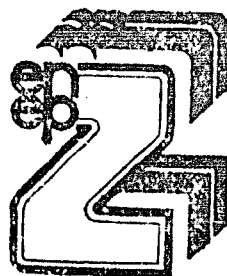


Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales ZARAGOZA



GLUCOSAMINA 6-FOSFATO ISOMERASA
(DESAMINASA) DE *E.coli*:
PURIFICACION Y PROPIEDADES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:

ELISEO CANTELLANO DE ROSAS

JULIO DE 1983



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

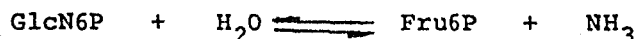
=====

I. INTRODUCCION	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.	6
III. MATERIALES	8
IV. METODOS	11
IV.1 Medidas de actividad enzimática.	11
IV.2 Medida de la concentración de proteínas.	14
IV.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida.	15
IV.4 Electroenfoque analítico en capa fina de poliacrilamida	16
IV.5 Ultracentrifugación	17
IV.6 Cromatografía analítica de filtración en gel.	18
IV.7 Análisis de aminoácidos.	19
IV.8 Diagrama del proceso de purificación y caracterización de la glucosamina 6-fos- fato isomerasa (desaminasa).	20
V. RESULTADOS.	24
V.1 Purificación de la enzima	24
V.2 Pureza de la enzima.	27
V.3 Estabilidad de la enzima.	28
V.4 Peso molecular y composición de subunidad	29
V.5 Composición de aminoácidos	30
V.6 Espectro de Absorción	30
V.7 Punto isoeléctrico	31
V.8 Actividad molecular.	31

V.9 Comportamiento cooperativo.	32
V.10 Dependencia de los parámetros con respecto al pH.	33
V.11 Cinética en ausencia de productos.	35
V.12 Cinética de la activación por GlcNAc6P	36
VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES.	37
VII. BIBLIOGRAFIA	52

I INTRODUCCION

En 1956, Leloir y Cardini (1) describieron por primera vez la transformación enzimática de la glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) en fructosa-6-fosfato (Fru6P) y NH_3 en preparados de riñón de cerdo. La enzima, que cataliza la siguiente reacción:



fué purificada parcialmente por estos autores por fraccionamiento salino con sulfato de amonio. También demostraron la reversibilidad de la reacción, y el efecto activador de la N-Acetil D-glucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). Este efecto es discutido por los autores como el de una posible coenzima, que participaría en la reacción. En esa época, no se había desarrollado la teoría alostérica, que actualmente nos permite replantear este fenómeno como de carácter regulatorio. Posteriormente, Comb y Roseman (2) estudiaron la enzima en *E.coli*, de donde la purificaron parcialmente a partir de bacterias cultivadas en glucosamina como única fuente de carbono y nitrógeno. El procedimiento de estos autores consistió en el fraccionamiento del extracto crudo

con sulfato de protamina seguido de cromatografía en columna de intercambio catiónico; en este trabajo se describen algunas propiedades fundamentales de la enzima, y la activación por GlcNAc6P, - que es semejante a la descrita en la enzima de - riñón de cerdo. La actividad de esta enzima ha - sido demostrada también en diferentes tejidos y - organismos, incluyendo cerebro humano (3), *Proteus vulgaris* (4), *Bacillus subtilis* (5), *Musca domés-tica* (6), *Drosophila virilis* (7), *Aerobacter cloa-cae* (8) y *Biphidobacterium biphidum* (9).

La enzima fué denominada inicialmente como - glucosamina 6-fosfato desaminasa, y en los prime-ros trabajos fué considerada fundamentalmente co-mo una enzima catabólica, capaz de catalizar una reacción necesaria para la utilización de los car-bonos de la glucosamina en el metabolismo energé-tico. La comisión de enzimas de la Unión Interna-cional de Bioquímica, la ha clasificado actualmen-te en la clase 5, de las isomerasas, con el nom-bre de 2-amino-2-desoxi-D-glucosa-6-P-cetol isome-rasa, y el número de clasificación 5.3.1.10. Se recomendó también como nombre común el de glu-cosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa).

También se la menciona frecuentemente en la literatura como glucosamina desaminasa.

El carácter reversible de la reacción, ha -
llevado a plantear el posible papel biosintético de esta enzima, es decir, su capacidad para iniciar la formación de aminoazúcares y sus derivados a partir de un intermediario glucolítico, la Fru6P. Se conoce otra enzima, que cataliza otra reacción de una manera irreversible, que ha sido reconocida desde hace mucho tiempo (10, 11) como la ruta de formación de la GlcN6P. Esta reacción es:



y la enzima correspondiente, se denominó inicialmente como una transferasa, de la clase 2: glutamina-Fru6P amido transferasa (E.C.2.6.1.16.). Actualmente se ha reclasificado como isomerasa, y se denomina glucosamina 6-P isomerasa (formadora de glutamina), E.C.5.3.1.19.

Sin embargo, la isomerasa desaminasa, puede cumplir también un papel en la formación de la -
GlcN6P. Es necesario tener en cuenta la constante de equilibrio de la reacción, ($K_{eq} = (\text{GlcN6P}) /$

$(\text{Fru6P})(\text{NH}_3) = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M (1) }$) y el hecho de -
que la etapa siguiente en la vía de síntesis de -
los aminoazúcares (fig. a) es la N-acetilación de
la GlcN6P con acetil CoA, para formar GlcNAc6P.
Esta última reacción es muy exergónica (ΔG° del
orden de las -8.0 KCal/mol , (12)), de modo que -
acoplada a la aminación-isomerización de la Fru6P,
permitiría la formación de aminoazúcares a partir
de intermediarios glucolíticos sin intervención de
la enzima que utiliza glutamina.

Esta idea se ha visto confirmada por Holmes
y Russell (13), quienes aislaron mutantes de *E. coli*
K 12, carentes de la isomerasa, dependientes de la
glutamina. También se ha mencionado la existencia
de esta enzima en dípteros (6, 7). En ambos casos,
la formación de aminoazúcares para la síntesis de
componentes de la pared bacteriana (mureína y li-
popolisacáridos) o del exoesqueleto de la quitina,
dependería únicamente de la actividad de la gluco-
samina 6-fosfato isomerasa (desaminasa).

Estos resultados, llevan a replantear el inte-
rés en las funciones biosintéticas de la glucosami-
na 6-fosfato isomerasa desaminasa. La existencia
de un regulador alostérico, puesta en evidencia -

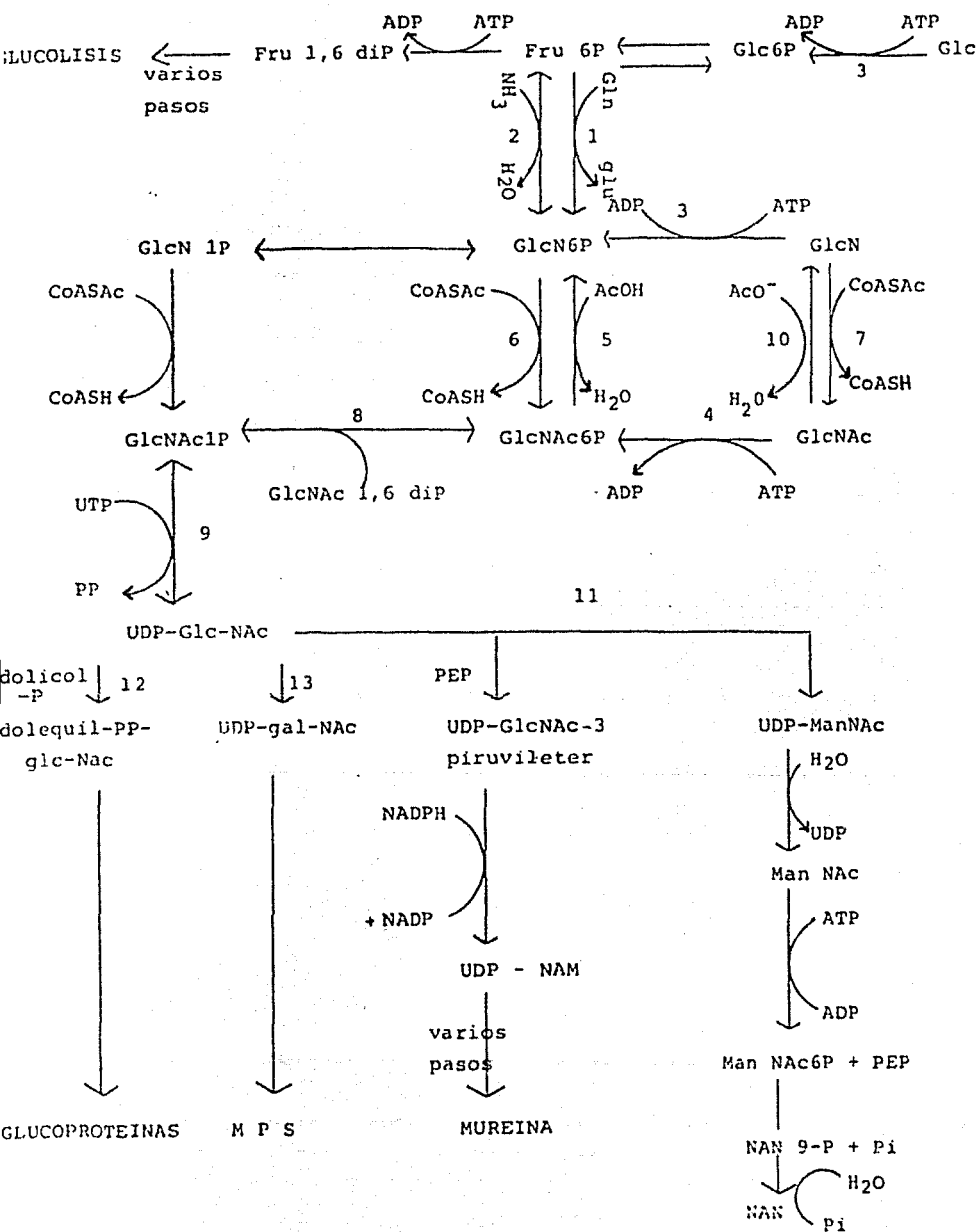


Figura a. Rutas metabólicas de los aminoazúcares.

ABREVIATURAS

Glc ; glucosa
Gal ; galactosa
Man ; manosa
glcN ; glucosamina
Fru ; fructosa
gln ; glutamina
AcOH ; ácido acético
CoASH ; coenzima A
PEP ; fosfoenol piruvato
NAN ; ác. N-acetil neuramínico
NAM ; ác. N-acetil murámico
MPS ; mucopolisacaridos
Pi ; fosfato
PP ; pirofosfato

- ENZIMAS
1. glucosamina 6-fosfato isomerasa dependiente de la glutamina.
 2. Glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa)
 3. Glucosamian cinasa, solo descrita en *Schistosoma mansoni* E.C. 2.7.1.8.
 4. N-acetil glucosamina cinasa 2.7.1.59.
 5. GlcNAc6P acetil hidrolasa E.C. 3.5.1.25.
 6. Acetil transferasa E.C. 2.3.1.4.
 7. GlcNAc transferas E.C. 2.3.1.3.
 8. fosfoacetil glucosamina mutasa E.C. 2.7.5.2.
 9. UDP-GlcNAc pirofosforilasa
 10. N-Ac-glucosamina acetil hidrolasa E.C. 3.5.1.33.
 11. UDP-GlcNAc 2-epimerasa E.C. 5.1.3.14.
 12. Pirofosforil-doliquil-di-P-GlcNAc sintetasa
 13. UDP-GlcNAc 4-epimerasa E.C. 5.1.3.7.

desde los primeros trabajos sobre esta enzima (1), nos pone frente a un sistema alostérico reversible con significación funcional en ambos sentidos, lo que constituye una situación excepcional en el metabolismo.

La reacción en sí, también es una situación-excepcional. Se trata de una isomerización ceto--aldólica acoplada a un proceso de aminación-desaminación (reacción de Amadori, (14)) de la cual - esta enzima constituye un único ejemplo biológico. En uno de los últimos trabajos significativos sobre esta enzima, Milderfort y Rose (15), estudiaron la estereoquímica y el mecanismo químico de la reacción catalizada por la isomerasa desaminasa. Con este fin, utilizaron el preparado parcialmente purificado de Comb y Roseman (2) en 1958.

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

De esta enzima aún no se han publicado purificaciones totales, de ninguna fuente animal o microbiana ni existen en consecuencia, estudios estructurales sobre la misma.

El presente trabajo forma parte de un estudio más amplio de esta enzima en *E.coli* que abarca aspectos cinéticos y mecanísticos. Su objetivo consiste en desarrollar una ruta de purificación total que permita obtener cantidades suficientes de la enzima, y reunir al mismo tiempo información cinética y estructural fundamental para apoyo del programa general de trabajo. Esto incluye el estudio de la cinética de velocidades - iniciales (en ausencia de productos) en ambos - sentidos de la reacción, y de la variación de - los parámetros cinéticos con el pH para establecer las condiciones de trabajo en el futuro. Desde el punto de vista estructural es también importante conocer el coeficiente de absortividad de - la enzima pura, a los efectos de establecer en cada experimento su concentración precisa. Esto se hará ventajosamente, estableciendo la composición de aminoácidos de la enzima. Este dato además de

su interés por sí mismo y como referencia para -
apoyar consideraciones de biología comparada, per
mitirá calcular con precisión la masa de la proteí
na colocada en la muestra analizada, lo que es el
fundamento de la medida del coeficiente de absor-
tividad molar. Asimismo con la composición de -
aminoácidos se podrá calcular el volumen específi
co de la proteína que es un dato importante para
estudios de sedimentación en la ultracentrífuga
analítica. Otro objetivo del estudio es el de
conocer el punto isoelectrico y el peso molecular de
la proteína nativa, su posible composición en sub
unidades, y el peso molecular de las mismas.

El trabajo se desarrollará con la bacteria
E.coli debido a su facilidad de cultivo y el ca-
rácter adaptativo de la síntesis de la glucosami-
na 6-fosfato isomerasa, cultivada en un medio in-
ductor con glucosamina como única fuente de carbo
no y nitrógeno.

III MATERIALES

Las enzimas, las proteínas y los derivados de carbohidratos se adquirieron a Sigma Chemical Co. (Estados Unidos), los demás reactivos fueron de pureza analítica y se compraron a Baker y a Merck de México. Los geles de filtración molecular y de intercambio iónico, así como los anfolitos para electroenfoque ("Pharmalyte") fueron productos de Pharmacia Fine Chemical (Suecia). El Ultrogel ACA 34 se adquirió a LKB Produkter (Suecia). La GlcN6P con anhídrido acético en solución de bicarbonato de sodio, y purificada por cromatografía de intercambio iónico en Dowex 1-acetato, de acuerdo al procedimiento de Leloir y Cardini (1). La pureza del producto se verificó por cromatografía en capa fina sobre placas de celulosa microcristalina usando el siguiente sistema como disolvente: etanol, 5; acetato de amonio 1M, 2; ácido acético, 1; agua 1. En este sistema la GlcNAc6P tiene un R_f de 0.60 mientras que el producto sin reaccionar, la GlcN6P migra con un R_f de 0.50. Las placas se revelaron para aminoazúcares con ninhidrina y para N-acetil aminoazúcares con la reacción de Elson y

Morgan (16). Además se usaron revelados de tipo general como los vapores de yodo y el rociado con ácido sulfúrico 5N seguido de calentamiento.

La matriz de afinidad se preparó enlazando - GlcN6P y epsilon-amino-caproíl agarosa (2 meq. - de grupos ácidos por ml. de gel empacado, adquirido a Sigma Co.) por acoplamiento con carbodiimida. La suspensión de agarosa en agua destilada a pH - 4.5 se mezcló con GlcN6P (forma ácida) para dar una concentración final de 100 mM, luego el pH se reajustó a 4.5. La reacción se efectuó a temperatura ambiente en la presencia de 0.2 mmol/ml de - cloruro de N-etil-N'-3-dimetil amino-propil-carbodiimida, durante doce horas. El gel se lavó con amortiguador Tris-HCl 0.1 M a pH 7.25 (25°C) - que contenía NaCl 0.1 M. Después de su uso el - gel fué lavado de la misma manera, adicionado con un volumen de glicerol y almacenado a -20°C. En - la figura b se muestra la estructura del componente activo de este medio cromatográfico de afinidad.

La *E.coli* B se cultivó en condiciones aeróbicas a 36°C y pH 7.0, glucosamina 0.05 M como única fuente de carbono y nitrógeno, en el medio mineral descrito por Comb y Roseman (2). El cultivo se -

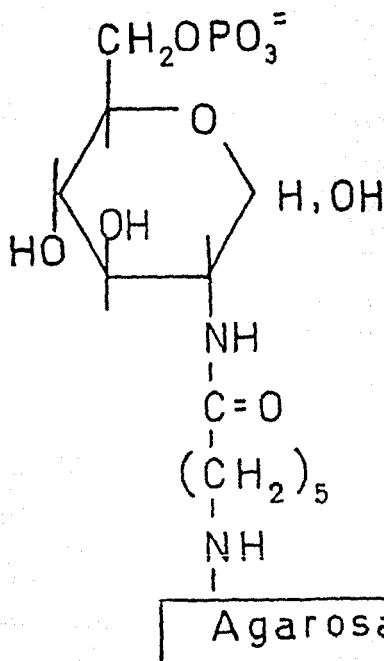


Figura b . Estructura de la matriz de afinidad utilizada para la purificación de la glucosamina 6-fosfato desaminasa.

realizó simultáneamente en tres fermentadores de 14 litros que contenían 10 litros de medio oxigenado por aire a 5 litros/minuto y un pH constante de 7.0 mantenido por adición automática de NaOH 5N (sistema labroferm). La masa celular de *E.coli* se colectó al final del período de crecimiento y se almacenó a -20°C hasta su uso, pero no por más de dos semanas.

