



UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE

FACULTAD DE TECNOLOGIA

ESCUELA DE QUIMICA

PURIFICACION DE GLUCOQUINASA DE HIGADO DE RATA

JORGE BABUL CATTAN ✓

Santiago de Chile

1966 ✓

Universidad Católica de Chile

Facultad de Tecnología

Escuela de Química

PURIFICACION DE GLUCOQUINASA DE HIGADO DE RATA

Memoria para optar al título de Químico y al
grado académico de Licenciado en Química.

Profesor Guía: Dr. Hermann Niemeier

Instituto de Química Fisiológica y Patológica,
Facultad de Medicina. Departamento de Química,
Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Jorge Babul Cattán

Santiago de Chile

1 9 6 6

A MIS PADRES

Mi agradecimiento al Dr. Hermann Niemeyer por su interés en el patrocinio de esta tesis y por las enseñanzas impartidas durante su desarrollo; al Dr. Tito Ureta por el interés que despertó en mí por la Bioquímica y su guía en las etapas iniciales de este trabajo, y a la Srta. Carmen González por sus consejos permanentes.

Agradezco sinceramente también al Director Profesor Julio Cabello y a los demás miembros del Instituto de Química Fisiológica y Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile la cordial acogida que me han dispensado, que me ha permitido disfrutar de un ambiente crítico y estimulante.

ABREVIATURAS USADAS

ADP: adenosín-difosfato

ATP: adenosín-trifosfato

CM-Celulosa: carboximetil-celulosa

CM-Sephadex: carboximetil-Sephadex

DEAE-Celulosa: dietilaminoetil-celulosa

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

G-6-P: glucosa-6-fosfato

G-6-PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

2-ME: 2-mercaptoetanol

NADP: nicotinamida-adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida-adenina dinucleótido reducido

6-PG: ácido 6-fosfogluconico

6-PGDH: 6-fosfogluconato deshidrogenasa

TCA: ácido tricloroacético

Tris: tris (hidroximetil) aminometano

Resumen

Este trabajo describe la purificación parcial de glucoquinasa (ATP:D-hexosa-6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.2.) de extractos de hígado de rata. Se consiguió un aumento de actividad específica de aproximadamente 400 veces por medio de un procedimiento que incluía cromatografía en CM-Sephadex, cromatografía en DEAE-Celulosa, fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía en hidroxilapatita. Se estudiaron algunas propiedades de la enzima purificada.

Summary

Glucokinase (ATP:D-hexose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2.) was partially purified from rat liver extracts. Approximately a 400-fold increase in specific activity was achieved by a procedure involving CM-Sephadex chromatography, DEAE-Cellulose chromatography, ammonium sulfate fractionation and hydroxylapatite chromatography. Some properties of the purified enzyme were studied.

1. INTRODUCCION

Dos grupos de investigadores, utilizando métodos diferentes, han caracterizado parcialmente y en forma independiente dos ATP:hexosa 6-fosfotransferasas de hígado de rata. En efecto, Walker (1, 2) y Walker y Rao (3) distinguieron mediante análisis cinético la presencia en el hígado de rata y de cobayo adultos de dos enzimas fosforilantes de glucosa, una con una K_m alta ($10^{-2}M$) y otra con una K_m baja ($10^{-5}M$). Por otra parte, en el laboratorio de Sols, Viñuela y col. (4) y Salas y col. (5) lograron separar, por medio de sulfato de amonio, dos fracciones proteicas con actividad ATP:hexosa fosfotransferásica: una caracterizada por una K_m alta ($10^{-2}M$) para glucosa, que denominaron glucoquinasa para distinguirla de la otra, de K_m baja ($10^{-5}M$), que denominaron hexoquinasa. Se diferenciaban ambas, además, por otras propiedades cinéticas, como gran capacidad para fosforilar fructosa y poca inhibición por N-acetilglucosamina de la hexoquinasa.

En 1964, en este laboratorio, González y col. (6) lograron separar, mediante cromatografía en DEAE-Celulosa, cuatro isoenzimas capaces de fosforilar glucosa y otras hexosas, y no sólo las dos descritas por los autores antes mencionados. Las denominaron A, B, C (hexoquinasas) y D (glucoquinasa) y se pueden diferenciar, además de por su comportamiento cromatográfico, por sus K_m para glucosa: $4,4 \times 10^{-5}$, $1,3 \times 10^{-4}$, $6,0 \times 10^{-6}$ y $1,8 \times 10^{-2}M$ para A, B, C y D respectivamente. La isoenzima D se puede distinguir de las otras también por el valor del cociente $V_{m\acute{a}x}$ fructosa/ $V_{m\acute{a}x}$ glucosa, que es de 0,25 para D mientras es alrededor de 1,2 para A, B y C.

Recientemente, Katzen y col. (7, 8) han confirmado, mediante electroforesis de zona en gel de almidón, la existencia de 4 isoenzimas capaces de fosforilar glucosa en hígado de rata.

En este y otros laboratorios se ha observado que la actividad fosforilante de glucosa del hígado disminuye en el ayuno (9-12) y la alimentación con dieta exenta de hidratos de carbono (12, 13), volviendo a niveles normales algunas horas después de la administración de glucosa (12, 14-19). Se ha logrado demostrar que las variaciones observadas en la actividad fosfotransferásica total del hígado corresponden a cambios en los niveles de la glucoquinasa o isoenzima D, de K_m alta, mientras que los valores del conjunto de las hexoquinasas, isoenzimas A, B y C de K_m baja, permanecen más o menos constantes en las condiciones estudiadas (4, 6, 20).

