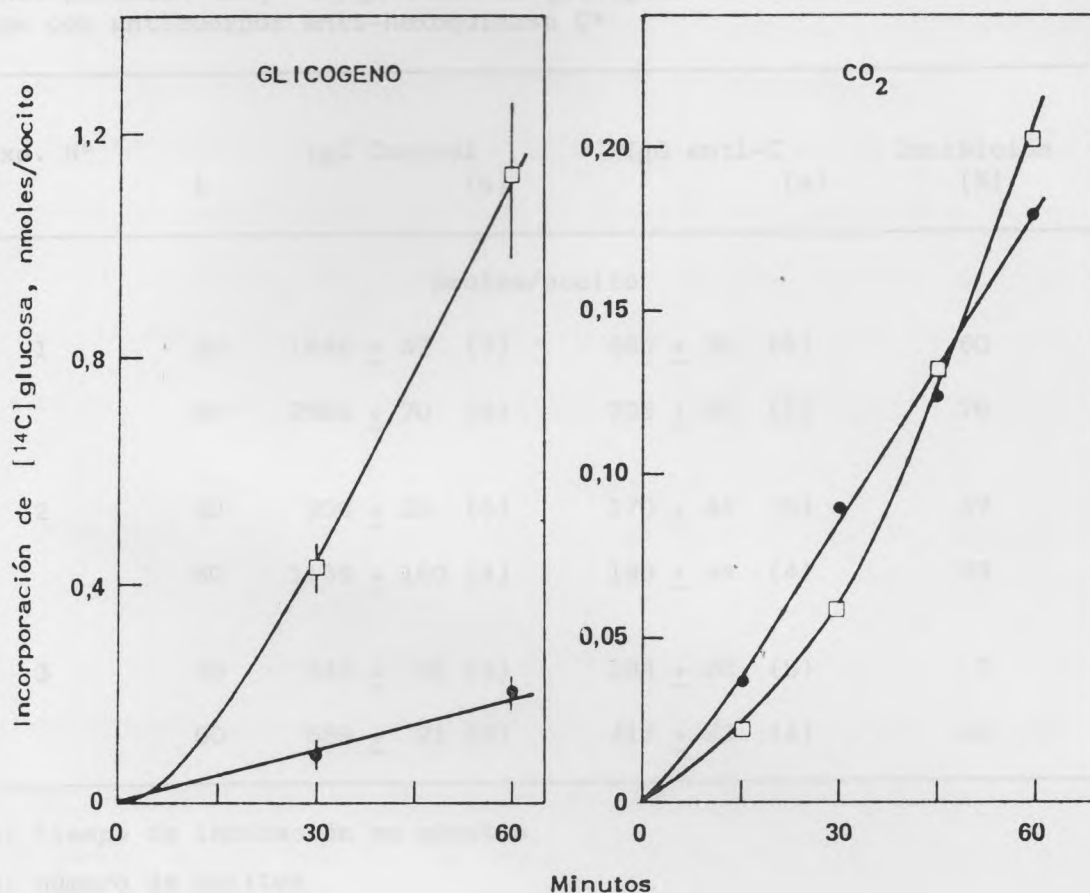


Figura 25. Efecto de la microinyección de anticuerpos anti-hexokinasa C sobre la síntesis de glicógeno y CO₂. Grupos de 4 oocitos se microinyectaron con 50 nl de IgG y se preincubaron en solución Barth a temperatura ambiente durante 2 h. En seguida se microinyectaron con 3 nmoles de [U-¹⁴C]glucosa (aproximadamente 50.000 cpm) y se incubaron durante tiempos variables en solución Barth a temperatura ambiente. Se midió la incorporación de ¹⁴C proveniente de glucosa radiactiva en glicógeno y CO₂ (pág. 33). Los anticuerpos inyectados se identifican como sigue. ●: anti-hexokinasa C; □: IgG control. Los resultados son el promedio de determinaciones en 4-5 oocitos + E.S.

Tabla 3

Incorporación de [^{14}C] glucosa en glicógeno en oocitos microinyectados con anticuerpos anti-hexoquinasa C*

Exp. N°	t	IgG Control (n)	IgG anti-C (n)	Inhibición (%)
pmoles/oocito				
1	30	1446 $\pm$ 47 (7)	580 $\pm$ 35 (6)	60
	60	2961 $\pm$ 70 (6)	705 $\pm$ 30 (5)	76
2	30	308 $\pm$ 28 (5)	170 $\pm$ 44 (5)	47
	60	1159 $\pm$ 160 (4)	199 $\pm$ 44 (4)	83
3	30	343 $\pm$ 21 (3)	284 $\pm$ 20 (5)	7
	60	689 $\pm$ 21 (6)	417 $\pm$ 23 (4)	40

t: tiempo de incubación en minutos

n: número de oocitos

*: Las técnicas de microinyección y de determinación de glicógeno fueron descritas en Materiales y Métodos. El glicógeno se midió en oocitos individuales y los resultados se expresaron como pmoles de [^{14}C] glucosa incorporados por oocito en 30 o 60 minutos $\pm$ ES.

DISCUSION

Isoenzimas fosforilantes de glucosa en vertebrados

La fosforilación de la glucosa es la primera reacción que inicia el metabolismo de este compuesto, ya sea hacia la glicólisis, la síntesis de glicógeno, la vía de las pentosas o la vía de los ácidos urónicos. La reacción de fosforilación es catalizada por enzimas denominadas hexoquinasas (E.C. 2.7.1.1):



En un gran número de organismos existen isoenzimas o formas moleculares múltiples de la enzima. Poco después del reconocimiento de la existencia de dos isoenzimas fosforilantes de glucosa en el hígado de rata (DiPietro *et al.*, 1962; Walker, 1963; Viñuela *et al.*, 1963), González y colaboradores (1964) separaron de la misma fuente cuatro isoenzimas, las que denominaron A, B, C y D de acuerdo al orden de elución de una columna de DEAE-celulosa. Se les llama también I, II, III y IV de acuerdo con su migración electroforética (Katzen *et al.*, 1965).

Las cuatro hexoquinasas presentan diferente distribución tisular, variando también el tipo de isoenzimas que aparece en diferentes organismos en un mismo tejido. Las isoenzimas A, B y C tienen valores de K_m bajos para glucosa (30-150 μM) y peso molecular de aproximadamente 100.000 daltons. La isoenzima D en

cambio, tiene una alta K_m para glucosa (6 mM), un peso molecular aproximado de 50.000 daltons, y se la encuentra solamente en hígado y páncreas. La isoenzima C presenta inhibición por glucosa.

En anfibios no se han encontrado las cuatro isoenzimas coexistiendo en el mismo tejido. En hígado se dan dos perfiles de hexoquinasa: A, B y D o C B y D, nunca coexisten A y C. En el músculo, para la gran mayoría de las especies analizadas la única isoenzima presente es hexoquinasa B (Ureta 1976, Ureta et al., 1978).

Las propiedades de las hexoquinasas de vertebrados han sido revisadas extensamente por Ureta (1975, 1982).

Purificación de hexoquinasas B y C de rana

Se han purificado a homogeneidad las siguientes enzimas, todas de rata: hexoquinasa A de cerebro (Chou y Wilson, 1972), hexoquinasa B de músculo (Holroyde y Trayer, 1976; Qadri e Easterby, 1980) y hexoquinasa D o glucoquinasa de hígado (Holroyde et al., 1976) y de páncreas (Meglasson et al., 1983). Se purificó también a homogeneidad la glucoquinasa de hígado de perro (Maccioni y Babul, 1980). La purificación de hexoquinasa C ha tenido serias dificultades, principalmente debido a que esta isoenzima existe en muy pocos tejidos y, cuando está presente, la cantidad es muy pequeña. Sin embargo, algunos autores han

comunicado la purificación de la enzima a homogeneidad en hígado de rata (Wright et al., 1978), en eritrocitos de cerdo (Stocchi et al., 1983) y recientemente Radojković y Ureta (1987) purificaron simultáneamente las hexoquinasas B y C de hepatoma de Novikoff.

