# UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS

GLUCOQUINASA, UNA ENZIMA MONOMERICA CON CINETICA COOPERATIVA

MARIA DE LA LUZ CARDENAS CERDA

Willer &

THE RESERVE OF THE PROPERTY OF THE PARTY OF

Total

United to the Children

an occalinate paretal in the Sequenter

pass service at prosto the

person at Classics are bounded in biologia

PRODUCED OF DESCRIPTION OF PERSONS AND PROPERTY.

HALLE IN THE DANSELINE COURS.

myleses, 190

more Detroctoretes of Diplom Sylventer at

# GLUCOQUINASA,

UNA ENZIMA MONOMÉRICA CON CINÉTICA COOPERATIVA

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 Básicas y Farmacéuticas

por

MARIA DE LA LUZ CARDENAS CERDA
Noviembre, 1981

Profesor Patrocinante: DR. HERMANN NIEMEYER F.

# Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas Universidad de Chile

### INFORME DE APROBACION

### TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la Candidata

#### MARIA DE LA LUZ CARDENAS CERDA

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 23 de Marzo de 1982.

Profesor Patrocinante de Tesis:

Dr. Hermann Niemeyer F.

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Catherine Connelly M.

Dr. Osvaldo Cori M.

Dr. Jaime Eyzaguirre P.

Dr. Tito Ureta A.

Esta tesis fue realizada en el

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular

de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmaceúticas

de la Universidad de Chile,

bajo la dirección del Dr. Hermann Niemeyer F.

#### **AGRADECIMIENTOS**

Sería difícil, y quizás pretencioso, tratar de agradecer a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido a la realización de esta Tesis. Sin embargo, hay algunos nombres que no puedo dejar de mencionar.

Como olvidar a Hermann Niemeyer, cuyas sobresalientes características intelectuales y humanas lo convierten en un Maestro ejemplar. Cuando se ha tenido el privilegio de ser su discípula es difícil encontrar las palabras adecuadas para agradecerle debidamente la huella imperecedera, que su acción de Maestro deja en los que son sus discípulos. Quizás solo se pueda decir, Gracias Maestro.

Como olvidar a Olga Pizarro, cuyo apoyo generoso permitió la iniciación de esta Tesis. Como agradecerle su contribución en mi formación intelectual y humana.

Como olvidar a Eliana Rabajille, con quien realice la mayor parte de los experimentos de esta Tesis. Su ayuda tecnica, realizada con inteligencia, eficacia y actitud crítica fue de imponderable valor.

Como olvidar a Tito Ureta, quien siempre constituyó un estímulo por su gran capacidad de trabajo, su mística por el laboratorio y su orden difícil de imitar. Como agradecerle debidamente sus consejos "de Editor" y el que siempre tuviera a mano la referencia que yo acababa de extraviar.

Como olvidar a Cecilia Toro, su alegría y sus generosas donaciones de glucoquinasa. Como agradecerle sus muchas pequeñas sorpresas que brillaron como grandes luces, a veces en momentos de gran oscuridad.

Como olvidar a José Manuel Olavarría, y sus estimulantes conversa ciones sobre la glucoquinasa, que nos llevaron un día a formular, sobre una servilleta de papel, el modelo III.

Como olvidar a Osvaldo Alvarez, y su ayuda generosa y oportuna cada vez que el Gilford, el microprocesador o un programa de computación así lo requirieron.

Como olvidar a Serena Mann, quien a lo largo de estos años, y con gran paciencia, confeccionó innumerables esquemas y gráficos.

Como olvidar a Patricia Fenero, quien muy eficientemente fue capaz de descifrar los primeros borradores de esta Tesis, y a Titina Cerda, quien transcribió la larga versión final.

Como olvidar a todos mis amigos, que me estimularon durante la realización de esta Tesis ayudándome a alcanzar el final. Como olvidar a los miembros del Laboratorio, que constituyeron la tierra fértil para que la semilla que fue esta Tesis se desarrollara y diera frutos.

Gracias

María de la Luz Cárdenas Cerda

Al Maestro, al Amigo, al Padre

Marilie

Desocupado lector, sin juramento me podrás creer que quisiera que este libro, como hijo del entendimiento, fuera el más hermoso, el más gallardo y más discreto que pudiera imaginarse. Pero no he podido yo contravenir a la orden de naturaleza; que en ella cada cosa engendra su semejante.

Miguel de Cervantes

# INDICE DE MATERIAS

	Página
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xx
RESUMEN	xxi
ABSTRACT	xxvi
A. INTRODUCCION	1
a) Adaptación metabólica	1
b) K <sub>0.5</sub> y n <sub>H</sub> , parámetros cinéticos fundamenta	les 3
c) Glucoquinasa, una enzima regulatoria	6
d) Propósitos y logros de esta tesis	13
B. MATERIALES Y METODOS	17
1. Reactivos	17
2. Animales	18
3. Preparación de la glucoquinasa	19
Método 1	19
Método 2	22
4. Control de enzimas contaminantes	25
5. Preparación y control de soluciones	29
6. Ensayo de la glucoquinasa	30
Ensayo 1a	34
Ensayo 1b	35

			Página
		Ensayo 1c	36
		Ensayo 2	37
	7.	Criterio para elegir la concentración de las	
		enzimas auxiliares	39
	8.	Análisis de los resultados	49
	9.	Fotooxidación	52
	10.	Filtración en gel en las condiciones de medición	
		de la enzima	54
_			5.7
C.	RE	SULTADOS	57
	1.	Función de saturación de la glucoquinasa con	
		sustratos glucídicos y con MgATP	57
	a)	Cooperatividad cinética con glucosa	57
	b)	Estado de purificación y propiedades cinéticas	63
	c)	Aspectos comparativos	66
	d)	Conducta cinética con sustratos glucídicos	
		alternativos	70
	e)	Conducta cinética de la glucoquinasa con MgATP	86
	2.	Efecto de las condiciones generales del ensayo	
		sobre la cooperatividad cinética con glucosa	91
	a)	Efecto de la variación del pH	91
	b)	Efecto de la concentración de K y de Na	103
		Efecto del DTT, agente reductor de puentes disúlfuros	118
		Efecto de la concentración de enzima sobre la	
		conducta cinética de la glucoquinasa	122
	3.	Intentos de modificación de la cooperatividad	127
	a)	Fotooxidación	128
	b)	Efecto del calentamiento	133
	c)	Efecto del Triton X-100	136
	d)	Efecto de la urea	139
	e)	Comentario general	150

			Página
	4.	Dependencia del efecto cooperativo de la concen-	
		tración de MgATP	155
	5.	Modificación del efecto cooperativo debido a la	
		presencia de análogos de la glucosa	161
	a)	Efecto de N-acetilglucosamina	162
	b)	Efecto de manosa	177
	c)	Efecto de 2-desoxiglucosa y fructosa	191
	d)	Efecto de galactosa	202
	e)	Comentario general	204
	6.	Efecto del glucosa-6-fosfato y del ADP sobre la	
		cooperatividad cinética con glucosa	207
	a)	Efecto del glucosa-6-fosfato	208
	b)	Efecto del ADP	220
	7.	Mantención de la estructura monomérica de la	
		glucoquinasa en las condiciones de reacción	228
	a)	Efecto de los sustratos sobre la filtración de	
		la glucoquinasa	229
	b)	Efecto de la N-acetilglucosamina	235
	c)	Efecto de los sustratos y los productos	237
	d)	Comentario general	239
D.	DI	SCUSION	242
	1	Interpretación de la cinética cooperativa	242
		Modelos de sistemas en equilibrio rápido	242
	α,	Modelo de transición concertada de Monod, Wyman	243
		y Changeux	244
		Modelo de transiciones consecutivas de Koshland, Némethy y Filmer	248
		Modelo de Frieden del segundo sitio	249
	b)	Modelos en régimen estacionario	252
	,	Modelos cinéticos. Modelo de Ferdinand	252
		Modelos con transiciones conformacionales	257

	Página
Modelo de transiciones conformacionales lentas	257
Modelo de transición mnemónica	261
2. Aplicación de modelos a enzimas monoméricas	270
a) Modelo del segundo sitio	270
Ribonucleosido-trifosfato-reductasa de Lactobacillus leichmannii	270
Ribonucleasa pancreática	272
b) Modelo de transiciones conformacionales lentas	274
Hexoquinasa de levadura	274
$\delta$ -quimotripsina	280
c) Modelo mnemónico	281
Hexoquinasa $L_{_{ m I}}$ de trigo	281
Octopina deshidrogenasa	283
3. Proposiciones de modelos para glucoquinasa	285
a) Modelo I	286
b) Modelo II	295
c) Modelo III	304
d) Modelo mnemonico	313
e) Comentario final	322
REFERENCIAS	324

E.

# LISTA DE TABLAS

Tabla II. Cantidad necesaria de glucosa-6-fosfato-des- hidrogenasa (V <sub>2</sub> ) usada como enzima auxiliar en el ensayo de la glucoquinasa  Tabla III. Parámetros cinéticos de la glucoquinasa de rata en diferentes estados de purificación  Tabla IV. Valores de los coeficientes de Hill n <sub>H</sub> y de las concentraciones de semisaturación K <sub>0.5</sub> de la glucoquinasa de vertebrados, con glucosa	igina
hidrogenasa (V <sub>2</sub> ) usada como enzima auxiliar en el ensayo de la glucoquinasa  Tabla III. Parámetros cinéticos de la glucoquinasa de rata en diferentes estados de purificación  Tabla IV. Valores de los coeficientes de Hill n <sub>H</sub> y de las concentraciones de semisaturación K <sub>0.5</sub> de la glucoquinasa de vertebrados, con glucosa	24
rata en diferentes estados de purificación $ \begin{tabular}{ll} Tabla IV. & Valores de los coeficientes de Hill n_H y de \\ las concentraciones de semisaturación  ^K0.5  de la glucoquinasa de vertebrados, con glucosa  \begin{tabular}{ll} Tabla IV. & Valores de los coeficientes de Hill n_H y de \\ la glucoquinasa de vertebrados, con glucosa \\ \begin{tabular}{ll} Tabla IV. & Valores de los coeficientes de Hill n_H y de \\ la glucoquinasa de vertebrados, con glucosa \\ \end{tabular} $	45
las concentraciones de semisaturación K <sub>0.5</sub> de la glucoquinasa de vertebrados, con glucosa	64
como sustrato	67
Tabla V. Efecto del NaCl sobre los parámetros cinéticos de la glucoquinasa de rata 1	12
Tabla VI. Efecto de la fotooxidación sobre los parámetros cinéticos de la glucoquinasa 1.	31
Tabla VII. Efecto de la adición de urea durante el ensayo	42
Tabla VIII. Efecto de la preincubación por tiempos variables de la glucoquinasa con urea en ausencia de sustratos. Estabilidad de la actividad enzimática en presencia del inhibidor	44
Tabla IX. Reversibilidad de la acción de la urea sobre la glucoquinasa. Efecto de la preincubación de la glucoquinasa con urea sobre la actividad medida ulteriormente a una concentración menor de urea	46

		Página
Tabla X.	Eficiencia relativa de los análogos de glucosa	
	para suprimir la cooperatividad cinética de la	
	glucoquinasa con glucosa	205
Tabla XI.	Inhibición por glucosa-6-fosfato de la fosfo-	
	rilación de glucosa por la glucoquinasa	210
Tabla XII.	Efecto no inhibidor del glucosa-6-fosfato 10 mM	
	sobre la actividad de la glucoquinasa	214
Tabla XIII.	Inhibición por ADP de la fosforilación de glu-	
	cosa por la glucoquinasa	221
Tabla XIV.	Efecto de la concentración de glucosa sobre	
	la inhibición por ADP de la glucoquinasa	226
Tabla XV.	Coeficiente de distribución de la glucoquinasa	
	obtenido por filtración en gel de Sephadex	
	G-200	232

# LISTA DE FIGURAS

			Página
Figura	1.	Cromatografía en DEAE-celulosa de la gluco-	
		quinasa y de la N-acetilglucosamina-quinasa	26
Figura	2.	Coelución de glucoquinasa y glucosa-6-fosfa-	
		to-deshidrogenasa en DEAE-celulosa	27
Figura	3.	Esquema del preincubador	32
Figura	4.	Función de saturación para glucosa de la glu-	
		coquinasa de rata	58
Figura	5.	Gráficos de Eadie-Hofstee (a), Hanes-Woolf (b)	
		y Lineweaver-Burk (c) de la función de satu-	
		ración de la glucoquinasa con glucosa	60
Figura	6.	Gráfico de Hill de la función de saturación de	
		la glucoquinasa de tortuga con glucosa y con	
		manosa	69
Figura	7.	Cinética cooperativa de la glucoquinasa con	
		glucosa (a) y con manosa (b)	72
Figura	8.	Cinética hiperbólica de la glucoquinasa con	
		2-desoxiglucosa (a) y con fructosa (b)	73
Figura	9.	Gráfico de Hill de la función de saturación de	
		la glucoquinasa con diferentes sustratos glu-	
		cídicos	74
Figura	10.	Función de saturación de la glucoquinasa con	
		manosa, determinada con diferentes ensayos	75
Figura	11.	Gráfico de Hanes-Woolf de la función de satu-	
		ración de la glucoquinasa con fructosa a dos	
		diferentes pH	79
Figura	12.	Estudios de velocidad inicial de la glucoqui-	
		nasa con fructosa	80

		Página
Figura 13.	Gráficos de dobles recíprocos con razones cons-	
	tantes entre las concentraciones del sustrato glucídico y el ATP	83
Figura 14.	Función de saturación de la glucoquinasa con MgATP	87
Figura 15.	Efecto del pH sobre la actividad de la gluco- sa-6-fosfato-deshidrogenasa	92
Figura 16.	Curvas de progreso a pH 8,5 de la reacción de fosforilación de la glucosa por la glucoqui- nasa. Efecto de DTT	94
Figura 17.	Efecto del pH sobre la actividad de la gluco- quinasa	97
Figura 18.	Gráficos de Hill de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa a diferentes pH	98
Figura 19.	Resumen de los efectos del pH sobre los pará- metros cinéticos de la glucoquinasa con glucosa	100
Figura 20.	Efecto del K <sup>+</sup> y del Na <sup>+</sup> sobre la actividad de la glucoquinasa	105
Figura 21.	Efecto del K <sup>+</sup> sobre la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa	107
Figura 22.	Resumen de los efectos de la variación de la concentración de K <sup>+</sup> sobre los parámetros ciné-	110
Figura 23.	ticos de la glucoquinasa con glucosa  Efecto del NaCl sobre la función de saturación	110
Figura 24.	de la glucoquinasa con glucosa Cinética de la inactivación a 37° de la gluco-	111
	quinasa en presencia de K <sup>+</sup> o de Na <sup>+</sup>	115
Figura 25.	Gráficos de Hill de la función de saturación con glucosa, en ausencia y en presencia de DTT	121

		Página
Figura 26.	Reactivación de la glucoquinasa por DTT. Carac terísticas cinéticas de la enzima reactivada	123
Figura 27.	Función de saturación de la glucoquinasa con glucosa, al usar diferentes concentraciones de enzima	125
Figura 28.	Efecto de la fotooxidación con azul de metileno sobre la glucoquinasa de rata	129
Figura 29.	Gráficos de Hill de la función de saturación con glucosa de la glucoquinasa nativa y calentada a 45°	135
Figura 30.	Gráficos de Hill de la función de saturación de la glucoquinasa en ausencia y en presencia de Triton X-100	138
Figura 31.	Efecto de la urea sobre la actividad de la glucoquinasa	140
Figura 32.	Efecto de la urea sobre la función de satura- ción de la glucoquinasa con glucosa	149
Figura 33.	Gráficos de Hill de la función de saturación para glucosa a dos concentraciones de MgATP	157
Figura 34.	Influencia de la concentración de MgATP sobre los parámetros cinéticos ${\rm K}_{0.5}$ y ${\rm n}_{\rm H}$	159
Figura 35.	Gráficos de dobles recíprocos para la inhibi- ción de la glucoquinasa por N-acetilglucosa-	
Figura 36.	mina  Gráfico de Dixon de la inhibición por N-acetil	163
Figura 37.	glucosamina de la glucoquinasa  Gráfico de Dixon de la inhibición por N-acetil	165
	glucosamina a bajas concentraciones de glucosa	167

		Páginä
Figura 38.	Modelo propuesto para la interacción de la glucoquinasa con glucosa y con N-acetilglu-cosamina	169
Figura 39.	Efecto de la concentración de la glucosa sobre la inhibición relativa por la N-acetilgluco-samina	170
Figura 40.	Efecto de la N-acetilglucosamina sobre la actividad de la glucoquinasa a bajas concentraciones de glucosa	172
Figura 41.	Gráficos de Hill de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa en presencia de distintas concentraciones de N-acetilglucosamina	174
Figura 42.	Efecto de la N-acetilglucosamina sobre los para metros cinéticos $K_{0.5}$ y $n_{\rm H}$	175
Figura 43.	Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquinasa por manosa	178
	Gráfico de Dixon de la inhibición por manosa de la glucoquinasa Gráfico de Dixon de la inhibición por manosa	180
	de la glucoquinasa a bajas concentraciones de glucosa	182
Figura 46.	Modelo propuesto para la interacción de la glu- coquinasa con glucosa y con manosa	183
Figura 47.	Efecto de la concentración de la glucosa sobre la inhibición relativa por manosa de la glucoquinasa	185
Figura 48.	Efecto de manosa sobre la actividad de la glu- coguinasa a baja concentración de glucosa	186

		Página
Figura 49.	Gráficos de Hill de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa a diferentes	
	concentraciones de manosa	188
Figura 50.	Gráficos de dobles recíprocos para la inhibición de la fosforilación de glucosa por 2-desoxiglucosa y por fructosa	192
Figura 51.	Gráfico de Dixon de la inhibición de la fosfo rilación de glucosa por fructosa	194
Figura 52.	Gráficos de Hill de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa, a diferentes concentraciones de 2-desoxiglucosa	196
Figura 53.	Resumen del efecto de la fructosa sobre los parámetros cinéticos $K_{0.5}$ y $n_{\rm H}$ de la función de saturación con glucosa	197
Figura 54.	Efecto de la galactosa sobre la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa	203
Figura 55.	Efecto del glucosa-6-fosfato sobre la acti- vidad de la glucoquinasa	212
Figura 56.	Gráficos de Eadie-Hofstee de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa a diferentes concentraciones de glucosa-6-fos-fato	216
Figura 57.	Gráficos de Hill de la función de saturación con glucosa en ausencia y en presencia de MgADP	225
Figura 58.	Perfiles típicos de elución de la glucoqui- nasa en presencia de los sustratos	230
Figura 58.	Estimación del peso molecular aparente por filtración en Sephadex G-200	234

		P <b>á</b> gina
Figura 60.	Perfil de elución de la filtración en gel	
	de glucoquinasa en presencia de N-acetilglu- cosamina	236
Figura 61.	Perfil de elución de la filtración en Sephadex de glucoquinasa en presencia de sustratos y productos	238
Figura 62.	Secuencia de reacciones en un sistema enzi- mático con mecanismo al azar de unión de sustratos	254
Figura 63.	Modelo de transición conformacional lenta aplicado a una enzima con un sustrato y un	
	producto	258
Figura 64.	Modelo de transición mnemónica	263
Figura 65.	Modelo de isomerización lenta aplicado a la hexoquinasa monomérica de levadura	277
Figura 66.	Modelo I postulado para explicar la coopera- tividad cinética de la glucoquinasa con glucosa	287
Figura 67.	Esquema de un mecanismo al azar de unión de sustratos en presencia de un inhibidor competitivo (I)	291
Figura 68.	Modelo II postulado para explicar la coopera- tividad cinética de la glucoquinasa con glucosa	297
Figura 69.		237
Figura 70.	con glucosa  Modelo III en presencia de un inhibidor	305
	competitivo para glucosa y a muy altas concentraciones de MgATP	310

		Página
Figura 71.	Gráficos de Hill de la función de saturación	
	con glucosa en ausencia y en presencia de	
	manosa y de 2-desoxiglucosa, obtenidos por	
	simulación del modelo III	311
Figura 72.	Modelo mnemónico postulado para explicar la	
	cooperatividad cinética de la glucoquinasa	
	con glucosa	314
Figura 73.	Modelo mnemónico considerando un mecanismo	
	al azar de unión de sustratos y de liberación	
	de productos	319

#### LISTA DE ABREVIATURAS

CH-Sefarosa 6-aminohexanoil Sepharose

DEAE-celulosa Dietilaminoetilcelulosa

DTNB 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoato)

DTT Ditiotreitol

dGlc 2-desoxiqlucosa

EDC Hidroclorhidrato de 1-etil-3-

(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EDTA Acido etilendiaminotetraacético

Fru Fructosa

Fructosa-6-P Fructosa-6-fosfato

Glc Glucosa

GlcNAc N-acetilglucosamina

Glucosa-6-fosfato

Man Manosa

Manosa-6-P Manosa-6-fosfato

Mes Acido (2-[N-Morfolino] etanosulfónico)

PEP Fosfoenolpiruvato

6-P-gluconato 6-Fosfogluconato

Pipes Acido piperazina-N', N-bis(2-etano-

sulfónico)

POPOP (1,4-bis 2(5-feniloxazolil)benceno

PPO 2,5-difeniloxazol

Tris-(hidroximetil)-aminometano

#### RESUMEN

La glucoquinasa (ATP: D-glucosa-6-fosfotransferasa EC 2.7.1.2.) es una de las cuatro isoenzimas fosforilantes de glucosa en el hígado de rata. Es la isoenzima predominante y se encuentra exclusivamente en los hepatocitos.

La glucoquinasa presenta cinética sigmoidea con glucosa. El coeficiente de Hill ( $n_{\rm H}$ ) fue 1,5 y el K $_{0.5}$  7,5 a pH 7,5. El grado de cooperatividad fue independiente del grado de purificación de la enzima y de la concentración de ella. El efecto cooperativo se encontró en la glucoquinasa de todas las especies de vertebrados estudiadas (mamíferos, anfibios y quelónidos) y los coeficientes de Hill fueron muy semejan tes. Los valores de K $_{0.5}$  variaron entre 2 y 8 mM glucosa.

Además de glucosa, la glucoquinasa fosforila otros azúcares y derivados. La función de saturación fue cooperativa con manosa ( $n_{\rm H}=1.5$ ;  ${\rm K}_{0.5}=8$  mM), en cambio fue hiperbólica con 2-desoxiglucosa ( $n_{\rm H}=1.0$ ;  ${\rm K}_{0.5}=22$  mM) y con fructosa ( $n_{\rm H}=1.0$ ;  ${\rm K}_{0.5}=325$  mM). La  ${\rm V}_{max}$  con fructosa fue al rededor de 2,6 veces mayor que la  ${\rm V}_{max}$  con glucosa. Frente al sustrato nucleotídico MgATP la conducta fue hiperbólica ( $n_{\rm H}=1.0$ ;  ${\rm K}_{0.5}=1$  mM).

La glucoquinasa de rata es una proteína monomérica y no se polimerizó al filtrarla a 30 $^{\circ}$  en Sephadex en un medio si milar al del ensayo. Esto excluye la posibilidad de que la

cooperatividad sea el resultado de la interacción de subunidades o de una asociación-disociación reversible, en que las propiedades cinéticas dependan del peso molecular de la especie enzimática.

Diversos intentos realizados para modificar la cooperatividad no tuvieron éxito. Así, una disminución del pH del medio de ensayo desde 8,5 a 5,75, la fotooxidación con azul de metileno o el calentamiento de la enzima antes del ensayo, y la adición de triton X-100 o de urea al medio de reacción no alteraron el coeficiente de Hill, pero disminuyeron la  $V_{\rm max}$  y aumentaron el K $_{0.5}$ . Tampoco hubo variación del grado de cooperatividad al elevar la fuerza iónica del medio con KCl o NaCl, pero hubo una disminución de la  $V_{\rm max}$  y del K $_{0.5}$ . La presencia en el medio de ensayo de DTT, que estabiliza la glucoquinasa, tampoco alteró la cooperatividad.

La variación producida en el parámetro  $K_{0.5}$  indican que las moléculas que retuvieron actividad presentan alteración en la afinidad por el sustrato, pero conservan la conducta cinética cooperativa. Se postula que esta propiedad cinética es intrín seca al mecanismo catalítico.

El grado de cooperatividad con glucosa disminuía al descender la concentración de MgATP por debajo de su  $\rm K_m$ , llegándose a un coeficiente de Hill de 1,0 con MgATP 0,2 mM. Simultánea mente, disminuía el  $\rm K_{0.5}$  para glucosa. La dependencia de los parámetros cinéticos de la concentración de MgATP se interpretó

como consecuencia de la unión al azar de los sustratos a la enzima en condiciones de no-equilibrio, y con una vía cinéticamente preferida, que es la que utiliza el complejo bina rio E.Glc (modelo I). La distribución relativa de ambos complejos binarios en el régimen estacionario será función de la concentración relativa de ambos sustratos y así resultaría el efecto cooperativo con glucosa.

El MgADP disminuía el coeficiente de Hill, llegándose a un valor 1,0 y disminuía también el  $K_{05}$  para glucosa. El glucosa-6-P no alteró la cooperatividad, aunque disminuyera la  $V_{\rm max}$  y el  $K_{0.5}$  para glucosa. La inhibición por glucosa-6-P era cooperativa.

Los sustratos alternativos, manosa, 2-desoxiglucosa y fructosa, así como el análogo N-acetilglucosamina, son inhibidores competitivos de la glucoquinasa respecto a glucosa. Junto con aumentar el  $K_{0.5}$  ocasionaron una disminución en el coeficiente de Hill, llegando hasta una cinética hiperbólica. La concentración necesaria para lograr un  $n_{\rm H}$  de 1,0 dependía de la naturaleza del inhibidor, siendo fructosa el más eficiente para eliminar la cooperatividad. El efecto es específico, pues galactosa, que no es inhibidor, no lo produce. La inhibición por N-acetilglucosamina y manosa era cooperativa, lo que se manifiesta bien al usar muy bajas concentraciones de glucosa (0,1 a 0,2 mM), condición en la que no se observó inhibición hasta con concentraciones de los inhibidores superiores a dos

veces su  $\mathbf{K}_{\mathbf{i}}$ . La inhibición aumentaba al subir la concentración de glucosa hasta alrededor de 2 mM; por encima de ella ya se observaba la inhibición competitiva típica.

Nuestras observaciones son compatibles con un modelo en régimen estacionario que considere al menos dos vías de conversión de sustratos en productos. El primer modelo (I), meramente cinético, pareció insuficiente, por lo cual estamos presentando dos nuevos modelos (II y III), que postulan la existencia de un cambio conformacional inducido por glucosa y por los análogos y la unión al azar de ambos sustratos, qlucosa y MgATP. En estos modelos el cambio conformacional genera una especie enzimática ( $E_{\tau\tau}$ ) con mayor afinidad por glucosa y sus análogos que la especie original predominante  $(E_{_{\mathrm{I}}})$  . En el modelo II, el cambio conformacional es el paso limitante de la reacción y es más rápido cuando la glucosa se une a la enzima libre  $(E_{_{\rm T}})$  que cuando se une al complejo binario  $E_{_{\rm T}} \cdot {\rm MgATP}$  y así resultan dos caminos no equivalentes, necesarios para la cooperatividad, derivados de la unión al azar de los sustratos.

En el modelo III en cambio conformacional inducido por glucosa no es requisito para la catálisis, pero genera una conformación  $\mathbf{E}_{II}$  con mayor afinidad por glucosa o sus análogos que  $\mathbf{E}_{I}$ , la especie inicialmente predominante. El MgATP no altera el equilibrio conformacional, pero los complejos  $\mathbf{E}_{I} \cdot \mathbf{MgATP}$  y  $\mathbf{E}_{II} \cdot \mathbf{MgATP}$  alcanzan más rápidamente un equilibrio

que las enzimas libres  $\mathbf{F}_{\mathrm{I}}$  y  $\mathbf{E}_{\mathrm{II}}$ .

El modelo III fue sometido a simulación analógica, siendo posible reproducir cualitativamente algunos de los resultados experimentales, como: i) la cinética cooperativa con glucosa y con manosa y la conducta hiperbólica con 2-desoxiglucosa; ii) la reducción gradual del coeficiente de Hill y del K<sub>0.5</sub> para glucosa al reducir la concentración de MgATP; y iii) la reducción del coeficiente de Hill en presencia de inhibidores competitivos.

#### ABSTRACT

Glucokinase (ATP: D-glucose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2.) is one of four glucose phosphorylating isozymes present in rat liver. It is the predominant isozyme and it is found exclusively in the hepatocyte.

Glucokinase exhibits sigmoid kinetics with glucose. The Hill coefficient  $(n_{\rm H})$  was of 1.5 and the  ${\rm K}_{0.5}$  7.5 at pH 7.5. The degree of cooperativity did not depend on the degree of purification or the concentration of the enzyme. Cooperativity was observed for the glucokinase of all the species of vertebrates so far studied (mammals, amphibians, chelonids), and the Hill coefficient values were very similar. The  ${\rm K}_{0.5}$  values varied between 2 and 8 mM glucose.

In addition to glucose, glucokinase phosphorylates other sugars and derivatives. The saturation function was cooperative with mannose ( $n_{\rm H}=1.0$ ;  $K_{0.5}=8\,{\rm mM}$ ), while it was hyperbolic with 2-deoxyglucose ( $n_{\rm H}=1.0$ ;  $K_{0.5}=22\,{\rm mM}$ ) and with fructose ( $n_{\rm H}=1.0$ ;  $K_{0.5}=325\,{\rm mM}$ ) as substrates.  $V_{\rm max}$  with fructose was about 2.6-fold higher than that with glucose. With the nucleotidic substrate ATP the behaviour was hyperbolic ( $n_{\rm H}=1.0$ ;  $K_{0.5}=1\,{\rm mM}$ ).

Rat glucokinase is a monomeric protein and did not polymer ize upon Sephadex filtration at 30° under conditions similar to those of the assay. This findings exclude the possibility

that the cooperativity was the result of the interaction of subunits or from a reversible association-dissociation in which the kinetic properties of the enzyme depend on the molecular weight of the enzymatic species.

Several attempts to modify cooperativity did not succeed. Thus, the Hill coefficient did not change with decrease in the pH of the assay medium from 8.5 to 5.75, photooxidation with methylene blue, heating of the enzyme before the assay or the addition to the assay medium of Triton X-100 or urea. All these treatments however, decreased  $V_{\rm max}$  and increased  $K_{0.5}$  values. Likewise there was no variation in the degree of cooperativity on increasing the ionic strength of the assay medium with KCl or NaCl, but there was a decrease in  $V_{\rm max}$  and  $K_{0.5}$ . In addition, the presence in the assay medium of DTT, which stabilize glucokinase, did not alter the cooperativity.

The variation produced in the  $K_{0.5}$  parameter indicates that those molecules which retained activity have an altered affinity for the substrate, but maintain the cooperative kinetic behaviour. It is proposed that this kinetic property is intrinsic to the catalytic mechanism.

The degree of cooperativity for glucose decreased on lowering the concentration of MgATP to below its  $K_{\rm m}$ , reaching a Hill coefficient of 1,0 with MgATP 0.2 mM. At the same time the  $K_{0.5}$  for glucose was diminished.

The dependence of the kinetic parameters on the concentration of MgATP was interpreted as a consequence of the random binding of the substrates to the enzyme under non-equilibrium conditions, and with one of the resultant pathways, that which operates through the binary complex E.Glc, being kinetically preferred (model I). The relative distribution of both binary complexes in the steady-state will be a function of the relative concentrations of both substrates, and thus giving rise to the cooperative effect with glucose.

MgADP decreased the Hill coefficient reaching a value of 1.0 and also diminished the  $\rm K_{0.5}$  for glucose. Glucose 6-phosphate was not effective in decreasing the cooperativity although the  $\rm V_{max}$  and the  $\rm K_{0.5}$  for glucose were decreased. The inhibition by glucose 6-phosphate was cooperative.

The alternative substrates mannose, 2-deoxyglucose and fructose, and the analog N-acetylglucosamine, acted as competitive inhibitors of glucokinase with glucose as substrate. Besides the increase in  $K_{0.5}$  for glucose they produced a decrease in the Hill coefficient approaching hyperbolic kinetics. The necessary concentration for obtaining a  $n_{\rm H}$  of 1.0 depended on the nature of the inhibitor, fructose being the most efficient one in abolishing the cooperativity. This effect is specific since galactose, which is not an inhibitor, did not produce it.

The inhibition with N-acetylglucosamine and with mannose was cooperative, which was seen clearly when low concentrations of glucose (0.1 to 0.2 mM) were used. In this condition inhibition was not observed until the concentrations of N-acetylglucosamine or mannose were two-fold higher than their  $K_i$ . This inhibition increased on raising the glucose concentration up to about 2 mM, above which the typical competitive inhibition was observed.

Our observations are compatible with a model in steadystate that considers at least two pathways of conversion of substrates into products. The merely kinetic model (I) was considered inadequate and thus two new models are presented which postulate the existence of a conformational change induced by glucose (and analogs) and the random binding of both substrates, glucose and MgATP. In these models the conformational change generates an enzymatic species  $\mathbf{E}_{\mathtt{II}}$ with greater affinity for glucose and its analogs than the predominant original species  $E_{\tau}$ . In model II the conformational change is the rate limiting step of the reaction, and is faster when glucose binds to the free enzyme  $(E_{\tau})$ than when it binds to the binary complex  $E_{\mathsf{T}}\cdot \mathsf{MgATP}$ . In this way two different pathways emerge which are necessary for cooperativity and which are derived from the binding at ramdom of substrates.

In model III, the conformational change induced by glucose is not a requirement for catalysis, but generates a conformation  $\mathbf{E}_{\mathrm{II}}$ , with more affinity for glucose and its analogs than  $\mathbf{E}_{\mathrm{I}}$ , the initially predominant form. MgATP does not alter the conformational equilibrium, but the complexes  $\mathbf{E}_{\mathrm{I}} \cdot \mathrm{MgATP}$  and  $\mathbf{E}_{\mathrm{II}} \cdot \mathrm{MgATP}$  reach equilibrium faster than the free enzymes  $\mathbf{E}_{\mathrm{I}}$  and  $\mathbf{E}_{\mathrm{II}} \cdot \mathrm{MgATP}$  reach equilibrium faster than the

Model III was simulated with an analog computer and it was possible to reproduce qualitatively some of the experimental results, such as, i) the cooperative behaviour with glucose and mannose and the hyperbolic kinetics with 2-deoxyglucose; ii) the gradual reduction of the Hill coefficient and of the  $K_{0.5}$  for glucose as the concentration of MgATP decreases, and iii) the reduction of the Hill coefficient by the presence of competitive inhibitors.

#### A. INTRODUCCION

# a) Adaptación metabólica

Los organismos vivos que existen en nuestros días pueden considerarse adaptados a su ambiente, lo que sería la consecuencia de que durante la evolución se han seleccionado mecanismos que se traducen en un funcionamiento apropiado dichos organismos en las condiciones presentes. La adecuación a las variaciones ambientales implica la operación de mecanismos eficientes de regulación. La efectividad de una regulación metabólica depende de la capacidad de mantención de niveles de actividades enzimáticas convenientes a diferentes estados fisiológicos del organismo. Lo que se regula no son reacciones enzimáticas aisladas, sino complejas redes de vías metabólicas. Más aún, en el caso de organismos pluricelulares, la regulación de una vía particu lar, en un tejido determinado, responde a las necesidades del organismo como un todo, pues es sobre los organismos don de ha actuado la evolución. La regulación de esa vía debe considerarse apropiada al papel específico que cumple el tejido en el conjunto del organismo.

No es de extrañarse que a través de la evolución se hubie ran desarrollado múltiples mecanismos de regulación que

asequren al organismo una adaptación eficiente frente a variaciones del medio ambiente. Así, la modulación de vía metabólica se puede lograr mediante la modificación la actividad de la enzima limitante de la velocidad de vía, enzima que suele denominarse enzima regulatoria, a su vez es regulable mediante diversos mecanismos. Dos son los parámetros de las enzimas regulatorias que están sujetos a regulación: la cantidad de moléculas de enzima y su activi dad catalítica. La concentración celular de enzima se modula mediante el control de la velocidad de síntesis, de velocidad de degradación de la proteína-enzima o de ambos a la vez (Schimke y Doyle, 1970) y requiere un tiempo que no es pequeño en relación a la vida de la célula, es decir, no es instantáneo. La actividad catalítica, sin cambio de cantidad de enzima, puede regularse a su vez de varias mane ras: i) por modificación covalente catalizada por otras enzimas (Holzer y Duntze, 1971; Stadtman y Chock, 1978); ii) por interacciones alostéricas con activadores o inhibidores (Monod et al., 1963; 1965; Koshland, 1970; Stadtman, 1970); iii) por las características cinéticas intrínsecas de la enzima, que permiten diversos tipos de respuestas frente a fluctuaciones en las concentraciones disponibles de sustratos y de productos.

Es frecuente que todos los mecanismos destinados a modular la actividad de las enzimas regulatorias operen en forma simultánea y coherente como para dar un máximo de sensibilidad a la respuesta frente a una determinada perturbación del medio celular (Sols, 1979).

# b) K $_{0.5}$ y $\rm n_{\rm H}$ , parámetros cinéticos fundamentales

La modificación de la actividad de una enzima frente a las variaciones en la concentración de sustratos es dependiente de los parámetros cinéticos  $K_m$  (o  $K_{0.5}$ ) y  $n_H$ .

Es importante el valor del parámetro cinético  $\rm K_m$  o  $\rm K_{0.5}$ , que corresponde a la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, en relación con los niveles de concentración del sustrato existentes en la célula y accesibles a la enzima. Dependiendo de la relación entre ambos valores, la concentración de sustrato y la  $\rm K_m$ , la modificación de la actividad enzimática podría ser más o menos sensible a las fluctuaciones intracelulares en los niveles de concentración del sustrato. Así, si el valor de  $\rm K_m$  es mayor que los niveles de sustratos, la variación de la actividad será con bastante aproximación directamente proporcional a la variación en la concentración del sustrato, es decir, el orden de la reacción será cercano a 1. Esto de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten, que describe la relación entre velocidad y concentración de sustrato en la mayoría de las

enzimas:  $v = V \cdot S/(K_m + S)$ . Parece ser muy general que el valor de  $K_m$  es semejante o mayor que la concentración total de sustrato intracelular (Tabla 6.6 en Larner, 1971).

El otro parámetro cinético responsable de la magnitud de la respuesta de la velocidad enzimática frente a la variación de la concentración de sustrato es el coeficiente de Hill (n<sub>H</sub>), que mide el grado de cooperatividad de la función de saturación. Si bien la cinética de un gran número de enzimas puede describirse mediante la ecuación clásica de Michaelis-Menten, la mayor parte de las enzimas que catalizan reacciones claves en la regulación de vías metabólicas presentan cinéticas no-michaelianas, en las cuales se observa una cooperatividad positiva.

La propiedad de una enzima de responder con mayor sensibilidad que lo esperado de la ecuación de Michaelis frente a cambios en las concentraciones de sustrato alrededor de la  $K_{\rm m}$ , se conoce comúnmente como cooperatividad positiva. Se la ha llamado también activación por sustrato (Dixon y Webb, 1964). En contraposición, se habla de cooperatividad negativa cuando la sensibilidad es menor. La interacción de la enzima con ligandos iguales, que se traduce en cooperatividad positiva o negativa se denomina interacción homotrópica (Monod  $et\ al.$ , 1965). Todos estos términos fueron introducidos inicialmente considerando la unión cooperativa de ligandos en enzimas oligoméricas. Sin embargo, en los

últimos años también se han observado funciones de saturación no michaelianas, que pueden describirse como cooperati
vidad positiva o negativa, en enzimas monoméricas, con un
solo sitio activo. En la Discusión se analizarán con algún
detalle estas situaciones.

Es importante destacar que, en cualquier caso, las funciones de saturación de enzimas que presentan cooperatividad pueden ser descritas por medio de la ecuación de Michae lis-Menten si la concentración de sustrato (S) y la concentración de semisaturación ( $K_{0.5}$ ) se elevan a un exponente ( $n_{\rm H}$ ), que mide el grado de cooperatividad. En el caso de la ecuación clásica de Michaelis-Menten este exponente tendría el valor de 1,0, y sería mayor que 1,0 si la cooperatividad es positiva y menor que 1,0 si es negativa.

$$v = \frac{v \cdot s^{n_H}}{K_{0,5}^{n_H} + s^{n_H}}$$

Un coeficiente de Hill mayor que 1,0 implica que se requiere variar un menor número de veces la concentración de sustrato para tener una determinada variación de velocidad, en comparación con la requerida con un coeficiente de 1,0. Así por ejemplo, en una enzima que no presenta cooperatividad

 $(n_{\rm H}=1,0)$ , se necesita incrementar 81 veces la concentración de sustrato para aumentar la velocidad desde un 10% de la  $V_{\rm max}$  a un 90% de la misma, en cambio si el coeficiente de Hill es 1,5 se requiere un aumento de solo 18,7 veces (raíz  $n_{\rm H}$  de 81). Es decir, con un coeficiente de Hill lige ramente superior a 1,0 se estaría disminuyendo en más de cuatro veces el cambio de concentración de sustrato necesario para alcanzar una misma respuesta.

No es extraño tampoco que los mecanismos moduladores de la actividad enzimática que enunciamos antes, modificación covalente y modificación alostérica, operen mediante alteraciones de los parámetros  $\mathbf{K}_{0.5}$  y  $\mathbf{n}_{\mathrm{H}}$  en la gran mayoría de los ejemplos conocidos. Las relaciones son complejas pues también la modificación covalente suele variar la sensibilidad frente a la concentración de los efectores alostéricos.

# c) Glucoquinasa, una enzima regulatoria

Una enzima en la cual los parámetros cinéticos  $K_{0.5}$  y  $n_{\rm H}$  tienen por si mismos significación regulatoria de una función celular, como se comentará más adelante, es la glucoquinasa o hexoquinasa D (EC 2.7.1.2). Es una de las cuatro isoenzimas que catalizan la fosforilación de glucosa en el hígado de la rata (González et al., 1964; Katzen et al., 1965).

D-Glucosa + MgATP → D-Glucosa-6-P + MgADP + H<sup>+</sup>

El nombre de glucoquinasa y su clasificación como EC 2.7.1.2 en contraposición a las otras isoenzimas, que han recibido la denominación más amplia de hexoquinasas (EC 2.7.1.1), implica que se trataría de una enzima específica para la glucosa. Sin embargo, esto no es estrictamente así, pues puede fosforilar también otras hexosas. En este problema útil considerar algunos antecedentes históricos. Poco des pués de que en el laboratorio de Weinhouse (Di Pietro et al., 1962) se describiera que en extractos de hígado de rata la fosforilación de glucosa catalizada por la llamada glucoqui nasa ocurría con una K<sub>m</sub> alta, se describió la presencia en el hígado de dos isoenzimas capaces de fosforilar glucosa: una de alta afinidad por glucosa (baja  $K_m$ ) y otra de baja afinidad (alta  $K_m$ ) (Viñuela et al., 1963; Walker, 1963). Esta última enzima correspondería a la señalada por Di Pietro et al., 1962). Viñuela et al.(1963) propusieron conservar el nombre de glucoquinasa (EC 2.7.1.2) para la enzima del higado caracterizada por una alta Km (= 10 mM), con una ca pacidad relativamente baja de fosforilar fructosa a la con centración de 100 mM y una insensibilidad a la inhibición por glucosa-6-fosfato. La otra isoenzima, que aparecía como una típica hexoquinasa animal, pues tenía una Km muy baja para glucosa (= 0,01 mM), fosforilaba fructosa tan

bien como glucosa y era fuertemente inhibida por glucosa-6fosfato, se designó como hexoquinasa (EC 2.7.1.1).

Posteriormente, al resolverse el sistema de dos componen tes en uno de cuatro, se encontró que tres de las isoenzimas compartían las propiedades de las hexoquinasas y se las denominó hexoquinasas A, B y C según su movilidad cromatográfica decreciente en DEAE-celulosa (González et al., 1964) o hexoquinasas I, II y III, respectivamente, de acuerdo con su movilidad anódica creciente en electroforesis (Katzen etal., 1965). A la glucoquinasa también se la llama, según estos criterios, hexoquinasa D (González et al., 1964) hexoquinasa IV (Katzen et al ., 1965). Al analizar las velocidades relativas de fosforilación de fructosa y de gluco sa en las enzimas purificadas se encontró que mientras las hexoquinasas fosforilan 1,1 a 1,3 veces mejor la fructosa, la razón de fosforilación de fructosa y glucosa con glucoquinasa, es 0,2 (Tabla 4 en revisión de Niemeyer et al., 1975b). Es decir, se confirmó para cada una de las hexoqui nasas parcialmente purificadas lo que el grupo de Sols había obtenido para la mezcla de isoenzimas.

Si bien históricamente esta capacidad relativa de fosforilación de fructosa pudo ser un buen argumento para la denominación de la glucoquinasa, en estos momentos no lo es más. En efecto, si bien la Km para fructosa de la glucoquinasa es aproximadamente cien veces superior a la

correspondiente para glucosa, la velocidad máxima es más del doble (página 82 de esta tesis). En el caso de las hexoquinasas también la K<sub>m</sub> para fructosa es aproximadamente 100 veces mayor que la K<sub>m</sub> para glucosa, pero esta vez la velocidad máxima es solo ligeramente superior (Tabla 4 en Niemeyer et al., 1975b). Esto hace que, comparativamente, la fructosa sea mejor sustrato de la glucoquinasa que de las hexoquinasas de hígado de rata. Hay que considerar, sin embargo, que dadas las concentraciones de fructosa que se podrían al canzar dentro de la célula, la glucoquinasa in vivo no fosforilaría fructosa. Quizás lo podrían hacer las hexoquinasas, aunque es poco probable pues el metabolismo de la fructosa en el hígado ocurre mediante la fosforilación en el carbono 1 por acción de la fructoquinasa (Hers, 1955).

Aunque en rigor el término de glucoquinasa debería reservarse para las enzimas específicas para glucosa y que han sido aisladas en invertebrados y en microorganismos (Ureta et al., 1979), a falta de una alternativa mejor usaremos en esta tesis la denominación de glucoquinasa para referirnos a la isoenzima D.

Trabajos muy recientes señalan con buenos argumentos que la glucoquinasa es una enzima exclusiva del hígado, pues la actividad fosforilante de glucosa de baja afinidad, comu nicada por diversos autores en varios tejidos, parece corresponder a la N-acetilglucosamina-quinasa y no a la

glucoquinasa (Vera et al., 1977; Davagnino y Ureta, 1978;

Davagnino, 1979; Davagnino y Ureta, 1980; Allen et al., 1980;

Vera, 1981).

Como el hígado es un tejido formado por varias clases de células, ha sido un problema saber la distribución celular de las isoenzimas fosforilantes de glucosa. Hay consenso en que la glucoquinasa se encuentra en los hepatocitos o células parenquimatosas pero existían dudas sobre la presencia en ellos de las hexoquinasas. Se ha postulado que éstas existirían solo en las células sinusoidales o no parenquimatosas (Revisión y referencias en Hue, 1979), entre las que predominan las células de Küpfer y las células endoteliales. Sin embargo, trabajos en curso en este laboratorio muestran con claridad que si bien la glucoquinasa se encuentra sólo en los hepatocitos, las tres hexoquinasas se encuentran tanto en los hepatocitos como en las células sinusoidales (Reyes y Cárdenas, 1980; Reyes et al., 1980.

En el hígado, la glucoquinasa da cuenta de un 85% de la actividad total fosforilante de glucosa (González et al., 1964) y parece jugar un papel clave en la utilización de la glucosa en el hepatocito. Su nivel de actividad puede ser alterado por factores dietarios y hormonales, los que aparentemente no alteran a las otras isoenzimas (revisión en Niemeyer y Ureta, 1972; Niemeyer et al., 1975b y Weinhouse, 1976). Este control grueso de la fosforilación de la glucosa corresponde a cambios en la masa de enzima

(Clark-Turri et al., 1974).

Se podría esperar que existieran mecanismos adicionales que fueran más rápidos y permitieran el ajuste fino de la actividad enzimática a las condiciones fisiológicas de apor te variable de glucosa. Si bien no se ha comunicado que ocurra una modificación covalente de la glucoquinasa, ni que existan modificadores alostéricos que modulen la actividad catalítica, desde su descubrimiento se ha vinculado la baja afinidad de la glucoquinasa por glucosa al papel que le corresponde en el hígado. En efecto, la propiedad de la glucoquinasa de tener un alto valor de  $K_m$ , dentro del rango fisiológico de la concentración de glucosa en la sangre de la vena porta, permitiría a la enzima ajustar automáticamente su actividad catalítica en respuesta a los cambios en la concentración de glucosa que llega al hepatocito. Aunque se había descrito una función de saturación hiperbólica con glucosa para la glucoquinasa de rata (González et al., 1967; Parry y Walker, 1967; Pilkis, 1972) y de conejo (Salas et al., 1965), algunas anormalidades descritas plan teaban dudas sobre si realmente la cinética era hiperbólica. Así, en el trabajo de González et al. (1967) se había encontrado un aplanamiento en la curva de saturación que fue interpretado como inhibición por exceso de sustrato. Por otra parte, Parry y Walker (1967) describieron un quiebre en el gráfico de dobles recíprocos (curva bifásica) con la enzima

obtenida en ciertas condiciones de purificación y que los autores interpretaron como la consecuencia de la formación de fragmentos de enzima durante la purificación, con propie dades catalíticas modificadas, pero sin significado fisiológico.

Posteriormente, en este laboratorio se encontró que las glu coquinasas de hamster y de rata presentaban una característica cinética que había pasado inadvertida inicialmente, consistente en una función de saturación sigmoidea con glu cosa, con un coeficiente de Hill de alrededor de 1.5 (Niemeyer, 1972), y que daba cuenta de las anormalidades descritas.

La cooperatividad cinética presentada por la glucoquinasa es interesante porque podría contribuir a la regulación de la captación de glucosa en el hepatocito pues, como se comentó anteriormente, aumenta la sensibilidad de la respuesta de fosforilación de la glucosa frente a cambios en la concentración de este sustrato en torno al  $K_{0.5}$ .

La cooperatividad sería una característica distintiva de la glucoquinasa, pues las hexoquinasas de baja Km de muchos vertebrados, presentan ya sea una cinética hiperbólica normal (isoenzimas A y B) o inhibición por exceso de glucosa (isoenzima C) (revisión en Niemeyer et al., 1975b; Ureta et al., 1979).

## d) Propósitos y logros de esta tesis

El propósito general de esta tesis ha sido estudiar en de talle la conducta cinética cooperativa de la glucoquinasa y formular una explicación molecular de ella.

Como fines específicos se plantearon los siguientes:

- 1) Determinar si la cooperatividad cinética con glucosa era un rasgo preservado evolutivamente en la enzima de los vertebrados.
- 2) Establecer si la cooperatividad ocurría también con los otros sustratos glucídicos, manosa, fructosa y 2-desoxiglucosa, así como con el sustrato nucleotídico MgATP.
- 3) Establecer si la cooperatividad dependía del estado de purificación de la enzima.
- 4) Estudiar el efecto de las variaciones en la composición del medio de ensayo, tales como pH y fuerza iónica, sobre la cooperatividad.
- 5) Intentar suprimir la cooperatividad (desensibilizar la enzima) mediante tratamientos que alteran la conformación de proteínas.
- 6) Estudiar el efecto sobre la cooperatividad de inhibidores competitivos análogos de la glucosa, así como pesquisar la posible existencia de efectores alostéricos.

7) Determinar la estructura cuaternaria de la enzima en las condiciones de ensayo.

El cumplimiento del propósito general de dar una explica ción molecular de la cooperatividad cinética fue difícil, porque la glucoquinasa resultó ser una enzima monomérica, que mantenía su condición de tal en las condiciones de ensayo, dado lo cual no era posible adaptar los modelos clásicos, como se analizará en detalle en la Discusión. Por esto, también los resultados obtenidos fueron de difícil interpretación, por cuanto no se ajustan a los hallazgos comúnmente descritos en la literatura, que corresponden a enzimas oligoméricas. Hasta la fecha solo se han encontrado unas pocas enzimas monoméricas con cinética no-michaeliana, las que se analizan en algún detalle en la Discusión.

Se encontró que la cooperatividad con glucosa era una característica común de las glucoquinasas de vertebrados (coeficiente de Hill 1,4 a 1,7). La cooperatividad ocurría también al usar manosa como sustrato (coeficiente de Hill 1,5), en cambio no se observaba cooperatividad al usar 2-desoxiglucosa o fructosa. La función de saturación con MgATP como sustrato variable era hiperbólica.

La cooperatividad persistía después de someter a la enzima a diversas etapas de purificación y no dependía de la
concentración de proteínas presentes. Tampoco se alteraba
al variar la composición del medio de ensayo en cuanto a pH,

fuerza iónica o presencia de agentes reductores de grupos tioles, que modificaban los otros parámetros cinéticos,  $K_{0.5}$  y  $V_{\rm max}$ . Diversos tratamientos (fotooxidación, calentamiento y acción de agentes desnaturalizadores) no lograron suprimir la cooperatividad, pero disminuyeron la  $V_{\rm max}$  y aumentaron el  $K_{0.5}$ . Parecería que la glucoquinasa en la medida que retiene la actividad catalítica, retiene la característica de presentar una función de saturación sigmoidea con glucosa.

Se logró determinar que el grado de cooperatividad dependía de la concentración del sustrato nucleotídico, de modo que la función se hacía hiperbólica a una concentración de MgATP alrededor de 5 veces menor que la  $K_{\rm m}$ . Por otra parte, la presencia de los sutratos alternativos (manosa, fructosa y 2-desoxiglucosa) y del análogo N-acetilglucosamina, que actúan como inhibidores competitivos respecto a glucosa, produce conjuntamente con un aumento del  $K_{0.5}$  una disminución en la cooperatividad, alcanzándose un coeficiente de Hill de 1,0 a concentraciones suficientemente altas del inhibidor. La presencia de ADP, pero no la de glucosa-6-fosfato, ambos productos de la reacción, logra suprimir la cooperatividad. No se encontraron metabolitos que pudieran actuar como efectores alostéricos.

Las observaciones son compatibles con un modelo en régimen estacionario en el cual la glucosa puede unirse a dos formas no equivalentes de enzima. En la Discusion se proponen dos modelos basados en la existencia de un cambio con formacional inducido por glucosa y que contemplan la unión al azar de los sustratos a la enzima.

## B. MATERIALES Y METODOS

#### 1. REACTIVOS

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, EE UU) se obtuvieron los siguientes productos: ATP (sal disódica), ATP (sal sódica), ADP (sal sódica), NADP, NAD, fosfoenolpiruvato (sal potásica y monociclohexilamónica),  $\alpha-D(+)$ -glucosa,  $\beta-D(-)$ fructosa, D(+)-manosa, 2-desoxi-D(+)-glucosa, glucosa-6fosfato, D(+)-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) tipo VII de levadura de panadería -en ocasiones también se usó de Boehringer-, alcohol-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1) de levadura, piruvato-quinasa (EC 2.7.1.40) tipo II de músculo de conejo, lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27) tipo II de músculo de conejo, fosfoglucosa-isomerasa (EC 5.3.1.9) tipo III de levadura, fosfomanosa-isomerasa (EC 5.3.1.8) de levadura, Trizma base, Mes, Pipes, Triton X-100, EDTA, DL-ditiotreitol (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), azul de metileno, sacarosa, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-car bodiimida (EDC), CM-Sephadex, DEAE-Sephadex, Hidroxilapa tita. La DEAE-celulosa provenía tanto de Schleicher y Schuell como de Whatman (DE-52). El Sephadex (G-25, G-100, G-200), la CH-Sepharose 4B y el azul-dextrano 2000 eran de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia). La

Sepharose -N-(6-aminohexanoil)-2-amino-2-desoxi-D-glucopirano - sa (sefarosa-glucosamina) se preparó por acoplamiento de glucosamina con CH-Sepharose 4B por medio de EDC, en las condiciones recomendadas por Pharmacia Fine Chemicals. La mioglobina y la ovoalbúmina eran de Schwarz-Mann (Orange-burg, EE UU), y la [¹4C]-DL-leucina y el agua tritiada (T20) de New England Nuclear (Boston, EE UU). El sulfato de amonio, de pureza para uso enzimológico, se obtuvo de Mann Research Laboratories (New York, EE UU). Otros reactivos eran de calidad analítica, generalmente Merck (Darmstadt, RFA).

#### 2. ANIMALES

En la mayor parte de los experimentos se usaron ratas albinas adultas obtenidas de las colonias del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte; del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y del Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos. Desde 48 horas antes del sacrificio se daba a las ratas una dieta enriquecida en hidratos de carbono, adicionando sacarosa al agua de bebida (12 g/l). Ocasionalmente se emplearon otros animales, algunos de vida silvestre, obtenidos de variadas fuentes, como se indica en Resultados.

## 3. PREPARACION DE LA GLUCOQUINASA

Se usaron fundamentalmente dos métodos para purificar glu coquinasa de rata, dependiendo de la fecha en que se trabajó. Las propiedades cinéticas y estructurales que se han estudia do no han diferido en las enzimas obtenidas con uno u otro método.

Los animales (adultos jóvenes) bien alimentados se mataban por decapitación y después de dejarlos desangrar exhaustivamente se retiraban los hígados (200 g) y se mantenían en hielo. Se preparaba luego un homogeneizado al 50% en un homogeneizador Potter-Elvehjem después de una rápida desintegración en una juguera.

## Método 1

En este procedimiento, que fue el inicial, la solución amortiguadora usada en la homogeneización contenía (concentraciones finales): Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; glucosa 100 mM. El homogeneizado se centrifugaba 60 min a 30.000 rpm (78.400 g) en la ultracentrífuga Spinco modelo L. El líquido sobrenadante ( $S_1$ ) se filtraba por lana de vidrio para retener los lípidos concentrados en la superficie. A partir del  $S_1$ , la glucoquinasa se purificaba siguiendo básicamente el procedimiento descrito en este laboratorio (Babul y Niemeyer, 1966; González et al., 1967), modificado por la introducción de una etapa de filtración en gel después de la cromatografía de intercambio iónico. Brevemente, el

procedimiento consistía en:

- a) Tratamiento del  $S_1$  con carboximetil-Sephadex. El  $S_1$  se trataba en la proporción de 2:1 (v/v) con CM-Sephadex equilibrada con amortiguador A (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; DTT 1 mM). Después de 10 a 15 min se filtraba en un embudo Büchner con bomba de agua.
- material no retenido en CM-Sephadex se sometía a una cromato grafía en columna de DEAE-celulosa (habitualmente de 3,8 x 39 cm) equilibrada con amortiguador A. Después de lavar con KCl 180 mM preparado en amortiguador A se eluía la glucoquinasa con KCl en un gradiente lineal de concentración de 180 a 500 mM en medio A (600 ml por lado). Se recogían fracciones de 11 ml.
- c) Precipitación con sulfato de amonio al 80%. Las fracciones correspondientes a glucoquinasa se juntaban, se añadía glucosa hasta 100 mM final y luego se agregaba sulfato de amonio sólido hasta alcanzar una concentración correspondien te a un 80% de saturación a 0°. El pH se mantenía en 7,0 con hidróxido de amonio. Se dejaba en equilibrio hasta el día siguiente, se centrifugaba y se descartaba el sobrenadante.
- d) Filtración en Sephadex G-100. El precipitado se disolvía en un mínimo de KCl 300 mM preparado en amortiguador B (amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; DTT

1 mM), se le agregaba sacarosa a una concentración final de 15% y se filtraba a través de una columna de Sephadex G-100 habitualmente 2,5 x 50 cm) equilibrada en medio B con KCl 300 mM. Se recogían fracciones de 1,8 ml. En ocasiones, el precipitado de sulfato de amonio se dializaba antes de la fil tración, contra medio B con KCl 300 mM y sacarosa al 50%. ) Cromatografía en hidroxilapatita. La columna (2,7 x 10 cm) se preparaba con una mezcla de 20 ml de Bio-Gel HT con 10 q de celulosa y se equilibraba a pH 6,8 con fosfato de potasio 5 mM; EDTA 1 mM; DTT 1 mM. Las fracciones de glucoquinasa provenientes de Sephadex se precipitaban con sulfato de amonio al 80% de saturación en presencia de glucosa 100 mM. precipitado se disolvía en el medio de equilibrio recién descrito y se cromatografiaba. La elución se hacía con fosfato de potasio (preparado en EDTA 1 mM y DTT 1 mM) en un gradien te lineal de concentración de 5 a 150 mM, con el pH ascenden

La Tabla III, comentada en Resultados (1b) ilustra en forma resumida el procedimiento de purificación seguido en el metodo 1 (pág. 64).

te desde 6,8 a 7,6.

Algunas veces la glucoquinasa se guardaba a 4° (en refrigerador) por varios días o semanas en la forma de un precipitado de sulfato de amonio (80% de saturación) en presencia de glucosa 100 mM y DTT 1 mM. Antes de usarse, la enzima se

filtraba a través de una pequeña columna de Sephadex G-25 para eliminar la glucosa y el sulfato de amonio. Las preparaciones diluidas de glucoquinasa se concentraban en una pequeña columna de DEAE-celulosa, eluyendo la enzima con KC1 500 mM.

## Método 2

Corresponde al descrito por Cárdenas et al. (1978), que deriva del anterior e introduce nuevas modificaciones a las de Maccioni y Babul (1976) y de León et al. (1977). En este procedimiento, la solución homogeneizadora consistía en KCl 120 mM y glucosa 50 mM preparados en amortiguador B. El S<sub>1</sub> se obtenía igual que en el Metodo l y a partir de él se purificaba la glucoquinasa a través de los siguientes pasos:

a) Cromatografía en DEAE-celulosa (Schleicher y Schuell). El S<sub>1</sub> se cromatografíaba en una columna de DEAE-celulosa (habitualmente 3 x 60 cm) equilibrada con KCl 120 mM en amortiguador B. Después de lavar exhaustivamente con esta misma solución, la enzima se eluía con KCl en un gradiente lineal de concentración de 120 a 500 mM preparado en amortiguador B (1000 ml por lado).

b) Fraccionamiento con sulfato de amonio. A la glucoquinasa eluida de la etapa anterior se le agregaba la sal hasta el

45% de saturación, en presencia de glucosa 50 mM, neutralizando con hidróxido de amonio. Se dejaba equilibrar alrededor de 2 horas. Luego de centrifugar se llevaba el sobrenadante al 80% de saturación y se dejaba a 0° hasta el día siguiente.