Es interesante que la disminución de la actividad fosfotransferásica del hígado que se observa en la rata diabética (9, 10, 21) corresponde a una desaparición casi total de la glucoquinasa (4, 5, 20, 22, 23). Los trabajos del grupo de Walker (1, 2, 3) y de Oliver (24) han mostrado, por otra parte, que la fracción de K_m alta, glucoquinasa, aparece inmediatamente después del nacimiento en el cuy, y a las tres semanas en la rata, mientras que la fracción de K_m baja, hexoquinasa, se encuentra presente desde la vida fetal.

Se consideró necesario purificar la isoenzima D o glucoquinasa, con el objeto de estudiar sus características cinéticas y estructurales y disponer de una enzima purificada que permita la obtención del antisuero correspondiente. El antisuero representa una herramienta útil para medir la masa de la proteína-enzima, conocer su recambio y dilucidar así el mecanismo responsable de

los cambios de actividad enzimática que se observan en las diferentes condiciones analizadas anteriormente. La glucoquinasa de hígado de conejo ha sido purificada parcialmente por el grupo de Sols (25) y se han estudiado algunas de sus propiedades.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Animales.

En este estudio se han empleado ratas albinas criadas por inbreeding en el Instituto de Química Fisiológica y Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, alimentadas con una dieta balanceada.

2.2. Preparación de Homogeneizados.

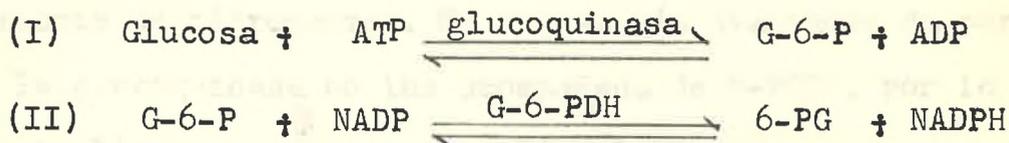
Los animales se sacrificaban por decapitación sin anestesia y se desangraban cuidadosamente. Los hígados se extraían rápidamente, se colocaban sobre hielo molido y se enjugaban con papel filtro para eliminar la mayor cantidad posible de sangre. Luego se hacían papilla en una prensa Harvard y se homogeneizaban al 50% (p/v) en una solución de Tris 10 mM, pH 7,0, EDTA 1 mM y 2-ME 6 mM (medio A). La homogeneización se efectuaba en un aparato de Potter y Elvehjem a 2-4°. Todas las operaciones de purificación que se describirán a lo largo de este trabajo se realizaban a esta temperatura.

2.3. Centrifugación del Homogeneizado.

El homogeneizado en medio A se centrifugaba durante una hora a 105.000 x g en una ultracentrífuga refrigerada Spinco, modelo L. El líquido sobrenadante de color rojizo (S_1), se obtenía por aspiración con jeringa, cuidando de no remover la capa de grasa de la parte superior.

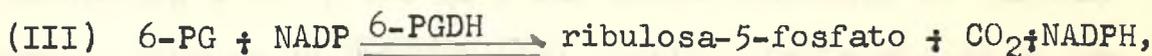
2.4. Determinaciones.

2.4.1. Actividad enzimática. Para conocer la actividad enzimática se midió la formación de G-6-P, acoplando la reacción de fosforilación a la de deshidrogenación del G-6-P y midiendo la velocidad de reducción del NADP (26):



La formación de NADPH se reconocía por el incremento en la absorbancia a 340 m μ en un espectrofotómetro Beckman modelo DU, provisto de un sistema para mantener la temperatura a 30°. La unidad de enzima es la cantidad capaz de fosforilar 1 μ mol de glucosa por minuto a 30° y la actividad específica se expresa como unidades por mg de proteína. Se usó el valor 6,22 x 10⁶ cm²/mol como coeficiente de extinción molecular del NADPH (27). El medio de reacción (1 ml) tenía la siguiente composición final (17): Tris, pH 7,5, 83,6 mM; MgCl₂ 12 mM; ATP 5 mM; EDTA 1 mM; NADP 0,5 mM y 0,05 unidades internacionales (μ moles/minuto) de deshidrogenasa. Se utilizaba como blanco un sistema semejante en el cual se omitía el ATP.

Si la reacción II se acopla a la reacción:



se obtiene la formación de otra molécula de NADPH por molécula de glucosa fosforilada y en tal caso los valores de cambio de absorbancia se dividen por 2 para obtener las unidades de enzima. Este valor teórico se comprobó en experimentos en los cuales se midió la actividad de una glucoquinasa purificada, en un sistema al que se agregaron cantidades variables de 6-PGDH.

Cuando se medía la actividad enzimática en las etapas iniciales de preparación de la enzima, antes del tratamiento con DEAE-Celulosa, los valores de cambio de absorbancia se dividían por 2, en consideración que al añadir 6-PGDH no aumentaba el cambio de absorbancia, indicando que tenían esas preparaciones suficiente deshidrogenasa. En etapas más avanzadas de purificación la glucoquinasa no iba acompañada de 6-PGDH, por lo cual no se realizaba ninguna corrección al ensayo.

El método de ensayo puede modificarse para estudiar fosforilación de hexosas cuyo producto de reacción sea convertible en G-6-P como es el caso de fructosa y manosa, si se adicionan al sistema las fosfohexosaisomerasas específicas.