Con respecto a las hexoquinasas B y C de rana no existía hasta este momento un protocolo de purificación para ninguna de ellas. Intentos para unir hexoquinasa B de rana a sefarosa-glucosamina según el procedimiento descrito por Holroyde y Trayer (1976) para la enzima de músculo de rata, no prosperaron. Se trató también de repetir el diseño propuesto por Qadri y Easterby (1979) en el cual la etapa clave en la purificación de la enzima de rata es la elución por afinidad desde una columna de fosfocelulosa. En nuestro caso, se logró adsorber la hexoquinasa de rana a la matriz, pero no fue posible encontrar las condiciones para la elución.

El protocolo propuesto en este trabajo para la purificación de hexoquinasa B de músculo de rana es el resultado de una combinación de técnicas cromatográficas tradicionales con una cromatografía de pseudo-afinidad en sefarosa-azul de Cibacron. La enzima de rana se comporta de manera muy similar a la hexoquinasa B de tumor de Novikoff puesto que la purificación de esta última incluye una cromatografía de afinidad en agarosa-azul 2. Al igual que la hexoquinasa de rana, la enzima de hepatoma

se eluye de la columna con ATP 5 mM, en las mismas condiciones que las descritas para la isoenzima de rana.

La preparación final de hexoquinasa B de músculo de rana obtenida por nosotros fue purificada 2900 veces con un rendimiento de 5%. Tiene una actividad específica que varía entre 12 y 18 U/mg de proteína. Este valor es notoriamente más bajo que los que se obtienen para las hexoquinasas de músculo de rata (210 a 120 U/mg según los autores citados) o de hepatoma (86 U/mg). Ello podría deberse por un lado, a que se parte con una actividad específica 10 veces más baja que en los casos mencionados. Además, la enzima es muy lábil y se inactiva fácilmente. Por otra parte, la baja actividad específica de la enzima de músculo de rana podría ser característica de la especie.

En relación a la hexoquinasa C, se probaron las técnicas convencionales para purificación de proteínas que se usan habitualmente en nuestro laboratorio, en diferentes condiciones y en distinto orden. Sin embargo la fracción más purificada presentaba normalmente 6 a 8 bandas de proteína en geles de poliacrilamida. Como se requería en forma urgente la enzima homogénea para la preparación de anticuerpos, se decidió concentrar la enzima proveniente de Sephacryl (purificada 400 veces y con una actividad específica cercana a 2 U/mg proteína) y someterla a electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida. Se cortó la banda del gel que correspondía a la hexoquinasa C y se usó para la obtención del anti-suero correspondiente (ver Materiales y Métodos, pág. 24).

La purificación de hexoquinasa C de rana es, por lo tanto, un problema no resuelto. Con la idea de encontrar alguna condición para una etapa de cromatografía de afinidad, se ensayó la metódica propuesta por Stocchi y colaboradores (1983) para la purificación de hexoquinasa C de eritrocitos de cerdo. De esta manera, se pudo unir la isoenzima C de hígado de rana a sefarosa-N-hexanoilglucosamina. Las condiciones para eluir la enzima de rana de la matriz son ligeramente distintas a las descritas para la hexoquinasa de eritrocito. Esta etapa de purificación aumentó 20 veces la actividad específica de una preparación de hexoquinasa C de rana proveniente de una cromatografía en DEAE-celulosa. Por lo tanto existen buenas perspectivas para intentar la purificación de la enzima como proyecto futuro.

Los valores que aparecen en la tabla de purificación para hexoquinasa C (Tabla 2, pág. 49) se muestran sólo como ejemplo del procedimiento, puesto que para calcularlos se han hecho varias suposiciones. Así por ejemplo, como en el citosol se mide la actividad hexoquinásica total del hígado, la actividad correspondiente a hexoquinasa C se estimó suponiendo que ella representa un 40% de la actividad total. Por otra parte, la hexoquinasa C presenta inhibición por el sustrato glucosa, de tal manera que los valores de actividad obtenidos durante todo el proceso debieran multiplicarse al menos por un factor de 2.

Caracterización inmunológica de las hexoquinasas B y C de rana

El suero anti-hexoquinasa B se preparó inyectando un conejo con la hexoquinasa homogénea obtenida por el protocolo descrito en este trabajo. La obtención del suero anti-hexoquinasa C merece un comentario especial puesto que, al no contar con la enzima homogénea, se usó como antígeno la banda del gel de poliacrilamida que tenía la actividad hexoquinásica. Se intentó eluir la enzima de la tajada del gel de acuerdo con la técnica descrita por Braatz y McIntire (1977) que consiste en someter las tajadas de gel que contienen la enzima a una electroforesis reversa. Sin embargo, el rendimiento obtenido fue muy bajo. Se optó entonces por inyectar la hexoquinasa incluida en el gel, como se describió anteriormente.

1. Reconocimiento de hexoquinasas B y C por los antisueros respectivos.

Los sueros anti-hexoquinasas B y C son inhibidores de la actividad de las enzimas, pero dada la naturaleza policlonal de ellos, no sabemos si la inactivación se produce por interacción de anticuerpos con el sitio activo, con regiones adyacentes a él o con otras regiones de la proteína.

La unión de los sueros a las enzimas se midió por ELISA. Los títulos (valor que corresponde a la dilución de suero con la cual se alcanza la mitad de la absorbancia máxima) obtenidos

por esta técnica fueron 1.024 para el suero anti-hexoquinasa B y 16.384 para el suero anti-hexoquinasa C. Este resultado indica que si el antígeno está inmovilizado en fase sólida, el suero anti-hexoquinasa C es más potente que el suero anti-hexoquinasa B. Sin embargo, Smith y Wilson (1986) han comunicado que cuando la hexoquinasa A de cerebro de rata se adhiere a la placa de ELISA se desnatura en alto grado. Por lo tanto, al usar esta técnica se miden de preferencia aquellos anticuerpos que reconocen a la enzima desnaturada. Es posible, por lo tanto, que el suero anti-hexoquinasa C esté reconociendo esencialmente hexoquinasa C desnaturada. Smith y Wilson proponen una modificación del método ELISA que mantiene a la enzima en conformación nativa. Sería interesante caracterizar nuestros sueros por ambos métodos, en primer lugar para ver si hay diferencia en los títulos que se obtienen, y luego, si las hubiere, ver si ellas dicen algo en cuanto a la composición de los antisueros, vale decir, si existe preferencia por la enzima desnaturada o nativa.

Al medir el efecto de los anti-sueros sobre la actividad enzimática de las hexoquinasas B y C, se encontró que el suero anti-hexoquinasa B es mejor inactivante que el anti-hexoquinasa C. En condiciones de ensayo similares, usando suero completo y enzima sin protectores de la actividad, 25 μ l de suero anti-hexoquinasa C por mU de enzima inhiben la actividad de hexoquinasa C en un 95%. En cambio hexoquinasa B se inhibe un 100% con

menos de 1 μ l de suero anti-hexoquinasa B por mU de enzima.

Estos resultados concuerdan con la idea discutida anteriormente de que el suero anti-hexoquinasa B estaría compuesto por un mayor porcentaje de inmunoglobulinas dirigidas contra la enzima nativa, mientras que en el suero anti-hexoquinasa C estarían en mayor número aquellas que reconocen mejor la enzima desnaturada.

Un hecho interesante de recalcar es la marcada protección de glucosa y glicerol sobre la actividad de las hexoquinasas en presencia de los sueros. Este efecto es especialmente notorio en la inactivación de la isoenzima C; no es posible sobrepasar el 50% de pérdida de actividad en presencia de los protectores aún con grandes cantidades de suero. Para hexoquinasa B, en presencia de los protectores queda siempre una actividad remanente de 20%. Este efecto podría explicarse ya sea porque hay anticuerpos que se unen al sitio activo, unión que sería impedida por el sustrato glucosa, o bien el sustrato podría impedir cambios conformacionales que se producen en la enzima por unión del anticuerpo a otras regiones de la proteína. Resultados similares se han obtenido en alcohol-deshidrogenasa (Fuller y Marucci, 1971) y en hexoquinasa A de rata (Wilson, comunicación personal). Con respecto al glicerol, éste es un muy buen protector de la actividad hexoquinásica, razón por la cual se agregaba siempre a las preparaciones además de glucosa. Por lo tanto no sabemos si glicerol tiene algún efecto en la inactivación producida por los sueros, o si el

efecto observado se debe solamente a la presencia de glucosa. Queda así presentado el interesante problema del efecto de sustratos, protectores, cofactores y otros sobre la inmuno-inactivación de las enzimas.