IV METODOS

IV.1 Medidas de actividad enzimática

Las determinaciones enzimáticas de rutina fueron hechas en la dirección de la formación de la Fru6P (sentido catabólico) en una mezcla de reacción de 200 microlitros, que contenían amortiguador Tris HCl 75 mM pH 7.7, GlcNAc6P 0.85 mM y cantidades variables del sustrato, GlcN6P. Las reacciones se iniciaron agregando la enzima e incubando a 30°C por un tiempo fijo y parando la reacción agregando 2.0 ml de HCl 10N. La Fru6P se determinó por el método de Roe (17) agregando resorcinol y leyendo a 512 nm, luego de incubar durante 7 minutos a 70°C. Este procedimiento también se usó para hacer la mayor parte de las determinaciones cinéticas, efectuando las correcciones por consumo de sustrato cuando era necesario, de acuerdo al procedimiento de Lee y Wilson (18), pero evitando siempre tener reacciones con grado de avance mayor del 5%. Las velocidades de reacción en esta dirección también se determinaron espectrofotométricamente por medio de un ensayo acoplado con la enzi-

ma glutamato deshidrogenasa, para medir la forma
ción del NH_3 . Comunmente la mezcla de reacción
(350 microlitros) contenía amortiguador Tris-
HCl 75 mM, pH 7.7, NADH 0.15 mM, alfa-cetogluta-
rato 12 mM, GlcNAc6P 0.15 mM, concentraciones -
variables de GlcN6P y una cantidad de glutamato
deshidrogenasa de hígado de bovino que fué esti-
mada como lo proponen Storer y Cornish-Bowden -
(19). La desaparición del NADH fué registrada -
por medio de un espectrofotómetro registrador -
de doble haz, Pye Unicam SP-8-100.

En la dirección biosintética de la reacción,
las velocidades se midieron analizando la GlcN6P
formada en un tiempo fijo. Cada mezcla de reac-
ción de 200 microlitros contenía amortiguador -
Tris-HCl 75 mM, pH 7.7, GlcNAc6P 0.85 mM, y con-
centraciones variables de los sustratos, Fru6P y
 NH_3 (como NH_4 , en solución acuosa ajustada con
alcali al pH de la mezcla). La reacción se de-
tuvo por inmersión de los tubos en un baño hir-
viente a 92°C , y la GlcN6P se midió con una modi
ficación de la reacción de Elson y Morgan descri-
ta por Reissig (20), usando blancos sin enzima pa-
ra corregir la lectura por la presencia de -

GlcNAc6P en la mezcla de reacción. El avance to tal de la reacción siempre se controló y cuando fué necesario se hizo la corrección por grado de avance de acuerdo a la ecuación de Lee y Wilson (18). La unidad de actividad enzimática se defini nió en el sentido catabólico como la cantidad - que cataliza la formación de un micromol de - Fru6P en un minuto a 30°C a pH 7.7 . Se realizó también un método de ensayo espectrofotométrico acoplado en el sentido biosintético de la reacci ción, basado en el hecho de que la glucosa 6-fosfo fato deshidrogenasa es capaz de actuar también sobre la GlcN6P, produciendo el 2-desoxi-2-amino derivado del ácido glucosamínico 6-fosfato. El Km para ambos sustratos es semejante, y el ensayo no ofrece dificultades como método de cuantifi ficación enzimática de la GlcN6P. El sistema - contiene Fru6P, NH_4Cl , NADP, glucosamina 6-fosfa to deshidrogenasa, glucosamina desaminasa y un - amortiguador de Tris-HCl pH 7.7; luego se registra la formación de NADPH a 340 nm, en un espectro trofotómetro de celdas termostatzadas a 30°C. Sin embargo, su empleo para la medida de la activi vidad enzimática en el sentido biosintético se -

ve obstaculizada por dos problemas. Uno de ellos, es que la Fru6P comercial, adquirida a Sigma Chemical Co., contiene hasta 0.1% de glucosa 6-fosfato como impureza, y que se trata de un componente muy difícil de eliminar. Otro inconveniente, es que el método sólo resulta aplicable a la enzima en ausencia de su activador alostérico, GlcNAc6P, ya que éste es también sustrato de la glucosamina 6-fosfato deshidrogenasa. El producto formado en este caso, es el ácido 2-desoxi-2-N-acetil amino glucónico 6-fosfato cuya existencia o significación no ha sido reportada.

IV.2 Medida de la concentración de proteínas

Durante los primeros pasos de la purificación se midió la concentración de proteínas por el método turbidimétrico de Bücher (21). También se utilizó el método de Bradford (22) basado en el cambio de color del extracto ácido del azul de comassie G en presencia de proteínas. En los dos casos se utilizó como patrón de referencia a la albúmina de suero de bovino. En el caso de la

enzima obtenida pura, y luego de establecer su -
coeficiente de absorptividad, siempre se calculó
la concentración en base a su absorción a 275 nm,
en amortiguador Tris-HCl pH 7.7 . El coeficiente
de absorptividad molar usado fué de 8.1×10^4 -
($E^{1\%}_{1\text{cm}}$ 4.55) calculado en base a los datos de -
composición de aminoácidos.

IV.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las electroforesis en condiciones no desnaturantes se efectuaron en placas de gel de poliacrilamida con gradiente de poro (PAA4/30, Pharmacia) a 10°C en amortiguador Tris-bórico 90 mM pH 8.35 con Na_2EDTA 5 mM, a 125 volts durante 16 horas. Simultáneamente se corrieron varias proteínas de referencia, y las bandas proteicas se detectaron tiñiendo con azul brillante de comassie G (23).

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes se desarrollaron en presencia de dodecil sulfato de sodio al 0.1% en placas de 18 x 14 x 0.07 cm. usando gel de empaque al 6% y gel de separación al 11.4% y un sistema discontinuo de amor

tiguadores modificado de acuerdo a Laemmli (24). Las placas se tiñieron con azul brillante de comassie G o R al 0.2% en solución de ácido acético al 10% e isopropanol al 20% durante 12 a 18 horas. El mismo disolvente se utilizó para desteñir los geles, en presencia de una lámina o trozos de espuma de poliuretano que absorbe el colorante. Esto permite economizar disolvente y evitar los cambios de líquido (25).

IV .4 Electroenfoque analítico en capa fina de Poliacrilamida.

Se corrieron geles al 5% de concentración* y al 2.6% de entrecruzamiento* con anfolitos de Pharmacia Fine Chemicals, pH 6 - 8 6 3 - 0 (Pharmalyte), diluidos y usados de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las placas se enfocaron a 25 watts durante 6 horas a 4°C, luego se fijaron y tiñieron de acuerdo al método de Malik y col. - (26), o con métodos convencionales con azul brillante de comassie G. También se realizó electroenfoque analítico en placas delgadas de poliacril

* % de concentración = acrilamida + metilenbis acrilamida
% de entrecruzamiento = metilenbis / % de concentración

amida (pH 6-8) en presencia de urea 6M y tritón X-100 al 2% bajo las mismas condiciones de corrida.

IV .5 Ultracentrifugación

Las ultracentrifugaciones en gradiente de densidad de sacarosa se hicieron como lo describen Martin y Ames (27), a 290 000 x g y 5°C en amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 7.7 usando un rotor Beckman SW-50 a 50 000 revoluciones por minuto durante diez horas en tubos de nitrato de celulosa de 5.0 ml. de capacidad. El contenido de los tubos se analizó colectando fracciones después de perforarle el fondo.

También se hicieron centrifugaciones en gradiante de densidad en presencia de monómeros de poliacrilamida, un procedimiento modificado (28), basado en una idea de Jolley y col. (29). En -esta técnica se polimeriza por fotocatálisis después de realizar la centrifugación y el gel se -colorea por los métodos señalados para proteínas. Para calcular el coeficiente de sedimentación y

el peso molecular se utilizaron como referencia las siguientes proteínas: hemoglobina humana, aldolasa de músculo de conejo y catalasa de eritrocitos humanos. Los resultados se graficaron de acuerdo al procedimiento descrito por Calcagno y Rendón (30), para calcular el peso molecular.

IV .6 Cromatografía analítica de filtración en gel

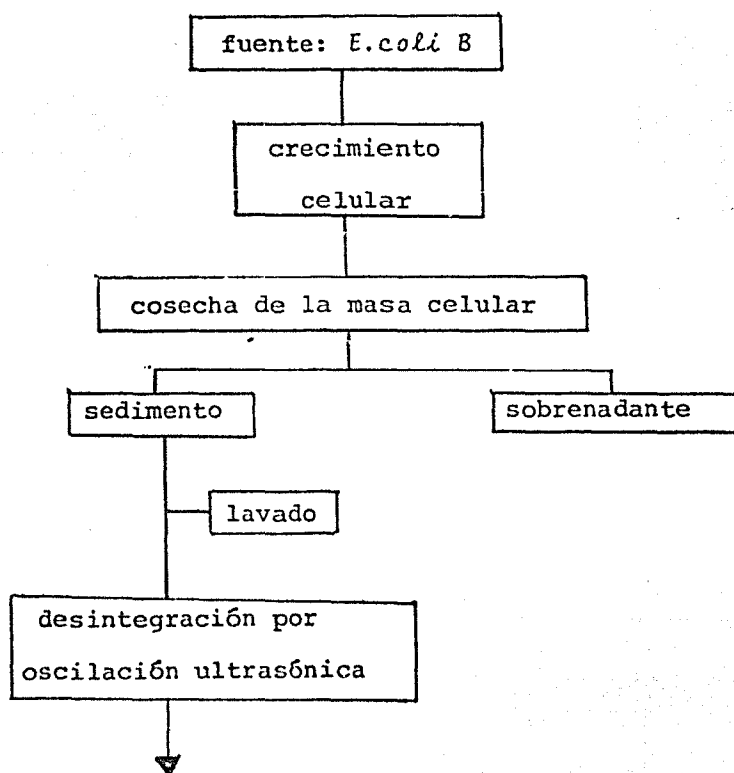
El peso molecular aparente de la glucosamina 6-fosfato isomerasa de *E.coli* se estimó a partir de su volumen de elución en una columna calibrada de Ultrogel ACA 34. El tamaño de la columna fue de 1.6 x 100 cm. y el gel fue equilibrado con amortiguador Tris-HCl 75 mM, pH 7.7 a 4°C. Las proteínas que se usaron como referencia fueron la mioglobina de caballo, la hemoglobina humana, la aldolasa de músculo de conejo y la catalasa de hígado de bovino. Los perfiles de elución se determinaron registrando la absorbancia del eluido a 280 nm.

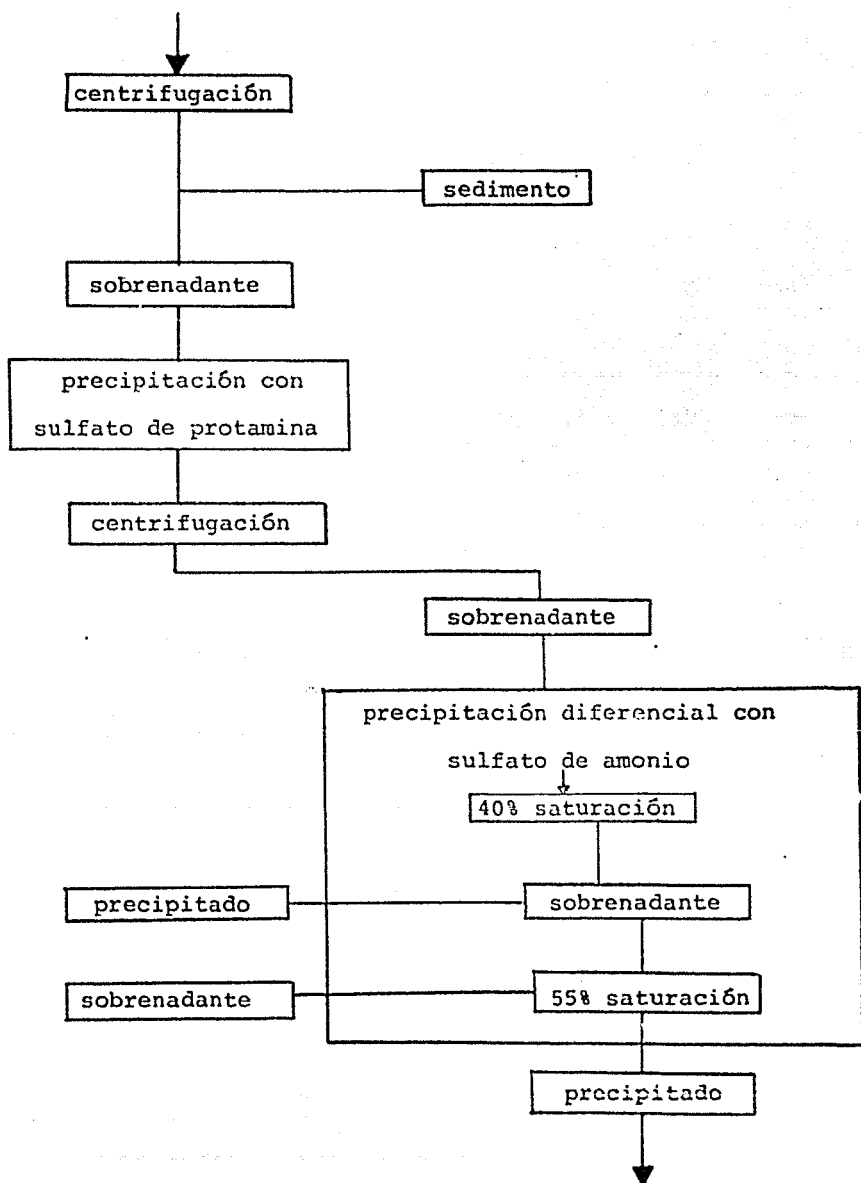
IV.7 Análisis de aminoácidos

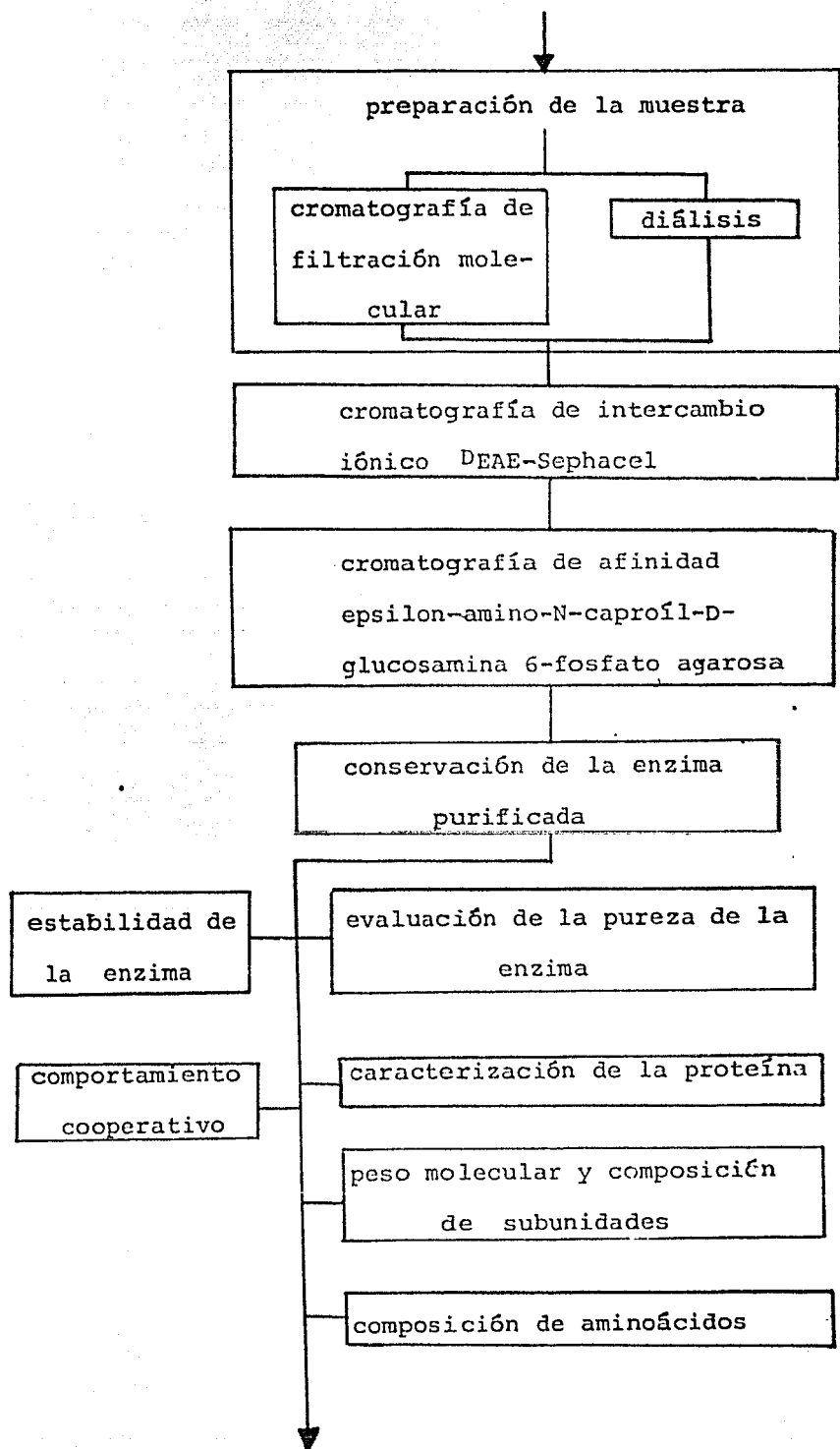
Todos los análisis de aminoácidos fueron realizados por el Dr. Guillermo Ramírez de la Unidad de Análisis y Secuenciación de Proteínas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las muestras de proteínas se hidrolizaron a 110°C en una solución de HCl 5.7N (mezcla de punto de ebullición constante), durante 24, 48 y 90 horas. Los aminoácidos se cuantificaron por medio de un analizador de aminoácidos Durrum D-500. La cisteína y metionina se determinaron como ácido cisteico a partir de las muestras de proteína previamente oxidadas con ácido per fórmico (31) e hidrolizando en HCl 5.6N durante 20 horas a 110°C. Los valores de treonina y serina se corrigieron por extrapolación a tiempo cero y el resto de los aminoácidos se calcularon en base a su valor medio. El análisis del triptófano fué hecho por hidrólisis de la enzima en ácido metanosulfónico 4.0N con 0.02% de 3-(2-aminoetil) indol (32). El ácido per fórmico se preparó en el momento de uso mezclando 0.5 ml. de H_2O_2 (30 vol.) con 9.5 ml. de ácido fórmico al 29% y se incubó a 25°C