2.4.2. Proteínas. Las proteínas se medían con la modificación de Miller (28) del método de Lowry y col. (29). Cuando era necesario eliminar las interferencias del 2-ME se usaba el mismo método después de precipitar las proteínas con TCA 10% y redissolverlas con NaOH 0,1 N. Esta operación se efectuaba a 4° y antes de redissolver las proteínas con NaOH se hacía un lavado con TCA al 5%.

En algunos casos las proteínas se determinaban midiendo la absorbancia a 260 y 280 m μ y las concentraciones se calculaban con la fórmula de Kalckar (30). Había interferencias al medir muestras que tenían 2-ME, ya que este compuesto presenta cierta absorción en las longitudes de onda indicadas.

2.4.3. Fosfato. La concentración de fosfato se determinaba según el método de Fiske y Subbarow (31).

2.4.4. Cloruros. La concentración de cloruros se determinaba por titulación con nitrato de plata, usando cromato de potasio como indicador.

2.5. Preparación del Material Cromatográfico.

DEAE-Celulosa (Cellex D) y CM-Sephadex se preparaban según instrucciones de los fabricantes (32, 33). Las columnas fueron empacadas con un sistema similar al descrito por Flodin (34).

2.6. Fuentes de Obtención de los Materiales.

Los siguientes materiales se obtuvieron de los productores que se indican:

ATP (lote 84 B-7332), EDTA, glicilglicina, Tris, NADP (lote 95 B-7920), de Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo., EE.UU.

NADP (N° 0334127) y G-6-PDH (C.N. 6364452) de C.F. Boehringer & Söhne, GmbH, Mannheim, Alemania.

CM-Sephadex C-50 coarse, de capacidad 4,4 meq/g (lote 8692-C) de Pharmacia, Uppsala, Suecia.

CM-Celulosa Serva (A 3647 de Gallard-Schlesinger Chemical MGF Corp., N.Y., EE.UU.

Hidroxilapatita para cromatografía (Biogel HT, N° de control 2980) y DEAE-Celulosa (Cellex D, N° de control B-2567) de capacidad 0,78 meq/g de Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal., EE.UU.

Sulfato de amonio (Special Enzyme Grade, Cat. N° 1946 Lot N° K 1698) de Mann Research Laboratories Inc. New York, EE.UU.

2-Mercaptoetanol, de Matheson Coleman & Bell, N.J., EE.UU.

6- Fosfogluconato deshidrogenasa se preparó de hígado de rata por fraccionamiento con sulfato de amonio según Glock y McLean (35), y tratamiento ulterior con CM-Sephadex.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Tratamiento con CM-Sephadex.

Alrededor de 50 ml de S_1 , provenientes de la homogeneización y centrifugación de 70 g de hígado (15 ratas), se colocaban en una columna de 2,7 cm de diámetro por 17 cm de altura de CM-Sephadex C-50. La columna era equilibrada con medio A y una vez intro-

ducido el S_1 se lavaba con medio A hasta que en el efluente no se observara absorción en el ultravioleta, fenómeno que se inscribía en un registrador automático. La actividad no se retenía en esta resina de intercambio catiónico, (6), y en la fracción obtenida al lavar la resina se recuperaba entre un 80 y 90% de la actividad inicial. La actividad específica del eluato era más o menos igual a la del S_1 original o aumentaba ligeramente (hasta 1,5 veces). Las proteínas se recuperaban entre 70 y 80%. La fracción no retenida, que llamaremos CM_E , podía guardarse a 0° durante algunos días sin pérdidas apreciables de la actividad, lo que no sucedía con el S_1 . Resultados semejantes se obtenían con CM-Celulosa.

Algunas veces el S_1 se mezclaba, en un tubo de centrifuga, con aproximadamente un volumen de CM-Celulosa o CM-Sephadex previamente centrifugado (6), obteniéndose una recuperación de actividad transferásica de alrededor de 90% después de 3 o 4 lavados con medio A.

3.2. Concentración del CM_E

La fracción CM_E se concentraba alrededor de 5 veces antes de continuar los siguientes procedimientos de purificación. Para tal efecto, la fracción era previamente congelada a -25° y sometida a una presión de 0,005 mm de Hg en un liofilizador Virtis. La actividad específica se mantenía y la recuperación de la actividad enzimática era alrededor de 100%.

Como método de concentración se empleó ocasionalmente la adición de sulfato de amonio. Incluso en un experimento de fraccionamiento a diferentes concentraciones se obtuvo una purificación de 2,1 veces, con una recuperación de 85% (Figura 1). No se hicieron más ensayos, aunque tal vez pudiera constituir un procedimiento útil de rutina.