2. Reacción inmunológica cruzada

Como ya se mencionó anteriormente, el objetivo central de este trabajo era abordar el estudio de las vías de utilización de glucosa en oocitos por inmuno-inhibición selectiva de las dos hexoquinasa presentes en estas células. Por ello, un requisito esencial exigido a cada anti-suero era su ausencia de reacción cruzada con la otra hexoquinasa. Para el caso de las hexoquinasa, existen en la literatura numerosas pruebas que indican ausencia de reacción cruzada con respecto a inhibición de la actividad de las otras isoenzimas. Craven y Basford (1969) comunicaron que un suero anti-hexoquinasa A de cerebro de bovino no afectaba la actividad de las hexoquinasa B, C o D de rata. Creighton y colaboradores (1972) encontraron que un suero anti-hexoquinasa B sólo inhibe a hexoquinasa B de rata, sin afectar las actividades de hexoquinasa A de cerebro y tejido adiposo ni hexoquinasa D de hígado de la misma especie. Otros autores (Neumann y Pfeleiderer, 1974; Neumann et al., 1974) demostraron que un suero anti-hexoquinasa A humana no precipitaba a hexoquinasa C de la misma especie, como así tampoco el suero anti-hexoquinasa C reconocía a hexoquinasa A. El suero anti-hexoquinasa

A de rata no inhibe la actividad de hexoquinasa B de músculo ni de bazo de la misma especie (Ouchi e Ishibashi, 1975).

Trabajos provenientes de nuestro laboratorio muestran que un suero anti-hexoquinasa D de rata sólo inhibe la actividad de la isoenzima D, pero no afecta a las restantes, A, B ni C (Clark-Turri et al., 1974). Suero anti-hexoquinasa A de rata sólo inhibe a ésta, sin afectar las actividades de las isoenzimas B, C y D (Núñez et al., 1985). Por último, un suero anti-hexoquinasa C de rata inhibe la actividad de la isoenzima C pero no inhibe a las hexoquinasas A ni B (Radojković y Ureta, 1987).

Los sueros anti-hexoquinasas B y C de rana descritos en esta tesis ratifican el hecho de que el antisuero dirigido contra una isoenzima no afecta la actividad de las otras isoenzimas del sistema.

Sin embargo, existe reacción cruzada cuando los sueros se caracterizan por ELISA. Ello no debería llamar la atención puesto que la comparación de las composiciones de aminoácidos de varias hexoquinasas indica gran similitud estructural entre ellas (Ureta, 1982). Esto significa que en todas las isoenzimas existen epítomos comunes que son reconocidos por los sueros, con mayor razón aún si suponemos que la enzima está desnaturada, como ya se discutió previamente. Resultados similares han sido descritos por Lawrence y Trayer (1984), quienes encontraron que las hexoquinasas A, B y D de rata reaccionaban cruzadamente entre ellas. De igual

modo Radojković y Ureta (1987), comunicaron que suero anti-hexoquinasa A de rata reaccionaba cruzadamente por ELISA con las hexoquinasas B y C de hepatoma y suero anti-hexoquinasa C de hepatoma reconocía a hexoquinasa B de la misma fuente.

Si bien en este trabajo hemos visto que con la técnica ELISA clásica se puede demostrar reacción inmunológica cruzada entre las dos hexoquinasas de rana estudiadas, pensamos que este reconocimiento sólo se obtiene en estas condiciones, ya que no hubo reacción cruzada en los experimentos de inhibición de la actividad enzimática. Sería interesante reestudiar este problema mediante la modificación "sandwich" del método ELISA (Smith y Wilson, 1986).

El oocito de rana como modelo experimental

Los oocitos de rana constituyen una población celular homogénea. Cada oocito está rodeado por una monocapa de células foliculares, cuyo volumen es despreciable en relación al volumen del oocito. Cada rana tiene alrededor de cinco mil oocitos, que se encuentran funcionalmente detenidos en la profase de la primera división meiótica. El proceso de la vitelogénesis ya se ha completado. La progesterona estimula la meiosis, que llega hasta la metafase segunda, etapa en la cual permanecen las células hasta que se produce la fertilización (Maller y Krebs, 1980). El tamaño de los oocitos (2 mm de diámetro en estadio VI de Dumont) y su

resistencia, permiten la microinyección de volúmenes apreciables de líquido. En los experimentos que se realizan en nuestro laboratorio, incluidos los de este trabajo, se inyectan alrededor de 50 nl por oocito. Como el volumen promedio de los oocitos es de 3 μ l, se está inyectando un volumen que corresponde a menos de 2% del volumen celular. Experimentos preliminares con inyecciones de 100 nl producían perturbaciones en el funcionamiento de los oocitos. Por otra parte, el gran tamaño de las células hace que su manipulación sea fácil y permite hacer mediciones metabólicas en una sola célula.

La cantidad total de proteínas es de 600 ± 12 μ g/oocito y el contenido de glicógeno es de 160 ± 4 μ g/oocito (Ureta y Radojko-vić, 1979).

Puesto que el objetivo central de este trabajo era investigar el efecto de la microinyección de los sueros anti-hexoquinasas B y C sobre las vías que utilizan glucosa en los oocitos, fue necesario buscar las condiciones apropiadas en las cuales éstos incorporan glucosa radiactiva en glicógeno y en CO_2 .

Un hecho importante que merece un especial comentario dice relación con la manera como los oocitos reciben la glucosa. La eficiencia de la incorporación de glucosa en glicógeno y en CO_2 aumenta significativamente cuando el sustrato se microinyecta en las células en lugar de ponerlo en el medio de incubación. Ello sugiere que el transporte de glucosa sería una etapa limitante en su utilización. Resultados similares fueron obtenidos por Ureta y

Radojković (1985) en las mismas células. Por otra parte, no podemos descartar la participación que pudieran tener las células foliculares que rodean al oocito. La vía de acceso de glucosa al oocito está relacionada también con el período de preincubación al cual se someten las células. Como ya se mencionó anteriormente, la preincubación de los oocitos a temperatura ambiente durante 1 o más horas disminuye en un 95% la incorporación de glucosa desde el medio de incubación en glicógeno. Sin embargo, cuando en estas condiciones la glucosa se microinyecta, el decaimiento de la síntesis de glicógeno desaparece. Estos efectos no se producen cuando la preincubación se hace a 4°. Efectos semejantes se obtuvieron para la síntesis de CO₂. Estos resultados sugieren que la temperatura afecta el mecanismo de transporte de glucosa.

A pesar de estos resultados, la preincubación de los oocitos inyectados con IgG se hizo a temperatura ambiente, puesto que existen datos que indican que el coeficiente de difusión de proteínas microinyectadas en fibroblastos es 5 veces menor a 5° que a 22° (Wojcieszyn et al., 1981). Estos mismos autores han demostrado que la difusión de IgG conjugada con fluoresceína es rápida en las células y se completa en 5 min. El coeficiente de difusión para esta molécula es de 10^{-8} cm²/segundo.

Por otra parte se ha demostrado que tanto IgG como fragmentos Fab son resistentes a la degradación intracelular, con un $t_{1/2}$ de al menos 48 h (McGarry et al., 1983). Hemos supuesto que estos resultados son aplicables al oocito de rana.