- c) Filtración en gel. Se usaba una columna de Sephadex G-100 (generalmente de 3 x 60 cm), equilibrada con amortiguador B, conteniendo KCl 300 mM y se procedía como en el  $método\ 1$ .
- d) Cromatografía de afinidad. Se usaba una columna de CH-Sepharose unida a glucosamina (sefarosa-glucosamina). Para realizar la cromatografía, la enzima obtenida de la eta pa anterior se diluía con amortiguador B de modo de tener una concentración final de KCl de 50 mM, condición en la cual la glucoquinasa era retenida. La elución de la enzima se llevaba a cabo con glucosa 1 M preparada en la misma solución. La concentración de la enzima y la eliminación de la glucosa se realizaba por adsorción en una pequeña co lumna de DE-52 celulosa (Whatman) y posterior elución con amortiguador B que contenía KCl 500 mM.
- e) En algunos casos se realizaba una etapa adicional de cromatografía en una columna de DEAE-Sephadex.

La tabla I ilustra en forma resumida una preparación de glucoquinasa con este método.

TABLA I

Ilustración resumida de la purificación de la glucoquinasa por el método 2

Etapa	Volumen (ml)	Actividad total <sup>a</sup> (unidades)	Actividad especifica <sup>b</sup> (U/mg proteinas)
Sobrenadante 78.000 g	188	160	0,02
DEAE-celulosa	135	64	0,21
Sephadex G-100 <sup>c</sup>	45	56	2,9
Sefarosa-Glc	110	46	30
Concentración DE-52	4	41	30

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>La actividad enzimática se determinó a pH 7,5 mediante el ensayo la como se describe en Materiales y Métodos

bLa concentración de proteínas se estimó por el método de Warburg y Christian (Dawson et al., 1972), midíendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

<sup>&</sup>lt;sup>C</sup>La enzima proveniente de DEAE-celulosa se sometía a un fraccionamiento con sulfato de amonio (45 al 80%) antes de filtrar por Sephadex

## 4. CONTROL DE ENZIMAS CONTAMINANTES

La enzima obtenida por ambos métodos no era homogénea. Por esta razón, se realizaban ensayos para pesquisar posibles enzimas contaminantes que pudieran interferir en los experimentos. Se encontró que las preparaciones usadas no presentaban actividad hexoquinasa, glucosa-deshidrogenasa, 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, fosfoglucosa-isomerasa, fosfomanosa-isomerasa, glucosa-6-fosfatasa, N-acetilglucosamina-quinasa y adenosintrifosfatasa. La enzima provenien te de la etapa de DEAE-celulosa salía contaminada con N-acetilglucosamina-quinasa (Fig. 1), la cual se eliminaba con el corte de sulfato de amonio y con la cromatografía de afinidad. La contaminación con N-acetilglucosamina-quinasa es importante de considerar porque esta enzima presenta actividad fosforilante de glucosa y es más estable que la glu coquinasa (Vera et al., 1977; Davagnino y Ureta, 1980). glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa eluye junto con la glucoqui nasa en DEAE-celulosa, aún después de una recromatografía en este medio (Fig. 2) y se detecta todavía en las preparaciones de elevada actividad específica. Corresponde a una de bandas de proteínas contaminantes observadas al hacer electro foresis en geles de poliacrilamida después de Sefarosa (Toro y Espinosa, comunicación personal). No pareció demasiado importante remover la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, ya que

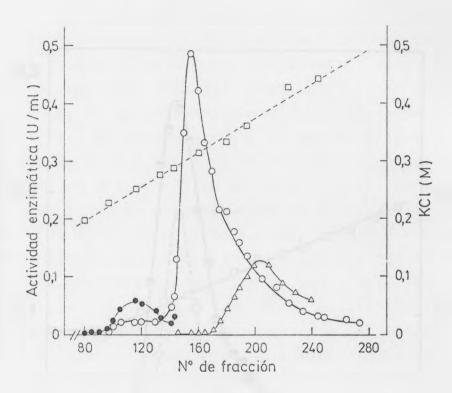


Figura 1. Cromatografía en DEAE-celulosa de la glucoquinasa y de la N-acetilglucosamina-quinasa. El S<sub>1</sub> proveniente de 157 g de hígado (16 ratas) se cromatografió en DEAE-celulosa (columna de 3 por 60 cm), como se describe en el Método 2, recogiéndose fracciones de 7 ml. La concentración de KCl (□) se determinó midiendo la conductividad del eluído. La actividad fosforilante de glucosa se determinó a pH 7,5 con glucosa 0,5 (•) y 100 mM (O), mediante el ensayo la. La actividad fosforilante de N-acetilglucosamina se determinó a pH 7,5 mediante el ensayo 2 (△), usando N-acetilglucosamina 1 mM.

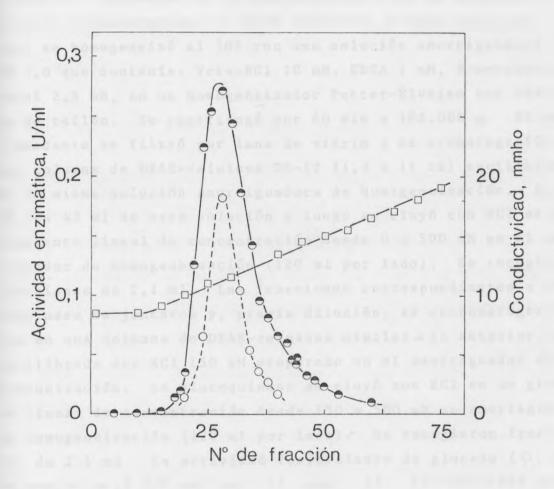


Figura 2. Leyenda en la página siguiente

Figura 2. Coelución de la glucoquinasa y de la glucosa-6fosfato-deshidrogenasa en DEAE-celulosa. Un higado (9,5 g) de rata se homogeneizó al 50% con una solución amortiguadora a pH 7,0 que contenía: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 2,5 mM, en un homogeneizador Potter-Elvejem con vástago de teflón. Se centrifugó por 60 min a 100.000 q. El sobrenadante se filtro por lana de vidrio y se cromatografió en una columna de DEAE-celulosa DE-52 (1,3 x 14 cm) equilibrada en la misma solución amortiguadora de homogeneización. vó con 42 ml de esta solución y luego se eluyó con KCl en un gradiente lineal de concentración desde O a 500 mM en el amor tiguador de homogeneización (120 ml por lado). Se recogieron fracciones de 2,1 ml. Las fracciones correspondientes a glucoquinasa se juntaron y, previa dilución, se recromatografíaron en una columna de DEAE-celulosa similar a la anterior, pero equilibrada con KCl 150 mM preparado en el amortiguador de homogeneización. La glucoquinasa se eluyó con KCl en un gradien te lineal de concentración desde 150 a 500 mM en amortíguador de homogeneización (120 ml por lado). Se recogieron fracciones de 2,1 ml. La actividad fosforilante de glucosa (O) se determinó a pH 8,0 mediante el ensayo la. La actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa ( → ) se determinó midiendo a pH 8,0 el NADPH, formado, en un medio que contenía Tris-HCl, EDTA, MgCl<sub>2</sub>, KCl, DTT y NADP a las mismas concentraciones que el ensayo la y glucosa-6-P l mM. La concentración de KCL se estimó midiendo la conductividad del eluido (□).

por una parte esta enzima es un constituyente normal de uno de los ensayos acoplados (ensayo 1) y, por otra, no actúa con NAD (Anstall y Trujillo, 1967) por lo que tampoco interferiría en el ensayo 2.

## 5. PREPARACION Y CONTROL DE SOLUCIONES

Todas las soluciones se preparaban en agua bidestilada (bidestilador de vidrio) o en agua destilada y desionizada. Cuando se necesitaba ajustar el pH se usaba generalmente KOH o HCl. La solución de ATP se ajustaba a pH 7,0 y se guardaba congelada. El ADP contaminante del ATP se determinaba por acoplamiento de la conversión del ADP en ATP a la oxidación del NADH2, usando piruvato-quinasa y deshidrogenasa-láctica en presencia de concentración saturante de PEP (ensayo 2). El ATP usado contenía no más de un 2 a 3% de ADP. La posible contaminación de la fructosa o de la manosa con glucosa se analizaba mediante el acoplamiento de la conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato a la reducción de NADP, usando glucosa (o hexoquinasa) y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (ensayo la). No se encontró glucosa contaminante.

## 6. ENSAYO DE LA GLUCOQUINASA

La actividad fosforilante de glucosa se determinaba espectrofotométricamente, midiendo la producción de glucosa-6-P

(ensayo la) o de ADP (ensayo 2). En el ensayo de la actividad fosforilante de los sutratos alternativos se medían los
ésteres fosfóricos, mediante el ensayo lb en el caso de fructosa y el ensayo lc en el de manosa, o el ADP formado (ensayo 2). Este último método era el único aplicable a la
2-desoxiglucosa.

Una unidad (U) de glucoquinasa se definió como la cantidad de enzima que cataliza la fosforilación de 1 µmol de sus trato en 1 min a 30° en las condiciones de ensayo. Para la definición no se hizo diferencia entre determinaciones efectuadas a pH 7,5 o pH 8,0 por ser de magnitud muy pequeña. Se ha preferido seguir usando la unidad tradicional en enzimolo gía en vez de la unidad internacional estándar "katal", debido a que esta última es una cantidad de actividad catalítica demasiado grande en relación con lo que realmente se mide. Un katal es la cantidad de enzima suficiente para catalizar la transformación de 1 mol de sustrato en producto en 1 s bajo condiciones estándar. Probablemente el uso aconsejará el empleo de submúltiplos, tal vez nkat. Una unidad habitual de enzima (µmol/min) correspondería a 16,7 nkat. A su vez

Los ensayos se realizaban en cubetas de cuarzo de 1 ml con paso de luz de 1 cm. La mezcla de ensayo se preincubaba a 30° por 3 min antes de iniciar la reacción. En esta opera ción se usaba un preincubador de bronce diseñado por nosotros, a través del cual circulaba agua a 30° proveniente del baño termorregulado, y en el que se colocaba el carro con cubetas (Fig. 3).

Una vez iniciada la reacción, generalmente con el sustrato glucídico, se detectaban los cambios de absorbancia a 340 nm (reducción de NADP en el ensayo 1 y oxidación de NADH<sub>2</sub> en el ensayo 2) mediante un espectrofotómetro Gilford modelo 2400. El coeficiente de extinción molar de NADH<sub>2</sub> y de NADPH<sub>2</sub> a 340 nm es 6220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. El cambio de absorbancia se registraba por varios minutos con el objeto de tener seguridad de que se estaba trabajando con la porción lineal de la cur va de progreso.

Las velocidades iniciales se estimaban a partir de los trazos de la curva de progreso registrados en el inscriptor, mediante una regla y un lápiz. Para obtener una mayor precisión se procuraba tener una pendiente de 45° en la curva de progreso. No era necesario hacer correcciones por curva tura, ya que los trazos fueron siempre esencialmente rectos, al menos durante los 5 primeros minutos de cada ensayo, lo que se explica por el reducido consumo habitual de sustratos en relación con las concentraciones iniciales usadas. En

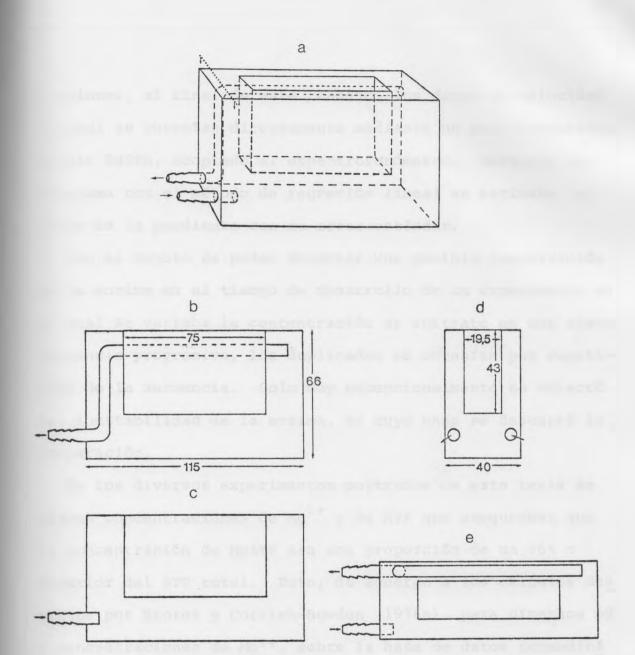


Figura 3. Esquema del preincubador. Las dimensiones están indicadas en milímetros. a) Figura completa; b) y c) cortes verticales, visión lateral; d) corte vertical, visión frontal; e) corte transversal, visión superior.

casiones, al final de este trabajo, los datos de velocidad inicial se obtenían directamente mediante un microcomputador Altair 8800b, acoplado al espectrofotómetro. Mediante un programa con el método de regresión lineal se estimaba el valor de la pendiente con su error estándar.

Con el objeto de poder detectar una posible inactivación de la enzima en el tiempo de desarrollo de un experimento en el cual se variaba la concentración de sustrato en una cierta secuencia progresiva, los duplicados se obtenían por repetición de la secuencia. Solo muy excepcionalmente se detectó tal inestabilidad de la enzima, en cuyo caso se descartó la preparación.

En los diversos experimentos mostrados en esta tesis se usaron concentraciones de Mg<sup>2+</sup> y de ATP que aseguraban que la concentración de MgATP era una proporción de un 86% o superior del ATP total. Esto, de acuerdo a los cálculos des critos por Storer y Cornish-Bowden (1976a), para diversos pH y concentraciones de Mg<sup>2+</sup>, sobre la base de datos termodinámicos (Phillips et al., 1966). Por esta razón, no se hicie ron correcciones y se consideró como concentración de MgATP a la de ATP total.

Ensayo la.

La producción del glucosa-6-fosfato se detectaba mediante un ensayo acoplado basado en el de Slein et al. (1950), con glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa como enzima acoplante y un exceso de NADP. El NADPH<sub>2</sub> producido en la reacción acoplada presenta un pico de absorción a 340 nm, que no posee el compuesto inicial oxidado.

- i) Glucosa + MgATP → glucosa-6-P + MgADP
- ii) Glucosa-6-P + NADP → 6-P-gluconato + NADPH2

La mezcla de reacción, a menos que se indique otra cosa, corresponde a la descrita en Cárdenas et al. (1978) y con tenía (concentraciones finales), en un volumen de 0,5 ml:

Tris-HCl 80 mM, pH 7,5 u 8,0; KCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 12 mM;

EDTA 1 mM; DTT 2,5 mM; NADP 0,5 mM; 0,3 a 0,5 unidades/ml de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa; ATP 5 mM; glucoquinasa y concentraciones variables de glucosa. Generalmente se usa ba una alícuota de 0,05 a 0,1 ml de glucoquinasa. Como norma habitual, los componentes del medio, incluidos desde Tris-HCl hasta la enzima auxiliar, se mezclaban previamente al ensayo, en forma de disponer de ellos en un volumen de 0,25 a 0,30 ml. Las variaciones en la composición del

medio que se hicieron con determinados propósitos experimen tales se indican en Resultados. De rutina se hacían blancos sin glucosa, los cuales normalmente daban una lectura de cero, y otros sin ATP, a distintas concentraciones de gluco sa. Estos últimos blancos corresponden a la actividad glucosa-deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa r eran generalmente menores que el 5% de la absorbancia correspondiente a la actividad de glucoquinasa con glucosa 100 mM e indetectables a concentraciones de glucosa menores que 10 mM; estos valores no dependían de la presencia de glu coquinasa, pese a que ella estaba contaminada con glucosa-6fosfato-deshidrogenasa. Los blancos sin enzima, correspondientes a la actividad hexoquinásica de la preparación de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, daban lecturas de cero. Esta enzima auxiliar, obtenida de fuente comercial, tuvo oca sionalmente en las etapas iniciales de este trabajo, una con taminación no despreciable de hexoquinasa, por lo cual fue rechazada.

## Ensayo lb.

La producción de fructosa-6-fosfato se seguía a través de la reducción de NADP en presencia de glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y de fosfoglucosa-isomerasa como enzimas aco
plantes (Slein et al., 1950).

- i) Fructosa + MgATP → Fructosa-6-P + MgADP
- ii) Fructosa-6-P → Glucosa-6-P
- iii) Glucosa-6-P + NADP → 6-P-gluconato + NADPH2

La mezcla de reacción era semejante a la del ensayo la, con la diferencia que contenía 0,7 a 0,8 unidades/ml de glu cosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 2 unidades/ml de fosfoglucosa-isomerasa y concentraciones variables de fructosa en lugar de glucosa. Se hacía el mismo tipo de blancos que en el ensayo la, pero el blanco sin ATP daba lecturas de cero debido a que la fructosa no es oxidada.

## Ensayo lc.

La producción de manosa-6-fosfato se determinaba a través de la reducción de NADP en presencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, fosfoglucosa-isomerasa y fosfomanosa-iso merasa como enzimas acoplantes (Slein et al., 1950).

- il Manosa + MgATP → Manosa-6-P + MgADP
- ii) Manosa-6-P -- Fructosa-6-P
- iii) Fructosa-6-P → Glucosa-6-P
- iv) Glucosa-6-P + NADP 6-P-gluconato + NADPH2

La mezcla de reacción era semejante a la del ensayo la, pero contenía 1,4 unidades/ml de glucosa-6-fosfato-deshidro penasa; 4,6 unidades/ml de fosfoglucosa-isomerasa; 8 unida-les/ml de fosfomanosa-isomerasa y concentraciones variables manosa. Se hacían blancos semejantes a los del ensayo la actividad manosa-deshidrogenasa de la glucosa-6-fosfato-leshidrogenasa era indetectable a las concentraciones de ma cosa empleadas.

## Ensayo 2.

La producción de ADP se seguía a través de la oxidación de NADH<sub>2</sub>, en presencia de piruvato-quinasa y de deshidrogeasa láctica como enzimas acoplantes y de un exceso de fosfoenolpiruvato (Kornberg y Pricer, 1951).

- il Glucosa + MgATP → Glucosa-6-P + MgADP
- il MgADP + P-enolpiruvato Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> MgATP + Piruvato
- Lii) Piruvato + NADH2 → Lactato + NAD

La mezcla de reacción, a menos que se indique otra cosa, contenía (concentraciones finales), en un volumen final total

de 0,5 ml: Tris-HCl 80 mM, pH 7,5 u 8,0; KCl 100 mM; MgCl 12 mM; EDTA 1 mM; DTT 2,5 mM; P-enolpiruvato 2,5 mM; NADH, 0,33 mM; 2,0 unidades/ml de piruvato-quinasa; 2,0 unidades/ml de deshidrogenasa láctica; ATP 5 mM; 0,05 a 0,1 ml de glucoquinasa U en cada figura) y concentraciones variables de glucosa, fruc tosa, manosa o 2-desoxiglucosa, según el caso. El ADP contaminante no interfería en el ensayo, ya que durante la preincubación del sistema, previo a la partida de la reacción con el azúcar o con glucoquinasa, era transformado en ATP. De ruti na se hacían blancos separados sin ATP, sin glucoquinasa y sin glucosa. Los controles sin ATP eran siempre cero; los blancos sin glucoquinasa, correspondientes a posibles actividades hexoquinásicas e hidrolizantes de ATP presentes en las enzimas auxiliares, eran generalmente cero. Cuando ocasionalmente estas actividades contaminantes no fueron despreciables, se descartó la enzima auxiliar contaminada. Los blancos sin glucosa, correspondientes a posible actividad hidrolizante de ATP en las preparaciones de glucoquinasa, tenían un valor que dependía del grado de purificación de la enzima. En preparaciones provenientes de Sephadex o más puras, eran menores que un 3% de la absorbancia correspondiente a la actividad de glucoquinasa con 100 mM glucosa.

## 7. CRITERIO PARA ELEGIR LA CONCENTRACION DE ENZIMAS AUXILIARES

Se trató de usar, en los diferentes ensayos de la gluco quinasa, la cantidad mínima de cada enzima auxiliar que per mitiera una adecuada estimación de la velocidad de la reacción. La idea era evitar posibles interferencias debido a actividades secundarias de dichas enzimas. Por ejemplo, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa puede oxidar también a la glucosa, como ya se comentó.

Al medir la velocidad de conversión de un sustrato A en su producto B en un ensayo con una o más enzimas auxiliares, es necesario considerar dos aspectos:

- i) Las concentraciones de los metabolitos intermediarios en el régimen estacionario, las cuales deben ser menores que las respectivas  $K_{m}$  aparentes de las enzimas que los transforman, a fin de asegurar que cada reacción sea de orden 1.
- ii) El tiempo requerido para que el sistema alcance el régimen estacionario. Este tiempo debe ser lo suficientemente
  pequeño como para que solo una muy pequeña fracción del sustrato se haya transformado en producto.

En la práctica se debe decidir qué fracción de la velocidad problema se requiere alcanzar y en qué tiempo y luego calcular las concentraciones adecuadas de las enzimas auxiliares.

a) En el caso más simple de solo una enzima auxiliar, como ocurre en el ensayo la, esquematizado a continuación:

$$A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C$$

$$GK \xrightarrow{G6PDH} C$$

el número de unidades de enzima auxiliar  $(V_2)$  se calculó a partir de la ecuación (1) (McClure, 1969):

$$V_2 = \frac{-K_B \ln(1-F_B)}{t^*}$$
 (1)

donde  $K_B$  corresponde a la  $K_m$  aparente para B de la enzima auxiliar y  $F_B$  al coeficiente que señala la fracción de la concentración de B en el régimen estacionario que se desea alcanzar en un tiempo prefijado t\*.

En la derivación de esta ecuación se requiere hacer dos presunciones:

() La primera reacción, es decir, la que interesa medir, se comporta como una reacción irreversible y de orden cero. La irreversibilidad tiene validez porque el producto se retira continuamente. Para que se cumpla que la constante de velocidad sea de orden cero se requiere que solo una pequeña fracción de A se transforme en B.

Dado el alto valor de  $K_{0.5}$  para glucosa y las velocidades de reacción que se miden, aún a concentraciones muy bajas de este sustrato, menores de 0,1 veces  $K_{0.5}$ , la fracción de glucosa que se transformaba en el período previo a alcanzar el régimen estacionario era muy pequeña, menor que 0,05 a 0,1%. Más aún, el porcentaje total de glucosa trans formada en el tiempo total de ensayo era menor que 1% en esas condiciones, lo que permitía que se cumpliera la condi ción implícita en el uso de un sistema acoplado, cual es que la constante de velocidad de la reacción problema se compor te como constante de orden cero en el tiempo de ensayo. Es tas consideraciones son igualmente válidas para los otros sus tratos glucídicos (manosa, 2-desoxiglucosa y fructosa).  $ec{\iota}\dot{\iota})$  La segunda reacción es irreversible y de primer orden con respecto a B. La irreversibilidad se cumple si el equilibrio de la reacción está muy desplazado hacia la derecha o si solo se detecta una pequeña fracción de la reacción (se está muy lejos del equilibrio). La presunción de orden 1 requiere que la concentración de B sea mucho menor que  $K_{\mathrm{R}}$  y que cualquier otro sustrato de la reacción esté en concentración saturante.

Si se cumplen ambas presunciones, la transformación de B en C está determinada por la expresión:

$$-\frac{dB}{dt} = \frac{V_2}{K_B} B$$

donde  $V_2/K_B$  corresponde a la constante de velocidad de primer orden  $(k_2)$  y B es la concentración del producto B. (Provienne de la ecuación de Michaelis cuando B  $\ll K_B$ ).

La variación de B en el tiempo va a estar dada por:

$$\frac{dB}{dt} = k_1 - k_2 B$$

donde  $k_1$  es la constante de velocidad de orden cero de la primera reacción y  $k_2$  la constante de velocidad de primer orden de la segunda.

Para determinar la concentración de B en cualquier tiempo t ( $B_{t}$ ) se integra la expresión diferencial.

$$\int \frac{\mathrm{dB_t}}{k_1 - k_2 B_t} = \int \mathrm{dt}$$

 $sea u = k_1 - k_2 B_{t}$ 

$$-\frac{1}{k_2}\int \frac{\mathrm{d}u}{u} = \int \mathrm{d}t$$

$$-\frac{1}{k_2}\left[\ln u\right] = \int dt$$

Poniendo límites entre 0 y t

$$-\frac{1}{k_2}\left\{\ln(k_1-k_2B_t)-\ln(k_1-k_2B_0)\right\}=t$$

A tiempo cero  $\mathbf{B}_{\mathbf{0}}$  vale cero, luego

$$\ln(k_1 - k_2 B_t) - \ln k_1 = -k_2 t$$

y aplicando la función exponencial

$$\frac{k_1 - k_2 B_t}{k_1} = e^{-k_2 t}$$

Por reordenamiento algebraico se llega finalmente a la expresión (2)

$$B = \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t})$$
 (2)

que en régimen estacionario (ss) se reduce a:

$$B_{SS} = \frac{k_1}{k_2}$$

A fin de determinar el tiempo requerido para alcanzar una cierta fracción de  ${\rm B}_{_{SS}}$  se reordena la ecuación (2):

$$e^{-k_2t} = 1 - \frac{k_2}{k_1} B$$

y aplicando logaritmo se llega a:

$$t = \frac{-\ln\left(1 - \frac{k_2}{k_1} B\right)}{k_2}$$

En un tiempo t\* se alcanzará una concentración de B igual  $\mathbf{E}_{\mathrm{B}} \frac{k_1}{k_2}$ , donde  $\mathbf{F}_{\mathrm{B}} = \mathbf{B}/\mathbf{B}_{ss}$ . Reemplazando en (3) se tiene  $\ln(1 - \mathbf{F}_{\mathrm{B}})$ 

$$t* = -\frac{\ln(1 - F_B)}{k_2}$$
 (3)

Como  $k_2 = \frac{V_2}{K_B}$ , se llega a la ecuación (1).

En la tabla II se ha calculado la cantidad de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa requerida en el ensayo la para alcanzar un  $F_B$  de 0,99 a distintos tiempos y la variación de  $F_B$  en función del tiempo al usar una concentración fija de la enzima auxiliar. En estos cálculos se consideró una  $K_m$  para glucosa-6-P de 0,15 mM(valor obtenido experimentalmente a pH 7,5).

El rango de las concentraciones de glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa usadas en el ensayo la (0,3 a 0,5 U/ml), per
mite cumplir con el propósito de tener con mucha seguridad
0,96 a 0,99 veces la concentración de glucosa-6-P en el régimen estacionario en 1 a 1,5 min. Las concentraciones de
la enzima auxiliar concuerdan con las recomendadas por Storer
y Cornish-Bowden (1974), quienes hacen un tratamiento más
general para sus estimaciones, el cual acepta desviaciones
de la cinética de primer orden en las reacciones auxiliares.

TABLA II

Cantidad necesaria de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa ( $V_2$ ) usada como enzima auxiliar en el ensayo de la glucoquinasa $^a$ 

F <sub>B</sub>	t* (min)	V <sub>2</sub> (U/m1)
0,99	0,5	1,38
0,99	1,0	0,69
0,99	1,5	0,46
0,99	2,0	0,34
0,882	1,0	0,32
0,959	1,5	0,32
0,986	2,0	0,32

El cálculo de  $V_2$  se hizo aplicando la ecuación (1) y usando un valor se  $K_{\rm B}$  de 0,15 mM.

Es el coeficiente que señala la fracción de la concentración de glucosa-6-P en régimen estacionario alcanzada en un tiempo dado t\*.

b) En el caso en que se emplean varias enzimas auxiliares, como ocurre en el ensayo lo representado a continuación:

$$A \xrightarrow{k_1} B \xrightarrow{k_2} C \xrightarrow{k_3} D \xrightarrow{k_4} E$$
 $GK \xrightarrow{PMI} PGI \xrightarrow{G6PDH} E$ 

Se deben cumplir también las presunciones de que la primera reacción sea irreversible y de orden cero, y que, las reacciones auxiliares sean irreversibles y de orden uno. En esas condiciones se tendrá que la variación en la concentración de A, B, C, D y E estará dada por las siguientes expresiones

$$\frac{-dA}{dt} = \frac{V_{1}A}{K_{A} + A} = k_{1}$$

$$\frac{dB}{dt} = k_{1} - \frac{V_{1}B}{K_{B}} = k_{1} - k_{2}B$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{V_{2}B}{K_{B}} - \frac{V_{3}C}{K_{C}} = k_{2}B - k_{3}C$$

$$\frac{dD}{dt} = \frac{V_{3}C}{K_{C}} - \frac{V_{4}D}{K_{D}} = k_{3}C - k_{4}D$$

$$\frac{dE}{dt} = \frac{V_{4}D}{K_{D}} = k_{4}D$$

En el régimen estacionario se tendrá que:

$$k_1 = k_2 B_{ss} = k_3 C_{ss} = k_4 D_{ss}$$

En este caso, no es simple tener una expresión que permita calcular las concentraciones adecuadas de enzimas auxiliares para alcanzar una determinada fracción de la velocidad problema en un cierto tiempo. En efecto, las ecuaciones diferenciales que describen un sistema de esta naturaleza son bastante complejas, por lo que no es fácilmente extendible el análisis realizado para dos reacciones. Los distintos autores tratan en general de solucionar el problema mediante aproximaciones.

Una manera de asegurar que las concentraciones de cada uno de los metabolitos intermediarios sea baja es usar concentraciones de enzimas auxiliares tales que se cumpla la siguiente condición:

$$k_1 < \frac{v_2}{\kappa_p} < \frac{v_3}{\kappa_C} < \frac{v_4}{\kappa_D}$$

El análisis para dos reacciones permite, sin embargo, tener una estimación del tiempo requerido para alcanzar una determinada fracción de la velocidad problema  $(v_1)$  en presencia de determinada concentración de enzimas auxiliares. En efecto, se puede calcular primeramente el tiempo $(t_1^*)$  requerido para que  $v_2$   $(k_2B)$  alcance una fracción de  $v_1$ , por ejemplo  $0.98v_1$ . Este cálculo es lícito porque la tercera reacción no afecta  $v_2$ . En seguida, se puede considerar  $v_2$  como constante  $v_3$ 0 estimar el tiempo  $v_3$ 1 requerido para que  $v_3$ 2 alcance

un valor de 0,98 $v_2$ .Esto lleva por supuesto, a una sobreestimación del tiempo total requerido (t\*), pues  $v_3$  empieza a incrementar antes que  $v_2$  alcance el valor de 0,98 $v_1$ .

Este tipo de análisis nos permite, sin embargo, establecer límites superiores e inferiores, pues el tiempo total t\* será mayor que cada uno de los tiempos (t\*, t\*), pero menor que la suma de ellos (t\*, t\*). Siguiendo un razonamiento similar se puede calcular t\* y t\*. En este caso, los límites de t\* serían:

$$t_{1}^{*}, t_{2}^{*}, t_{3}^{*}, t_{4}^{*} < t^{*} < (t_{1}^{*} + t_{2}^{*} + t_{3}^{*} + t_{4}^{*})$$

#### E. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

El grado de sigmoidicidad de las funciones de saturación se evaluó mediante el coeficiente de Hill  $(n_H)$ , utilizando la expresión exponencial (4) o la expresión logarítmica de la e-cuación de Hill (5):

$$v = \frac{V \cdot s^n}{K + s^n} \tag{4}$$

$$\log \frac{v}{-v} = n_{H} \log S - \log K$$

$$V - v$$
(5)

Por razones prácticas en los gráficos y en las fórmulas que el coeficiente de Hill se utiliza como exponente, se simplemente el símbolo n en lugar de  $n_{\rm H}$ .

El coeficiente de Hill es un parámetro que, en una enzima pligomérica, expresa a la vez el número de sitios de unión de ligando y la cooperatividad existente entre esos sitios. Il valor del coeficiente de Hill tiende a ser igual al número es sitios a medida que la cooperatividad existente entre ellos liende a infinito y siempre que la conducta cinética de la entima sea el reflejo de su conducta en la unión de ligandos. In una enzima monomérica con un sitio único de unión de ligandos, el coeficiente de Hill no tiene un significado físico, sino que es solo un parámetro cinético que permite ajustar los latos a una función sigmoidea.

El parámetro  ${\rm K}_{0.5}$  es la concentración de sustrato a la cual se tiene la mitad de la velocidad máxima. Es igual a la raíz  ${\rm n}_{\rm H}$  de K.

El valor de la velocidad máxima aparente ( $V_{max}$  o V), para una concentración determinada de MgATP, se estimaba directamente del gráfico de la velocidad en función de la concentra — ción de sustrato, o bien mediante un programa de mínimos cuazrados, ejecutado en un microcomputador Altair, que ajustaba el estamente los datos a la ecuación exponencial por un méto- iterativo. Los valores de  $V_{max}$  obtenidos por uno u otro método diferían generalmente en menos de un 5%.

Los parâmetros  $K_{0.5}$  y  $n_{\rm H}$  se obtenían de la recta del gráfico de Hill, fuera esta trazada a ojo o calculada por el método de los mínimos cuadrados; para hacer el gráfico se consideraban valores de velocidad entre 0,1 V y 0,9 V. Los parámetros también se obtuvieron directamente con el programa de computación ya mencionado.

Los valores de los tres parámetros cinéticos (V, K<sub>0.5</sub> y n<sub>H</sub>)

Extenidos con cualquiera de los procedimientos o una combina
Tión de ellos a fin de someterlos a prueba, no diferían en ge
meral en más de un 5%.

Inicialmente se intentó obtener los parámetros cinéticos mediante el uso iterativo de las funciones de Hill (4) y de inewaver-Burk de acuerdo con las ideas de Wieker  $et\ al.$  (1970). De la función de dobles recíprocos, aunque no era lineal, se intenía una estimación gruesa de  $V_{max}$ , que luego se usaba en

la función de Hill para obtener un valor de  $n_H$ , que servía a su vez como exponente linearizador en un segundo cálculo de en la función de dobles recíprocos. Este nuevo valor de proporcionaba un valor de  $n_H$  más próximo al verdadero. Así se continuaba hasta alcanzar valores aproximadamente constantes de  $V_{max}$  y de  $n_H$ . Estas estimaciones eran laboriosas y al intentar realizarlas con programas de computación no se obtuvieron resultados alentadores, pues no había buen ajuste de las funciones calculadas a los datos experimentales.

#### 9. FOTOOXIDACION

La glucoquinasa de rata fué sometida a fotooxidación, empleando el azul de metileno como catalizador (Ray, 1967; Ahlfors y Mansour, 1969). Alícuotas de glucoquinasa de la etapa de purificación de hidroxilapatita se iluminaban en presencia de azul de metileno, a 0° y a pH 7,0 durante tiempos variables (0 - 25 min). Como fuente luminosa se usaba una ampolleta de tungsteno de 100 watts colocada a 10 cm de la enzima, la cual se encontraba en un tubo cónico sumergido en hielo fundente. Un ventilador contribuía a evitar el calentamiento producido por la ampolleta. La solución de azul de metileno, en una concentración final de 2,57 μM, se utilizaba recién preparada. Como controles se hacían experimentos en tres condiciones: iluminación en ausencia de azul de metileno, oscuridad en presencia del oxidante y oscuridad sin azul de metileno. Para determinar el efecto de la fotooxidación sobre la actividad de la glucoquinasa, se trataban alícuotas de 0,2 ml de la enzima (48 mU), y para conocer el efecto sobre la función de saturación con glucosa, se usaban alícuotas de 1,0 ml (240 mU). Una vez finalizado el tiempo de fotooxidación proyectado, se determinaba la actividad en una alícuota de 0,05 ml, mediante el ensayo la, a pH 7,5.

La enzima fotooxidada era inestable durante el ensayo a concentraciones bajas de glucosa, menores que  ${\rm K}_{0.5}$ . Esta

inestabilidad se evitaba haciendo el ensayo en presencia de DTT 2.5 mM.

En una oportunidad se hizo la fotooxidación en una alfcuota de 0,75 ml (55 mU) de glucoquinasa de hígado de rana chilena, proveniente de la etapa de DEAE-celulosa (metodo 1). El procedimiento fue ligeramente diferente al descrito. La enzima se colocó en un matraz de fondo redondo, el cual estaba en posición inclinada y se hacía girar con un agitador rotatorio sobre agua con hielo. Para iluminar se usó una lámpara de tungsteno de 100 watts que se colocó a 8 cm por encima de la superficie del matraz, usándose también un ventilador para evitar el calentamiento. La fotooxidación se realizó por 10 min en presencia de azul de metileno 3,95 µM. Como control se usó una alícuota mantenida en hielo y en la oscuridad, en presencia de azul de metîleno a la mîsma concentración.

# 10. FILTRACION EN GEL EN LAS CONDICIONES DE MEDICION DE LA ENZIMA

Se usaron geles de Sephadex G-100 y G-200, que se prepararon para la cromatografía de acuerdo a las instrucciones dadas por los fabricantes (Pharmacia Fine Chemicals, 1968). Como columnas se usaron tubos de vidrio, de 1,2 x 48 cm y de 1,5 x 20 cm, provistos de una salida fija de tygon. Una solución semejante a la del ensayo la de actividad enzimática amortiguador C) se utilizaba para equilibrar y eluir las columnas y tenía la siguiente composición (concentraciones finales): Tris-HCl 80 mM, pH 7,5; KCl 100 mM; MgCl2 12 mM; EDTA 1 mM y DTT 2,5 mM. Los metabolitos añadidos en los diversos experimentos se indican en Resultados. Para colocar la □uestra, se detenía momentáneamente el flujo de la columna 🛂 se depositaban cuidadosamente 0,2 ml de muestra debajo del solvente, en la superficie del gel, antes de reiniciar el flu jo. La velocidad del flujo era alrededor de 15 ml/h. Se colectaban fracciones de 0,25 ml o de 0,3 ml, que eran recogidas en tubos enfriados. En cuanto se completaba el volumen de cada tubo, se introducía éste en hielo e inmediatamente se medía la actividad glucoquinásica, con el objeto de evitar la acumulación de productos de la reacción cuando ambos sustratos estaban presentes durante la filtración. En su mayoría, las cromatografías se realizaron a 30°, para lo cual se colocaba

a la columna un mango de vidrio con agua circulante proveniente de un baño termorregulado. Otras cromatografías se hicieron a 4ºen la pieza fría.

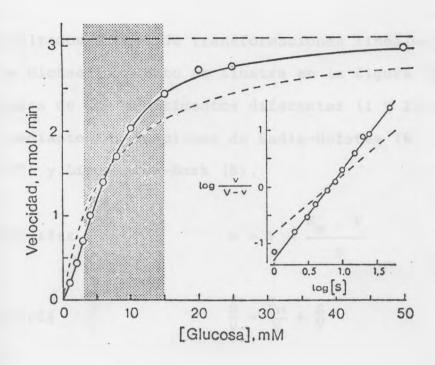
Para medir el volumen de exclusión de las columnas ( $V_o$ ) se utilizaba azul-dextrano 2000 y para el volumen total accesible al solvente (V;) se empleaba [14C] - leucina o agua tritiada (T20). Cuando se deseó estimar el peso molecular aparente, se usó alcohol-deshidrogenasa de levadura (Mr = 141.000), mioglobina ( $M_r = 17.800$ ) y ovoalbúmina ( $M_r = 45.000$ ) como proteínas marcadoras. El volumen de elución (V<sub>e</sub>) para una o más de estas proteínas se determinaba en cada condición experimental. El volumen efluyente correspondiente a la concentración máxima del soluto se estimaba a partir del diagrama de elución, extrapolando ambos lados del pico del soluto lasta su concurrencia. Para la estimación del peso molecular aparente de la glucoquinasa, se hizo un gráfico de los pesos moleculares de las proteínas marcadoras, en función de sus coeficientes de distribución  $(K_d = (V_e - V_o)/(V_i - V_o))$ . La ovoalbúmina, la mioglobina y el azul-dextrano se estimaban midiendo su absorbancia a 280, 415 y 630 nm, respectivamente. La concentración de estas proteínas se elegía de modo de tener una absorbancia de al menos 0,2 unidades en el máximo. La alcohol-deshidrogenasa se ensayaba en una mezcla de reacción que consistía en amortiguador A más etanol 220 mM y NAD 0,5 mM. Las velocidades iniciales se medían por el aumento de absor-Pancia a 340 nm. La cantidad colocada en la columna daba

en el máximo de actividad. Tanto la [14 C] -leucina como el agua tritiada se determinaban en una mezcla estándar de centelleo de 2 partes de tolueno y 1 parte de Tritón X-100, que contenía 4 g de PPO y 50 mg de POPOP por litro de tolue no. Se contaba una alícuota que en el máximo del pico tuviera alrededor de 2000 cpm.

#### C. RESULTADOS

- 1. FUNCION DE SATURACION DE LA GLUCOQUINASA CON SUSTRATOS
  GLUCIDICOS Y CON MGATP
- E) Cooperatividad cinética con glucosa

En contraste con estudios previos (Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1966; 1967; González et al., 1967; Pilkis, 1972; Grossman et al., 1974), investigaciones realizadas en este laboratorio indicaron que la curva de saturación de la glucoquinasa con glucosa es sigmoidea, con un coeficiente de Eill de 1,5 a 1,6 (Niemeyer, 1972; Cardenas et al., 1974; Siemeyer et al., 1975a; 1975b). Este hallazgo fue confirmaen los estudios de Storer y Cornish-Bowden (1976b) y posteriormente, en los de Kelkar y Nadkarni (1978). La figura 4 llustra una típica función de saturación para glucosa de la glucoquinasa de hígado de rata. La curva sigmoidea obrenida se aparta claramente de la curva hiperbólica calculala con los mismos valores de velocidad máxima y de concentra ción de semisaturación. El valor de la pendiente del gráfico de Hill (gráfico inserto en la figura 4) es significativa mente mayor que la unidad. Esta desviación de la conducta michaeliana clásica, se hace más evidente si se representan



🔩. 4. Función de saturación para glucosa de la glucoquina 🚅 de rata. La enzima se preparó de ratas Sprague-Dawley, 📑 días antes del ensayo y se usó en la etapa de purificación 💶 DEAE-celulosa (método 1). La velocidad se determinó midien el glucosa-6-P formado (ensayo la). Los valores de n<sub>H</sub> y fueron 1,6 y 6,6 respectivamente y se obtuvieron a partir 💴 gráfico de Hill mostrado en el recuadro. La velocidad 🛋 xima considerada (3,08 mU) corresponde a la medición real a 💴 mM glucosa, una vez restados los blancos, y se indica por 💷 línea quebrada horizontal. La curva con línea quebrada co responde a la curva teórica para una enzima que presente ciné Elca michaeliana normal  $(n_H = 1,0)$ , y tenga los mismos valores  $_{
m max}$  y K $_{
m 0.5}$  que la curva experimental. El área sombreada 🗪 estra aproximadamente el rango de variación de la concentra-💶 n de la glucosa en la sangre portal bajo diferentes condiciones de ingestión de hidratos de carbono (de Niemeyer et al., 1375a).

los resultados a base de transformaciones lineales de la ecuación de Michaelis. Esto se ilustra en la figura 5, donde los resultados de dos experimentos diferentes (I y II) se analizaron mediante las funciones de Eadie-Hofstee (6), Hanes-Woolf (7) y Lineweaver-Burk (8).

Eadie-Hosstee 
$$v = V - \frac{K_{\rm m} \cdot v}{S}$$
 (6)

$$\frac{S}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{S}{V}$$
 (7)

Lineweaver-Burk 
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{VS}$$
 (8)

En la figura 5a se ve que cuando se coloca en gráfico el valor de la velocidad en función del cuociente entre la velocidad y la concentración de glucosa (Eadie-Hofstee), se obtiene una curva cóncava en vez de una recta con pendiente negativa. Al trabajar con la función de Hanes se observa que el valor de S/v pasa por un mínimo (Fig. 5b) y cuando se usa la transformación de Lineweaver-Burk se obtiene una curva cónca hacia arriba (Fig. 5c). Si para hacer los gráficos se tiliza el valor de la concentración de glucosa elevado al exponente n<sub>H</sub>, obtenido del gráfico de Hill, se tienen líneas

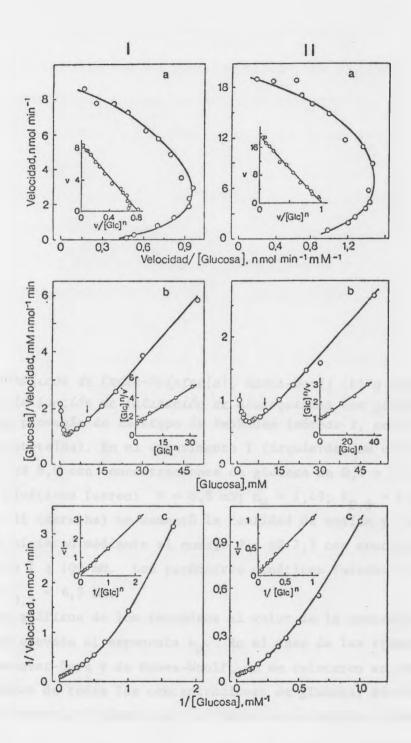


Figura 5. Leyenda en la página siguiente

Figura 5. Gráficos de Eadie-Hofstee(a), Hanes-Woolf (b) y Lineweaver-Burk (c) de la función de saturación de glucoquinasa con glucosa. La glucoquinasa provenía de la etapa de Sephadex (método 2, act. esp. 2.8 U/mg de proteína). En el experimento I (izquierda) se utilizó el ensayo la a pH 8,0 con concentraciones de glucosa de 0,4 a 100 mM. Los parámetros cinéticos fueron: V=8,8 mU;  $n_{\rm H}=1,49$ ;  $K_{0.5}=5,2$ . En el experimento II (derecha) se aumentó la cantidad de enzima y las determinaciones se hicieron mediante el ensayo 2 a pH 7,5 con concentraciones de glucosa de 1 a 100 mM. Los parámetros cinéticos fueron: V=19 mU;  $n_{\rm H}=1,56$ ;  $K_{0.5}=6,7$  mM.

En los gráficos de los recuadros el valor de la concentración de glucosa está elevado al exponente n<sub>H</sub>. En el caso de las transformaciones de Lineweaver-Burk y de Hanes-Woolf, no se colocaron en estos gráficos los valores de todas las concentraciones de glucosa, sino solo desde la menor hasta la indicada por la flecha en el gráfico principal.

rectas, como se ilustra en los recuadros de la figura 5 para las tres funciones. Puede apreciarse que existe un buen ajuste de los puntos. El coeficiente de correlación fue maror que 0,99.

El efecto cooperativo de la glucosa, no depende del método usado para determinar la actividad enzimática. La figura 5 muestra por ejemplo, que el coeficiente de Hill es muy similar si se utiliza el ensayo la (Experimento I;  $n_{\rm H}=1,49$ ) el ensayo 2 (Experimento II;  $n_{\rm H}=1,55$ ). La pequeña diferencia en el  $K_{0.5}$  puede atribuirse a la diferencia en los PH utilizados (ver más adelante: R-2). Además, cuando se empleó otro ensayo, sin enzimas acoplantes, en que se determina directamente el  $\begin{bmatrix} 1 & 4 & C \end{bmatrix}$  -glucosa-6-P formado a partir de  $\begin{bmatrix} 1 & 4 & C \end{bmatrix}$  -glucosa (Radojković et al., 1978), se obtuvo una función de saturación sigmoidea con un  $n_{\rm H}$  de 1,8 y un  $K_{0.5}$  de 8,5 mM para una glucoquinasa obtenida de la etapa de DEAE-celulosa Niemeyer et al., 1975b).

En extractos de hepatocítos aíslados la curva de satura ción de glucosa también es sigmoidea con un n<sub>H</sub> de 1,5 y un de 9 mM (Bontemps et al., 1978), similares a los obserdados con glucoquinasa purificada (Niemeyer et al., 1975b; storer y Cornish-Bowden, 1976). Es importante destacar que fosforilación de glucosa in situ en hepatocitos aislados también sigmoidea, con un coeficiente de Hill de 1,8 y

una concentración de semisaturación de 20 mM glucosa (Bontemps et al., 1978). En estos últimos experimentos, la formación de glucosa-6-P en la célula intacta se estimó mediante un método radioquímico en el cual se usa  $2-\begin{bmatrix}3\\H\end{bmatrix}$ -glucosa y se mide el  $T_2O$  formado (Clark et al., 1973; Katz et al., 1975).

## b) Estado de purificación y propiedades cinéticas

Dado que las características cinéticas de una enzima pue den verse influenciadas por la presencia de otras proteínas o cofactores que interactúen con ella (Koshland y Neet, 1968; Atkinson, 1969), es posible esperar una variación de la conducta cinética según el grado de su purificación. Esto ocurre por ejemplo, en el caso de la fosforilasa, de la fosfori lasa-quinasa (Heilmeyer et al., 1970) y de la fosforilasa-fos fatasa (Haschke et al., 1970), las que presentan caracterís ticas diferentes cuando están formando parte de un complejo proteína-glicógeno que cuando están purificadas. Se consideró por ello importante llevar a cabo, como uno de los primeros estudios, el análisis de si el grado de sigmoidicidad dependía no del grado de purificación. Pudo establecerse que los pará metros cinéticos de la glucoquinasa no variaban significativamente cuando la enzima se estudiaba en diferentes grados de purificación, lo que se ilustra en la tabla III con los

TABLA III

Parámetros cinéticos de la glucoquinasa de rata en diferentes

estados de purificación<sup>a</sup>

Etapa de purificación <sup>b</sup>	Actividad específica (U/mg proteína)	n <sub>H</sub>	K <sub>0.5</sub> (mM)
Sobrenadante de 100.000 g <sup>c</sup>	0,016	_	_
CM-Sephadex <sup>C</sup>	0,017	_	_
DEAE-celulosa	0,66	1,6	6,8
Sephadex G-100	10,0	1,5	8,1
Hidroxilapatita	15,0	1,5	6,8

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup>De Niemeyer *et al.*, 1975a

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup>La purificación se describe en Materiales y Métodos, método 1

 $<sup>^{\</sup>rm c}$  En estas dos etapas no se obtuvieron datos de  $\rm n_H$  y  $\rm K_{0.5}$  por estar presentes las hexoquinasas A, B y C

resultados de una preparación en pequeña escala (método 1), iseñada para analizar específicamente este punto. En la eta sa de hidroxilapatita la enzima era inestable y se inactivaba parcialmente durante el ensayo a bajas concentraciones de lucosa. Buscando condiciones que evitaran esta inactivación se encontró que la presencia de ditiotreitol en el ensayo la evitaba en gran medida. Este hallazgo llevó a introducír 🖆 rutina DTT en el medio de ensayo. Además, para minimizar la posible inactivación que aún pudiera persistir, se inició la reacción con glucoquinasa en lugar de glucosa. Se leyó la actividad durante un tiempo triple del acostumbrado en un ensayo normal, de modo de asegurarse de pesquisar la inactiración durante el ensayo, si aún existiera. Esto era muy im cortante ya que como la inactivación se presentaba a bajas concentraciones de glucosa, podría traducirse en una curva sigmoidea de velocidad en función de la concentración de la lucosa, aunque la enzima presentara una cinética michaeliala.

El hecho que la conducta cinética de la glucoquinasa no aríe con el grado de purificación concuerda con la afirmación de Storer y Cornish-Bowden (1976) de que preparaciones comogéneas y parcialmente purificadas de esta enzima sólo difieren en actividad específica. Como ya se comentó, la sig-coidicidad también se presenta in vivo, en hepatocitos

la enzima en condiciones de interacciones fisiológicas con otros componentes celulares exhibe propiedades semejantes a las de la glucoquinasa purificada, sino que permite pensar que estas propiedades tengan un significado para la función de la célula.

### a Aspectos comparativos

Pareció conveniente explorar si la dependencia sigmoidea de la velocidad con respecto a la concentración de glucosa, presente en la glucoquinasa de rata, existía también en la entima de otros vertebrados. Esto abría la posibilidad de entontrar una especie en la cual el grado de sigmoidicidad de la glucoquinasa pudiera ser mayor que en la rata, y por lo tanto ofrecer un mejor material para el estudio de la regula ción de la actividad de la enzima. La glucoquinasa existe en el hígado de mamíferos (con excepciones), anfibios y quelónicos entre los reptiles; no se encuentra en los reptiles superiores ni en las aves (Ureta et al., 1979).

Se encontró que las glucoquinasas de todas las especies le vertebrados estudiadas hasta ahora, presentan la misma con lecta cinética que la enzima de rata. La tabla IV muestra los lores de los coeficientes de Hill  $(n_H)$  y de las concentrationes de semisaturación  $(K_{0.5})$  obtenidos de gráficos de Hill.

TABLA IV

Valores de los coeficientes de Hill  $n_{\rm H}$  y de las concentraciones de semisaturación  $K_{0.5}$  de la glucoquinasa de vertebrados  $^{\rm a}$ 

Animal <sup>b</sup>	n <sub>H</sub>	K <sub>0.5</sub> (mM)	
Mammalia			
Akodon	1,4	3,0	
Perro	1,5	3,2	
Cerdo	1,5	3,8	
Cururo	1,4	4,4	
Coipo	1,4	6,2	
Hamster	1,6	7,5	
Rata	1,6	7,5	
Cuy	1,6	8,5	
Reptilia			
Fortuga chilena	1,6	5,2	
.or caga chilicha	1,0	3,2	
Amphibia			
Rana chilena	1,6	1,5	
Ranita de garras	1,7	2,6	
Ranita cornuda	1,7	2,6	
Ajolote	1,6	3,4	

Los datos se obtuvieron de preparaciones en la etapa de purificación de DEAE-celulosa (método 1), con excepción de la enzima de coipo que era de Sephadex G-100. La actividad enzimática se determinó con glucosa como sustrato a pH 7,5 mediante el ensayo la. De Cárdenas et al., 1979.

Akodon (Akodon olivaceous), perro (Canis familiaris), cerdo (Sus scrofa), cururo (Spalacopus cyanus), coipo (Myocastor coypus), hamster (Mesocricetus auratus), rata (Rattus norvegicus), cuy (Cavia porcellus), tortuga chilena (Geochelone chilensis), rana chilena (Calyptocephalella caudiverbera), ranita de garras (Xenopus laevis), ranita cornuda (Ceratophrys ornata), ajolote (Ambystoma mexicanum).

La función de saturación sigmoidea parecer ser una caracterís tica común de todas las glucoquinasas de vertebrados, observándose valores de n<sub>H</sub> entre 1,4 y 1,7 en todas las especies estudiadas. Esto indica que es un rasgo muy bien preservado desde el punto de vista evolutivo, lo que insinuaría una importancia fisiológica.

Es de destacar que las glucoquinasas de anfibios, aunque difieren de las de mamíferos en propiedades inmunológicas, ya que no presentan inmunidad cruzada con la glucoquina sa de rata (Pilkis et al., 1968; Clark-Turri et al., 1974), presentan una cinética sigmoidea similar. La glucoquinasa de tortuga, que en un comienzo fue descrita con cinética michaeliana (Niemeyer et al., 1975b), ha mostrado posteriormen te y sin lugar a dudas una cinética sigmoidea (Fig. 6 ). El efecto cooperativo se presenta también con manosa (Fig. 6) como ocurre con glucoquinasa de rata (ver más adelante: 1d) La discrepancia con los primeros valores podría residir en las diferentes estaciones en que los experimentos fueron hechos, pues durante la hibernación del animal la glucoquinasa parece desaparecer (Clark-Turri y Espinosa, comunicación per sonal) y las primeras observaciones se realizaron en el perfo 🖆 próximo siguiente a la hibernación.

Los valores de K<sub>0.5</sub> muestran cierta variación, pues a pH 7,5 van desde alrededor de 2,0 hasta alrededor de 8,0 mM, encontrándose generalmente en los anfibios los valores más bajos.

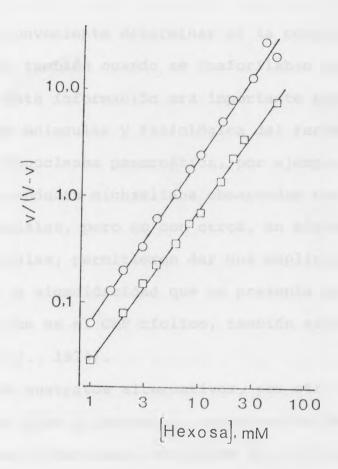


Figura 6. Gráficos de Hill de la función de saturación de la glucoquitas de tortuga con glucosa y con manosa. Se usó enzima proveniente de la etapa de DEAE-celulosa (método 1). La actividad se determinó a pH 7,5 rediante el ensayo la (glucosa) o el ensayo la (manosa). Los parámetros cinéticos se obtuvieron como en la figura 9.

(0) Glucosa:  $V = 4,35 \text{ nmol/min}; K_{0.5} = 6,0 \text{ mM}; n_{H} = 1,62$ 

 $\sim$  Manosa:  $V = 1,76 \text{ nmol/min}; K_{0.5} = 11,8 \text{ nM}; n_{H} = 1,46$ 

### d) Conducta cinética con sustratos glucídicos alternativos

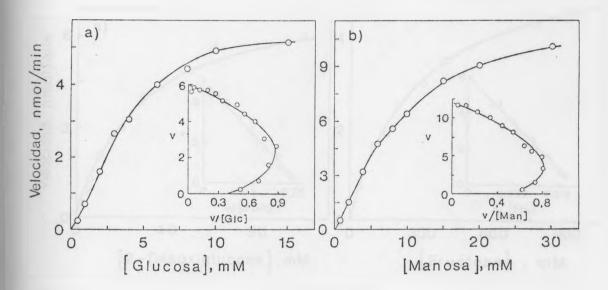
Pareció conveniente determinar si la cooperatividad cinética ocurría también cuando se fosforilaban otros sustratos glucídicos. Esta información era importante para una posible interpretación molecular y fisiológica del fenómeno. En el caso de la ribonucleasa pancreática, por ejemplo, las desviaciones de la conducta michaeliana observadas con algunos sustratos artificiales, pero no con otros, en algunas condiciones experimentales, permitieron dar una explicación a nivel polecular de la sigmoidicidad que se presenta con el sustrato habitual, que es el CMP cíclico, también sintético

El uso de sustratos alternativos, por otra parte, ha sido de utilidad para dilucidar el mecanismo de desviaciones de la cinética michaeliana, derivadas de la interacción con sitios alostéricos. Por ejemplo, uno de los sustratos de la fosfofructoquinasa, el ATP, actúa como modulador de la actitidad al unirse a un sitio alostérico, lo que tendría importante significación en la regulación de la gluconeogénesis; en cambio, GTP e ITP sólo actúan como sustratos (Viñuela et al., 1963; Uyeda y Racker, 1965). Otro caso es el de la dexoquinasa A de rata, donde sólo el producto de la fosforilación de glucosa (glucosa-6-P), que puede considerarse el sustrato en la reacción inversa, es inhibidor alostérico y

o el de la fosforilación de manosa (manosa-6-P), fructosa (fructosa-6-P) o 2-desoxiglucosa (desoxiglucosa-6-P) (Crane Sols, 1954). El papel del glucosa-6-P como regulador de la entrada de glucosa a levaduras o de la utilización del azúcar en otras células ha sido destacado por Sols (1973).

Se encontró que la glucoquinasa de rata mostraba notolas diferencias en la conducta cinética con diferentes sustratos glucídicos (Cárdenas et al., 1977; 1978). Así, con ma Posa, al igual que con glucosa, había una dependencia sigmoi lea de la velocidad con respecto a la concentración del susrato glucídico, como se ilustra en la figura 7. El coeficiente de Hill obtenido con manosa  $(n_{_{\rm H}}$  = 1,5) era similar al obtenido con glucosa. En cambio, no se observó cooperativiad cuando se usaba 2-desoxiglucosa o fructosa como sustratos, lo que se ilustra en la figura 8. En el gráfico de Hill e la figura 9 se compara la conducta cinética a pH 8,0 de la Isma preparación de glucoquinasa con glucosa, manosa o 2-desoxiglucosa como sustratos. Puede verse que mientras las rec tas correspondientes a glucosa y manosa son paralelas (coefilentes de Hill similares), la de 2-desoxiglucosa presenta Ina pendiente menor  $(n_{H} = 1,0)$ .

Al igual que en el caso de glucosa el valor de n<sub>H</sub> para Lanosa no varió con el grado de purificación de la enzima o con el método de ensayo (Fig.10).



rigura 7. Cinética cooperativa de la glucoquinasa con glucosa (a) y con manosa (b). Se usaron enzimas diferentes y en cantidades distintas provenientes de la etapa de Sephadex G-100 (método 2; act. esp. aproximada 3 U/mg de proteína). La actividad se determinó a pH 8,0 mediante el ensayo la (glucosa) o el ensayo 2 (manosa). Para los gráficos de Eadie-Hofstee de los recuadros se usaron todos los datos experimentales, mientras para los gráficos directos se omitieron las concentraciones de los sustratos mayores que 4 veces K<sub>0.5</sub>. Los valores de los parámetros cinéticos fueron:

a) Glucosa:  $K_{0.5} = 4 \text{ mM}$ ;  $n_{H} = 1.6$ 

b) Manosa:  $K_{0.5} = 8 \text{ mM}; n_{H} = 1.5$ 

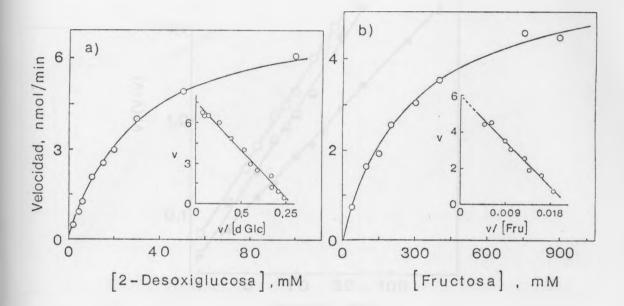


Figura 8. Cinética hiperbólica de la glucoquinasa con 2-deso xiglucosa (a) y con fructosa (b). Con 2-desoxiglucosa se usó una enzima de la etapa de sefarosa (act. esp. 30 U/mg de proteína) y con fructosa una enzima de la etapa de Sephadex G-100 (método 2; act. esp. 3 U/mg de proteína). La actividad se determinó a pH 8,0 mediante el ensayo 2 (2-desoxiglucosa) o el ensayo 1b (fructosa). En el gráfico directo con 2-desoxiglucosa se omitieron los datos correspondientes a las concentraciones superiores a 4 veces K<sub>0.5</sub>. Los valores de los parámetros cinéticos fueron:

a) 2-desoxiglucosa:  $K_{0.5} = 24 \text{ mM}$ ;  $n_{H} = 1.0$ 

b) Fructosa:  $K_{0.5} = 276 \text{ mM}; n_{H} = 1,0$ 

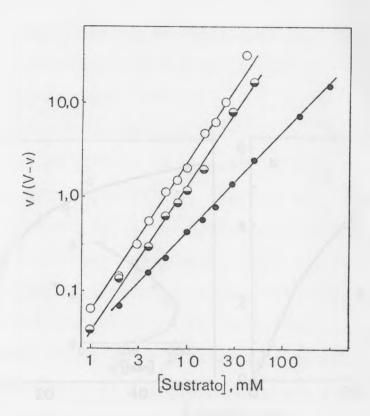


Figura 9. Gráfico de Hill de la función de saturación de la glucoquinasa con diferentes sustratos glucidicos. Se usó una glucoquinasa proveniente de la etapa de purificación de sefarosa (método 2; act. esp.
25 U/mg de proteína). La actividad fosforilante del azucar se determinó a pH 8,0 y a 30° a través de la medición del ADP formado (ensayo 2).
Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante un programa de mínimos cuadrados aplicado a la función directa de  $v = (V S^{\rm nH})/(K + S^{\rm nH})$  y desarrollado con un microcomputador Altair.