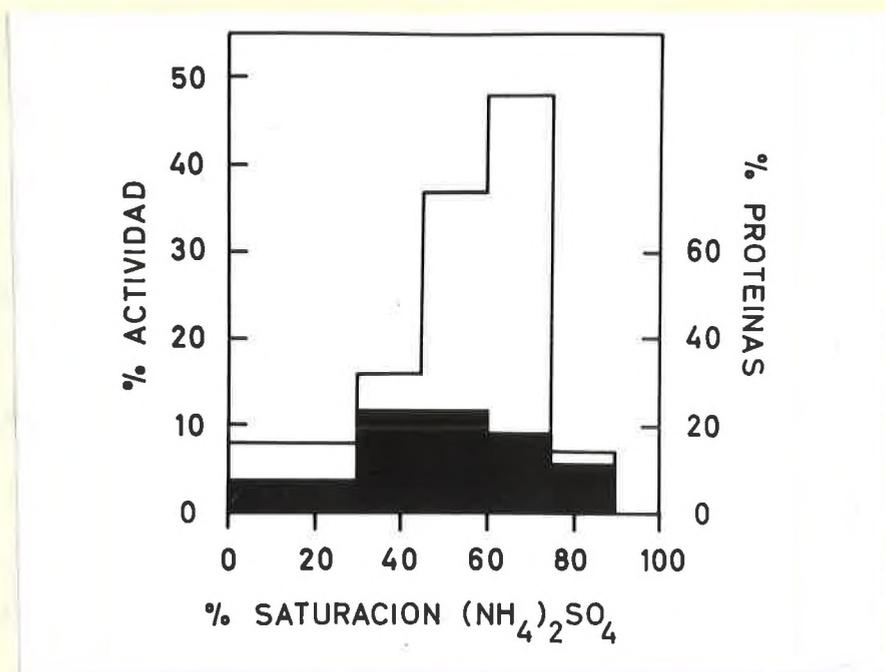


Figura 1. Fraccionamiento de CM_E con sulfato de amonio.

A 30 ml de CM_E que contenía 204 mg de proteínas y una actividad glucoquinásica de 1,45 unidades, se agregó sulfato de amonio (pH 7,7; 4°) y se separaron las fracciones que precipitan entre 0-30, 30-45, 45-60, 60-75 y 75-90% de saturación. En la figura se muestra el porcentaje de la actividad inicial (columna en blanco) y el porcentaje de las proteínas iniciales (columnas en negro) contenidas en cada fracción.

3.3. Tratamiento con DEAE-Celulosa.

La fracción CM_E previamente concentrada se introducía a una columna de DEAE-Celulosa de 2,7 cm de diámetro por 15 cm de altura, equilibrada con medio A. Luego se lavaba la columna con medio A, que arrastraba ciertas proteínas no retenidas (6). Al llegar a un mínimo la absorción al ultravioleta, se trataba la columna con KCl 0,18 M en medio A, que eluía proteínas diversas y un 70 a 80% de las hexoquinasas y sólo un 2 a 6% de la glucoquinasa. Al llegar de nuevo a un mínimo de absorción en el ultravioleta en el efluente, se comenzaba una gradiente lineal de concentración de KCl, preparada en medio A, desde 0,2 M hasta 0,4 o 0,5 M KCl. No se observaron diferencias de importancia entre una

y otra gradiente. Las cámaras de la gradiente tenían un volumen inicial de 240 ml y la elución se desarrollaba recogiendo fracciones de alrededor de 13 ml por tubo, a un flujo de 4 a 5 ml por minuto, en un colector de fracciones Buchler, provisto de un dispositivo para inscribir la absorción en el ultravioleta del líquido que emergía de la columna. Cada 2 a 4 tubos se efectuaban medidas de actividad enzimática, proteínas y cloruros. En el conjunto de los tubos seleccionados por su mejor actividad específica (DEAE-G) se recuperaba alrededor de 60% (49 a 70) de las unidades de glucoquinasa colocadas en la columna (Figura 2). La actividad específica del total del eluato seleccionado era alrededor de 20 (17 a 23) veces superior al CM_E . DEAE-G se podía guardar a 0° durante meses sin pérdidas apreciables de actividad.

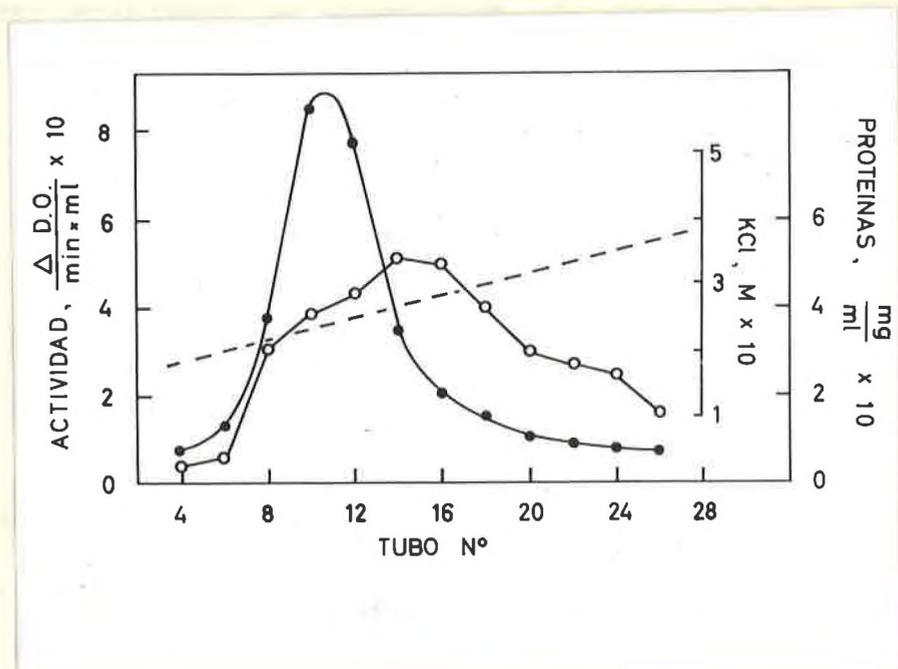


Figura 2. Cromatografía de CM_E en columna de DEAE-Celulosa.