Actividad hexoquinásica de los oocitos

Existen aparentemente dos isoenzimas que fosforilan glucosa en oocitos (Radojković y Ureta, 1982), que fueron denominadas hexoquinasas B y C, por comparación del orden de elución de ellas de una columna de DEAE-celulosa con las isoenzimas del hígado de la misma especie (Ureta, 1976). Sin embargo ninguna de las dos actividades enzimáticas del oocito se han caracterizado hasta el momento. La actividad hexoquinásica total encontrada por esos autores fue de 600 pmoles de glucosa-6-P/min/oocito.

En condiciones similares, obtuvimos un valor de 700 pmoles de glucosa-6-P/min/oocito. Sin embargo, cuando la actividad de la enzima se mide por radioensayo usando 2-desoxiglucosa como sustrato, se obtienen 120 pmoles de 2-desoxiglucosa-6-P/min/oocito. Una explicación posible para la diferencia podría ser que la K_m para la 2-desoxiglucosa fuera mayor y que la actividad molecular menor que para la glucosa. Estos datos no se conocen para las hexoquinasas de oocito. Por otra parte, en experimentos in vivo en oocitos intactos la actividad era equivalente a 40-50 pmoles de 2-desoxiglucosa-6-P/min/oocito que es aproximadamente la mitad del valor encontrado en los experimentos in vitro usando el mismo método. La incorporación de glucosa marcada en glicógeno varía entre 50 y 100 pmoles de glucosa/min/oocito, valor que se correlaciona muy bien con la actividad hexoquinásica medida in vivo.

Efecto de los sueros inmunes sobre las vías de utilización de glucosa

El postulado central que se ha mantenido durante la realización de esta tesis es que de las dos hexoquinasas presentes en el oocito, una de ellas participa solamente en la vía que conduce a la síntesis de glicógeno mientras que la otra lo hace sólo en la vía de las pentosas. El problema fue abordado por microinyección de anticuerpos específicos para dichas enzimas.

El uso de la técnica de microinyección de anticuerpos en células ha aumentado notablemente en el último tiempo, particularmente después de la posibilidad de poder disponer de manera relativamente sencilla de anticuerpos monoclonales (Milstein, 1980). Ella ha permitido estudiar una gran variedad de problemas relacionados con la arquitectura de la célula, funciones celulares y vías metabólicas que parecían difíciles de abordar experimentalmente. Citaremos como ejemplo sólo algunos.

Cuando se inyectó suero anti-histonas en núcleos de oocitos de anfibio, los anticuerpos reaccionaron específicamente con histonas asociadas al DNA, interfiriendo el proceso de transcripción (Scheer et al., 1979) en fibroblastos microinyectados con un anticuerpo monoclonal anti-filamentos intermedios, se produce un colapso rápido de estas estructuras (Klymkowsky, 1981). La organización de microtúbulos y microfilamentos no se altera. Se ha obtenido información importante sobre la degradación de insulina

in vivo microinyectando anticuerpos en células derivadas de hepatoma humano (Shii y Roth, 1986). Doxsey y colaboradores (1987) han demostrado mediante la introducción de anticuerpos monoclonales anti-clatrina en células CV-1 que dicha proteína está involucrada en los procesos de endocitosis de fase fluida y endocitosis mediada por receptores.

En conjunto, estos resultados y muchos otros, indican que los anticuerpos para una variedad de proteínas son capaces de reconocer in vivo al antígeno respectivo y reaccionan con él en forma específica cuando son microinyectados en la célula.

Los experimentos destinados a producir inhibición selectiva de las hexoquinasas del oocito mediante la microinyección de anticuerpos específicos, han mostrado un resultado sorprendente. El anticuerpo anti-hexoquinasa C produce una inhibición drástica de la síntesis de glicógeno, sin alterar la producción de CO_2 . Este hecho indica claramente que la hexoquinasa C sólo está involucrada en la vía que va hacia la síntesis del polisacárido. Por lo tanto era tentador esperar que la otra hexoquinasa estuviera implicada sólo en la vía de las pentosas y al ser inhibida por el anticuerpo anti-hexoquinasa B produjera la detención de la producción de CO_2 marcado, sin afectar la incorporación de glucosa en glicógeno. Sin embargo si bien la IgG anti-hexoquinasa B no afecta la síntesis de glicógeno tampoco mostró ningún efecto sobre la producción de CO_2 .

Aunque no tenemos explicación para la desaparición de la fase de retardo en la producción de CO_2 en presencia de IgG anti-hexoquinasa C, ofrecemos la siguiente especulación. En condiciones normales, algún intermediario o producto de la síntesis de glicógeno tiene efecto retardatorio sobre el ciclo de las pentosas. Este efecto desaparece si el metabolito no se produce al estar inhibida la síntesis de glicógeno.

Existen varias maneras de interpretar estos resultados. Una posibilidad es que el conjunto de enzimas que integran la vía de las pentosas esté compartimentado de tal manera que el acceso del anticuerpo a él no sea posible. Otra alternativa es que, siendo el complejo accesible, la enzima en su interior esté oculta por el resto de los componentes de modo que existiría impedimento estérico para el reconocimiento antígeno-anticuerpo.

Estas proposiciones son difíciles de abordar experimentalmente.

Otra explicación posible es que los oocitos no contengan hexoquinasa B. Como ya se mencionó, se denominó isoenzima B a la fracción minoritaria que aparece en el perfil cromatográfico de DEAE-celulosa. Sin embargo, debido a que esta función tiene una actividad muy pequeña (5-10% de la actividad hexoquinásica total del oocito) y es muy lábil, nunca ha sido caracterizada. Podría tratarse de otra isoenzima, cosa que nos parece poco probable, o de una forma modificada de hexoquinasa C. Alternativamente, la hexoquinasa B estaría limitada a las células foliculares que

rodean al oocito, y por lo tanto no accesible al anticuerpo inyectado. Por lo tanto este es un problema que debe ser abordado en forma inmediata, buscando las técnicas apropiadas que permitan identificar esta actividad sin ambigüedades.

La presencia de hexoquinasa C en el oocito es clara como lo demuestran los experimentos de inmuno-inactivación por inmunoglobulinas anti-hexoquinasa C de hígado. El anticuerpo inhibe la actividad hexoquinásica en un extracto crudo de oocitos y en oocitos intactos. Por otra parte inhibe también la actividad enzimática de la fracción mayoritaria que se obtiene de la cromatografía en DEAE-celulosa.

Consideraciones finales

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran, por primera vez, que una isoenzima participa en una y solo una vía metabólica. Así, es válida la situación a) planteada en el "Enfoque experimental del Problema" pág. 9, situación que predice que la inactivación de una isoenzima implica supresión de sólo una de las vías de utilización de glucosa.

Por otra parte, estos resultados sugieren que no existe un "pool" único de glucosa-6-P en la célula, puesto que la incorporación de glucosa en CO_2 no es afectada: un "pool" estaría involucrado en la vía que conduce a la síntesis de glicógeno y el

otro estaría participando en la vía de las pentosas. Ello implica compartimentación funcional de las vías que utilizan el intermediario.

Existen varios trabajos en la literatura que demuestran la existencia de más de un "pool" de glucosa-6-P. Nos referiremos a los más recientes, que han sido realizados en un solo tipo celular, eliminando de esta manera artefactos que pudieran producirse en un tejido por la existencia de varios tipos celulares.

Christ y Jungermann (1987), trabajando en hepatocitos permeabilizados, encontraron que la radiactividad específica de glucosa proveniente de glicógeno endógeno radiactivo que se libera al medio de incubación no cambia por dilución con glucosa-6-P externa. Asimismo, la radiactividad específica de glucosa proveniente de glucosa-6-P marcada externa no se altera por dilución con glucosa-6-P proveniente de glicógeno endógeno. Estos resultados son incompatibles con la existencia de un solo "pool" de glucosa-6-P.

Por otra parte, Kalant y colaboradores (1987) demostraron que cuando se incubaban hepatocitos aislados con glucosa o fructosa radiactivas, las radiactividades específicas de glucosa-1-P y fructosa-6-P eran 4 veces mayor que la de glucosa-6-P. Ello indica que el glucosa-6-P formado por fosforilación de glucosa no se mezcla rápidamente con el que proviene de otras fuentes. Ello sugiere que glucosa-6-P no existe en un "pool" único.