- (O) Glucosa:  $K_{0.5} = 5.8 \text{ mM}; n_{H} = 1.6$
- ( $\bigcirc$ ) Manosa :  $K_{0.5} = 8,3 \text{ mM}; n_{H} = 1,6$
- (•) 2-Desoxiglucosa:  $K_{0.5} = 22$  mM;  $n_{H} = 1.0$  De Cardenas et al., 1979.

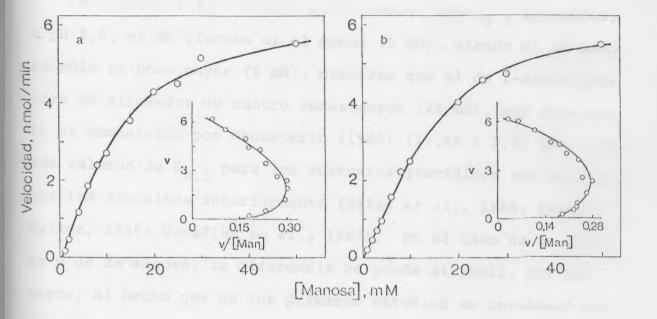


Figura 10. Función de saturación de glucoquinasa con manosa determinada con diferentes ensayos. 7 mU de glucoquinasa en la etapa de purificación de Sephadex (método 2, act. esp. 2,0 U/mg de proteína) se ensayaron a pH 7,5 con concentraciones variables de manosa (1-200 mM). La actividad fosforilante de manosa se determinó mediante el ensayo lc (a) o el ensayo 2 (b). Los parámetros cinéticos obtenidos fueron:

a) V = 6,25 nmol/min;  $K_{0.5} = 12$  mM;  $n_{H} = 1,4$ 

b) V = 6,24 nmol/min;  $K_{0.5} = 12,8$  mM;  $n_{H} = 1,4$ 

La naturaleza hiperbólica de la función de saturación con 2-desoxiglucosa nos indujo a usar este sustrato para estudiar el mecanismo cinético de la glucoquinasa (Niemeyer et al., 1978; Monasterio, 1980).

En cuanto a los valores relativos de los K<sub>0.5</sub> aparentes, a pH 8,0, el de glucosa es el menor (5 mM), siendo el de mano sa sólo un poco mayor (8 mM), mientras que el de 2-desoxiglucosa es alrededor de cuatro veces mayor (22 mM), muy semejante al comunicado por Monasterio (1980) (19,16 ± 2,33 mM). Es tos valores de K<sub>0.5</sub> para los sustratos glucídicos son menores que los descritos anteriormente (Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1966; González et al., 1967). En el caso de la gluco sa y de la manosa, la diferencia se puede atribuir, por una parte, al hecho que en los primeros estudios se consideró una cinética hiperbólica para estos sustratos y, por otra, a que el ensayo se hizo a pH 7,5 en vez de 8,0 (ver más adelante).

El efecto del pH podría explicar las diferencias en el  $K_{0.5}$  para 2-desoxiglucosa, pero no se investigó mayormente el problema. El  $K_{0.5}$  con glucosa coincide con el obtenido por Storer y Cornish-Bowden (1976), también a pH 8.

El caso de la fructosa merece un análisis más detallado pues fue difícil determinar la forma de la función de saturación, debido a la baja afinidad de la enzima por este sustrato, lo que exigía usar concentraciones muy altas.

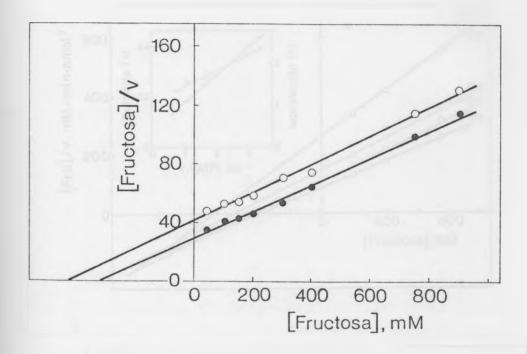
Los primeros intentos, hechos a pH 7,5 y usando una enzima parcialmente purificada (metodo 1, DEAE-celulosa act. esp. 0,5 U/mg de proteína) sugirieron una cinética hiperbóli ca con un valor muy alto de  $K_{0.5}$  (  $\sim 2$  M). Este valor de  $K_{m}$ aparente (aproximado) concordaba con los datos, también apro ximados, de Salas et al. (1965) (mayor que 800 mM) y de Parry 😗 Walker (1966) (2 M). Llamó la atención que no obstante el alto valor de K<sub>0.5</sub> obtenido, la V<sub>max</sub> aparente parecía ser más el doble del valor correspondiente al con glucosa, lo que apoyaba en general una observación de Parry y Walker (1966). Sin embargo, y al igual que dichos autores, no se profundizó Tás en este aspecto, dada la incertidumbre de los valores de los parámetros cinéticos y dada la baja actividad específica e la enzima utilizada, que podía poner en duda la especificidad de la reacción. Posteriormente, experimentos llevados acabo con una enzima más purificada (act. esp. 2-4 U/mg roteina, método 2) mostraron claramente que la glucoquinasa fosforilaba fructosa con cinética hiperbólica ( $n_{H}^{-}=1,0$ ), co- $_{ t m}$ o se muestra en la fîgura  $^{8}$ . Los valores de las K $_{ t m}$  aparenles variaron en un rango de 276 a 380 mM en varios experimen tos realizados a pH 8,0, con diferentes preparaciones de en-Resultados similares se obtuvieron con una enzima Tuy pura (método 2; act. esp. 70 U/mg de proteina, dos bandas e proteína en electroforesis en poliacrilamida), donación

de Cecilia Toro. Al igual que en el caso de glucosa (ver más adelante), el cambio del pH de 7,5 a 8,0 no alteró el coeficiente de Hill, pero disminuyó el  $K_{0.5}$  (Fig. 11). Al hacer es tudios de velocidad inicial de la fosforilación de fructosa a distintas concentraciones fijas de uno de los sustratos y variando el otro, se obtuvo en el gráfico de Hanes un perfil de rectas intersectantes (Fig. 12) que es característico de en mecanismo en secuencia. Los datos pueden ser ajustados a la ecuación (9), que describe un mecanismo en secuencia orde cado o al azar en equilibrio rápido.

$$V = \frac{VAB}{K_{ia}K_a + AK_b + BK_a + AB}$$
(9)

Si A es la concentración de fructosa y B la de MgATP, se pueden calcular los valores de las siguientes constantes, hacien do uso de los gráficos secundarios de la función de Hanes-colf:  $K_a = 174$  mM;  $K_{ia} = 1.025$  mM;  $K_b = 0.35$  mM; y  $K_{ia}$   $K_b$ / $K_a = 2.0$  mM (esta última equibale a  $K_{ib}$  si se supone un mecanismo al azar en equilibrio rápido.

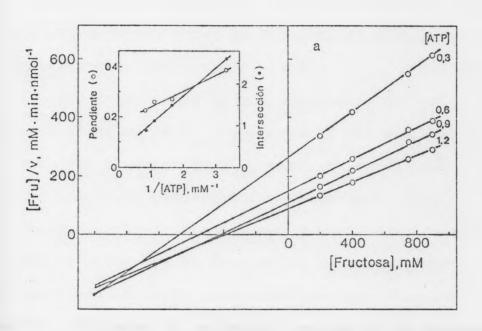
Los gráficos secundarios fueron lineales (recuadros de la figura 12), concordando con las características hiper-



igura 11. Gráfico de Hanes-Woolf de la función de saturación de la succoquinasa con fructosa a dos diferentes pH. 5 mU de glucoquinasa setodo 2; etapa de Sephadex G-100; act. esp. 3,1 U/mg de proteína) se ensayaron a pH 7,5 (○) o a pH 8,0 (●) usando concentraciones variables e fructosa (40 a 900 mM). La actividad fosforilante de fructosa se determinó mediante el ensayo lb. Los coeficientes de n<sub>H</sub> se obtuvieron a cartir de gráficos de Hill. Los valores de los parámetros cinéticos fue con:

•) pH 8,0: 
$$V = 10,95$$
;  $K_{0.5} = 322$  mM;  $n_{H} = 1,0$ 

<sup>(</sup>O) pH 7,5: V = 10,31;  $K_{0.5} = 423 \text{ mM}$ ;  $n_H = 1,0$ 



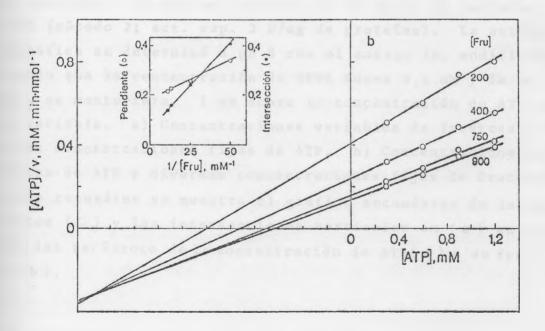
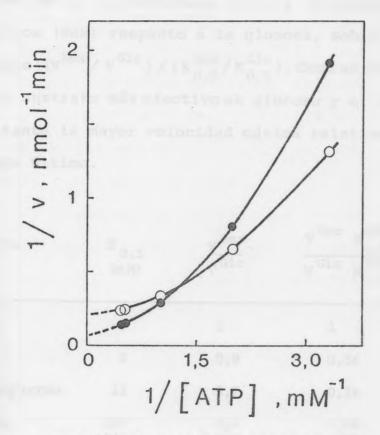


Figura 12. Leyenda en la página siguiente

in fructosa. La enzima provenía de la etapa de Sephadex -100 (método 2; act. esp. 3 U/mg de proteína). La actividad nzimática se determinó a pH 8 con el ensayo lb, modificado emodo que la concentración de EDTA fuera 0,1 mM y la de color en actividad enzimática se modo que la concentración de EDTA fuera 0,1 mM y la de color emodo que la concentración de ATP, que exariable. a) Concentraciones variables de fructosa y directosas concentraciones fijas de ATP. b) Concentraciones variables de ATP y diversas concentraciones fijas de fructosa. los recuadros se muestra el gráfico secundario de las pentientes (O) y las intersecciones verticales en (O) en función del recíproco de la concentración de ATP(a) o de fructo-ra (b).

AgATP. Las características de los gráficos primarios y secun arios son semejantes a las de los obtenidos con 2-desoxiglucosa como sustrato (Monasterio, 1980).

Un hecho interesante es que nuevamente en todos estos ex perimentos el valor de V aparente es más del doble (2,1 a 2.8 veces) que el valor de  $V_{max}$  aparente con glucosa. Con el objeto de hacer una comparación más adecuada entre las V 🚉 glucoquinasa con fructosa y con glucosa como sustratos, se Teterminó la velocidad en función de la concentración de susrato, variando en razón constante las concentraciones de ATP del sustrato glucídico (glucosa/ATP = 10; fructosa/ATP = 200). 🖿 la figura 13 puede observarse que en ambos casos se obtienen gráficos de tipo parabólico, lo que es indicio de un mecanismo cinético en secuencia, en contraposición con un mecanismo Fing-pong (Gulbinsky y Cleland, 1968; Garcés y Cleland, 1969). 🔍 extrapolar las curvas, el valor de la intersección con la rdenada es diferente para ambos sustratos glucídicos, lo que 🔤 traduce en un valor de velocidad máxima con fructosa de al rededor de 2,6 veces mayor que el obtenido con glucosa. ==1lazgo contrasta con la observación de que la velocidad máxi EE con 2-desoxiglucosa es sólo 0,73 veces la V con glucosa, experimentos de igual diseño (Monasterio, 1980).



En el experimento con glucosa (O), la razón glucosa/
En el experimento con glucosa (O), la razón glucosa/
En el experimento con glucosa (O), la razón glucosa/
En el experimento con glucosa (O), la razón fructosa/ATP

La el con fructosa (O), la con fructosa (O), la con fructosa (O), la con fructosa (O), la

Se puede comparar en forma aproximada la especificidad relativa de la glucoquinasa con los diferentes sustratos glucídicos (Hex) respecto a la glucosa, sobre la base del cuociente  $(V^{Hex}/V^{Glc})/(K_{0.5}^{Hex}/K_{0.5}^{Glc})$ . Como se resume a continuación, el sustrato más efectivo es glucosa y el menos fructosa, no obstante la mayor velocidad máxima relativa  $(V^{Hex}/V^{Glc})$  con este último.

Sustrato	<sup>K</sup> 0.5 (m M)	$\frac{v^{\text{Hex}}}{v^{\text{Glc}}}$	V Hex K Glc 0.5 V Glc K Hex 0.5
Glucosa	5	1	1
Manosa	8	0,9	0,56
2-desoxiglucosa	22	0,7	0,16
Fructosa	325 174	2,6 2,6	0,04 0,08
Fructofuranosa	65 35	2,6 2,6	0,20 0,37

Los valores de  $K_{0.5}$  y los valores relativos de  $V_{\rm max}$  utilizados para esta comparación, son los obtenidos a pH 8,0.

Si se considera que únicamente la forma furanosa de la fructosa es sustrato de las hexoquinasas, y que esta forma constituye solo alrededor de un 20% de la concentración total de hexosa a 30° y a pH 8,0 (Slein et al., 1950), la  $K_{\rm m}$  para el sustrato fructofuranosa sería alrededor de un quinto del valor de  $K_{\rm m}$  obtenido experimentalmente. De esta manera,

el valor de K<sub>m</sub> aparente de 325 mM, correspondiente al prome dio de determinaciones hechas con ATP 5 mM, se reduce a 65 mM y, el de K<sub>m</sub> verdadera de 174 mM, obtenido en el experimen to de la figura 12, a 35 mM. Con estos valores corregidos, la especificidad relativa con fructosa sería semejante o ma yor que la con 2-desoxiglucosa.

Hay que destacar sin embargo, que la comparación realiza da es estrictamente válida sólo en sistemas con cinética michaeliana ( $n_H^{=}$ 1) o que al menos presenten el mismo grado de cooperatividad con todos sus sustratos, que no es la situación de la glucoquinasa.

e) Conducta cinética de la glucoquinasa con MgATP.

En las reacciones enzimáticas de dos sustratos, cabe hacer la pregunta si la conducta cinética de la enzima es igual con ambos. En muchos casos existen diferencias. Así, entre las enzimas fosforilantes de glucosa, se observa que la hexoquina sa C presenta una inhibición por exceso de glucosa, pero no por exceso de MgATP (Ureta, 1976), y que la hexoquinasa  $\mathbf{L}_{\mathrm{I}}$  de trigo exhibe una cooperatividad cinética negativa respecto a glucosa, pero conducta michaeliana con MgATP (Meunier et al., 1974). En glucoquinasa también existen diferencias.

Estudios previos habían indicado que la glucoquinasa presenta una cinética michaeliana con MgATP (Parry y Walker, 1966; 1967; González et al., 1967). Más aún, en los trabajos de Parry y Walker (1967) y en los de González et al. (1967), en que hay indicios de una posible desviación de la cinética clásica con glucosa, la función de saturación con ATP, estudada entre 0,2 y 5 mM es claramente hiperbólica. Sin embar con como en esos trabajos aún no se detectaba la cinética copperativa con glucosa, pareció conveniente estudiar nuevamente la función de saturación con MgATP. La figura 14 ilus la los resultados obtenidos a dos concentraciones fijas de clucosa, 6 y 100 mM. En estos estudios, como en todos aquellos en los cuales se varió la concentración de ATP, se hicie con algunas modificaciones al sistema de ensayo. Así, se usó

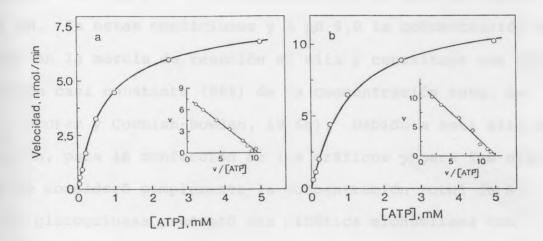


Figura 14. Función de saturación de la glucoquinasa con MgATP. La glucoquinasa, proveniente de la etapa de purificación de Sephadex G-100 (método 2, act. esp. 4,0 U/mg de proteína), se ensayó a diferentes concentraciones de ATP en presencia de Elucosa 6 mM (a) ó 100 mM (b). La actividad enzimática se de terminó a pH 8,0 mediante el ensayo la. La mezcla de reacción difería de la habitual en la concentración de algunos componen tes, como se comentó en el texto, y contenía en un volumen de 0,5 ml: amortiguador Tris-HC1 80 mM; KC1 100 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 2,5 mM; NADP 1 mM; glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa 0,60 D/m1; MgCl2 en concentración de 1 mM en exceso sobre la concentración de ATP; ATP (0,025 a 5 mM); glucosa (6 ó 100 mM) y glucoquinasa (4 a 10,5 mU). La reacción se inició con la adí ción de la glucoquinasa. Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de un gráfico de Hill, confeccionado con el valor de Tax obtenida con la función de Eadie-Hofstee, fueron los si-Luientes:

e) Glc 6 mM.  $V_{\text{max}} = 7.8 \text{ mU}$ ;  $K_{0.5} = 0.73 \text{ mM}$ ;  $n_{\text{H}} = 1.00$ 

b) G1c 100 mM.  $V_{\text{max}} = 12,6 \text{ mU}$ ;  $K_{0.5} = 1,00 \text{ mM}$ ;  $n_{\text{H}} = 0,95$ 

una concentración de MgCl<sub>2</sub> igual a 1,0 mM en exceso sobre la concentración de ATP, y la concentración de EDTA se redujo a 0,1 mM. En estas condiciones y a pH 8,0 la concentración de MgATP en la mezcla de reacción es alta y constituye una proporción casi constante (86%) de la concentración total de ATP (Storer y Cornish-Bowden, 1976a). Debido a esta alta proporción, para la confección de los gráficos y para los cálculos se consideró simplemente la concentración total de ATP.

La glucoquinasa presentó una cinética michaeliana con MgATP, como se aprecia en la figura 14. En efecto los gráficos de Eadie-Hosftee insertos son lineales, a diferencia de lo que ocurre con glucosa (Fig. 5). Estos resultados son similares a los obtenidos por Storer y Cornish-Bowden (1976b). La  $K_m$  aparente para ATP de 1,0 mM (con glucosa 100 mM) (Fig. 14b) es igual a la descrita por Parry y Walker (1967), pero ligeramente superior a las obtenidas por González et al. 1967) y por Storer y Cornish-Bowden (1976b), que fueron 0,73 y 0,64 mM (MgATP 0,55 mM) respectivamente. Un hecho interesante es que en todos los estudios realizados, incluyendo los nuestros, las rectas obtenidas a diferentes concentraciones de glucosa en un gráfico de dobles recíprocos, se intersectan en el cuadrante izquierdo inferior o en el eje de la abscisa. Aún en este último caso, al examinar los gráficos publicados, se observa una tendencia a una menor  $K_m$  aparente a

concentraciones más bajas de glucosa. Una situación diferen te, en cambio, se observa al usar fructosa o 2-desoxiglucosa como sustratos glucídicos. En efecto, la  $K_{m}$  aparente para ATP disminuye al incrementarse la concentración de la fructosa (datos de la figura 11) o de la 2-desoxiglucosa (Niemeyer et al., 1978; Monasterio, 1980) y, en un gráfico de dobles recíprocos, se obtiene un conjunto de rectas que se intersectan en el cuadrante izquierdo superior. Otra enzima en la cual ocurre una variación en el lugar de intersección de las rectas de un gráfico de dobles recíprocos al cambiar el sustrato fijo, es la hexoquinasa de cerebro. En efecto, al hacer estudios de velocidad inicial con ATP como sustrato variable y distintas concentraciones fijas de glucosa, se tiene un conjunto de rectas aparentemente paralelas que se cortarían muy lejos en el cuadrante izquierdo inferior, aparentando un mecanismo de tipo ping-pong (Fromm y Zewe, 1962; Copley y Fromm, 1967). En cambio, al usar fructosa como sustrato fijo se tienen rectas que se intersectan en el eje de la abscisa (dato de la figura 1 en Fromm y Ning, 1968). En un mecanismo en secuencia, el que las rectas se intersecten por encima o por debajo del eje depende del va lor relativo de los parámetros K , y K de la ecuación (9). En la fosforilación de fructosa y de 2-desoxiglucosa por glucoquinasa, la intersección ocurre en el cuadrante superior y K ia sería mayor que K a. Podría suponerse que en el

caso de la glucosa, esta relación se invierte. Hay que recordar, sin embargo, que la ecuación (9) no da cuenta del mecanismo cinético de la fosforilación de la glucosa  $(ver\ Discusión)$ , pues existe un efecto cooperativo de este sustrato. Esto hace que no puedan usarse los gráficos secundarios habituales en estudios cinéticos para determinar con precisión el valor de  $K_m$  para ATP.

## 2. EFECTO DE LAS CONDICIONES GENERALES DEL ENSAYO SOBRE LA COOPERATIVIDAD CINETICA CON GLUCOSA

En una primera etapa se exploraron algunas condiciones

Dásicas del ensayo (pH, fuerza iónica, protección

de tioles, concentración de enzima) que pudieran modificar el grado de cooperatividad, como ocurre con otras enzimas (Stadtman, 1970; Atkinson, 1970). Esto parecía importan

te pues, fuera de aportar antecedentes para la interpretación del tipo de cinética operante, permitiría disponer de

condiciones más adecuadas para futuros experimentos sobre el

efecto posible de metabolitos en la conducta cinética de la

## Efecto de la variación del pH

Primeramente se estudió la variación de la actividad de la enzima auxiliar glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa al modificar el pH de ensayo. Aunque existían estudios acerca del efecto del pH sobre la enzima obtenida de diversas fuentes, ara importante determinarlo en las condiciones de ensayo de la glucoquinasa y en el tipo de glucosa-6-fosfato-deshidroge lasa usado en el ensayo como enzima auxiliar. La figura 15 lustra un experimento en que se utilizaron Mes y Tris. Aun pue no se hizo un análisis minucioso, el pH óptimo parece

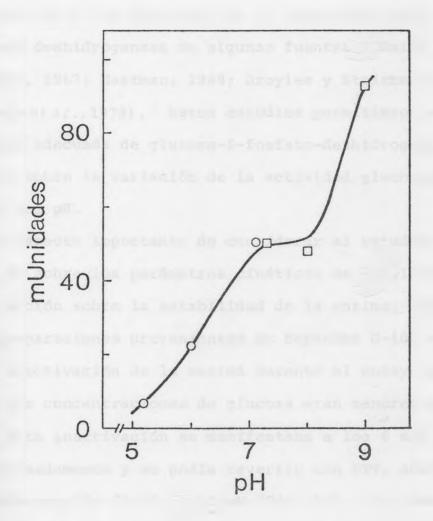


Figura 15. Efecto del pH sobre la actividad de la glucosa-6-fosfato-desidrogenasa. Se usó enzima comercial de tórula (Boehringer), en suspensión en sulfato de amonio. El NADPH<sub>2</sub> formado se determinó en un medio
que contenía: mezclas amortiguadoras, EDTA, KCl, MgCl<sub>2</sub> y NADP en las mis
as concentraciones finales del ensayo la; glucosa-6-P l mM y glucosa-5-fosfato-deshidrogenasa. La reacción se iniciaba adicionando la enzima
tespués de preincubar la mezcla de reacción por 3 min a 30°.

○) Mes; (□) Tris-HCl.

mente similar a las descritas en la literatura para glucosai-fosfato deshidrogenasa de algunas fuentes (Smith y
i-fosfato deshidrogenas de

Un aspecto importante de considerar al estudiar el efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de la glucoquinasa, fie la acción sobre la estabilidad de la enzima. Así, en alpunas preparaciones provenientes de Sephadex G-100 se obserto una inactivación de la enzima durante el ensayo a pH 8,5 cuando las concentraciones de glucosa eran menores que el aproximadamente y se podía revertir con DTT, añadido a concentración final de 10 mM (Fig. 16). La presencia de concentración final de 10 mM (Fig. 16). La presencia de gue no se producía al menos hasta 25 min de lectura fig. 16). En el experimento que se ilustra en figura 18, la enzima se preincubó con DTT 10 mM y se cabajó con una concentración de DTT de 1 mM en el ensayo, vez de 0,1 mM usado en los experimentos de la figura 17,

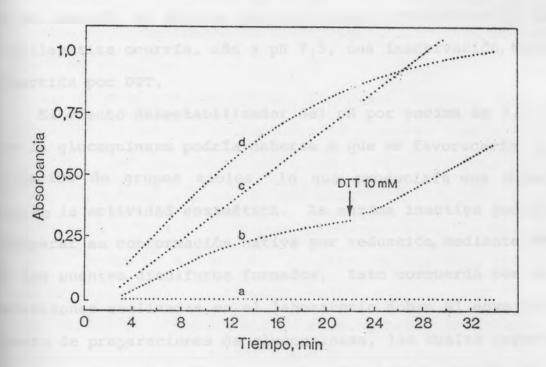


Figura 16. Curvas de progreso a pH 8,5 de la reacción de 605 lilación de la glucosa por la glucoquinasa. Esecto de DTT.

La glucoquinasa provenía de la etapa de Sephadex (método 1).

La actividad fosforilante de glucosa se determinó a una contentración de 3 y 6 mM, a pH 8,5, mediante el ensayo la con DTT 10,1 mM o 0,1 mM (solo el que aporte la enzima). Los grálicos corresponden al registro simultáneo en el inscriptor de las cuatro cubetas a), b), c) y d). En este experimento no registro antes de los tres primeros minutos, pero lo habital era empezar a registrar al mínuto.

- Glc 3 mM, DTT 10,1 mM. Blanco sin ATP
- Glc 3 mM, DTT 0,1 mM. La flecha indica el momento de la adición de 10 µ1 de DTT 500 mM (concentración final 10,1 mM)
- El Glc 3 mM, DTT 10,1 mM
- Glc 6 mM, DTT 0,1 mM

en los cuales, sin embargo, no se observó inactivación. Como ya se comentó, en algunas preparaciones provenientes de hiiroxilapatita ocurría, aún a pH 7,5, una inactivación, también revertida por DTT.

El efecto desestabilizador del pH por encima de 7,5 so
Zre la glucoquinasa podría deberse a que se favorecería la

Exidación de grupos tioles, lo que produciría una disminu
Zión de la actividad enzimática. La enzima inactiva podría

Zecuperar su conformación nativa por reducción, mediante DTT,

Ze los puentes disúlfuros formados. Esto concuerda con ob
Servaciones realizadas en el laboratorio sobre el envejeci
Ziento de preparaciones de glucoquinasa, las cuales experi
Zentan una inactivación que es precedida por la pérdida de

La reactividad con ditio-bis-dinitrobenzoato (DTNB), siendo

Exposerva su cinética sigmoidea (Heberlein et al., 1979).

Por otra parte, una ligera inactivación de la enzima

Contre durante el ensayo a pH ácidos. Esta inactivación es

Layor en presencia de bajas concentraciones de glucosa y pa

Lece ser más susceptible la enzima con mayor grado de puri
Licación. Así, se aprecia inactivación de la enzima prove
Liente de hidroxilapatita, después de 12 a 16 min de ensayo

Con glucosa 2 mM a pH 6,05 o menor. A pH 5,5 la inactivación

Con observable aún con glucosa 100 mM. Hay que destacar que

esta desestabilización de la enzima durante su medición no fue impedida por la presencia de DTT 4 mM, lo que sugiere la operación de un mecanismo de inactivación diferente al que estúa a pH alcalino.

Inicialmente se exploró el efecto del pH sobre la gluco guinasa solo a dos concentraciones de glucosa, 2 mM y 100 mM Fig. 17). Los resultados obtenidos a 100 mM glucosa conruerdan en general con los de González et al. (1967), usando Tris-maleato y Tris-glicina, quienes encontraron la máxima Ectividad entre pH 8,0 y 9,0. Difieren de los descritos por Salas et al. (1965) en glucoquinasa de conejo y por Parry y 📭 lker (1966) en glucoquinasa de rata, quienes encontraron actividad máxima entre 7,7 y 8,0, usando imidazol, glici-🔤 y glicilglicina. Puede observarse en la figura 17 que no way superposición de ambas curvas, a 2 y 100 mM, lo que esta =1a indicando que no sólo varía la actividad catalítica de la zima, sino también podrían modificarse otros parámetros ci Eticos, como el K<sub>0.5</sub> y el n<sub>y</sub>. Se estudió por esto, el efec 💴 que tendría el pH sobre la función de saturación de la glu La figura 18 ilustra los resultados obtenidos a res diferentes pH (6,6; 7,5; 8,5), destacándose que, no obs-Tante la variación en  $V_{max}$  y en  $K_{0.5}$  el  $n_{H}$  no varía signifi Estivamente. No es rara entonces, la observación de que en ex-Tactos de hepatocitos aislados, la sigmoidicidad de la función

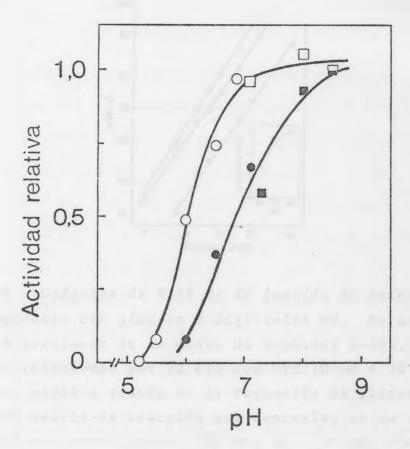


Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad de la glucoquinasa. Se usó una enzima proveniente de la etapa de purificación de hidroxilapatita método 1). Se midió el glucosa-6-P formado (ensayo la) con una concentración de DTT de 0,1 mM. Las cantidades de glucosa-6-fosfato-deshirogenasa se ajustaban de modo de compensar el efecto del pH sobre esta enzima. Símbolos vacíos (O, D) glucosa 100 mM; símbolos llenos (O, D) glucosa 2 mM. Tris-HCl (D, M); Mes (O, O). Se asignó el valor relativo de 1,0 a la actividad obtenida a pH 8,5.

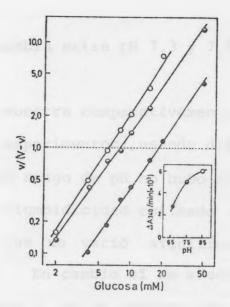


Figura 18. Gráficos de Hill de la función de saturación de la glucoquínasa con glucosa a diferentes pH. Se uso glucoquinasa proveniente de la etapa de Sephadex G-100, la que ha bía sido preincubada por 30 min con DTT 10 mM a 30°. La actividad se midió a través de la formación de glucosa-6-P, usando una mezcla de reacción que contenía, en un volumen fi aal de 0,5 ml: amortiguador 100 mM; KCl 150 mM; EDTA 1,0 mM; MgCl<sub>2</sub> 12 mM; NADP 0,5 mM; glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (cantidad variable segun el pH); ATP 5,0 mM; 0,05 ml de glucoquinasa y concentraciones variables de glucosa (1 a 200 mM). Pipes pH 6,6 (●); Tris pH 7,5 (⊕); Tris pH 8,5 (○). El gráfico inserto muestra los valores de velocidad obtenidos a los diferentes pH usando una concentración de glucosa de 100 mM. Los parámetros cinéticos se determinaron mediante un programa de ajuste por mínimos cuadrados de la función directa  $(v = VS^n / (K + S^n))$  en un microcomputador Altair y fueron los siguientes:

- ( ) pH 6,6: V = 2,76 nmol/min;  $K_{0.5} = 17,9 \text{ mM}$ ;  $n_{H} = 1,46$
- ( $\bullet$ ) pH 7,5: V = 5,23 nmol/min; K<sub>0.5</sub> = 7,9 mM; n<sub>H</sub> = 1,45
- (0) pH 8,5: V = 6,38 nmol/min;  $K_{0.5} = 6,4 \text{ mM}$ ;  $n_H = 1,51$

de saturación no cambia entre pH 7,3 y 7,5 (Bontemps et al., 1978).

La figura 19 muestra comparativamente los resultados obtenidos en varios experimentos, usando diferentes amortiguadores. En un amplio rango de pH no hubo un efecto apreciable sobre el grado de sigmoidicidad estimado a través del coeficiente de Hill, que no varió significativamente  $\begin{aligned} & \ln_{\rm H} = 1,47 \pm 0,09 \end{aligned} . & \text{En cambio si se afecta el } & \text{K}_{0.5}, \text{ el cual aumenta notoriamente a los pH menores que 7,0. No se observaron diferencias de } & \text{K}_{0.5} & \text{ni de n}_{\rm H} & \text{entre los ensayos con di tersas concentraciones de DTT. Esto ocurre porque, aunque aubiera cierto grado de inactivación durante el ensayo a baza concentración de DTT (0,1 mM), para la estimación de la actividad se consideraban solo los minutos iniciales, donde la eventual inactivación era indetectable.$ 

La variación del  $K_{0.5}$  en función del pH sugiere que un grupo ácido de un pK aproximado de 7, que podría ser el imi mazzolio de la histidina, estaría implicado en la unión de glu mosa. En efecto, al hacer un gráfico de Dixon (pK $_{0.5}$  en función del pH) (Dixon y Webb, 1964), aparece un grupo de pK marededor de 7 en el complejo enzima-glucosa.

El efecto del pH sobre el K<sub>0.5</sub> explica por qué no se su

rerponen las dos curvas de la figura 17, pues, aparte del

efecto sobre la actividad catalítica de la glucoquinasa, hay

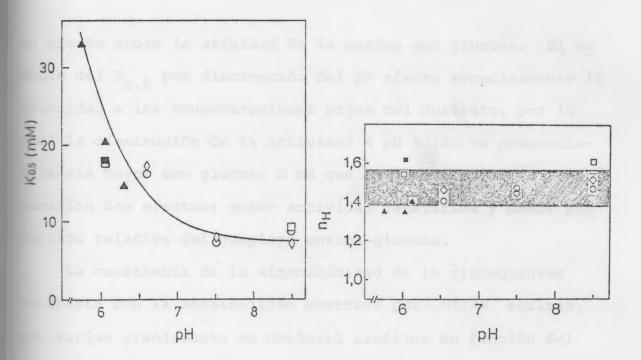


Figura 19. Resumen de los efectos del pH sobre los parámetros cinéticos de la glucoquinasa con glucosa. Se muestran resultados obtenidos en distintos experimentos similares al descrito en la figura 18, usando diferen les amortiguadores, diversas preparaciones enzimáticas obtenidas por el letodo 1 (GK), en presencia de distintas concentraciones de DTT. En todos estos casos se midió el pH de las mezclas de ensayo una vez finalizado és le, y se encontró que correspondía al pH del amortiguador usado. Cada sím bolo indica un mismo experimento. La franja gris en el grafico de la dere cha, indica el intervalo entre una desviación estándar (s) por encima y otra por debajo del promedio de los valores de  $n_{\rm H}$ .  $s=(\sum (x_i-\bar{x})^2/N)^{1/2}$ 

- (hidroxilapatita).
- ( ) Mes: pH 6,05; Tris pH 8,5. DTT 0,1 mM. GK (hidroxilapatita)
- ■) Mes: pH 6,05. DTT 4 mM. GK (Sephadex)
- (O) Pipes: pH 6,6. Tris: pH 7,5; 8,5. DTT 1 mM. GK (Sephadex)
- (\$\delta\$) Pipes: pH 6,6. Tris: pH 7,5; 8,5. DTT 1 mM. GK (Sephadex)

un efecto sobre la afinidad de la enzima por glucosa. El au mento del K<sub>0.5</sub> por disminución del pH afecta especialmente la elocidad a las concentraciones bajas del sustrato, por lo cual la disminución de la actividad a pH ácido es proporcionalmente mayor con glucosa 2 mM que con glucosa 100 mM. Se sumarían dos efectos: menor actividad catalítica y menor proporción relativa del complejo enzima-glucosa.

La constancia de la sigmoidicidad de la glucoquinasa contrasta con la sensibilidad mostrada por otras que varían grandemente su conducta cinética en función del Estudios realizados con fosfofructoquinasa de variadas fuentes muestran que la cinética tiende a hacerse hiperbólia pH sobre 7,5 (Lowry y Passoneau, 1966; Kemp, 1971; Lee et al., 1973). Así, a pH 8,2 la enzima de corazón de oveja es michaeliana con respecto a ATP, fructosa-6-P y Mg . ➡bargo, a pH 6,9 la enzima muestra cinética sigmoidea para fructosa-6-P y se hace sensible a la inhibición por ATP Mansour y Ahlfors, 1968). A la inversa, a pH menores que 7,0 la piruvato-quinasa L presenta una cinética michaeliana con respecto a P-enolpiruvato y no puede ser activada por fructosadifosfato. En cambio, a pH mayores que 7,2 muestra ra dependencia sigmoidea de la concentración de P-enolpiru Tato y es activada por fructosadifosfato, aumentando el efec to homotrópico del sustrato al incrementarse el pH (Rozengurt et al., 1969). Estas dos enzimas son oligómeros y el efecto del pH se ha interpretado sobre la base del modelo de Monod et al. (1965), postulándose un desplazamiento en el equilibrio de los confórmeros, que poseerían diferente afinidad por los sustratos y por los modificadores alostéricos (ver Discusión).

Por otra parte, la ribonucleasa pancreática de bovino es Ina enzima monomérica y muestra sigmoidicidad a pH sobre 6,6 con algunos sustratos sintéticos. Así, con uridilil-3,1-o-Inaftaleno-5-ol no presenta cooperatividad a pH 5,6, mientras que a pH 6,6 o superior hay una cooperatividad cinética mar-Inaftaleno-5-ol no presenta cinét

La glucoquinasa es también una enzima monomérica (ver zás adelante), y para explicar la cinética sigmoidea hemos postulado la existencia de al menos dos conformaciones con ziversa afinidad por glucosa (Cárdenas, 1978; Cárdenas et al., 1979; Olavarría et al., 1979). Debe concluirse, en consecuenzia, que las variaciones de pH no alterarían de modo diferente la afinidad por glucosa de ambas formas, ni el equilibrio enzre ellas, en contraste con lo que ocurriría en la ribonucleasa.

## b) Efecto de la concentración de K y de Na +

Los cationes monovalentes son activadores de varias clases de reacciones enzimáticas, incluyendo reacciones de transferencia de grupos fosforilos (Evans y Sorger, 1966). La activación podría ocurrir a través de una transición conformacional de la enzima inducida o estabilizada por el catión (Kachmar y Boyer, 1953; Evans y Sorger, 1966; Sapico y Anderson, 1970). También pueden actuar como inhibidores. En efecto, se ha mostrado que el K<sup>+</sup> es un inhibidor potente de las hexoquinasas de rata y de cuy. Así, a concentraciones de K<sup>+</sup> relativamente bajas (<0,25 M) inhiben significativamente (25 a 50 %) a las hexoquinasas de hígado, riñón y músculo esquelético (Weiser et al., 1971). Estos mismos autores encuentran en cambio, una muy leve inhibición de la glucoquinasa (<10 %) con concentraciones de KCl de hasta 0,5 M.

El K<sup>+</sup> ha sido descrito como un agente estabilizador de la glucoquinasa (Salas et al.,1965; Parry y Walker, 1966; González et al., 1967; Pilkis, 1972; Grossman et al., 1974; Maccioni y Babul, 1974; Holroyde et al., 1976). Por otra parte, Pilkis (1972) encontró una considerable variación en el peso molecular aparente de la glucoquinasa, de 48.000 a 65.000, al hacer experimentos de filtración en Sephadex G-100 en presencia y ausencia de KCl 150 mM, respectivamente

Estos resultados sugieren que la glucoquinasa puede existir en diversas conformaciones, de acuerdo con la concentración de

x o de la fuerza iónica, las cuales tendrían diferente radio de Stokes y diferente estabilidad. Dado que estas distintas conformaciones podrían diferir en sus propiedades cinéticas, co-To ocurre con fructosa-1-fosfato-quinasa (Sapico y Anderson, 1970) y fructosa-1,6-difosfatasa (Hubert et al., 1970), pareció conveniente investigar si las variaciones en la concentración de 😨 afectaban la cinética de la glucoquinasa. La figura 20a Tuestra un experimento en el cual se trató de pesquisar alguna liferencia en el efecto del ión potasio sobre la actividad de la lucoquinasa medida a dos concentraciones de glucosa. Se eligió ina concentración saturante (100 mM) y otra bajo el  $K_{0.5}$  (3 mM) se estudió el efecto de concentraciones crecientes de K+ sore la velocidad. El medio de ensayo contenía una concentración casal de K<sup>+</sup> de 15 o 30 mE y el aumento de concentración se conseguía por adición de KCl. Puede observarse que mientras con Flucosa 100 mM hay una franca disminución de la actividad enzimática al aumentar la concentración de K+, con glucosa 3 mM, en Tambio, la velocidad casi no varía. Aún más, al no añadir DTT medio de ensayo (tenía solo lo que aportaba la enzima), se servó una pequeña activación (15%) con K a concentración ==ja de glucosa, lo que no ocurrió a glucosa 100 mM.

Se quiso estudiar si este fenómeno ocurría también al suslituir K<sup>+</sup> por Na<sup>+</sup>. La figura 20 bilustra que al aumentar la concentración de Na<sup>+</sup> hay una inhibición al usar glucosa 100 mM en cambio, hay más bien una estimulación a glucosa 3 mM, a

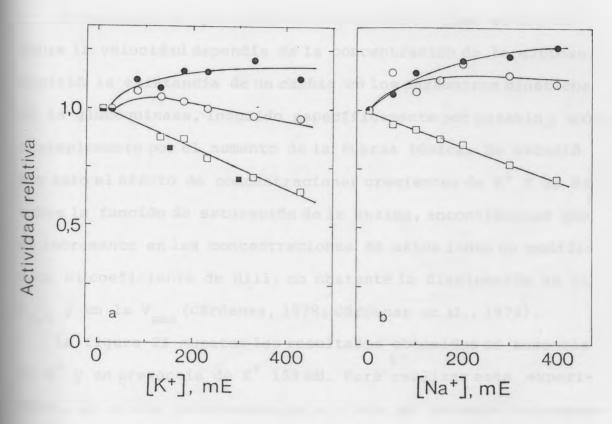


Figura 20. Efecto del K<sup>+</sup> y del Na<sup>+</sup> sobre la actividad de la glucoquinasa. La glucoquinasa (17 mU), proveniente de Sepha lex G-100 (método 1; act. esp. 2,9 U/mg proteína), se ensayó a dos concentraciones de glucosa en presencia de diferentes loncentraciones de K<sup>+</sup> (a) y de Na<sup>+</sup>(b). La actividad fosforilante de glucosa se determinó midiendo la producción del glucosa-6-P (ensayo la) a pH 7,5.

- En el medio de ensayo existía una concentración de Na $^+$  de 10 mE y la fuerza iónica varió entre 112 mM a concentración le K $^+$  de 0 mE y 543 mM a concentración de K $^+$  de 431 mE.
- En el medio de ensayo existía una concentración de K<sup>+</sup> de la mE. La fuerza iónica en ausencia de Na<sup>+</sup> era de 143 mM y sumentaba hasta 543 mM en presencia de NaCl 400 mM.
- (O) Glucosa 3 mM; DTT 2,5 mM
- •) Glucosa 3 mM; DTT 0,1 mM
- (a) Glucosa 100 mM; DTT 2,5 mM
- 🔳) Glucosa 100 mM; DTT 0,1 mM

El hallazgo de que tanto el efecto del K<sup>+</sup> como el del Na<sup>+</sup> sobre la velocidad dependía de la concentración de la glucosa, sugirió la existencia de un cambio en los parámetros cinéticos de la glucoquinasa, inducido específicamente por potasio y sodio o simplemente por el aumento de la fuerza iónica. Se estudió por esto el efecto de concentraciones crecientes de K<sup>+</sup> Y de Na<sup>+</sup> sobre la función de saturación de la enzima, encontrándose que el incremento en las concentraciones de estos iones no modificaba el coeficiente de Hill, no obstante la disminución en el X<sub>0.5</sub> y en la V<sub>max</sub> (Cárdenas, 1978; Cárdenas et al., 1979).

La figura 21 muestra los resultados obtenidos en ausencia de K $^+$  y en presencia de K $^+$  150 mM. Para realizar este experiento, la enzima proveniente de la etapa de Sephadex fue concentrada a través de una pequeña columna de DEAE-celulosa y luego se retiró el K $^+$  mediante filtración en una columna de Sephadex G-25. Cabe destacar, sin embargo, que en estos experimentos las soluciones de ensayo contenían una pequeña concentración de Na $^+$  (10 mE), usado como contraión del ATP. Puede observarse que la  $V_{\rm max}$  y el  $K_{0.5}$  disminuyen en presencia de K $^+$ , pero que no hay una diferencia entre las pendientes del gráfico de Hill. Al realizar los experimentos en ausencia o con bajas concentraciones de K $^+$  (< 30 mM) hay que tener presente que puede ocurrir na cierta inactivación durante el ensayo. Algunas preparaciones son más susceptibles a la inactivación, lo que puede depender del tiempo transcurrido desde su obtención y del grado de

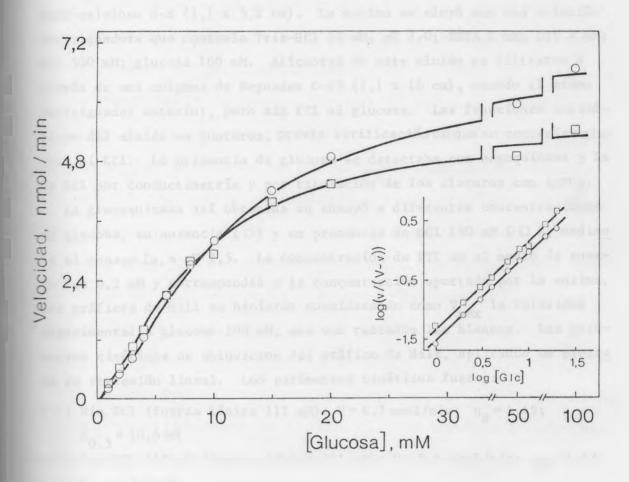


Figura 21. Leyenda en la página siguiente

rigura 21. Efecto del K<sup>†</sup> sobre la función de saturación de la glucoquirasa con glucosa. Cuatro unidades de glucoquinasa, de la misma preparación usada en la figura 20, se concentraron a través de una columna de DEAE-celulosa S-S (1,1 x 5,2 cm). La enzima se eluyó con una solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; DTT 4 mM; KCl 500 mM; glucosa 100 mM. Alícuotas de este eluido se filtraron a través de una columna de Sephadex G-25 (1,1 x 10 cm), usando el mismo amortiguador anterior, pero sin KCl ni glucosa. Las fracciones enzimáticas del eluido se juntaron, previa verificación de que no contenían glucosa ni KCl. La presencia de glucosa se detectaba con hexoquinasa y la de KCl por conductimetría y por titulación de los cloruros con AgNO<sub>3</sub>.

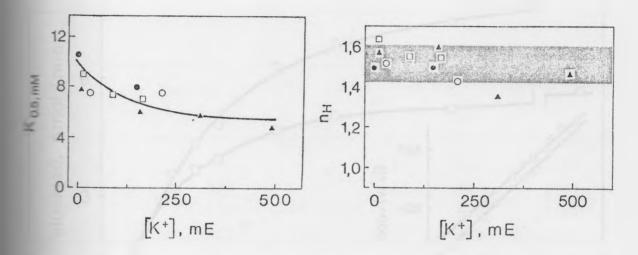
La glucoquinasa así obtenida se ensayó a diferentes concentraciones de glucosa, en ausencia (O) y en presencia de KCl 150 mM ( ), median te el ensayo la, a pH 7,5. La concentración de DTT en el medio de ensago fue 0,2 mM y correspondió a la concentración aportada por la enzima. Los gráficos de Hill se hicieron considerando como V la velocidad experimental a glucosa 100 mM, una vez restados los blancos. Los parátetros cinéticos se obtuvieron del gráfico de Hill, aplicando un progra de regresión lineal. Los parámetros cinéticos fueron:

- O) Sin KCl (fuerza iónica lll mM): V = 6,7 nmol/min;  $n_H = 1,49$ ;  $K_{0.5} = 10,6 \text{ mM}$
- Con KCl 150 mM (fuerza iónica 261 mM): V = 5,4 nmol/min;  $n_H = 1,49$ ;  $K_{0.5} = 8,0$  mM

pureza alcanzado. La inactivación ocurre especialmente a concentraciones bajas de glucosa y de DTT, pues tanto el sustrato mismo como el DTT son estabilizadores. Es importante estar alerta a este hecho y observar con extremo cuidado las curvas de progreso, pues si se presenta inactivación a concentraciones bajas de glucosa, se obtiene un aumento de la sigmoidicidad, que no es sino un error metodológico.

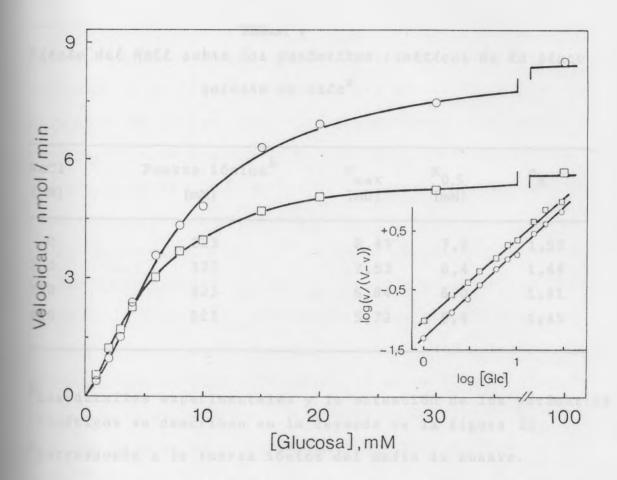
El efecto de la concentración del K<sup>+</sup> sobre la conducta cinética de la enzima puede apreciarse mejor en la figura 22, que resume los resultados de varios experimentos. Se observa que no había variación significativa del coeficiente de Hill de la enzima ( $n_H = 1.51 \pm 0.08$ ), aún a concentraciones de K<sup>+</sup> tan altas como 495 mM. En cambio, existía una disminución del  $n_{0.5}$  a medida que aumentaba la concentración del K<sup>+</sup>. En estos experimentos se confirmó la disminución de V a max a medida que se hacía mayor la concentración de K<sup>+</sup>.

El efecto de la concentración de Na<sup>+</sup> sobre la función de saturación se ilustra en la figura 23, que muestra los resultados obtenidos en ausencia y en presencia de Na<sup>+</sup> 400 mM. Puede verse en el gráfico de Hill inserto, que no hay variación significativa entre las pendientes de ambas rectas, no obstante el apreciable efecto sobre la V<sub>max</sub>. La tabla V muestra los alores de los parámetros cinéticos obtenidos a cuatro concentraciones de Na<sup>+</sup>. Al igual que en el caso de K<sup>+</sup>, el n<sub>H</sub> permatece constante mientras que el K<sub>0.5</sub> y la V<sub>max</sub> disminuyen. Debido este efecto sobre la V<sub>max</sub> y el K<sub>0.5</sub>, el Na<sup>+</sup> y el K<sup>+</sup> podrían



22. Resumen de los efectos de la variación de la concentración de sobre los parámetros cinéticos de la glucoquinasa con glucosa. Se mues los resultados de varios experimentos similares al descrito en la figual, usando distintas preparaciones enzimáticas obtenidas por el método 1 y diferentes concentraciones de DTT. En todos los casos existió en el de ensayo una concentración de Na de 10 mE. La fuerza iónica varió escella y 618. En los experimentos con baja concentración de K y de DTT se observó inactivación durante el ensayo. Cada símbolo indica un conde experimentos realizados en iguales condiciones, salvo la variación el concentración de K. Zona gris como en la figura 20.

- K 31 mE, 213 mE. GK (Sephadex). DTT 5,0 mM
- \* 0 mE, 150 mE. GK (Sephadex). DTT 0,2mM. Experimento de la figura 21.
- I K 13 mE, 88 mE, 163 mE. GK (Sephadex). DTT 0,1 mM
- \*\* 10 mE, 161 mE, 313 mE, 495 mE. GK (DEAE-celulosa). DTT 2,5 mM



Egura 23. Efecto del NaCl sobre la función de saturación de la glucominasa con glucosa. La glucoquinasa (etapa Sephadex; método 1; act. 2,9 U/mg de proteína) se ensayó a diferentes concentraciones de lacosa, en ausencia (○) y en presencia (□) de NaCl 400 mM. La fuer iónica fue de 123 y 523 respectivamente. En ambos casos había prete una concentración de K<sup>+</sup> de 22,4 mE. La actividad se midió con el sayo la, a pH 7,5. El gráfico de Hill inserto fue confeccionado usan el como V<sub>max</sub> el valor medido a 100 mM glucosa, una vez restados los blan los parámetros cinéticos n<sub>H</sub> y K<sub>0.5</sub> se obtuvieron como se indica la figura 21 y se encuentran en la tabla V.

TABLA V

Esecto del NaCl sobre los parámetros cinéticos de la glucoquinasa de rata<sup>a</sup>

NaCl (mM)	Fuerza iónica <sup>b</sup> (mM)	V max (mU)	K <sub>0.5</sub> (mM)	n <sub>H</sub>
0	123	8,49	7,8	1,52
200	323	7,53	6,4	1,44
300	423	6,84	6,0	1,41
400	523	5,72	5,4	1,45

Los detalles experimentales y la obtención de los parámetros cinéticos se describen en la leyenda de la figura 23.

Corresponde a la fuerza iónica del medio de ensayo.

aparecer como inhibidores incompetitivos; sin embargo, su acción activadora a bajas concentraciones de glucosa, hace que no puedan ser catalogados como tales. En efecto, si los datos de la figura 21 o los de la figura 23 se llevan a un gráfico de dobles recíprocos que se lineariza elevando la concentración de glucosa al exponente  $n_{\rm H}$ , se obtienen dos rectas que, como era de esperar, no son paralelas sino que se intersectan en el cuadrante derecho superior.

El efecto del K<sup>+</sup> y del Na<sup>+</sup> (o de la fuerza iónica) de disminuir conjuntamente K $_{0.5}$  y V $_{\rm max}$  podría explicar los resultados de la figura 20, ya que habría dos efectos opuestos: por una parte, una inhibición de la actividad catalítica y, por otra, una estimulación debida al aumento de la afinidad de la enzima por glucosa. A concentración alta de glucosa (100 mM) pesaría principalmente el efecto inhibitorio, en cambio a concentraciones bajas se harían sentir ambos efectos, dejando un balance de cierta activación. La disminución del K $_{0.5}$  y de la V $_{\rm max}$  provocada por aumento en la concentración de KCl o de NaCl indica cambios en la conformación de la enzima. Las conformaciones existentes a alta concentración de K $^+$ , no obtante ser más estables y tener valores menores de V $_{\rm max}$  y de K $_{0.5}$ , mantienen una cinética cooperativa con glucosa.

De los estudios realizados en presencia de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> se desprende que ambos cationes son equivalentes desde el punto de vista del efecto *in vitro* sobre los parámetros cinéticos

de la glucoquinasa, a pesar de que, como agente estabilizador, algunos autores han descrito que el Na<sup>+</sup> no podría reemplazar al K<sup>+</sup> (Salas *et al.*, 1965; Pilkis, 1972; Parry y Walker, 1966).

A fin de verificar este último punto se realizaron recientemente algunos estudios (Toledo y Cárdenas). Se exploró, por una parte, la posibilidad de reemplazar el K<sup>+</sup> por el Na<sup>+</sup> Turante la preparación de la enzima y, por otra, la estabili zad de la glucoquinasa a 37° en presencia de Na<sup>+</sup> o de K<sup>+</sup>. Se reparó enzima, mediante el método 2, hasta la etapa de DEAEcelulosa (columna de 4 ml), a partir de un hígado de rata separado en dos porciones. Una de ellas se procesó con las mis mas soluciones descritas en el método 2. Para el procesamien to de la otra parte se reemplazó el fosfato de potasio por fosfato de sodio y el cloruro de potasio por cloruro de so 10. Se encontró que en dos preparaciones así realizadas el rendimiento con Na tue un 50-60% del rendimiento con Kt. De esto se desprende que el K no puede ser reemplazado por el en la purificación de la glucoquinasa, al menos en las Etapas iniciales de la purificación. Al estudiar la estabi-Ildad térmica de las enzimas así obtenidas (una con Na y la mra con K<sup>+</sup>), se encontró que la glucoquinasa preparada en rresencia de Na era más susceptible a la inactivación a 37° == la obtenida en presencia de K<sup>+</sup> (Fig. 24). Además, en

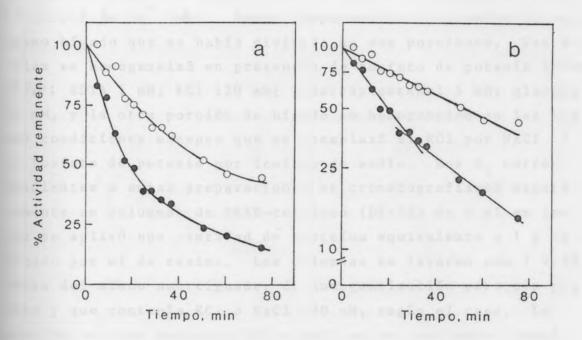


Figura 24. Leyenda en la página siguiente

Figura 24. Cinética de inactivación a 37° de la glucoquinasa en presencia de K<sup>†</sup> o de Na<sup>†</sup>. La glucoquinasa en etapa de DEAE-celulosa se preparó por el método 2 en presencia de 🖈 (○) ó de Na<sup>†</sup> (●). Ambas preparaciones provenían de un mismo hígado que se había dividido en dos porciones. Una de ellas se homogeneizo en presencia de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; KC1 120 mM; 2-mercaptoetanol 5 mM; glucosa 10 mM, y la otra porción de hígado se homogeneizó en las mis mas condiciones excepto que se reemplazó el KCl por NaCl y el fosfato de potasio por fosfato de sodio. Los S, correspondientes a ambas preparaciones se cromatografiaron separatamente en columnas de DEAE-celulosa (DE-52) de 4 ml en las cue se aplicó una cantidad de proteína equivalente a l g de ີ່ Ígado por ml de resina. Las columnas se lavaron con 7 volú menes del mísmo amortiguador de homogeneización pero sin glu cosa y que contenía KCl o NaCl 120 mM, según el caso. La elución se hizo mediante KCl o NaCl en un gradiente lineal ce 120-500 mM en el amortiguador de equilibrio y lavado 16 ml por lado). Las fracciones con actividad glucoquinási ta y sin contaminación con hexoquinasa C o con N-acetilgluco samina-quinasa se juntaron y con ellas se hizo este experimen Volumenes iguales de ambas preparaciones se incubaron a 📝 y se retiraron alícuotas a distintos tiempos según se in zica en la figura, determinando la actividad fosforilante de zlucosa remanente a pH 8,0 mediante el ensayo la. La reaczión se inició con la adición de ATP.

La ordenada está dibujada en escala aritmética (a) o escala logarítmica (b).

presencia de Na<sup>+</sup> la inactivación no sigue una cinética de primer orden, como puede observarse en la figura 24b. Estas observaciones confirman la diferencia en la acción estabilizadora de ambos cationes.

En estudios de fosforilación de glucosa en hepatocitos intactos se ha mostrado que la naturaleza del catión influye en la función de saturación de la glucoquinasa. Así, cuando se incuban los hepatocitos en solución de Krebs-Henseleit, la curva de saturación es sigmoidea, con un coeficiente de Eill de 1,8 y un K<sub>0.5</sub> para glucosa de 20 mM. Al reemplazar en el medio de incubación los iones sodio por iones potasio, el coeficiente de Hill disminuye a 1,3 y el K<sub>0.5</sub> a 12 mM, con igual V<sub>max</sub> en ambas condiciones (Bontemps et al., 1978). Es iecir, en presencia de K<sup>+</sup>, la curva tiende a hacerse menos sigmoidea, lo que trae como consecuencia que a concentraciotes no saturantes de glucosa, por ejemplo a concentraciones fisiológicas, la velocidad de fosforilación in situ sea mayor en un medio con K<sup>+</sup> que en un medio con Na<sup>+</sup>.

El efecto diferente de ambos iones sobre la fosforilación le glucosa se pierde al hacer el estudio en extractos de hetatocitos (Bontemps et al., 1978), donde la forma de la curno cambia al reemplazar el Na por K en el medio de ensa lo, lo que concuerda con los resultados descritos en este trabajo con enzima purificada. Parecería ser que el efecto

ciferente de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> sobre la fosforilación de glucosa *in*vivo requiere de alguna manera la integridad celular para

canifestarse y modular la conformación de la enzima por un

canismo aún no conocido.