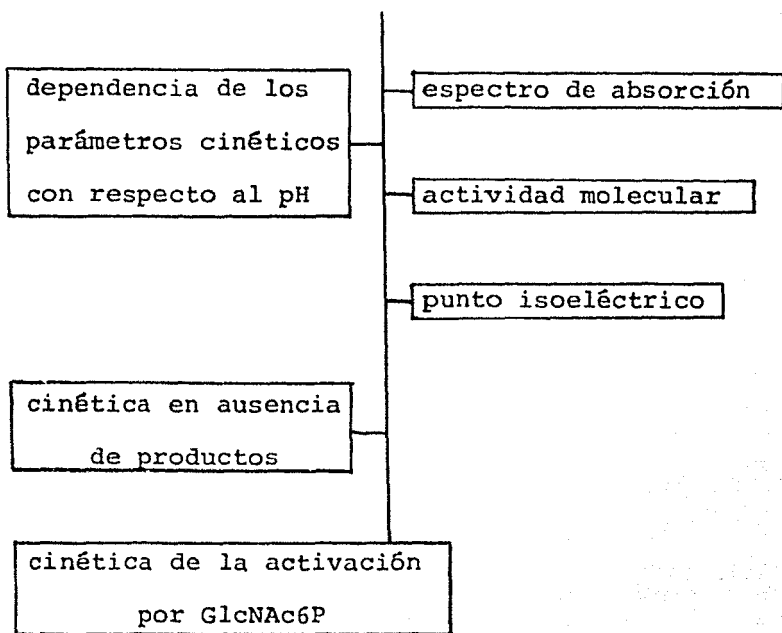
antes de su uso. También se calculó la concentración de triptófano en la proteína sin hidrolizar en NaOH 0.1 N mediante el método de Goodwin y Morton (33).

IV.8 Diagrama del Proceso de Purificación y - Caracterización de la Glucosamina 6-fos- fato isomerasa (desaminasa) de *E.coli*









V RESULTADOS

V.1 Purificación de la enzima

La enzima se purificó por el siguiente procedimiento efectuando todas las operaciones a una temperatura constante de 4°C. Las células bacterianas centrifugadas (150 - 250 g. de peso húmedo en una preparación típica) se lavaron dos veces con KCl 0.15 M, y se desintegraron por oscilación ultrasónica con tres volúmenes de amortiguador fosfato de potasio 50 mM pH 7.0. Luego el extracto fué centrifugado a 48 000 x g. durante una hora, y el sedimento se sometió a un nuevo ciclo de rotura y centrifugación. A los sobrenadantes recogidos, se les agregó una solución de sulfato de protamina 0.5% bajo agitación suave, en una proporción de 0.3 mg. de sulfato de protamina por mg. de proteína. Después de 15 minutos se centrifugó el precipitado formado (48 000 x g. durante una hora), el sobrenadante se ajustó a un pH de 7.0 con una solución de NH_4OH 5N y se agregaron 225 mg/ml de sulfato de amonio (equivalente a 40% de saturación a 4°C) el precipitado se recogió por centri-

fugación (25 000 x g, durante 5 minutos) al sobrenadante decantado se le agregaron 89 mg/ml de sulfato de amonio y el precipitado que contiene la enzima se recogió por centrifugación para después disolverlo en un volumen mínimo de amortiguador de imidazol-HCl 50 mM, pH 7.4 a 4°C. El sulfato de amonio se eliminó por cromatografía de filtración molecular en una columna de Sephadex G-25 equilibrada con el mismo amortiguador y de esta manera preparar la muestra para la cromatografía de intercambio iónico. En algunas preparaciones esta etapa se substituyó con una diálisis de 6 horas (con un cambio de medio de diálisis a las 3 horas) contra 50 a 70 volúmenes de amortiguador de imidazol-HCl, bajo agitación a 4°C en una membrana de diálisis Spectrapor 4, con un corte a los 10 000 daltones de peso molecular. La muestra se aplicó en una columna de DEAE Sephacel equilibrada con el mismo amortiguador de imidazol. La elución se llevó a cabo con un gradiente convexo, formado con una bomba peristáltica de tres canales (Pharmacia modelo P-3), de acuerdo al método de Lakshmanan y col. (34), de 0 a 0.25 M, manteniendo constante la concentración del amorti

guador. De esta manera la enzima sale como un solo pico cuando la concentración de NaCl es de 0.095 - 0.10 M (figura c) Las fracciones eluidas que tenían una actividad enzimática específica mayor de 20 - 25 unidades mg de proteína, se recogieron para agregarles 0.45 mg/ml de sulfato de amonio y de esta manera concentrar las proteínas por precipitación. Luego el precipitado se disolvió en un volumen mínimo de amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.25.

La solución se aplicó en una pequeña columna de un ml preparada con la matriz de afinidad de ϵ -amino-N-caproíl-D-glucosamina 6-fosfato agarosa, contenida en una jeringa desechable del tipo para insulina. La matriz de afinidad se usó en una proporción de un ml de gel por cada 10 mg de enzima pura. La columna se lavó con el amortiguador, y la enzima fué eluida con una solución de GlcNAc6P 1.0 mM preparada en el mismo amortiguador. La enzima sale como un solo pico pronunciado, con una actividad específica constante de 800 - 900 unidades por mg de proteína. Se juntaron las fracciones que contenían la enzima y se diluyeron con un volumen de glicerol y luego se almacenaron a - 20°C.

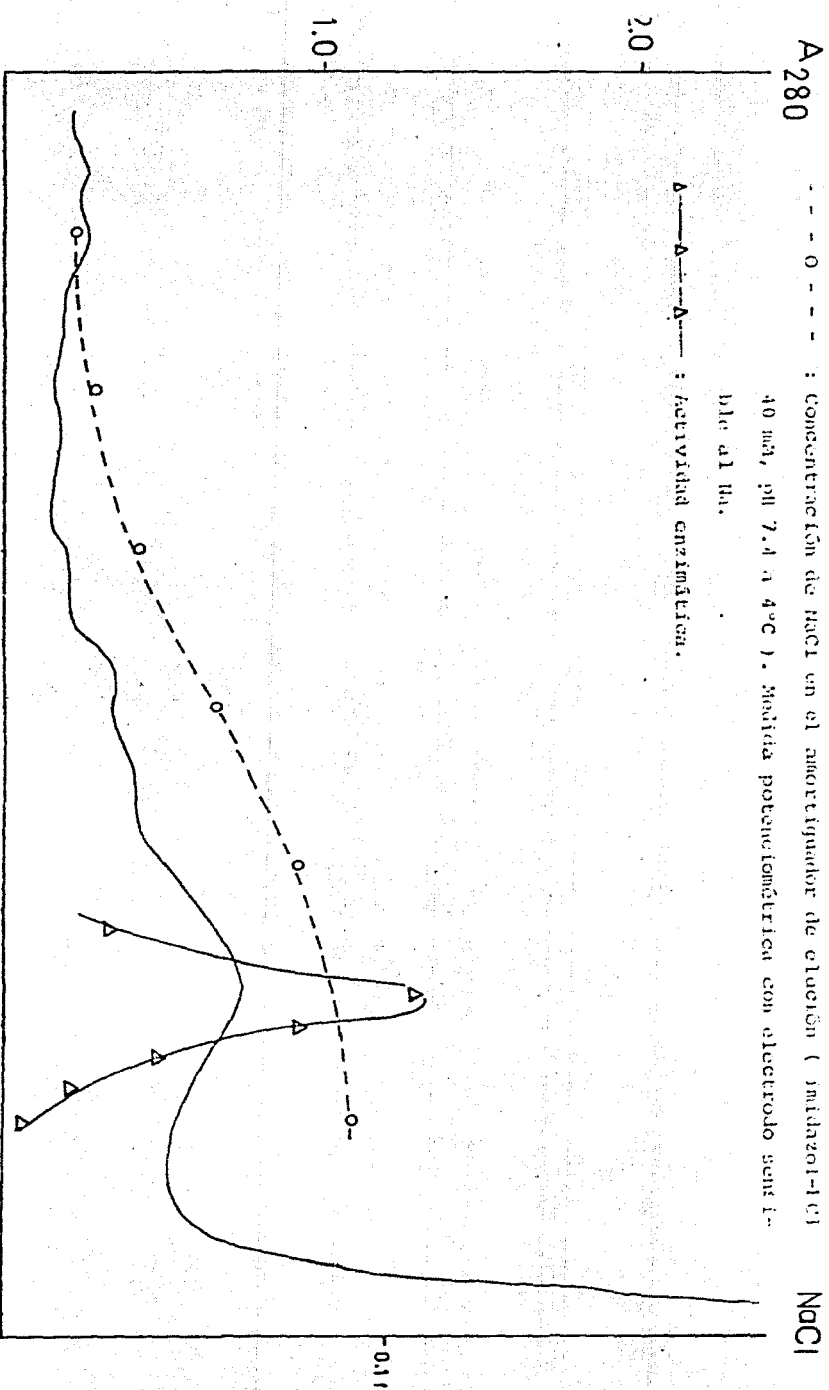
Comparada con el extracto inicial, la enzima --

Figura 1. Purificación de la glucosamina de semilla. Paso IV : cromatografía en fase líquida.

frase continuo : Perfil de absorbancia a 280 nm (monitorización continua) .

--- O --- : concentración de NaCl en el amortiguador de elución (indazol-1-Cl 40 mM, pH 7.4 a 4°C). Medida potenciométrica con electrodo sensible al Na.

Δ---Δ---Δ : actividad enzimática.



FRACCIONES

se purificó 1090 veces, con un rendimiento promedio de casi 50%. Se obtuvieron aproximadamente 12 mg de enzima pura a partir de 100 g. peso húmedo de células de *E. coli*. En la tabla I se presenta un resumen de los pasos de purificación.

V. 2. Pureza de la enzima

Después de efectuar la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio 0.1 %, la preparación enzimática reveló una sola banda. En la figura d, se muestran las electroferesis realizadas con este método para todas las etapas de la purificación. De igual manera la electroforesis en gel de gradiente de poro (4-30%) mostró una sola banda y lo mismo sucedió en la sedimentación en la ultracentrífuga en presencia de monómeros de poliacrilamida que fueron polimerizados y posteriormente teñidos.

Todas las fracciones que corresponden al pico - obtenido en la columna de cromatografía de ultrogel-AcA 34 presentaron una actividad específica constante y el pico fué simétrico. Las fracciones de elución colectadas después de perforar los tubos de centrifuga en los experimentos de sedimentación en gradiente de sacarosa, también muestran un solo pico con acti-

ESQUEMA DE LA PURIFICACION DE LA GLUCOSAMINA 6-FOSFATO ISOMERASA
(DESAMINASA) DE ESCHERICHIA COLI B (100 g de biomasa).

TABLA 1

PROCEDIMIENTO	VOLUMEN ml	PROTEINA mg/ml	UNIDADES TOTALES	ACTIVIDAD ESPECIFICA	RENDIMIENTO	PURIFICACION No. VECES
EXTRACTO INICIAL	315	21.0	3.55×10^3	0.56	100	1
SULFATO DE PROTAMINA	350	6.25	3.41×10^3	1.74	96	3.1
SULFATO DE AMONIO 40 - 55 % Saturación	18.5	21.0	3.08×10^3	8.25	85	14.9
DEAD-SEPHACEL	4.0	5.3	1.96×10^3	93.3	55.2	166.
N-aminocaproil- Glucosamina-6-P agarosa	0.5	5.8	1.76×10^3	610.0	49.6	1090.

UNIDAD : u moles de Fru6P formadas a partir de la GlcN6P, a 30°C, pH 7.7 (V max)

EXTRACTO INICIAL

SULFATO DE PROTAMINA

SULFATO DE AMONIO

40 a 55 % Saturación

DEAE Sephacel

N-epsilon-aminocaproil

Glucosamina -P agarosa

Figura d . Electroforesis en poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio de las diferentes etapas de la purificación de la enzima.

vidad específica constante. También se encuentra una única banda en electroenfoque en gel de poliacrilamida al 6% (pH 3-9 y pH 5-8) y en electroenfoque de pH 3 a 9 en geles que contenían urea 6M y --triton X-100 2%.

V. 3 Estabilidad de la enzima

La enzima purificada se almacenó a - 20°C en amortiguador Tris-HCl 0.05 M a pH 7.25, NaCl 0.05 M, GlcNAc6P y glicerol a 50% (volumen/volumen); en estas condiciones la enzima se mantuvo estable durante varios meses. En cambio si la enzima se mantiene en el mismo pH pero precipitada en sulfato de amonio - al 50%, la estabilidad es menor y la actividad enzimática se pierde gradualmente. Por otra parte en la electroforesis en gel de gradiente de poro y en la cromatografía de exclusión molecular, la enzima ya no mostraba la misma homogeneidad que en las condiciones de almacenamiento anteriormente descritas.

V. 4. Peso molecular y composición de subunidades

Se obtuvo un peso molecular por subunidad de 29000 Dalton (± 300 error estándar) a partir de la electroforesis en gel desnaturalizante con dodecilsulfato de sodio. Con este procedimiento se observó - una sola banda lo que indica que aparentemente las subunidades tienen un peso molecular igual o muy semejante (figura e). Empleando la técnica de electroforesis en gel con gradiente de poro se encontró -- un peso molecular estimado en $190\ 000 \pm 2\ 500$ (figura f). Mediante cromatografía de filtración molecular en ultrogel Aca 34 fué de 185 000 (figura g). - En la ultracentrifugación con gradiente de sacarosa la enzima muestra un coeficiente de sedimentación - de 9.55 ± 0.5 , este valor fué calculado usando como patrones de referencia internos a la hemoglobina, - la aldolasa y la catalasa (figura h e i). Empleando este valor y de acuerdo a el criterio de Martín y - Ames (27) el peso molecular asignado a la proteína - por este procedimiento es de 190 000. Cuando los resultados de la ultracentrifugación se analizan de - acuerdo al gráfico propuesto por Calcagno y Rendón (30) se obtiene un peso molecular de 175 000 Daltones (figura j).