En este experimento se usó una columna de 2,7 x 15 cm y en ella se colocaron 29 ml de CM_E concentrado que contenía 1666 mg de proteínas con una actividad glucoquinásica de 22,8 unidades. En el conjunto de los tubos 4 al 13 se obtuvo una recuperación de 49% y un aumento de 19 veces en la actividad específica. Los tubos representan fracciones de 13,4 ml. (●) actividad enzimática; (○) proteínas y (---) cloruros.

Es posible que una elución más lenta que la usada rutinariamente logre separar mejor la actividad glucoquinásica del resto de las proteínas y se obtengan así mejores rendimiento y actividad específica. El procedimiento de eluir la glucoquinasa con los gradientes de concentración anteriormente señaladas, fue el resultado de varios experimentos preliminares, en los cuales no se hizo un estudio exhaustivo de todas las variables. En uno de ellos se investigó la concentración de KCl a la cual la glucoquinasa era eluída, para lo cual se efectuaron eluciones en etapas con KCl a las siguientes concentraciones: 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35 y 0,50M, preparado en medio A. Se concluyó que la mayor parte de la actividad glucoquinásica era eluída entre 0,20 y 0,30 M de KCl. También se hicieron experimentos en que se seguía exactamente el procedimiento de separación por gradiente de concentración de las cuatro isoenzimas (tres de hexoquinasa y glucoquinasa) de acuerdo con el método de González y col.(6).

3.4. Fraccionamiento con Sulfato de Amonio.

A la fracción DEAE-G, proveniente de DEAE-Celulosa, se le añadía glucosa como estabilizante, de modo que la concentración fuera 50 mM. Después se agregaba sulfato de amonio sólido (pH 7; 4°), lentamente y con agitación, hasta alcanzar una saturación de 55%. Una vez disuelto, se continuaba agitando durante 10 minutos adicionales y después se dejaba reposar unos 30 minutos, antes de centrifugar durante 30 minutos a 28.000 x g en una centrifuga refrigerada Sorvall modelo RC2. Se descartaba el precipitado y al sobrenadante se agregaba nuevamente sulfato de amonio hasta alcanzar 80% de saturación. La solución se dejaba reposar y se centrifugaba como antes. Para calcular la cantidad en gramos de sulfato de amonio que debía agregarse, se usaba la fórmula de

Noltmann y col. (36). En el precipitado del segundo fraccionamiento se encuentra la mayor parte de la actividad glucoquinásica, recuperándose entre 53 y 63% de la actividad del DEAE-G, con un aumento de actividad específica de alrededor de 2,5 veces.

Cuando el precipitado a 80% de saturación (SA-80) era suspendido en una pequeña porción de su sobrenadante, se podía mantener durante meses, a 0°, sin pareciabes pérdidas de actividad. Se podían juntar varias preparaciones en esta etapa para continuar con el procedimiento de purificación.

Antes de llegar a normalizar el procedimiento descrito, se hicieron experimentos preliminares de fraccionamientos entre concentraciones más próximas de sulfato de amonio.

3.5. Tratamiento con Hidroxilapatita.

El precipitado obtenido con sulfato de amonio a 80% de saturación (SA-80) se disolvía en 15 ml de fosfato de potasio 5 mM, pH 6,8, preparado en medio B (glucosa 50 mM, 2-ME 6mM y EDTA 1 mM). Una vez disuelto, se colocaba en una columna de 2,7 cm de diámetro y 10 cm de altura preparada con una mezcla de 20 ml de Biogel HT con 10 g de celulosa en polvo y equilibrada con fosfato de potasio 5 mM preparado en medio B. La elución se efectuaba con un gradiente de concentración lineal de fosfato de potasio preparado en el mismo medio. El gradiente comenzaba con 5 mM pH 6,8 y terminaba con 150 mM pH 7,6, siendo 120 ml el volumen inicial de las cámaras. Se ajustaba el flujo a alrededor de 3,5 ml por minuto y se recogían fracciones de 5 o 6 ml por tubo. Cada 2 o 4 tubos se medían actividad enzimática, proteínas y fosfato. La recuperación total de la enzima era entre 80 y 90% y la del conjunto de tubos con mejor actividad específica (OH-AP) de alrededor de 60% y con una purificación de 6 veces (Figura 3). El procedimiento resultó perfectamente reproducible.