# Efecto de DTT, agente reductor de puentes disulfuros

Los grupos tioles juegan un papel importante en la acti-Tidad de muchas enzimas. Así, en las hexoquinasas de mamí-Teros y de levaduras se ha encontrado una relación directa entre la modificación de los grupos SH y la inactivación de la enzima (Colowick, 1973). En la glucoguinasa se había lamostrado una inactivación con reactivos modificadores de Trupos tioles (Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1967; Pilkis, 1972). Por otra parte, observaciones realizadas en este y otros laboratorios habían mostrado que reactivos reduc Tores de puentes disúlfuros, como DTT y 2-mercaptoetanol, actuaban como agentes estabilizadores de la glucoquinasa y se labía introducido su uso durante la purificación de la enzima Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1966; Babul y Niemeyer, 1966). Los grupos SH de la glucoquinasa podrían participar residuos catalíticos, o bien como estabilizadores de - conformación catalíticamente activa. La modificación ie los grupos tioles (oxidación o alquilación)

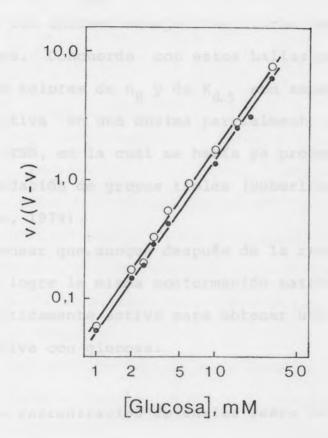
podría originar un cambio conformacional que, junto con disminuir la actividad catalítica, pudiera alterar la conducta cinética. Por ejemplo, la modificación de un grupo tiol produce un cambio en las propiedades cinéticas de la fosfofructo-quinasa, obteniéndose una enzima desensibilizada frente a la inhibición por MgATP (Kemp, 1969). Asimismo, la hexoquinasa C pierde la inhibición por exceso de glucosa al ser modificados sus grupos SH (Ureta, 1976).

Por actuar como agente estabilizador, la presencia del DTT en la mezcla de reacción puede ser muy importante al trabajar con concentraciones bajas de glucosa, pues en algunas condiciones ocurre una inactivación. Así, se había visto que el DTT impedía y revertía la inactivación producida a pH alcalino (figura 16). También evitaba la inactivación a bajas concentraciones de glucosa, observada aún a pH 7,5, con preparaciones de glucoquinasa provenientes de hidroxilapatita (página 65). Esta capacidad estabilizadora del DTT hacía aconsejable su uso rutinario en el medio de ensayo de la enzima. Sin embargo, antes de tomar esta decisión, y en vista de todos los antecedentes comentados, pareció necesario determinar si la presencia de DTT en la mezcla de reacción era capaz de modificar el grado de cooperatividad de la glucoquinasa con glucosa.

El gráfico de Hill de la figura 25 muestra los resultados obtenidos en ausencia y en presencia de DTT en el medio de ensayo, al estudiar la función de saturación con glucosa de una enzima recién preparada que había sido purificada en ausencia de agentes reductores. La glucoguinasa usada era activable en un 20% por DTT, lo que indicaba que se había inac tivado parcialmente, con formación de puentes disúlfuros. El paralelismo de las rectas indica que la presencia de DTT no afecta la cinética cooperativa con glucosa (Cárdenas et =1., 1975). Debido a que el grado de oxidación de los grupos tioles parecía afectar la V pero no el coeficiente de Hill, se decidió introducir DTT como componente habitual de la mezcla de ensayo. Como el tiempo requerido para la reactivación de la glucoquinasa a 30° es dependiente de la concentración de DTT, se eligió una concentración de 2,5 mM que permitía reactivar en el período de preincubación una enzima carcialmente inactivada.

La independencia del grado de sigmoidicidad con respecto el grado de inactivación se vió también en una preparación de la etapa de Sephadex que había perdido totalmente su actividad catalítica durante el almacenamiento de 9 meses a 4°.

Al ser tratada con DTT 10 mM durante 18 h aproximadamente, la enzima envejecida se reactivó hasta alcanzar un 3,3% de la actividad original. En esta condición el coeficiente de



igura 25. Gráficos de Hill de la función de saturación con glucosa en sencia y en presencia de DTT. La glucoquinasa se preparó hasta la etade de hidroxilapatita en ausencia de DTT. La actividad fosforilante de lucosa se determinó a diferentes concentraciones de este sustrato me− fiante el ensayo la, a pH 7,5 en ausencia (○) y en presencia de DTT 2,5 mM (●).

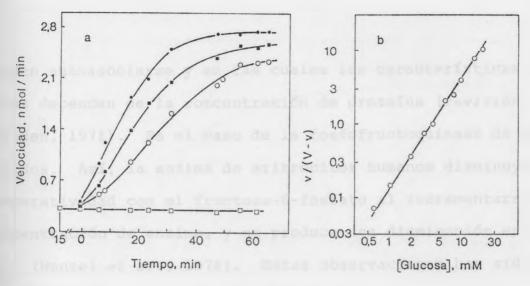
- (O) Sin DTT:  $V = 10.5 \text{ nmol/min}; n_H = 1.47; K_{0.5} = 6.4 \text{ mM}$
- •) DTT 2,5 mM: V = 12,6 nmol/min;  $n_H = 1,47$ ;  $K_{0.5} = 7,3 \text{ mM}$

Hill fue de 1,45 y el K $_{0.5}$  de 4,2 (Fig. 26). Otros experimentos realizados con enzimas envejecidas dieron resultados enteramente análogos. Concuerda con estos hallazgos la observación de que los valores de  $n_{\rm H}$  y de K $_{0.5}$  son semejantes a los de la enzima nativa en una enzima parcialmente inactiva y resistente al DTNB, en la cual se había ya producido supuestamente una oxidación de grupos tioles (Heberlein et al., 1978; Heberlein, 1979).

Todo hace pensar que, aunque después de la reactivación con DTT no se logre la misma conformación nativa, basta que ella sea catalíticamente activa para obtener una conducta cimética cooperativa con glucosa.

Efecto de la concentración de enzima sobre la conducta cinética de la glucoquinasa

Una condición importante del ensayo, que puede modificar el rado de cooperatividad, es la concentración de la enzima. Va riaciones en este parámetro pueden producir desplazamientos en el estado de equilibrio entre formas enzimáticas con distin ta estructura cuaternaria, produciéndose fenómenos de asocia rión-disociación. Estas formas podrían diferir en sus propie rades cinéticas y la cooperatividad ser el resultado de un des plazamiento adicional del equilibrio entre ellas provocado por sustrato. Se han descrito varios ejemplos de enzimas que



igura 26. Reactivación de la glucoquinasa por DTT. Características inéticas de la enzima reactivada. Se usó glucoquinasa en la etapa de sephadex G-100 (método 1; act. esp. original 2 U/mg de proteína) envejerada por 9 meses a 4°. La actividad fosforilante de glucosa se determinó pH 7,5 mediante el ensayo la.

Cinética de reactivación por DTT. La actividad de una alícuota de 1.15 ml de glucoquinasa se ensayó a 100 mM glucosa y sin DTT. Al cabo de 1.15 ml (tiempo 0) se agregó DTT a una concentración final de 2,5 (()), (()) o 10 mM (()) y se continuó registrando la formación de producto. Se estimó la velocidad a distintos tiempos mediante el trazado de las 1.20 gentes a las curvas de progreso respectivas. Control sin DTT (()). La 1.21 lectividad basal corresponde a la actividad fosforilante de glucosa de la 1.22 lectilglucosamina-quinasa, la cual no es activada por DTT.

Gráfico de Hill. Una alícuota de la misma preparación anteriormente usada se incubó con DTT 10 mM a 30° por 30 min, y se dejó luego a 4°hasta día siguiente (18 h). Se ensayó la actividad fosforilante de glucosa distintas concentraciones de este sustrato y en presencia de una concentración de DTT de 3mM. V<sub>max</sub> = 2,8 nmol/min; K<sub>0.5</sub> = 4,2 mM; n<sub>H</sub> = 1,45.

ticas dependen de la concentración de proteína (revisión en Frieden, 1971). Es el caso de la fosfofructoquinasa de varios tejidos. Así, la enzima de eritrocitos humanos disminuye la cooperatividad con el fructosa-6-fosfato al incrementarse la concentración de enzima, y se produce una disminución en el (Wenzel et al., 1976). Estas observaciones han sido interpretadas en términos de un modelo de autoasociación que considera como unidad básica un dímero inactivo (M<sub>r</sub> 190.000), el cual por autoasociación originaría formas activas. El fructosa-6-fosfato desplazaría el equilibrio hacia las formas pligoméricas (Wenzel et al., 1976).

La cooperatividad podría también ser el resultado de las interacciones entre los sitios activos de formas oligoméricas de la enzima, cuya proporción relativa con respecto al monómero es función de la concentración total de enzima y de la concentración del sustrato.

Era, pues, importante determinar si los parámetros cinézicos de la glucoquinasa se veían afectados por la concentra
zión de enzima usada en el ensayo. Este punto era crucial
para la correcta interpretación de futuros experimentos. La
zigura 27 muestra los resultados obtenidos al estudiar la
zunción de saturación con glucosa, variando la concentración
ze enzima en un orden de magnitud. En el intervalo de concentraciones utilizadas, el cual estaba limitado por los

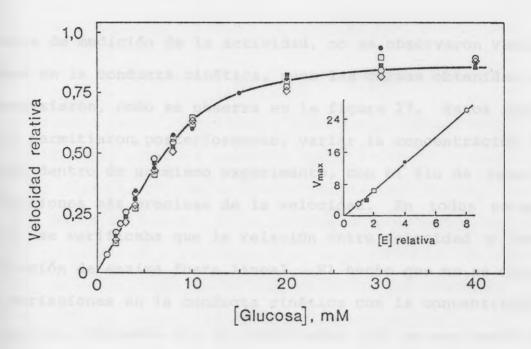


Figura 27. Función de saturación de la glucoquinasa con glucosa al usar inferentes concentraciones de enzima. La glucoquinasa en la etapa de La celulosa (método 1; act. esp. 0,6 U/mg de proteína) se diluyó 1:2; 1:4; 1:6; y 1:8 en amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 que contenía EDTA M; DTT 1,0 mM y KCl 0,26 M. Las diluciones se hicieron inmediatamente etes de ser usadas y para cada una de ellas se determinó, en una alí-ceota de 0,1 ml, la actividad fosforilante de glucosa a distintas contentraciones de este sustrato. Se usó el ensayo la, a pH 7,5. En el gráfico principal se muestra la velocidad relativa (v / Vmax) en función de encentración de glucosa. El gráfico inserto muestra la variación de la en función de la concentración relativa de la enzima. Se asignó el en función de la concentración de enzima resultante de la dilución 1:8.

So valores de n<sub>H</sub> oscilaron entre 1,41 y 1,61 con un valor promedio de 1.50. Los valores de K<sub>0.5</sub> variaron entre 6,8 y 8,0 con un valor promedio e 7,4.

métodos de medición de la actividad, no se observaron variaciones en la conducta cinética, pues las curvas obtenidas se superpusieron, como se observa en la figura 27. Estos resultados permitieron, posteriormente, variar la concentración de enzima dentro de un mismo experimento, con el fin de tener estimaciones más precisas de la velocidad. En todos estos se verificaba que la relación entre velocidad y contentración de enzima fuera lineal. El hecho que no se obserten variaciones en la conducta cinética con la concentración de enzima, concuerda con los resultados que se mostrarán en capítulo 7, donde no se observan variaciones en el coeficiente de distribución en Sephadex G-200 al variar la concentración de enzima (Figs. 58 y 60).

## 3. INTENTOS DE MODIFICACION DE LA COOPERATIVIDAD

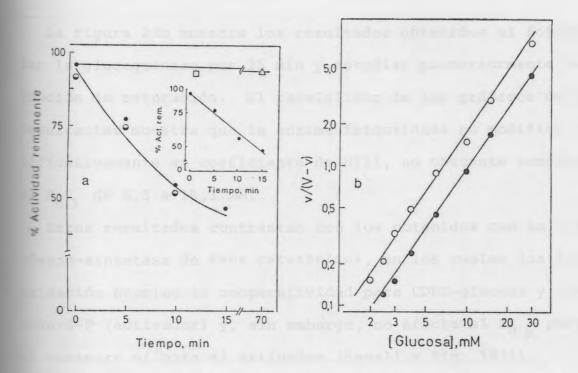
Se consideraron inicialmente tres posibilidades que dieran una explicación sobre la cinética cooperativa de la glucoquilasa con glucosa: i) que el efecto cooperativo fuera la conse cuencia de la existencia de un oligómero (compuesto tal vez de dos subunidades), como ocurre en la mayoría de las enzimas que lo presentan; ii) que la cooperatividad se debiera a la presencia de un segundo sitio de unión del sustrato (sitio ≥lostérico) en la misma subunidad, como se sugiere en el caso le la ribonucleósidotrifosfato-reductasa (ver Discusión, pp. 270-272), y iii) que la enzima pudiera existir en al menos los conformaciones con distintas propiedades cinéticas, como parece ser el caso de la hexoquinasa  $L_{\scriptscriptstyle T}$  (ver Discusion, pp. 281-Tanto las interacciones entre las subunidades como entre los dos sitios de una misma subunidad, así como las propor ciones relativas de diversas conformaciones, podrían perturbar se por diversos tratamientos, como fotooxidación, calentamieny presencia de agentes desnaturalizadores. Se pensó que es tratamientos podrían originar una enzima con cinética micaaeliana, como ha ocurrido en el caso de otras enzimas que pre sentan cooperatividad (ref. en Stadtman, 1970). Este tipo de experimento podría, además, aportar información para una interretación molecular de la conducta cinética de la glucoquinasa.

### Fotooxidación

Se sometió a fotooxidación a la glucoquinasa para determinar si la modificación fotoquímica producida podría eliminar el efecto homotrópico aparente de glucosa. Este resultado era probable, ya que a través de la fotooxidación es factible producir cambios en las conductas cinéticas no michaelianas, como ha sido descrito. Así por ejemplo, en la fosfofructoqui esta de corazón de oveja, la fotooxidación suprime la cinética cooperativa con fructosa-6-P y la inhibición por ATP

Al estudiar el efecto de la fotooxidación sobre la activitad de la glucoquinasa a pH 7,0, usando como agente oxidante ul de metileno, se observó que se producía una inactivación la enzima, proceso que se comportaba como de primer orden la enzima, proceso que se comportaba como de primer orden la iluminación hasta por 70 min en ausencia del catalizador, produjeron inactivación en las condiciones experimenta-les usadas. La presencia de DTT en el medio de ensayo no retirtió la inactivación.

Al estudiar el efecto de la fotooxidación sobre los parázetros cinéticos de la glucoquinasa, se observó que, contrariamente a lo esperado, la modificación fotoquímica no logró suprimir o disminuir la cooperatividad (Cárdenas et al.,



Ejura 28. Efecto de la fotooxidación con azul de metileno sobre la coquinasa de rata. Se usó glucoquinasa proveniente de la etapa de direxilapatita (método 1). La fotooxidación de la enzima se realizó DH 7,0 como se indica en Materiales y Métodos. La actividad fos - director de glucosa remanente se determinó a pH 7,5 mediante el cayo la.

Cinética de inactivación. Alícuotas de 0,2 ml se fotooxidaron por empos variables: 0,5,10 y 15 min. La actividad remanente se determision DTT 2,6 mM (♠) o 0,1 mM (♠) (solo el que aporta la enzima).

Controles con solo iluminación (□) y solo azul de metileno (♠)

Tresponden al experimento en que se usó DTT 2,6 mM. El recuadro

Tresponde a un gráfico semilogarítmico de la actividad remanente en

Ción del tiempo. Constante de inactivación de pseudo-primer-orden

Lobs) = 0,021 min<sup>-1</sup>.

Gráfico de Hill. La actividad enzimática remanente se determinó concentraciones variables de glucosa. Control ( $\bigcirc$ ),  $n_{\rm H}$  = 1,48.

La figura 28b muestra los resultados obtenidos al fotooxila la glucoquinasa por 25 min y estudiar posteriormente la minima de saturación. El paralelismo de los gráficos de Hill mesultantes muestra que la enzima fotooxidada no modificó siguificativamente su coeficiente de Hill, no obstante aumentar de Kons de 6,5 a 10,1 mM.

Estos resultados contrastan con los obtenidos con la gliefgeno-sintetasa de Rana catesbeiana, en los cuales las fotomidación suprime la cooperatividad para UDPG-glucosa y glumidación suprime la cooperatividad para UDPG-glucosa y glumidación suprime la cooperatividad para UDPG-glucosa y glumidación y, sin embargo, no afecta al  $K_{0.5}$  para midación suprime la cooperatividad para UDPG-glucosa y glumidación suprime la cooperatividad para un suprime la

Se exploró la posibilidad de usar en estos experimentos flucoquinasa proveniente de otro organismo, cuya cooperatiidad pudiera ser alterada más fácilmente. Así, se ensayó flucoquinasa de rana chilena (C. caudiverbera), la que resulto ser muy sensible a la fotooxidación en las condiciones empleadas. Al ser fotooxidada por 10 min en presencia de azul de metileno, se inactivó en un 89%, lo que impidió estudiar la función de saturación. La sola presencia de azul de metileno a esa concentración inactivó considerablemente la enzima respecto al control sin azul de metileno y en oscuridad, teniéndose una V de 58%, con un ligero aumento en el foso, pero con mantención de la cooperatividad (Tabla VI).

La glucoquinasa de rana parece ser más sensible a la inaczivación por fotooxidación que la isoenzima C de la misma

TABLA VI Esecto de la fotooxidación sobre los parámetros cinéticos de la glucoquinasa<sup>a</sup>

Indición enzimática	V U/0,5 ml	K 0.5 (mM)	n <sub>H</sub>	
Elucoquinasa de rata <sup>b</sup>				
To tratada	11,92	6,45	1,47	
Totooxidada 10 min	6,02	9,47	1,43	
Potooxidada 20 min	3,05	10,14	1,50	
Sucoquinasa de rana <sup>c</sup>				
tratada	4,55	1,45	1,6	
- Azul de metileno 10 min	2,54	2.00	1,4	
Potooxidada 10 min	0,51		-	

La actividad fosforilante de glucosa se determinó a pH 7,5 mediante el ensayo la

Condiciones experimentales semejantes a las descritas en la figura 28. El control corresponde a enzima sin azul de metileno y sin iluminación

La enzima provenía de la etapa de purificación de DEAE-celulosa (método 1). No se usó DTT en el medio de ensayo. Otros detalles experimentales en Materiales y Métodos

Especie, la cual varía solo levemente su actividad en las mises condiciones, pero, en cambio, deja de ser inhibida por esceso de glucosa al ser fotooxidada (Ureta, 1976).

En la glucoquinasa microsómica de rata se ha descrito que en la forma GM<sub>1</sub> el coeficiente de Hill para glucosa baja de 2,8 a la después de la fotooxidación con azul de metileno. Contintamente se produce una desensibilización respecto a la in libición por ATP. La modificación fotoquímica tendría, en este caso, una acción disociante, ya que al ser fotooxidada enzima GM<sub>1</sub> (dímero de peso molecular 120.000), presenta volumen de elución en BioGel semejante a la forma GM<sub>2</sub> (mo

El hecho que la glucoquinasa de rata al ser fotooxidada

enta su K<sub>0.5</sub> para glucosa y disminuye su V<sub>max</sub>, como se re

en la tabla VI, indica que la fotooxidación no solamen
disminuye el número de moléculas catalíticamente activas,

que también genera la aparición de moléculas de enzima

lteradas, que presentan una menor afinidad por glucosa, pe
que retienen todavía la cooperatividad con este sustrato.

se encontró efecto sobre el grado de cooperatividad de la

lucoquinasa de rata con inactivaciones entre 15 y 75%.

El efecto de la fotooxidación sobre el K<sub>0.5</sub> y la velocidad mima podría ser consecuencia de la modificación de resias aminoacídicos del sitio activo o fuera de él, pero ca activa. Se podría pensar en un residuo histidina, ya que se ha descrito en varias enzimas que el azul de metileno modifica este aminoácido (Cohen, 1968), aunque también, según las condiciones experimentales, puede oxidar otros residuos como cisteína, metionina, triptófano y tirosina.

En un experimento en que se usó glucoquinasa de rata foto-Exidada a pH 8,0 con rosa de bengala, colorante que muestra Fran selectividad hacia histidina, tampoco se modificó la Ecoperatividad ( $n_H = 1,52$ ), en condiciones en que la  $V_{max}$ 52 había reducido en un 50%.

La postulación de un residuo histidina como parte del sitio activo sería compatible con las variaciones observadas el  $K_{0.5}$  y en la  $V_{\rm max}$  en función del pH, porque ellas susieren la presencia de un grupo ácido con un pK de alrededor 7.0.

#### Efecto del calentamiento

Variaciones en la temperatura modifican las interacciones Ligrofóbicas de las proteínas pudiendo producirse variacio
Les en el grado de asociación y en la estructura conformacio

de ellas. Estos efectos pueden derivar en cambios en

Les parámetros cinéticos de una enzima, como ha sido descri
(ref. en Stadtman, 1970). Por ejemplo en aspartato trans
Larbamilasa de E. coli, el calentamiento por 5 min a 60° su
rrime la cooperatividad con aspartato (Gerhart y Pardee, 1962).

Parry y Walker (1966) habían descrito que el gráfico de Errhenius para la actividad glucoquinásica daba una línea recta en un rango de temperatura de 5 a 46,5° y que, además, el valor de K<sub>m</sub> era independiente de la temperatura, dentro de dicho rango. Estos resultados llevan a pensar que las rariaciones en la temperatura del medio de ensayo no afectan la cinética de la glucoquinasa. Sin embargo, debido a que asos autores describen una cinética michaeliana, era recozendable reestudiar el efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos de la glucoquinasa.

Estudios de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa realizados a distintas temperaturas, en un ranentre 0 y 40° no mostraron alteraciones significativas el grado de sigmoidicidad (H. Niemeyer y E. Rabajille, comunicación personal), lo que estaría de acuerdo con lo deserto por Parry y Walker (1966).

En vista de que las modificaciones de la temperatura del medio de ensayo no habían afectado la cooperatividad, se pen que posiblemente una incubación de la glucoquinasa en essencia de los sustratos podría revelar una acción desensibilizadora. La figura 29 muestra los resultados obtenidos incubar la glucoquinasa por 90 min a 45° y estudiar poste riormente la función de saturación con glucosa a la temperatura habitual del ensayo (30°).

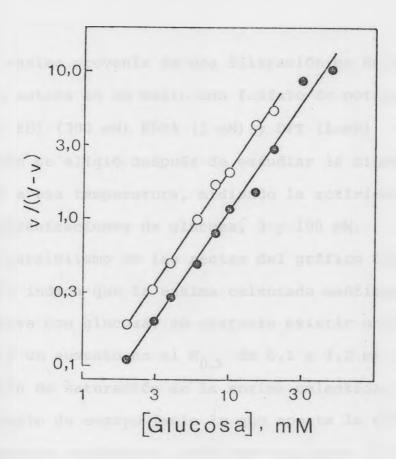


Figura 29. Gráficos de Hill de la función de saturación con glucosa de La glucoquinasa nativa y calentada a 45°.

Una alícuota de 2,5 ml de glucoquinasa proveniente de la etapa de Sephadex G-100 (método 2, act. esp. 2,0 U/mg de proteína), se calento por min a 45° ( ) y luego se mantuvo en hielo antes de proceder al ensa
Como control se usó la enzima no calentada ( ). La actividad fosfo calente de glucosa se determinó a 30° mediante el ensayo la a pH 7,5, usán se concentraciones variables de glucosa (1 a 100 mM). Los parámetros cinéticos obtenidos fueron los siguientes:

- (3) GK nativa: V = 11,0 nmol/min;  $n_H = 1,52$ ;  $K_{0.5} = 6,1 \text{ mM}$
- (•) GK calentada: V = 5,6 nmol/min;  $n_H = 1,47$ ;  $K_{0.5} = 9,2$  mM

La enzima provenía de una filtración en Sephadex y por la tanto estaba en un medio con fosfato de potasio (10 mM, 7,0), KCl (300 mM), EDTA (1 mM) y DTT (1 mM). El tiempo de cubación se eligió después de estudiar la cinética de inactivación a esa temperatura, midiendo la actividad remanente dos concentraciones de glucosa, 3 y 100 mM.

El paralelismo de las rectas del gráfico de Hill de la figura 29 indica que la enzima calentada mantiene la cinética coperativa con glucosa, no obstante existir una inactivación 49% y un aumento en el  $K_{0.5}$  de 6,1 a 9,2 mM. Al estudiar función de saturación de la enzima calentada, sin agregar al medio de ensayo (solo lo que aporta la enzima, 0,1 mM), obtuvieron parámetros cinéticos similares (V = 5,4 nmol/min = 1,48;  $K_{0.5}$  = 9,06).

#### Efecto del Triton X-100

En primer término, se ensayó el efecto de diferentes

concentraciones de Triton X-100 (detergente no iónico) sobre

la actividad de la glucoquinasa, con el objeto de determinar

concentración que alterara solo levemente la velocidad

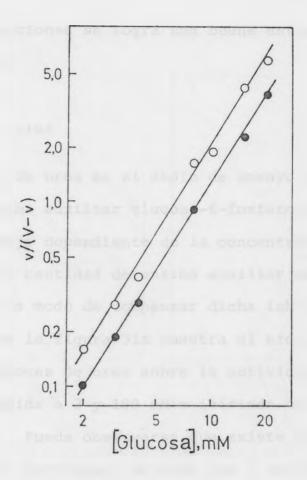
sáxima. La idea era buscar una condición que pudiera supri
la cooperatividad sin alterar grandemente la actividad

catalítica. Se encontró que el Triton X-100 agregado a

la mexcla de ensayo a concentraciones sobre 0,1%

0,2 a 0,5%), aunque tenía un efecto mínimo sobre la relocidad, inactivaba la enzima durante el curso de la reacción. El efecto inactivador era especialmente notorio a concentraciones de glucosa menores que 8 mM pero muy definido a concentraciones de 100 mM.

Se decidió usar una concentración de tritón de 0,1% para Estudiar la función de saturación con glucosa. A esa concen-Tación, aunque aún persistía a bajas concentraciones de glu-₹ una ligera inactivación después de algunos minutos (6-8 era posible tener una estimación confiable de la veloci-La figura 30 muestra los resultados obtenidos. El parelelismo de las rectas de los gráficos de Hill indica que la zima ensayada en presencia de tritón mantiene una cinética experativa con glucosa, y que el coeficiente de Hill es seme late al de la enzima control. Aunque no hay efecto sobre la se observa un aumento en el  $K_{0.5}$  en presencia de tritón. el experimento que se ilustra en la figura 30, la reacción inició con la adición de la enzima, con el objeto de evila posible inactivación durante la preincubación y aumen al máximo el segmento lineal en la curva de progreso (8min). Sin embargo, en un experimento en que se inició la ección con glucosa y el tiempo de linealidad fue menor, se etuvieron valores semejantes de los parámetros cinéticos. indica que, aunque existe algo de inactivación, tomando



igura 30. Gráficos de Hill de la función de saturación con glucosa de glucoquinasa en ausencia y en presencia de Triton X-100.

La glucoquinasa (método 1, Sephadex G-100, act. esp. 2,9 U/mg de proteína) se ensayó en ausencia (O) o en presencia (O) de Triton X-100 ,1%, a concentraciones variables de glucosa (1 a 100 mM). Se utilizó el ensayo la, a pH 7,5 con DTT 0,1 mM. La reacción se inició con la aditión de la glucoquinasa.

- (O) Control:  $V = 14,1 \text{ nmol/min}; K_{0.5} = 6,1 \text{ mM}; n_H = 1,63$
- •) Triton 0,1%: V = 13,9 nmol/min;  $K_{0.5} = 8,8$  mM;  $n_H = 1,57$

las debidas precauciones se logra una buena estimación de la relocidad inicial.

### Efecto de la urea

La presencia de urea en el medio de ensayo inhibe la ac

lividad de la enzima auxiliar glucosa-6-fosfato-deshidrogena

sa, en un porcentaje dependiente de la concentración de urea.

esta razón, la cantidad de enzima auxiliar usada en cada

essayo, se varió de modo de compensar dicha inhibición.

El gráfico de la figura 31a muestra el efecto de dife
rentes concentraciones de urea sobre la actividad fosforilan

le de glucosa, medida a 2 y 100 mM e iniciada con la adición

le este sustrato. Puede observarse que existe una disminu
lon marcada de la actividad, de modo que a una concentración

le urea de 0,72 M la actividad con glucosa 2 mM es alrededor

le un 40% del control y con glucosa 100 mM es de alrededor

le un 70%. En la figura 31b se ilustra otro experimento,

le que se usan concentraciones mayores de urea y en el que

la reacción se inició con la adición de ATP. Se aprecia que

lon urea 2 M y glucosa 100 mM se tiene un 11% de la actividad

le control (Cárdenas et al., 1975; 1979). Si la concentra

lon de urea se eleva a 3 M la actividad no es mayor que un

la Resultados similares han sido obtenidos con glucoquinasa

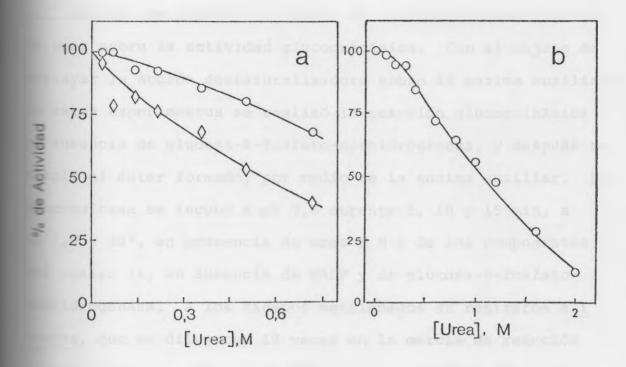


Figura 31. Efecto de la urea sobre la actividad de la glucoquinasa. Se só glucoquinasa en la etapa de purificación de Sephadex G-100 (método 2; esp. 5,1 U/mg de proteína). La actividad se midió a pH 7,5 mediante ensayo la, en presencia de diferentes concentraciones de urea (soluión recién preparada). El sistema se preincubó 3 min antes de iniciar la reacción con la adición de glucosa (a) o de ATP (b).

<sup>%</sup> de actividad de 8,0 mU de glucoquinasa ensayadas con glucosa 2 mM ( $\diamondsuit$ ) con glucosa 100 mM ( $\circlearrowleft$ ).

<sup>🧻 %</sup> de actividad de 6,0 mU de glucoquinasa ensayadas con glucosa 100 mM.

perro (Maccioni, 1975; Maccioni y Babul, 1980).

También se exploró el efecto de concentraciones mayores rea sobre la actividad glucoquinásica. Con el objeto de layar la acción desnaturalizadora sobre la enzima auxiliar, estos experimentos se realizó la reacción glucoquinásica = susencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, y después se el éster formado, por medio de la enzima auxiliar. coquinasa se incubó a pH 7,5 durante 5, 10 y 15 min, a 7,5 y 30°, en presencia de urea 8 M y de los componentes ensayo la, en ausencia de NADP y de glucosa-6-fosfatoidrogenasa. A los tiempos mencionados se retiraron alí tas, que se diluyeron 10 veces en la mezcla de reacción glucoquinasa, glucosa y ATP, pero con NADP y glucosa-6fato-deshidrogenasa, para titular el glucosa-6-P acumula-La actividad fosforilante de glucosa fue cero. En expe mentos de igual diseño en que se usó urea 3 M, la actividad alrededor de un 5% del control, como cuando se registra forma continua la formación del glucosa-6-fosfato. Maccioni tuvo resultados semejantes.

La inhibición por urea parece ser inmediata, dentro de límites del procedimiento de medida de la actividad enzitica; además, parece ser revertida en forma instantánea, al inuir la concentración de urea. Así, la tabla VII muestra resultados de dos experimentos con registro

TABLA VII

Efecto de la adición de urea durante el ensayo<sup>a</sup>

Exp.	Urea M	Actividad nmol/min	Actividad relativa	
1	0	1,71; 1,70	1	
	0,91	0,70; 0,68	0,41	
2	0	1,34	1	
	0,91	0,47; 0,46	0,34	

Después del registro de la actividad de la enzima durante 15 a 16 min, se agregaron 50 µl de urea 10 M (o agua) a los 500 µl iniciales y se continuó el registro durante 20 a 25 min. La glucoquinasa provenía de la etapa de Sephadex (método 2) y la actividad se de
terminó mediante el ensayo la, pH 7,5, con glucosa 2 mM. La activi
dad promedio de los 4 ensayos antes de la adición de urea o agua fue
2,19 nmol/min (intervalo 2,00 - 2,29) en el Exp. 1 y 1,6 nmol/min
(intervalo 1,55 - 1,65) en el Exp. 2.

espectrofotométrico continuo en los que la adición de urea (0,91 M final) al medio de reacción en que está funcionando enzima (sistema completo) provocó en forma inmediata una Enhibición. La magnitud fue semejante a la que se hubiera sotenido en un ensayo como el de la figura 31, en que la urea 🔀 agregó 3 min antes de iniciar la reacción con glucosa o con ATP. La Tabla VIII muestra los resultados de otros dos experimentos en los que la mezcla de reacción con glucoquina 🞫 (450 μl), pero sin glucosa (Exp. 1) o sin glucosa y sin (Exp. 2), se incubó durante tiempos variables en presen-La de urea 1,11 M. Al añadir glucosa (2 mM final) o glucose (2 mM final) más ATP (5 mM final), según el caso, se iniel aumento de la absorbancia después de un pequeño retar 💌, retardo que es igual al de los controles preincubados sin Los valores finales fueron independientes del tiempo preincubación con urea y similares a la fracción de veloci btenida al agregar urea después de iniciada la catálisis tabla VII ), o poco antes de iniciarse (Fig. 31). Este hecho 🔤 ilustra claramente en el experimento 2, en que la actividad relativa con urea fue en promedio el 41% del control efectuado simultáneamente.

Un resultado adicional interesante de estos experimentos
es que la actividad en presencia de urea y de glucosa se manelene constante (curva de progreso lineal) durante un tiempo

TABLA VIII

Efecto de la preincubación de la glucoquinasa con urea por tiempos variables. Estabilidad de la enzima en presencia de urea<sup>a</sup>

			greso <sup>b</sup> min
0	0,52	-	80
15	0,55	-	65
30	0,53	-	50
60	0,51	-	20
0 <sup>C</sup>	1,52	1	20
0	0,64	0,42	32
15	0,54	0,36	20
30	0,68	0,45	16
	15 30 60 0 0	15 0,55 30 0,53 60 0,51  0° 1,52 0 0,64 15 0,54	$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$

La enzima se preincubó a 30° en la mezcla de ensayo sin glucosa (Exp. 1) o sin glucosa y sin ATP (Exp. 2), en presencia de urea 1,11 M o en su ausencia. Después de los tiempos indicados, se iniciaba la reacción con glucosa 2 mM (Exp. 1) o con glucosa 2 mM más ATP 5 mM (Exp. 2). La concentración de urea en el ensayo era de 1,0 M. Se registraba el aumen to de absorbancia durante tiempos variables y prolongados.

Corresponde al tiempo total registrado, y durante el cual la curva de progreso fue lineal.

Control sin urea.

muy prolongado, que en el experimento 1 de la tabla VIII lle ga a 80 min. Este hecho es muy reproducible. En efecto, en los diferentes experimentos realizados con urea presente en el ensayo, se observó estabilidad por tiempos prolongados (20 min), aún a concentraciones pequeñas de glucosa (1 mM) y altas de urea (2 M), a diferencia de lo que ocurrió en los experimentos con tritón, en que había inestabilidad durante el ensayo. Una posible causa de la inestabilidad en presencia de tritón podría ser la baja concentración de DTT usada (0,1 mM), en contraste con la mayor concentración (2,5 mM) usada con urea.

En otro conjunto de experimentos (tabla IX), la preparación enzimática se mezcló con soluciones frescas de urea preparadas en amortiguador Tris 10 mM, pH 7,5, de manera de tener concentraciones finales de urea de 1, 3 u 8 M y se incubó a 30° durante 20 ó 30 minutos. Transcurrido este tiempo se retiraron alícuotas y se midió la actividad con glucosa 100 mM, mediante el ensayo la a pH 7,5. La dilución de la enzima en el medio de ensayo se hizo como para obtener, furante la medida de la actividad, las concentraciones de rea que se indican en la tabla. Es importante destacar que con una concentración de urea de 8 M en el ensayo se tiene, como dijimos anteriormente, una completa inactivación, aún en presencia de glucosa 200 mM. Los valores de actividad de la tabla IX indican claramente la reversibilidad de la

TABLA IX

reversibilidad de la acción de urea sobre la glucoquinasa. Efecto de la preincubación de la glucoquinasa con urea sobre la actividad medida ulteriormente a una concentración menor de urea a

PREINCUBACION		ENSAYO				
Exp.	Tiempo min	Urea M		Urea M	Actividad nmol/min	Actividad relativa
1	20	0		0	4,82	1
	20	1		0,05	4,97	1,03
2	30	0		0	2,68	1
	30	3		0,8	1,51	0,56
3	30	0		0	0,58	1
	30	8		0,8	0,32	0,55

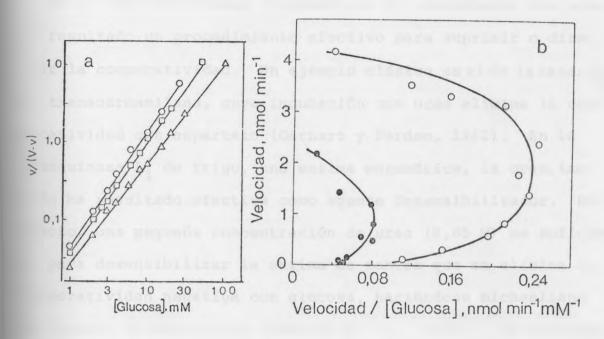
La preincubación de la glucoquinasa se hacía a 30° en amortiguador (tris 10 mM, pH 7,5), o en presencia de urea, preparada en el mismo cortiguador, sin otros componentes que los que aporte la preparación metiguador (método 2; Sephadex). Una alícuota de la mezcla se agregaba medio de ensayo para medir la actividad con glucosa 100 mM (ensayo la, pH 7,5).

acción de la urea, reversibilidad que el registro espectrofotométrico muestra como casi instantánea. La actividad final corresponde, con mucha aproximación, a la esperada de
acuerdo con las concentraciones de urea y de glucosa en el
ensayo. Sobre la base de estos resultados y los de las figuras 31 y 32 se puede concluir que el efecto inhibitorio de
la urea a concentraciones de 1, 3 y 8 M sería completamente
reversible, pues al diluir la urea se llega al efecto correspondiente a la concentración final de la urea obtenida. Por
extrapolación, puede postularse que si se eliminara por completo la urea (por diálisis o filtración en geles, por ejemplo), se debería recuperar la actividad total de la glucoquimasa.

Pilkis (1972) sostiene que la incubación de la glucoquina
sa de rata con urea 1, 2 y 3 M por 5 minutos en ausencia de
clucosa produce 25, 75 y 90% de inactivación, respectivamente.
La presencia de glucosa 1 M impediría esta inactivación, pero
sería efectiva a una concentración de urea de 4 M, en que
la inactivación sería de casi un 100%. Como no da ninguna
cescripción de la forma en que fueron hechos estos experimen
cos, no es posible conocer su significado y compararlos con
los nuestros. Maccioni (1975) también refiere una reversibilidad con urea 8 M.

La inhibición por urea, como ya se señaló, aumenta al dis minuir la concentración de glucosa, lo que indica que, además de afectarse la actividad catalítica, podrían modificarse parámetros cinéticos como K<sub>O 5</sub> y n<sub>H</sub>. Con el objeto de analizar este aspecto, se estudió la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa, en ausencia y en presencia de urea. Se eligieron concentraciones de urea que dieran, con glucosa 100 mM, una pequeña inactivación (alrededor de 10%) o una inactivación considerable (alrededor de 50%). Los gráficos de Hill de la figura 32a muestran un experimento en que se iso urea 0,2 y 1,0 M. Se observa un aumento del  $K_{0.5}$ n valor de 8,6 mM (control) a 10,1 mM con urea 0,2 M y a 15,8 mM con urea 1,0 M. Sin embargo, la cooperatividad permanece constante, pues no se observa un efecto significativo sobre el coeficiente de Hill, el cual conserva valores similares al control.

La inhibición de la actividad es una función de ambos com ponentes del sistema, glucosa y urea, pero, aunque se aumente la concentración de glucosa hasta 200 mM, se observa siempre una menor actividad que depende de la concentración de urea presente. La velocidad máxima, en efecto, es disminuida por la urea, lo que se ilustra en la figura 32b con un experimen diferente del de la figura 32a, donde también se había hecano la misma observación.



Ejura 32. Efecto de la wrea sobre la función de saturación de la glucocuasa con glucosa. Se usó la misma preparación de enzima que en la
sigura 31. La actividad se ensayó a diferentes concentraciones de glucosa
la 200 mM) en ausencia o en presencia de urea, mediante el ensayo la a
7,5.

Gráficos de Hill. La reacción se inició con la adición de ATP.

- Sin urea: V = 12 nmo1/min;  $n_{H} = 1,46$ ;  $K_{0.5} = 8,6 \text{ mM}$
- Urea 0,2 M : V = 10,9 nmol/min;  $n_{H} = 1,44$ ;  $K_{0.5} = 10,1 \text{ mM}$
- Urea 1,0 M: V=7,0 nmol/min;  $n_{\rm H}=1,36$ ;  $K_{0.5}=15,8$  mM Gráficos de Eadie-Hofstee. La reacción se inició con la adición de glucosa.
- Sin urea: V = 4,24 nmol/min;  $n_H = 1,58$ ;  $K_{0.5} = 8,7$
- Urea 1,0 M: V = 2,40 nmol/min;  $n_{\text{H}} = 1,47$ ;  $K_{0.5} = 17,4$

En el caso de enzimas oligoméricas el tratamiento con urea ha resultado un procedimiento efectivo para suprimir o disminuir la cooperatividad. Un ejemplo clásico es el de la asparta to transcarbamilasa, cuya incubación con urea elimina la cooperatividad con aspartato (Gerhart y Pardee, 1962). En la texoquinasa L<sub>I</sub> de trigo, una enzima monomérica, la urea, tamién ha resultado efectiva como agente desensibilizador. En efecto, una pequeña concentración de urea (0,05 M) es suficien te para desensibilizar la enzima de manera que se elimina la cooperatividad negativa con glucosa, haciéndose michaeliana la función de saturación (Meunier et al., 1974). En contrapo sición con nuestras observaciones con glucoquinasa, llama la atención que a esa concentración de urea hay una marcada inac tivación de la hexoquinasa L<sub>I</sub>, que se puede estimar en un 40% de la velocidad máxima en la figura 10 de Meunier et al. (1974).

### = Comentario general

Se estudió el efecto del tritón y de la urea sobre la glu

requinasa, debido a que estos agentes producen un desplegamien

de las cadenas polipeptídicas y, en el caso de estructuras

ligoméricas, una disociación en subunidades. Si la glucoqui

asa existiera en más de una conformación enzimática, esos

sentes podrían inactivarlas diferentemente o desplazar el

equilibrio entre estados conformacionales con propiedades ci fiticas distintas. También cabe la posibilidad de que bajo su acción se indujera una nueva conformación, todavía catalí ticamente activa, pero que no presentara cooperatividad ciné tica con glucosa. De igual manera, la modificación química le algunos residuos de aminoácidos de una enzima, además de poder interferir directamente en la catálisis, puede producir alteraciones conformacionales del sitio catalítico o de regiones alejadas de él, que se traduzcan en efectos simila-Tes a los del tritón y la urea. Asimismo, el calentamiento te una enzima, si bien puede ocasionar una desorganización completa de la molécula, con pérdida total de la actividad satalftica en determinadas condiciones experimentales (nivel temperatura, composición del medio), puede también afectar solo ciertos dominios de la proteína y originar alteraciones conformacionales que lleven a una inactivación parcial, con masecuencias semejantes.

Desde el punto de vista cinético esas alteraciones confor acionales pueden expresarse, como modificaciones de los pará metros cinéticos  $V_{max}$ ,  $K_{0.5}$  y  $n_{H}$  en conjunto o en forma indesendiente.

Si bien algunos de los tratamientos se efectuaron solo an
tes del ensayo o solo durante él, mientras otros se hicieron

ambas condiciones, según se detalló, los resultados entregan

una conclusión general similar. Al someter la glucoquinasa a la acción de tritón, calor, fotooxidación o urea, se producen alteraciones importantes en la actividad enzimática, que implican disminución en la velocidad máxima y aumento del  $\mathbf{K}_{0.5}$ , pero no modificaciones significativas del coeficien te de Hill. Las alteraciones en el  $\mathbf{K}_{0.5}$  señalan que todos los tratamientos, en las condiciones empleadas, además de confucir a una posible inactivación total de una fracción de las coléculas de enzima, que podría ser la causa de la disminución de  $\mathbf{V}_{\mathrm{max}}$ , producen modificaciones en la conformación de moléculas de la glucoquinasaque retienen actividad total o parcial.

Una situación semejante ocurrió también al variar la composición del medio en cuanto a concentración de DTT, pH y fuerza lónica, como se analizó en el capítulo 2.

Los experimentos con agentes desnaturalizadores durante el ansayo presentan, sin embargo, una complicación en su interpretación, pues la inactivación que ocasionan varía en magnitud de acuerdo a la concentración de sustrato presente, debido a la acción estabilizadora de éste. Así, podría ser que la urea el tritón logren desensibilizar a la glucoquinasa, es decir, supriman la condición molecular responsable de la cooperatividad. Sin embargo, como la inactivación es mayor a bajas concentra ciones de glucosa, puede producirse una aparente cooperatividad que enmascare la desensibilización. La constancia del valor del

coeficiente de Hill a pesar de los cambios de la V y del Kos, hace pensar que la urea y el tritón no interfieren en el mecanismo responsable de la cooperatividad en la enzima =ativa. Es decir, no solo se mantiene la cooperatividad sino que además el grado de ella es esencialmente igual al de la enzima nativa, lo que no sería de esperar si la cooperati "idad fuera el resultado de una inactivación diferente a ca-22 concentración de glucosa y a cada concentración del agen-Una manera de poner a prueba esta situación sería buscar na condición en que se tenga una cinética michaeliana y es-Tudiar si en esas condiciones se induce o no la cooperativifad en presencia de urea u otro agente. Por ejemplo, como se rerá en el capítulo 4, a bajas concentraciones de MgATP se logra ra cinética michaeliana con glucosa, de modo que esa sería ana buena condición experimental para estudiar el efecto de rea, que todavía no se ha explorado.

Se puede postular, entonces, que la urea y el tritón, lo sismo que otros agentes y condiciones estudiados (calor, fotoxidación, oxidación de puentes disúlfuros, fuerza iónica, puedan alterar la conformación general de la glucoquina lo que se manifiesta a nivel del sitio catalítico por un simento del  $K_{0.5}$  (excepcionalmente, disminución) y por una sisminución de la  $V_{\rm max}$ . Esta alteración, sin embargo, no

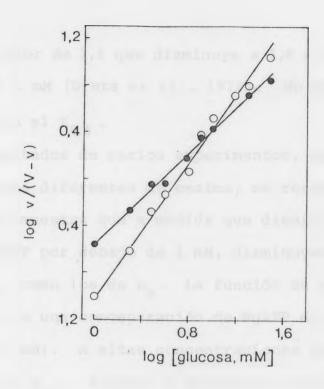
Interferiría en el efecto específico de la glucosa, que poiría consistir en la inducción de un cambio conformacional responsable de la conducta cinética cooperativa, como anali raremos en la Discusión.

La susceptibilidad de los parámetros K<sub>0.5</sub> y V<sub>max</sub> a experimentar cambios frente a variaciones en las condiciones del pedio de reacción en que se ensaya la glucoquinasa o frente pretratamientos de ella, contrasta con la constancia del coeficiente de Hill en las mismas condiciones. Parecería que la conducta cinética cooperativa está muy ligada a la accividad catalítica, de manera tal que en la medida en que la enzima conserva actividad, conserva también la conducta cinética no michaeliana. En otras palabras, la cooperatividad execería estar estrechamente ligada al ciclo catalítico.

# DEPENDENCIA DEL EFECTO COOPERATIVO RESPECTO A LA CONCENTRACION DE MGATP

Puesto que la glucoquinasa aparecía como una proteína mo cmérica (ver más adelante), se decidió explorar si el mecalismo cinético de la enzima pudiera dar cuenta de la sigmoilicidad observada. Ferdinand (1966) había propuesto una exclicación para el fenómeno de cooperatividad en una reacción 3131, basada en el mecanismo cinético de la reacción, que no requería interacción de subunidades (ver Discusión) y en la real el grado de cooperatividad con respecto al sustrato va-Elable dependería de la concentración del sustrato fijo. Pa zeció pues importante pesquisar si el grado de cooperatividad la glucoquinasa con glucosa era dependiente de la concenración de MgATP. Los primeros intentos, en los cuales se ex loró un rango de concentración que iba desde los valores ∞rcanos a la K<sub>m</sub> hasta concentración saturante, mostraron ana aparente independencia del grado de cooperatividad con respecto a la concentración de MgATP. No fue posible en esos experimentos explorar concentraciones más bajas de MgATP por no disponer de una enzima lo suficientemente activa como para estener resultados confiables en los ensayos en que se emplea can las concentraciones menores de glucosa y de MgATP. Sin sbargo, algún tiempo más tarde se repitieron estos experimen tos con preparaciones de mayor actividad específica y se pu-Tieron explorar concentraciones de MgATP tan bajas como 0,1

veces la Km. Se observó que el grado de cooperatividad depen día de la concentración del sustrato nucleotídico. ensayos debieron emplearse diferentes cantidades de glucogui Lasa, por lo cual las velocidades se normalizaban tomando co no referencia la cantidad menor de enzima. Algunos puntos experimentales se determinaban con dos cantidades sucesivas ce enzima y una vez normalizados no diferían entre sí más que los duplicados de rigor. Pudo demostrarse que el grado le cooperatividad dependía de la concentración del sustrato Eucleotídico (Cárdenas et al., 1977; 1979). En los gráficos de Hill de la figura 33 se ilustra un experimento en que Teterminaron los parámetros cinéticos con ATP 5 mM y ATP 2,05 mM. Con la concentración saturante de ATP (5 mM) Talores de  $n_H$  (1,5) y de  $K_{0.5}$  (5,0 mM) fueron los habituales, sero con ATP 0,05 mM disminuyeron, correspondiendo a una fun ción de saturación hiperbólica  $(n_{H} = 1,0)$  con  $K_{0.5}$  igual 3,7 mM. Storer y Cornish-Bowden (1976b) comunicaron también 🖴 descenso del n<sub>H</sub> al disminuir la concentración de ATP, pere no exploraron un intervalo amplio de concentraciones lacktriangledo que no alcanzaron a observar valores de  $n_{_{
m H}}$  de 1,0, si elen los predicen; los autores no mencionan haber observado Tariaciones en el  $K_{0.5}$ . En glucoquinasa de rana aparentemen también disminuye el coeficiente de Hill al disminuir concentración de ATP. Así, a una concentración de 10 mM



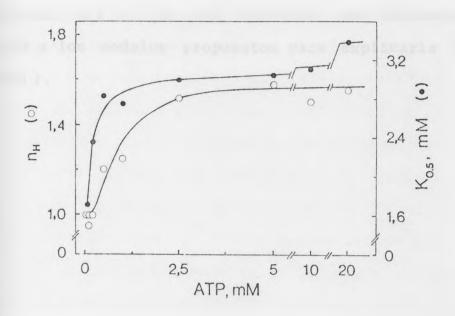
que 33. Gráficos de Hill de la función de saturación pa-💌 glucosa a dos concentraciones de MgATP. La glucoquinasa, Proveniente de la etapa de purificación de sefarosa (metodo act. esp. 25 U/mg de proteína), se ensayó a diferentes con estraciones de glucosa en presencia de ATP 5,0 mM (O) ó 🔍 5 mM ( 👁 ). La actividad enzimática se determinó a pH 8,0 📨 iante el *ensayo la*. La mezcla de reacción difería de la 🐸 itual en la concentración de algunos componentes y conteen un volumen de 0,5 ml: amortiguador Tris-HCl 80 mM, 100 mM; EDTA 0,1 mM, DTT 2,5 mM, NADP 1 mM; glucosa-6-Esstato-deshidrogenasa 0,64 U/ml; MgCl, en concentración de 💀 🖼 en exceso sobre la concentración de ATP; ATP 0,05 ó 5 glucosa 0,5 a 100 mM y glucoquinasa (2 a 15 mU). El sis 📭 a se incubó por 3 minutos antes de iniciar la reacción ᄤ la adición de glucoquinasa. Los parámetros obtenidos Meron:

<sup>(0)</sup> ATP 5,0 mM:  $n_{H} = 1,5$ ;  $K_{0.5} = 5,0$ 

<sup>•</sup> ATP 0,05 mM:  $n_{H} = 1,0$ ;  $K_{0.5} = 3,7$ 

tiene un valor de 2,3 que disminuye a 1,8 a una concentración de ATP de 1 mM (Ureta  $et\ al.$ , 1978). No parece existir efecto sobre el  $K_{0.5}$ .

Los resultados de varios experimentos, usando otras dos reparaciones diferentes de enzima, se resumen en la figura 14, donde se muestra que a medida que disminuye la concentración de MgATP por debajo de 1 mM, disminuyen tanto los valores de K $_{0.5}$  como los de  $n_{_{
m H}}$ . La función de saturación se hace siperbólica a una concentración de MgATP de alrededor de  $^{\circ}$ ,2 K<sub>m</sub> (0,2 mM). A altas concentraciones de MgATP ambos par $\overset{\circ}{a}$ metros,  $n_{\rm H}$  y  $K_{0.5}$ , tienden a permanecer constantes. En más  $\tilde{\epsilon}$ e una oportunidad el  $n_{_{
m H}}$  obtenido a baja concentración de MATP fue menor que 1,0. Esto es interesante porque al simular el modelo III (ver Discusión) ocasionalmente también se Estenían valores de  $n_{_{\mathrm{H}}}$  menores que 1,0. Cabe destacar que conjuntamente con hacerse hiperbólica la función de saturasión, el K<sub>0.5</sub> para glucosa disminuye, es decir, aumenta la Efinidad para glucosa. Con 2-desoxiglucosa, en cambio, el tiene un valor de 1,0 en un amplio rango de concentracioses de MgATP y el K<sub>0.5</sub> aumenta al disminuir la concentración tel sustrato nucleotídico (Niemeyer et al., 1978; Monasterio, 1380). Una situación semejante se observa con fructosa (es-Tesis, 1d). Los resultados concuerdan en general con las proposiciones de Ferdinand, aunque no alcanzó a observarse una



Influencia de la concentración de MgATP sobre los elímetros cinéticos  $K_{0.5}$  y  $n_{\rm H}$ . La glucoquinasa (2,5 a 10 proveniente de la etapa de sefarosa (método 2, act. esp. 1/mg de proteína), se ensayó a diferentes concentraciones elucosa (0,2 a 100 mM) en presencia de ATP, que se varió un rango de concentración de 0,05 a 20 mM como se indica la figura. El sistema se incubó 3 min antes de iniciar la elición con la adición de ATP. Las demás condiciones experitales fueron las descritas en la figura 33. Los parámetros elicos se obtuvieron mediante el programa de mínimos cuadra aplicado a la función directa. De Cárdenas et al., 1979.

inhibición por MgATP como podría esperarse de su modelo. El efecto de la concentración de ATP es de importancia para la interpretación de la cinética cooperativa de la glucoquinasa, por lo que será discutido más adelante, en relación a los modelos propuestos para explicarla (ver Discusión).

## DE ANALOGOS DE GLUCOSA

Se ha descrito que en algunas enzimas oligoméricas con ci tica cooperativa, los análogos del sustrato, capaces de ac Plar como inhibidores competitivos, pueden disminuir la coomeratividad y actuar también como activadores a bajas concen Traciones del sustrato y del inhibidor (Monod et al., 1965). Istos resultados pueden ser explicados mediante los modelos Monod et al. (1965) y de Koshland et al. (1966), así como stre la base de fenómenos de asociación y disociación de sub midades (Frieden, 1967). En una enzima monomérica podría moducirse un fenómeno semejante si la cooperatividad fuera consecuencia de la entrada del sustrato a un sitio alos-Mrico (Frieden, 1964). También si se produjera, inducido el sustrato, un cambio en la proporción de formas enzimá - as con diferente afinidad por el sustrato o con distinta ividad catalítica, haciendo que predomine la forma de la ma con mayor afinidad o con mayor actividad catalitica Minslie et al., 1972; Ricard et al., 1974) (ver Discusion). Cualesquiera fueran la estructura de la glucoquinasa y la mulicación de la cooperatividad con glucosa, pareció intere mete pesquisar si la presencia de los sustratos alternativos a, 2-desoxiglucosa y fructosa, así como del inhibidor etitivo N-acetilglucosamina, era capaz, por una parte,

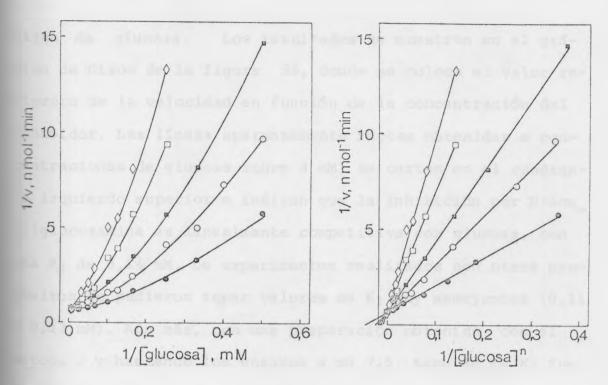
de disminuir el grado de cooperatividad y, por otra, de conducir activación. Se exploró también el efecto de la galactosa, la cual, si bien no inhibe la fosforilación de gluco-sa (Salas et al., 1965), podría servir como control de especificidad.

### ■ Efecto de N-acetilglucosamina

La N-acetilglucosamina había sido descrita como inhibidor competitivo respecto a glucosa en la reacción catalizada por la glucoquinasa (Walker y Rao, 1963; Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1966; González et al., 1967). El gráfico de sobles recíprocos de la figura 35a confirma estos resultatos y muestra el aumento del K<sub>0.5</sub> para glucosa, sin cambio de la V<sub>max</sub>, con concentraciones variables de N-acetilglucosami.

La la figura 35b se linearizaron las curvas, utilizando la abscisa la concentración de glucosa elevada al exponen la abscisa la concentración de glucosa elevada al exponen cuanto al tipo de inhibición, se obtuvieron en otros experimentos realizados a pH 8,0 en vez de 7,5, usando gluco-rinasa de mayor actividad específica y un rango mayor de concentraciones de N-acetilglucosamina (hasta 10 mM).

Para determinar la constante de inhibición  $(K_i)$  y elegir las concentraciones adecuadas del inhibidor en futuros expenentos, se examinaron las velocidades iniciales en función las concentraciones del inhibidor, a varias concentraciones



Eigura 35. Gráficos de dobles recíprocos para la inhibición la glucoquinasa por N-acetilglucosamina. En el gráfico e la derecha (b) se elevaron las concentraciones de glucosa el exponente n<sub>H</sub> correspondiente a cada concentración de N-seetilglucosamina. La actividad fosforilante de glucosa se eterminó a concentraciones variables de este sustrato (la 100 mM) en presencia de diferentes concentraciones fijas del enhibidor N-acetilglucosamina. La glucoquinasa (5 a 15 mU; stodo 1; etapa de Sephadex; act. esp. 1,6 U/mg de proteína) midió a pH 7,5 mediante el ensayo la y la reacción se inició con la adición de glucosa. Los resultados se normalizaran a la actividad de 15 mU de enzima. Los parámetros cinécicos n<sub>H</sub> y K<sub>0.5</sub> se obtuvieron de los gráficos de Hill correspondientes y fueron:

	GlcNAc	K0.5	nH
	m M	Glc, mM	-
(•)	0,00	7,5	1,50
(0)	0,19	11,5	1,44
( 🜃 )	0,38	16,5	1,43
(0)	0,76	2 4	1,42
(♦)	1,52	36	1,41

fijas de glucosa. Los resultados se muestran en el gráfico de Dixon de la figura 36, donde se coloca el valor recíproco de la velocidad en función de la concentración del inhibidor. Las líneas aparentemente rectas obtenidas a concentraciones de glucosa sobre 4 mM, se cortan en el cuadrante izquierdo superior e indican que la inhibición por N-ace\_tilglucosamina es linealmente competitiva con glucosa, con una  $K_i$  de 0,14 mM. De experimentos realizados con otros propósitos se pudieron tener valores de  $K_i$  muy semejantes (0,11 a 0,13 mM). Aun más, con una preparación obtenida con el Metodo 1 y haciendo los ensayos a pH 7,5, también la  $K_i$  fue igual, 0,15 mM. Estos valores son ligeramente inferiores a los descritos anteriormente, 0,38 mM (González et al., 1967) y 0,5 mM (Walker y Rao, 1963; Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1966).

Sin embargo, al realizar los estudios con muy bajas concentraciones de glucosa ( $\leq$  2 mM), los gráficos de Dixon no son lineales, sino curvos, con una concavidad inferior, remedando en cierta forma una inhibición competitiva parcial. Esto puede apreciarse en el recuadro de la figura 36, donde con línea continua se muestra el total de los datos obtenidos con glucosa 2 mM, ilustrado sólo parcialmente en el gráfico principal y, con línea cortada, los datos obtenidos en otro experimento a esa misma concentración de glucosa. La no linearidad en la inhibición por N-acetilglucosamina a baja concentración de glucosa puede apreciarse muy bien en la

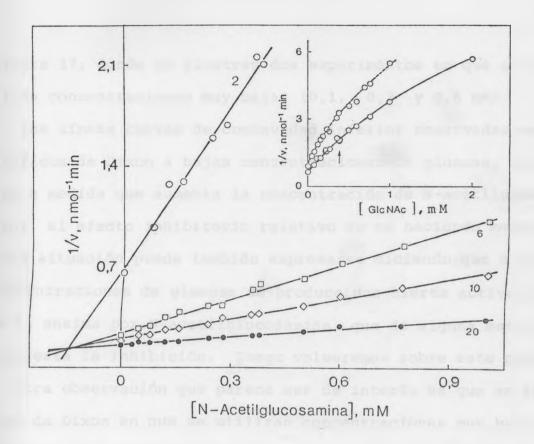


Figura 36. Gráfico de Dixon de la inhibición por N-acetiljucosamina de la glucoquinasa. La actividad fosforilante de glucosa se determinó a distintas concentraciones fijas de este sustrato: 2 (○), 6 (□), 10 (◇) y 20 (⑤) mM, en presencia de concentraciones variables del inhibidor N-acetilglu cosamina, según se indica en la figura. La glucoquinasa (6,5 a 13 mU; método 2; etapa de Sephadex G-100; act. esp. 2,8 U/mg de proteína) se midió a pH 8,0 mediante el ensayo la, y la reacción se inició con la adición de glucosa. Los resultados se normalizaron a la actividad de 6,5 mU de enzima. En el gráfico inserto, con línea continua se muestra el resulta do obtenido con glucosa 2 mM en presencia de concentraciones de N-acetilglucosamina hasta 2 mM, de las cuales en el gráfi co principal aparecen solo hasta 0,38 mM (flecha en el gráfico inserto). Con línea cortada se ilustra otro experimento a glucosa 2 mM, realizado con 4,3 mU de glucoquinasa.

figura 37, donde se ilustran dos experimentos en que se utilizan concentraciones muy bajas (0,1, 0,2 y 0,6 mM).