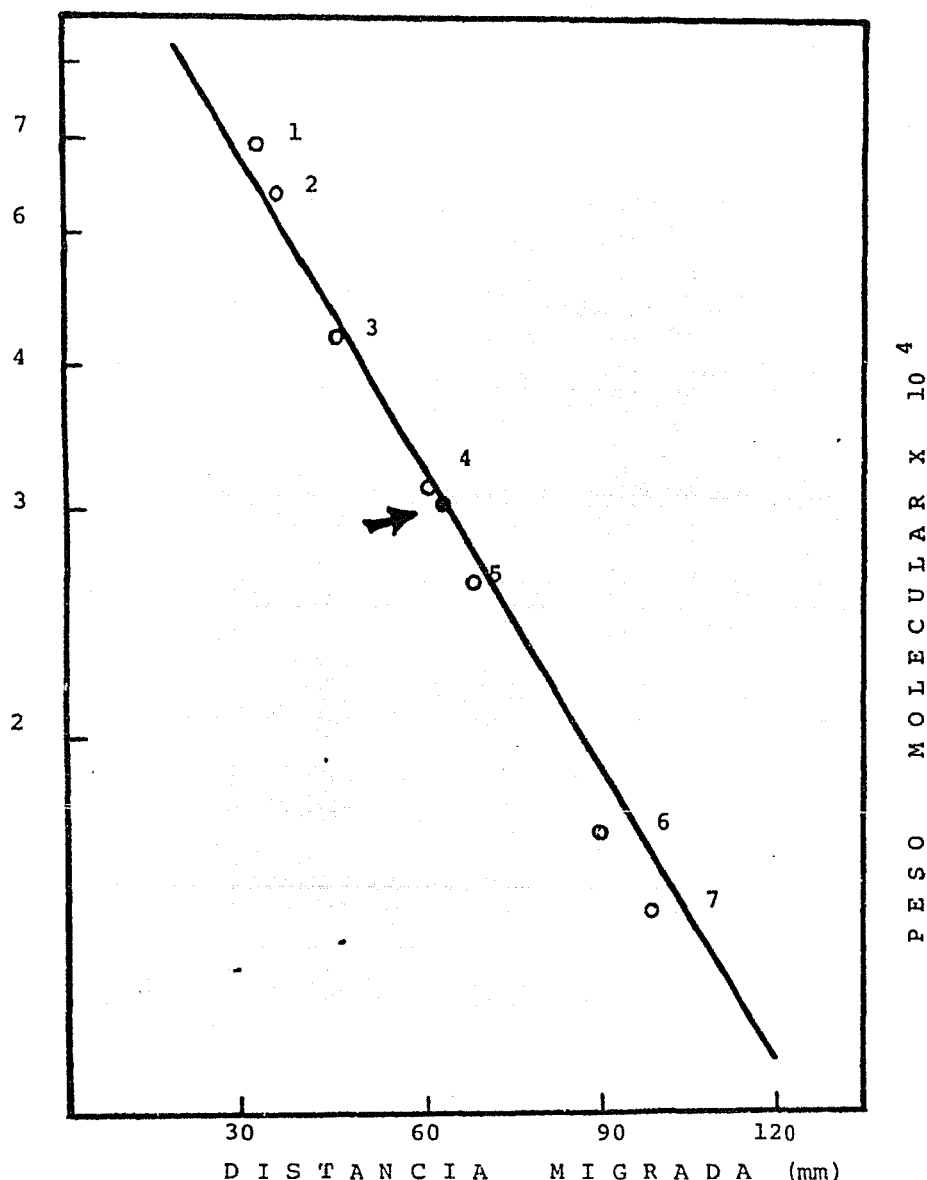


Figura e. Peso molecular de las cadenas polipeptídicas de la enzima determinado por lectroforesis en poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio. La flecha indica la distancia migrada y el peso molecular estimado.

Patrones de calibración; 1. Albúmina de suero bovino, 2. Catalasa de hígado de bovino, 3. Ovoalbúmina, 4. Anhidrasa carbónica de eritrocito, 5. Quimiotripsinógeno de cerdo, 6. Mioglobina de músculo de caballo y 7. Citocromo C de músculo de caballo .

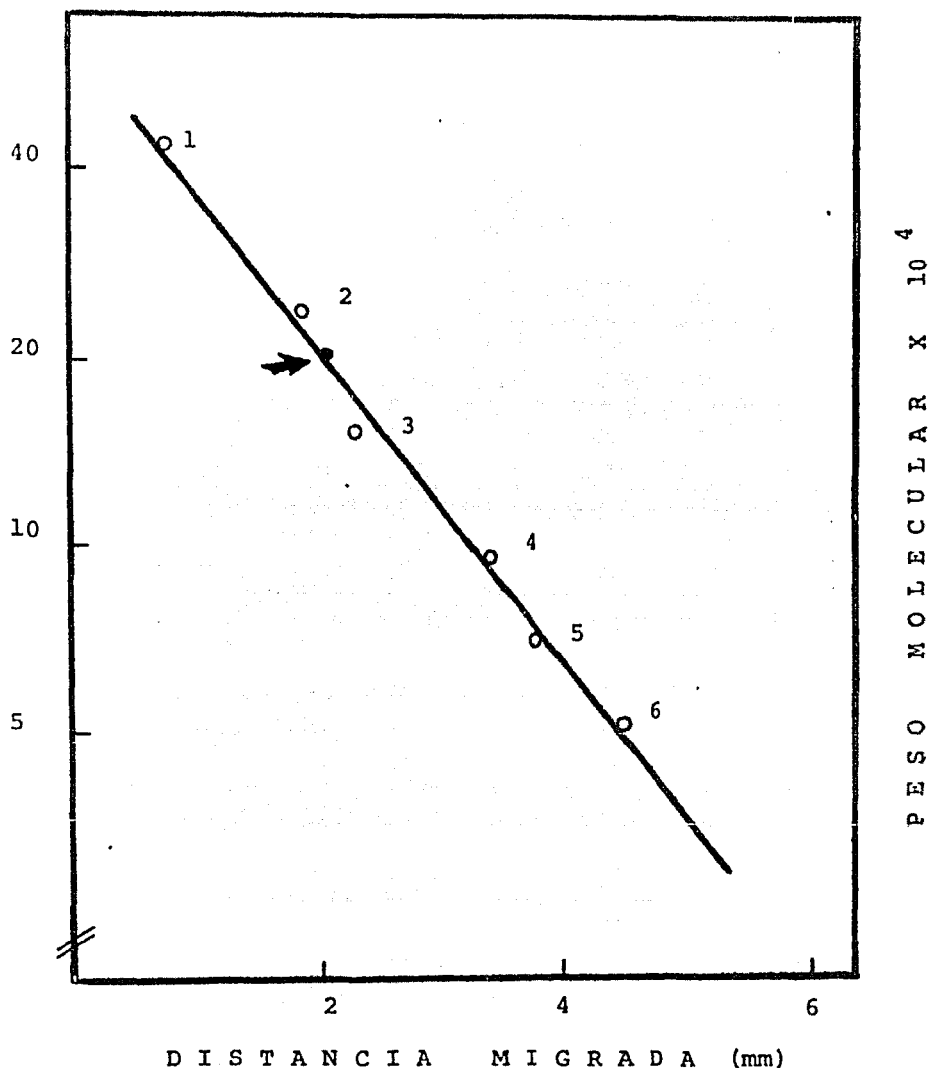


Figura f. Peso Molecular de la enzima mediante gradiente de poro. La flecha indica la distancia migrada y el peso molecular correspondiente.

Patrones de calibración: 1. Ferritina de bazo de bovino, 2. Catalasa de hígado de bovino, 3. Dímero de albúmina de suero de bovino, 4. Glutación reductasa de *Spirulina maxima* (dímero), 5. Albúmina de suero de bovino (monomero) y 6. Ovoalbúmina .

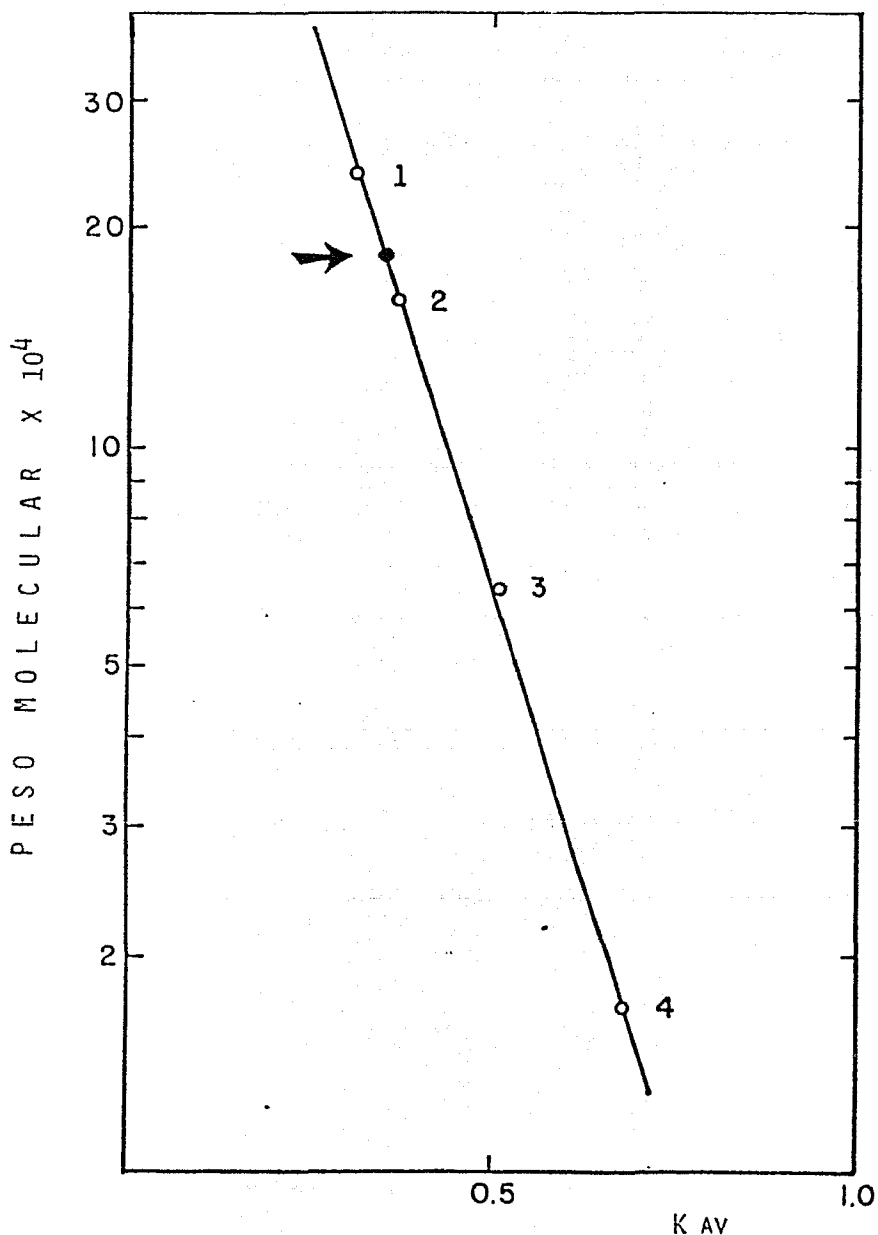


Figura g.

Cromatografía de la $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ desaminasa en una columna de Ultrogel Aca 34, en Tris-HCl 75 mM, pH 7.75 a 4°C . Columna de 1.6 x 100 cm eluida a un flujo constante de 4.0 cm h^{-1} . La flecha indica el valor de K_{AV} y el peso molecular estimado para la enzima.

Patrones de referencia : 1 - Catalasa, 2 - Fructosa 1,6 di-fosfato aldolasa de músculo de conejo, 3 - hemoglobina humana y 4 - Mioglobina.

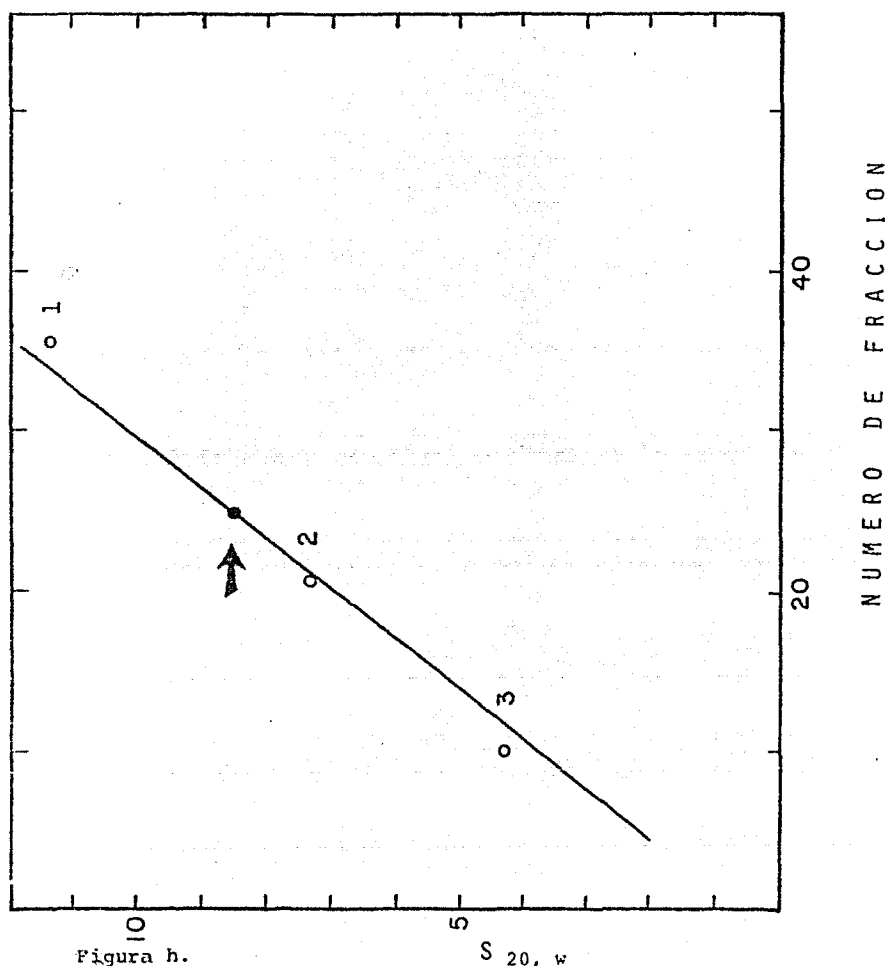


Figura h.

. Sedimentación por ultracentrifugación de la desaminasa a $290\,000 \times g$, a $5^{\circ}C$, durante diez horas. La flecha indica la fracción en que se localizó la actividad de la enzima, y el correspondiente valor de $S_{20,w}$ estimado.

Patrones de calibración : 1 - Catalasa, 2 - Aldolasa, 3 - Hemoglobina .

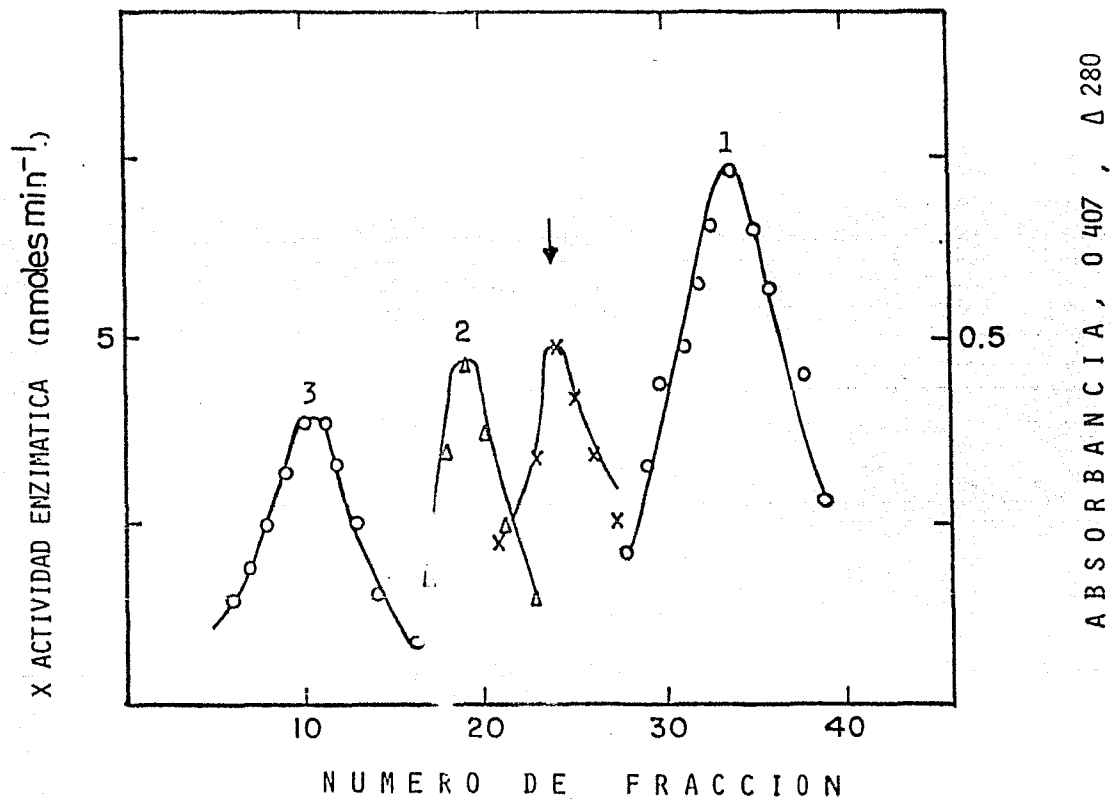


Figura 1 . Sedimentación de la glucosamina 6-fosfato desaminasa y patrones de calibración. Técnica de Martin y Ames (26). Perfiles de concentración de las proteínas de referencia (1 al 3) y actividad de la enzima. Los números tienen el mismo significado que en la figura h .