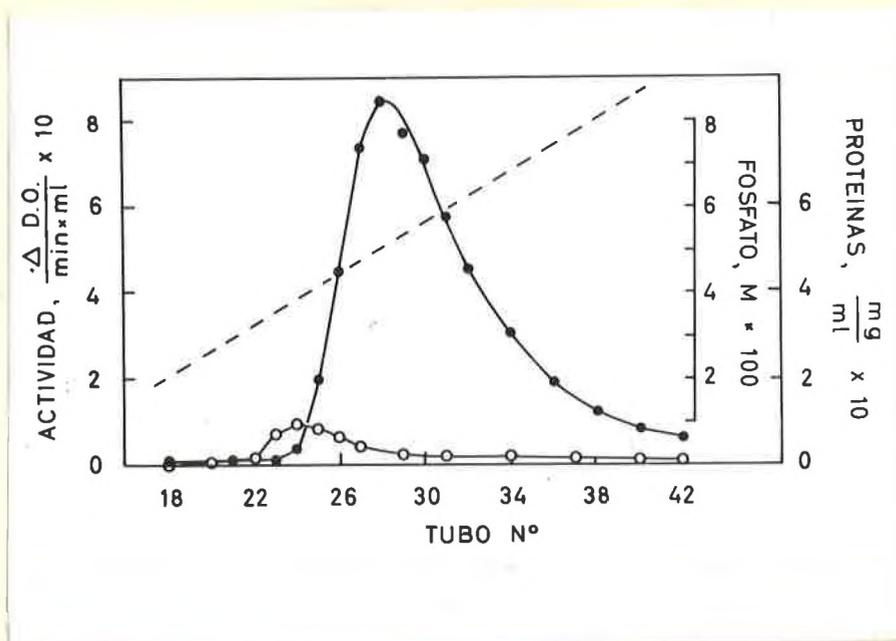


Figura 3. Cromatografía de SA-80 en columna de hidroxilapatita.

En este experimento se usó una columna de 2,7 x 10 cm y en ella se colocaron 15 ml de una solución de SA-80 en amortiguador de fosfato de potasio preparado en medio B, que contenía 15,4 mg de proteínas con una actividad glucoquinásica de 9,0 unidades. En el conjunto de los tubos 27 al 34, se obtuvo una recuperación de 53% y un aumento de 6,3 veces en la actividad específica. Los tubos representan fracciones de 6 ml. (●) actividad enzimática; (○) proteínas y (---) fosfato.

En experimentos previos en que se ensayaron otras condiciones de flujo de la columna, tamaño de las cámaras y concentración final de fosfato, y en las cuales la gradiente de concentración era más pronunciada (75 mM por 100 ml de efluyente en vez de 50 mM por 100 ml) el aumento de la actividad específica de la enzima no fue tan satisfactorio como el que se obtuvo sistemáticamente en el procedimiento adoptado.

3.6. Resumen del procedimiento de purificación.

En la Tabla I se resume un experimento típico de obtención de glucoquinasa, donde se siguió el proceso en forma sistemática. La actividad específica de esta preparación fue de 5,6 unidades por mg de proteína con una purificación total de 400 veces y un rendimiento de 19%.

Tabla I

Purificación de glucoquinasa

Fracción	Proteínas mg	Actividad total unidades	Rendimiento Etapa %	Total %	Actividad específica <u>unidades</u> mg
Extracto (S ₁)	3170	45,7			0,014
CM-Sephadex (CM _E)	2260	40,4	88	88	0,018
DEAE-Celulosa (DEAE-G)	69	24,2	60	53	0,35
Sulfato amonio 55-80 (SA-80)	16,6	14,5	60	32	0,88
Hidroxilapatita (OH-AP)	1,57	8,85	62	19	5,64

3.7. Estudio de algunas propiedades de la glucoquinasa purificada.

3.7.1. Estabilidad. La enzima obtenida de hidroxilapatita era inestable. En la figura 4 se muestra la estabilidad del eluato de un tubo con la mayor actividad específica, y la de un conjunto de fracciones (OH-AP). La mayor estabilidad del conjunto de fracciones no se debe a mayor protección de la enzima por diferencias en la concentración de proteínas, por cuanto en ambos casos ésta era similar (0,027 mg/ml en el tubo aislado y 0,024 mg/ml en el conjunto).

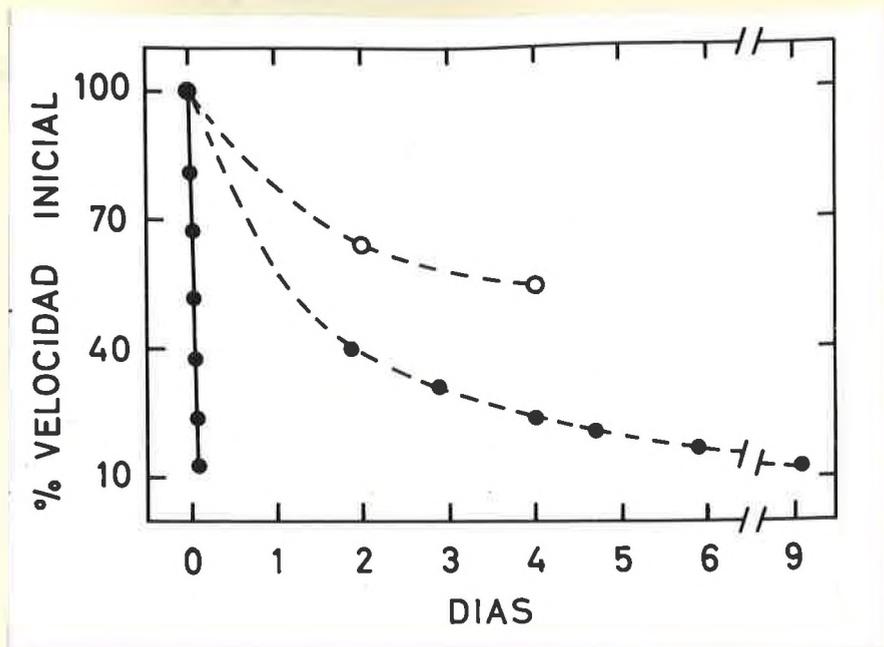


Figura 4. Estabilidad de la glucoquinasa.