En nuestros experimentos sería importante medir la radiactividad específica de algunos intermediarios, especialmente glucosa-6-P, glucosa-1-P, 6-P-gluconato y CO_2 , como una manera de confirmar la existencia de más de un "pool" de glucosa-6-P en los oocitos.

No podemos en este momento vislumbrar cuan generales puedan ser nuestros resultados. En el músculo, por ejemplo, que sintetiza glicógeno, no existe hexoquinasa C. Sin embargo, podría darse el caso de que en diferentes tejidos existieran distintas combinaciones de isoenzimas para la composición de una misma vía metabólica.

Una posibilidad atrayente es usar, para este tipo de experimentos, mutantes de levaduras o de E. coli que carecen de algunas isoenzimas de hexoquinasa o fosfofructoquinasa, respectivamente.

Si bien las dificultades prácticas para un estudio in vivo en células somáticas son formidables, es posible imaginar soluciones experimentales que utilicen una combinación de técnicas inmunológicas con métodos no invasivos de detección de intermediarios o productos finales específicos de las vías de utilización de glucosa.

REFERENCIAS

- Braatz, J.A. & McIntire, K.R. (1977) A rapid and efficient method for the isolation of proteins from polyacrylamide gels. Prep. Biochem. **7**, 495-509.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. **72**, 248-254.
- Brendel, K. & Meezan, E. (1974) A simple apparatus for the continuous monitoring of $^{14}\text{CO}_2$ production from several small reaction mixtures. Anal. Biochem. **60**, 88-107.
- Chou, A.C. & Wilson, J.E. (1972) Purification and properties of rat brain hexokinase. Arch. Biochem. Biophys. **151**, 48-55.
- Christ, B. & Jungermann, K. (1987) Sub-compartmentation of the 'cytosolic' glucose 6-phosphate pool in cultured rat hepatocytes. FEBS Lett. **221**, 375-380.
- Clark-Turri, L., Peñaranda, J., Rabajille, E. & Niemeyer, H. (1974) Immunochemical titration of liver glucokinase from normal, fasted, and diabetic rats. FEBS Lett. **41**, 342-344.
- Clegg, J.S. (1984a) Metabolic compartmentation and "soluble" metabolic pathways. BioEssays **1**, 129-131.
- Clegg, J.S. (1984b) Properties and metabolism of the aqueous cytoplasm and its boundaries. Am. J. Physiol. **246**, R133-R151.

- Craven, P.A. & Basford, R.E. (1969) Brain hexokinase: immuno-histochemical localization at the light microscopic level. Biochemistry 8, 3520-3525.
- Creighton, S.R., McClure, A.M., Watrous, B.J. & Hansen, R.J. (1972) Hexose-ATP phosphotransferases: comparative aspects-III. Interrelationships of animal hexokinases. Comp. Biochem. Physiol. 42, 509-516.
- DiPietro, D.L., Sharma, C. & Weinhouse, S. (1962) Studies on glucose phosphorylation in rat liver. Biochemistry 1, 445-462.
- Doxsey, S.J., Brodsky, F.M., Blanck, G.S. & Helenius, A. (1987) Inhibition of endocytosis by anti-chlathrin antibodies. Cell 50, 453-463.
- Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. J. Morph. 136, 153-180.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. J. Immunol. 109, 129-135.
- Fuller, T.C. & Marucci, A.A. (1971) Immunoenzymology of liver alcohol dehydrogenase by rabbit and guinea pig antisera. J. Immunol. 106, 110-119.
- González, C., Ureta, T., Sánchez, R. & Niemeyer, H. (1964) Multiple molecular forms of ATP: hexose-6-phosphotransferase from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 16, 347-352.
- Grossmann, S.H. & Potter, V.R. (1974) Identification of rat hepatic glucokinase after polyacrylamide disc electrophoresis. Anal. Biochem. 59, 54-62.

- Gurdon, J.B. (1974) The Control of Gene Expression in Animal Development. Harvard University Press, Cambridge, 121-126.
- Gurdon, J.B. (1976) Injected nuclei in frog oocytes: Fate, enlargement, and chromatin dispersal. J. Embryol. Exp. Morphol. 36, 523-540.
- Holroyde, M.J. & Trayer, I.P. (1976) Purification and properties of rat skeletal muscle hexokinase. FEBS Letters 62, 215-219.
- Holroyde, M.J., Allen, M.B., Storer, A.C., Warsy, A.S., Chesher, J.M.E., Trayer, I.P., Cornish-Bowden, A. & Walker, D.G. (1976) The purification in high yields and characterization of rat hepatic glucokinase. Biochem. J. 153, 363-373.
- Kalant, N., Parniak, M. & Lemieux, M. (1987) Compartmentation of glucose 6-phosphate in hepatocytes. Biochem. J. 248, 927-931.
- Kaplan, N.O., Everse, J. & Admiraal, J. (1968) Significance of substrate inhibition of dehydrogenases. Ann. N.Y. Acad. Sci. 151, 400-412.
- Katzen, H.M., Soderman, D.D. & 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.
- Klymkowsky, M.W. (1981) Intermediate filaments in 3T3 cells collapse after intracellular injection of a monoclonal anti-intermediate filament antibody. Nature 291, 249-251.

- Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- Lawrence, G.M. & Trayer, I.P. (1984) Hexokinase isoenzymes: antigenic cross-reactivities and amino acid compositional relatedness. Comp. Biochem. Physiol. 79B, 233-238.
- Lynch, R.M. & Paul, R.J. (1983) Compartmentation of glycolytic and glycogenolytic metabolism in vascular smooth muscle. Science 222, 1344-1346.
- Maccioni, R. & Babul, J. (1980) Purification and characterization of dog liver glucokinase. Arch. Biol. Med. Exp. 13, 271-286.
- MacGregor, J.S., Singh, V.N., Davoust, S., Melloni, E., Pontremoli, S. & Horecker, B.L. (1980) Evidence for formation of a rabbit liver aldolase-rabbit fructose-1,6-bisphosphatase complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 3889-3892.
- Maller, J.L. & Krebs, E.G. (1980) Regulation of oocyte maturation. Current Top. Cell. Reg. 16, 272-311.
- Markert, C.L. & Moller, F. (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 45, 753-763.
- Masters, C.J. (1981) Interactions between soluble enzymes and subcellular structure. Critical Revs. Biochem. 11, 105-143.

- McGarry, T., Hough, R., Rogers, S. & Rechsteiner, M. (1983) Intracellular distribution and degradation of immunoglobulin G and immunoglobulin G fragments injected into Hela cells. J. Cell. Biol. **96**, 338-346.
- Meglasson, M.D., Burch, P.T., Berner, D.K., Najafi, H., Vogin, A.P. & Matchinsky, F.M. (1983) Chromatographic resolution and kinetic characterization of glucokinase from islets of Langerhans. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 85-89.
- Milstein, C. (1980) Monoclonal antibodies. Sci. Am. **243**, 56-64.
- Mowbray, J. & Moses, V. (1976) The tentative identification in Escherichia coli of a multienzyme complex with glycolytic activity. Eur. J. Biochem. **66**, 25-36.
- Neumann, S. & Pfeleiderer, G. (1974) Immunological specificity of the isoenzymes I and III of human hexokinase (ATP:D-hexose 6-phosphotransferase EC 2.7.1.1). Estimation of isoenzyme pattern by quantitative immunotechniques. Biochim. Biophys. Acta **334**, 343-353.
- Neumann, S., Falkenberg, F. & Pfeleiderer, G. (1974) Purification and immunological characterization of the human hexokinase isoenzymes I and III (ATP:D-hexose 6-phosphotransferase EC 2.7.1.1). Biochim. Biophys. Acta **334**, 328-342.
- Niemeyer, H., Cárdenas, M.L., Rabajille, E., Ureta, T., Clark-Turri, L. & Peñaranda, J. (1975) Sigmoidal kinetics of glucokinase. Enzyme **20**, 321-333.