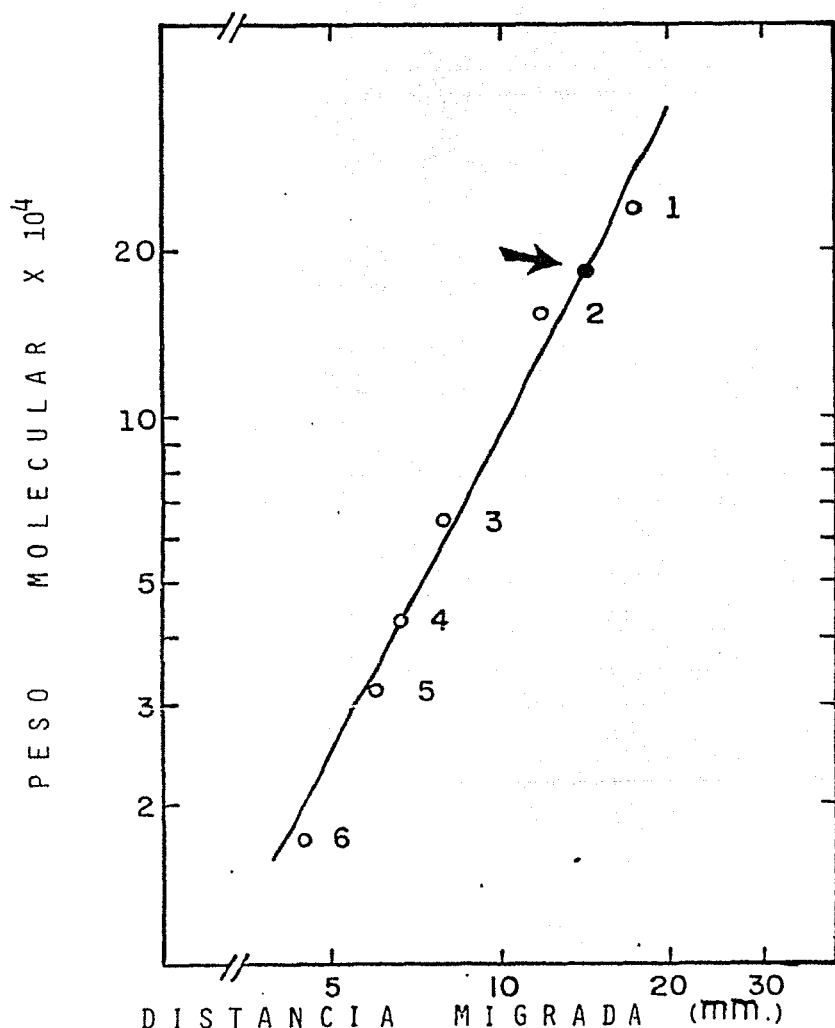


Figura j.

Estimación del peso molecular de la glucosamina 6-fosfato desaminasa mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa en presencia de monómeros de poliácridamida, seguida de polimerización y tinción. La flecha indica la distancia recorrida por la enzima y el correspondiente peso molecular estimado.

Patrones de referencia : 1 - Catalasa, 2 - Aldolasa, 3 - Albúmina de suero de bovino, 4 - Ovoalbúmina, 5 - lactoglobulina bovina, 6 - mioglobina de caballo

V. 5. Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de la glucosamina 6-fosfato desaminasa se muestra en la tabla II. A partir de este resultado y de acuerdo al método y datos publicados por McMeekin y col. (35) se calculó un volumen parcial específico de 0.741 ml/g para esta enzima. El peso molecular mínimo calculado por composición de aminoácidos fué de 9872, lo que corresponde a un peso molecular por subunidad de --- 29-406 Daltones.

V. 6. Espectro de Absorción

En la figura k se muestra el espectro de absorción en el ultravioleta medio de la enzima en solución a pH 7.7. En base a la masa obtenida a partir del análisis de aminoácidos se calculó un coeficiente de absorbancia (275 nm), suponiendo un peso molecular de 178 000 daltones.

Aminoácido	Residuos por unidad
Asx	27
Thr	15
Ser	10
Glx	24
Pro	9
Gly	18
Ala	21
Cysteic Acid	4
Val	20
Met	9
Ile	12
Leu	24
Tyr	8
Phe	12
His	12
Lys	15
Arg	11
Trp	6

TABLA II. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA GLUCOSAMINA
6-FOSFATO ISOMERASA (DESAMINASA).

ABSORBANCIA

ABSORBANCIA

1.5
1.0
0.5

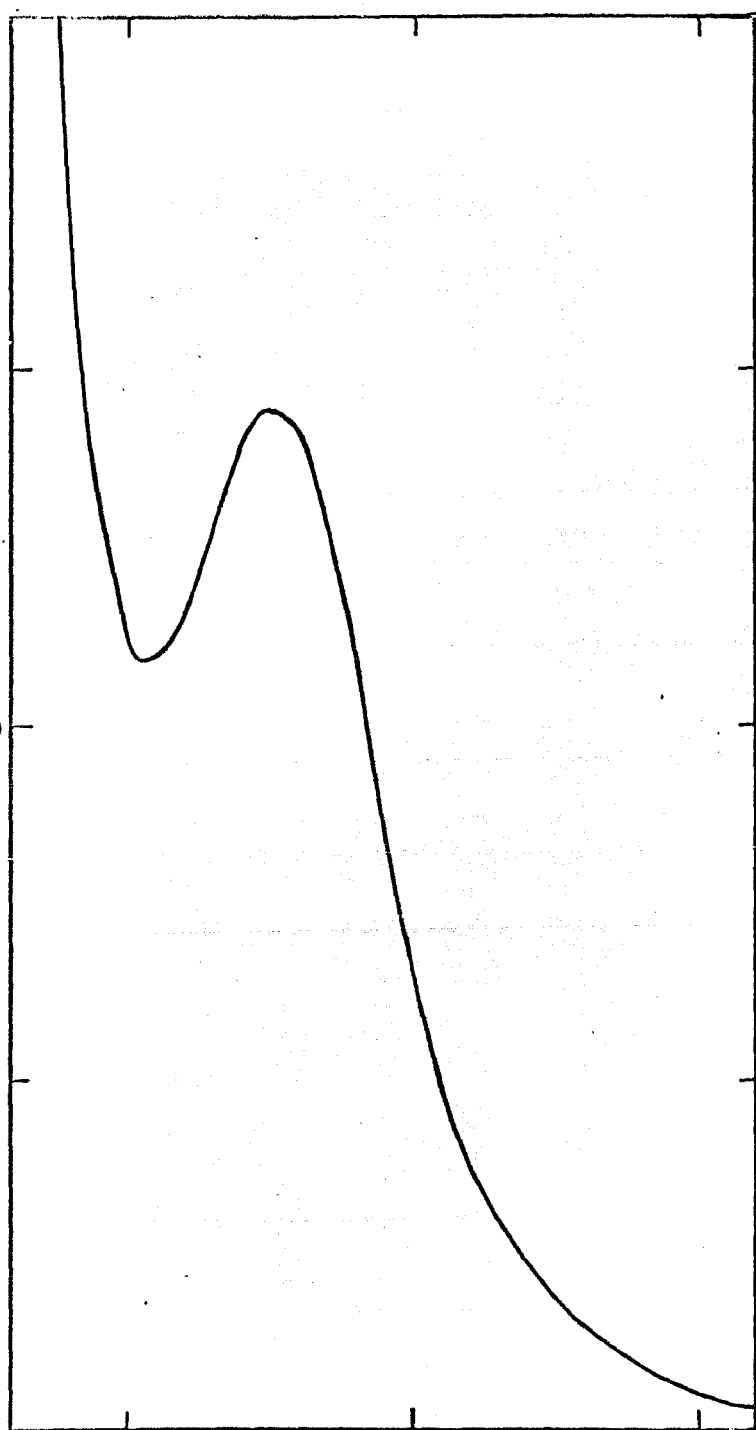


Figura k. 250 300
Espectro de absorción en el ultravioleta de la GlcNH₂6P desaminasa,
en Tris-HCl 40 mM a pH 7.7 . Registrado con un espectrofotómetro
de doble haz.

V. 7. Punto isoeléctrico

Empleando el enfoque isoeléctrico analítico - en placas delgadas de gel de poliacrilamida en un - intervalo de pH de 4 a 6, se encontró que el pH en - el punto isoeléctrico de la enzima fué de 6.0 (fi- gura 1) . Cuando el enfoque isoeléctrico se reali- zó en gel de poliacrilamida en un pH de 3 a 9 en - presencia de urea 6M y Tritón X-100 se confirmó - el anterior resultado.

V. 8. Actividad molecular

La actividad molecular de la enzima se midió - tanto en el sentido catabólico como en el sentido - biosintético de la reacción siempre con GlcN Ac6P -- 1.85 mM a pH 7.7 . En ambos casos los resultados se obtubieron extrapolando los resultados cinéticos a concentración infinita de los sustratos, por otro - lado la concentración de la enzima se estableció - mediante su absorbancia a 275 nm. De esta manera los valores formados fueron 44.2 seg^{-1} en la dirección catabólica de la reacción y de 4.25 seg^{-1} en la -

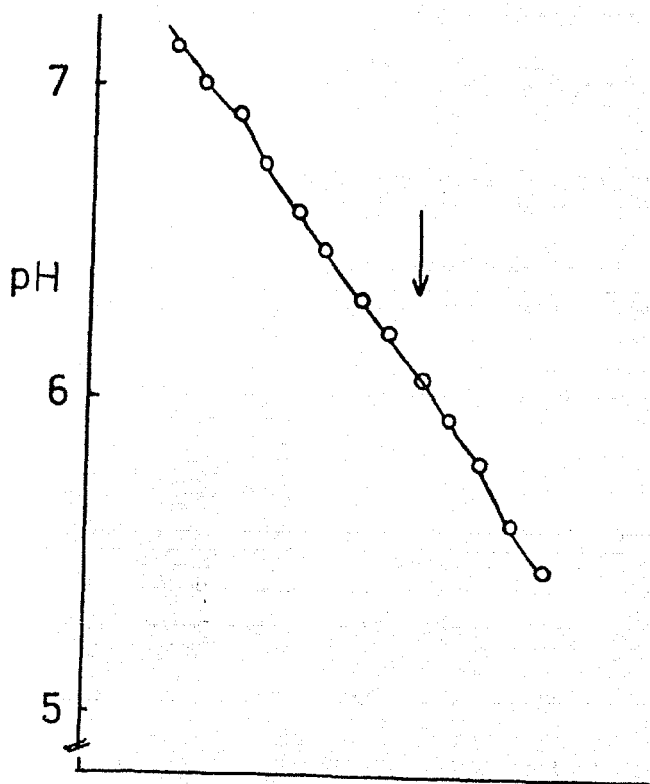


Figura 1 . Enfoque isoelectrico en gel de poli -
acrilamida al 6 % en anfolitos pH 5 - 8 . La
fecha indica la posición de la banda de protef -
na. Los puntos corresponden a medidas de pH rea -
lizadas a distancias regulares (cada 5 mm) so -
bre el gel .

dirección de la formación de la glucosamina 6-fosfato

V. 9. Comportamiento cooperativo

Los estudios cinéticos se hicieron en ambas direcciones de la reacción. Cuando se estudiaron las velocidades en la dirección catabólica como una función de la GlcN6P, se encontró que la enzima mostraba una intensa cooperatividad (figura m). El grado de cooperatividad se midió por medio del valor extremo del número de Hill (h), de acuerdo a Wyman (36). De esta manera se observó que el fenómeno de cooperatividad depende fuertemente del pH, como se muestra en la figura n. La cooperatividad resulta máxima en el intervalo de pH de 7.5 a 8.0 a 30°C (Tris-HCl), con un número de Hill cercano a 3.0. El valor de $S_{0.5}$ en estas condiciones es de aproximadamente 15 mM (recuadro de la figura m), el valor de la constante K' en la ecuación de Hill $\frac{v}{V_m} = \frac{S^n}{K' + S^n}$ equivale entonces a $S_{0.5}^n = (15 \times 10^{-3})^3$.

En la dirección biosintética de la reacción también se presenta una cinética con cooperatividad -

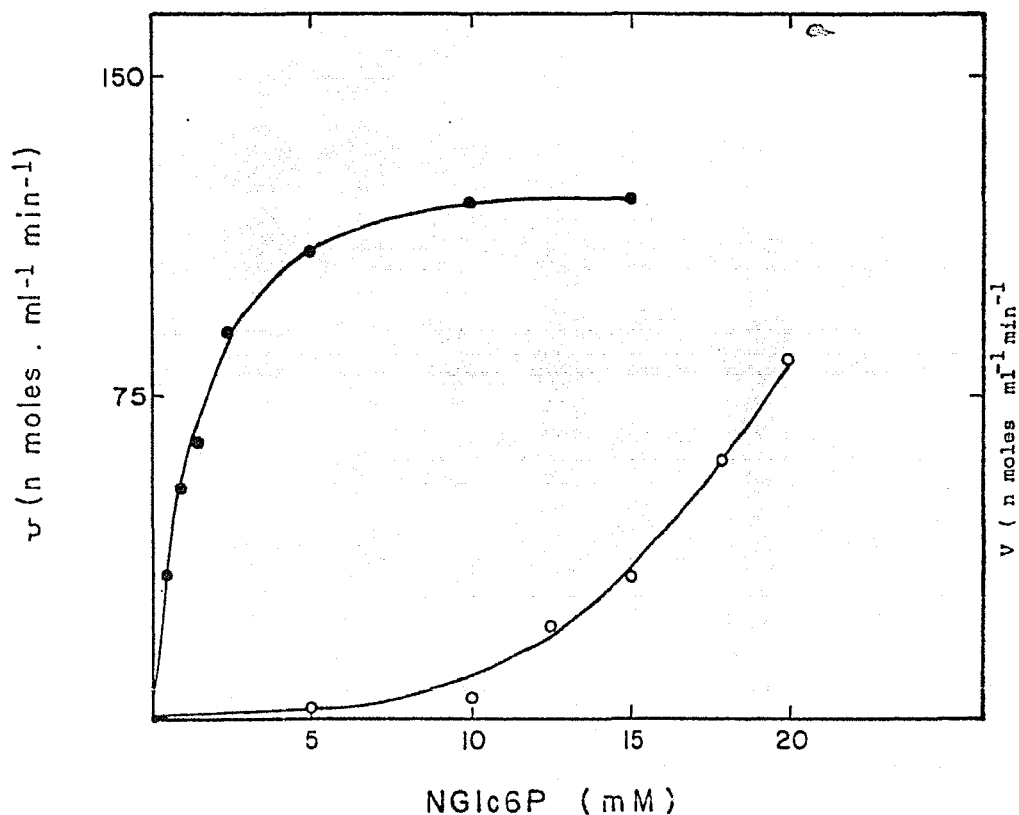


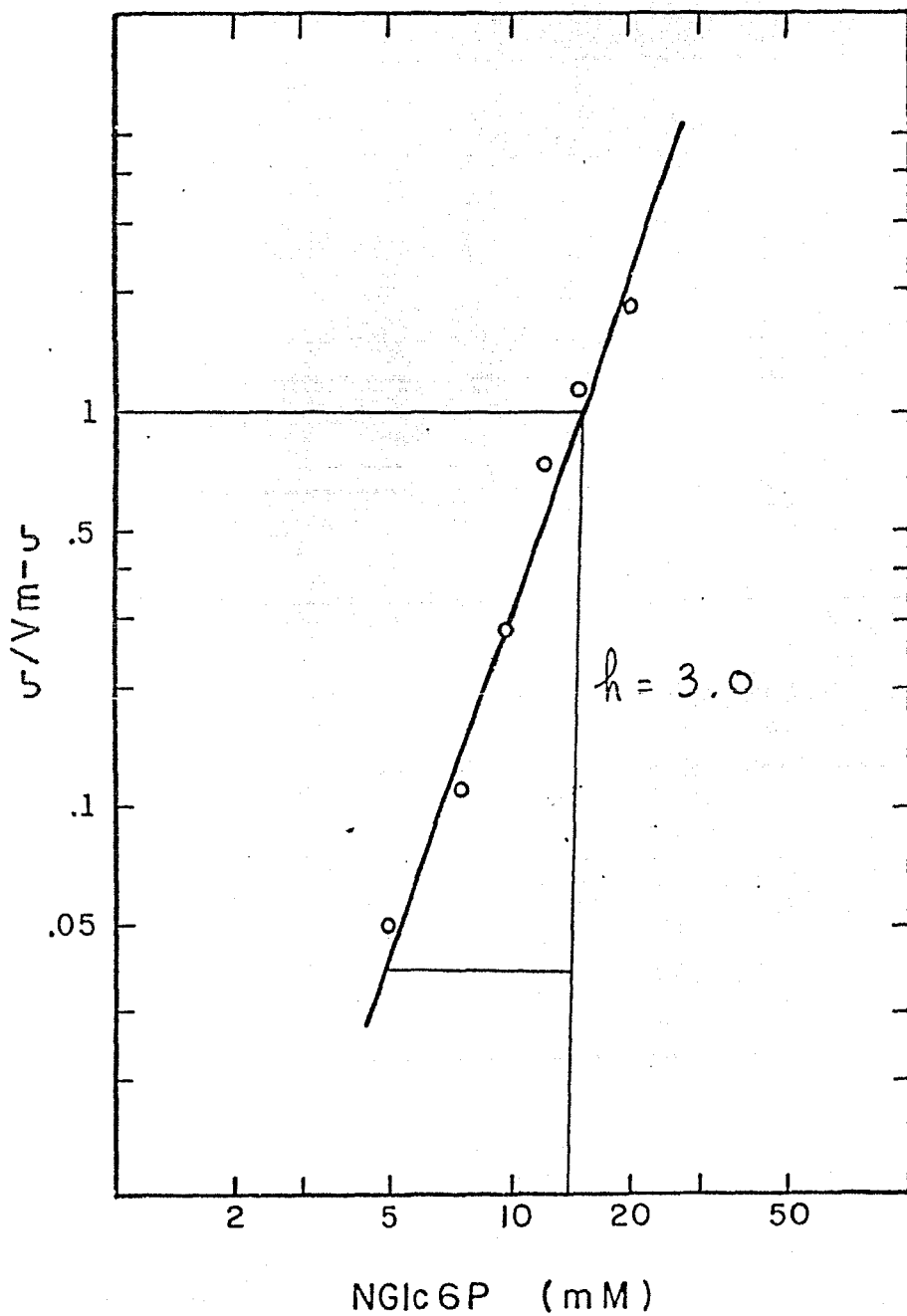
Figura m .

Velocidad inicial de reacción en función de la concentración de glucosamina (sentido catabólico de la reacción).