Alícuotas de eluatos de hidroxilapatita se incubaron durante tiempos variables antes del ensayo de la actividad enzimática. (o) alícuotas del conjunto de los tubos con mejor actividad específica, OH-AP; (●) alícuotas del tubo con la mayor actividad específica; (— · —) incubación a 30°; (- - -) incubación a 0°.

Al precipitar la enzima con sulfato de amonio a 80% de saturación y resuspenderla en los restos del sobrenadante, se logró mantenerla por varias semanas a 0° sin pérdidas en su actividad. Alícuotas de la suspensión de sulfato de amonio se diluyeron para estudiar estabilidad de la enzima. En la figura 5 se ilustra el efecto de incubar, a 0 y 30°, la enzima disuelta en diversos diluyentes. La enzima diluida y mantenida a 0° es más inestable que la suspensión. a 30° la enzima es francamente inestable pero es protegida parcialmente, por glucosa 50 mM. Separadamente, ni el 2-ME ni el EDTA ejercen protección.

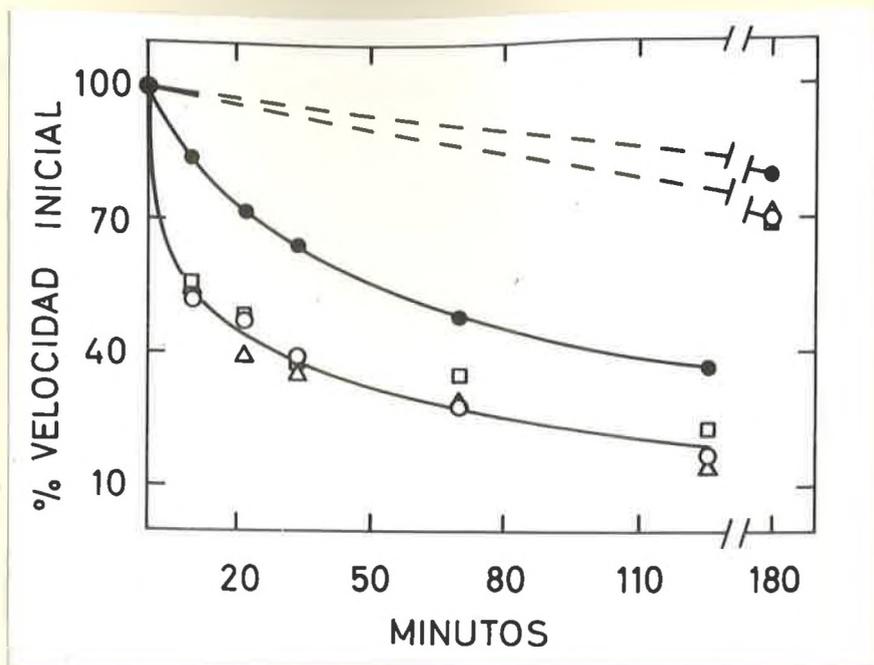


Figura 5. Estabilidad de la glucoquinasa.

Al eluato de hidroxilapatita (OH-AP) se agregó sulfato de amonio hasta 80% de saturación para precipitar la glucoquinasa. La figura ilustra el efecto de incubar a 0° (- - -) y 30° (—), la enzima disuelta en glucosa 50 mM (●); 2-ME 6 mM (Δ); EDTA 1 mM (○), y agua (□).

3.7.2. Especificidad de sustratos. Con la enzima purificada se hicieron algunos estudios de especificidad de sustrato. La tabla II muestra los resultados obtenidos al ensayar diversos azúcares como sustratos.

Tabla II

Fosforilación de algunos azúcares *

$V_{m\acute{a}x}$ manosa/ $V_{m\acute{a}x}$ glucosa	0,85
$V_{m\acute{a}x}$ fructosa/ $V_{m\acute{a}x}$ glucosa	0,25
$V_{m\acute{a}x}$ 2-desoxiglucosa/ $V_{m\acute{a}x}$ glucosa	0,23
$V_{m\acute{a}x}$ galactosa/ $V_{m\acute{a}x}$ glucosa	0,06

* La actividad se midió a 100 mM, concentración con la cual se obtiene la mayor velocidad de fosforilación, que no es, sin embargo, una verdadera $V_{m\acute{a}x}$ por cuanto a mayor concentración de sustrato hay inhibición de la actividad enzimática. (Datos no publicados de C. González).

Estos valores concuerdan con los obtenidos en preparaciones menos purificadas, en la etapa DEAE-G (datos no publicados de C. González). También se confirmó que la enzima purificada no fosforila algunas pentosas tales como D(-) ribosa, D(-) arabinosa y L(+) arabinosa, ni tampoco los derivados de la glucosa, D(+) glucosamina y α -metil glucósido.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Walker, D.G., The development of hepatic hexokinases after birth. *Biochem. J.*, 84, 118P, 1962.
2. Walker, D.G., On the presence of two soluble glucose-phosphorylating enzymes in the adult liver and the development of one of this after birth. *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 209 (1963).
3. Walker, D.G., and Rao, S., The role of glucokinase in the phosphorylation of glucose in rat liver. *Biochem. J.*, 90, 360 (1964).
4. Viñuela, E., Salas, M. and Sols, A., Glucokinase and hexokinase in liver in relation to glycogen synthesis, *J. Biol. Chem.*, 238, PC1175 (1963).
5. Salas, M., Viñuela, E and Sols, A., Insulin dependent synthesis of liver glucokinase in the rat. *J. Biol. Chem.*, 200, 145 (1963)
6. González, C., Ureta, T., Sánchez, R. y Niemeyer, H., Multiple molecular forms of ATP:hexose-6-phosphotransferase from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 16, 347 (1964).
7. Katzen, H.M., Soderman, D.D. y Nitowsky, H.M., Kinetic and electrophoretic evidence for multiple forms of glucose-ATP phosphotransferase activity from human cell cultures and rat liver. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 19, 377 (1965).
8. Katzen, H.M. and Schimke, R.T., Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency and properties. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 54, 1218 (1965).
9. DiPietro, D.L., and Weinhouse, S., Hepatic glucokinase in the fed, fasted and alloxan-diabetic rat. *J. Biol. Chem.*, 235, 2542 (1960).
10. Ilyn, V.S., and Shanygina, K.I., Hormonal regulation of hexokinase activity in liver. *Vop. Med. Khim.*, 6, 291 (1960).