Las líneas curvas de concavidad inferior observadas en los gráficos de Dixon a bajas concentraciones de glucosa, indican que a medida que aumenta la concentración de N-acetilglucosamina, el efecto inhibitorio relativo se va haciendo menor. Esta situación puede también expresarse diciendo que a bajas concentraciones de glucosa se produce una cierta activación de la enzima por N-acetilglucosamina, que de alguna manera con trarresta la inhibición. Luego volveremos sobre este punto.

Otra observación que parece ser de interés es que en el gráfico de Dixon en que se utilizan concentraciones muy bajas de glucosa, las pendientes de las tangentes trazadas a concentración cero del inhibidor son mucho menores que las esperadas del valor de la constante de inhibición  $K_i$ , calculada ésta con las concentraciones de glucosa habitualmente usadas (alrededor del  $K_{0.5}$ ). Esta situación se ilustra en la figura 37, en la cual se observa que las prolongaciones de las pendientes no se cortan en el cuadrante izquierdo superior, lo que cinéticamente sugeriría la aparición de un componente aparentemente incompetitivo. En otras palabras, la N-acetilglucosamina de bería estar interactuando con más de una forma de enzima, con distintas afinidades y cuya proporción relativa sería de pendiente de la concentración de glucosa. Como discutiremos más adelante, en virtud de nuevos experimentos (ver Discusión),

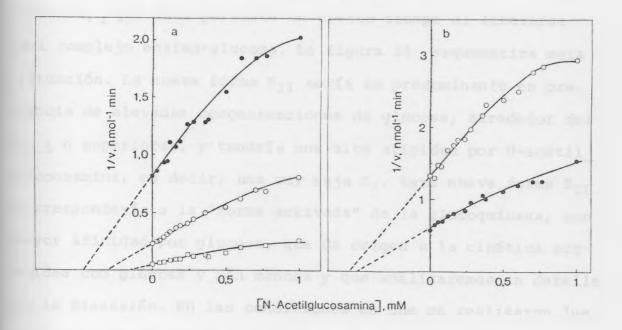


Figura 37. Gráfico de Dixon de la inhibición por N-acetilglu cosamina a bajas concentraciones de glucosa. La glucoquina-sa proveniente de la etapa de purificación de Sephadex G-100 (método 2; act. esp. 2,8 U/mg de proteína) se ensayó a concentraciones fijas de glucosa, en presencia de concentraciones variables de N-acetilglucosamina según se indica en la figura. La actividad fosforilante de glucosa se determinó a pH 8,0 a través del ensayo la.

- a) 25 a 100 mU de glucoquinasa se ensayaron a concentraciones de glucosa de 0,2 ( $\bullet$ ), 0,6 ( $\Theta$ ) y 2 mM ( $\square$ ). Los resultados se normalizaron a la actividad de 100 mU de glucoquinasa.
- b) 130 mU se ensayaron a concentraciones de glucosa de 0,1 ( $\odot$ ) y 0,2 mM ( $\odot$ )

es posible postular que la enzima inicialmente presente (E<sub>I</sub>) genera una nueva forma de enzima (EII) al interactuar con glucosa, y que ésta persiste un cierto tiempo al liberarse del complejo enzima-glucosa. La figura 38 esquematiza esta situación. La nueva forma  $E_{\mathsf{TT}}$  sería la predominante en presencia de elevadas concentraciones de glucosa, alrededor del K<sub>0.5</sub> o superiores, y tendría una alta afinidad por N-acetil glucosamina, es decir, una muy baja  $K_i$ . Esta nueva forma  $E_{\mathsf{TT}}$ correspondería a la "forma activada" de la glucoquinasa, con mayor afinidad por glucosa, que da origen a la cinética sigmoidea con glucosa y con manosa y que analizaremos en detalle en la Discusión. En las condiciones en que se realizaron los experimentos de las figuras 35 y 36, se estaría visualizan do la inhibición competitiva con la forma  $E_{\mathsf{TT}}$ . Mientras menor es la concentración de glucosa, mayor es la proporción de la forma E<sub>I</sub>, que tendría menor afinidad por N-acetilglu\_ cosamina y, por lo tanto, una constante de inhibición  $(K_i)$  ma yor. En las condiciones de los experimentos de la figura 37 coexistirîan  $E_{T}$  y  $E_{II}$ , y se pondrîan de manifiesto tanto  $K_i^!$  como  $K_i$ , lo que hace aparecer la inhibición como de ti po mixto. El aparente componente incompetitivo correspondería a la expresión de  $K_i$  de la forma  $E_I$ .

Otra manera de analizar la interacción entre glucosa y "-acetilglucosamina a bajas concentraciones de glucosa se i-lustra en la figura 39, donde se relaciona el valor del

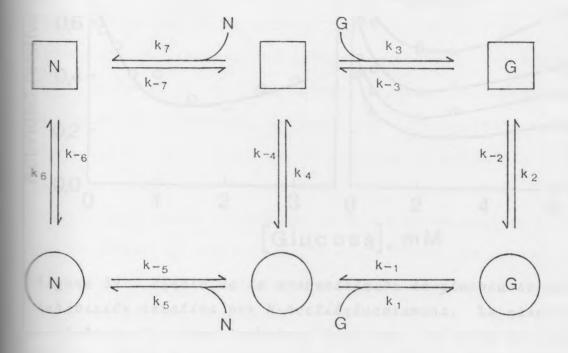


Figura 38. Modelo propuesto para la interacción de la glucoquinasa con elucosa y con N-acetilglucosamina. El círculo (conformación  $E_{\rm I}$ ) representa el estado conformacional predominante de la glucoquinasa en ausencia de ligandos. El cuadrado (conformación  $E_{\rm II}$ ) corresponde al estado inducido por glucosa (G) o N-acetilglucosamina (N).  $K_{\rm i}=k_{-7}/k_7$ ;  $K'_{\rm i}=k_{-5}/k_5$ ;  $K_{\rm T}^{\rm N}=k_6/k_{-6}$ ;  $K_{\rm T}^{\rm G}=k_2/k_{-2}$ ;  $K_{\rm T}=k_4/k_{-4}$ ;  $K_{\rm i}< K'_{\rm i}$  y  $K_{\rm T}^{\rm G}\sim K_{\rm T}^{\rm N}> K_{\rm T}$ .

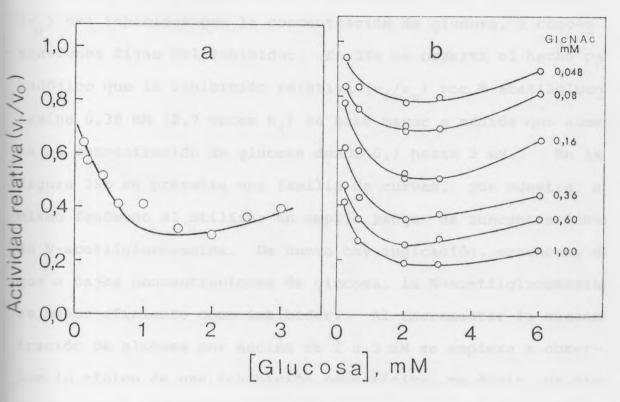


Figura 39. Esecto de la concentración de glucosa sobre la inhibición relativa por N-acetilglucosamina. La glucoquina sa (método 2; etapa Sephadex; act. esp. 2,8 U/mg de proteína) se ensayó a concentraciones variables de glucosa en ausencia ( $\mathbf{v}_{\mathbf{o}}$ ) y en presencia de distintas concentraciones fijas de N-acetilglucosamina ( $\mathbf{v}_{\mathbf{i}}$ ). La actividad fosforilante de glucosa se determinó a pH 8,0 mediante el ensayo la. La reacción se inició mediante la adición de glucosa.

- a) 48 mU de glucoquinasa se ensayaron en presencia de N-ace-tilglucosamina 0,38 mM a las concentraciones de glucosa indicadas en la figura.
- b) La glucoquinasa (10; 12,5; 25 y 100 mU) se ensay $\delta$  a 0,2; 0,6; 2; 3 y 6 mM glucosa, en ausencia ( $v_0$ ) y en presencia de las concentraciones de N-acetilglucosamina indicadas en la figura ( $v_i$ )

cuociente de las velocidades en presencia  $(v_i)$  y en ausencia  $(v_o)$  del inhibidor con la concentración de glucosa, a concentraciones fijas del inhibidor. En 39a se observa el hecho paradójico que la inhibición relativa  $(v_i/v_o)$  por N-acetilgluco samina 0,38 mM (2,7 veces  $\mathbf{K}_i$ ) se hace mayor a medida que aumenta la concentración de glucosa desde 0,1 hasta 2 mM. En la figura 39b se presenta una familia de curvas, que muestra el mismo fenómeno al utilizar un amplio rango de concentraciones de N-acetilglucosamina. De nuevo hay indicación, entonces, de que a bajas concentraciones de glucosa, la N-acetilglucosamina es menos eficiente como inhibidor. Al incrementar la concentración de glucosa por encima de 2 a 3 mM se empieza a observar lo típico de una inhibición competitiva, es decir, va disminuyendo la inhibición por N-acetilglucosamina a cualquiera concentración del análogo.

Los efectos recíprocos de la glucosa y de la N-acetilglucosamina en su interacción con la glucoquinasa pueden
interpretarse como una acción cooperativa de la glucosa,
pues a medida que aumenta su concentración dentro de
ciertos límites, favorece la acción inhibitoria del análogo.
El fenómeno también puede describirse como una inhibición
cooperativa de N-acetilglucosamina cuando la concentración
de glucosa es baja, lo que se ilustra muy bien en la figura
40a. Esta corresponde a dos experimentos realizados a pH
7,5 con una preparación obtenida con el método 1. En presen
cia de glucosa 0,2 mM se observa una meseta, es decir,

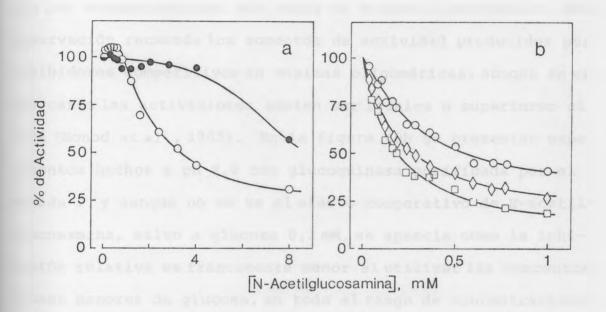


Figura 40. Efecto de la N-acetilglucosamina sobre la activi dad de la glucoquinasa a bajas concentraciones de glucosa.

a) La glucoquinasa (30 mU) proveniente de Sephadex G-100 (método 1, act. esp. 1,6 U/mg de proteína) se ensayó en presencia de diferentes concentraciones de N-acetilglucosamina, a dos concentraciones fijas de glucosa: 0,2 ( ) y 1,0 mM (0). La actividad enzimática se determinó a pH 7,5 mediante el ensayo la. La reacción se inició por la adición de glucosa.

b) Los datos corresponden al experimento descrito en la figura 37a y las concentraciones de glucosa son: 0,2 (0); 0,6 (\( \)) y 2 mM ( ).

prácticamente no hay inhibición hasta una concentración de N-acetilglucosamina de 4 mM (> 25 veces K<sub>i</sub>). En el otro experimento, realizado con glucosa 1 mM, la meseta ha disminuido de tamaño, pero incluso se observa una pequeña activación (10%) con las concentraciones más bajas de N-acetilglucosamina. Esta observación recuerda los aumentos de actividad producidos por inhibidores competitivos en enzimas oligoméricas, aunque en estos casos las activaciones suelen ser iguales o superiores al 100% (Monod et al., 1965). En la figura 40b se presentan experimentos hechos a pH 8,0 con glucoquinasa purificada por el método 2, y aunque no se ve el efecto cooperativo de N-acetilglucosamina, salvo a glucosa 0,2 mM, se aprecia como la inhibición relativa es francamente menor al utilizar las concentraciones menores de glucosa, en todo el rango de concentraciones del inhibidor.

La naturaleza especial de la interacción de N-acetilglucosa mina y glucosa con la enzima, más allá de la competencia por el sitio catalítico, se expresa también mediante otros resultados, que muestran una disminución de la sigmoidicidad de la función de saturación con glucosa al aumentar progresivamente la concentración del análogo. En efecto, en la figura 41 puede observarse que a medida que aumenta la concentración de N-acetilglucosamina, aumenta el  $K_{0.5}$  para glucosa y disminuye la pendiente de los gráficos de Hill. Llega a hacerse hiperbólica la función de saturación ( $n_{\rm H}=1,0$ ) cuando la concentración de N-acetilglucosamina es 10 mM (alrededor de 70 veces  $K_{\rm i}$ ). La figura 42

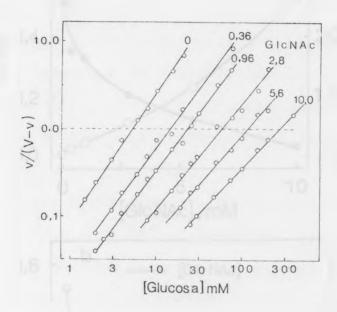


Figura 41. Gráficos de Hill en presencia de distintas concentraciones de N-acetilglucosamina. La actividad fosforilante de glucosa se determinó a concentraciones variables de este sustrato (1 a 400 mM) en presencia de diferentes concentraciones fijas del inhibidor N-acetilglucosamina, según se muestra en la figura. La glucoquinasa, 4 a 8 mU (método 2; etapa Sephadex; act. esp. 4,1 U/mg de proteína) se midió a pH 8,0 mediante el ensayo la. La reacción se inició con la adición de glucosa. Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante el programa de mínimos cuadrados que ajusta la ecuación directa y fueron:

GlcNAc mM	K <sub>0.5</sub> Glc, mM	пн
0	5,2	1,52
0,36	14,5	1,35
0,96	23	1,33
2 , 8	58	1,21
5,6	115	1,13
10.0	268	1,03

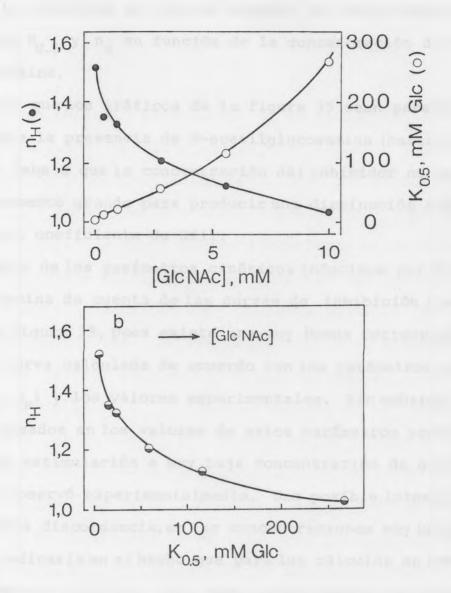


Figura 42. Resumen del efecto de la N-acetilglucosamina sotte los parámetros cinéticos  $K_{0.5}$  y  $n_{\rm H}$ . Se promedió el resultado de dos experimentos, uno de los cuales es el que se mostró en la figura 41, donde se describen las condiciones experimentales usadas (De Cárdenas et al., 1979).

muestra la variación en sentido opuesto que experimentan los parámetros  ${\rm K_{0.5}}$  y  ${\rm n_H}$  en función de la concentración de N-acetilglucosamina.

El hecho que los gráficos de la figura 35 sean parabólicos, no obstante la presencia de N-acetilglucosamina (hasta 10 veces la  $K_i$ ), se debe a que la concentración del inhibidor no es lo suficientemente grande para producir una disminución significativa en el coeficiente de Hill.

El cambio de los parámetros cinéticos inducidos por N-acetilglucosamina da cuenta de las curvas de inhibición ilustradas en la figura 39, pues existe una muy buena correspondencia entre la curva calculada de acuerdo con los parámetros cinéti- $\cos (K_{0.5}, n_H)$  y los valores experimentales. Sin embargo, los cálculos basados en los valores de estos parámetros predecían una franca estimulación a muy baja concentración de glucosa, que no se observó experimentalmente. Una posible interpretación de esta discordancia, en las concentraciones muy bajas de glucosa, radicaría en el hecho que para los cálculos se tomaron los parámetros cinéticos para cada concentración de inhibidor, 🍸 no es segura su validez para las concentraciones muy bajas de glucosa (0,1 a 0,5 mM). En resumen, tanto la cooperatividad de la inhibición como el efecto paradójico observado a las concentraciones bajas de glucosa, podrían ser el resultado de dos efectos opuestos operando en forma simultánea: por una parte, la inhibición competitiva y, por otra, un cierto grado de activación de la enzima.

#### b) Efecto de manosa

La manosa, sustrato alternativo de la glucoquinasa, había sido descrita como inhibidor competitivo respecto a glucosa en la reacción de fosforilación catalizada por glucoquinasa (Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1966; 1967). El gráfico de dobles recíprocos de la figura 43 confirma estos resultados, aunque en nuestros experimentos se observan las curvas de con cavidad superior típicas de la sigmoidicidad de la función de saturación con glucosa. En efecto, a distintas concentraciones fijas de manosa, se observa un aumento del K $_{0.5}$  para glu cosa sin cambio en la  $V_{\text{max}}$ . En el recuadro de la figura 43 se emplea el procedimiento de linearizar las curvas del gráfico de dobles recíprocos, elevando la concentración de glucosa al exponente de Hill, que varía según la concentración de manosa. Es importante hacer notar que a una concentración de manosa de 20 mM, el simple gráfico de dobles recíprocos ya no es parabólico, sino recto y el índice nu, por lo tanto, es 1. Esto indica, como se verá más adelante (Fig. 49), que la manosa, al igual que la N-acetilglucosamina, altera el grado de sigmoidicidad y hace hiperbólica la función de saturación con glucosa.

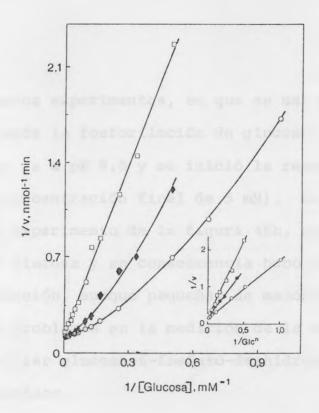


Figura 43. Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de glucoquínasa por manosa. La actividad fosforilante de glucosa se determinó a concentraciones variables de este sus trato (1 a 400 mM), en ausencia y en presencia de dos concentraciones fijas del inhibidor manosa: 6 y 20 mM. La glucoquinasa (7,6 mU; método 2; etapa Sephadex; act. esp. 2,8 U/mg de proteína) se midió a pH 8,0 mediante el ensayo la y la reacción se inició con la adición de ATP (concentración final de 5 mM). En el gráfico inserto se elevaron las concentraciones de glucosa al exponente n<sub>H</sub> correspondiente a cada concentración de manosa. Los parámetros cinéticos obtenidos por el programa de mínimos cuadrados aplicado a la función exponencial fueron:

	Manosa mM	K <sub>0.5</sub> Glc, mM	n <sub>H</sub>
(0)	0	4,9	1,55
(4)	6	9,1	1,33
(0)	20	32,5	0,96

En todos estos experimentos, en que se usa manosa como inhibidor y se mide la fosforilación de glucosa, se usó el sistema de ensayo la a pH 8,0 y se inició la reacción con la adición de ATP (concentración final de 5 mM). La excepción la constituyó el experimento de la figura 48b, que se inició con la adición de glucosa y en consecuencia hubo ciclos catalíticos con acumulación, aunque pequeña, de manosa-6-fosfato y de ADP. No hubo problemas en la medición de la actividad, pues la enzima auxiliar glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa no oxida al manosa-6-fosfato.

Con el objeto de determinar la constante de inhibición  $K_i$ , se midieron las velocidades iniciales de fosforilación de glucosa en función de concentraciones variables del inhibidor, a diferentes concentraciones fijas de glucosa (6, 10 y 20 mM). Se obtuvieron los resultados que se ilustran en el gráfico de Dixon de la figura 44. Al igual que en el caso de la N-acetil glucosamina, a concentraciones relativamente altas de glucosa  $(R_{0.5})$ , se obtuvieron líneas aparentemente rectas que se cortan en el cuadrante izquierdo superior, indicando que la inhibición es competitiva lineal. Se obtuvo un valor de  $K_i$  para manosa de 3,1 mM, que es inferior al de 16 mM, descrito a pH 7,5 para la enzima de conejo (Salas et al., 1965), y al de 14 mM para la enzima de rata (Parry y Walker, 1966).

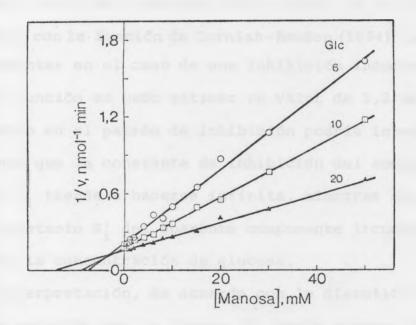


Figura 44. Gráfico de Dixon de la inhibición por manosa de la glucoquinasa. La actividad fosforilante de glucosa se de terminó a distintas concentraciones fijas de este sustrato:

(O), 10 (D) y 20 mM (A), en presencia de concentraciones ariables del inhibidor manosa según se indica en la figura.

La glucoquinasa (10 mU, método 2, act. esp. 2,8 U/mg de proteína) se midió a pH 8,0 mediante el ensayo la. La reacción se inició con la adición de ATP (concentración final de 5 mM).

I = 3,1 mM manosa.

En cambio, a concentraciones bajas de glucosa (< K<sub>0.5</sub>) se observa que, al igual que en la inhibición por N-acetilgluco samina, pero en forma más evidente, se pone de manifiesto un aparente componente incompetitivo. Así, los gráficos de Dixon obtenidos a concentraciones de glucosa de 1 y 2,5 mM son para lelos (Fig. 45). En el recuadro de la figura 45, se ha dibujado un gráfico con la función de Cornish-Bowden (1974), que da rectas intersectantes en el caso de una inhibición incompetitiva. Con esta función se pudo estimar un valor de 5,2 mM para K<sub>1</sub>. Este cambio en el patrón de inhibición podría interpretarse suponiendo que la constante de inhibición del componente competitivo K<sub>1</sub> tiende a hacerse infinita, mientras se hace medible la constante K<sub>1</sub> del aparente componente incompetitivo al sisminuir la concentración de glucosa.

Una interpretación, de acuerdo con lo discutido anteriormente en relación con la figura 38, sería suponer que la mano sa puede unirse a más de una forma de enzima con distintas afinidades. A baja concentración de glucosa tendería a predominar la forma con menor afinidad por manosa y por glucosa  $(E_I)$  (Fig. 46). La unión de cualquiera de ambos azúcares a la enzima  $(E_I)$  induciría un cambio conformacional, originando una enzima con mayor afinidad y, quizás, con una constante catalítica mayor  $(E_{II})$ , como se analizará en la  $(E_{II})$ . El experimento ilustrado en la figura 44 mostraría la

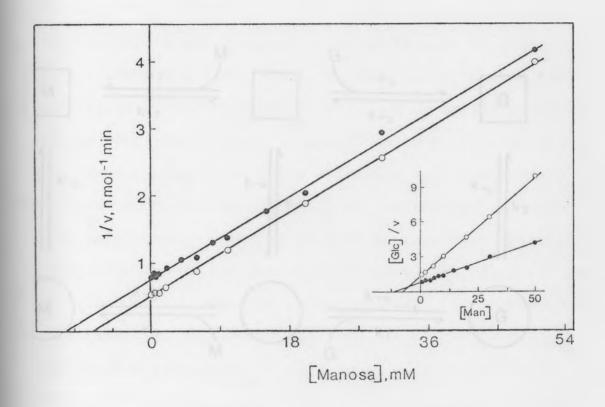


Figura 45. Gráfico de Dixon de la inhibición por manosa de la glucoquinasa a bajas concentraciones de glucosa. Las condiciones experimentales fueron semejantes a las descritas en la figura 44. Se usaron 13 mU de enzima y se determinó la actividad a dos concentraciones de glucosa: 1 (•) y 2,5 mM (O). En el gráfico inserto se muestran los mismos datos en un gráfico de Cornish-Bowden (S/v en función de I). El valor de K; para manosa, obtenido a partir de la intersección de las líneas de regresión correspondientes a las concentraciones de glucosa de 1 y 2,5 mM fue de 5,2 mM.

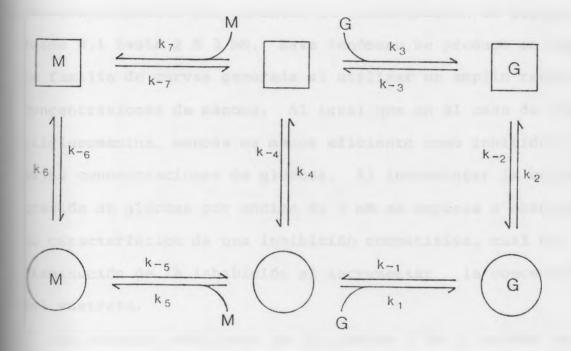


Figura 46. Modelo propuesto para la interacción de la glucoquinasa con flucosa y con manosa. El círculo (conformación  $E_{\rm I}$ ) representa el estado conformacional de la glucoquinasa predominante en ausencia de ligandos . El cuadrado (conformación  $E_{\rm II}$ ) corresponde al estado inducido por glucosa (G) o por manosa (M).  $K_{\rm i} = k_{-7}/k_7$ ;  $K'_{\rm i} = k_{-5}/k_5$ ;  $K_{\rm T} = k_{\rm i}/k_{-4}$ ;  $K_{\rm T}^{\rm G} = k_{\rm i}/k_{-2}$ ;  $K_{\rm T}^{\rm M} = k_{\rm i}/k_{-6}$ . Donde,  $K_{\rm i} < K'_{\rm i}$  y  $K_{\rm T}^{\rm G} \sim K_{\rm T}^{\rm M} > K_{\rm T}$ .

inhibición competitiva con la forma  $\mathbf{E}_{\text{II}}$ .

La merma en la inhibición al decrecer la concentración de glucosa, se ilustra muy bien en la figura 47, donde se ve que la inhibición relativa  $(v_i/v_o)$  por manosa se va haciendo mayor conjuntamente con aumentar la concentración de glucosa desde 0,1 hasta 2 ó 3 mM. Este fenómeno se produce en toda la familia de curvas generada al utilizar un amplio rango de concentraciones de manosa. Al igual que en el caso de N-ace tilglucosamina, manosa es menos eficiente como inhibidor a bajas concentraciones de glucosa. Al incrementar la concentración de glucosa por encima de 3 mM se empieza a observar lo característico de una inhibición competitiva, cual es la disminución de la inhibición al incrementar la concentración del sustrato.

Los efectos recíprocos de la glucosa y de la manosa en sus interacciones con la glucoquinasa pueden interpretarse como una acción cooperativa de la glucosa que, al aumentar su concentración hasta un cierto límite, favorece la acción inhibidora del análogo. Por otra parte, el fenómeno también puede expresarse como una inhibición cooperativa de manosa cuando la concentración de glucosa es baja. Esta situación se ilustra muy bien en la figura 48. En los gráficos de la izquierda (a) se muestra la inhibición relativa en función de la concentración de manosa. Se observa que en presencia de glucosa 0,1 mM existe una meseta,

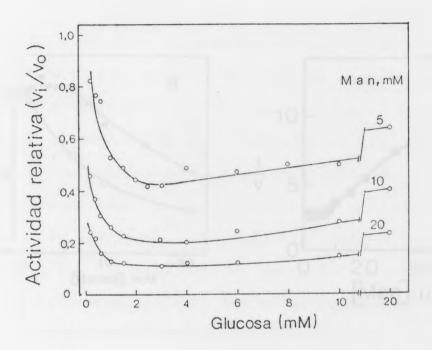


Figura 47. Efecto de la concentración de la glucosa sobre la inhibición relativa por manosa de la glucoquinasa. La glucoquinasa (7 a 28 mU; método 2; Sephadex G-100; act. esp. 2,8 U/mg de proteína) se ensayó a concentraciones variables de glucosa en ausencia  $(v_0)$  y en presencia de distintas concentraciones fijas de manosa  $(v_1)$ . La actividad fosforilante de glucosa se determinó a pH 8,0 mediante el ensayo la. La reacción se inició mediante la adición de ATP (5 mM final). Los puntos son experimentales; las curvas se trazaron de acuerdo a cálculo considerando los parámetros cinéticos a dichas concentraciones de manosa (Fig. 49a).

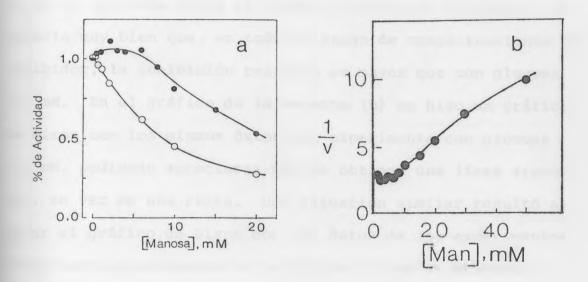


Figura 48. Efecto de manosa sobre la actividad de glucoquinasa a baja concentración de glucosa.

- a) La glucoquinasa (13 a 30 mU; método 2, etapa de Sephadex, act. esp. 2,8 U/mg de proteína) se ensayó en presencia de diferentes concentraciones de manosa, a dos concentraciones fijas de glucosa: 0,1 ( ) y 2,5 mM ( ). La actividad enzimatica se determinó a pH 8,0 mediante el ensayo la. La reacción se inició por la adición de ATP.
- b) Gráfico de Dixon (1/v en función de la concentración de manosa) correspondiente a los datos del experimento con glucosa 0,1 mM descrito en a)

es decir, prácticamente no hay inhibición hasta una concentración de manosa de 6 mM (aproximadamente 2 veces K<sub>i</sub>). En el otro experimento, realizado con glucosa 2,5 mM, aunque no se ve en forma clara el efecto cooperativo de manosa, se aprecia muy bien que, en todo el rango de concentraciones del inhibidor, la inhibición relativa es mayor que con glucosa 0,1 mM. En el gráfico de la derecha (b) se hizo un gráfico de Dixon con los mismos datos del experimento con glucosa 0,1 mM, pudiendo apreciarse que se obtiene una línea sigmoidea, en vez de una recta. Una situación similar resultó al hacer el gráfico de Dixon con los datos de los experimentos con N-acetilglucosamina de la figura 40 (no se muestra).

La interacción entre manosa y glucosa, que va más allá de la simple competencia por el sitio catalítico, se expresa también en los resultados que indican una disminución de la sigmoidicidad de la función de saturación con glucosa en presencia de manosa, como se comentó a propósito de la figura de la figura En efecto, al aumentar progresivamente la concentración del análogo, junto al aumento del K<sub>0.5</sub> disminuye la pendiente de los gráficos de Hill (Cárdenas et al., 1976; 1977, 1979). En la figura 49, en el panel de la izquierda (a) se muestra experimento en que la reacción de fosforilación de la glucosa se comenzaba con la adición del ATP, como era lo habitual al usar la manosa como inhibidor. En este experimento, al

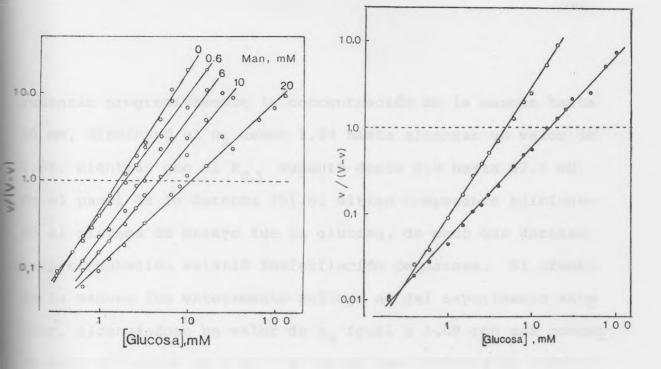


Figura 49. Gráficos de Hill de la función de saturación de la glucoquiusa con glucosa, a diferentes concentraciones de manosa. La actividad fosforilante de glucosa, de la glucoquinasa (método 2; Sephadex G-100; act. esp. 4,1 U/mg de proteína) se determinó mediante el ensayo la, a pH 8,0. La reacción se inició con la adición de ATP.

a) 4 a 8 m U de glucoquinasa se ensayaron a concentraciones variables de glucosa (1 a 400 mM) en presencia de diferentes concentraciones fijas del inhibidor manosa según se muestra en la figura.

Man	<sup>K</sup> 0.5	$^{\mathrm{n}}{_{\mathrm{H}}}$
Mπ	Glc, mM	
0	5,0	1,59
0,6	5,8	1,39
6	9,4	1,36
10	14,4	1,22
20	32,5	1,06

4 a 25 mU de glucoquinasa se ensayaron a concentraciones variables de elucosa (0,2 a 400 mM) en ausencia (0) o en presencia de manosa 6 mM (0).

0) 
$$n_{H} = 1,52; K_{0.5} = 5,0$$

•) 
$$n_{H} = 1,09; K_{0.5} = 16,3$$

aumentar progresivamente la concentración de la manosa hasta 20 mM, disminuy $\delta$  el  $n_{_{\rm H}}$  desde 1,59 hasta alcanzar un valor de 1,06; mientras que el K<sub>0.5</sub> aumentó desde 5,0 hasta 32,5 mM. En el panel de la derecha (b) el último componente adicionado al sistema de ensayo fue la glucosa, de modo que durante la preincubación existió fosforilación de manosa. El efecto de la manosa fue enteramente análogo al del experimento ante rior, alcanzándose un valor de  $n_{_{\rm H}}$  igual a 1,09 con una concen tración de manosa de 6 mM. Al hacer los cálculos de velocidad basandose en los valores de los parametros cinéticos In s y n obtenidos a las distintas concentraciones de manosa, es posible obtener curvas a las que se ajustan bastante bien los valores experimentales de la figura 47. Al igual que en el caso de la N-acetilglucosamina, se predecía un estímulo a muy bajas concentraciones de glucosa que, sin embargo, no se tbservo experimentalmente. Parry y Walker (1967) describen ina cinética anormal con glucosa (curva bifásica en un gráfi co de dobles recíprocos), la cual persiste en presencia de manosa 10 mM y de N-acetilglucosamina 0,2 mM.

Tanto la cooperatividad de la inhibición como el efecto

paradójico observado a las concentraciones bajas de glucosa,

podrían ser el resultado de dos efectos opuestos, operando

simultáneamente: por una parte, la inhibición competitiva y,

por otra, una cierta activación de la enzima. Es decir,

N-acetilglucosamina y manosa, aunque compiten con glucosa por el sitio catalítico de la enzima y, por lo tanto, son inhibidores competitivos, serían al mismo tiempo activadores, debido a la posibilidad de generar una forma enzimática más activa. Si se comparan los efectos de la manosa y de la N-acetil glucosamina, en términos del cuociente  $\begin{bmatrix} \mathbf{I} \end{bmatrix}/K_{\mathbf{i}}$ , puede observarse que la manosa es más eficiente que la N-acetilglucosamica en transformar la conducta cinética de sigmoidea en hiperzólica. En efecto, mientras una concentración de manosa inferior a 10 veces  $K_{\mathbf{i}}$  ya logra suprimir la cooperatividad, en el caso de N-acetilglucosamina se requiere una concentración superior a 40 veces  $K_{\mathbf{i}}$  (Tabla X, pág. 205).

## c) Efecto de 2-desoxiglucosa y fructosa

La 2-desoxiglucosa, además de ser sustrato de la glucoqui nasa, actúa como inhibidor competitivo respecto a glucosa en la reacción de fosforilación de este azúcar (Walker y Rao, 1963; Parry y Walker, 1966). El gráfico de dobles recíprocos de la figura 50a confirma estos resultados, aunque, como era de esperar, se tienen líneas parabólicas en vez de rectas. Puede observarse que en presencia de 2-desoxiglucosa 40 mM (alrededor de 2 veces  $K_{\rm m}$ ) se obtiene la misma velocidad máxima para glucosa, con aumento del  $K_{0.5}$ . El coeficiente de Hill, sin embargo, disminuye de 1,7 a 1,3 (ver más adelante).

La fructosa, debido a su baja afinidad por glucoquinasa (alta  $\rm K_m$ ), ha sido poco estudiada. Se la había descrito como inhibidor competitivo respecto a glucosa con un  $\rm K_i$  de 300 mM (Parry y Walker, 1966). El gráfico de dobles recíprocos de la figura 50b confirma estos resultados y muestra, además, que mientras el control sin fructosa es una curva parabólica, el experimento en presencia de fructosa 300 mM es una recta, lo que indica una disminución del coeficiente de Hill a un valor de 1,0. Luego se volverá sobre este punto. Con el fin de de terminar la constante de inhibición  $\rm K_i$ , se estudió la variación de la velocidad de fosforilación de glucosa en función de la concentración de fructosa, a distintas concentraciones

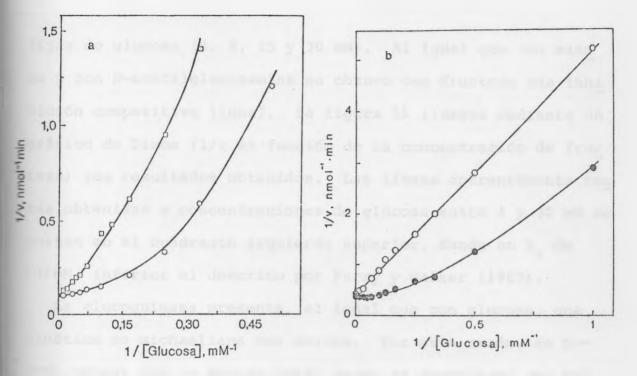


Figura 50. Gráfico de dobles recíprocos para la inhibición de la fosforilación de glucosa, por 2-desoxiglucosa y por fructosa. La actividad fosforilante de glucosa, de la glucoquinasa se determinó a pH 8,0 mediante el ensayo la. La reacción se inició por la adición de ATP.

a) 4 a 10 mU de glucoquinasa (método 2; Sephadex G-100; act. esp. 4,8 U/mg de proteína) se ensayaron a concentraciones variables de glucosa (1 a 400 mM) en ausencia ( ) o en presencia ( ) de 2-desoxiglucosa 40 mM.

(0) 
$$K_{0.5} = 5,7$$
;  $n_{H} = 1,71$   
(1)  $K_{0.5} = 21,3$ ;  $n_{H} = 1,3$ 

b) 3 a 6 mU de glucoquinasa (método 2; act. esp. 5,0 U/mg de proteína) se ensayaron a concentraciones variables de glucosa (1 a 200 mM) en ausencia ( ● ) o en presencia de fructosa 300 mM ( ○ ).

( • ) 
$$K_{0.5} = 3.6$$
  $n_{H} = 1.56$   
( 0 )  $K_{0.5} = 13.6$   $n_{H} = 1.0$ 

fijas de glucosa (4, 8, 15 y 30 mM). Al igual que con mano sa y con N-acetilglucosamina se obtuvo con fructosa una inhibición competitiva lineal. La figura 51 ilustra mediante un gráfico de Dixon (1/v en función de la concentración de fructosa) los resultados obtenidos. Las líneas aparentemente rectas obtenidas a concentraciones de glucosa entre 4 y 30 mM se cortan en el cuadrante izquierdo superior, dando un K, de 107 mM, inferior al descrito por Parry y Walker (1967).

La glucoquinasa presenta, al igual que con glucosa, una cinética no michaeliana con manosa. Por esta razón, se poiría pensar que la manosa sería capaz de reemplazar con mutha efectividad a la glucosa, ya sea entrando en un segundo
sitio (sitio alostérico) o induciendo un cambio conformaciotal que persistiera después de la disociación del complejo.

A diferencia de lo que ocurre con manosa, la glucoquinasa
presenta una cinética michaeliana con 2-desoxiglucosa y con
fructosa. Por esta razón se podría pensar que estos últimos
azácares no pueden entrar a un sitio alostérico, si es que
este existe, o inducir un cambio conformacional en la enzima.
Cabría esperar, por tanto, que en contraposición a lo que
courre con manosa y con N-acetilglucosamina, aquellas no fue
capaces de modificar el tipo de conducta cinética con

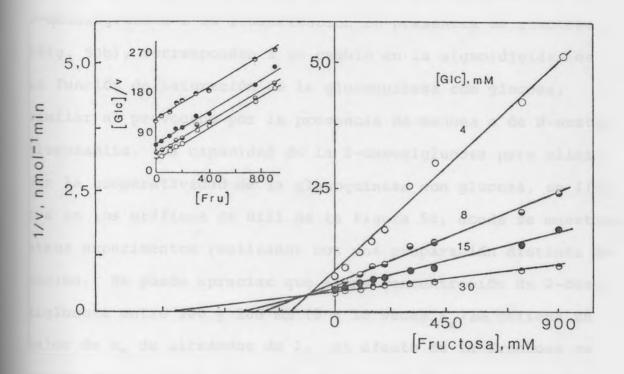


Figura 51. Gráfico de Dixon de la inhibición de la fosforilación de glucosa por fructosa. La actividad fosforilante de glucosa se determinó a distintas concentraciones fijas de este sustrato, 4 (  $\circ$  ), 8 (  $\circ$  ); 15 (  $\circ$  ) y 30 mM (  $\circ$  ) en presencia de concentraciones variables del inhibidor fructosa (40 a 900), según se indica en la figura. La glucoquinasa (3 mU; método 2; Sephadex G-100; act. esp. 4,8 U/mg de proteína) se idió a pH 8,0 mediante el ensayo la. La reacción se inició con la adición de ATP. El valor de  $\kappa_i$  para fructosa, obtenido a partir de la intersección de las líneas de regresión correspondientes a las diferentes concentraciones de glucosa fue de 107 mM. El recuadro muestra el gráfico de Cornish-Bowden (Glc/v en función de fructosa) a las cuatro concentraciones de glucosa usadas.

glucosa. Sin embargo, la disminución de la curvatura en el gráfico de dobles recíprocos (Fig. 50a) por la presencia de 2-desoxiglucosa o la linearización en presencia de fructosa (Fig. 50b), corresponden a un cambio en la sigmoidicidad de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa, similar al provocado por la presencia de manosa o de N-acetil glucosamina. La capacidad de la 2-desoxiglucosa para eliminar la cooperatividad de la glucoquinasa con glucosa, se ilus tra en los gráficos de Hill de la figura 52, donde se muestran otros experimentos realizados con una preparación distinta de enzima. Se puede apreciar que a una concentración de 2-desoxiglucosa entre 100 y 200 mM (5 a 10 veces  $K_m$ ) se obtiene un valor de  $n_{
m H}^{}$  de alrededor de 1. El efecto de la fructosa se resume en la figura 53, donde se observa la disminución del coeficiente de Hill hasta un valor de 1,0, con un aumento del K<sub>0.5</sub> para glucosa, al incrementar la concentración del inhibi dor.

Los experimentos con 2-desoxiglucosa y con fructosa presentaron una complicación debido a que la glucosa-6-fosfato-desidrogenasa, tanto de levadura como hígado de rata, es capaz de oxidar al 2-desoxiglucosa-6-fosfato y al fructosa-6-fosfato, aunque con baja actividad. La investigación bibliográfica mostró que la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa de variadas fuentes, aunque exhibe una alta especificidad de sustrato,

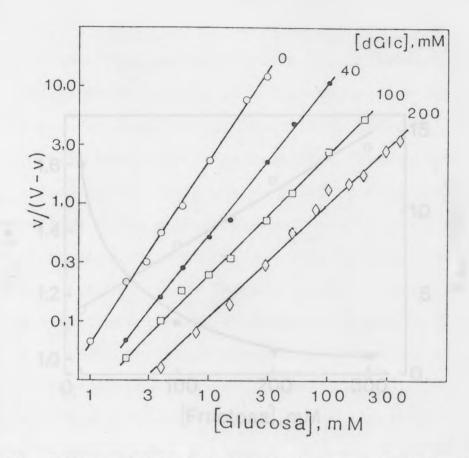


Figura 52. Gráficos de Hill de la función de saturación de la glucoquimasa con glucosa, a diferentes concentraciones de 2-desoxiglucosa. La actividad fosforilante de glucosa se determinó a concentraciones variables de este sustrato (1 a 600 mM) en presencia de diferentes concentraciones fijas del inhibidor 2-desoxiglucosa, 40 mM (•); 100 mM (□) y 200 mM (◊). Control sin 2-desoxiglucosa (○). La glucoquinasa (8 mU; método 2; Sefarosa; act. esp. 31 U/mg de proteína) se midió a pH 8,0 mediante el ensayo la. La reacción se inició con la adición de ATP.

	dG1c	K <sub>0.5</sub>	n <sub>H</sub>	
	Мп	Glc, mM		
(0)	0	5,9	1,6	
(●)	40	16	1,3	
(□)	100	39	1,1	
( 🔷 )	200	98	1,0	

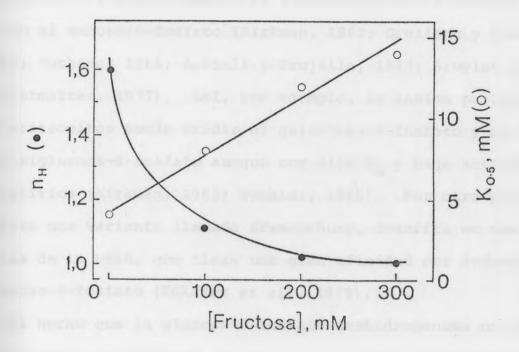


Figura 53. Efecto de la fructosa sobre los parámetros cinéticos  $K_{0.5}$  y  $M_{\rm H}$ , de la función de saturación con glucosa. La glucoquinasa (4 mU; Sephadex G-150; act. esp. 3,3 U/mg de proteína), se ensayó a diferentes concentraciones de glucosa (1 a 200 mM) en presencia de diferentes concentraciones de fructosa como se indica en la figura. Las demás condiciones experimentales fueron las descritas en la figura 50b. Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante el programa de mínimos cuadrados que ajusta la función directa (Materiales y Métodos, pág. 48).

ésta no es absoluta, oxidando en algunos casos al galactosa-6-fosfato y a veces también al 2-desoxiglucosa-6-fosfato, pero no al manosa-6-fosfato (Kirkman, 1962; Greiling y Kisters, 1965; Yoshida, 1966; Anstall y Trujillo, 1967; Broyles y Strittmatter, 1977). Así, por ejemplo, la enzima purificada de eritrocitos puede oxidar al galactosa-6-fosfato y al 2-desoxiglucosa-6-fosfato aunque con alta K, y baja actividad catalítica (Kirkman, 1962; Yoshida, 1966). Por otra parte, existe una variante llamada Kremenchung, descrita en una failia de la USSR, que tiene una gran afinidad por 2-desoxi-slucosa-6-fosfato (Tokarev et al., 1978).

El hecho que la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa no presente una especificidad absoluta, trae como consecuencia que a bajas concentraciones de glucosa, en que normalmente se registra la curva de progreso por un período de tiempo largo, la 16 min, con el objeto de detectar cualquiera inactivación de la enzima, se observe que la curva de progreso pierde linearidad, produciéndose una aceleración. Esta aceleración sería la consecuencia de la oxidación del 2-desoxiglucosa-6-fosfato y del fructosa-6-fosfato, que se van acumulando turante el ensayo. Si se mide la fosforilación de 2-desoxiglucosa o de fructosa, en ausencia de glucosa y en las condiciones habituales del ensayo la, la curva de progreso muestra ma fase retardada, con una velocidad inicial igual a cero.

Como se comentó en el capítulo sobre ensayos con enzimas auxiliares, este fenómeno de retardo en alcanzar el régimen estacionario debe interpretarse como la consecuencia de una escasez de enzima auxiliar, derivada en este caso de la alta K<sub>m</sub> y baja actividad catalítica de la glucosa-6-fosfato-deshidro genasa con los ésteres fosfóricos de la 2-desoxiglucosa y de la manosa. Por ejemplo, con 2-desoxiglucosa 40 mM, en un experimento en que había 7,4 mU de glucoquinasa por cubeta, se podía tener una actividad de 0,08 mU si se trazaba una recta entre 0 y 6 min de incubación y de 0,20 mU, si la recta se trazaba entre 18 y 24 min.

La contribución de los ésteres fosfóricos de los sustratos usados como inhibidores, es insignificante a altas concentraciones de glucosa, sobre todo si se toman en cuenta para las determinaciones de la velocidad solo los primeros 10 min de la curva de progreso. Sin embargo, a bajas concentraciones de glucosa y a altas concentraciones de los inhibidores el error puede ser considerable, especialmente si no se está muy atento a la curva de progreso, que debe ser registrada desde el momento en que se inicia la fosforilación de glucosa. Los blancos sin glucosa dan una cierta corrección, especialmente si se toman en un período inicial e igual al de la medida de la fosforilación de glucosa que se desea corregir. No es posible, sin embargo, tener blancos perfectos en los experimentos en que

se estudia la interacción de la glucosa con estos sustratos alternativos de la glucoquinasa. Los blancos sin glucosa, restados en cada ocasión, corresponden a valores máximos, pues con toda seguridad son menores en presencia de glucosa y depen dientes de la concentración de este azúcar, ya que la glucosa va a actuar como inhibidor competitivo de la 2-desoxiglucosa y de la fructosa y, por ende, la producción de los ésteres fos fóricos de estos azúcares debiera ser menor. Más aún, va a existir también competencia por la enzima auxiliar entre el glucosa-6-fosfato y los ésteres fosfóricos de los inhibidores. Luego, la presencia de 2-desoxiglucosa o de fructosa, por efec to de la corrección con blancos sobredimensionados, podría hacer menores los valores de la actividad fosforilante de glu cosa, especialmente a bajas concentraciones de este sustrato y a altas concentraciones de los inhibidores. En los experimentos de las figuras 50, 52 y 53 se emplean concentraciones relativamente altas de inhibidor, especialmente en el caso de 2-desoxiglucosa, pero al incrementar las concentraciones tel inhibidor deben elevarse también las concentraciones de la glucosa, lo que disminuye el error, pero no lo elimina to talmente. La existencia del error podría significar un sumento de la cooperatividad, el que no sería legítimo. resar de esta posibilidad, se observa una franca disminución de la cooperatividad en presencia de los inhibidores, lo que

hace pensar que las observaciones son válidas. Es decir, la supresión de la cooperatividad por efecto de la presencia de fructosa o de 2-desoxiglucosa, no sería atribuible a un error derivado de la oxidación de los ésteres fosfóricos de estos azúcares. No obstante, el error metodológico hace difícil realizar estudios finos con concentraciones muy bajas de glu cosa, que serían deseables con el fin de poder establecer com paraciones con los efectos de la manosa, cuyo éster fosfórico no es oxidado por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa. Traba jando a bajas concentraciones relativas de fructosa (alrededor  $\mbox{del } K_{\mbox{\scriptsize m}}$  o menores) y con concentraciones relativamente altas de glucosa (alrededor del  $K_{0.5}$  o superiores) se pudo tener una medida confiable de la  $K_i$  (Fig. 51). No se hicieron estudios de este tipo con 2-desoxiglucosa, por lo cual no se determinó la  $K_i$ . Con ninguno de estos sustratos alternativos pudieron hacerse estudios fidedignos de inhibición a muy bajas concentraciones de glucosa, similares a los efectuados con manosa. Esta clase de experimentos requeriría otra metódica, como la medición directa del glucosa-6-fosfato formado. Podría usarse el método radiactivo descrito por Radojković et al. (1978) para pesquisar si existe cooperatividad en la inhibición por 2-desoxiglucosa y por fructosa.

#### d) Efecto de galactosa

Con el fin de determinar cuan específica era la acción de los análogos de glucosa, sobre la función de saturación para este sustrato, se estudió el efecto de la galactosa. Se había descrito que este azúcar no era sustrato (Salas et al., 1965; Parry y Walker, 1966; González et al., 1967) ni inhibidor de la glucoquinasa (Salas et al., 1965; Grossman et al., 1974), aunque Parry y Walker (1966) refieren un valor de Kide 83 mM, lo que en cualquier, caso lo convertiría en un mal inhibidor.

Si la eliminación de la cooperatividad de la glucoquinasa por acción de los análogos de glucosa no fuera específica, sino que se debiera, por ejemplo, a la concentración de polialcoholes presentes en el medio de reacción, la galactosa podría resultar efectiva en alterar la cooperatividad, aunque no se uniera a la enzima o lo hiciera con muy baja afinidad. La figura 54 muestra los resultados obtenidos al estudiar la función de saturación para glucosa en presencia de una alta concentración de galactosa (320 mM). No se ven alterados significativamente los parámetros  $V_{\rm max}$ ,  $K_{0.5}$  ni  $n_{\rm H}$  a pesar de la gran concentración de galactosa usada, lo que confirma el hecho que la galactosa no es inhibidor. Más aún, al explorar el efecto de galactosa a bajas concentraciones de glucosa, en un rango entre 0,1 y 1,0 mM, tampoco se observó inhibición.

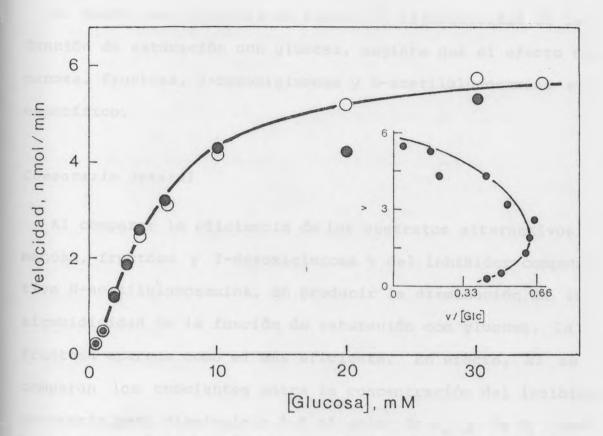


Figura 54. Efecto de la galactosa sobre la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa. La actividad fosforilante de glucosa de la glucoquinasa (5,9 mU; método 2; Sephadex G-100) se determinó a concentraciones variables de este sustrato (0,6 a 100 mM), en ausencia (0) o en presencia de galactosa 320 mM (•). Se usó el ensayo la, a pH 8,0 y la reacción se inició con la adición de ATP. El gráfico inserto corresponde a la función de Eadie-Hofstee aplicada a los datos obtenidos en presencia de galactosa.

(0) 
$$K_{0.5} = 4.9;$$
  $n_{H} = 1.51$ 

(•) 
$$K_{0.5} = 5.0; n_{H} = 1.46$$

El hecho que galactosa no altere la sigmoidicidad de la función de saturación con glucosa, sugiere que el efecto de manosa, fructosa, 2-desoxiglucosa y N-acetilglucosamina es específico.

#### Comentario general

Al comparar la eficiencia de los sustratos alternativos manosa, fructosa y 2-desoxiglucosa y del inhibidor competitivo N-acetilglucosamina, en producir la disminución de la sigmoidicidad de la función de saturación con glucosa, la fructosa aparece como el más eficiente. En efecto, si se comparan los cuocientes entre la concentración del inhibidor necesaria para disminuir a 1,0 el valor de n y la K, respectiva , el cuociente para fructosa es el menor de todos (Tabla X). El análisis de la tabla X es interesante, además, porque muestra otra indicación de que existe especificidad en la disminución del coeficiente de Hill. No basta para la disminución solo la concentración del polialcohol en el medio, pues mientras se requiere una concentración de 10 a 20 mM de N-acetilglucosamina y de manosa para obtener un  $n_{tt}$  de 1,0, se necesita una concentración de un órden de magnitud superior en el caso de 2-desoxiglucosa y de fructosa. Más aún, la galactosa, que no es sustrato ni inhibidor de la

TABLA X

Eficiencia relativa de los análogos de glucosa para suprimir la cooperatividad cinética de la glucoquinasa con glucosa

Análogo	[A] <sup>a</sup>	K <sub>i</sub> <sup>b</sup> mM	K <sub>m</sub> b	[A]/K <sub>i</sub>	[A]/K <sub>m</sub>
Fructosa	200-300	107	325	2 - 3	≃ 1
Manosa	20	3,1	8	6 - 7	2 - 3
2-Desoxiglucosa	200	C	22	-	10
N-Acetilglucosamina	10	0,14	-	71	<b>G</b> -A-

 $<sup>^</sup>a\mathrm{Corresponde}$  a la concentración de análogo en presencia de la cual se alcanza un valor de n $_\mathrm{H}$  de 1,0. Se trata de una concentración aproximada.

 $<sup>^</sup>b$ K, es la constante de inhibición competitiva obtenida a partir del gráfico de Dixon, al usar el análogo como inhibidor competitivo respecto a glucosa.  $^K$ M es la constante de semisaturación obtenida al usar el análogo como sustrato de la glucoquinasa.  $^N$ -acetilglucosamina no es sustrato.

 $<sup>^{</sup>C}$ No se determinó.

glucoquinasa (Salas et al., 1965; Grossman et al., 1974), como se confirma en la figura 54, tampoco produce disminución de la sigmoidicidad hasta una concentración de 320 mM (Fig. 54).

# 6. EFECTO DE ADP Y DE GLUCOSA-6-FOSFATO SOBRE LA COOPERATIVIDAD CINETICA CON GLUCOSA

Entre los metabolitos que podrían alterar la conducta cinética de una enzima están los productos de la reacción. Si el mecanismo cinético lo permite, ellos pueden unirse a la enzima en el sitio catalítico e inducir cambios conformacionales que van a alterar el régimen estacionario de conformaciones existentes en el curso de la reacción. Por otra parte, podrían unirse a un sitio alostérico, y actuar como modificadores positivos o negativos, según el caso. Por ejemplo, en  $hexoquinasa L_{T}$  de trigo, en la cual se ha descrito un mecanis mo cinético en secuencia ordenada, donde el último producto sería glucosa-6-P, la presencia de éste en el medio de ensayo acrecienta el grado de cooperatividad negativa con glucosa (Meunier et al., 1974). Recientemente, estudios de salto de temperatura han mostrado que el glucosa-6-P es capaz de alterar el equilibrio conformacional de la hexoquinasa  $\mathbf{L}_{\mathrm{I}}$  (Buc et al., 1977; Meunier et al., 1979).

En el caso de hexoquinasa A de rata, el glucosa-6-P actúa como efector negativo. Se ha postulado que esta acción inhibidora es consecuencia de la unión a un sitio específico de la enzima, diferente del sitio catalítico (Crane y Sols, 1954; Sols y Crane, 1954) y sobre cuya existencia se han dado

pruebas recientemente (Lazo et al., 1980). La unión induciría un cambio conformacional en la enzima (Wilson, 1978; 1979).

En piruvato-quinasa L, el ATP, producto de la reacción, es un modulador negativo, el cual aumenta el  $K_{0.5}$  para fosfoenolpiruvato y el grado de sigmoidicidad para la función de satura ción con este sustrato (Rozengurt et al., 1969).

Pareció, pues, importante estudiar el efecto que sobre la función de saturación con glucosa, pudieran tener los productos de la reacción catalizada por la glucoquinasa.

### a) Efecto del glucosa-6-fosfato

Se había descrito que la glucoquinasa de hígado de rata era menos sensible a la inhibición por glucosa-6-P que otras hexoquinasas animales (Viñuela et al., 1963; Parry y Walker, 1966; González et al., 1967). Asimismo, la glucoquinasa de conejo, a una concentración de glucosa de 5 mM y de ATP de 1 mM, no era apreciablemente inhibida por glucosa-6-P hasta una concentración de 10 mM (Salas et al., 1965).

Posiblemente, debido a la complejidad derivada del carácter sigmoideo de la función de saturación con glucosa - propiedad no conocida en los primeros trabajos -, la inhibición por glucosa-6-P con respecto a glucosa descrita por los diferentes

autores, ha sido de variada naturaleza (Tabla XI). Así, cuan do se varía la concentración de glucosa, y se mantiene fijo el ATP a una concentración alta (saturante), se ha obtenido una inhibición competitiva, no competitiva o compleja según se define en la tabla. Más aún, las complicaciones derivadas de la presencia del glucosa-6-P en el medio de ensayo (ver más adelante), dificultan la interpretación y la comparación de los resultados de los distintos trabajos. En este laboratorio, González et al. (1967) habían hecho una observación interesante que nos sugirió que el glucosa-6-P pudiera disminuir el grado de sigmoidicidad de la función de saturación con glucosa. efecto, al hacer estudios de inhibición usando preparaciones frescas de enzima, encontraron que aumentaba la inhibición por glucosa-6-P al incrementar la concentración de glucosa. hemos visto a propósito del efecto de otros metabolitos, la menor inhibición a concentraciones bajas de glucosa podría ser el resultado de dos fenómenos contrapuestos: estimulación e inhibición.