—○— En ausencia de activador.

—●— En presencia de GlcNAc6P mM (pH 7.7, 30°C).

Recuadro : Gráfico de Hill de los mismos resultados. La velocidad máxima utilizada para este gráfico se tomó de la curva correspondiente al experimento en presencia de activador.



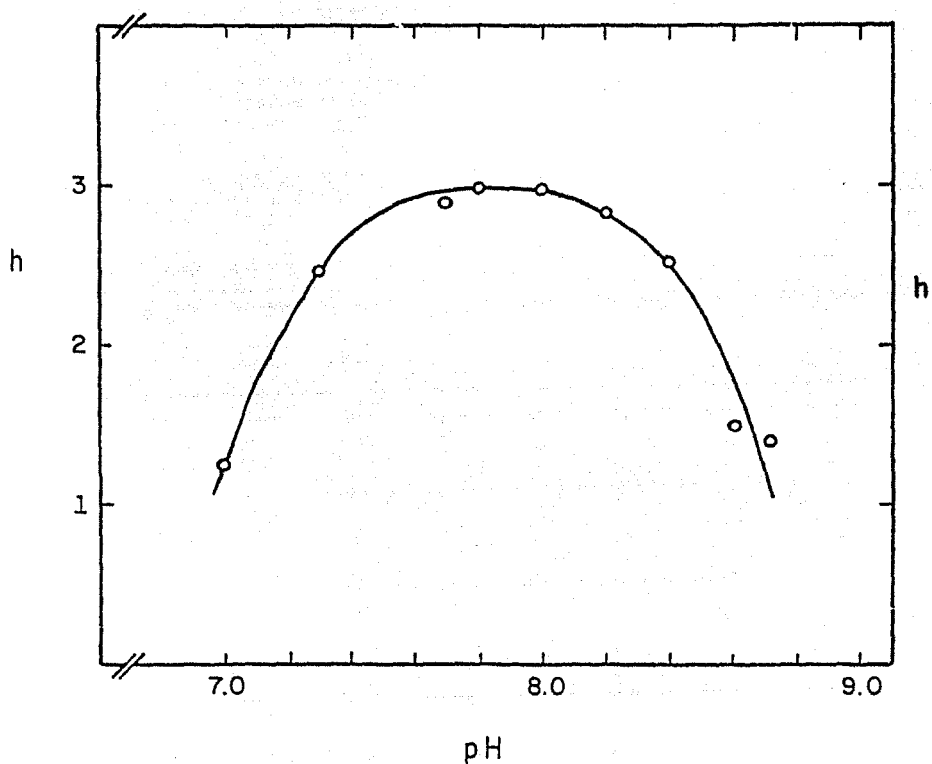


Figura n.

Variación del número de Hill en función del pH. (sentido catabólico).

homotrópica positiva con respecto a la Fru6P, sin embargo el NH_3 se comporta como un sustrato de tipo Michaeliano. El valor extremo del número de Hill para la Fru6P, es independiente de la concentración de NH_3 y también depende del pH pero en un menor grado y su valor se encontró de 1.3 a pH 7.7 (figura ñ) .

La GlcNAc6P funciona como un modelador alostérico con efecto K positivo (figura o), en ambas direcciones de la reacción hace posible la eliminación del comportamiento cooperativo cuando está presente a una concentración suficiente como para saturar a la enzima (figura p). Este compuesto carece de efecto sobre el K_m de NH_4Cl (figura q).

V. 10. Dependencia de los parámetros cinéticos con respecto al pH

Ya se ha mencionado la dependencia de la cooperatividad con respecto al pH (figura n). En el sentido catabólico de la reacción y en presencia del activador alostérico, GlcNAc6P, la enzima presenta

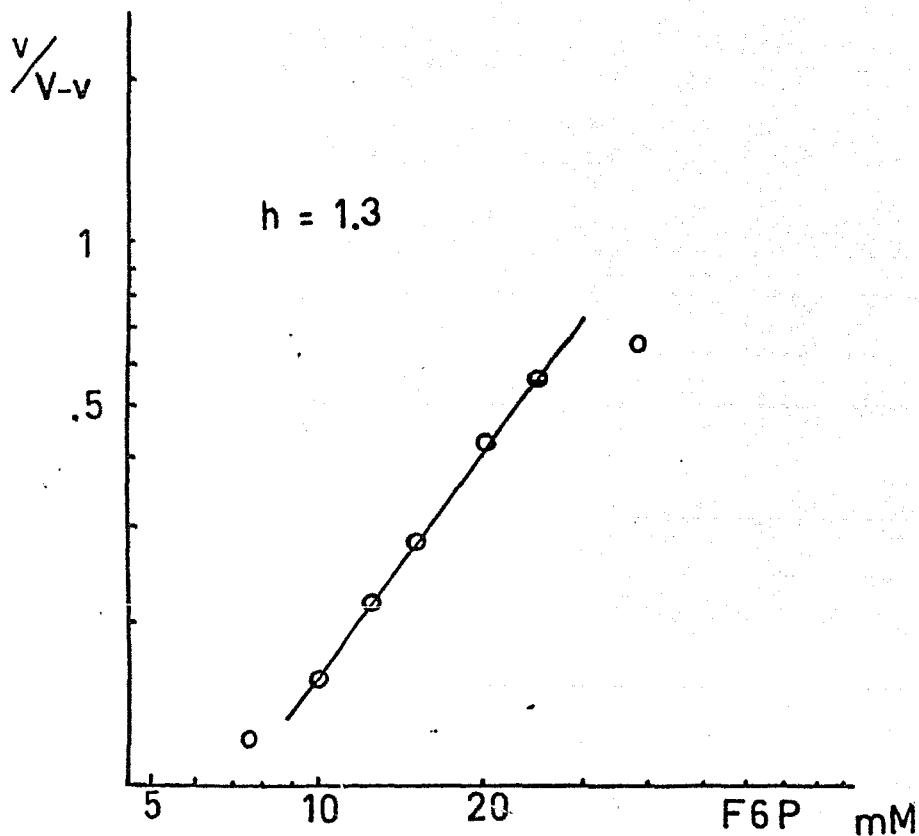


Figura 5 .

Reacción en sentido biosintético. Cooperatividad con respecto a la Fru6P, puesta en evidencia a través del gráfico de Hill. Estos datos provienen de un experimento semejante al mostrado en la figura m . Concentración de NH_4Cl constante, 30 mM (pH 7.7, 30°C) .

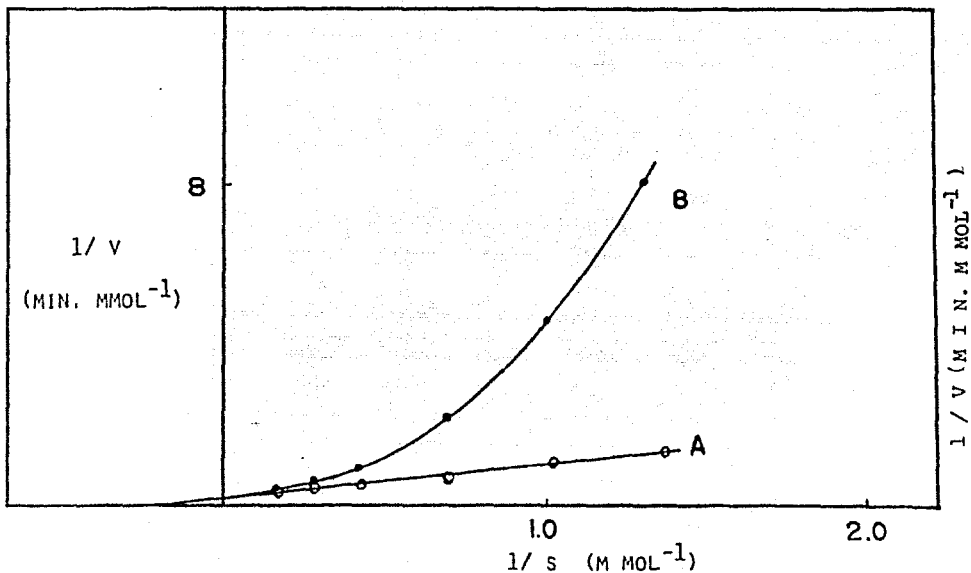


Figura o.

Reacción en sentido catabólico. Representación de los datos de un experimento semejante al de la gráfica m en forma de gráfico doble recíproco. pH 7.7, 30°C.

A - En presencia de GlcNAc6P 0.25 mM. $r=0.99$, $K_m = 7.3$

B - En ausencia de activador.

Se observa que la gráfica doble recíproca en ausencia del activador presenta la concavidad hacia arriba característica de la cooperatividad positiva.

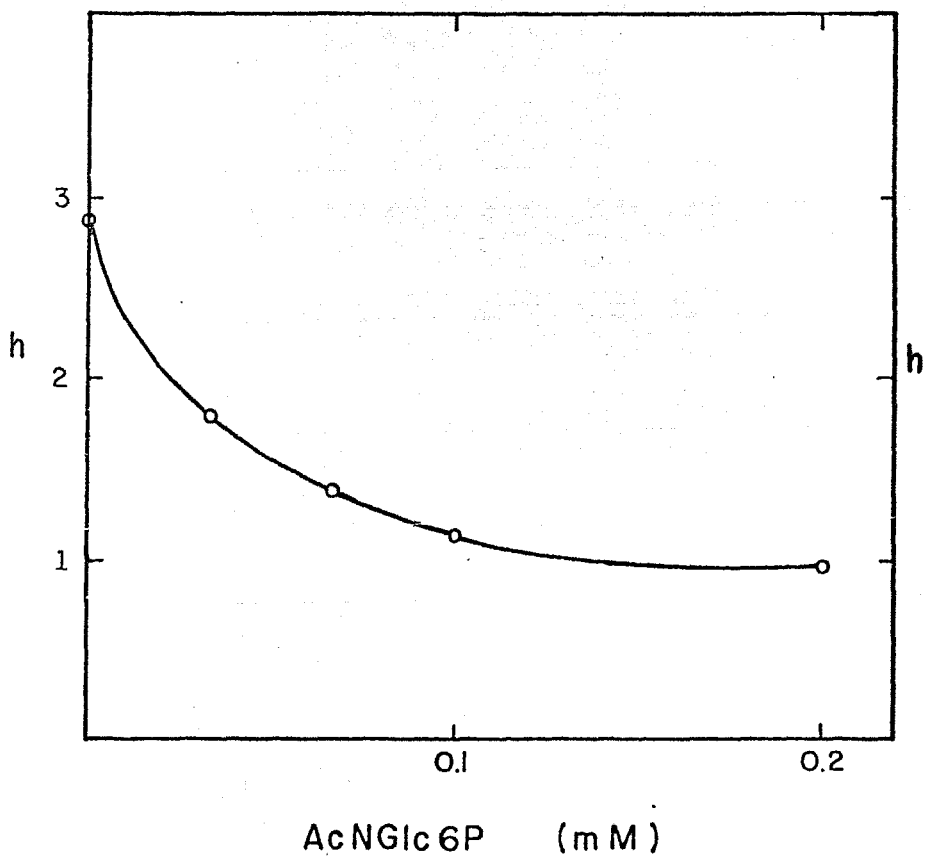


Figura p.

La GlcNAc6P produce la desaparición de la cooperatividad en el sentido catabólico de la reacción. Número de Hill, h , en función de la concentración de activador. (pH 7.7, 30°C) .

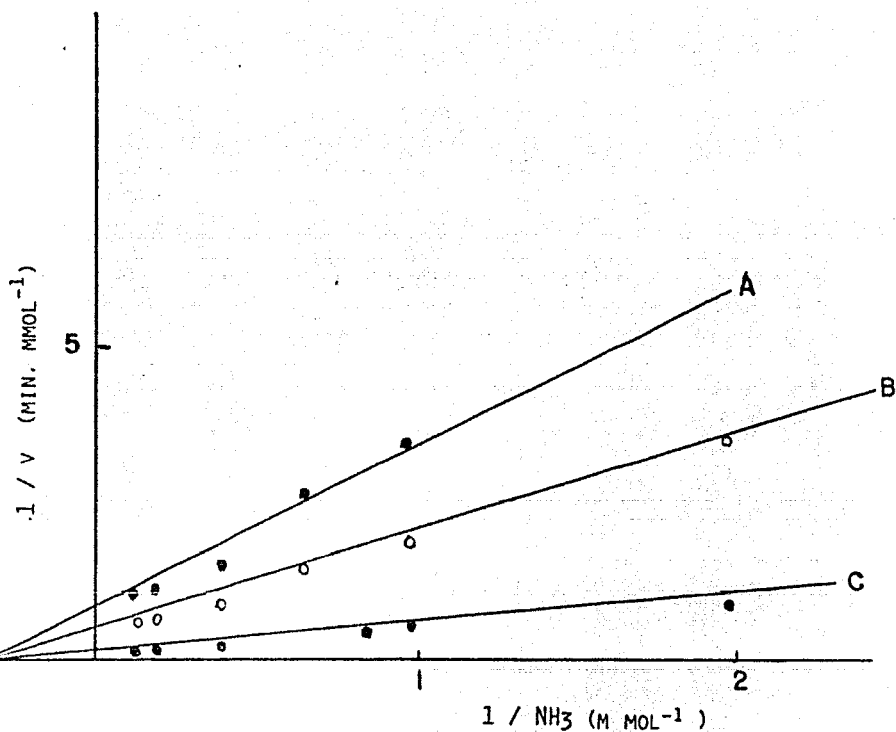


Figura q.

Efecto del GlcNAc6P sobre el K_m con respecto al NH_4Cl (coordenada del sustrato expresada en concentración de NH_3). También se observó el efecto de la guanidin difosfato sobre la activación por GlcNAc6P (pH 7.7, 30°C).

A - Control, sin agregados.

B - GlcNAc6P 0.14 mM + GDP 5 mM.

C - GlcNAc6P 0.14 mM.

una velocidad máxima prácticamente constante dentro del intervalo 6.8 a 9.2 . La constante de Michaelis para la GlcN6P resulta menor entre pH 7.6 y 8.2 ; - esta propiedad configura un pH óptimo para la enzima en el sentido de la formación de la Fru6P en ese intervalo de pH (figura r).

En la figura s, se muestra el K_m para la Fru6P en función del pH. En esta gráfica se observa una dependencia semejante, con respecto al pH, con una zona óptima de 7.2 a 7.8 . El análisis gráfico según - - Dixon (37), muestra una porción recta, de pendiente +1 de pH de 6.5 a 7.5, una porción de pendiente cero hasta pH 8.2 y luego una porción de pendiente -1, - pero tan próximos entre sí que el análisis de Dixon no es válido (38).

Cuando se estudia el K_m con respecto al NH_4Cl , en función del pH, se encuentra los resultados que se presentan en la figura u. En uno de los ejes de esta gráfica, se han expresado los resultados como pK_m - ($= - \log K_m$) para las concentraciones calculadas de ion NH_4^+ presente en la mezcla de reacción. En el - otro eje, se hizo lo mismo, pero calculando el pK_m en base a concentraciones efectivas de NH_3 , la especie no portonada del sustrato. En el primer caso --

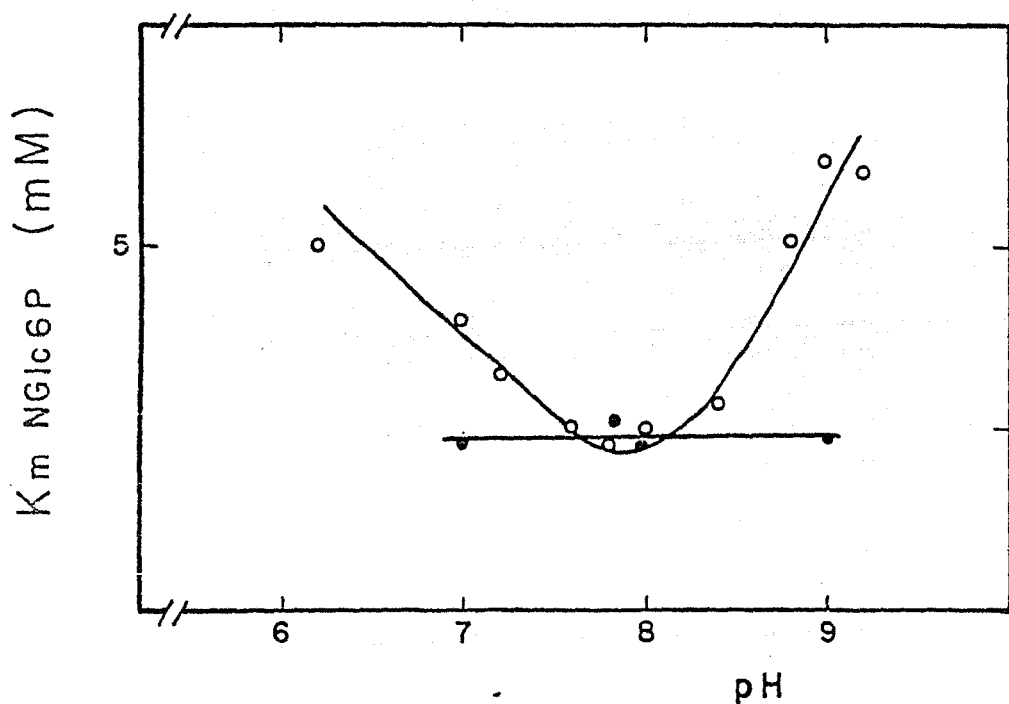


Figura r.