- Núñez, L., De Ioannes, A. & Ureta, T. (1985) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes from vertebrates. VIII. Immunochemical studies on mammalian hexokinase A. Comp. Biochem. Physiol. 82B, 247-253.
- Oppendoes, F.R. & Borst, P (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. FEBS Lett. 80, 360-364.
- Ottaway, J.H. & Mowbray, J. (1977) The role of compartmentation in the control of glycolysis. Current Top. Cell. Reg. 12, 107-208.
- Ouchi, M. & Ishibashi, S. (1975) Discrimination of antigenic sites and thiol-inhibitor-sensitive site of hexokinase isoenzymes. Biochem. J. 149, 481-483.
- Qadri, S.S. & Easterby, J.S. (1980) Purification of skeletal muscle hexokinase by affinity elution chromatography. Anal. Biochem. 105, 299-303.
- Radojković, J., Slebe, J.C., & Ureta, T. (1978) A radioassay for the hexokinase reaction. Arch. Biol. Med. Exp. 11, 73-76.
- Radojković, J. & Ureta, T. (1982) Regulation of carbohydrate metabolism in microinjected frog oocytes. Arch. Biol. Med. Exp. 15, 395-405.
- Radojković, J. & Ureta, T. (1987) Hexokinase isoenzymes from the Novikoff hepatoma. Purification, kinetic and structural characterization, with emphasis on hexokinase C. Biochem. J. 242, 895-903.

- Rinderknecht, H., Wilding, P. & Haverback, B.J. (1967) A new method for the determination of α -amylase. Experientia 23, 805-805.
- Scheer, U., Sommerville, J. & Bustin, M. (1979) Injected histone antibodies interfere with transcription of lampbrush chromosome loops in oocytes of *Pleurodeles*. J. Cell Sci. 40, 1-20.
- Seubert, W. & Schoner, W. (1971) The regulation of pyruvate kinase. Current Top. Cell. Reg. 3, 237-267.
- Shii, K. & Roth, R. (1986) Inhibition of insulin degradation by hepatoma cells after microinjection of monoclonal antibodies to a specific cytosol protease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4147-4151.
- Slein, M.W., Cori, G.T. & Cori, C.F. (1950) A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. J. Biol. Chem. 186, 763-780.
- Smith, A.D. & Wilson, J.E. (1986) A modified ELISA that selectively detects monoclonal antibodies recognizing native antigen. J. Immunol. Meth. 94, 31-35.
- Srere, P.A. & Mosbach, K. (1974) Metabolic compartmentation: symbiotic, organellar, multienzymic, and microenvironmental. Annu. Rev. Microbiol. 28, 61-83.
- Srere, P.A. (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. Annu. Rev. Biochem. 56, 89-124.

- Stadtman, E.R., Cohen, G.N., LeBras, G. & De Robichon-Szulmajster, H. (1961) Feed-back inhibition and repression of aspartokinase activity in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. **236**, 2033-2038.
- Stebbing, N. (1980) Evolution of compartmentation, metabolic channelling and control of biosynthetic pathways. In Nover, L., Lynen, F. & Mothes, K. (Eds). Cell Compartmentation and Metabolic Channeling. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 93-105.
- Stocchi, V., Magnani, M., Novelli, G., Dacha, M. & Fornaini, G. (1983) Pig red blood cell hexokinase: evidence for the presence of hexokinase types II and III, and their purification and characterization. Arch. Biochem. Biophys. **226**, 365-376.
- Toro, G.C. (1982) Purificación de glucoquinasa de hígado de rata e inducción de un antisuero específico. Tesis Licenciatura en Ciencias. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Ureta, T., Radojković, J., Díaz, N., Slebe, J.C. & Lozano, C. (1978) Comparative studies on glucose phosphorylating isoenzymes of vertebrates. Identification and characterization of amphibian liver hexokinases. Arch. Biochem. Biophys. **186**, 235-247.
- Ureta, T. & Radojković, J. (1979) Frog oocytes: a model system for in vivo studies on the regulation of glucose metabolism. Acta Cient. Venez **30**, 396-400.

- Ureta, T. & Radojković, J. (1985) Microinjected frog oocytes: a first-rate test tube for studies on metabolism and its control. BioEssays 2, 221-226.
- Ureta, T. & Radojković, J. (1987) Organization of glucose metabolism: A model of compartments by poly-isozymic complexes. In Welch, G.R. & Clegg, J.S. The Organization of Cell Metabolism. Plenum, New York., 131-142.
- Ureta, T. (1975) Phylogeny, ontogeny, and properties of the hexokinase from vertebrates. In Isozymes III-Developmental Biology (Markert, C.L. ed.) Academic Press, New York III, 575-601.
- Ureta, T. (1976) The allosteric regulation of hexokinase C from amphibian liver. J. Biol. Chem. 251, 5035-5042.
- Ureta, T. (1978) The role of isozymes in metabolism: a model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes. Current Top. Cell. Reg. 13, 233-258.
- Ureta, T. (1982) The comparative isozymology of vertebrate hexokinases. Comp. Biochem. Physiol. 71B, 549-555.
- Ureta, T. (1985) Organización del metabolismo: localización subcelular de enzimas glicolíticas. Arch. Biol. Med. Exp. 18, 9-32.
- Viñuela, E., Salas, M. & Sols, A. (1963) Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis. J. Biol. Chem. 238, PC1175-PC1177.

- Vora, S. (1982) Isozymes of phosphofructokinase. Isozymes. Current Top. Biol. Med. Res. 6, 120-167.
- 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.
- Walliman, T., Moser, H. & Eppenberger, H.M. (1983) Isoenzyme-specific localization of M-line bound creatine kinase in myogenic cells. J. Muscle Res. Cell Mot. 4, 429-441.
- Welch, G.R. (1987) Cytosociological aspects of enzyme action. In Welch, G. R. & Clegg, J.S. (Eds.). The Organization of Cell Metabolism. Plenum, New York., 367-380.
- Wilson, J.E. (1985) Regulation of mammalian hexokinase activity. In Regulation of Carbohydrate Metabolism (Beitner, R., Ed.). CRC Press, Boca Raton, Fl., 1, 45-85.
- Wojcieszyn, J.W., Schlegel, R.A. & Jacobson, K.A. (1981) Measurements of the diffusion of macromolecules injected into the cytoplasm of living cells. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. 46, 1981.
- Wolpert, J.S. & Ernst-Fonberg, M.L. (1975) Dissociation and characterization of enzymes from a multienzyme complex involved in CO₂ fixation. Biochemistry 14, 1103-1107.
- Wombacher, H. (1983) Molecular compartmentation by enzyme cluster formation. A view over current investigations. Mol. Cell. Biochem. 56, 155-164.

Wright, C.L., Warsy, A.S., Holroyde, M.J. & Trayer, I.P. (1978) Purification of the hexokinases by affinity chromatography on Sepharose-N-aminoacylglucosamine derivatives. Design of affinity matrices from free solution kinetics. Biochem. J. 175, 125-135.

Yamashita, S., Yamamoto, N. & Yasuda, K. (1979) Immunohistochemical study of lactate dehydrogenase isozymes in rat liver. Acta Histochem. Cytochem. 12, 125-140.

ANEXO 1

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS

MONOCLONALES ANTI-HEXOQUINASA B DE

MUSCULO DE RANA

En general, los sueros policlonales convencionales presentan algunas desventajas, entre las cuales mencionaré que están constituidos por una población heterogénea de anticuerpos imposible de reproducir en un nuevo animal y el requerimiento de cantidades apreciables de proteína para su preparación. Estas limitantes normalmente no se dan en los anticuerpos monoclonales. Por estas razones y fundamentalmente por la escasa cantidad de enzimas puras disponibles para las inmunizaciones, se decidió preparar anticuerpos monoclonales en ratón, comenzando por monoclonales anti-hexoquinasa B.