Como etapa previa al estudio del efecto sobre la función de saturación con glucosa, se determinó la inhibición de diferentes concentraciones de glucosa-6-P sobre la fosforilación de glucosa. La figura 55 muestra los resultados obtenidos al variar la concentración de glucosa-6-P desde 2 hasta 80 mM y mantener fija la concentración de glucosa (6 mM) y de ATP

TABLA XI
Inhibición por glucosa-6-fosfato de la fosforilación de glucosa por la glucoquinasa<sup>a</sup>

Glucosa-6-P	Glucosa mM	ATP <sup>b</sup>	Razón Mg:ATP	рН	Tipo de inhibición	K'i mM	K!	Referencia
≼ 10	5	1	2	7,0	no hay in- hibición	nd	nd	Salas et <i>al.</i> , 1965
22,5; 45	100	0,25-5	1	7,5	compleja <sup>c</sup>	nd	nd	Parry y Walker, 1966
22,5; 45	10-100	5	2	7,5	competitiva	65		Parry y Walker, 1966
10-50	16,7	1-5	2,5	7,5	competitiva	15		González et al., 1967
50	7,1; 17; ∞ <sup>d</sup>	5	2,5	7,5	compleja o no competi- tiva <sup>e</sup>	nď	nd	González et al., 1967
5-25	50	0,344-8,8	< 1	8,0	competitiva	11,5		Storer y Cornish- Bowden, 1977
13-70	5-50	4,3	< 1	8,0	mixta	60	60	Storer y Cornish- Bowden, 1977

- El rango de concentraciones del sustrato variable fue estimado en la mayoría de los casos a partir de gráficos de dobles recíprocos o de Dixon, por lo que puede no corresponder con exactitud al rango preciso estudiado.
- La concentración de ATP corresponde a la concentración total, salvo en el trabajo de Storer y Cornish-Bowden (1977), en que es la concentración calculada del complejo MgATP.
- El tipo de inhibición es similar al debido a MgADP (Tabla XIII)
- d Corresponde al valor extrapolado en un gráfico de Lineweaver-Burk.
- Al usar preparaciones frescas de enzima se obtuvo una mayor inhibición a las concentraciones mayores de glucosa. Al dejar una de esas preparaciones en el refrigerador a 4° por 4 meses, se obtuvo una inhibición aparentemente no competitiva pura.

nd: no se determinó

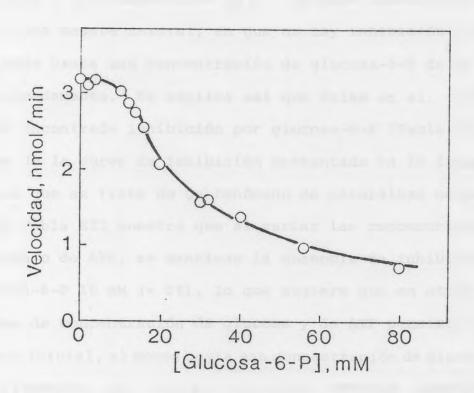


Figura 55. Efecto del glucosa-6-fosfato sobre la actividad de la gluco-quinasa. La glucoquinasa (7 mU; método 2; Sephadex G-100; Act. esp. 2,6 U/mg de proteína) se ensayó en presencia de diferentes concentra-ciones de glucosa-6-fosfato (2 a 80 mM) a una concentración de glucosa de 6 mM. La actividad enzimática se determinó a pH 7,5 mediante el en-sayo 2, en presencia de ATP lmM y de una concentración de Mg<sup>2+</sup> de 2 mM. Las soluciones de glucosa-6-fosfato se neutralizaron con carbonato de potasio, antes de ser usadas.

(1 mM). Las concentraciones de ambos sustratos se eligieron en torno a los respectivos  $K_{0.5}$ . En esas condiciones se observa una meseta inicial, en que no hay inhibición y que se extiende hasta una concentración de glucosa-6-P de 10 mM aproximadamente. Se explica así que Salas et al. (1965) no hayan encontrado inhibición por glucosa-6-P (Tabla XI). La forma de la curva de inhibición presentada en la figura 54, indica que se trata de un fenómeno de naturaleza cooperativa.

La Tabla XII muestra que al variar las concentraciones de glucosa o de ATP, se mantiene la ausencia de inhibición por glucosa-6-P 10 mM (< 5%), lo que sugiere que en otras condiciones de concentración de glucosa y de ATP persistiría la meseta inicial, al menos hasta esa concentración de glucosa-6-P. Efectivamente, así ocurrió al hacer estudios semejantes a los de la figura 55 en presencia de ATP 0,5 mM o 2 mM (no se muestra). Al tratar de analizar estos resultados mediante los gráficos de Dixon o de Cornish-Bowden para establecer el tipo de inhibición respecto a ATP y, tratar de de terminar constantes de inhibición, se encontró una situación compleja, pues la inhibición no correspondía al tipo competi tivo respecto a ATP, que ha sido descrito por algunos autores (Tabla XI) en experimentos que usan concentraciones rela tivamente altas de glucosa (> 16 mM). En efecto, en un gráfico de Dixon se obtenía una respuestabifásicay alextrapolar

TABLA XII

Efecto no inhibidor del glucosa-6-P 10 mM sobre la actividad de la glucoquinasa<sup>a</sup>

Glucosa mM	ATP mM	Actividad relativa <sup>b</sup> $(v_{i}/v_{o})$
•114.4	111.1	'i'o'
2	1	0,96
6	1	0,97
1	5	1,06
2	5 -	1,07
6	5	1,02
100	5	1,18

La actividad enzimática se determinó a pH 8,0 mediante el ensayo 2 con ATP 1 ó 5 mM.

 $v_{\dot{\chi}}$  es la velocidad en presencia de glucosa-6-P y  $v_{o}$  es la velocidad en ausencia. Se promediaron los resultados de dos experimentos.

los valores correspondientes a las altas concentraciones de glucosa-6-P (donde hay inhibición) se obtenía una velocidad mayor que la existente en ausencia de glucosa-6-P. Dadas las dificultadas comentadas más adelante, no se trató de di lucidar este punto. Por otra parte, en estudios de inhibición por glucosa-6-P, realizados a bajas concentraciones de glucosa (< 2 mM) también ser observaron mesetas iniciales, en las cuales no había inhibición, encontrándose a veces ligera activación.

La inhibición por glucosa-6-P parece ser cooperativa, lo que difiere de los resultados de Storer y Cornish-Bowden (1977), quienes encuentran una inhibición competitiva lineal respecto a ATP ( $K_i$  = 11,5) en presencia de glucosa 50 mM y, mixta lineal respecto a glucosa (5 a 50 mM) en presencia de ATP 4,3 mM (Tabla XI). En cambio nuestros resultados no dan inhibiciones simples ni respecto a ATP ni respecto a glucosa. La diferencia se deba probablemente a que nuestros estudios fueron realizados a bajas concentraciones de glucosa (<  $K_{0.5}$ ).

Los resultados del estudio de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa en presencia de diferentes concentraciones de glucosa-6-P se muestran en la figura 56a. La concavidad de los gráficos de Eadie-Hofstee indica que la presencia del glucosa-6-P no suprime la cooperatividad. Se aprecia también que se produce una marcada disminución de la  $V_{\rm max}$ 

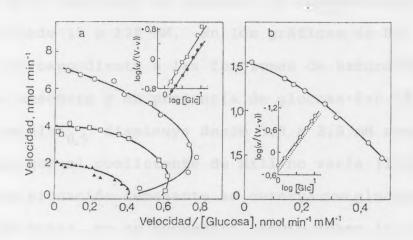


Figura 56. Gráficos de Eadie-Hofstee de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa en presencia de glucosa-6-fosfato. La actividad fosforilante de glucosa de la glucoquinasa (método 2; Sephadex G-100) se determinó a pH 8,0 mediante el ensayo 2. Las figuras insertas muestran gráficos de Hill. Las soluciones de glucosa-6-fosfato se neutralizaron con carbonato de potasio antes de ser usadas.

a) La glucoquinasa se ensayó a diferentes concentraciones de glucosa (1 a 200 mM) en ausencia (♠) y en presencia de glucosa-6-P 15 (○); 89(□) y 178 mM (♠). Se usó una concentración de ATP de 5 mM y una de Mg<sup>2+</sup> de 12mM.

(•) Sin Glc-6-P:  $V = 7,3 \text{ nmol/min}; K_{0.5} = 5,9 \text{ mM}; n_{H} = 1,51$ 

(O) Glc-6-P 15 mM: V = 7,2 nmol/min;  $K_{0.5} = 5,2 \text{ mM}$ ;  $n_{H} = 1,54$ 

( $\square$ ) Glc-6-P 89 mM:  $V = 4,0 \text{ nmol/min}; K_{0.5} = 3,5 \text{ mM}; n_H = 1,59$ 

( $\triangle$ ) Glc-6-P 178 mM: V = 2,0 nmol/min; K<sub>0.5</sub> = 2,9 mM; n<sub>H</sub> = 1,44

b) La glucoquinasa se ensayó a diferentes concentraciones de glucosa (0,6) a 100 mM) en ausencia (---) o en presencia de glucosa-6-P 35 mM (0). Se usó una concentración de ATP de 0,5 mM y una de Mg<sup>2+</sup> de 1,5 mM.

desde 7,2 a 2,0 nmol/min al aumentar la concentración del inhibidor desde 15 a 178 mM. En los gráficos de Hill del recuadro correspondiente a las funciones de saturación obtenidas en ausencia y en presencia de glucosa-6-P 89 mM, se observa que el K<sub>0.5</sub> disminuye desde 5,9 a 3,5 mM respectivamente, pero que el coeficiente de Hill no varía (1,51 y 1,59). Una situación semejante se observa con glucosa-6-P 178 mM. Es decir, no se encuentra efecto sobre la cooperatividad ni a concentraciones bajas de glucosa-6-P (15 mM) donde no hay inhibición, ni a concentraciones altas (178 mM) donde la inhibición es marcada (Fig. 56a).

Debido a que el glucosa-6-P había sido descrito como inhibidor competitivo respecto a ATP, se decidió estudiar el efecto del glucosa-6-P sobre la función de saturación con glucosa en presencia de baja concentración de ATP 0,5 mM.

El gráfico de Eadie-Hofstee de la figura 56b ilustra la función de saturación en presencia de glucosa-6-P 35 mM. La ligera concavidad obtenida, indica que persiste la cooperatividad.

En los gráficos de Hill del recuadro se aprecia que el grado de cooperatividad en presencia y en ausencia de glucosa-6-P, es semejante. El valor del coeficiente de Hill, 1,35 para el control y 1,38 para la función en presencia de glucosa-6-P, es algo menor que lo habitual, debido a la baja concentración

de ATP usada (ver capítulo 4). Se observó también una disminución en el  $K_{0.5}$  desde 2,3 a 2,0 mM en presencia del inhibidor; este efecto aunque pequeño ilustra una tendencia general. El control se ilustró en el recuadro de la figura 56b sólo mediante línea de puntos para que se pudiera visualizar con claridad, pues dada la similitud en los parámetros, tendía a haber sobreposición de los puntos de ambas rectas.

Estos resultados, que señalan claramente que el glucosa-6-P no afecta la cooperatividad, concuerdan, en general, con los descritos por Storer y Cornish-Bowden (1977).

Aunque no se observó efecto de glucosa-6-P sobre la cooperatividad, a alta ni a baja concentración de ATP, se encontró que el porcentaje de inhibición aumentaba al aumentar la concentración de glucosa, es decir lo mismo que habían descrito González et al. (1967). Storer y Cornish-Bowden, no hacen referencia a este hecho ni al efecto de glucosa-6-P sobre el  $K_{0.5}$ .

Los experimentos con glucosa-6-P presentan sin embargo, al gunas complicaciones que es necesario tener en cuenta y que pueden dificultar la interpretación de los resultados. En primer término, dado que se usa la sal de potasio y que la concentración que debe usarse del ester fosfórico es relativamente alta, debido a que la constante de inhibición es elevada, cabe hacer la pregunta si la inhibición se debe al glucosa-6-P

o al K presente, pues como se mostró en el capítulo 2, este ión junto con disminuir V , disminuye el K . Los cál culos indican que el efecto inhibidor de glucosa-6-P sobre la V no puede explicarse solamente por la acción del K+, pero la presencia de este podría introducir variaciones en el tipo de inhibición. Otro problema es que el glucosa-6-P puede sufrir hidrólisis espontánea a pH 8,0, que, aunque len ta puede ser significativa; esto se traduciría en un aporte de glucosa al sistema, lo cual es especialmente grave a bajas concentraciones de glucosa. En nuestros experimentos pa rece no existir este problema, pues los blancos sin glucosa obtenidos en ausencia y en presencia de glucosa-6-P fueron iguales, a todas las concentraciones de glucosa-6-P ensayadas. Un tercer problema, más grave porque no parece tener solución simple, se refiere a las concentraciones de MgATP, ATP y Mg<sup>2+</sup>. En efecto, el glucosa-6-P a altas concentracio nes interfiere en el control de la concentración de MgATP me diante el uso de un exceso de MgCl2, debido a que el glucosa--6-P también secuestra Mg<sup>2+</sup>. Por esta razón parecería aconsejable controlar la concentración de MgATP usando una concentración de ATP de 1 mM en exceso sobre la concentración de MgCl<sub>2</sub> como recomiendan Storer y Cornish-Bowden (1977). Esta solución no es perfecta, sin embargo, porque permite la existencia de ATP libre que es inhibidor de la glucoquinasa,

competitivo con respecto al MgATP, y con una constante de in hibición (K<sub>i</sub>) de 2,4 mM (Storer y Cornish-Bowden, 1977). Aun que el Mg<sup>2+</sup> es también inhibidor, su K<sub>i</sub> es algo mayor (7 mM). Por otra parte, en los experimentos con glucosa-6-P se usa el ensayo 2, con piruvato-quinasa. El usar ATP en exceso so bre la concentración de Mg<sup>2+</sup>, introduce complicaciones, porque por una parte, la piruvato-quinasa requiere Mg<sup>2+</sup> (Mac Farlane y Ainsworth, 1972) y por otra, es inhibida por ATP. Para contrarrestar estos efectos, si se desea mantener este en sayo, es necesario aumentar considerablemente las concentraciones de las enzimas auxiliares, lo que a su vez puede traer problemas debido a actividades secundarias de ellas o a posibles contaminaciones. Todas estas dificultades vuelven muy problemáticos los estudios con glucosa-6-P, tanto en su realización como en la interpretación de los resultados.

## b) Efecto del MgADP

El análisis de los estudios de inhibición por ADP, realizados por los diferentes autores y resumidos en la Tabla XIII indica que no se trata de una inhibición simple, ni respecto a ATP ni respecto a glucosa. Así, cuando el ATP es variable y la glucosa fija, a una concentración que puede considerarse saturante, el ADP puede dar una inhibición competitiva, mixta

TABLA XIII

Inhibición por ADP de la fosforilación de glucosa por la glucoquinasa²

ADP <sup>b</sup>	Glucosa	ATP <sup>b</sup>	Razón	pН	Tipo de inhibición	K.	K!	Referencia	
mM	mM	mM	Mg:ATP			mM	•		
5	50	0,25-10	2	7,0	Compleja <sup>C</sup>	nd	nd	Salas et al., 1965	
5	5-50	1	2	7,0	Mixta	nd	nd	Salas et al., 1965	
2;4	100	0,2- 5	1	7,5	Competitiva	2		Parry y Walker, 1966	
2;4	10-100	5	1	7,5	Competitiva	2		Parry y Walker, 1966	
2;4	100	0,25- 5	> 1 <sup>d</sup>	7,5	Compleja <sup>C</sup>	0,9	2	Parry y Walker, 1966	
3	7-100	5	> 1 <sup>d</sup>	7,5	No competitiva	2	2	Parry y Walker, 1966	
0,5-8,5 <sup>d</sup>	50	0,09-8,8	> 1	8,0	Mixta <sup>e</sup>	2,3	>20	Storer y Cornish- Bowden, 1977	
f	variable <sup>f</sup>	4,4	> 1	8,0	Mixta	8-10	8-10	Storer y Cornish- Bowden, 1977	

- El rango de concentraciones del sustrato variable fue estimado en la mayoría de los casos a partir de gráficos de dobles recíprocos o de Dixon, por lo que puede no corresponder con exactitud al rango preciso estudiado por los autores.
- Las concentraciones de ATP y de ADP corresponden a las concentraciones totales usadas, salvo en el trabajo de Storer y Cornish-Bowden (1977) en que son las concentraciones calculadas de los complejos MgATP, y MgADP respectivamente, sobre la base de las constantes de disociación de los complejos al pH del ensayo.
- Se obtienen dos rectas (curva bifásica), tales que la extrapolación de los puntos correspondientes a las concentraciones altas de MgATP da una inhibición competitiva y la correspondiente a las concentraciones bajas de ATP una inhibición mixta con intersección en el cuadrante izquierdo inferior, pero cerca del eje (análisis de los datos de la figura 9 en Parry y Walker, 1966) o en el cuadrante izquierdo superior (figura 7 A en Salas et al., 1965). En ambos casos se trata de gráficos de dobles recíprocos.
- La concentración de Mg<sup>2+</sup> es igual a la suma de las concentraciones de ATP y ADP.
- <sup>e</sup>Gráficos primarios curvos. Los valores de K, y K; corresponden a extrapo laciones de la conducta a baja concentración de ADP en un gráfico de Dixon.

nd: no se determinó.

f<sub>No</sub> se dan datos

o compleja, según se define en la tabla. Diversos factores varían en los trabajos analizados, siendo los más obvios el pH (7,0 - 7,5 - 8,0) y la razón Mg:ATP. Ambos determinan las concentraciones efectivas de los complejos MgATP y MgADP, así como las concentraciones de nucleótidos libres y de Mg²+. Como ya se ha comentado, el ATP libre y el Mg²+ son inhibidores por sí mismos. Todas estas circunstancias dan un buen grado de complejidad a la interpretación y comparación de los resultados, a las que se agrega el que el ADP (o MgADP) podría interactuar en la enzima no solo en su propio sitio, sino también en el sitio del ATP. Podría asimismo formar com plejos ternarios, no-productivos con la enzima y la glucosa (Storer y Cornish-Bowden, 1977).

Se decidió explorar el efecto del ADP sobre la función de saturación con glucosa a una concentración baja de ATP (0,5 mM), pues en estas condiciones, aunque el valor de n<sub>H</sub> es algo menor que a las concentraciones habituales de ensayo (5 mM), cualquiera disminución del ATP por debajo de esa concentración, produce una gran disminución del coeficiente de Hill (Fig. 34). Debido a que la inhibición por ADP presenta un componente com petitivo respecto a ATP (Tabla XIII), su presencia provocaría una disminución en la concentración efectiva de ATP y podría esperarse una disminución del coeficiente de Hill.

Para controlar las concentraciones de MgATP y de MgADP presentes en el medio de reacción, se usó una concentración de Mg<sup>2+</sup> de 5 mM en exceso sobre la suma de nucleótidos y un pH de 8,0, de modo que hubiera un claro predominio de los nucleótidos ligados al metal (88 a 90% de ATP y 76 a 82% de ADP) (Storer y Cornish-Bowden, 1976a).

La figura 57 muestra los resultados obtenidos con MgADP a una concentración de 5 mM, la que fue efectiva en suprimir la cooperatividad, como puede apreciarse en los gráficos de Hill presentados. Con otras concentraciones de ADP, 1, 2,5 y 3 se obtuvieron valores de n, de 1,3, 1,23 y 1,15 respec tivamente. Conjuntamente con la disminución del coeficiente de Hill se produce un decremento en el K para glucosa, al aumentar la concentración de MgADP. Los resultados obtenidos concuerdan en general con los de Storer y Cornish-Bowden (1977), aunque ellos no hacen referencia al efecto sobre el  $K_{0.5}$ . Aunque no se trató de dilucidar el problema del tipo cinético de inhibición, se concluyó que el MgADP inhibe la reacción glucoquinásica, siendo mayor su efecto a las mayores concentraciones de glucosa y disminuyendo hasta hacerse nulo (o incluso activante) a las concentraciones menores de glucosa (Tabla XIV). Este hecho se observa con las distintas concentraciones de MgADP usadas, tanto al compararlas con el control sin MgADP, como entre varias concentraciones de MgADP. Storer y Cornish-Bowden no hacen referencia a la

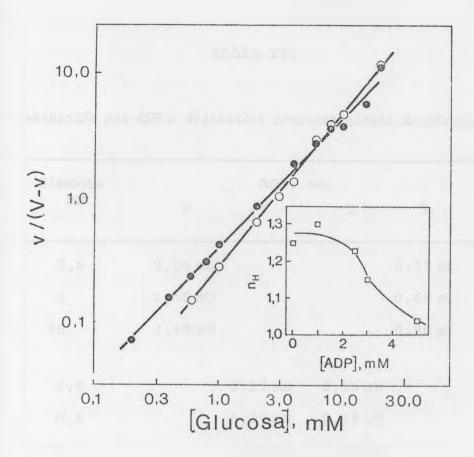


Figura 57. Gráficos de Hill de la función de saturación con glucosa en ausencia y en presencia de ADP. La glucoquinasa ( método 2; act. esp. 31 U/mg de proteína) se ensayó a pH 8,0 mediante el ensayo la a concentraciones variables de glucosa (0,2 a 100 mM), en ausencia (O) o en presencia de ADP 5 mM ( $\bullet$ ) Se usó una concentración de ATP de 0,5 mM y una concentración de MgCl<sub>2</sub> 5 mM en exceso sobre la suma de las concentraciones de ATP y de ADP. El gráfico inserto muestra el efecto de ADP sobre  $n_{\rm H}$  en experimentos con el mismo diseño experimental y diferentes concentraciones de ADP.

TABLA XIV

Inhibición por ADP a diferentes concentraciones de glucosa<sup>a</sup>

Exp.	Glucosa mM	0	ADP,	mM 3	5	Actividad Relativa <sup>k</sup>
	0,6	0,36 mU			0,37 mU	1,03
I	4	1,56 mU			0,68 mU	0,44
	20	2,49 mU			0,90 mU	0,36
	0,4		0,17 mU	0,16 mU		0,94
II	0,6		0,29 mU	0,24 mU		0,83
	20		1,59 mU	0,95 mU		0,60

En estos experimentos se hicieron ensayos paralelos a las concentraciones de ADP indicadas.

 $v_i$  corresponde a la actividad determinada con la menor concentración de ADP y  $v_i$  a la actividad en presencia de la concentración mayor de ADP.

a la existencia de un fenómeno de esta naturaleza, y no muestran ningún experimento del cual se pueda obtener información al respecto. Nuestros resultados sugieren que el MgADP mostraría una inhibición de tipo mixto respecto a glucosa. Estudios de inhibición por ADP de la fosforilación de 2-desoxiglucosa (Monasterio, 1980) indican tambien una inhibición mixta, respecto al sustrato glucídico, pero en este caso el Kospara 2-desoxiglucosa aumenta al incrementarse la concentración del MgADP. Por otra parte, la inhibición por ADP respecto a ATP como sustrato variable es no competitiva pura, en contraposición a las observaciones con glucosa que indican un fuerte componente competitivo (Tabla XIII).

La menor inhibición a bajas concentraciones de glucosa puede interpretarse como debida a la disminución de la cooperatividad y del K<sub>0.5</sub> lo cual produciría una activación que a bajas concentraciones de glucosa podría contrarrestar en gran parte el efecto inhibidor del MgADP. Se trataría de un efecto parecido al del K<sup>+</sup> y del Na<sup>+</sup>, aunque debido a las bajas concentraciones de ADP empleadas es insignificante la contribución en cationes, y por tanto el efecto no podría atribuir se a la presencia de éstos.

El efecto del MgADP podría interpretarse considerando que como consecuencia de la presencia de éste, habría una disminución en la concentración del complejo E.MgATP, lo que significaría un predominio de la vía de reacción que se inicia con el complejo E.Glc, de acuerdo con lo que analizaremos en la Discusión.

# 7. MANTENCION DE LA ESTRUCTURA MONOMERICA DE LA GLUCOQUINASA EN LAS CONDICIONES DE REACCION

Los resultados de diversos investigadores indican que la glucoquinasa es una proteína monomérica bajo condiciones nativas y desnaturalizadoras (Grossman et al., 1974; Maccioni, 1975; Holroyde et al., 1976). Sin embargo, la gran mayoría de las enzimas con cinética sigmoidea son proteínas oligomé ricas (ver Discusión). Antes de postular un modelo compatible con la conducta cinética observada, era necesario considerar la posibilidad de que la glucoquinasa se polimerizara bajo las condiciones de ensayo, formando especies moleculares en las cuales pudieran ocurrir interacciones entre los sitios activos, o que presentaran parámetros cinéticos dife rentes del monómero. En este último caso, el desplazamiento del equilibrio entre las distintas formas por acción del sus trato podría originar desviaciones de la conducta cinética clásica y dar lugar a la aparición de curvas de saturación sigmoideas (Frieden, 1967). Es conocido que la presencia tan to de sustratos, productos y análogos, como de modificadores alostéricos, puede afectar en las enzimas considerablemente el grado de asociación de las cadenas peptídicas y sus inte racciones (Klotz et al., 1970; Frieden, 1971; Levitzki y Koshland, 1972). Un ejemplo muy relacionado con nuestra

enzima es el de las hexoquinasas de cerebro y de corazón, las que se encuentran en forma de monómero y de dímero, en equilibrio reversible, que es desplazado hacia el dímero por la presencia de glucosa-6-P, que es un modificador negativo (Chakrabarti y Kenkare, 1974; Easterby, 1975). Por otra parte, la hexoquinasa P<sub>II</sub> de levadura existe en gran parte como monómero durante el ensayo, aunque es aislada en forma de dímero (Shill et al., 1974; Shill y Neet, 1975).

Pensando en la posibilidad de una oligomerización, se examinó, por filtración en gel, el peso molecular aparente de la glucoquinasa en condiciones similares a las que operan durante el ensayo de la reacción. Los resultados que se ilustran a continuación, mostraron que en las diferentes con diciones experimentales usadas, la glucoquinasa eluía como un pico de actividad único y simétrico, correspondiente a una proteína del mismo peso molecular que la enzima monomérica (Cárdenas et al., 1978).

a) Efecto de los sustratos sobre la filtración de la glucoquinasa

El efecto de la presencia de los sustratos sobre los per files de elución de la glucoquinasa durante la cromatografía por filtración en gel de Sephadex G-200 se estudió a dos tem peraturas, 30 y 4°, como se señaló en Materiales y Métodos. La figura 58 ilustra algunos resultados típicos obtenidos en

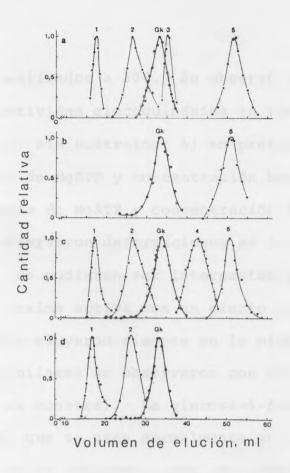


Figura 58. Perfiles típicos de elución de la glucoquinasa en presencia de los sustratos. La enzima provenía de una preparación en la etapa de purificación de Sephadex ( método 2) y su actividad específica era de 5,1 U/mg de proteína. La columna de Sephadex G-200 (1,2 x 48 cm) era equilibrada a 30 con amortiguador B enriquecido con los siguientes metabolitos: a) ninguno; b) ATP 5 mM; c) ATP 5 mM más glucosa 1 mM; d) ATP 5 mM más glucosa 100 mM. Las cifras en el máximo de cada pico de elución corresponden a: 1, azul dextrano; 2, alcohol-deshidrogenasa de levadura; 3, ovoalbumina; 4, mioglobina y 5, [14c]-leucina. . En las fracciones con glucoquinasa, los valores de actividad máxima, expresados en miliunidades/ml, eran los siguientes: a) 15,2; b) 9,0; c) 14,2; d)18,3. En todos los experimentos se mezcló la glucoquinasa (0,18 unidades) con [14C]-leucina y a menudo con alcohol-deshidrogenasa. Los otros marcadores (azul-dextrano, mioglobina y ovoalbumina) se filtraban separadamente o junto con | 14C | leucina. Detalles de esta columna:  $V_0 = 17 \text{ ml}$ ;  $V_i = 50,7 \text{ ml}$ . Otros pormenores se describen en Materiales y Metodos. De Cárdenas et al., 1978.

experimentos realizados a 30°. Se observo un pico único y simétrico de actividad glucoquinásica en todas las condicio nes probadas: a) sin sustratos; b) en presencia de MqATP; c) en presencia de MgATP y concentración baja de glucosa; y d) en presencia de MgATP y concentración saturante de glu cosa. No se observaron deformaciones en la rama izquierda de los picos, que pudieran ser interpretadas como pequeñas cantidades de enzima activa con un cierto grado de agregación. Los picos eluyeron siempre en la misma posición. Perfiles muy similares se observaron con otra columna traba jada a 4° (no se muestra). La glucosa-6-fosfato-deshidroge nasa y el NADP, que se usan normalmente en el ensayo de la glucoquinasa, no se probaron, pues la sigmoidicidad de función de saturación con glucosa se observa también cuando se mide la actividad enzimática por aislamiento de glucosa-6-P, en ausencia de la enzima auxiliar y de NADP (Niemeyer et al., 1975), así como también cuando se usa el otro sistema de medición de actividad (ensayo 2) (ver figura 5).

En la tabla XV se comparan los coeficientes de distribución de la glucoquinasa obtenidos a 30° y con soluciones de la misma composición que las empleadas en los experimentos de la figura 58. Se obtuvieron casi idénticos valores de  $K_d$  tanto en ausencia de ambos sustratos como en presencia de MgATP solo, o MgATP más glucosa a baja (1 mM) o alta (100 mM) concentración. El valor promedio de  $K_d$  de

TABLA XV

Coeficientes de distribución de la glucoquinasa obtenidos por filtración en gel de Sephadex G-200ª

Adiciones al amortiguador B en el solvente de elución <sup>b</sup>	Coeficiente de distribución c			
Ninguno	0,479			
ATP 5 mM	0,479 - 0,483			
ATP 5 mM + glucosa 1 mM	0,494 - 0,494			
ATP 5 mM + glucosa 100 mM	0,487			

a De Cárdenas et al., 1978

Las condiciones de los experimentos se describen en la leyenda de la figura 58. Otros detalles se suministran en Materiales y Métodos.

Coeficiente de distribución  $K_d = (V_e - V_o)/(V_i - V_o)$ 

todos los experimentos fue 0,486  $\pm$  0,002, que es igual al obtenido con la columna a 4° (0,491  $\pm$  0,006).

La estimación del peso molecular aparente de la glucoquinasa se muestra en la figura 59, en la que se relacionan en escala semilogarítmica los coeficientes de distribución de varias proteínas marcadoras con sus pesos moleculares. La glucoquinasa aparece como una proteína de peso molecular de 54.400 ± 700, valor muy similar a los obtenidos para la enzima monomérica (Grossman et al., 1974; Maccioni, 1975; Holroyde et al., 1976). También se indica en la línea de regresión la posición que ocuparía un hipotético dímero de la glucoquinasa.

Los resultados de la figura 58 muestran con claridad que en presencia de ambos sustratos, glucosa y MgATP, y de otros componentes habituales en la mezcla del ensayo de glucoquinasa, la enzima se recupera de la columna de filtración de Sephadex como una proteína activa única. El MgATP no altera la estructura monomérica de la glucoquinasa, aunque el grado de sigmoidicidad de la función de saturación con glucosa es dependiente de la concentración del nucleótido (figura 34). En este aspecto, la glucoquinasa soluble se diferencia de la glucoquinasa microsómica descrita por Berthillier y Got (1972), la cual se dimeriza en presencia de ATP y solo en esta condición exhibe una dependencia sig moidea de la concentración de glucosa.

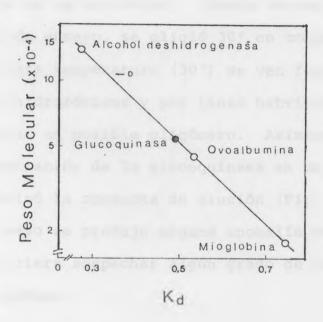


Figura 59. Estimación del peso molecular aparente por filtración en Sephadex G-200. El promedio de los valores de  $K_{\rm d}$  para la glucoquinasa presentados en la Tabla XV (0,486 ± 0,002) se situó en el gráfico construído con los valores de  $K_{\rm d}$  de las proteínas marcadoras, obtenidos en experimentos que se realizaron en las mismas condiciones. D señala el valor de  $K_{\rm d}$  de un hipotético dímero de glucoquinasa. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Metodos.

No hubo tampoco efecto al cambiar la temperatura desde 4°, que es la empleada por los diversos autores que se han preocupado del asunto, a 30°, que es la temperatura habitual de ensayo de la actividad. Además de ser la temperatura habitura habitual de ensayo, se eligió 30° en contraposición a 4°, porque a esta temperatura (30°) se ven favorecidas las interacciones hidrofóbicas y por tanto habría más posibilidad de pesquisar un posible oligómero. Asimismo, la varia ción en concentración de la glucoquinasa en un orden de mag nitud no modificó la conducta de elución (Fig. 60).

En ningún caso se produjo alguna anomalía del perfil de elución que hiciera sospechar algún grado de heterogeneidad de la enzima activa.

## b) Efecto de la N-acetilglucosamina

La N-acetilglucosamina a alta concentración (10 mM) hace desaparecer la sigmoidicidad de la función de saturación para glucosa de la glucoquinasa, como se vió anteriormente (Fig. 41). Dado que se había descrito que la glucoquinasa con un cierto grado de oligomerización (posiblemente dímero) exhibía una cinética hiperbólica (Niemeyer et al., 1975a), cabía la posibilidad de que la N-acetilglucosamina estuviera induciendo cambios conformacionales en la enzima que favorecieran la formación de una estructura dimérica. Sin

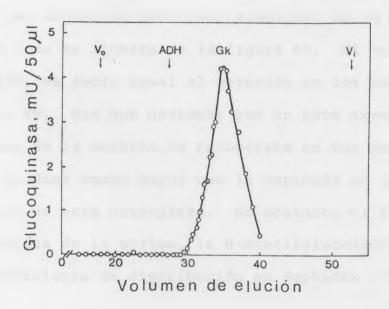


Figura 60. Perfil de elución de la filtración en gel de la glucoqui nasa en presencia de N-acetilglucosamina. La enzima era de la etapa de cromatografía de afinidad (método 2) con una actividad específica de 32 U/mg de proteína. La columna de Sephadex G-200 (1,2 x 48 cm) se equilibro a 30° con N-acetilglucosamina 10 mM preparada en amortiguador B. La muestra de glucoquinasa (1,7 Unidades) se mezclo con alcohol-deshidrogenasa de levadura y  $T_2O$ . El azul-dextrano se filtro solo o junto con  $T_2O$ . Otros detalles se describen en Materiales y Métodos.

embargo, cuando se incluyó N-acetilglucosamina en la solución de elución durante la filtración en Sephadex de la glucoquinasa, se obtuvo un solo pico simétrico de la actividad enzimática, como se ilustra en la figura 60. El valor de  $\mathbf{K}_d$  fue de 0,490, es decir igual al obtenido en los experimentos de la Tabla XV. Hay que destacar que en este experimento la glucoquinasa de la muestra se encontraba en una concentración alrededor de diez veces mayor que la empleada en los otros experimentos de esta naturaleza. No obstante el efecto sobre la cinética de la enzima, la N-acetilglucosamina no alteró su coeficiente de distribución en Sephadex G-100.

## c) Efecto de los sustratos y los productos

La figura 61 ilustra el hecho que la adición de una mezcla de los sustratos (glucosa y MgATP) y de los productos
(glucosa-6-fosfato y MgADP) a la solución de equilibrio y
elución, no determina ningún cambio en el perfil de elución
de la glucoquinasa desde una columna de Sephadex G-100. En
efecto, se obtuvo en estas condiciones de nuevo un pico simétrico y único de glucoquinasa, en la misma posición que en
ausencia de los metabolitos. El peso molecular correspondería al de la enzima monomérica. Un comportamiento similar
se observó en presencia de glucosa-6-fosfato solo. Así, a
diferencia de lo que ocurre en hexoquinasas de corazón y de

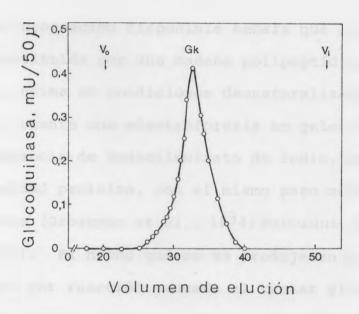


Figura 61. Perfil de elución de la filtración en Sephadex de glucoqui nasa en presencia de sustratos y productos. La enzima provenía de una preparación en la etapa de cromatografía de afinidad (método 2) y tenía una actividad específica de 30 U/mg de proteína. La columna de Sephadex G-100 (1,2 x 48 cm) se equilibró a 30° con amortiguador B contenien do glucosa 50 mM, ATP 5 mM, glucosa-6-fosfato 50 μM, y ADP 50 μM. La muestra de glucoquinasa (0,2 Unidades) se mezcló con [ <sup>14</sup>C]-leucina. Otros detalles se dan en Materiales y Métodos.

cerebro, el glucosa-6-P no parece alterar significativamente la estructura monomérica de la glucoquinasa.

## d) Comentario general

Toda la información disponible señala que la glucoquinasa está constituída por una cadena polipeptídica única. En efecto, la enzima en condiciones desnaturalizadoras como las existentes durante una electroforesis en geles de poliacrila mida en presencia de dodecilsulfato de sodio, aparece como una sola unidad proteica, con el mismo peso molecular que la enzima nativa (Grossman et al., 1974; Maccioni, 1975; Holroyde et al., 1976). El hecho que no se produjeran moléculas de mayor tamaño por reacción cruzada al tratar glucoquinasa pu ra con dimetilsuberimidato, a 4°, en presencia de los sustra tos, apoya la naturaleza monomérica de la glucoquinasa (Holroyde et al., 1976). Asimismo, la cromatografía por filtración en geles de la glucoquinasa nunca ha indicado la presencia de formas oligoméricas, aunque se haya realizado en condiciones muy variadas de fuerza iónica y de composición del medio de desarrollo (Pilkis et al., 1968; González y Ureta, 1969; Pilkis, 1972; Grossman et al., 1974; Maccioni, 1975; Holroyde et al., 1976). La única excepción la consti tuyó la observación de este laboratorio de un cierto grado de oligomerización en preparaciones envejecidas de glucoqui nasa purificada; los estados agregados exhibieron una

cinética hiperbólica (Niemeyer et al., 1975).

La estructura monomérica de la glucoquinasa es de especial interés dado el carácter sigmoideo de la función de sa turación con glucosa, ya que esta cinética exigirá una interpretación diferente a la que dan los modelos más conocidos, que sirven para proteínas oligoméricas (Monod et al., 1965; Koshland et al., 1966). Por esto, era crítico asegurarse de que la glucoquinasa permanecía como monómero cuando se encontraba en condiciones iguales a las que operan durante el ensayo de la actividad.

Es un punto muy importante en el estudio de una enzima que presenta cinética cooperativa el establecer cual es su grado de oligomerización en las condiciones de ensayo, ya que es ahí donde se presenta el fenómeno de cooperatividad. En el caso de una enzima monomérica es imprescindible.

De acuerdo con la información disponible existen otras cinco enzimas monoméricas, que presentan cinética no hiperbó lica. Ellas son la ribonucleósido-trifosfato-reductasa (Beck, 1967; Vitols et al., 1967; Panagou et al., 1972), la ribonucleasa-pancreática (Rübsamen et al., 1974; Walker et al., 1975; Walker et al., 1976), la hexoquinasa  $L_{\rm I}$  de trigo (Meunier et al., 1974), la  $\delta$ -quimotripsina (Ainslie y Neet,1979) y la octopina-deshidrogenasa (Olomucki et al., 1972; Monneuse-Doublet et al., 1978).

En ninguno de estos casos, sin embargo, se han publicado pruebas inequívocas de que no ocurre una oligomerización du rante el ensayo. Además, habría que agregar la hexoquinasa de levadura que, si bien existe como dímero, en las condiciones de ensayo sería fundamentalmente un monómero (Shill et al., 1974). Todas estas enzimas serán analizadas en la Discusión.

La demostración de la estructura monomérica de la glucoquinasa, en condiciones de reacción, descarta la posibilidad de que su función de saturación con glucosa sea el resultado de la interacción entre sitios activos, ubicados en diferentes subunidades de una enzima oligomérica formada durante el ensayo. También puede excluirse la posibilidad de un equili brio de formas asociadas y disociadas, en las que las propie dades cinéticas de la enzima dependieran del peso molecular de las especies presentes. Los modelos en régimen estacionario presentados por varios autores dan la posibilidad de cinética no hiperbólicas en enzimas monoméricas (Ferdinand, 1966; Rabin, 1967; Sweeny y Fisher, 1968; Ainslie et al., 1972; Ricard et al., 1974; Storer y Cornish-Bowden, 1977). En todos estos modelos se postulan al menos dos caminos cinéticamente diferentes de conversión de los sustratos en los productos. Se analizarán primero brevemente estos modelos, y luego se presentará un modelo propio, que da cuenta de la mayoría de los hechos observados en este y otros laboratorios.

### D. DISCUSION

### 1. INTERPRETACION DE LA CINETICA COOPERATIVA

Los trabajos pioneros de Umbarger (1956) y de Yates y
Pardee (1956) en la década de los cincuenta, mostraron que había
enzimas como la treonina-desaminasa y la aspartato-transcarba
milasa, respectivamente, que estaban sujetas a regulación y
que no se ajustaban a la ecuación cinética de Michaelis-Menten,
sino que presentaban una cinética que, al decir de Umbarger,
era "peculiar".

Ha transcurrido alrededor de un cuarto de siglo desde esos descubrimientos y en este lapso se han descrito numerosas enzimas que presentan desviaciones de la cinética michaeliana clásica (cooperatividad positiva o negativa) y que en la mayoría de los casos corresponden a enzimas que parecen jugar un papel importante en la regulación de las vías metabólicas (Koshland, 1968; Stadtman, 1970).

Junto con la descripción del fenómeno de cooperatividad cinética surgió la inquietud de poder explicarlo. Así, en los últimos 15 años, el estudio de los mecanismos que podrían dar cuenta de una conducta cinética cooperativa ha ocupado la atención de diversos grupos de investigadores. La idea principal que ha dominado el pensamiento en esta área es la de las

interacciones alostéricas propuesta por Monod *et al*. (1963, 1965) y extendida luego por Koshland *et al*. (1966).

## a) Modelos de sistemas en equilibrio rapido

Los principales modelos de sistemas en equilibrio rápido para explicar la cooperatividad son los planteados por los grupos de Monod y de Koshland. Son de equilibrio rápido porque se considera que:

- i) Los pasos de unión y de disociación de ligandos a la proteína son muy rápidos comparados con el paso catalítico.
- ii) Los cambios conformacionales inducidos o los desplazamientos de equilibrios provocados por la unión de los ligandos a la proteína son rápidos con respecto a la velocidad de la reacción catalizada.

Estas dos consideraciones permiten que se alcance un esta do de cuasiequilibrio (equilibrio rápido) entre las diferentes especies de enzima, y entre el ligando libre y el ligando unido a la enzima.

Tanto en el modelo de Monod et al. (1965) como en el de Koshland et al. (1966) se pone énfasis en la interacción entre las subunidades en el control de la actividad enzimática. En estos modelos, la variación sigmoidea de la velocidad en función de la concentración de sustrato se interpreta suponiendo que la cooperatividad cinética es

consecuencia de la cooperatividad en la unión del sustrato a las subunidades interactuantes de la enzima. La cooperatividad cinética queda así restringida a enzimas oligoméricas. La mayoría de los datos descritos en la literatura son compatibles con estos modelos, los cuales pueden aplicarse también a proteínas no enzimáticas que enlazan específicamen te un ligando, como es el caso de la hemoglobina.

Modelo de transicion concertada de Monod, Wyman y Changeux

En 1965, Monod, Wyman y Changeux propusieron un modelo cu yos postulados son:

- i) Las proteínas alostéricas son oligómeros cuyos protómeros se encuentran asociados de tal manera que ocupan posiciones equivalentes. Un oligómero es una proteína que contiene un número relativamente pequeño de subunidades idénticas cada una de las cuales se denomina protómero.
- ii) A cada ligando capaz de formar un complejo estereoespecífico con la proteína, le corresponde uno y sólo un sitio
  de unión en cada protómero: al sustrato el sitio catalítico
  y al modulador (activador, inhibidor) un sitio alostérico,
  es decir, un sitio estructural y topológicamente distinto
  del sitio catalítico.

- iii) La conformación de cada protómero está restringida por su asociación con los vecinos. Es decir, existen restricciones moleculares que hacen que los cambios de conformación de los protómeros sean concertados.
- iv) Los oligómeros alostéricos pueden existir en al menos dos estados conformacionales reversibles (R y T), que difieren en la distribución y energía de los enlaces interprotoméricos, y también en las restricciones impuestas sobre los protómeros.
- v) Existe una unión preferente de cada ligando por algún esta do conformacional. Es decir, al ocurrir una transición conformacional (concertada) de un estado a otro, la afinidad de los sitios estereoespecíficos hacia el correspondiente ligan do se altera.
- $v\dot{\iota}$ ) Al experimentar el oligómero la transición conformacional de un estado a otro, se conserva la simetría molecular, incluyendo la simetría de las restricciones impuestas sobre cada protómero (transición concertada).

Estos seis postulados del modelo de Monod et al. se pueden resumir en dos presunciones fundamentales. Una es la presencia de un equilibrio preexistente entre dos o unos pocos estados conformacionales de la proteína y, la segunda, es que cualquier cambio conformacional afecta a todos los protómeros de igual manera, lo que permite conservar en todo momento la simetría de la molécula proteica. De ahí que se hable de una

transición concertada. Este modelo es "elegantemente simple" (Koshland, 1970). Los activadores y los sustratos favorecen el estado R y los inhibidores el estado T. El desplazamiento del estado T al estado R bajo la influencia la unión del sustrato explica la cooperatividad. El modelo no permite especies moleculares hibridas y predice, por lo tanto, solamente la cooperatividad positiva en las interacciones homotrópicas. Pettigrew y Frieden (1977) han extendido este modelo al caso de una reacción de dos sustratos con un mecanismo de unión al azar en equilibrio rápido. Han mostrado, por estudios de simulación, que si los estados con formacionales tienen diferente afinidad por cada uno de los sustratos se pueden obtener conductas cinéticas diferentes de las esperadas por simple analogía con la conducta de unión de cada uno de los sustratos por separado. Estos autores re fieren, aunque no lo muestran, que en ciertas condiciones es posible la existencia de cooperatividad cinética negativa.

El hecho que los postulados de este modelo se refieran a proteínas alostéricas, hizo que existiera una tendencia a establecer una relación biunívoca entre el fenómeno de alos terismo y el de cinética cooperativa. Si bien ambos fenóme nos están estrechamente relacionados y ambos pueden ser explicados a base de flexibilidad conformacional de las proteínas, no son sinónimos. Esta confusión se ha visto

estimulada por el hecho que muchas enzimas alostéricas pre sentan también cinética cooperativa y, viceversa, la mayoría de las enzimas que presentan cooperatividad poseen sitios alostéricos. Esto no debe sorprender, ya que ambas propiedades son importantes en el control metabólico y se podría suponer que han sido seleccionadas a través de la e volución. No obstante, esto no significa que los términos de alosterismo y de cooperatividad sean intercambiables; ellos describen dos propiedades diferentes y deben ser dis tinguidos claramente. Así, una enzima alostérica es solamente una enzima que presenta un sitio alostérico y puede o no tener cinética cooperativa. Por ejemplo, desde hace tiempo se sabe que la primera enzima en la biosíntesis de histidina (fosforribosil-ATP-pirofosforilasa) es alostérica (Martin, 1963); sin embargo, no se ha descrito que ella pre sente cinética cooperativa. Por otra parte, una enzima con cinética cooperativa puede ser o no ser alostérica. La glu coquinasa parece ser un ejemplo de enzima no alostérica con cinética cooperativa.

Los trabajos del grupo de Monod fueron muy importantes porque dieron un marco conceptual simple para enfocar los primeros trabajos con enzimas de cinéticas no michaelianas; definieron además muchos términos, lo que contribuyó a evitar confusiones; pusieron énfasis en las características de simetría en el diseño de las proteínas y plantearon el rol

de las subunidades en el proceso cooperativo.

Modelo de transiciones consecutivas de Koshland, Némethy y Filmer

El modelo de Koshland comparte con el de Monod los postulados ii) y v) y la idea que la proteína es un oligómero, pero no requiere condiciones de simetría. Sus presunciones básicas son:

- i) La interacción del ligando con la proteína induce en ésta un cambio conformacional (encaje inducido) que puede estar restringido a una sola subunidad de la proteína.
- La interacción entre las subunidades es la clave de los procesos homotrópicos. Según la fuerza de dichas interacciones, la deformación que afecta a una subunidad puede a su vez afectar la forma y estabilidad de las subunidades vecinas, provocando un cambio conformacional en ellas que ocurriría en forma consecutiva, más bien que concertada. Solo si la interacción es infinita, el cambio conformacional sería concertado.
- iii) La conducta de los estados conformacionales se puede describir a base de tres parámetros moleculares, que describen la energía del cambio conformacional, la fuerza de la interacción entre las subunidades y la afinidad de los ligandos a un estado conformacional definido.

Este modelo, como no requiere el principio de simetría, permite la existencia de especies híbridas y puede explicar la aparición de cooperatividad negativa y mixta tanto cinética como de unión (Koshland, 1970).

## Modelo de Frieden del segundo sitio

Los dos modelos anteriores consideran enzimas con sitios múltiples, en las cuales todos los sitios de unión del sustratos son catalíticamente activos y están situados en sub unidades diferentes dentro de la proteína. Es posible, sin embargo, que una enzima posea sitios de unión del sustrato que no tengan actividad catalítica y que en cambio jueguen un papel regulatorio.

Frieden (1964), en un análisis general de la situación de enzimas cuya actividad está influenciada por la unión específica de modificadores a sitios diferentes del sitio catalítico (alostéricos), considera el caso en que el mismo sustrato actúa como modificador, originando activación o inhibición.

Frieden plantea las siguientes ecuaciones de interacción de la enzima con el sustrato:

Sobre la base de presunciones de equilibrio rápido, deriva una ecuación de velocidad inicial, la cual es de segundo orden con respecto a la concentración de sustrato y es del tipo:

$$\frac{v}{E_0} = \frac{fS^2 + gS}{h + iS^2 + jS} \tag{10}$$

donde los parámetros f, g, h, i, j, son funciones de las constantes cinéticas y de las constantes de equilibrio.

Notese que en este caso no se presume interacción de sub unidades y, por lo tanto, es aplicable a enzimas monoméricas. Solo se presume la existencia de un segundo sitio, alostérico, que al unir el sustrato, puede modificar la constante catalítica  $(k_5 \neq k_6)$  o afectar la afinidad del sitio activo por el sustrato  $(K_1 \neq K_4)$ .

En una situación extrema de unión cooperativa, el sitio catalítico estaría accesible al sustrato sólo después que éste se ha unido al sitio alostérico y ha inducido un cambio conformacional en la enzima. En este caso, se tendría lo siguiente:

La variación de la velocidad en función de la concentra ción de sustrato, en condiciones de equilibrio rápido sería:

$$\frac{v}{E} = \frac{kS^2}{\alpha K^2 + S^2 + \alpha KS}$$

donde K es la constante de disociación intrínseca.

La ecuación de velocidad obtenida es de segundo orden respecto a la concentración del sustrato, aún si  $\alpha$  vale 1,0. La ecuación de unión del ligando también es de segundo orden con respecto a su concentración. El grado de sigmoidicidad aumenta a medida que  $\alpha$  disminuye.

## b) Modelos en régimen estacionario

Como contrapartida a los anteriores y con posterioridad, han surgido modelos que no postulan unión cooperativa de ligandos, pues no requieren interacción de subunidades, y que pueden, por lo tanto, ser aplicados a enzimas monoméricas (como la glucoquinasa). Estos modelos presentan dos ideas en común:

- ii) Las distintas especies enzimáticas no alcanzan un equilibrio rápido, sino que están en régimen estacionario.

Las diferencias entre los modelos de régimen estacionario surgen en el modo de generación de las distintas especies enzimáticas a las cuales se puede unir el sustrato.

#### Modelos cinéticos

En el modelo de Ferdinand (1966), las especies enzimáticas surgen debido al mecanismo cinético de la reacción. Se muestra que en reacciones de dos sustratos puede originarse una cinética sigmoidea si los sustratos se unen al azar a la enzima, en condiciones de régimen estacionario y si una de las vías resultantes es preferida cinéticamente, es

decir, es más rápida (Fig. 62). En este caso, el sustrato que presenta cooperatividad podría unirse a dos especies en zimáticas: la enzima libre y el complejo binario formado por la enzima con el otro sustrato.

Un mecanismo Bi-Bi al azar en régimen estacionario es des crito por una ecuación de velocidad inicial bastante comple-ja (Dixon y Webb, 1964):

$$\frac{c_1ab + c_2a^2b + c_3ab^2}{c_7 + c_8a + c_9b + c_{10}ab + c_{11}a^2 + c_{12}b^2 + c_{13}a^2b + c_{14}ab^2}$$

donde c1 a c14 son combinaciones de constantes de velocidad.

```
c_1 = k_{+1} k_{-2} k_{+3} k_{+5} + k_{-1} k_{+2} k_{+4} k_{+5}
 c_2 = k_{+1} k_{+3} k_{+4} k_{+5}
 c_3 = k_{+2} k_{+3} k_{+4} k_{+5}
 c_4 = k_{-1} k_{-2} k_{-3} k_{-5} + k_{-1} k_{-2} k_{-4} k_{-5}
 c_5 = k_{-1} k_{-3} k_{+4} k_{-5}
 c_6 = k_{-2} k_{+3} k_{-4} k_{-5}
 c_7 = k_{-1}k_{-2}k_{-3} + k_{-1}k_{-2}k_{-4} + k_{-1}k_{-2}k_{+5}
 c_8 = k_{+1}k_{-2}k_{-3} + k_{+1}k_{-2}k_{-4} + k_{+1}k_{-2}k_{+5} + k_{-1}k_{-3}k_{+4} + k_{-1}k_{+4}k_{+5}
 c_9 = k_{-1}k_{+2}k_{-3} + k_{-1}k_{+2}k_{-4} + k_{-1}k_{+2}k_{+5} + k_{-2}k_{+3}k_{-4} + k_{-2}k_{+3}k_{+5}
c_{10} = k_{+1}k_{-2}k_{+3} + k_{-1}k_{+2}k_{+4} + k_{+1}k_{+3}k_{-4} + k_{+2}k_{-3}k_{+4} + k_{+3}k_{+4}k_{+5}
c_{11} = k_{+1} k_{-3} k_{+4} + k_{+1} k_{+4} k_{+5}
c_{12} = k_{+2} k_{+3} k_{-4} + k_{+2} k_{+3} k_{+5}
c_{13} = k_{+1} k_{+3} k_{+4}
c_{14} = k_{+2} k_{+3} k_{+4}
c_{15} = k_{-1}k_{-2}k_{-5} + k_{-1}k_{-4}k_{-5} + k_{-2}k_{-3}k_{-5}
c_{16} = k_{-1}k_{+4}k_{-5} + k_{-3}k_{+4}k_{-5}
c_{17} = k_{-2}k_{+3}k_{-5} + k_{+3}k_{-4}k_{-5}
c_{18} = k_{+3} k_{+4} k_{-5}
```

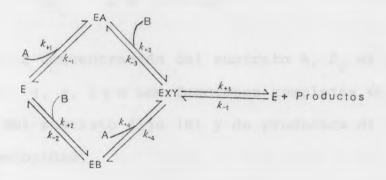


Figura 62. Secuencia de reacciones en un sistema enzimático con mecanismo al azar de unión de sustratos.  $k_1k_3k_{-4}k_{-2} = k_2k_4k_{-3}k_{-1}$  (reversibilidad microscópica). No se indica el número de productos ni el orden de salida de ellos por no ser de importancia para el análisis.

Si uno de los sustratos (por ejemplo B) se mantiene constante, la ecuación de velocidad se reduce a:

$$\frac{v}{E_{0}} = \frac{iA^{2} + iA}{k + 1A^{2} + mA}$$
 (11)

donde, A es la concentración del sustrato A,  $E_o$  es la enzima total e i, j, k, l y m son funciones complejas de la concentración del sustrato fijo (B) y de productos de las constantes de velocidad.

$$i = c_2B$$
  
 $j = c_1B + c_3B^2$   $I = c_{11} + c_{13}B$   
 $k = c_7 + c_9B + c_{12}B^2$   $m = c_8 + c_{10}B + c_{14}B^2$ 

Este sistema es de segundo grado en A y no se ajusta a la ecuación clásica de Michaelis. Aunque los gráficos recíprocos no son lineales, el alejamiento de la linealidad sería imposible de detectar si ambas rutas de formación de EAB son equivalentes. Mediante diferenciación de la ecuación (11), Ferdinand (1966) analiza las condiciones que deben cumplir las relaciones entre los parámetros cinéticos de esta ecuación para la obtención de una activación por sustrato o de una inhibición. De esta manera establece que si se cumple la siguiente condición:

se obtiene una cinética sigmoidea para el sustrato variable. Dado que los parámetros de la ecuación de velocidad son funciones de la concentración del sustrato fijo, su valor dependerá de la concentración de éste. Luego, la existencia de cooperatividad dependerá, en este caso, de la concentración del sustrato fijo. Debido a la complejidad de los parámetros cinéticos, no es posible reducir la condición para la existencia de sigmoidicidad a una forma en que pueda visualizarse una relación obvia entre las constantes de velocidad. Parte de la condición sería que  $k_{\rm S}$  sea grande respecto a las otras constantes de velocidad, a fin de que se cumpla la condición de régimen estacionario, y que, por otra parte,  $k_{\rm I} > k_{\rm F}$ . Por esta misma razón, no debe esperarse necesariamente que, si se observa cooperatividad positiva respecto de A, deba observarse en las mismas condiciones inhibición por B.

En general, cualquier mecanismo cinético que implique más de un camino para la unión de una molécula de sustrato al sitio activo, puede originar una relación sigmoidea entre velocidad y concentración de sustrato (Sweeny y Fisher, 1968; Fisher et al., (1972).

Modelos con transiciones conformacionales

Varios investigadores (Anderson y Weber, 1965; Witzell, 1967; Frieden, 1970; Ainslie et al., 1972) han discutido modelos que implican una isomerización lenta entre dos for mas coexistentes de enzimas que poseen un sitio activo único. En estos casos, ambos estados unen el sustrato con afinidades diferentes o tienen constantes catalíticas distintas. El paso de unión y el de isomerización deben estar en régimen estacionario.

El modelo de transiciones conformacionales lentas propues to por Ainslie et al., (1972) es el más elaborado y de carácter más general y tiene los siguientes postulados básicos:

- i) La enzima puede existir en dos (o más) estados conformacionales diferentes e interconvertibles en forma lenta en relación a la velocidad de la reacción catalizada.
- ii) Cada forma enzimática puede llevar a cabo un ciclo catalítico, pero con diferentes constantes de velocidad.
- iii) La velocidad de interconversión de ambas formas y su distribución están influenciadas por la concentración del sustrato.

Para el caso de una reacción Uni-Uni, como la que se ilustra en la figura 63, la ecuación de velocidad inicial describe una dependencia de segundo orden respecto a la concentración del sustrato,

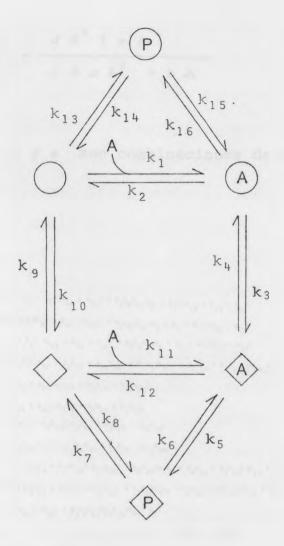


Figura 63. Modelo de transición conformacional lenta aplicado a una enzima con un sustrato y un producto. El círculo y el rombo representan conformaciones diferentes e interconvertibles de la enzima, E y E' respectivamente. A, sustrato y P, producto. El paso lento de interconversión está determinado por las constantes cinéticas  $k_9$  y  $k_{10}$  en el caso de la enzima libre y por  $k_3$  y  $k_4$  en el del complejo binario. Adaptado de Ainslie et al., 1972.

$$\frac{v}{E_0} = \frac{d A^2 + e A}{c + a A^2 + b A}$$
 (13)

donde, a, b, c, d y e son combinaciones de constantes cinéticas:

```
= {^k}_1 {^k}_3 {^k}_{11} ({^k}_5 + {^k}_6 + {^k}_7) ({^k}_{14} + {^k}_{15}) + {^k}_1 {^k}_4 {^k}_{11} ({^k}_6 + {^k}_7) ({^k}_{14} + {^k}_{15} + {^k}_{16})
```

 $<sup>^{</sup>k_{1}+k_{1}k_{4}k_{9}(k_{6}+k_{7})(k_{14}+k_{15}+k_{16})+k_{3}k_{10}k_{11}(k_{5}+k_{6}+k_{7})(k_{14}+k_{15})}$ 

 $<sup>+ \</sup> k_4 k_{11} (k_6 + k_7) (k_2 k_{14} + k_2 k_{15} + k_{14} k_{16}) + k_2 k_3 (k_5 k_7 + k_6 k_{12} + k_7 k_{12}) (k_{14} + k_{15})$ 

 $<sup>+</sup> k_{10}k_{11}(k_5 + k_6 + k_7)(k_2k_{14} + k_2k_{15} + k_{14}k_{16})$ 

 $<sup>+</sup> k_1 k_9 (k_{14} + k_{15} + k_{16}) (k_5 k_7 + k_6 k_{12} + k_7 k_{12})$ 

 $<sup>=</sup> k_9 (k_5 k_7 + k_6 k_{12} + k_7 k_{12}) (k_2 k_{14} + k_2 k_{15} + k_{14} k_{16})$ 

 $<sup>^{+}</sup>$   $^{k}$   $_{10}$   $^{(k}$   $_{5}$   $^{k}$   $_{7}$   $^{+}$   $^{k}$   $_{6}$   $^{k}$   $_{12}$   $^{+}$   $^{k}$   $_{7}$   $^{k}$   $_{12}$   $^{)}$   $^{(k}$   $_{2}$   $^{k}$   $_{14}$   $^{+}$   $^{k}$   $_{2}$   $^{k}$   $_{15}$   $^{+}$   $^{k}$   $_{14}$   $^{k}$   $_{16}$   $^{)}$ 

 $<sup>+</sup> k_4 k_9 (k_6 + k_7) (k_2 k_{14} + k_2 k_{15} + k_{14} k_{16}) + k_3 k_{10} (k_5 k_7 + k_6 k_{12} + k_7 k_{12}) (k_{14} + k_{15})$ 

 $<sup>+</sup> k_4 k_{10} (k_6 + k_7) (k_2 k_{14} + k_2 k_{15} + k_{14} k_{16}) + k_3 k_9 (k_5 k_7 + k_6 k_{12} + k_7 k_{12}) (k_{14} + k_{15})$ 

 $d = k_1 k_2 k_5 k_7 k_{11} (k_{14} + k_{15}) + k_1 k_4 k_{11} k_{14} k_{16} (k_6 + k_7)$ 

 $e = k_1 k_5 k_7 (k_{14} + k_{15}) (k_1 k_9 + k_{10} k_{11}) + k_4 k_{14} k_{16} (k_6 + k_7) (k_1 k_9 + k_{10} k_{11})$ 

 $<sup>+ \,</sup> k_1 k_0 k_{14} k_{16} (k_5 k_7 + k_6 k_{12} + k_7 k_{12}) + k_5 k_7 k_{16} k_{11} (k_2 k_{14} + k_2 k_{15} + k_{16} k_{16})$ 

Establecido el régimen estacionario, la velocidad es la suma de las contribuciones de la enzima en los dos ciclos catalíticos a una concentración dada de sustrato. Al variar la concentración del sustrato varía la distribución de las formas enzimáticas en régimen estacionario y, dado que ellas tienen diferentes constantes cinéticas, surge la cooperatividad, que puede ser positiva o negativa.