Estudio de la variación de los parámetros cinéticos (Km, Vmáx con el pH, en el sentido catabólico de la reacción, a 30°C .

● Vmáx

O Km para la glucosamina 6-fosfato.

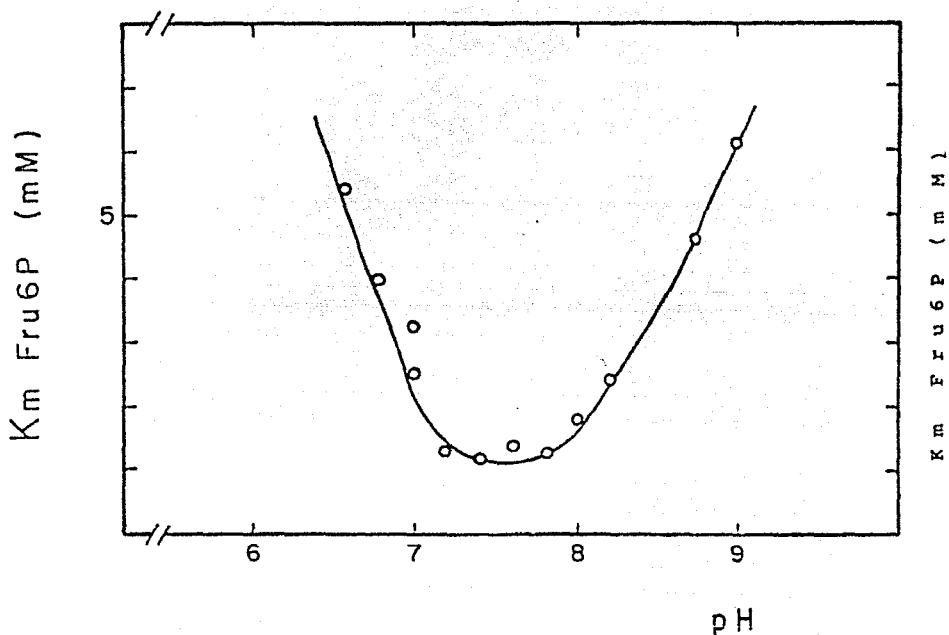


Figura 5.

Estudio de la variación del K_m con respecto a la Fru6P en función del pH. Medidas realizadas a concentración constante de NH_4Cl (25mM) a 30°C .

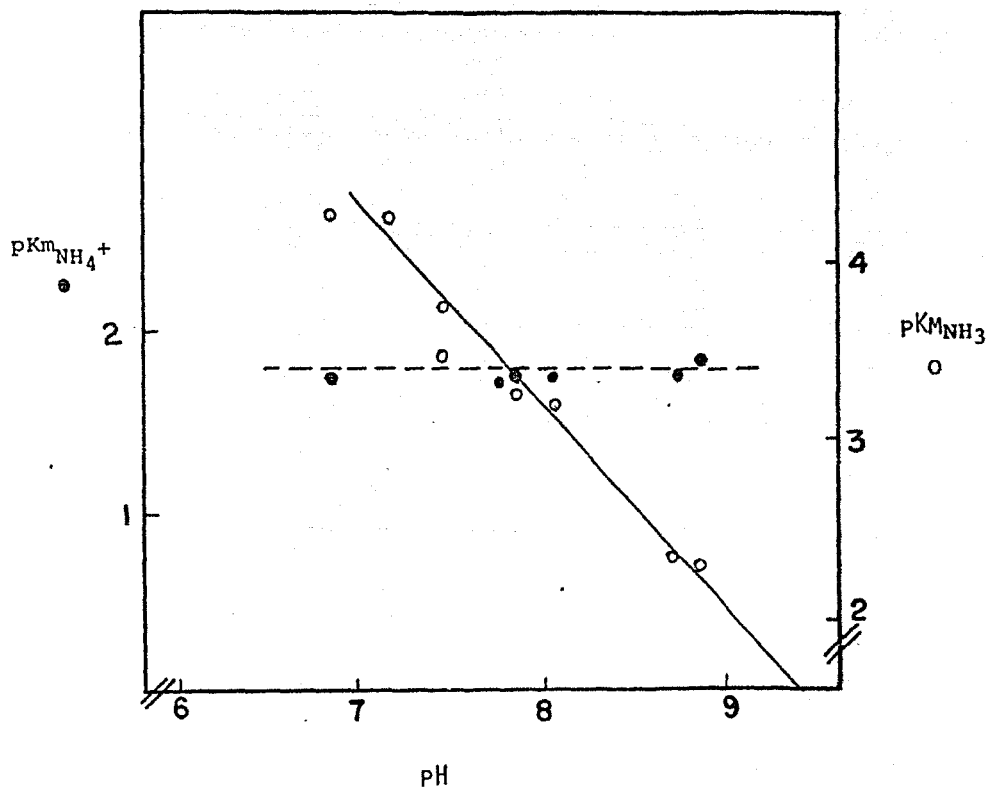


Figura u.

Estudio de la variación del pK_m con respecto al NH_3 y al NH_4^+ en función del pH. La pendiente experimental es de -1.1 ($r=0.99$).

se observa una valor de pK_m prácticamente constante entre los valores de pH de 6.8 y 9.0 . En este mismo intervalo, la variación del pK_m para el sustrato no protonado, disminuye con una pendiente de -1 (-1.1 en el resultado experimental) .

V. 11. Cinética en ausencia de productos

Los patrones de velocidad inicial (figuraV) indica que los K_m para la Fru6P son independientes de la concentración de NH_3 (agregado como NH_4Cl), y viceversa. Se trata de un caso particular de la cinética de enzimas secuenciales birreactantes, en la cual la constante de inhibición por productos de un sustrato dado es numericamente igual a la correspondiente constante de Michaelis. En este caso, los patrones de velocidad inicial toman la forma de una familia de rectas intersectantes en el eje de las abcisas. De acuerdo a esta observación, es posible estudiar el K_m para cada uno de estos dos sustratos en función del pH, a una concentración cualquiera y fija del otro sustrato. Esta independendencia del

Km de un sustrato con la concentración del otro - permite además, analizar el comportamiento cooperativo de cada uno de los sustratos del sentido - birreactante en forma totalmente independiente.

V. 12. Cinética de la activación por GlcNAc6P

Cuando se estudia la activación por GlcNAc6P a concentración elevada de GlcN6P (30 mM, aproximadamente 10 Km, lo que a veces se considera como criterio de saturación) se observa un incremento de las velocidades iniciales, en función de la concentración del activador, tal como se muestra en la figura w. La curva es de tipo sigmoide, semejante a una curva de saturación con cooperatividad homotrópica positiva. Calculando una velocidad máxima extrapolando los datos correspondientes a las concentraciones elevadas, (que siguen aproximadamente una saturación hiperbólica) mediante los procedimientos usuales, se puede aplicar la ecuación de Hill en su forma doble logarítmica, y calcular los valores de h . En este caso se observa un valor de h igual a 2.8 . El valor de $S_{0.5}$ calculando es de 58 μ M, y el índice de cooperatividad de Koshland ($S_{0.9} / S_{0.1}$) (39) es diez.

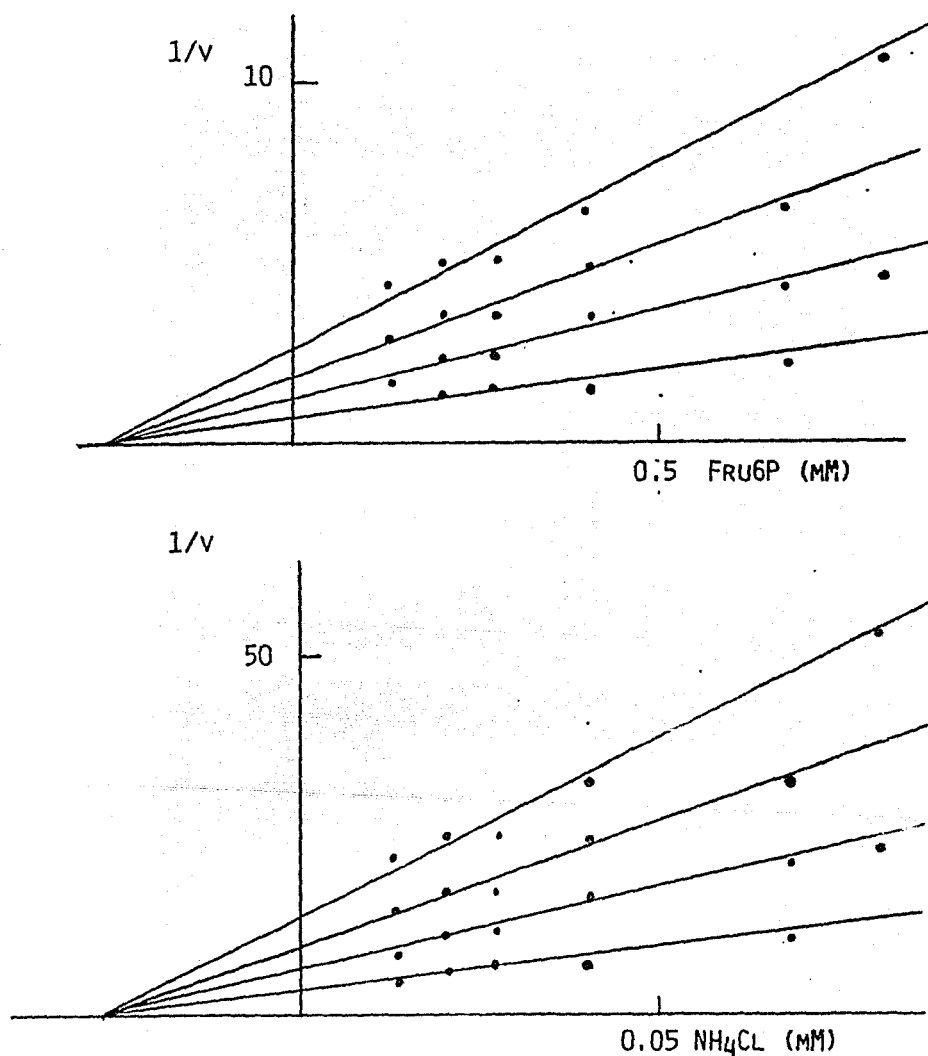


Figura V.

Patrones de velocidad inicial en el sentido biosintético, gráficos de doble recíprocos.

- A. Patrones de velocidad en función de la concentración de Fru6P a diferentes concentraciones fijas de NH_4Cl que se indican en cada una de las rectas en presencia de GlcNAc6P 0.12 mM .
- B. Patrones de velocidad en función de la concentración de NH_4Cl a diferentes concentraciones fijas de Fru6P que se indican en cada una de las rectas; en este caso no se utilizó GlcNAc6P.

En todos los casos se utilizó Tris-HCl 0.25 mM pH 7.7 a una concentración de enzima de 5 pmoles/ml con un tiempo de incubación fijo de $20'$.

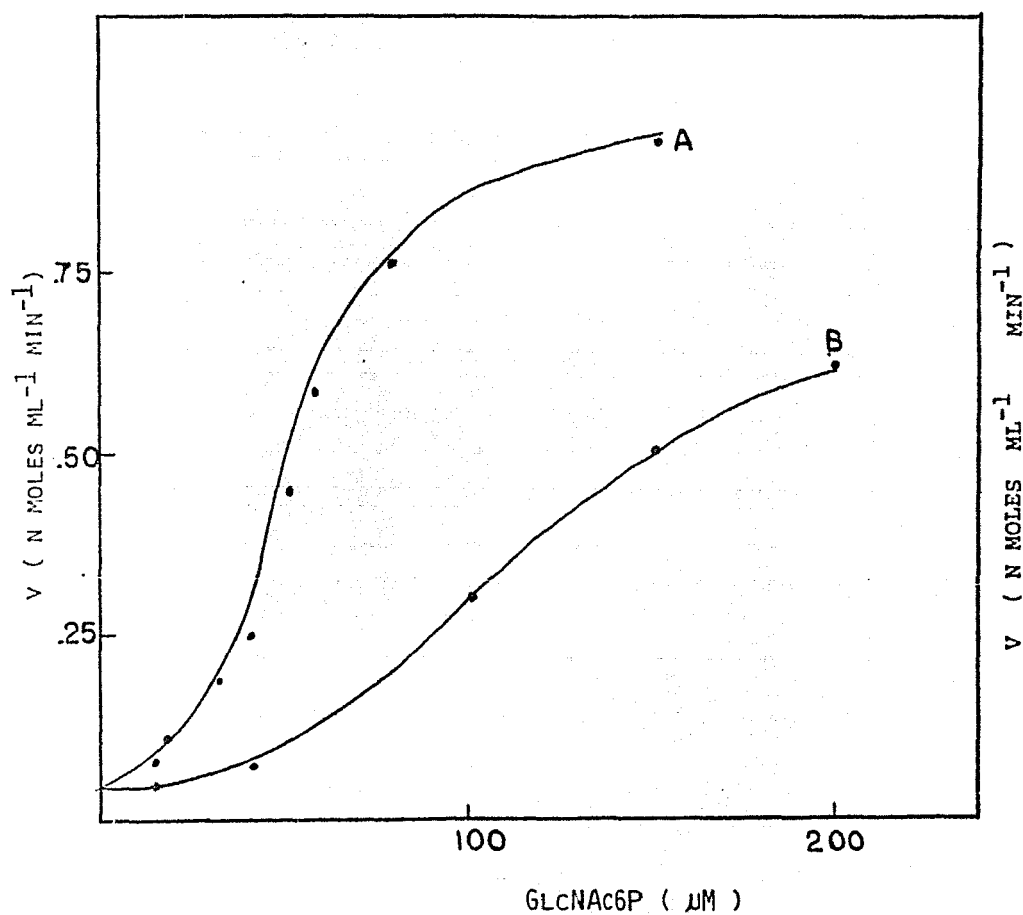


Figura w.

Velocidad de reacción en sentido catabólico, en función de la concentración del activador.

B. Solución con GDP 5 mM; número de Hill 2.4 ($r=.99$) $S_{0.5}$ 58 μM .

A. En ausencia de GDP 5 mM. Número de Hill 2.8 ($r=.96$) $S_{0.5}$ 181 μM .

En la misma figura w se observa el efecto de la adición de la 5' guanidina difosfato sobre el - efecto activador de GlcNAc6P sobre la reacción en sentido catabólico, La $S_{0.5}$ aumenta tres veces sin que se produzca una notable modificación de la coo peratividad. Cuando se analiza este efecto en función de la concentración de GlcN6P o Fru6P, en uno u otro sentido de la reacción se comprueba que este nucleótido es inhibidor, y que su efecto consite - en contrarrestar la acción activadora de la GlcNA6P.

VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este trabajo se presenta una técnica de - purificación de la glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) de *E.coli* en la cual se hace uso de la interacción específica entre la enzima, y su - ligando alostérico. En este caso, se emplea un -- análogo, la epsilon-amino-N-caproil-glucosamina-6-fosfato unido covalentemente a un soporte inerte de gel de agarosa en forma de pequeñas partículas esféricas.

Si bien el modelador positivo de la enzima - es el N-acetil derivado de la $\text{GlcNH}_2\text{6P}$, hemos observado que el homólogo superior correspondiente, N-propionil glucosamina-6-fosfato, tiene las mismas propiedades (40). Esto nos llevó a suponer -- que la longitud de la cadena del grupo acilo N-substituyente no es un factor determinante de la cadena del grupo acilo N-substituyente no es un factor determinante de la afinidad del activador por el correspondiente sitio alostérico, y por - lo tanto, podría utilizarse un grupo de mayor -- longitud para "anclar" este ligando a una matriz inerte para crear un medio de cromatografía de -

afinidad para la purificación de la enzima. Es importante tener en cuenta la longitud dada por los seis metilenos del grupo caproíl que son necesarios como espaciadores, para permitir la interacción entre la proteína y el ligando sin interferencias de tipo estérico.

Otra posibilidad para fijar al activador o algún análogo estructural del mismo, podría ser su unión a través del grupo éster fosfato en C-6 o bien el OH situado en el carbón anomérico u otro OH libre (C-3,C-4).

En experimentos preliminares no reportados, hemos intentado obtener una matriz de afinidad fosforilando la quitina, de acuerdo a la técnica de Hoffpawir y Guthrie (41) con ácido fosfórico concentrado en solución de urea concentrada. Si bien se obtuvo un grado aceptable de fosforilación del polímero, el material resultante no es capaz de retener la enzima. Esto evidencia tal vez la necesidad de que el carbon 1, el 4 o ambos tengan su OH libre, o simplemente que el -- ligando no resulta accesible a la enzima por --

impedimento estérico. Otro ligando que podría utilizarse para la creación de una matriz de afinidad para esta enzima, es la guanidina monofosfato o la guanidina difosfato. De acuerdo a resultados de nuestro grupo (42), estos nucleótidos actuán como moduladores negativos de la enzima, contrarrestando el efecto activador de la GlcNAc6P (figura W) . Sin embargo la afinidad aparente de la enzima para estos nucleótidos no es tan baja como por la GlcNAc6P, (K_i de 2 a 5 mM) lo que da lugar a condiciones menos favorables para la cromatografía de afinidad; además, la interacción -- sería selectiva, que con el N-acetil aminoazúcar. En cuanto a los sustratos no resultan adecuados -- para este fin, por su elevado K_m (2.0 mM aproximadamente para la Fru6P y la GlcNH₂6P, ambos a concentración saturante de GlcNAc6P, pH 7.7 30°C). -- Sólo un inhibidór competitivo de la enzima, la 2-desoxi 2-amino glucitol 6-fosfato (sorbitolamina 6-fosfato, SNH₂6P) tiene una constante de inhibición suficientemente baja (5 micromolar), como para plantear la posibilidad de emplear esta interacción para desarrollar una técnica de afinidad, sin embargo, no es fácil resolver en forma inmedia

ta cómo ligar este inhibidor a una matriz de aga rosa u otro material de soporte y sería necesario realizar un estudio sistemático de las propiedades de este ligante.