Parte importante de este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Alfredo de Ioannes en el laboratorio de Inmunología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Inmunización de los animales y caracterización del suero inmune

Se usaron ratones de la cepa Balb/c a los cuales se inyectó hexoquinasa B de músculo de rana homogénea como se describió en Materiales y Métodos. El protocolo de inmunización fue como sigue:

Primera inyección: 70 μ g de proteína y coadyuvante de Freund completo, en volúmenes iguales, vía intraperitoneal.

Segunda inyección: 3 meses después, 0,1 mg de proteína vía endovenosa.

Tercera inyección: 21 días después, 0,1 mg de proteína vía endovenosa.

Después de 4 días de la tercera inyección se realizó la fusión celular para obtener los hibridomas.

La respuesta inmune del animal se controló midiendo el título del suero 10 días después de la segunda inyección y el día en que se realizó la fusión. Se utilizó el ensayo ELISA, tal como se describió en Materiales y Métodos. El título obtenido después de la última inyección fue equivalente a 32.000 diluciones de suero (Fig. 26).

Por otra parte, se midió también la capacidad del suero de ratón para inhibir la actividad hexoquinásica (Fig. 27). Se puede apreciar que 10 μ l de anticuerpo inhiben el 100% de la actividad de hexoquinasa B, cuando la incubación se hace durante 1 hora a temperatura ambiente. La actividad enzimática de hexoquinasa C, en cambio, no es afectada por el antisuero.

Obtención de los hibridomas

Se siguió básicamente el protocolo de fusión de Köhler y Milstein (1975). Se usaron células de mieloma NS-Ag 4/1 las que se fusionaron con células del bazo del ratón inmunizado mediante polietilenglicol.

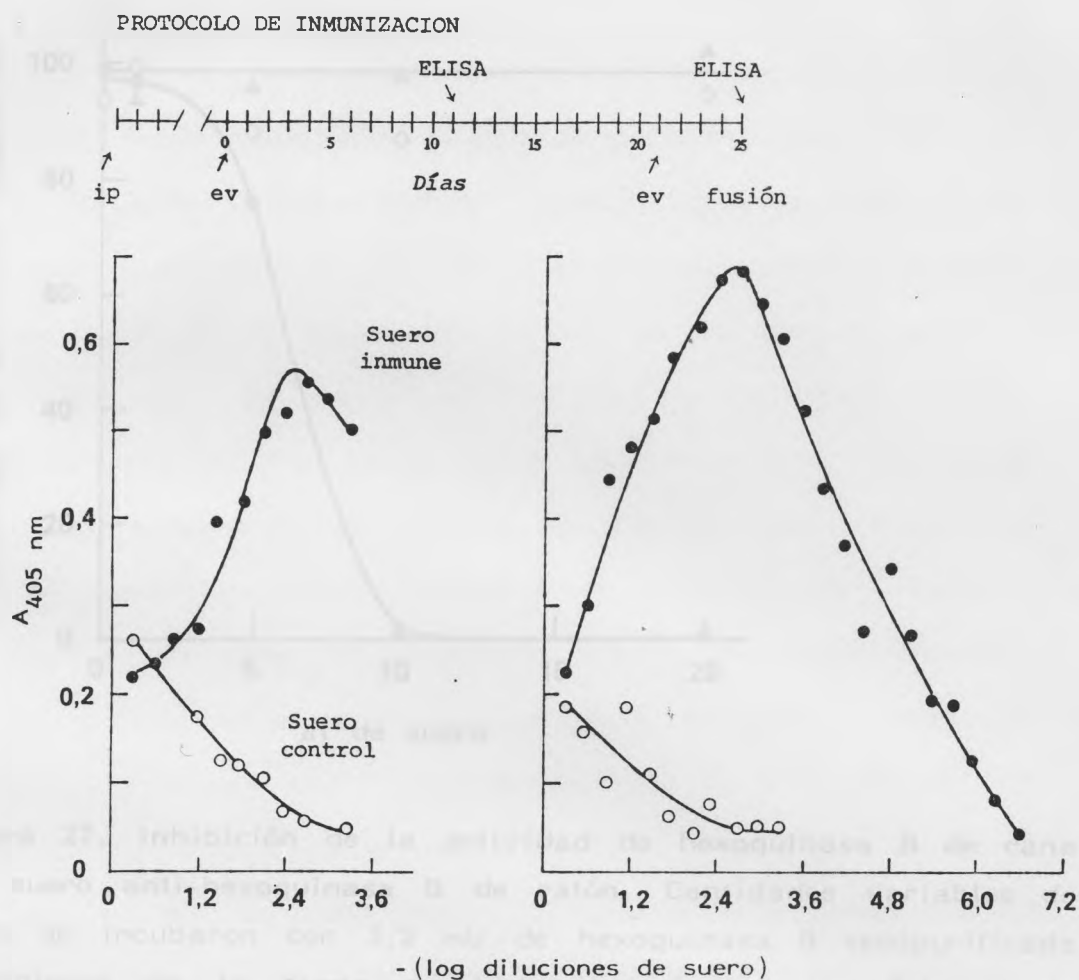


Figura 26. Titulación por ELISA del suero anti-hexoquinasa B de ratón. Se usaron diluciones seriadas de sueros, las que se expresan como $-(\log \text{ de la dilución del suero})$. El procedimiento ELISA se describió en Materiales y Métodos.

Panel izquierdo: Suero obtenido 10 días después de la segunda inyección de antígeno.

Panel derecho: Suero obtenido el día que se realizó la fusión (4 días después de la tercera inyección).

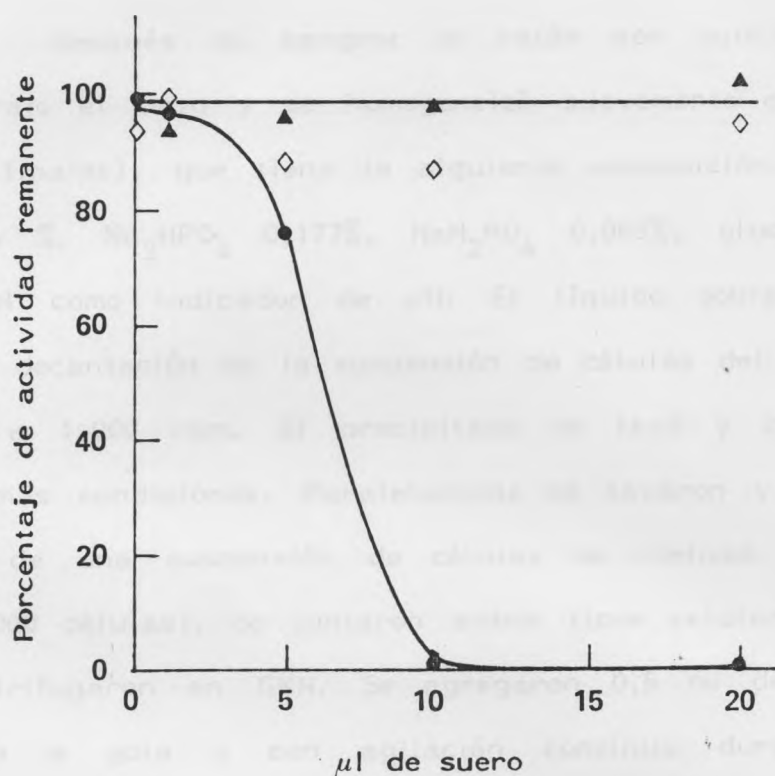


Figura 27. Inhibición de la actividad de hexoquinasa B de rana por suero anti-hexoquinasa B de ratón. Cantidades variables de suero se incubaron con 3,2 mU de hexoquinasa B semipurificada proveniente de la etapa de hidroxilapatita o con 3,4 mU de hexoquinasa C semipurificada proveniente de la etapa de DEAE-celulosa. El volumen final de incubación fue de 0,2 ml. La incubación se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de centrifugar 10 min se midió actividad enzimática en el líquido sobrenadante mediante el método espectrofotométrico. Símbolos llenos: suero inmune; Símbolos vacíos: suero control; ●: Hexoquinasa B; ▲: Hexoquinasa C.