En este modelo, el paso lento de interconversión puede ser una isomerización, una asociación-disociación o la unión de otro ligando (modificador).

Estudios de simulación de este mecanismo han mostrado que puede originar cooperatividad cinética positiva y negativa, acompañada de retardo ("lag") o de estallido ("burst") en la curva de progreso. La existencia de cooperatividad está aquí mecanísticamente relacionada a la existencia de un estado transitorio, de modo que en este mecanismo pueden generarse estados transitorios sin dar lugar a cooperatividad, pero no viceversa (Ainslie et al., 1972).

Si la reacción enzimática implica dos sustratos y dos productos, el análisis se hace bastante complejo, pero se siguen aplicando los mismos principios que para el caso de un sustra to. Se pueden considerar varios casos límites que implican diferentes presunciones respecto al efecto de los sustratos sobre la velocidad de isomerización  $(k_3)$  y al orden en que ellos se adicionan a la enzima. Una situación incompatible

con el modelo es la de azar en equilibrio rápido, pues deriva en una conducta cinética michaeliana.

El modelo de transición lenta ha sido aplicado a hexoquinasa de levadura (Shill y Neet, 1975) y a  $\delta$ -quimiotripsina (Ainslie y Neet, 1979).

#### Transición mnemónica

Ricard et al. (1974) propusieron otro tipo de isomeriza ción enzimática, que llamaron transición mnemónica, basándose en la idea básica de Rabin (1967), que plantea que la enzima que se libera al final del ciclo catalítico presenta una conformación diferente a la que tenía cuando inició el ciclo. Es decir, cuando el producto (o el último producto en una reacción de varios productos) se libera del sitio activo, la enzima "recuerda" por unos instantes la conformación estabilizada por aquel producto.

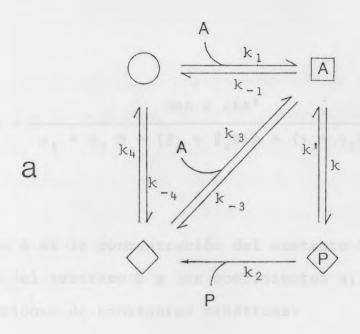
Los postulados básicos del modelo de transición mnemónica son los siguientes:

i) La enzima puede existir en dos estados conformaciona les interconvertibles, con una constante de equilibrio que favorece grandemente la presencia de uno de ellos en ausencia de ligandos. Esta es la forma que prácticamente inicia el ciclo.

- ii) La enzima libre que se genera al final de la catálisis corresponde a la forma menos estable y está por tanto en una conformación diferente de la inicial.
- iii) La unión del sustrato, o del primer sustrato cuando se trata de reacción bimolecular o de orden mayor, a cualquiera de las formas induce una nueva conformación común, que es requisito para la catálisis.
- iv) La velocidad de la transición conformacional inducida por el sustrato es diferente para las dos conformaciones.

El concepto de transición mnemónica implica necesariamen te la existencia de un encaje inducido y puede aplicarse para analizar la conducta cinética de una enzima con un sus trato (Fig. 64a) o con dos sustratos que sigan un mecanismo de adición en secuencia ordenada (Fig. 64b). A diferencia del modelo de isomerización lenta, que puede aplicarse tanto a un mecanismo al azar como a uno ordenado, el de transición mnemónica sólo sería aplicable a este último. Sólo con el primer sustrato se produciría cooperatividad y el grado de ésta no dependería de la concentración del segundo sustrato.

Para una enzima mnemónica que cataliza una reacción Bi-Bi con un mecanismo cinético como el de la figura 64b, la velocidad inicial está dada por la siguiente ecuación:



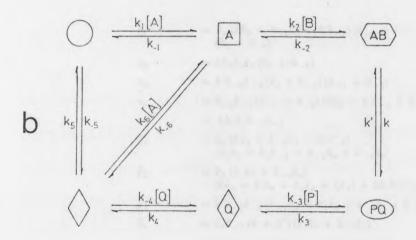


Figura 64. Modelo de transición mnemónica. El círculo, el rombo y el cuadrado representan diferentes estados conformacionales de la enzima. A y B, sustratos. P y Q, productos.

- a) Modelo para una enzima con un sustrato (A) y un producto (P).
- b) Modelo para una enzima con dos sustratos (A y B) y dos productos
- (P y Q). El mecanismo cinético de adición de sustratos a la enzima y de liberación de productos es en secuencia ordenada.

Adaptado de Ricard et al., 1974.

$$\frac{v}{E_0} = \frac{\delta BA + \epsilon BA^2}{\alpha_1 + \alpha_2 B + (\beta_1 + \beta_2 B)A + (\gamma_1 + \gamma_2 B)A^2}$$
(14)

donde A es la concentración del sustrato A y B la concentración del sustrato B y los coeficientes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  son combinaciones de constantes cinéticas:

$$\begin{array}{lll} \alpha_1 & = k_4 \left(kk_3 + k_{-2}k_3 + k'k_{-2}\right) \left(k_{-1} + k_{-6}\right) \\ \left(k_5 + k_{-5}\right) & = kk_2k_3k_4 \left(k_5 + k_{-5}\right) \\ \alpha_3 & = kk_{-2}k_{-3} \left(k_5 + k_{-5}\right) \left(k_{-1} + k_{-6}\right) \\ \alpha_4 & = k_{-4}k_{-5} \left(k_{-1} + k_{-6}\right) \left(kk_3 + k'k_{-2} + k_{-2}k_3\right) \\ \alpha_5 & = kk_2k_3k_{-4}k_{-5} \\ \beta_1 & = k_4 \left(kk_3 + k_{-2}k_3 + k'k_{-2}\right) \\ \left(k_1k_5 + k_1k_{-6} + k_{-1}k_6 + k_{-5}k_6\right) \\ \beta_2 & = k_2 \left(k_1k_5 + k_{-5}k_6\right) \\ \left(kk_4 + k'k_4 + k_3k_4 + kk_3\right) + kk_1k_2k_3k_4 \\ \beta_3 & = k'k_{-2}k_{-3} \left(k_{-1}k_6 + k_1k_5 + k_{-5}k_6 + k_1k_{-6}\right) \\ \beta_4 & = k_2k_{-3} \left(k + k'\right) \left(k_1k_5 + k_{-5}k_6\right) \\ \beta_5 & = k_1k_{-4}k_{-6} \left(k'k_{-2} + k_{-2}k_3 + kk_3\right) \\ \beta_6 & = k_1k_2k_3k_{-4} \\ \gamma_1 & = k_1k_4k_6 \left(k'k_{-2} + k_{-2}k_3 + kk_3\right) \\ \beta_6 & = k_1k_2k_6 \left(k_3k_4 + k'k_4 + kk_4 + kk_4\right) \\ \gamma_3 & = k'k_1k_2k_{-3}k_6 \\ \beta_4 & = k_1k_2k_{-3}k_6 \left(k + k'\right) \\ \delta & = kk_2k_3k_4 \left(k_1k_5 + k_{-5}k_6\right) \\ \epsilon & = kk_1k_2k_3k_4k_6 \end{array}$$

Los coeficientes  $\alpha_3-\alpha_5$ ,  $\beta_3-\beta_6$ ,  $\gamma_3$  y  $\gamma_4$  pertenecen a la ecuación general de velocidad, es decir en presencia de productos.

La cooperatividad se evalúa mediante la segunda derivada de la función de dobles recíprocos correspondiente a la ecua ción (14) (Ricard et al., 1974). El grado de cooperatividad ( $\Gamma$ ) se obtiene del valor numérico de la segunda derivada cuan do  $1/A \rightarrow 0$ .  $\Gamma$  mide la curvatura de un gráfico de dobles recíprocos en el eje 1/v a concentración  $\infty$  de sustrato. Para una reacción Bi-Bi como la de la figura 64b el valor de  $\Gamma$  es:

$$\Gamma = \frac{2k_5}{k_1 k_6^2} \quad (k_6 - k_1) \tag{15}$$

De ahíque, segúnel análisis de Ricard et al. (1974), el grado de cooperatividad sea independiente de la concentración del segundo sustrato, pudiendo predecirse cooperatividad cinética solo para el primer sustrato. La cooperatividad dependerá de los valores relativos de las constantes de velocidad de las transiciones conformacionales (postulado (v)). Si  $k_6 > k_1$  se tendrá cooperatividad positiva; en cambio, si  $k_6 < k_1$ , la cooperatividad cinética será negativa. El grado de cooperatividad dependerá pues de la diferencia en tre los valores de  $k_1$  y  $k_6$ .

En el caso de la hexoquinasa  $L_{\rm I}$ , a la cual se ha aplicado este modelo, se tiene que la cooperatividad negativa con glu cosa es independiente de la concentración de MgATP en un amplio rango (Meunier et al., 1974), lo cual estaría de acuerdo

con la ecuación (15).

Si la ecuación (14) se simplifica, haciendo constante la concentración de B, se tiene la ecuación:

$$\frac{v}{E_{o}} = \frac{\Psi A^{2} + \rho A}{\phi + \omega A^{2} + \lambda A} \tag{16}$$

donde,  $\Psi$ ,  $\rho$ ,  $\phi$ ,  $\omega$  y  $\lambda$  son funciones complejas de la concentración del sustrato fijo (B) y de productos de las constantes de velocidad:

$$Ψ = εB$$
  $ω = γ1 + γ2B$   $ρ = δB$   $λ = β1 + β2B$   $φ = α1 + α2B$ 

La ecuación (16) tiene la misma forma que la ecuación (11) correspondiente al mecanismo al azar en régimen estacionario y que fue examinada por Ferdinand (1966). Nótese que la ecuación (13) del modelo de transiciones conformacionales lentas es también de igual forma. Lo que varía es el significado de los parámetros cinéticos. Según el análisis matemático de Ferdinand, la curva representada por la ecuación (16) tendría, entonces, un punto de inflexión si se cumple una condición equivalente a la (12):

$$\phi \Psi > \lambda \rho ; \omega \lambda > \rho \omega$$
 (17)

Dado que los parámetros cinéticos de la ecuación (16) son funciones de la concentración del sustrato fijo, sus valores deben depender de la concentración de éste. Luego, la existencia de cooperatividad debería depender de la concentración del sustrato fijo y no ser independiente como lo plantean Ricard et al. (1974) a través de la ecuación (15). Cabe, sin embargo, la posibilidad de que, dada la complejidad de las expresiones que definen los parámetros cinéticos, la contribución de la concentración del sustrato fijo sea de peso tal en cada uno de los parámetros que no altere la condición (17), o que su alteración sea de magnitud tal que no sea discernible experimentalmente.

Por otra parte, Storer y Cornish-Bowden (1977) consideran que el parámetro  $\Gamma$  no es muy sensible para medir el grado de cooperatividad y que es preferible usar como índice de cooperatividad el coeficiente de Hill ( $n_{\rm H}$ ). El hecho que la hexoquinasa  $L_{\rm I}$  de trigo no presente variación en el grado de cooperatividad negativa en función de la concentración de MgATP, podría deberse a que el rango de concentración de MgATP estudiado (0,02 a 1 mM) no fue lo suficientemente amplio y que aunque hubiera existido una pequeña variación en la cooperatividad, no hubiera sido detectada mediante el índice  $\Gamma$ , pero quizás lo hubiera sido a través del coeficiente de Hill. Lamentablemente no es posible determinar con se guridad este coeficiente con los datos publicados.

Ricard et al. (1974) plantean que su modelo es muy dife rente del derivado por Ainslie et al. (1972), básicamente porque primero, en el modelo de transiciones lentas el enca je inducido no parece ser un componente del esquema y, segundo, porque el cambio conformacional es lento con respec to a otros procesos; en cambio, el modelo mnemónico implica la existencia de un encaje inducido y no se requiere que las transiciones conformacionales sean lentas. En mi opinión, sin embargo, estas observaciones no son totalmente válidas, ya que si bien el grupo de Ainslie no insiste explicitamente en la importancia del encaje inducido, el hecho que la unión del sustrato afecte la constante de velocidad de interconversión de las formas enzimáticas implica de hecho un encaje inducido. Por otra parte, el modelo mnemónico requiere que una de las transiciones conformacio nales, la inducida por el primer sustrato, sea lenta respec to a los otros pasos, porque de no ser así pierde sentido el postulado iv. Si bien la transición mnemónica puede ser rápida, la inducida por el sustrato no puede serlo.

A mi entender, la diferencia básica entre ambos modelos reside en que:

¿) En la transición mnemónica el sustrato que presenta cooperatividad induce un cambio conformacional en la enzima necesario para la catálisis; en cambio, en el modelo de transiciones lentas esto no es un requisito indispensable, ya que una vez que se une el sustrato, puede producirse la catálisis con o sin cambio conformacional importante.

ii) La interconversión entre las especies enzimáticas libres puede ser relativamente rápida en la transición mne mónica; en cambio, debe ser lenta en el modelo de Ainslie et al. (1972).

### 2. APLICACION DE MODELOS A ENZIMAS MONOMERICAS

En su mayor parte, las enzimas con cinética no michaelia na son proteínas oligoméricas, a las cuales se pueden aplicar modelos basados en la interacción de subunidades. Recientemente, sin embargo, se han descrito unas pocas enzimas monoméricas con cinética atípica. Ellas son la glucoquinasa, la hexoquinasa de levadura, la hexoquinasa  $\mathbf{L}_{\mathbf{I}}$  de trigo, la octopina-deshidrogenasa, la  $\delta$ -quimotripsina, la ribonucleasa pancreática y la ribonucleósido-trifosfato-re ductasa. Analizaremos brevemente a continuación como se han aplicado a estas enzimas algunos de los modelos que presentamos anteriormente. Se darán más detalles sobre la ribonucleósido-trifosfato-reductasa, la hexoquinasa de levadura y la hexoquinasa  $\mathbf{L}_{\mathbf{I}}$  de trigo, consideradas como prototipos de los modelos.

# a) Modelo del segundo sitio

La ribonucleosido-trifosfato-reductasa (EC 1.17.4.2) de Lactobacillus leichmannii cataliza la reducción de GTP, CTP, ITP y, en menor grado, de UTP, por ditioles tales como dihi drolipoato o tiorredoxina reducida. Presenta cooperatividad positiva con todos los ribonucleótidos en presencia de iones magnesio (Beck, 1967). La reducción de los nucleósido-trifos fatos es activada en forma específica por varios de los

desoxinucleótidos productos de la reacción. Así, por ejemplo, la reducción de ATP es activada por dGTP, mientras que la reducción de CTP es activada por dATP. Sobre la base de estudios cinéticos se sugirió que los desoxinucleósido-trifosfatos actuarían como activadores debido a que se unirían a sitios alostéricos de la enzima (Goulian y Beck, 1966; Beck, 1967; Vitols et al., 1967) y que los ribonucleótidos también podrían unirse a un sitio regulador (Beck, 1967; Vitols et al., 1967).

No obstante ser una enzima con características alostéricas, la ribonucleósido-trifosfato-reductasa de Lactobacillus leichmannii es un monômero de peso molecular 76.000, constituido por una sola cadena polipeptídica. No presenta agregación en presencia de modificadores alostéricos, como dGTP, ni de los sustratos ATP y GTP (Panagou et al., 1972).

La ribonucleótido-reductasa fue el primer ejemplo descrito de una enzima monomérica con cinética no michaeliana en ciertas condiciones y sujeta a regulación por modificadores alostéricos. Hay que considerar, sin embargo, que los estudios de Panagou et al. (1972) no informan acerca de la estructura de la enzima en las condiciones de ensayo o en pre sencia de alta concentración de Mg<sup>2+</sup>. Esto último es impor tante porque el ión magnesio, además de inducir cooperatividad cinética en esta enzima, asocia las subunidades de la

ribonucleótido-reductasa de *E. coli*, la cual posee dos tipos de subunidades débilmente asociadas (Brown y Reichard, 1969a). Una de ellas llevaría el sitio catalítico (Brown *et al.*, 1969) y la otra cumpliría una función regulatoria (Brown y Reichard, 1969b), requiriéndose la asociación de ambas para la actividad de la enzima.

Basados en la naturaleza monomérica de la enzima de L. leichmannii, Panagou et al. (1972) interpretan su conducta cinética sobre la base de la proposición de Frieden (1964), de que una enzima monomérica con un sitio modificador puede originar cinéticas no lineales de varios tipos y exhibir activación o inhibición por metabolitos que se unan a dicho sitio.

La ribonucleasa pancreática (ribonucleasa I; EC 3.1.27.5) está constituida por una cadena polipeptídica única de peso molecular 13.600 y presenta varias peculiaridades cinéticas. Una de ellas es que la función de saturación con el ácido 2',3'-citidílico cíclico (0,8 a 12 mM) y otros sustratos sintéticos es sigmoidea a pH sobre 7,2 (Rübsamen et al. 1974), acerca de lo cual nos referimos anteriormente (p. 102). Otra característica es que la función de saturación a pH 7 muestra una aparente inhibición por sustrato, seguida por una aparente reactivación cuando se estudia en un amplio

intervalo de concentraciones de 2',3'-citidílico cíclico, 0,175 a 139 mM (Walker et al. 1975). Para la explicación de esta última propiedad, a la cual los autores denominan transición dependiente de la concentración de sustrato, se ha postulado la existencia de sitios diferentes del sitio catalítico, los cuales podrían unir el sustrato induciendo cambios conformacionales. Las formas enzimáticas resultantes tendrían diferente afinidad por el sustrato en el sitio catalítico y quizás también una diferente actividad catalítica (Walker et al., 1975; 1976). Aunque los autores no lo señalan explícitamente, el modelo que proponen cabe dentro de los conceptos de Frieden (1964) que comentamos antes (p.249). En el caso de la ribonucleasa parecería existir más de un sitio alosté rico, pues experimentos de diálisis en equilibrio han mostrado unión múltiple a la enzima de análogos de sustrato co mo el 3'-CMP y el 3'-AMP, los que desplazan el punto medio de la transición a una concentración menor de CMP cíclico (Walker et al., 1976). Estudios posteriores de este mismo grupo indican que la transición alostérica implica una inte racción electrostática entre las moléculas de sustrato cargadas negativamente y los grupos catiónicos en la enzima (Walker et al., 1978a). Las condiciones de preparación de la ribonucleasa y de su almacenamiento afectan las propieda des cinéticas de ella , razón por la cual no siempre se

observa una cinética no michaeliana (Walker et al., 1978b).

### b) Modelo de transiciones conformacionales lentas

La hexoquinasa de levadura (EC 2.7.1.1, isoenzimas P<sub>I</sub> y P<sub>II</sub>) presenta una aparente cooperatividad negativa con respecto a MgATP a pH inferior a 7 (Kosow y Rose, 1971). La isoenzima P<sub>II</sub> exhibe en la curva de progreso un estallido de alrededor de un minuto de duración a pH 6,5; la forma P<sub>I</sub> también presenta un estallido aunque de menor intensidad (Shill y Neet, 1971). La coexistencia en la hexoquinasa de levadura de cooperatividad y de un estado transitorio, características presentadas también por otras enzimas, llevó a estos últimos autores a derivar un modelo general que diera cuenta de ambos fenómenos: cooperatividad y estados transitorios (Ainslie et al., 1972) (p. 257).

La hexoquinasa de levadura si bien se había descrito como un dímero de peso molecular de alrededor de 100.000, ella se encontraría fundamentalmente como monómero a las concentraciones de enzima usadas en el ensayo habitual, como mostraron los estudios de sedimentación en la ultracentrífuga (Shill et al., 1974). Para dar una explicación de las propiedades cinéticas de la enzima monomérica ( $M_r$  50.000); Shill y Neet (1975) estudiaron las constantes de velocidad en la

fase transitoria del estallido y una vez establecido el régimen estacionario, en diversas condiciones de pH, concentración de enzima, de sustratos y en presencia del activador citrato. Estos estudios les permitieron interpretar el conjunto de propiedades sobre la base del modelo de transiciones conformacionales lentas propuesto por el mismo grupo de investigadores. Así, postularon que la hexoquinasa de levadura existiría en dos formas: E y E'.

La forma E sería la más activa. En presencia de gluco sa y de MgATP se produciría un desplazamiento lento en la distribución de las formas enzimáticas (histéresis) que favorecería la forma menos activa E', lo cual explicaría el estallido en la curva de progreso. Es decir, la velocidad inicial de formación de producto  $(\phi_i)$  correspondería a la distribución inicial de formas enzimáticas y decaería exponencialmente a una velocidad menor  $(\phi_{\tau\tau})$  a medida que E se convierte en E'.  $\phi_i$  sería la velocidad previa a la transición y  $\phi_{\text{II}}$  sería la velocidad en el régimen estacionario; ambas dependerían de la proporción relativa de ambas formas de enzima en uno y otro momento. A bajo pH la transformación ocurriría con un tiempo medio de 1 a 5 minutos (Shill y Neet, 1975). Si inicialmente existiera sólo una forma enzimática (E), no debiera haber cooperatividad con ATP al considerar la velocidad  $\phi_i$ . Esto es lo que ocurre al estudiar la función de saturación de ATP a alta concentración de glucosa en

condiciones de pretransición  $(n_{\mu} = 1.0)$ ; en cambio, durante el régimen estacionario existe una marcada cooperatividad ne gativa  $(n_{_{\rm H}} = 0,06)$  a alta concentración del azúcar. Esto puede interpretarse considerando que la glucosa afecta la dis tribución inicial de ambas formas enzimáticas de modo que concentración alta de glucosa hay una sola forma cinéticamen te importante (E) que contribuye a  $\phi_i$ . El cambio producido por glucosa no sería lo suficientemente rápido como para abo lir la cooperatividad en el régimen estacionario. Por otra parte, a concentraciones bajas de glucosa existe cooperatividad negativa al considerar tanto  $\phi_{i}$  ( $n_{H}$  = 0,69) como  $\phi_{II}$  $(n_{\rm H} = 0.33)$ , lo que sugiere que en estas condiciones las dos formas de enzima están contribuyendo a la velocidad  $\phi_i$ . La función de saturación con glucosa es hiperbólica tanto, al considerar condiciones de pretransición, como de régimen estacionario; sin embargo, a concentraciones de ATP de 5,6 mM existe una ligera desviación de la linearidad en el sentido de cooperatividad negativa.

El modelo completo de isomerización lenta para la hexoqui nasa monomérica es bastante complejo y está esquematizado en la figura 65. En el modelo se ha considerado un mecanismo cinético al azar porque cualquiera de los sustratos puede ser el primero en adicionarse a la enzima y cualquiera de los productos el último en salir; sin embargo, parece existir una

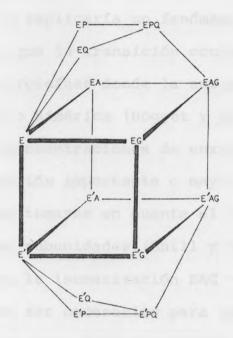


Figura 65. Modelo de isomerización lenta aplicado a la hexoquinasa monomérica de levadura. E y E' son dos conformaciones diferentes de la hexoquinasa. A es MgATP y G es glucosa. P y Q representan productos. Tomado de Shill y Neet, 1975.

vía predominante que operaría a través de los complejos binarios enzima.glucosa (EG) y enzima.glucosa-6-P (EQ) (Collowick, 1973). La transición es causada por un cambio conformacional lento que no implicaría un fenómeno de asociacióndisociación debido a que la transición ocurre en condiciones de concentración de proteínas donde la enzima es monomérica (Shill et al., 1974) o dimérica (Hogget y Kellett, 1976). Al trabajar a altas concentraciones de enzima, cuando el dímero existe en proporción importante o mayoritaria, debería, por supuesto, también tomarse en cuenta el efecto de las interacciones entre las subunidades (Shill y Neet, 1975).

El modelo considera la isomerización EAG  $\rightarrow$  E'AG porque am bos sustratos parecen ser necesarios para que ocurra la transición. En efecto, si bien ésta se produce a bajas concentraciones de cualquiera de los sustratos, no es completa a menos que tanto glucosa como MgATP estén presentes en alta concentración. La isomerización EG  $\rightarrow$  E'G ha sido considera da porque la cooperatividad con MgATP en condiciones de pretransición ( $\phi_i$ ) depende de la concentración de glucosa, lo que podría indicar que glucosa afecta la distribución inicial de la enzima. La isomerización del complejo binario con ATP (EA  $\rightarrow$  E'A) se incluyó por la dependencia de la  $K_m$  aparente para glucosa con respecto a la concentración de MgATP en condiciones de pretransición.

Shill y Neet (1975) consideran que debido al hecho que ca da sustrato puede adicionarse a dos formas diferentes de en zima, la cooperatividad en régimen estacionario puede verse afectada por los niveles fijos del otro sustrato.

Mediante estudios cinéticos, Peters y Neet (1976) han postulado que a un pH inferior a 7 la glucosa y el  $Cr(NH_3)_2$  ATP inducen un desplazamiento lento en la distribución de las formas enzimáticas de la hexoquinasa  $P_{II}$  que favorece a la menos activa (E'). Así, la preincubación a pH 6,5 en presencia de  $Cr(NH_3)_2$  ATP y un azúcar (lixosa o glucosa) logra eliminar el estallido en la curva de progreso, lo que no ocurre al preincubar con  $Cr(NH_3)_2$  ATP hasta por 48 h.

Estudios de fluorescencia y de espectroscopía en ultravio leta han mostrado que existe un cambio conformacional inducido por la unión de glucosa y de  $Cr(NH_3)_2$  ATP a la isoenzima  $P_{II}$ , el cual es diferente de los inducidos por cada ligando separadamente (Peters y Neet, 1978). Por otra parte, estudios de filtración en gel de Wilkinson y Rose (1979), tendientes a determinar si la pérdida histerética de la actividad está asociada a una dimerización, han mostrado que el cambio conformacional puede ocurrir a nivel del monómero. Todos estos estudios son consistentes con lo postulado previamente que la transición observada durante el ensayo sea

causada por una interconversión lenta de dos conformaciones con diferente actividad, pero igual estructura cuaternaria.

En el caso de la  $\delta$ -quimotripsina, que es una enzima monomé rica con un solo sitio catalítico, se conocía que podía experimentar una isomerización lenta inducida por cambios de pH, con cambios de reactividad hacia una variedad de sustra tos (Garel y Labouesse, 1973; Fehrst, 1972). Puesto que las transiciones lentas entre dos o más formas de enzima que tienen diferentes propiedades cinéticas pueden producir una cinética cooperativa, Ainslie y Neet (1979) exploraron la posibilidad de que, con algún sustrato y en ciertas condiciones experimentales, ocurriera cooperatividad. Efectivamente, a pH 9,0 y usando como sustrato el éster del N-carbobenzoxil--L-triptófano con p-nitrofenol encontraron cooperatividad negativa con un coeficiente de Hill de alrededor de 0.6. A concentraciones altas de este sustrato ( >1,0 µM) se observó inhibición por sustrato. Los datos obtenidos a concentraciones de sustrato en que no existe inhibición, pudie ron ajustarse a un mecanismo de transición lenta semejante al esquematizado en la figura 63. La conducta cinética no fue iqual con otros sustratos.

## c) Modelo mnemonico

La hexoquinasa  $L_{\tau}$  de trigo es una proteína constituida por una sola cadena polipeptídica de 50.000 D, con un solo sitio de unión de glucosa. Presenta una cinética michaelia na con respecto a MgATP y una cooperatividad cinética negativa con glucosa, que se muestra en un gráfico de dobles re cíprocos como una línea curva de concavidad inferior. grado de cooperatividad es evaluado a través de un parámetro  $(\Gamma)$ , que corresponde a la segunda derivada de la función de dobles recíprocos a concentración infinita de sustrato. Γ es independiente de la concentración de MgATP y de MgADP y, en cambio, crece fuertemente con la concentración de glu cosa-6-P (Meunier et al., 1974). La conducta cinética de esta enzima se ha interpretado en base al modelo de transición mnemónica (Ricard et al., 1974), esquematizado en la figura 64. La enzima libre existiría en dos estados confor macionales (círculo y rombo). La colisión de cualquiera de estas formas con la glucosa (primer sustrato) induciría una nueva conformación (cuadrado), igual para ambos estados. Después de la unión de MgATP (segundo sustrato) y la libera ción de MgADP (primer producto), la enzima presenta una de las conformaciones iniciales (rombo), la cual es estabiliza da por glucosa-6-P (último producto). Este ligando se

uniría sólo a uno de los dos estados conformacionales de la enzima libre (rombo). La cooperatividad negativa para glucosa surgiría porque  $k_6$  sería menor que  $k_1$ , de modo que, al aumentar la concentración de glucosa, aumentaría la participación de la especie menos reactiva (rombo) en el ciclo catalítico (Meunier et al., 1974).

Mediante estudios cinéticos del estado transitorio de la reacción catalizada por hexoquinasa  $\mathbf{L}_{\mathsf{T}}$ , se han obtenido prue bas de la existencia de la transición mnemónica. Así, usando un sistema de flujo detenido, se ha observado un estallido (burst) en la curva de progreso, el cual se ha interpretado como indicador de un desplazamiento progresivo desde una especie enzimática más reactiva (círculo) a otra con menor capacidad de unir glucosa en forma productiva (rombo) (Ricard et al., 1977). Por otra parte, estudios de salto de temperatura han indicado que en ausencia de ligandos el equi librio estaría muy desplazado hacia la forma más reactiva (Buc et al., 1977). En cambio, si la enzima se preincuba con glucosa-6-P y luego se mezcla con los reaccionantes, la reacción presenta un retardo (lag) en vez de un estallido (burst). Este estado transitorio de retardo correspondería al desplazamiento desde una forma poco reactiva (rombo) a una más reactiva (círculo), ya que al preincubar con gluco sa-6-P se estabilizaría la forma rombo (Meunier et al., 1979).

El análisis de los datos cinéticos del estado transitorio, en términos de espectros de relajación, indica que la unión de glucosa sería un proceso rápido, que iría seguido luego por el paso de transición conformacional, que sería lento (Ricard et al., 1979). El hecho que en la hexoquinasa  $L_{\rm I}$  la transición conformacional inducida por el sustrato sea lenta, apoya mis comentarios en la sección anterior, al comparar el modelo de transición lenta con el de transición mnemónica.

La octopina deshidrogenasa (EC 1.5.1.11) es una enzima que cataliza la fisión oxidativa de la octopina para dar, vía la formación de una base de Schiff, arginina y piruvato (Doublet et.al., 1975).

Se la ha encontrado en músculo de invertebrados marinos y en tejidos vegetales cancerosos. En los invertebrados donde se la ha descrito, parece desempeñar un papel metabólico semejante a la lactato-deshidrogenasa, la cual es muy poco activa o está ausente (Thoai et al., 1969).

La octopina-deshidrogenasa de músculo de *Pecten maximus* L es una enzima monomérica, cuyo peso molecular es de 38.000. Se ha establecido que se trata de una proteína monomérica por varios métodos experimentales: sedimentación en equilibrio en presencia de hidrocloruro de guanidina (6M), electroforesis en poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio y por

el número de péptidos obtenidos por digestión tríptica (Olomucki et al., 1972).

Los estudios espectrofométricos (Pho et al., 1970) y cinéticos han mostrado que la adición de los sustratos a la enzima sique un mecanismo en secuencia ordenada, en la cual NAD es el primer sustrato, seguido por octopina; en cuanto a la liberación de los productos, L-arginina es el primer producto NADH, el último (Doublet y Olomucki, 1975). Los estudios en velocidad inicial muestran una cooperatividad cinética negativa respecto a NAD. El grado de cooperatividad, evaluado a través del parámetro r (pág. 263), es independiente de la concentración del segundo sustrato octopina, pero dependiente del último producto NADH, cuya presencia incrementa el grado de cooperatividad negativa (Monneuse-Doublet et al., 1978). Estos autores interpretan la cooperatividad cinética respecto a NAD sobre la base de un modelo de transición mnemónica muy semejante al aplicado para la hexoquinasa L, (Meunier et al., 1974). La existencia de un segundo sitio de unión de NAD está descartada por estudios de unión de NAD a la enzima (Baici et al., 1974). Por otra parte, estudios de sedimentación en la ultracentrífuga muestran un único pico simétrico para la apoenzima y para el complejo binario Enzima-NAD, con coeficientes de sedimentación iguales, 3,09 S y 3,02 S respectivamente. (Monneuse-Doublet et al., 1978). Este resultado descartaría una asociación de la enzima por NAD, pero no descarta la posibilidad de una asociación en las condiciones de ensayo.

### 3. PROPOSICIONES DE MODELOS PARA GLUCOQUINASA

Dada su estructura monomérica bajo todas las condiciones de ensayo, es obvio que las desviaciones de la conducta cinética de la glucoquinasa no pueden deberse a las interacciones entre subunidades (Monod et al., 1965; Koshland et al. 1966), puesto que la enzima está constituida por una sola cadena polipeptídica. Por la misma razón tampoco pueden ser explicadas por una posible asociación reversible de la enzima (Frieden, 1967; Nichol et al., 1967).

La posibilidad de existencia de dos o más sitios activos interactuantes por molécula de glucoquinasa, puede descartarse por experimentos de marcación por afinidad en los cuales, al usar el derivado N-(N-bromo[1-14C]acetil)-6-aminohexanoilglucosa, se ha mostrado la existencia de un único sitio activo (Connolly y Trayer, 1979). En efecto, aunque dos moles de reactivo pueden incorporarse por mol de enzima, solo uno de ellos parece hacerlo en el área del sitio activo. Esta conclusión surge porque, al hacer los experimentos de marcación en presencia de concentración saturante de N-acetilglucosa-mina (70 mM), hay incorporación de un mol de reactivo sin pérdida de la actividad catalítica. La unión al segundo sitio parece ser, en opinión de los autores, bastante inespecífica.

Hemos propuesto explicaciones para la conducta cinética de la glucoquinasa que han ido evolucionando con el tiempo.

Así han surgido los modelos I, II y III que analizaremos a continuación. Presentaremos también el modelo mnemónico postulado por Storer y Cornish Bowden (1977) para la conducta cinética de la glucoquinasa, el cual también se ha visto modificado con el transcurrir del tiempo.

### a) Modelo I

Debido a las características estructurales ya comentadas, la conducta cooperativa de la glucoquinasa con glucosa y con manosa debe ser explicada en términos puramente cinéticos. En un comienzo consideramos simplemente un modelo en régimen estacionario con unión al azar de sustratos (Cárdenas et al., 1976; Cárdenas et al., 1977), basado en los planteamientos de Ferdinand (1966) (Modelo I, Fig. 66). Este modelo surgió como consecuencia de la observación de que el grado de sigmoidicidad de la función de saturación de la glucoquinasa con glu-cosa, era dependiente de la concentración de MgATP. Como se recordará, en el capítulo 4 de Resultados se mostró que a bajas concentraciones del sustrato nucleotídico la función de saturación se hace hiperbólica.

En el modelo I la reacción glucoquinásica operaría mediante un mecanismo al azar en régimen estacionario, donde habría
dos vías para formar el complejo ternario que llevaría a los
productos. Una a través del complejo binario enzima.glucosa
y otra a través del complejo enzima.MgATP. La vía cinéticamente

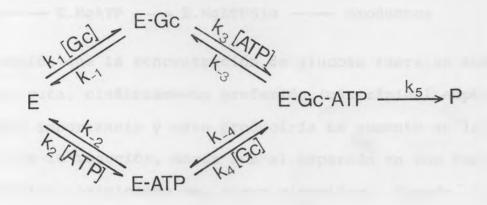


Figura 66. Modelo I postulado para explicar la cooperatividad cinética de la glucoquinasa con glucosa. E-Gc complejo binario enzima.glucosa. E-ATP, complejo binario enzima.MgATP. E-Gc-ATP, complejo ternario enzima.glucosa.MgATP. P, productos (glucosa-6-P y MgADP).

preferida sería aquella que implica la unión de glucosa como primer sustrato. La cooperatividad surgiría porque la glucosa podría unirse a dos especies enzimáticas no equivalentes, la enzima libre y el complejo binario enzima.MgATP. A alta concentración del sustrato nucleotídico, la enzima existiría en su mayor parte como complejo binario E.MgATP. En estas condiciones, al ser baja la concentración de glucosa, la ruta de reacción sería fundamentalmente la siguiente:

$$E \longrightarrow E.MgATP \longrightarrow E.MgATPGlc \longrightarrow productos$$

A medida que la concentración de glucosa fuera en aumento, la otra ruta, cinéticamente preferida (más rápida) empezaría a cobrar importancia y esto produciría un aumento en la velocidad de la reacción, mayor que el esperado en una función hiperbólica, originando una curva sigmoidea. Cuando la concentración de MgATP fuera suficientemente baja, alrededor de 0,2 veces su valor de K<sub>0.5</sub> o menor, la concentración del complejo binario E.MgATP sería despreciable. Este hecho permitiría que la glucosa aún a bajas concentraciones podría unirse a la enzima libre que ahora sería la especie predominante. De esta manera operaría sólo la ruta cinéticamente preferida, lo que resultaría en una función de saturación hiperbólica para glucosa.

Si bien cuando surgió este modelo no se conocía el posible mecanismo cinético de la glucoquinasa, la postulación de un mecanismo al azar, con unión de glucosa a la enzima como vía

preferencial, era posible dado que un mecanismo semejante parece operar en hexoquinasas (Colowick, 1973).

Por otra parte, la observación de que Tritón X-100 y urea no lograran modificar la cooperatividad de la glucoquinasa, no obstante ser agentes que en general alteran la conformación de proteínas, sugería que la enzima, como especie libre, existiría básicamente en una conformación única. De existir dos conformaciones con diferentes propiedades cinéticas, se podría haber esperado que en presencia de tritón y urea se hubiera alterado el grado de cooperatividad, puesto que con mucha probabilidad ellos podrían haber alterado diferentemente ambas conformaciones. La glucoquinasa aparecía así bastante diferente a la hexoquinasa de trigo L<sub>I</sub>, en la cual, como se comentó anteriormente (pág.150 ), una pequeña concentración de urea elimina la cooperatividad (Meunier et al.,1974). Los autores plantean que este hecho es "probablemente la evidencia más directa en favor del concepto de enzima mnemónica".

El hecho que tratamientos de la glucoquinasa, como fotooxidación y calentamiento, tampoco fueran capaces de modificar el grado de cooperatividad, contribuía también a apoyar la idea que la enzima libre existiría básicamente en una conformación, e inducía a pensar que el fenómeno de cooperatividad era inherente al mecanismo catalítico. En efecto, según se mostró en Resultados (capítulos 2 y 3), en la medida en que la glucoquinasa permanecía activa retenía la conducta cinética

cooperativa. Esta situación parecía compatible con el modelo I.

El modelo I permitía dar una explicación intuitiva de la disminución de la cooperatividad en presencia de los inhibidores competitivos de la glucoquinasa respecto a glucosa, como son el sustrato alternativo manosa y el análogo N-acetilglucosamina. Al aumentar la concentración de los inhibidores debe aumentarse también la concentración de glucosa para definir la función de saturación de la enzima con este sustrato. En estas condiciones la enzima se hace menos accesible al ATP, cuya concentración se mantiene constante. Es decir, la vía a través del complejo binario E.MgATP se haría menos probable y la contribución de ella a la formación de productos disminuiría a medida que aumenta la concentración del inhibidor.

Se intentó el análisis matemático de las ecuaciones de velocidad inicial con intervención de los inhibidores. Se buscaba verificar una alteración de las relaciones de los parámetros cinéticos de la ecuación 11 (pág. 255-256 ). De producirse una alteración, ella podría dar cuenta de la desaparición del efecto cooperativo de la glucosa. Con este objeto, se derivaron ecuaciones en velocidad inicial para el sistema en presencia del inhibidor competitivo N-acetilglucosamina o del sustrato alternativo manosa. La derivación se hizo según el método gráfico de King y Altman (Segel, 1975), y se consideraron las especies enzimáticas correspondientes a los esquemas de la figura 67. Se obtuvieron ecuaciones del mismo tipo que

a EI 
$$\frac{k_6}{k_{-6}}$$
 E  $\frac{k_1}{k_{-6}}$  E  $\frac{k_1}{k_{-6}}$   $\frac{k_1}{k_{-6}}$   $\frac{k_2}{k_{-6}}$   $\frac{k_3}{k_{-6}}$   $\frac{k_3}{k_{-6}}$   $\frac{k_4}{k_4}$  EAI  $\frac{k_6}{k_6}$   $\frac{k_6}{k$ 

Figura 67. Esquema de un mecanismo al azar de unión de sustratos en presencia de un inhibidor competitivo (I). EG, complejo binario E.Glc;
EA, complejo binario E.MgATP; EGA, complejo ternario E.Glc.MgATP; EP,
complejo ternario E.Glc-6-P.MgADP; P, productos (glucosa-6-P, MgADP).

a) y b) I, N-acetilglucosamina, EI, complejo binario E.GlcNac; EIA,
complejo ternario E.GlcNAc.MgATP.

c) I, manosa; P\*, manosa-6-P y MgADP; EI, E.Man; EIA, E.Man.MgATP.

la ecuación 11, en las cuales los coeficientes cinéticos eran funciones complejas de las concentraciones de los análogos de glucosa.

En el caso en que el inhibidor se une solo a la enzima libre (Fig. 67a) se obtiene la ecuación 18,i

$$\frac{v}{E_o} = \frac{c_1 AG + C_2 AG^2 + C_3 A^2 G}{C_7 + C_8 G + C_9 A + C_{10} AG + C_{11} G_2 + C_{12} A_2 + C_{13} G^2 A}$$

$$+ C_{14} GA_2 + C_{15} I + C_{16} GI + C_{17} AI + C_{18} AGI$$
(18)

donde, A es MgATP, G es glucosa y  $C_1$  a  $C_{18}$  son combina - ciones de constantes de velocidad. Al considerar constante la concentración de MgATP, la ecuación 18 se reduce a

$$\frac{v}{E_o} = \frac{iG^2 + jG}{k^* + 1G^2 + m^*G}$$
 (19)

$$i = C_2A$$

$$j = C_1A + C_3A^2$$

$$k^* = C_7 + C_9A + C_{12}A^2 + C_{15}I + C_{17}AI$$

$$1 = C_{11} + C_{13}A$$

$$m^* = C_8 + C_{10}A + C_{14}A^2 + C_{16}I + C_{18}AI$$

Si el inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo binario E.MgATP (Fig. 67b) se obtiene la ecuación 20, la cual se reduce a la ecuación 21 al considerar constante la concentración de MgATP.

$$\frac{v}{E_o} = \frac{C_1AG + C_2A^2G + C_3A^3G + C_4AGI + C_5A^2GI + C_6AG^2 + C_7A^2G^2}{C_8 + C_9A + C_{10}A^2 + C_{11}A^3 + C_{12}I + C_{13}I^2 + C_{14}AI +}$$

$$+ C_{15}A^2I + C_{16}A^3I + C_{17}AI^2 + C_{18}A^2I^2 + C_{19}G + C_{20}AG$$

$$+ C_{21}A^2G + C_{22}A^3G + C_{23}GI + C_{24}AGI + C_{25}A^2GI + C_{26}G^2$$

$$+ C_{27}AG^2 + C_{28}A^2G^2$$

$$\frac{v}{E_o} = \frac{i'G^2 + *j'G}{*k' + 1'G^2 + *m'G}$$
 (21)

$$i' = C_6A + C_7A^2$$

$$*j' = C_1A + C_2A^2 + C_3A^3 + C_4AI + C_5A^2I$$

$$*k' = C_8 + C_9A + C_{10}A^2 + C_{11}A^3 + C_{12}I + C_{13}I^2 + C_{14}AI + C_{15}A^2I$$

$$+ C_{16}A^3I + C_{17}AI^2 + C_{18}A^2I^2$$

$$1' = C_{26} + C_{27}A + C_{28}A^2$$

$$*m' = C_{19} + C_{20}A + C_{21}A^2 + C_{22}A^3 + C_{23}I + C_{24}AI + C_{25}A^2I$$

El \* indica que esos coeficientes cinéticos dependen de la concentración del inhibidor.

En el caso de manosa (Fig. 67c) que, por presentar la misma conducta cinética que glucosa debería unirse tanto a la enzima libre como al complejo binario E.MgATP, se obtiene la ecuación 22, la cual se reduce a la ecuación 23 al considerar constante la concentración de MgATP.

$$\frac{v}{E_{\circ}} = \frac{C_{1}AG + C_{2}A^{2}G + C_{3}A^{3}G + C_{4}AGI + C_{5}A^{2}GI + C_{6}A^{2}B + C_{7}A^{2}G^{2}}{C_{8} + C_{9}A + C_{10}A^{2} + C_{11}A^{3} + C_{12}I + C_{13}I^{2} + C_{14}AI + C_{15}A^{2}I + C_{16}A^{3}I + C_{17}AI^{2} + C_{18}A^{2}I^{2} + C_{19}G + C_{20}AG + C_{21}A^{2}G + C_{22}A^{3}G + C_{23}GI + C_{24}AGI + C_{25}A^{2}GI + C_{26}G^{2} + C_{27}AG^{2} + C_{28}A^{2}G^{2}$$

(23) 
$$\frac{v}{E_o} = \frac{i''G^2 + *j''G}{*k'' + 1''G^2 + *m''G}$$

$$\begin{split} \mathbf{i''} &= & C_6 \mathbf{A} + C_7 \mathbf{A}^2 \\ *\mathbf{j''} &= & C_1 \mathbf{A} + C_2 \mathbf{A}^2 + C_3 \mathbf{A}^3 + C_4 \mathbf{A} \mathbf{I} + C_5 \mathbf{A}^2 \\ *\mathbf{k''} &= & C_8 + C_9 \mathbf{A} + C_{10} \mathbf{A}^2 + C_{11} \mathbf{A}^3 + C_{12} \mathbf{I} + C_{13} \mathbf{I}^2 + C_{14} \mathbf{A} \mathbf{I} \\ & + C_{15} \mathbf{A}^2 \mathbf{I} + C_{16} \mathbf{A}^3 \mathbf{I} + C_{17} \mathbf{A} \mathbf{I}^2 + C_{18} \mathbf{A}^2 \mathbf{I}^2 \\ \mathbf{1''} &= & C_{26} + C_{27} \mathbf{A} + C_{28} \mathbf{A}^2 \\ *\mathbf{m''} &= & C_{19} + C_{20} \mathbf{A} + C_{21} \mathbf{A}^2 + C_{22} \mathbf{A}^3 + C_{23} \mathbf{I} + C_{24} \mathbf{A} \mathbf{I} + C_{25} \mathbf{A}^2 \mathbf{I} \end{split}$$

Como ya se comentó, las ecuaciones 19, 21 y 23 son semejantes a la ecuación 11 (pág. 255). En los tres casos, la
presencia del inhibidor afecta ambos términos de la expresión 12 (pág. 256), lo que hace difícil predecir su efecto.
Podría pensarse que, dado que ambos términos de la desigualdad
dependen de la concentración de inhibidor, éste no debiera
suprimir la cooperatividad, pues la desigualdad se mantendría.
Sin embargo, es necesario considerar que, por los valores relativos de los coeficientes cinéticos, el peso de la concentración de inhibidor en ambos términos podría ser diferente.

Se trató de ajustar los datos experimentales a la ecuación 11 a fin de obtener los valores de los coeficientes i, j, k, 1 y m, y determinar la variación de estos en función de la concentración de ATP o de los inhibidores competitivos respecto a glucosa. La idea era, por una parte, verificar si los valores obtenidos para los coeficientes cumplían la desigualdad 12 (ki > mj; im > j1) y, por otra, determinar si ésta se alteraba al disminuir experimentalmente la concentración de ATP o añadir inhibidores al medio de reacción de la glucoquinasa, condiciones ambas en las cuales se tenía una cinética hiperbólica.

Esta operación, sin embargo no resultó satisfactoria. Si bien se logró obtener valores para los coeficientes i, j, k, l y m, los cuales cumplían la desigualdad l2 a alta concentración de ATP y en ausencia de inhibidores, ellos no ajustaban adecuadamente los datos experimentales a la ecuación l1.

No se prosiguieron estos intentos porque surgió el modelo II
y porque se pensó, además, que sería preferible tratar de
realizar una simulación directa del sistema. Como se verá más
adelante, esta simulación se realizó en el modelo III.

## b) Modelo II

La primera proposición (modelo I) fue modificada más adelante, introducióndose un cambio conformacional en la enzima que condujo a la formulación del modelo II.

Este cambio se produjo porque, por una parte, se tomó conciencia que desde el punto de vista molecular, es difícil explicar una diferencia de velocidad entre las dos vías si se consideran solo las constantes de asociación de sustratos a la enzima libre o a complejos binarios. En efecto, parece ser que los procesos de asociación son muy rápidos y aparentemente solo controlados por difusión (Frieden, 1970; Gutfreund, 1975). Experimentalmente se ha determinado que en general las constantes de asociación bimoleculares son del orden de 10<sup>7</sup> a 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> (Eigen y Hammes, 1963).

Por otra parte, la falta de inhibición por N-acetilgluco - samina y por manosa a bajas concentraciones de glucosa parecía explicarse mejor como la consecuencia de dos efectos simultáneos: por un lado, la inhibición competitiva y, por otro,
una estimulación debida a la inducción de una conformación más activa.

En el modelo II la glucoquinasa existiría en dos conformaciones:  $\mathbf{E_I}$  (círculo) y  $\mathbf{E_{II}}$  (cuadrado) (Fig. 68) (Cárdenas, 1978; Cárdenas et al., 1979). En ausencia de ligandos, se encontraría básicamente en una conformación  $\mathbf{E_I}$  y la conformación  $\mathbf{E_{II}}$  sería cuantitativamente despreciable.  $\mathbf{E_I}$  podría unir ambos sustratos, glucosa o MgATP, para formar los complejos binarios respectivos. La unión de glucosa induciría un cambio conformacional, originando la conformación  $\mathbf{E_{II}}$ . Este cambio ocurriría tanto cuando la glucosa se une a la enzima libre  $\mathbf{E_I}$ , como

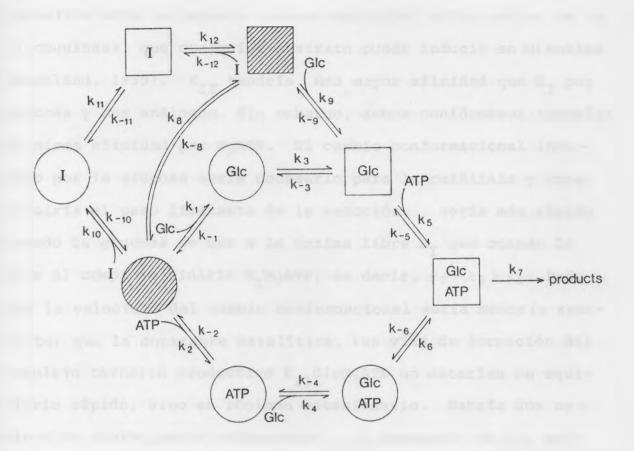


Figura 68. Modelo II postulado para explicar la cooperatividad cinética de la glucoquinasa con glucosa. El círculo (conformación  $\mathbf{E_I}$ ) representa el estado de la glucoquinasa predominante en la ausencia de glucosa (Glc) y análogos (I). El cuadrado (conformación  $\mathbf{E_{II}}$  corresponde al estado inducido por glucosa y análogos. ATP, MgATP. De Cárdenas et al., 1979.

cuando se une al complejo binario  $E_{\mathsf{T}}^{\mathsf{MgATP}}$ . En cambio, el MgATP induciría solo la pequeña reorganización del sitio activo de la glucoquinasa que cualquier sustrato puede inducir en su enzima (Koshland, 1959).  $\mathbf{E}_{\mathrm{II}}$  tendría una mayor afinidad que  $\mathbf{E}_{\mathrm{I}}$  por glucosa y sus análogos. Sin embargo, ambos confórmeros tendrían la misma afinidad por MgATP. El cambio conformacional inducido por la glucosa sería necesario para la catálisis y constituiría el paso limitante de la reacción; sería más rápido cuando la glucosa se une a la enzima libre  $\mathbf{E}_{_{\mathrm{T}}}$  que cuando lo hace al complejo binario  $E_TMgATP$ , es decir,  $k_7 > k_3 > k_6$ . Dado que la velocidad del cambio conformacional sería menor (o semejante) que la constante catalítica, las vías de formación del complejo ternario productivo  $E_{\mathsf{TT}}\mathsf{GlcMgATP}$  no estar**í**an en equilibrio rápido, sino en régimen estacionario. Habría dos caminos no equivalentes conducentes a la formación de los productos. Uno operaría a través del complejo  $E_{\tau}Glc$  y el otro operaría a través del complejo  $E_{\mathsf{T}} \mathsf{MgATP}$ . La distribución relativa de ambos complejos binarios en el régimen estacionario sería una función de la concentración relativa de ambos sustratos, expresada como fracción de saturación. Ambas vías no serían equivalentes desde el punto de vista cinético debido a la diferencia de velocidad en el cambio conformacional inducido por la glucosa, que constituiría el paso limitante de la reacción.

Por razones de simplicidad se omitió de este modelo el

complejo binario  $\mathbf{E}_{\text{II}}^{\text{MgATP}}$ , así como la unión de MgATP al complejo binario  $\mathbf{E}_{\text{T}}^{\text{Glc}}$ .

La cooperatividad cinética con glucosa resultaría del hecho que cuando la concentración de este sustrato es pequeña con respecto al valor de su  ${\rm K}_{0.5}$ , la glucosa se uniría principalmente al complejo binario  ${\rm E}_{\rm I}{\rm MgATP}$ . Este complejo existiría en una concentración relativamente alta a niveles saturantes de ATP, y así el paso más lento predominaría. Sin embargo, a medida que la concentración de glucosa aumenta, el camino más rápido adquiriría mayor importancia, pues la glucosa podría competir exitosamente con MgATP por la enzima libre y la reacción operaría cada vez más a través de la formación del complejo binario  ${\rm E}_{\rm I}{\rm Glc.}$  De esta manera, a medida que la concentración de glucosa crece, se origina una cooperatividad positiva, pues la fracción del camino más rápido se hace mayor.

Con el objeto de satisfacer restricciones termodinámicas, las constantes de velocidad en las asas cerradas (closed-loops) no pueden ser independientes y deben cumplir el requisito que el producto de las constantes de velocidad en un sentido sea igual al producto de las constantes de velocidad en sentido inverso:

$$k_{8}k_{9}k_{-3}k_{-1} = k_{1}k_{3}k_{-9}k_{-8}$$

$$k_{10}k_{11}k_{12}k_{-8} = k_{8}k_{-12}k_{-11}k_{-10}$$

$$k_{1}k_{3}k_{5}k_{-6}k_{-4}k_{-2} = k_{2}k_{4}k_{6}k_{-5}k_{-3}k_{-1}$$

$$k_{8}k_{9}k_{5}k_{-6}k_{-4}k_{-2} = k_{2}k_{4}k_{6}k_{-5}k_{-9}k_{-8}$$

$$k_{10} k_{11} k_{12} k_{9} k_{-3} k_{-1} = k_{1} k_{3} k_{-9} k_{-12} k_{-11} k_{-10}$$

$$k_{10} k_{11} k_{12} k_{9} k_{5}^{2} k_{-6} k_{-4} k_{-2} = k_{2} k_{4} k_{6} k_{-5} k_{-9} k_{-12} k_{-11} k_{-10}$$

Estos requisitos se satisfacen si suponemos que:

i) La constante de transición del cambio conformacional de la forma libre de enzima ( ${\rm E_{II}/E_{I}}$ ) favorece la existencia de  ${\rm E_{I}}$ .

$$\frac{k_8}{\ldots} << 1$$

ii) La unión de glucosa o sus análogos (manosa, 2-desoxiglucosa, fructosa, N-acetilglucosamina) aumenta la velocidad de la transición conformacional de  ${\rm E_I}$  a  ${\rm E_{II}}$  y disminuye (o no modifica) la velocidad de conversión de  ${\rm E_{II}}$  a  ${\rm E_{II}}$ , lo que se traduce en un aumento del valor de la constante de transición.

$$\frac{k_8}{k_{-8}} < \frac{k_6}{k_{-6}} \cdot \frac{k_3}{k_{-3}} \cdot \frac{k_{11}}{k_{-11}}$$

iii) La unión de MgATP disminuye la velocidad de interconversión de los confórmeros inducida por glucosa o manosa.

$$k_6 < k_3$$
 ,  $k_{11}$   $k_{-6} < k_{-3}$  ,  $k_{-11}$ 

iv) La afinidad de  $\mathbf{E}_{\mathbf{I}\mathbf{I}}$  es mayor que la de  $\mathbf{E}_{\mathbf{I}}$  para glucosa y sus análogos.

$$\frac{k_{-9}}{k_9} < \frac{k_{-1}}{k_1}, \frac{k_{-4}}{k_4} \qquad \frac{k_{12}}{k_{-12}} < \frac{k_{-10}}{k_{10}}$$

v) La afinidad de  $E_{I}$  y de  $E_{II}$ .Glc por MgATP es la misma.

$$\frac{k_{-2}}{k_2} = \frac{k_{-5}}{k_5}$$

La enzima que se libera al final del ciclo catalítico volvería rápidamente a la conformación  $\mathbf{E}_{\mathrm{I}}$ , por lo que la enzima libre existiría predominantemente en esta conformación a concentraciones bajas de glucosa.

Un punto clave sería poder discernir si la cooperatividad surge principalmente porque al aumentar la concentración de glucosa incrementa la fracción de la vía que opera a través del complejo binario  ${\rm E_I}.{\rm Glc}$ , o porque al aumentar la concentración de glucosa aumenta la probabilidad de que este ligando atrape la especie  ${\rm E_{II}}$  antes que ella sufra la transición a  ${\rm E_I}$ , o porque ambas circunstancias se dan conjuntamente con diferente grado, según las condiciones del experimento.

La presencia de análogos de glucosa, N-acetilglucosamina, manosa, 2-desoxiglucosa y fructosa, suprimiría la cooperatividad como consecuencia de un desplazamiento en la distribución de conformaciones de la enzima. En efecto, en presencia de concentraciones suficientemente altas de estos inhibidores, la mayor parte de la enzima libre existiría como  $E_{II}$ , pues aquellos serían capaces de inducir el cambio conformacional de  $E_{I}$  a  $E_{II}$ . Luego, glucosa y MgATP competirían por esta forma, originándose los complejos binarios  $E_{II}$ Glc y  $E_{II}$ MgATP, que serían equivalentes desde el punto de vista cinético, debido a que el paso de transición lenta estaría sobrepasado. Como consecuencia la función de saturación con glucosa se haría hiperbólica. Por otra parte, el hecho que en presencia de los inhibidores se deba incrementar la concentración de glucosa, hace que este sustrato compita efectivamente con MgATP por la enzima libre.

Los estudios cinéticos de fosforilación de 2-desoxiglucosa en presencia de análogos de ATP (Niemeyer et al., 1978;

Monasterio, 1980) son compatibles con un mecanismo al azar con una ruta preferencial marcada, que operaría a través del complejo binario E.dGlc. Dependiendo de las concentraciones

relativas de ambos sustratos, podría operar la ruta a través del complejo E.MgATP, el cual sería catalíticamente activo.

El hecho que MgATP, en ausencia de glucosa, proteja a la glucoquinasa de la fotooxidación con Rosa de Bengala (Monasterio, 1980), apoya la idea de la existencia de un complejo E.MgATP. Del mismo modo, el efecto protector del MgATP frente a la modificación por DTNB, aunque leve, contribuye a apoyar la existencia del complejo binario E.MgATP (Heberlein, 1979; Monasterio et al., 1979; Monasterio, 1980). La existencia de dicho complejo sería compatible con la operación de un mecanismo al azar con una ruta preferencial donde dGlc fuera el primer sustrato (Monasterio, 1980). Un mecanismo semejante podría operar en el caso de glucosa.

El hecho que la glucoquinasa presente cinética hiperbólica con fructosa y con 2-desoxiglucosa, podría explicarse suponiendo que con estos sustratos hay diferencias respecto a glucosa en la velocidad de las transiciones conformacionales. Así, podría suponerse que en el caso de 2-desoxiglucosa, la velocidad de transición conformacional  $\mathbf{E}_{\mathbf{I}}\mathbf{GGlc} \rightarrow \mathbf{E}_{\mathbf{II}}\mathbf{GGlc} \ (k'_3)$  fuera igual a la velocidad de transición  $\mathbf{E}_{\mathbf{I}}\mathbf{MgATPdGlc} \rightarrow \mathbf{E}_{\mathbf{II}}\mathbf{MgATPdGlc} \ (k'_6)$ , y menor que la velocidad de transición  $\mathbf{E}_{\mathbf{T}}\mathbf{Glc} \rightarrow \mathbf{E}_{\mathbf{T}}\mathbf{Glc} \ (k'_8)$ .

Es decir  $k'_3 = k'_6 < k_3$ . Con fructosa en cambio, la transición  $E_I$  Fru  $\rightarrow E_{II}$  Fru podría ser igual a la transición  $E_I$  MgATPFru  $\rightarrow E_{II}$  MgATPFru, pero mayor que la velocidad de transición  $E_I$  Glc  $\rightarrow E_{II}$  Glc. Es decir,  $k'_3 = k'_6 > k_3$ .

Estas diferencias podrían explicar además, el que la  $V_{\rm max}$  con 2-desoxiglucosa fuera menor que la obtenida con glucosa (Monasterio, 1980), en contraposición a lo que ocurre con fructosa en que la  $V_{\rm max}$  es mayor (esta Tesis, capítulo 1 de Resultados, figura 13, pág. 82).

### c) Modelo III

En vista de la complejidad del comportamiento cinético de la glucoquinasa, hecho que dificultaba una solución analítica del sistema, pareció conveniente intentar su simulación. Con este objeto, se decidió ampliar el modelo II y tomar en cuenta todos los complejos posibles. Surgió, así, un modelo de ocho estados, Modelo III, que se esquematiza en la figura 69 (Olavarría et al., 1979).