La especificidad de la unión de la enzima - al medio estacionario de la columna, es de esperarse que sea muy elevada. Sin embargo, otras -- enzimas presentadas como impurezas también podrí an fijarse en forma específica, como la N-acetil glucosamina 6-fosfato desacetilasa (E.C. 3.5 - - 1.25)., N-acetil glucosamina 6-fosfato mutasa - (EC. 2.7. 5.2) o incluso la glucosa 6- fosfato-- deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49.) que como hemos - visto, también es capaz de utilizar la GlcNAc6P como sustrato. También existe la posibilidad de - interacciones inespecíficas, por simple efecto de intercambio iónico sobre los grupos fosfato - inmovilizados, o por tratarse de enzimas de espe cificidad amplia, como por ejemplo algunas fosfa tasas presentes en *E.coli*. Hay que tener en cuen ta que una desacetilasa u otra hidrolasa, al igual que una fosfatasa inespecífica dañaría la matriz de afinidad haciéndola inservible.

Por este motivo, no es posible emplear la - cromatografía de afinidad desde el comienzo de la preparación, por ejemplo en la fracción de sulfato de amonio entre 40 y 55% de saturación, (etapa III, tabla 1). Con la finalidad de proteger la -- matriz de afinidad, para cuya preparación se emplean materiales costosos, se agregó la etapa IV (tabla 1) consistente en una cromatografía de - intercambio iónico de DEAE-Sephacel, que es una forma comercial de celulosa en forma de pequeñas esferitas, con grupos dietil-aminoetil terminales.

Los fenómenos inespecíficos de adsorción por interacción electrostática pueden compensarse o - eliminarse mediante una fuerza iónica elevada. Por este motivo hemos incluido en nuestro amortiguador de trabajo una cierta concentración de cloruro de sodio. La especificidad de la etapa de afinidad - depende también de la elución que llevemos a cabo mediante el pasaje por la columna de una solución de GlcNAc6P 1 mM. La elución se puede hacer también por cambio de pH, aumento de la fuerza iónica, o ambos, con la ventaja de no consumir un metabolito costoso y que no se obtiene de fuentes comerciales, Sin embargo, se sometería la enzima a extremos de

pH que podrían disminuir el rendimiento de la preparación por desnaturalización de la enzima. El pH de adsorción y elución fue escogido en forma empírica en 7,25. Si se usa un pH dentro del intervalo de pH óptimo de la enzima (7.7) no es posible eluir la enzima con GlcNAc6P 5 mM. A pH 7.25 la afinidad de la enzima por la matriz es menor, y permite realizar el paso de purificación en condiciones más favorables, y con mayor economía de activador. La enzima purificada, ha demostrado ser homogénea, de acuerdo a diversos procedimientos y criterios de pureza. Su actividad específica es de 1060 unidades por miligramo de proteína, el valor más elevado que se haya publicado para una preparación de esta enzima en *E. coli*. Esto se debe a que otras preparaciones eran sólo purificaciones parciales, (2,3,7) aunque en algunos casos los autores reportan homogeneidad electroforética (15). Hay que tener en cuenta además que nuestras medidas de actividad se basan en velocidades máximas verdaderas, obtenidas extrapolando las velocidades a concentración infinita de sustrato, y no simples medidas de actividad a concentración elevada de sustrato, cosa que con esta enzima no

es posibles debido a los elevados valores de K_m para la GlcNH_2 6P. Los resultados sobre el peso molecular de la enzima nativa y de subunidad, permite deducir que esta proteína posee una estructura cuaternaria hexamérica, constituida por subunidades de masa igual o muy semejante. Estas seis subunidades pueden estar dispuestas de acuerdo a tres tipos fundamentales, el hexágono plano, el octaedro (o antiprisma trigonal) y el prisma trigonal.

Los datos de microscopía electrónica recientemente obtenidos por el grupo (43) muestran una estructura aproximadamente circular de 17.8 ± 1.3 nm de diámetro con una distribución plana compuesta por seis subunidades.

Si bien la técnica de electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio, no permite detectar pequeñas diferencias de peso molecular, -- como las que existen entre las cadenas alfa y beta de hemoglobina, por ejemplo, la identidad de las seis subunidades puede resolverse por electroenfoque en medios desnaturalizantes. En este caso --

la separación se basa en el pH isoeléctrico de la enzima y no en su peso molecular, y una pequeña - diferencia en la composición de subunidades de dos tipos semejantes pero no iguales sería detectada. En estas condiciones, se ha observado la aparición de una única banda perfectamente enfocada.

Por lo tanto, es posible suponer que se trata de un hexámero formado por seis subunidades iguales de 29 500 daltones de peso, aproximadamente. El peso más probable para la molécula entera, es entonces de 177 000 daltones. El pH isoeléctrico, y la composición de aminoácidos no ofrecen particularidades notables, constituyen información que podrá ser útil en ulteriores estudios comparados con otras fuentes de esta enzima, cuando sean estudiadas.

La composición de aminoácidos proporciona in formación útil además, para el trabajo estructural, mediante datos como el coeficiente de absortividad molar, que hace posible trabajar en el experimentos cinéticos conociendo con precisión la concentración de la enzima, y el volumen específico parcial, que podrá hacer factible la medida precisa del peso mo lecular por sedimentación en equilibrio, en caso de

disponerse de instrumental adecuado para ello,

El estudio cinético revela que la enzima ad-
quiere una cinética perfectamente Michaeliana, a
concentración saturante de GlcNAc6P. Esto permi-
tiría plantear la validez de un modelo de fijación
exclusiva (modelo de Wyman-Monod-Changeaux res-
tringido). Esta hipótesis ha sido verificada re-
cientemente en nuestro laboratorio. Los datos para
la reacción en sentido catabólico pueden ajustar-
se a la ecuación de Horn y Bjorning (44) basado en
la fijación exclusiva de GlcN6P. Los datos se ajus
tan con correlación mayor o igual a 0.97, y permi-
te calcular una constante alostérica de 80.1 y un
número de sitios inteactantes de 3.0 (resultados
no publicados). De confirmar estos resultados ha-
brá que suponer que cada sitio esta formado con -
la contribución de dos subunidades vecinas.

El estudio de la cinética de velocidades ini
ciales, en presencia de GlcNAc6P muestra un caso
muy particular de un mecanismo de tipo secuencial,
en el cual la cinética en ausencia de productos -
puede describirse sólo con dos constantes relacio
nadas cada uno con cada sustrato. (En los meca-

nismos secuenciales se requieren tres constantes; dos constantes de Michaelis y una constante de -- inhibición). En este caso, $K_{ia} = K_m$ para ambos -- sustratos (Fru6P y NH_3), lo que da lugar a esta -- ecuación cinética:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{(Fru6P)(NH_3)}{[K_{m_{Fru6P}} + (Fru6P)][K_{m_{NH_4^+}} + (NH_4^+)]}$$

Nuestros resultados no permiten sacar una conclusión acerca del orden de adición de la Fru6P y el NH_4^+ al sitio activo. Este aspecto ha sido estudiado recientemente por Silva y Suastegui (45) mediante experimentos de inhibición por productos, inhibidores competitivos, sustratos alternativos y experimentos en equilibrio.

Nuestra preparación enzimática presenta una intensa cooperatividad homotrópica positiva con respecto al sustrato, en el sentido catabólico de la reacción. También existe una leve cooperatividad del mismo tipo con respecto a la Fru6P, pero el NH_4^+ es un ligante absolutamente michaeliano. Esta propiedad de la enzima de *E. Coli* no ha sido

observada hasta ahora por ninguno de los otros autores que han estudiado esta enzima en bacterias, hongos y tejidos animales. Esta discrepancia podría explicarse suponiendo que dicha propiedad sea exclusiva de la enzima de *E.coli*, pero que no aparece en otras especies. Sin embargo, tampoco ha sido observada por Comb y Roseman (2) ni por Milderfort y Rose (15), quienes trabajaron con *E.coli*. La intensidad del fenómeno es tal que no es posible suponer que haya pasado inadvertida. Tal vez, como nuestra técnica de preparación esta basada en procedimientos menos agresivos, posiblemente obtenemos la enzima en una forma particularmente intacta. Esto es válido, principalmente para la etapa de cromatografía de afinidad.

En las enzimas alostéricas es frecuente encontrar cooperatividad homotrópica positiva con respecto a algunos de los sustratos, y no es de sorprender que esta enzima siga la regla general. Una excepción bien conocida, a esta tendencia, es la enzima glucosamina 6-fosfato isomerasa (formadora de glutamina), también conocida como glucosamina-sintetasa (E.C. 5.3.1.19.). Aunque se hubiese podido esperar que las dos glucosamina 6-fosfato isome

rasas estén evolutivamente realcionadas, y compartiesen esta propiedad, (alostería sin cooperatividad), nuestros resultados muestran una clara interacción entre las subunidades que fijan la - $\text{GlcNH}_2\text{6P}$, que es más intensa a su pH óptimo, que la correspondiente a la hemoglobina.

En el sentido opuesto de la reacción, la enzima se asemeja más a la isomerasa dependiente de glutamina, ya que si bien está sujeta a importante regulación alostérica, presenta una cooperatividad mínima con respecto a la Fru6P, sustrato cuyo Km es intensamente modificado por la GlcNAC6P. Es importante señalar, que la cooperatividad homotrópica en sentido catabólico es muy intensa, mientras que en el sentido opuesto es apenas detectable. - Los principales modelos que se han propuesto para explicar tanto el comportamiento cooperativo como la regulación por efectos alostéricos proporcionan una visión unificada de ambos procesos, que son - una consecuencia de conformaciones extremas, con afinidades diferentes por los sustratos hacia los cuales existe cooperatividad, o por los ligandos activadores o inhibidores (47,46). En esta enzima,

se observa que en el sentido catabólico, la relación entre cooperatividad y activación por GlcNac6P es la esperada de acuerdo a la teoría. La activación, consiste en la adquisición de cinética hiperbólica (k cambia de 3 a 1), pero la velocidad máxima no se modifica. Esto es lo que Monod denomina un sistema K puro (46).

En sentido biosintético, en cambio, la cooperatividad es escasa, y su desaparición produciría poca o ninguna activación. Sin embargo la activación en este sentido es intensa, y se manifiesta como una reducción muy significativa de la K_m para la Fru6P por la acción del activador, GlcNac6P. En este sentido de la reacción, la activación es muy semejante a la cinética obtenida con un activador de tipo esencial (salvo una pequeña velocidad basal sin activador), en que para cualquier concentración de activador, la cinética es de tipo Michaelis-Henri.

Llama la atención que en una misma molécula alostérica, y un sitio ligante igual, (el sitio de la Fru6P y el de la GlcNH₂6P son necesariamente el mismo; aunque alguno de los grupos ligantes --

que participan en uno y otro caso pueden no ser los mismos) la activación por GlcNAc6P puede explicar por la desaparición de la cooperatividad en un sentido de la reacción pero no en el otro, para el cual es necesario postular una activación alostérica en un sistema no cooperativo. Esta última situación ha sido mencionada por Monod y col. (46) como una característica de la glucosamina 6-fosfato sintetasa (glucosamina 6-fosfato isomerasa, dependiente de la glutamina) y que es incompatible con su modelo de las transiciones concertadas. La enzima, tanto de hígado de rata, como de cartílago de pollo (49,48) es inhibida por 5' AMP y UDP-GlcNAc, y se ha demostrado el carácter alostérico de estas inhibiciones. Sin embargo, tanto la enzima fuertemente inhibida, como la enzima sin inhibidores presenta una total ausencia de cooperatividad. Este fenómeno no ha sido suficientemente estudiado, y por lo contrario, la gran mayoría de las enzimas alostéricas presentan cooperatividad, como lo requieren los modelos mencionados.

En nuestro caso, hemos encontrado en una misma molécula de enzima un comportamiento alostérico

clásico, monodiano para el sentido catabólico, y un comportamiento no ajustable al modelo clásico, para la racción reversa, aún cuando el activador es el mismo ligando, la GlcNAc6P. Estas observaciones tendrán que llevarnos a replantear la interpretación teórica de las propiedades alostéricas de esta enzima aunque al momento presente, no tengamos un modelo interpretativo de este comportamiento aparentemente anormal.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Leloir L.F. y Cardini C.E. Biochim Biophys Acta (1956) 10, 169
2. Comb D.G. y Roseman S. J. Biol Chem (1958) --
232, 807
3. Pattabiraman T.N. y Bachhawat B.K. Biochim
Biophys Acta (1961), 54, 273
4. Nakada H.I. en Methods in Enzimology (1966)
IX , 575. Wood W.A. Acad.Press.New Y.
5. Bates C.J. y Pasternak C.A. Biochem J. (1965)
96, 147
6. Benson R.L. y Friedman S. J. Biol Chem (1970)
245, 2219
7. Enhoter E. y Kress H. Dev Biol (1980) 78, 63.
- 8.. Imanaga Y. J. Biochem (Tokio) (1957) 44, 69.
9. Veerkamp J.H. Arch Biochem Biophys (1969) 129,
248.
10. Kornfeld R. J. Biol Chem (1962) 242, 31.
11. Witerburn P.J. y Phelps C.F. Biochem J. (1971)
12. Mahler H. Cordes E. "Biological Chemistry" (19
68) Harper Inter. New Y. p. 19.
13. Holmes R.P. y Russell R.R.B. J. Bacteriology
(1972) 111, 290
14. Amadori M. Atti Accad Nazl Lincei (1929) 9 (6)
68 Chem Abs (1929) 23, 3211, 3443.
15. Mildefort C.F. y Rose I.A. Biochemistry
1977) 16, 1590

16. Morgan W.T. y Elson C.A. Biochem J. (1934) 28
988.
17. Roe J.H. J. Biol Chem (1934) 107, 15.
18. Lee J.J. y Wilson I.B. Biophys Acta (1971) 242, 519
19. Storer A.C. y Cornish-Bowden A. Biochem J. (1974)
141 , 205
20. Reissig J.L., Strominger J.L. y Leloir L.F.
J Biol Chem (1958) 217, 959
21. Bucher T, Buicgun Buiogts Acta (1942) 1
192
22. Bradford M.M. Anal Buichem (1976) 72, 248
- 23 Fehrnstrom H., Moberg U. LKB application
note No. 250 (1977)
24. Laemmli U.K. J Mol Biol (1973) 80, 575.
- 25 Holguín J.A. y Más J. Boletín de Educación
Bioquímica (1982) 1, 16.
26. Malik N. y Berrie A. Anal Biochem (1972) 40
292.
27. Martin R.G. y Ames B.N. J Biol Chem (1961)
236, 1372
28. Calcagno M., Diaz-Zagoya J. y Gascon A.
Anal Biochem (1976) 73, 386
29. JolleyW., Allen K. y Griffith O. Anal Bio-
chem (1976) 21, 454
30. Calcagno M. y Rendón J. Anal Buichem (envia
do a publicación).
31. Moore S. J Biol Chem (1962) 238 , 235.
32. Ellman G.L. Arch Bichem Biophys (1949) 82 ,
70.

33. Goodwin T.W. y Morton R. Bioch J (1946) 40 ,
628
34. Lakshmanan T.K. y Lieberman S. Arch Biochem
Biophys (1954) 53, 258
35. Mc Meekin etal En Colowiek G. y Kaplan N.
Methods in Enzymology. Vol. I A.C.
36. Wyman J. Proc Nazl Acad. Sci (1975) 72, 3983
37. Dixon M. y Webb E. "Tge Enzymes" (1979) Logman
3a. Ed. p. 138-164
38. Alberty R.A. y Massey V, Biochim Biophys Acta
(1954) 13, 347
39. Koshland D.E. En Boyer P.D. "The Enzymes" 3a. ed.
vol. 1, cap. 7, Acad.Press, N.Y. p 342
40. Resulatados no publicados.
41. Hoffpauir C.L. y Guhier J.B. Tex. Rev. J. (1950)
20, 617
42. Suástegui j., Silva A. y Calcagno M. Comunica-
cion al XVI congreso Mexicano de --
Química y Aplicada. Rev.Soc.Mex. de
Química. (1981).
43. Suástegui J. Viveros R. Cantellano E. y Calcagno
M. Comunicación al XIV Congreso Nacio-
nal de la Sociedad Mexicana de Bioqui-
mica, Rev.Soc.Mex. Bioq. Guadalajara
(1982).
44. Horn A. y Bjorning H. FEBS letters (1969) 3, 325.
45. Silva S.A. y Suástegui H.J., Tesis de licencia-
tura, ENEP Zaragoza, UNAM (1982).

46. Mond J., Wyman J. y Changeux J.P. J Mol Biol.
(1965) 12, 88.
47. Koshland D.E., Nemethy S y Filmer D. Biochemistry
9 1966) 5, 365
48. Arrambide E. y Calcagno M. Experientia (1970) 24
896.
49. Calcagno M. y Mizraji E. Enzimologia (1971) 41, 175.