11. Niemeyer, H., The influence of diet on the enzyme content of animal tissues. *Acta Physiol. Lat.*, 12, 173 (1962).
12. Niemeyer, H., Clark-Turri, L., Garcés, E., and Vergara, F.E., Selective response of liver enzymes to the administration of different diets after fasting. *Arch. Biochem. Biophys.*, 98, 77 (1962).
13. Vaughan, D.A., Hannon, J.P., and Vaughan, L.N., Effect of diet on selected glycolytic enzymes of the rat. *Am. J. Physiol.*, 199, 1041 (1960).
14. Niemeyer, H., Pérez, N., Garcés, E., and Vergara, F.E., Enzyme synthesis in mammalian liver as consequence of refeeding after fasting. *Biochim. Biophys. Acta*, 62, 411 (1962).
15. Niemeyer, H., Clark-Turri, L., and Rabajille, E., Induction of glucokinase by glucose in rat liver. *Nature (Londres)*, 198, 1096 (1963).
16. Clark-Turri, L., González, C., Pérez, N., Rabajille, E., and Niemeyer, H., Características de la inducción de ATP:D-hexosa 6-fosfotransferasa en hígado de rata. *Arch. Biol. Med. Exper.*, 1, 157 (1964).
17. Pérez, N., Clark-Turri, L., Rabajille, E., and Niemeyer, H., Regulation of rat liver enzymes by natural components of the diet. *J. Biol. Chem.*, 239, 2420 (1964).
18. Blumenthal, M.D., Abraham, S. and Chaikoff, I.L., Dietary control of liver glucokinase activity in the normal rat. *Arch. Biochem. Biophys.*, 104, 215 (1964).
19. Niemeyer, H., Clark-Turri, L., Pérez, N., and Rabajille, E., Studies on factors affecting the induction of ATP:D-hexose 6-phosphotransferase in rat liver. *Arch. Biochim. Biophys.*, 109, 634 (1965).
20. Sharma, C., Manjeshwar, R., and Weinhouse, S., Effects of diet and insulin on glucose-adenosine triphosphate phosphotransferases of rat liver, *J. Biol. Chem.*, 238, 3840 (1963).

21. Blumenthal, M.D., Abraham, S., and Chaikoff, I.L., Adaptive behavior of hepatic glucokinase in the alloxan-diabetic rat. Arch. Biochim. Biophys., 104, 225 (1964).
22. Niemeyer, H., Pérez, N., and Rabajille, E., Interrelation of actions of glucose, insulin and glucagon on ATP:D-hexose-6-phosphotransferase induction in rat liver. J. Biol. Chem., Agosto (1966).
23. Niemeyer, H., Pérez, N., and Codoceo, R., Acute effects of insulin insufficiency and insulin administration on ATP:D-hexose 6-phosphotransferase induction. Enviado a publicación.
24. Oliver, I.T. and Cooke, J.S., Rat liver glucokinase activities in starvation. Biochim. Biophys. Acta, 81, 402 (1963).
25. Salas, J., Viñuela, E., Salas, M., and Sols, A., Glucokinase of rabbit liver. Purification and properties. J. Biol. Chem., 240, 1014 (1965).
26. Slein, M.W., Cori, G.T., and Cori, C.F., A comparative study of hexokinase from yeast and animal tissues. J. Biol. Chem., 186, 763 (1950).
27. Kornberg, A. and Horecker, B.L., Biochem. Preparations, Vol. 3, p. 27, E.E. Snell, editor, J. Wiley & Sons, N.Y. (1953).
28. Miller, G.L., Protein determination for large number of samples. Anal. Chem., 31, 964 (1959).
29. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
30. Kalckar, H.M., Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. J. Biol. Chem., 167, 461 (1947).
31. Umbreit, W., Burris, R., and Stanffer, J., Manometric Techniques, p. 272, Burges Publishing CO., Minneapolis (1959).

32. Materials for Ion Exchange Adsorption and Gel Filtration, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EE.UU., 1965.
33. Sephadex Ion Exchangers, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia, 1965.
34. Flodin, P., Methodological aspects of gel filtration with special reference to desalting operations. J. Chromatog. 5, 103 (1961).
35. Glock, G.E., and McLean, P., Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochem. J., 55, 400 (1953).
36. Noltmann, E.A., Gubler, C.J. and Kuby, S.A., Glucose 6-phosphate dehydrogenase. Isolation of the crystalline enzyme from yeast. J. Biol. Chem. 236, 1225 (1961).-