En el modelo III, resultante de la simulación, al igual que en el modelo II, la glucoquinasa existe básicamente en la conformación I (círculo) en ausencia de ligandos. Ambos modelos comparten las presunciones i), ii), iv) y v) que, expresadas en términos de las constantes cinéticas del modelo III, serían:

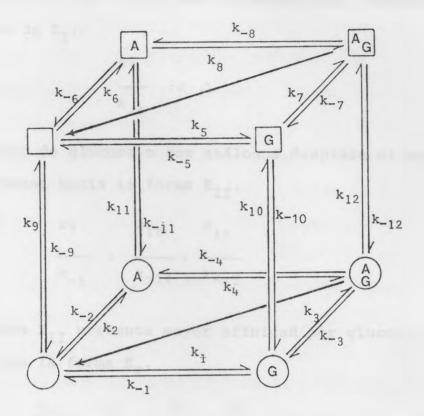


Figura 69. Modelo III postulado para explicar la cooperatividad cinética de la glucoquinasa con glucosa. El círculo, conformación  $E_{\rm I}$ , representa el estado de la glucoquinasa predominante en ausencia de glucosa (G). El cuadrado, conformación  $E_{\rm II}$ , corresponde al estado inducido por glucosa o sus análogos. A, MgATP.  $k_{11} = \alpha k_9$ ;  $k_{-11} = \alpha k_{-9}$ ;  $\alpha > 1$   $(k_{11}/k_{-11}) = (k_9/k_{-9}) < (k_{10}/k_{-10})$ ;  $(k_{12}/k_{-12})$ .

i) La constante de transición conformacional favorece la existencia de  $\mathbf{E}_{\mathtt{T}}$  .

$$\frac{k_9}{\cdots} << 1$$

ii) La unión de glucosa o sus análogos desplaza el equilibrio conformacional hacia la forma  $\mathbf{E}_{\mathsf{TT}}$ .

iv) La forma  $\mathbf{E}_{\mathbf{II}}$  presenta mayor afinidad por glucosa y sus análogos que la forma  $\mathbf{E}_{\mathbf{I}}$ .

$$\frac{k_5}{k_{-5}}$$
,  $\frac{k_8}{k_{-8}}$  >  $\frac{k_1}{k_{-1}}$ ,  $\frac{k_4}{k_{-4}}$ 

v) El ATP no altera el equilibrio conformacional de la glucoquinasa, pues la afinidad de ambos confórmeros por este ligando, es la misma.

$$\frac{k_{6}}{k_{-6}} = \frac{k_{2}}{k_{-2}} : \frac{k_{7}}{k_{-7}} = \frac{k_{3}}{k_{-3}}$$

No comparte la presunción iii) que establece el efecto negativo del MgATP previamente unido a la enzima, para la transición conformacional inducida por glucosa o manosa.

En el modelo III el cambio conformacional no sería requisito indispensable para la catálisis, pudiendo la constante catalítica ( $k_c$ ) del complejo ternario  $E_I$ GlcMgATP ser menor o incluso igual a la del complejo  $E_{II}$ GlcMgATP. El énfasis estaría en este modelo en la diferencia de afinidad por glucosa y sus análogos (manosa, 2-desoxiglucosa, fructosa , N-acetilglucosamina ) de la forma II con respecto a la forma I.

A concentraciones bajas de glucosa y altas de MgATP se formaría el complejo binario  ${\rm E_I}{\rm MgATP}$ , el cual tendría una mayor probabilidad de unir glucosa y formar el complejo ternario  ${\rm E_I}{\rm GlcMgATP}$ , que de sufrir la transición y luego unir glucosa para originar el complejo  ${\rm E_{II}}{\rm GlcMgATP}$ . El complejo  ${\rm E_{II}}{\rm GlcMgATP}$  liberaría después de la catálisis la forma I y el complejo  ${\rm E_{II}}{\rm GlcMgATP}$  la forma II. De la diferente afinidad de ambas formas por glucosa surgiría el fenómeno de cooperatividad. Al aumentar la concentración de glucosa, ésta podría competir exitosamente con MgATP por la forma  ${\rm E_{I}}$ . Se formaría así el complejo binario  ${\rm E_{I}}{\rm Glc}$ , que podría sufrir la transición con mayor probabilidad que  ${\rm E_{I}}{\rm MgATP}$ , y uniría luego MgATP. Así, se formaría el complejo  ${\rm E_{II}}{\rm GlcMgATP}$ , el cual liberaría después de la catálisis la forma  ${\rm E_{II}}$ , con mayor afinidad por glucosa que  ${\rm E_{I}}$ .

El modelo III fué simulado en una computadora construida especialmente para la simulación directa de modelos enzimáticos estocásticos, por el Dr. J. M. Olavarría, en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar,

Buenos Aires, Argentina. Este equipo permite representar en forma de una matriz de transiciones un modelo enzimático de hasta ocho estados, en el cual los cambios de estados (isomerizaciones, asociaciones o disociaciones) son representados por señales aleatorias de probabilidad prefijable. Estas señales aleatorias representan los parámetros del modelo y son producidas por generadores aleatorios independientes.

Los resultados de las simulaciones permitieron reproducir cualitativamente algunos de los resultados experimentales. Así, se reprodujo la cooperatividad positiva con glucosa y con manosa, obteniéndose valores de  $n_{\rm H}$  equivalentes a los experimentales. Con MgATP en cambio la cinética fue michaeliana a semejanza de lo que ocurre experimentalmente.

El hecho que la cooperatividad de la enzima frente a glucosa fuera dependiente de la concentración de MgATP, se podía atribuir al efecto de este ligando sobre la velocidad del cambio conformacional de la enzima. Al hacer la simulación del modelo III se encontró que, si se suponía que el ATP unido a la enzima aumentaba la velocidad de transición conformacional en ambos sentidos, por un factor de 10, se obtenía un efecto de este ligando similar al observado en el sistema real. Al reducir la concentración de MgATP se disminuía gradualmente el  $\rm n_H$  y el  $\rm K_{0.5}$  para glucosa. A concentraciones suficientemente bajas de ATP se logró obtener valores de  $\rm n_H$  próximos a 1,0 (1,1 à 0,9), reproduciéndose cualitativamente las curvas

de la figura 34, sobre dependencia de los parámetros cinéticos  $K_{0.5}$  y  $n_{\rm H}$  respecto a la concentración de MgATP. En la simulación, al aumentar la concentración de ATP muy por encima de las concentraciones experimentales usadas en esta Tesis, se observó que el  $n_{\rm H}$  vuelve a reducirse, pero no el  $K_{0.5}$  para glucosa. La reducción del coeficiente de Hill a altas concentraciones de ATP no se ha observado experimentalmente, posiblemente debido a que las concentraciones usadas ( $\pm$  20 veces el  $K_{0.5}$  para ATP) no fueron suficientemente altas en comparación con las concentraciones de ATP usadas en la simulación (sobre 100 veces el  $K_{0.5}$  para ATP).

Para simular el efecto de inhibidores competitivos habría sido necesario considerar un modelo de 12 estados. Dado que el instrumento solo permitía usar un módulo que representa un elemento (una molécula de enzima) y las transiciones entre ocho estados posibles como máximo, se tuvo que simplificar el modelo para el estudio de inhibidores. Se consideró una concentración muy alta de ATP y, aceptando que el sistema está permanentemente saturado con ATP, se pudo disminuir a seis en vez de doce, el número de especies enzimáticas en juego (Fig. 70). La simulación de este modelo permitió comprobar que un inhibidor competitivo (sustrato o no) modificaba el n<sub>H</sub> para la glucosa tal como en el sistema real. El modelo supone que el inhibidor competitivo, al igual que la glucosa, desplaza el equilibrio conformacional hacia la forma E<sub>II</sub>. La figura 71

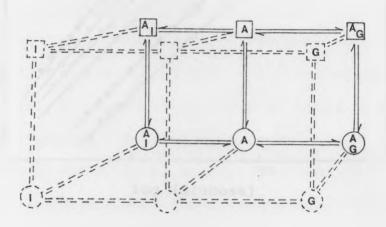


Figura 70. Modelo III en presencia de un inhibidor competitivo para glucosa y a muy altas concentraciones de MgATP. Los círculos y los cuadrados en línea cortada representan las especies enzimáticas no existentes en presencia de muy altas concentraciones de MgATP. A, MgATP, G, glucosa; I, análogo de glucosa.

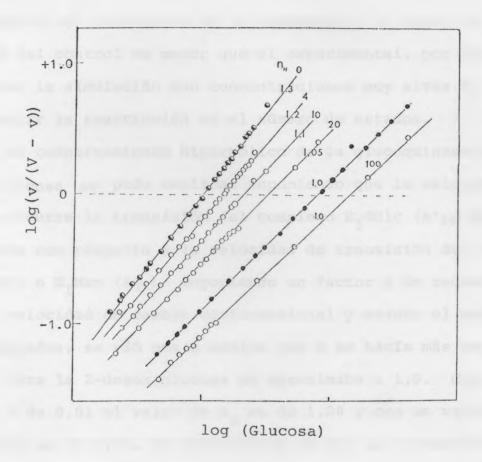


Figura 71. Gráficos de Hill de la función de saturación con glucosa en ausencia y en presencia de manosa y de 2-desoxiglucosa, obtenidos por simulación del modelo III. El modelo III (figura 70) fue simulado considerando una concentración muy alta de MgATP (sobre  $100 \, {\rm veces} \, K_m$ ) en ausencia y en presencia de manosa (4 a  $100 \, {\rm mM}$ ) y de  $2-{\rm desoxiglucosa}$  ( $200 \, {\rm mM}$ ).

- ( $\bullet$ ) Control;  $n_H = 1,3$
- (0) Manosa: 4 mM,  $n_{\overline{H}} = 1,2$ ; 10 mM,  $n_{\overline{H}} = 1,1$ ; 20 mM,  $n_{\overline{H}} = 1,05$ ; 100 mM,  $n_{\overline{H}} = 1,0$
- ( $\bullet$ ) 2-desoxiglucosa 200 mM:  $n_H = 1,0$

muestra los resultados de la simulación. El valor de  $n_H^{}$  de 1,3 del control es menor que el experimental, por haberse hecho la simulación con concentraciones muy altas de ATP para cumplir la restricción en el número de estados.

El comportamiento hiperbólico de la glucoquinasa con 2-deso xiglucosa se pudo explicar suponiendo que la velocidad con que ocurre la transición del complejo  $E_I^{\rm dGlc}$  ( $k'_{10}$ ) está disminuida con respecto a la velocidad de transición del complejo  $E_I^{\rm Glc}$  o  $E_I^{\rm Man}$  ( $k_{10}$ ). Suponiendo un factor  $\beta$  de reducción en la velocidad de cambio conformacional y usando el modelo de 8 estados, se vió que a medida que  $\beta$  se hacía más pequeño el  $n_H^{\rm para}$  la 2-desoxiglucosa se aproximaba a 1,0. Con un valor de  $\beta$  de 0,01 el valor de  $n_H^{\rm es}$  de 1,28 y con un valor de  $\beta$  de 0,01 es de 1,19. En condiciones en que la 2-desoxiglucosa mostraba una cinética hiperbólica, ella también fue capaz de suprimir la cooperatividad con glucosa, como se muestra en la figura 71.

El modelo III resultó así cualitativamente adecuado para reproducir por simulación gran parte de los datos experimentales. Estos estudios se hicieron en conjunto con el Dr. J. M. Olavarría del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Campomar, Argentina.

# d) Modelo mnemonico

Mientras estábamos en la búsqueda de una explicación para la cooperatividad cinética de la glucoquinasa con glucosa y con manosa, Storer y Cornish-Bowden (1977) propusieron una interpretación basada en el modelo mnemónico de Ricard et al. (1974). En esta interpretación la enzima libre existiría en dos conformaciones, E y E', con diferentes propiedades cinéticas (Fig. 72). La cooperatividad con glucosa surgiría por la unión diferente de la glucosa (primer sustrato) a las dos formas de enzima libre, las cuales, a alta concentración de MgATP, no estarían en equilibrio sino en régimen estacionario. Por otra parte, el MgADP (último producto) y la glucosa podrían unirse simultáneamente a la enzima, constituyendo un complejo no productivo.

En ausencia de productos, la velocidad inicial para el mecanismo de la figura 72 está dada por una ecuación de la forma siguiente:

(24) 
$$V = \frac{(1 + \beta_1 G)\beta_2 GA}{1 + \beta_3 A + (1 + \beta_4 A)\beta_5 G + (1 + \beta_6 A)\beta_7 G^2}$$

donde, G es la concentración de glucosa, A es la concentración de ATP y  $\beta_1$  a  $\beta_7$  son constantes que es necesario estimar para ajustar a los datos experimentales los valores de velocidad dados por la ecuación. Esta ecuación predice una conducta cinética michaeliana para MgATP y en cambio una de segundo orden para glucosa.

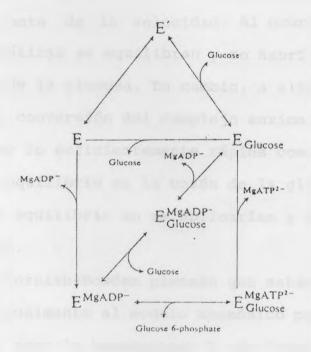


Figura 72. Modelo mnemónico postulado para explicar la cooperatividad cinética de la glucoquinasa con glucosa. E' representa la forma enzimatica predominante en ausencia de glucosa. E es la conformación resultante de la catalisis. De Storer y Cornish-Bowden, 1977.

La dependencia del grado de sigmoidicidad de la glucoquinasa con glucosa respecto a la concentración de MgATP, la explican los autores suponiendo que, al ser suficientemente baja
la concentración de MgATP, su unión al complejo enzima-glucosa
sería limitante de la velocidad. Al ocurrir ésto, las dos
formas enzimáticas se equilibran y no habría cooperatividad
en la unión de la glucosa. En cambio, a altas concentraciones
de MgATP, la conversión del complejo enzima-glucosa a productos puede ser lo suficientemente rápida como para impedir el
logro de un equilibrio en la unión de la glucosa, de modo que
las leyes de equilibrio no se aplicarían y la cooperatividad
sería posible.

Storer y Cornish-Bowden piensan que estas consideraciones se aplican igualmente al modelo mnemónico propuesto por Meunier et al.(1974) para la hexoquinasa  $L_{\rm I}$  de trigo, por lo cual les llama la atención que en este caso no se observe dependencia de la cooperatividad negativa con glucosa, respecto a la concentración de MgATP. Atribuyen este hecho al parámetro  $\Gamma$ , usado para estimar la cooperatividad, el cual sería de menor sensibilidad que el coeficiente de Hill.

Hay que considerar, sin embargo, que, dado que las constantes cinéticas de asociación son altas, no es claro que una disminución en la concentración de ATP de la magnitud usada experimentalmente, sea suficiente para permitir un equilibrio de las formas enzimáticas. Habría que hacer una simulación.

El producto MgADP disminuiría la cooperatividad de la glucoquinasa con glucosa debido a que impediría la rápida conversión del complejo enzima-glucosa en productos, al secuestrarlo en forma de un complejo ternario no productivo (Storer y Cornish-Bowden, 1977).

Siguiendo el análisis de la primera sección de la Discusión, si en la ecuación 24 se considera constante la concentración de MgATP, se obtiene la ecuación 25:

$$v = \frac{nG + oG^2}{p + qG + rG^2}$$
 (25)

 $n = \beta_2 A$ 

 $o = \beta_1 \beta_2 A$ 

 $p = 1 + \beta_3 A$ 

 $q = (1 + \beta_4 A)\beta_5$ 

 $r = (1 + \beta_6 A)\beta_7$ 

La ecuación 25 es análoga a las ecuaciones 11, 13 y 16 examinadas anteriormente.

De acuerdo al análisis de Ferdinand, cabe la posibilidad de que se produzca o no se produzca un punto de inflexión en la curva de velocidad en función de la concentración de glucosa, dependiendo de la concentración de MgATP. Sería posible entonces predecir una dependencia de la cooperatividad respecto a la concentración de este sustrato. Habría que determinar si a las concentraciones de MgATP que según este análisis

permiten la existencia de una conducta cinética hiperbólica, se equilibran o no las dos formas de enzima, y cuan cerca de las concentraciones experimentales que permiten una conducta cinética hiperbólica se encuentran las concentraciones que permiten el equilibrio.

Un punto importante es que, según el modelo, la forma E resultante de la catálisis uniría la glucosa con mayor afinidad. En presencia de bajas concentraciones de MgATP ambas formas podrían equilibrarse, es decir la forma E se relajaría a E'. Dado que la forma E' tiene menor afinidad que la forma E por glucosa, se debería esperar que al disminuir la concentración de MgATP el  $K_{0.5}$  para glucosa aumentara. Sin embargo, experimentalmente se observa lo contrario (capítulo 4 de Resultados). Es decir, el modelo no predice la disminución en el  $K_{0.5}$  para glucosa al disminuir la concentración de MgATP.

En el modelo mnemónico (Figura 72) y sobre la base de estudios cinéticos de inhibición por producto, se postulaba que glucosa-6-P sería el primer producto y MgADP el segundo. El orden de salida de los productos era compatible con el hecho que MgADP y no glucosa-6-P disminuyera la cooperatividad positiva con glucosa. En efecto, de acuerdo con lo predicho por el modelo mnemónico el último producto disminuye la cooperatividad positiva mientras que el primero no tiene efecto.

Con el fin de determinar con mayor exactitud el orden de entrada y salida de sustratos y productos, estos autores

realizaron estudios de intercambio isotópico los que fueron publicados recientemente (Gregoriou et al., 1981). Los estudios de intercambio realizados en condiciones de equilibrio químico indicaron que existe unión al azar de los sustratos, y luego, todos los pasos mostrados en la figura 66 (modelo I, mecanismo al azar de unión de sustratos) existirían realmente, pues ni el intercambio isotópico entre MqATP y MqADP ni el existente entre glucosa y glucosa-6-P fueron inhibidos a concentraciones saturantes de los cuatro reactantes. Sin embargo, los experimentos de intercambio isotópico realizados en régimen estacionario mostraron solamente la existencia de los complejos E.Glc y E.Glc-6-P, siendo incapaces de detectar los complejos binarios E.ATP y E.ADP. Estos resultados parecerían indicar que la contribución de estos últimos complejos a la velocidad total sería despreciable. En estas condiciones, los autores piensan que la vía alternativa a través del complejo binario E.MgATP no contribuiría a generar cooperatividad con glucosa. Cabe sin embargo la posibilidad de que dados los diferentes promedios de vida (span of life) de los complejos E.Glc y E.MgATP, la probabilidad de su detección en régimen estacionario no sea la misma para ambos. (Los estudios de intercambio isotópico en equilibrio muestran que el complejo E.Glc se disocia lentamente, lo mismo que el complejo E.Glc-6-P).

En el modelo mnemónico últimamente propuesto (Fig. 73)

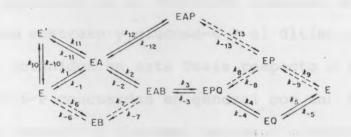


Figura 73. Modelo mnemónico considerando un mecanismo al azar de unión de sustratos y de liberación de productos. A, glucosa; B, MgATP:

P, MgADP; Q, glucosa-6-P. Los pasos mostrados con linea cortada representan reacciones que no serían cuantitativamente importantes en condiciones de régimen estacionario. De Gregoriou et al., 1981.

operaría un mecanismo ordenado de unión de sustratos con glucosa como primer sustrato y glucosa-6-P como último producto, es decir un orden de salida de productos diferente al postulado sobre la base de estudios cinéticos de inhibición por producto. En efecto, Storer y Cornish-Bowden (1977) encontraron inhibición competitiva por glucosa-6-P respecto a MgATP, pero mixta respecto a glucosa, es decir lo opuesto de lo que se esperaría en un mecanismo ordenado en que glucosa es el primer sustrato y glucosa-6-P el último producto. Los resultados obtenidos en esta Tesis respecto a la inhibición por glucosa-6-P concuerdan en general con una inhibición de tipo mixto respecto a glucosa, aunque en nuestro caso se agrega la complejidad de que la inhibición por glucosa-6-P es de naturaleza cooperativa.

El perfil de inhibición obtenido podría interpretarse, y así lo hacen los autores, suponiendo que glucosa-6-P y MgATP compiten por un sitio específico para el fosfato, es decir el glucosa-6-P no entraría en el mismo sitio de la glucosa. Casazza y Fromm (1976) dieron esta explicación en el caso de la hexoquinasa de cerebro (hexoquinasa A) sobre la base de la postulación cinética de un complejo E.Glc.Glc-6-P. Es necesario considerar, sin embargo, que la existencia en hexoquinasa A de un sitio alostérico para glucosa-6-P (Lazo et al., 1980) dificulta la interpretación de los datos cinéticos de Casazza y Fromm.

Llama la atención en el modelo de la figura 73 que no obstante ser glucosa-6-P el último producto no altere la coo peratividad (esta Tesis, capítulo 6 de Resultados; Storer y Cornish-Bowden, 1977). En efecto, esto no ocurrió experimen talmente ni aún en experimentos en que se preincubó la enzima con glucosa-6-P por un tiempo de hasta 30 min antes de partir la reacción con glucosa (esta Tesis). En hexoquinasa de trigo en cambio, donde se ha postulado un modelo mnemónico con glucosa-6-P como último producto, la presencia de éste intensifica la cooperatividad negativa, concordando con lo predicho por el modelo (Meunier et al., 1974).

Una posible explicación de la ineficacia del glucosa-6-P para alterar la cooperatividad sería que la especie resultante de la catálisis fuera equivalente a la enzima inicial. Otra posibilidad sin embargo, sería que se requirieran concentraciones de glucosa-6-P mucho más altas que las usadas en esta Tesis y por Storer y Cornish-Bowden (1977). Es decir, que se estuviera en una situación semejante a la presentada por N-acetilglucosamina, donde se requiere usar una concentración superior a 10 veces su K<sub>i</sub> para empezar a observar en forma clara una disminución en la cooperatividad, y alrededor de 70 veces su K<sub>i</sub> para suprimirla. Este requerimiento, de ser efectivo haría casi imposible los estudios con glucosa-6-P, pues se necesitarían concentraciones superiores a 600 mM.

## e) Comentario final

Los estudios de intercambio isotópico parecerían descartar los modelos presentados en esta Tesis y apoyar en cambio, el modelo mnemónico. Sin embargo, como hemos analizado recientemente, este modelo tampoco da cuenta de todos los hechos experimentales.

Parecería que el modelo que explique en forma global todos los hechos experimentales aún no ha sido formulado, y que faltan antecedentes experimentales y tal vez la utilización de nuevas metódicas. Los estudios cinéticos en régimen esta cionario parecerían estar agotados en su mayor parte.

Si bien es cierto que el efecto de inhibidores competitivos sugiere la existencia de un cambio conformacional de la glucoquinasa (esta Tesis, capítulo 5 de Resultados), y que la existencia de este cambio conformacional estaría apoyada por el gran efecto protector (100%), ejercido por la glucosa y análogos, frente a la modificación de grupos tioles de la glucoquinasa (Heberlein et al., 1979; Monasterio et al., 1979), sería conveniente aplicar un tipo de metódica que pudiera detectar directamente la existencia de un cambio conformacional. Así por ejemplo, sería importante aplicar a la glucoquinasa un enfoque experimental como el de

la realización de estudios espectroscópicos en presencia de sustratos y de análogos, a fin de detectar si existe realmente un cambio conformacional y cual es su naturaleza con los diferentes sustratos y análogos, y en distintas condiciones, presencia de urea, por ejemplo.

Por otra parte, sería interesante poder realizar estudios cinéticos en estado transitorio, a fin de obtener prue bas sobre la posible transición mnemónica. La idea sería pesquisar la existencia de un retardo en la curva de progreso y determinar, por ejemplo si la preincubación con glucosa o con glucosa-6-P disminuye el retardo o incluso lo transforma en estallido. En la medida que la transición mnemónica fuera importante para el mecanismo de la cooperatividad debiera esperarse que la cinética para glucosa fuera hiperbólica al considerar las velocidades en estado transitorio.

Parece así, que la última palabra sobre la cooperatividad cinética de la glucoquinasa con glucosa y con manosa no está aún dicha, y queda mucho por hacer.

#### E. REFERENCIAS

- Ahlfors, C.E. y Mansour, T.E. (1969). Studies on Heart Phosphofructokinase. Desensitization of the Enzyme to Adenosine Triphosphate Inhibition. J. Biol. Chem. 244, 1247-1251.
- Ainslie, G.R. y Neet, K.E. (1979). Cooperativity and the Slow Isomerization of  $\delta$ -Chymotrypsin. *Mol. Cell. Biochem*. 24, 183-191.
- Ainslie, G.R., Shill, J.P. y Neet, K.E. (1972). Transients and Cooperativity. A Slow Transition Model for Relating Transients and Cooperative Kinetics of Enzymes. J. Biol. Chem. 247, 7088-7096.
- Allen, M.B. y Walker, D.G. (1980). Kinetic Characterization of N-Acetyl-D-Glucosamine Kinase from Rat Liver and Kidney. Biochem. J. 185, 577-582.
- Anderson, S.R. y Weber, G. (1965). Multiplicity of Binding by Lactate Dehydrogenase. *Biochemistry* 4, 1948-1957.
- Anstall, H.B. y Trujillo, J.M. (1967). Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. Its Purification and Properties. Am. J. Clin. Pathol. 47, 296-302.
- Atkinson, D.E. (1969). Regulation of Enzyme Function. Annu. Rev. Microbiol. 23, 47-68.
- Atkinson, D.E. (1970). Enzymes as Control Elements in Metabolic Regulation. En *The Enzymes* (P.D. Boyer, editor). Vol. I, pp 111-130. 3a. Edición. Academic Press, New York.
- Babul, J. y Niemeyer, H. (1966). Purificación de glucoquinasa de hígado de rata. Arch. Biol. Med. Exp. 3, 65-70.

- Baici, A., Luisi, P.L., Olomucki, A., Doublet, M. y Klincak, J. (1974). Influence of Ligands on the Coenzyme Dissociation Constants in Octopine Dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 46, 59-66.
- Beck, W.S. (1967). Regulation of Cobamide-dependent Ribonucleotide Reductase by Allosteric Effectors and Divalent Cations. J. Biol. Chem. 242, 3148-3158.
- Berthillier, G. y Got, R. (1972). Effets de l'ATP et de la photo-oxydation sur l'agrégation de la glucokinase microsomique du foie de rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 258, 88-98.
- Bontemps, F., Hue, L. y Hers, H.G. (1978). Phosphorylation of Glucose in Isolated Rat Hepatocytes. Sigmoidal Kinetics Explained by the Activity of Glucokinase Alone. *Biochem*. J. 174, 604-611.
- Brown, N.C., Canellakis, Z.N., Lundin, B., Reichard, P. y
  Thelander, L. (1969). Ribonucleoside Diphosphate Reductase. Purification of the Two Subunits, Proteins B<sub>1</sub> and
  B<sub>2</sub>. Eur. J. Biochem. 9, 561-573.
- Brown, N.C. y Reichard, P. (1969a). Ribonucleoside Diphosphate Reductase. Formation of Active and Inactive Complexes of Proteins  $B_1$  and  $B_2$ . J. Mol. Biol.  $\underline{46}$ , 25-38.
- Brown, N.C. y Reichard, P. (1969b). Role of Effector Binding in Allosteric Control of Ribonucleoside Diphosphate Reductase. J. Mol. Biol. 46, 39-55.
- Broyles, R.H. y Strittmatter, C.F. (1977). Hexose Monophosphate Shunt Dehydrogenases in the Sea Urchin and the Frog: Comparison of Some Functional Properties of the Enzymes in vitro. Comp. Biochem. Physiol. 57B, 249-255.

- Buc, J., Ricard, J. y Meunier, J.C. (1977). Enzyme Memory.

  2. Kinetics and Thermodynamics of the Slow Conformation
  Changes of Wheat-Germ Hexokinase L<sub>I</sub>. Eur. J. Biochem. 80,
  593-601.
- Cárdenas, M.L. (1977). Postulación de un mecanismo para la cinética sigmoidea de la glucoquinasa. I Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica de Chile, Talca. Resúmenes, s/n.
- Cárdenas, M.L. (1978). Kinetic Cooperativity of Glucokinase with Glucose. En Simposio Regulatory Aspects of the Kinases of Carbohydrate Metabolism. II Reunión Anual Sociedad de Bioquímica de Chile, Santiago, Chile, Arch. Biol. Med. Exp. 11, 23.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1974).

  Sigmoidicidad de la función de saturación de la glucoquinasa con glucosa. XVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Santiago. Arch. Biol. Med. Exp. 10, R-8, 1976.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1975). Cinética sigmoidal de la glucoquinasa hepática. XII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Bogotá, Colombia. Resúmenes, p. 20.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1976).

  Glucoquinasa, una enzima monomérica con cinética sigmoidal.

  XIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile.

  Jahuel. Arch. Biol. Med. Exp. 11, R-63, 1978.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1977). A Kinetic Model Explaining the Sigmoidal Saturation Function of Glucokinase. 11th. FEBS Meeting. Copenhagen, Denmark. Proceedings A 1-8-056.

- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1978).

  Maintenance of the Monomeric Structure of Glucokinase

  Under Reacting Conditions. Arch. Biochem. Biophys. 190,

  142-148.
- Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1979). Kinetic Cooperativity of Glucokinase with Glucose. *Arch. Biol. Med. Exp.* 12, 571-580.
- Casazza, J.P. y Fromm, H.J. (1976). Studies on the Mode of Sugar-Phosphate Product Inhibition of Brain Hexokinase.

  Arch. Biochem. Biophys. 177, 480-487.
- Chakrabarti, U. y Kenkare, U.W. (1974). Dimerization of Brain Hexokinase Induced by its Regulator Glucose 6-Phosphate. J. Biol. Chem. 249, 5984-5988.
- Clark, D.G., Rognstad, R. y Katz, J. (1973). Isotopic Evidence for Futile Cycles in Liver Cells. *Biochim. Biophys.*Res. Commun. 54, 1141-1148.
- Clark-Turri, L., Peñaranda, J., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1974). Immunochemical Titration of Liver Glucokinase from Normal, Fasted, and Diabetic Rats. FEBS Letters 41, 342-344.
- Cohen, L.A. (1968). Group-Specific Reagents in Protein Chemistry. Annu. Rev. Biochem. 37, 695-726.
- Colowick, S.P. (1973). The Hexokinases. En The Enzymes (P.D. Boyer, editor), Vol. IX, Parte B, 3a. Edición, pp. 1-48. Academic Press, New York.
- Connolly, B.A. y Trayer, I.P. (1979). Reaction of Rat Hepatic Glucokinase with Substrate-Related and Other Alkylating Agents. Eur. J. Biochem. 99, 299-308.

- Copley, M. y Fromm, H.J. (1967). Kinetic Studies of the Brain Hexokinase Reaction. A Reinvestigation with the Solubilized Bovine Enzyme. *Biochemistry* 6, 3503-3509.
- Cornish-Bowden, A. (1974). A Simple Graphical Method for Determining the Inhibition Constants of Mixed, Uncompetitive and Non-Competitive Inhibitors. *Biochem. J.* 137, 143-144.
- Crane, R.K. y Sols, A. (1954). The Non-Competitive Inhibition of Brain Hexokinase by Glucose 6-Phosphate and Related Compounds. J. Biol. Chem. 210, 597-606.
- Davagnino, J. (1979). Glucoquinasas múltiples y extrahepáticas: su identificación como N-acetilglucosaminaquinasa. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Davagnino, J. y Ureta, T. (1978). Glucoquinasas múltiples y extrahepáticas: su identificación como N-acetilglucosa mina-quinasa. II Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica de Chile, Santiago. Arch. Biol. Med. Exp. 11, 12.
- Davagnino, J. y Ureta, T. (1980). Identification of Extrahepatic 'Glucokinase' as N-Acetylglucosamine Kinase. J. Biol. Chem. 255, 2633-2636.
- Dawson, R.M., Elliot, D.C., Elliot, W.H. y Jones, K.M. (1972).

  Data for Biochemical Research. 2a. edición, Oxford

  University Press. p. 170.
- DiPietro, D.L., Sharma, C.H. y Weinhouse, S. (1962). Studies on Glucose Phosphorylation in Rat Liver. Biochemistry 1, 455-462.

- Dixon, M. y Webb, E.C. (1964). Enzymes, 2a. edición. Longmans, Green & Co. Ltd., London.
- Doublet, M.O., Olomucki, A., Baici, A., y Luisi, P. (1975). Investigation on the Kinetic Mechanism of Octopine Dehydrogenase. 2. Location of the Rate-Limiting Step for Enzyme Turnover. Eur. J. Biochem. 59, 185-191.
- Easterby, J.S. (1975). Heart Hexokinase: Quaternary Structure Changes Accompanying the Binding of Regulatory Molecules. Eur. J. Biochem. 58, 231-235.
- Eastman, R.C. (1968). Activities of Several Pentose Shunt and Glycolytic Enzymes in Developing Eggs of the Barnacle Pollicipes polymetus. Exp. Cell Res. 51, 323-329.
- Eigen, M. y Hammes, G.G. (1963). Elementary steps in Enzyme Reactions (as Studied by Relaxation Spectrometry).

  Advances Enzymol. 25, 1-38.
- Evans, H.J. y Sorger, G.J. (1966). Role of Mineral Elements with Emphasis on the Univalent Cations. Annu. Rev. Plant Physiol. 17, 47-76.
- Farnararo, M., Favilli, F., Tonelli, M.F. y Bruni, P. (1978). Some Properties of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Rat and Chick Brain: A Comparative Study. Comp. Biochem. Physiol. 61B, 351-356.
- Fersht, A.R. (1972). Conformational Equilibria in  $\alpha-$  and  $\delta-$ Chymotrypsin. The Energetics and Importance of the Salt Bridge. J. Mol. Biol. 64, 497-509.
- Ferdinand, W. (1966). The Interpretation of Non-hyperbolic Rate Curves for Two-Substrate Enzymes. A possible Mechanism for Phosphofructokinase. *Biochem. J.* 98, 278-283.

- Fisher, J.R., Priest, D.G. y Barton, J.S. (1972). Random Pathway Models and their Application to Steady-State Enzyme Kinetics. J. Theor. Biol. 37, 335-352.
- Foe, G. y Trujillo, L. (1979). Effects of Monovalent Cations on the Catalytic Activity of Pig Liver Phosphofructokinase. Life Sci. 25, 1529-1538.
- Frieden, C. (1964). Treatment of Enzyme Kinetic Data. I.

  The Effect of Modifiers on the Kinetic Parameters of Single
  Substrate Enzymes. J. Biol. Chem. 239, 3522-3531.
- Frieden, C. (1967). Treatment of Enzyme Kinetic Data. II. The Multisite Case: Comparison of Allosteric Models and a Possible New Mechanism. J. Biol. Chem. 242, 4045-4052.
- Frieden, C. (1970). Kinetic Aspects of Regulation of Metabolic Processes. The Hysteretic Enzyme Concept. J. Biol. Chem. 245, 5788-5799.
- Frieden C. (1971). Protein-Protein Interaction and Enzymatic Activity. Annu. Rev. Biochem. 40, 653-696.
- Fromm, H.J. y Ning, J. (1968). Kinetic Studies of Solubilized Brain Hexokinase with D-Fructose as a Substrate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 672-677.
- Fromm, H.J. y Zewe, V. (1962). Kinetic Studies of the Brain Hexokinase Reaction. J. Biol. Chem. 237, 1661-1667.
- Garcés, E. y Cleland, W.W. (1969). Kinetic Studies of Yeast Nucleoside Diphosphate Kinase. *Biochemistry* 8, 633-640.
- Garel, J.R. y Labouesse, B. (1973). The Time Dependence of the Activity of Delta-Chymotrypsin at High pH. Eur. J. Biochem. 39, 293-300.

- Gerhart, J.C. y Pardee, A.B. (1962). The Enzymology of Control by Feedback Inhibition. J. Biol. Chem. 237, 891-896.
- González, C. y Ureta, T. (1969). Estudios sobre el peso molecular de glucoquinasa de hígado de rata. V Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas. Tucumán, Argentina. Resúmenes p. 31.
- González, C., Ureta, T., Sánchez, R. y Niemeyer, H. (1964).

  Multiple Molecular Forms of ATP: Hexose 6-Phosphotransferase from Rat Liver. Biochem. Biophys. Res. Commun.

  16, 347-352.
- González, C., Ureta, T., Babul, J., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1967). Characterization of Isoenzymes of Adenosine Triphosphate: D-Hexose 6-Phosphotransferase from Rat Liver. Biochemistry 6, 460-468.
- Goulian, M. y Beck, W.S. (1966). Purification and Properties of Cobamide-dependent Ribonucleotide Reductase from Lactobacillus leichmannii. J. Biol. Chem. 241, 4233-4242.
- Gregoriou, M., Trayer, J.P. y Cornish-Bowden, A. (1981).
  Isotope-Exchange Evidence for an Ordered Mechanism for
  Rat-Liver Glucokinase, a Monomeric Cooperative Enzyme.
  Biochemistry 20, 499-506.
- Greiling, H. y Kisters, R. (1965). Studies on Substrate Specificity of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase.

  Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 341, 172-184.
- Grossman, S.H., Dorn, C.G. y Potter, V.R. (1974). The Preparation and Characterization of Pure Rat Liver Glucokinase. J. Biol. Chem. 249, 3055-3060.
- Gulbinsky, J.S. y Cleland, W.W. (1968). Kinetic Studies of Escherichia coli Galactokinase. Biochemistry 7, 566-575.

- GutFreund, H. (1975). Enzymes: Physical Principles. J. Wiley and Sons Ltd., Bristol.
- Haschke, R.H., Heilmeyer, Jr. L.G., Meyer, F. y Fischer, E.H. (1970). Control of Phosphorylase Activity in a Muscle Glycogen Particle. III. Regulation of Phosphorylase Phosphatase. J. Biol. Chem. 245, 6657-6663.
- Heberlein, U., Monasterio, O. y Niemeyer, H. (1979).

  Inactivación de la glucoquinasa con ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico). Disociación entre la actividad enzimática y la susceptibilidad al reactivo. II Reunión Regional de PAABS, Cono Sur y III Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica de Chile, Viña del Mar, Chile.

  Arch. Biol. Med. Exp. 12, 271.
- Heilmeyer, L.M.G., Meyer, F., Haschke, R.H. y Fischer, E.H. (1970). Control of Phosphorylase Activity in a Muscle Glycogen Particle. II. Activation by Calcium. J. Biol. Chem. 245, 6649-6656.
- H.G. Hers (1955). The Conversion of Fructose-1-C<sup>14</sup> and Sorbitol-1-C<sup>14</sup> to Liver and Muscle Glycogen in the Rat. J. Biol. Chem. 214, 373-381.
- Hoggett, J.G. y Kellett, G.L. (1976). Yeast Hexokinase Substrate-Induced Association-Dissociation Reactions in the Binding of Glucose to Hexokinase P-II. Eur. J. Biochem. 66, 65-77.
- Holroyde, M.J., Allen, M.B., Storer, A.C., Warsy, A.S., Chesher, J.M.E., Trayer, I.P., Cornish-Bowden, A. y Walker, D.G. (1976). The Purification in High Yield and Characterization of the Rat hepatic Glucokinase. Biochem. J. 153, 363-373.

- Holzer, H. y Duntze, W. (1971). Metabolic Regulation by Chemical Modification of Enzymes. Annu. Rev. Biochem. 40, 345-374.
- Hubert, E., Villanueva, J., González, A.M. y Marcus, F. (1970). Univalent Cation Activation of Fructose 1,6-Diphosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 138, 590-597.
- Hue, L. (1979). The Role of Futile Cycles in the Regulation of Carbohydrate Metabolism in the Liver. Tesis de Agrega do a la Enseñanza Superior. Facultad de Medicina, Universidad Católica de Louvain, Bélgica.
- Jensen, R.A. y Trentini, W.C. (1970). Alternative Allosteric Effects Exerted by End Products upon a Two-Substrate Enzyme in Rhodomicrobium vannielii. J. Biol. Chem. 245, 2018-2022.
- Jentoft, J.E., Neet, K.E. y Stuehr, J.E. (1977). Relaxation Spectra of Yeast Hexokinases. Isomerization of the Enzyme.

  Biochemistry 16, 117-121.
- Kachmar, J.F. y Boyer, P.D. (1953). Kinetic Analysis of Enzyme Reactions. II. The Potassium Activation and Calcium Inhibition of Pyruvic Phospherase. J. Biol. Chem. 200, 669-682.
- Katz, J., Wals, P.A., Golden, S. y Rognstad, R. (1975).
  Recycling of Glucose by Rat Hepatocytes. Eur. J. Biochem.
  60, 91-101.
- Katzen, H.M., Soderman, D.D. y Nitowsky, H.M. (1975). 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.

- Kelkar, S.M. y Nadkarni, G.B. (1978). Regulatory Responses
   of Rat Liver Glucokinase. Indian J. Biochem. Biophys.
   15, 95-100.
- Kemp, R.G.(1969). Allosteric Properties of Muscle Phosphofructokinase. II. Kinetics of Native and ThiolModified Enzyme. Biochemistry 8, 4490-4496.
- Kemp, R.G. (1971). Rabbit Liver Phosphofructokinase.
  Comparison of Some Properties with those of Muscle
  Phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 246, 245-252.
- Kirkman, H.N. (1962). Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. I. Further Purification and Characterization. J. Biol. Chem. 237, 2364-2370.
- Klotz, I.M., Langerman, N.R. y Darnell, D.W. (1970).

  Quaternary Structure of Proteins. Annu. Rev. Biochem.

  39, 25-62.
- Kornberg, A. y Pricer, W.E. (1951). Enzymatic Phosphorylation of Adenosine and 2,6-Diaminopurine Riboside. J. Biol. Chem. 193, 481-495.
- Koshland, D.E. (1970). The Molecular Basis for Enzyme Regulation. En *The Enzymes* (P.D. Boyer, editor) Vol. I, pp. 341-396, 3a. edición. Academic Press, New York.
- Koshland, D.E. y Neet, K.E. (1968). The Catalytic and Regulatory Properties of Enzymes. Annu. Rev. Biochem. 37, 359-410.
- Koshland, D.E., Jr., Némethy, G. y Filmer, D. (1966).
  Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical
  Models in Proteins Containing Subunits. Biochemistry
  5, 365-385.

- Kosow, D.P. y Rose, I.A. (1971). Activators of Yeast Hexokinase. J. Biol. Chem. 246, 2618-2625.
- Larner, J. (1971). Intermediary Metabolism and Its Regulation. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Lazo, P.A., Sols, A. y Wilson, J.E. (1980). Brain Hexokinase has Two-Spatially Discrete Sites for Binding of Glucose 6-Phosphate. J. Biol. Chem. 255, 7548-7551.
- Lee, L.M., Krupka, R.M. y Cook, R.A. (1973). Cooperativity in Human Erythrocyte Phosphofructokinase. *Biochemistry* 12, 3503-3508.
- León, O., Monasterio, O. y Niemeyer, H. (1977). Cromatogra fía de afinidad de enzimas fosforilantes de glucosa y N-acetilglucosamina en derivados inmovilizados en Sefarosa. I Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica de Chile, Talca. Libro de Resúmenes, s/n.
- Levitzki, A. y Koshland, D.E. (1972). Ligand-Induced Dimerto-Tetramer Transformation in Cytosine Triphosphate

  Synthetase. Biochemistry 11, 247-252.
- Lowry, O.H. y Passonneau, J.V. (1966). Kinetic Evidence for Multiple Binding Sites on Phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 241, 2268-2279.
- Maccioni, R. (1975). Purificación y caracterización de glucoquinasa. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Maccioni, R. y Babul, J. (1974). Glucoquinasa: purificación y caracterización. XVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Concepción, Chile. Resúmenes, p. 32.

- Maccioni, R. y Babul, J. (1980). Purification and Characterization of Dog Liver Glucokinase. Arch. Biol. Med. Exp. 13, 271-286.
- Macfarlane, H. y Ainsworth, S. (1972). A Kinetic Study of Baker's-Yeast Pyruvate Kinase Activated by Fructose 1,6-Diphosphate. *Biochem. J.* 129, 1035-1047.
- Mansour, T.E. y Ahlfors, C.E. (1968). Studies on Heart Phosphofructokinase. Some Kinetic and Physical Properties of the Crystalline Enzyme. J. Biol. Chem. 243, 2523-2533.
- Martin, R.G. (1963). The First Enzyme in Histidine Biosynthesis: The Nature of Feedback Inhibition by Histidine.

  J. Biol. Chem. 238, 257-268.
- Mc Clure, W.R. (1969). A Kinetic Analysis of Coupled Enzyme Assays. *Biochemistry* 8, 2782-2786.
- Meunier, J.C., Buc, J., Navarro, A. y Ricard, J. (1974).

  Regulatory Behavior of Monomeric Enzymes. 2. A WheatGerm Hexokinase as a Mnemonical Enzyme. Eur. J. Biochem.
  49, 209-223.
- Meunier, J.C., Buc, J. y Ricard, J. (1979). Enzyme Memory. Effect of Glucose 6-Phosphate and Temperature on the Molecular Transition of Wheat-Germ Hexokinase L<sub>I</sub>. Eur. J. Biochem. 97, 573-583.
- Monasterio, O. (1980). Mecanismo cinético de la glucoquina sa: Estudios en velocidad inicial con 2-desoxiglucosa como sustrato y efecto de inhibidores; modificaciones químicas e interacciones enzima-ligandos. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Monasterio, O., Heberlein, U. y Niemeyer, H. (1979).

  Protección por ligandos a la inactivación de glucoquinasa con el ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico). Relación con el ciclo catalítico. International Simposium Gen and Protein Behaviour. XXII Reunión Anual Soc. Biol. Chile, Valdivia, Chile. Arch. Biol. Med. Exp. 12, 473.
- Monneuse-Doublet, M.E., Olomucki, A. y Buc, J. (1978).

  Investigation on the Kinetic Mechanism of Octopine
  Dehydrogenase. A Regulatory Behavior. Eur. J. Biochem.
  84, 441-448.
- Monod, J., Changeux, J. y Jacob, F. (1963). Allosteric Proteins and Cellular Control Systems. J. Mol. Biology 6, 306-329.
- Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J.P. (1965). On the Nature of Allosteric Interactions: A Plausible Model. J. Mol. Biol. 12, 88-118.
- Neet, K.E. (1979). Ligand-Induced Association/Dissociation and the Reacting Form of Enzymes. Bull. Mol. Biol. Med. 4, 101-138.
- Niemeyer, H. (1972). El sistema hexoquinásico. VIII Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica. Corrientes, Argentina. Resúmenes, p. 111.
- Niemeyer, H. y Ureta, T. (1972). Enzyme adaptation in mammals. En Molecular Basis of Biological Activity (K. Gaede, B.L. Horecker y W.J. Whelan, editores) PAABS SYMPOSIUM Vol 1, pp 221-273. Academic Press, New York.
- Niemeyer, H., Cardenas, M.L., Rabajille, E., Ureta, T., Clark-Turri, L. y Peñaranda, J. (1975a). Sigmoidal Kinetics of Glucokinase. *Enzyme* 20, 321-333.

- Niemeyer H., Ureta, T. y Clark-Turri, L. (1975b). Adaptive Character of Liver Glucokinase. *Mol. Cell. Biochem.* 6, 109-126.
- Niemeyer H., Cardenas, M.L. y Rabajille, E. (1976). Abstr. 10th. International Congress of Biochemistry, Hamburg, FRG, p. 375.
- Niemeyer, H., Monasterio, O., Cárdenas, M.L. y Rabajille, E. (1978). Kinetic Mechanism of the Phosphorylation of 2-Deoxyglucose by Rat Liver Glucokinase. American Society Biological Chemists 69th Annual Meeting, Atlanta, Georgia, U.S.A. Fed. Proc. 37, 1421.
- Nichol, L.W., Jackson, W.J.H. y Winzor, D.G. (1967). A Theoretical Study of the Binding Molecules to a Polymerizing Protein System. A Model for Allosteric Effects. *Biochemistry* 6, 2449-2456.
- Olavarría, J.M., Cárdenas, M.L. y Niemeyer, H. (1979).

  Simulación de un modelo de glucoquinasa. XV Reunión Anual
  de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica.

  Mendoza, Argentina, Octubre. R-134.
- Olomucki, A., Huc, C., Lefebure, F. y Thoai, N.v. (1972).
  Octopine Dehydrogenase. Evidence for a Single-Chain
  Structure. Eur. J. Biochem. 28, 261-268.
- Panagou, D., Orr, M.D., Dunstone, J.R. y Blakley, R.L. (1972).

  A monomeric, Allosteric Enzyme with a Single Polypeptide
  Chain. Ribonucleotide Reductase of Lactobacillus leichmannii. Biochemistry 11, 2378-2388.

- Parry, M.J. y Walker, D.G. (1966). Purification and Properties of Adenosine 5'-Triphosphate-D-Glucose 6-Phosphotransferase from Rat Liver. Biochem. J. 99, 266-274.
- Parry, M.J. y Walker, D.G. (1967). Further Properties and Possible Mechanism of Action of Adenosine 5'-Triphosphate D-Glucose 6-Phosphotransferase from Rat Liver. *Biochem.* J. 105, 473-482.
- Peters, B.A. y Neet, K.E. (1976). pH-dependent Effects of  $Cr(NH_3)_2ATP$  on Kinetics of Yeast Hexokinase PII. J. Biol. Chem. 251, 7521-7525.
- Peters, B.A. y Neet, K.E. (1978). Yeast Hexokinase PII. Conformational Changes Induced by Substrates and Substrate Analogues. J. Biol. Chem. 253, 6826-6831.
- Pettigrew, D.W. y Frieden, C. (1977). Treatment of Enzyme Kinetic Data. Extension of the Concerted Allosteric Model to the Two-Substrate Case. J. Biol. Chem. 252, 4546-4551.
- Phillips, R.C., George, P. y Rutman, R.J. (1966).

  Thermodynamic Studies of the Formation and Ionization of the Magnesium (II) Complexes of ADP and ATP over the pH Range 5 to 9. J. Am. Chem. soc. 88, 2631-2640.
- Pho, D.B., Olomucki, A., Huc, C. y Thoai, N.v. (1970).

  Spectrophotometric Studies of Binary and Ternary Complexes of Octopine Dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 206, 46-53.
- Pilkis, S.J. (1972). Rat Hepatic Glucokinase: Improved Purification and Some Properties. Arch. Biochem. Biophys. 149, 349-360.

- Pilkis, S.J., Hansen, R.J. y Krahl, M.E. (1968). Apparent Molecular Weights of Some ATP: D-Hexose 6-Phosphotransferases. Specific Effects of Sephadex G-100.

  Biochim. Biophys. Acta 154, 250-252.
- Rabin, B.R. (1967). Cooperative Effects in Enzyme Catalysis:
  A Possible Kinetic Model Based on Substrate-Induced
  Conformation Isomerization. *Biochem. J.* 102, 22c-23c.
- Radojković, J., Slebe, J.C. y Ureta, T. (1978). A Radioassay for the Hexokinase Reaction. Arch. Biol. Med. Exp. 11, 73-76.
- Ray, W.J. Jr. (1967). Photochemical Oxidation. En Methods in Enzymology. Vol. 11, 490-497.
- Reyes, A. y Cárdenas, M.L. (1980). Distribución celular de las isoenzimas fosforilantes de glucosa en hígado de rata. IV Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica de Chile-XVI Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas. Mendoza, Argentina, Octubre 1980.

  Arch. Biol. Med. Exp. 13, 467.
- Reyes, A., Cárdenas, M.L., Rabajille, E. y Niemeyer, H. (1980). Distribución celular de isoenzimas fosforilantes de glucosa en hígado de rata. Efectos dietarios y hormonales. XXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Noviembre 1980. Viña del Mar, Chile. Arch. Biol. Med. Exp. 13, 102.
- Ricard, J., Meunier, J.C. y Buc, J. (1974). Regulatory
  Behavior of Monomeric Enzymes. 1. The Mnemonical Enzyme
  Concept. Eur. J. Biochem. 49, 195-208.
- Ricard, J., Buc, J. y Meunier, J.C. (1977). Enzyme Memory. 1.A Transient Kinetic Study of Wheat-Germ Hexokinase  $L_{\rm I}$ . Eur. J. Biochem. 80, 581-592.

- Rozengurt, E., Jiménez de Asúa, L. y Carminatti, H. (1969).

  Some Kinetic Properties of Liver Pyruvate Kinase (Type L).

  J. Biol. Chem. 244, 3142-3147.
- Rübsamen, H., Khandker, R. y Witzel, H. (1974). Sigmoid Kinetics of the Monomeric Ribonuclease I Due to Ligand-Induced Shifts of Conformation Equilibria. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 687-708.
- Salas, J, Salas, M., Viñuela, E. y Sols, A. (1965).

  Glucokinase of Rabbit Liver. Purification and Properties.

  J. Biol. Chem. 240, 1014-1018.
- Sanwal, B.D., Stachow, C.S. y Cook, R.A. (1965). A Kinetic Model for the Mechanism of Allosteric Activation of Nicotinamide-Adenine Dinucleotide-Specific Isocitric Dehydrogenase. *Biochemistry* 4, 410-421.
- Sapico, V. y Anderson, R.L. (1970). Regulation of D-Fructose 1-Phosphate Kinase by Potassium Ion. J. Biol. Chem. 245, 3252-3256.
- Schimke, R.T. y Doyle, D. (1970). Control of Enzyme Levels in Animals Tissues. Annu. Rev. Biochem. 39, 929-976.
- Segel, I. H. (1975). Enzyme Kinetics. J. Wiley and Sons, N. York.
- Sevall, J.S. y Kim, K-H. (1971). Regulation of Hepatic Glycogen Synthetase of Rana Catesbeiana. Studies of Adenosine Triphosphate Inhibition with Reference to Insulin Activation of Glycogen Synthetase. J. Biol. Chem. 246, 2959-2964.
- Shill, J.P. y Neet, K.E. (1971). A Slow Transient Kinetic Process of Yeast Hexokinase. Biochem. J. 123, 283-285.

- Shill, J.P. y Neet, K.E. (1975). Allosteric Properties and the Slow Transition of Yeast Hexokinase. J. Biol. Chem. 250, 2259-2268.
- Slein, M.W., Cori, G.T. y Cori, C.F. (1950). A Comparative Study of Hexokinase from Yeast and Animal Tissues. J. Biol. Chem. 186, 763-780.
- Smith, J.E. y Holdridge, B.A. (1967). Comparison of Erythrocyte Glucose 6-Phosphate Dehydrogenases of Man and Various Ungulates. Comp. Biochem. Physiol. 22, 737-743.
- Sols, A. (1973). Allosteric Effects by Products and Substrates Involving Specifically Regulatory Sites. En Mechanisms and Control Properties of Phosphotransferases. Akademie-Verlag, Berlin, pp. 239-251.
- Sols, A. (1977). El efecto Pasteur en la era alostérica. En Avances de la Bioquímica. Salvat Editores, S.A. pp. 451-460.
- Sols, A. (1979). Multimodulation of Enzyme Activity.

  Physiological Significance and Evolutionary Origin. En

  Modulation of Protein Function (D.E. Atkinson y C.F. Fox,
  editores). ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular
  Biology, vol. XIII, 27-45. Academic Press, N.Y.
- Sols, A. y Crane, R.K. (1954). The Non-Competitive Inhibition of Brain Hexokinase by Glucose 6-Phosphate and Related Compounds. J. Biol. Chem. 210, 597-606.
- Stadtman, E.R. (1970). Mechanisms of Enzyme Regulation in Metabolism. En *The Enzymes* (P.D. Boyer, editor). Vol. I, pp. 397-459, 3a. Edición. Academic Press, New York.
- Stadtman, E.R. y Chock, P.B. (1978). Interconvertible Enzyme Cascades in Metabolic Regulation. Curr. Top. Cell. Regul. 13, 53-95.

- Storer, C. y Cornish-Bowden, A. (1974). The Kinetic of Coupled Enzyme Reactions. Applications to the Assay of Glucokinase, with Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase as Coupling Enzyme. *Biochem. J.* 141, 205-209.
- Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. (1976a). Concentration of MgATP<sup>2-</sup> and other Ions in Solution. Calculation of the Time Concentrations of Species Present in Mixtures of Associating Ions. *Biochem. J.* 159, 1-5.
- Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. (1976b). Kinetics of Rat Liver Glucokinase. Cooperative Interactions with Glucose at Physiologically Significant Concentrations. Biochem. J. 159, 7-14.
- Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. (1977). Kinetic Evidence for a 'Mnemonical' Mechanism for Rat Liver Glucokinase.

  Biochem. J. 165, 61-69.
- Sweeny, J.R. y Fisher, J.R. (1968). An Alternative to Allosterism and Cooperativity in the Interpretation of Enzyme Kinetic Data. *Biochemistry* 7, 561-565.
- Thoai, N.v., Huc, C., Pho, D.B. y Olomucki, A. (1969).
  Octopine déshydrogénase purification et propriétés catalytiques. Biochim. Biophys. Acta 191, 46-57.
- Tokarev, Y.N., Chernyak, N.B., Batishchev, A.I., Lamzina, N.V. y Alexeyev, G.A. (1978). Study of Electrophoretic and Kinetics Properties of G6PD from Erythrocytes in Cases of Inherited Enzyme Deficiency. Nouvel Rev. Fr. Hematol. 20, 558-564.
- Umbarger, H.E. (1956). Evidence for a Negative-Feedback Mechanism in the Biosynthesis of Isoleucine. Science 123, 848.

- Ureta, T. (1976). The Allosteric Regulation of Hexokinase C from Amphibian Liver. J. Biol. Chem. 251, 5035-5042.
- Ureta, T., Radojković, J., Díaz, N., Slebe, J.C. y 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., Lagos, R., Guixé, V. y Nuñez, L. (1979). Phylogenetic and Ontogenetic Studies of Glucose Phosphorylating Isozymes of Vertebrates. Arch. Biol. Exp. 12, 587-604.
- Uyeda, K. y Racker, E. (1965). Regulatory Mechanisms in Carbohydrate Metabolism. VII. Hexokinase and Phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 240, 4682-4688.
- Vera, M.L. (1981). Enzimas fosforilantes de glucosa en mucosa de intestino de rata. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- Vera, M.L., Cárdenas, M.L. y Niemeyer, H. (1976). Enzimas fosforilantes de glucosa en mucosa de intestino de rata. XIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile, Jahuel. Arch. Biol. Med. Exp. 11, R-110.
- Vera, M.L., Cárdenas, M.L. y Niemeyer, H. (1977). Enzimas fosforilantes de glucosa y de N-acetilglucosamina en mucosa de intestino de rata. I. Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica de Chile, Talca. Libro de Resúmenes, s/n.
- Viñuela, E., Salas, M. y Sols, A. (1963a). Glucokinase and Hexokinase in Liver in Relation to Glycogen Synthesis.

  J. Biol. Chem. 238, PC 1175-1177.

- Viñuela, E., Salas, M.L., y Sols, A. (1963b). End-Product Inhibition of Yeast Phosphofructokinase by ATP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 140-145.
- Vitols, E., Brownson, C., Gardinier, W. y Blakley, R.L. (1967). Cobamides and Ribonucleotide Reduction. V. A Kinetic Study of the Ribonucleoside Triphosphate Reductase of Lactobacillus leichmannii. J. Biol. Chem. 242, 3035-3041.
- Walker, D.G. (1963). On the Presence of Two Soluble Glucose Phosphorylating Enzymes in Adult Liver and the Development of one of these After Birth. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 209-226.
- Walker, D.G. (1966). The Nature and Function of Hexokinase in Animal Tissues. Essays in Biochemistry 2, 33-67.
- Walker, E.J., Ralston, G.B. y Darvey, I.G. (1975). An Allosteric Model for Ribonuclease. *Biochem. J.* 147, 425-433.
- Walker, E.J., Ralston, G.B. y Darvey, I.G. (1976). Further Evidence for an Allosteric Model for Ribonuclease.

  Biochem. J. 153, 329-337.
- Walker, E.J., Ralston, G.B. y Darvey, I.G. (1978a). The Nature of the Allosteric Interactions of Ribonuclease and its Ligands. *Biochem. J.* 173, 1-4.
- Walker, E.J., Ralston, G.B. y Darvey, I.G. (1978b). Preparation of Allosteric Ribonuclease. *Biochem. J.* 173, 5-10.
- Weinhouse, S. (1976). Regulation of Glucokinase in Liver. Curr. Top. Cell. Regul. 11, 1-50.
- Weiser, M.M., Qill, H. e Isselbacher, K.J. (1971). Isolation and Properties of Intestinal Hexokinases, Fructokinase, and N-acetylglucosamine Kinase. J. Biol. Chem. 246, 2331-2337.

- Wenzel, K.W., Kurganov, B.I., Zimmermann, G., Yakovlev, V.A., Schellenberger, W. y Hofmann, E. (1976). Self-Association of Human Erythrocyte Phosphofructokinase. Kinetic Behaviour in Dependence on Enzyme Concentration and Mode of Association. Eur. J. Biochem. 61, 181-190.
- Wieker, H.J., Johannes, K.J. y Hess, B. (1970). A Computer Program for the Determination of Kinetic Parameters from Sigmoidal Steady-State Kinetics. FEBS Letters, 8, 178-185.
- Wilkinson, K.D. y Rose, I.A. (1979). Activation of Yeast Hexokinase PII. Changes in Conformation and Association.

  J. Biol. Chem. 254, 2125-2131.
- Wilkinson, K.D. y Rose, I.A. (1980). Glucose Exchange and Catalysis by Two Crystalline Hexokinase Glucose Complexes. Evidence for an Obligatory ATP-Dependent Conformational Change in Catalysis. J. Biol. Chem. 255, 7569-7574.
- Wilson, J.E. (1978). Ligand-Induced Conformations of Rat
  Brain Hexokinase: Studies with Hexoses, Hexose 6-Phosphates,
  and Nucleoside Triphosphates Leading to Development of a
  New Model for the Enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 185,
  88-99.
- Wilson, J.E. (1979). Ligand-Induced Conformational Changes of Rat Brain Hexokinase. Their Role Determining the Substrate Specifity for Hexose and Inhibitory Effectiveness of Hexose 6-Phosphates. Arch. Biochem. Biophys. 196, 79-87.
- Witzell, H. (1967). Zur Interpretation Kinetisher Daten der Reacktion der Pancreas-Ribonuclease. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1249-1250.

- Yates, R.A. y Pardee, A.B. (1956). Control of Pyrimidine
  Biosynthesis in Escherichia coli by a Feed-back Mechanism.

  J. Biol. Chem. 221, 757-770.
- Yoshida, A. (1966). Glucose 6-phosphate Dehydrogenase of Human Erythrocytes. I. Purification and Characterization of the Normal (B<sup>+</sup>) Enzyme. J. Biol. Chem. 241, 4966-4976.