Después de sangrar el ratón por punción cardíaca, se extrajo el bazo y se homogeneizó suavemente en medio GKN (10 ml finales), que tiene la siguiente composición: NaCl 0,8%, KCl 0,04 %, Na_2HPO_4 0,177%, NaH_2PO_4 0,069%, glucosa 0,2% y rojo fenol como indicador de pH. El líquido sobrenadante obtenido por decantación de la suspensión de células del bazo se centrifugó a 1.000 rpm. El precipitado se lavó y centrifugó en las mismas condiciones. Paralelamente se lavaron y centrifugaron 30 ml de una suspensión de células de mieloma (aproximadamente 95.000 células). Se juntaron ambos tipos celulares, se lavaron y centrifugaron en GKN. Se agregaron 0,5 ml de polietilenglicol, gota a gota y con agitación continua durante 1 min. Se agregaron 10 ml de GKN, agitando durante 5 min. Después de esperar 5 min, se llevó a un volumen de 40 ml con GKN. Se centrifugó 10 min a 1.000 rpm y el precipitado se resuspendió en medio HAT completo adicionado de 10% suero fetal, en medio RPMI-1640. El medio HAT completo contiene piruvato, β -mercapto-etanol, aminopterina, hipoxantina, timidina y antibióticos (penicilina y estreptomicina).

La suspensión final se distribuyó en placas de polivinilo de 96 pocillos, colocando 0,1 ml de suspensión en cada una de ellas. Los cultivos se incubaron en estufa a 37° en una atmósfera de aire húmedo con 5% CO_2 .

Selección y caracterización de los clones

Ocho días después de realizada la fusión comenzaron a aparecer clones crecidos en la placa. Con 25 μ l de medio de cultivo de cada uno de ellos se hizo el ensayo ELISA usando como antígeno hexoquinasa B de rana. Como controles se usaba suero de un ratón no inmunizado o BSA. Se seleccionaron aquellos clones que dieron las lecturas más altas en ELISA y se expandieron en placas de 24 pocillos con 1 ml de medio HT completo (el medio HT no contiene aminopterina) con adición de homogeneizado fresco de bazo de ratón.

La capacidad de los clones expandidos para reconocer a la hexoquinasa se controló nuevamente por ELISA. Los clones positivos se expandieron en botellas de 15 ml en medio HT completo con adición de 10% suero fetal. Se hizo una última expansión en botellas de 100 ml, previo control de los clones por ELISA.

Se observaron al microscopio alícuotas de todos los clones expandidos con el objeto de cuantificar las células y proceder finalmente a congelarlas. El número de células variaba entre 200.000 y 250.000/ml de suspensión.

Para congelar las células se preparó un medio crioprotector que contenía 10% dimetilsulfóxido y 90% suero de ternero recién nacido. Las células se centrifugaron 2 veces durante 10 min a 1.000 rpm y se resuspendieron en el medio crioprotector (aproximadamente 10×10^6 células/ml). Se guardaron alícuotas

de 1 ml en frascos plásticos, en nitrógeno líquido. Se congelaron 6 clones celulares que reaccionaban con hexoquinasa B.

Los medios de crecimiento de los clones se congelaron a -20° y se usaron para caracterizar los anticuerpos monoclonales obtenidos.

Caracterización de los anticuerpos monoclonales

1. Determinación de la clase y sub-clase de inmunoglobulinas.

La identificación de las inmunoglobulinas secretadas por los clones seleccionados se hizo mediante un ELISA modificado. Las placas se cebaban con suero anti-inmunoglobulinas totales de ratón. Después de incubar con un alícuota de los medios de crecimiento de los clones, se hacía otra incubación con sueros específicos para cada tipo de inmunoglobulina: anti-IgG1, IgG2A, IgG2B, IgG3 e IgM. El resto del procedimiento se realizó tal como se describió en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos fueron corroborados purificando los medios de crecimiento en columnas de Protein A-Sepharose CL-4B. La sefarosa unida a proteína A retiene las inmunoglobulinas de tipo G, no así las de tipo M. Las inmunoproteínas retenidas en la columna se eluían con diferentes condiciones de pH. Se obtuvieron IgG de las sub-clases 1 y 3.

La inmunoglobulina de tipo M se purificó parcialmente por precipitación con sulfato de amonio.

2. Título y concentración de proteínas de los anticuerpos purificados.

El título de los anticuerpos (dilución del suero con la cual se alcanza la mitad de la absorbancia máxima) se midió por ELISA. Estos variaron entre 1024 y 16.

La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (1976) tal como se describió en Materiales y Métodos. Las concentraciones variaban entre 0,3 y 0,7 mg de proteína/ml.

Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en la Tabla 4.

3. Efecto de los anticuerpos monoclonales sobre la actividad de hexoquinasa B.

Se probó la capacidad de cada anticuerpo monoclonal para inhibir la actividad enzimática de hexoquinasa B. Se ensayaron diferentes condiciones, entre ellas, concentración del anticuerpo, concentración de enzima, tiempo de incubación. Por otra parte, los mismos experimentos se repitieron usando combinaciones de dos anticuerpos, y usando el conjunto completo. Sin embargo, en ninguno de los casos fue posible obtener inhibición de la actividad enzimática.

Con la intención de tener otro criterio (además de ELISA) que permitiera poner de manifiesto la unión entre los monoclonales y la enzima, se prepararon matrices inmuno-absorbentes,

Tabla 4

Designación, clase y sub-clase, título y concentración de 6 anticuerpos monoclonales dirigidos contra hexoquinasa B de músculo de rana*.

Clon	Ig	Título (diluciones suero)	Proteína (mg/ml)
1A6	IgM	64	2,30
1D5	IgG3	16	0,60
2B1	IgG3	128	0,60
2C5	IgG3	1024	0,68
2A2	IgG1	16	0,42
1C5	IgG1	64	0,38
	IgG3	n.d.	0,33

*Los procedimientos para la caracterización de los anticuerpos fueron descritos en el texto de este Anexo.

ligando cada uno de los monoclonales a Sepharose 4B, según el procedimiento descrito por March y colaboradores (1974). Con este material se prepararon columnas de 1 ml por las cuales se hacía pasar la enzima. No se detectó unión de la enzima a ninguno de los inmunoabsorbentes. Como control se usó un inmunoabsorbente preparado con el suero policlonal del ratón. En este caso la enzima fue retenida en la columna.

Consideraciones finales

Los anticuerpos monoclonales obtenidos contra hexoquinas B fueron seleccionados mediante el ensayo ELISA. Este fue el único procedimiento que permitió poner en evidencia la unión de los anticuerpos a la enzima.

Estos resultados podrían deberse a varias razones. En primer lugar, como ya se discutió en la pág. 92, la técnica ELISA detecta preferencialmente enzima desnaturalada. Por lo tanto, los anticuerpos seleccionados serían aquellos que reconocen de preferencia a la enzima desnaturalada y no reconocerían a la enzima nativa. Así se explicaría el hecho de que los anticuerpos no reaccionan con la enzima nativa en solución, ya sea estando el anticuerpo en solución o inmovilizado en sefarosa.

Junto con lo anterior, los anticuerpos parecerían ser de muy baja afinidad, como lo demuestran los títulos obtenidos (ver Tabla 4).

Por las razones anteriormente expuestas, no se usaron anticuerpos monoclonales para los experimentos de microinyección en oocitos. Sin embargo, podrán ser usados para futuros experimentos sobre estructura y evolución de hexoquinasas. Es probable que usando nuevas técnicas como el test de ELISA modificado propuesto por Smith y Wilson (1986), agentes precipitantes como anti-IgG recubierto por proteína A, entre otras, los resultados sean más alentadores.

Referencias

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497.
- March, S.C., Parikh, I. & Cuatrecasas, P. (1974) A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal. Biochem. 60, 149-152.
- Smith, A.D. & Wilson, J.E. (1986) A modified ELISA that selectively detects monoclonal antibodies recognizing native antigen. J. Immunol. Meth. 94, 31-35.

