



# Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

MECANISMO CINETICO DE LA GLUCOSAMINA  
6-FOSFATO ISOMERASA (DESAMINASA) DE E. coli

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presentan

ALFONSO SILVA SERNA  
Y  
JAVIER SUASTEGUI HERNANDEZ

MEXICO, D. F.

1982



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

	pag
1.- Introducción .....	1
2.- Objetivos .....	7
3.- Fundamentación del tema .....	8
4.- Importancia del estudio de esta enzima .....	9
5.- Hipótesis .....	10
6.- Planteamiento del problema .....	11
7.- Material y métodos .....	14
7.1. Purificación de la enzima .....	14
7.2. Medidas de actividad enzimática .....	18
7.3. Medidas de proteínas .....	20
7.4. Experimentos en equilibrio .....	21
7.5. Procesamiento de datos .....	22
7.6. Materiales .....	22
8.- Resultados .....	24
8.1. Obtención y purificación de la enzima .....	24
8.2. Obtención de cinética de Michaelis .....	24
8.3. Patrones de velocidad inicial .....	30
8.4. Inhibición por productos .....	33
8.5. Inhibición por productos alternativos e inhibidores competitivos.....	35
8.6. Medida de la constante de equilibrio .....	38
8.7. Medidas de las velocidades máximas biosintética y catabólica.....	40
8.8. Experimentos en equilibrio .....	43
9.- Discusión .....	45
10.- Conclusiones .....	60
11.- Propuestas y recomendaciones .....	65
12.- Bibliografía .....	70
13.- Anexos .....	74

## 1.- INTRODUCCION.

El primer paso en el catabolismo de los aminoazúcares - consiste en la conversión de la glucosamina 6-fosfato ( $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ ) en un intermediario glucolítico, la fructosa 6-fosfato ( $\text{Fru6P}$ ). Esta reacción es catalizada en todas las especies estudiadas hasta la actualidad, por una enzima que forma  $\text{Fru6P}$  y  $\text{NH}_3$  a partir de la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ , la que se denomina, glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) [2-amino-2-desoxi-D-glucosa 6-fosfato cetol-isomerasa (desaminante) E.C. 5. 3. 1. 10. ] (1).

Esta enzima cataliza una reacción reversible, que es al mismo tiempo una isomerización entre una cetosa y una aldosa, acoplada a una reacción de aminación-desaminación, lo que constituye un único ejemplo metabólico de la reacción de Amadori (2).

Las primeras menciones a esta enzima la designan como glucosamina 6-fosfato desaminasa, destacando en la nomenclatura la reacción de desaminación (3). Actualmente, sin embargo, se ha clasificado como una isomerasa en la clase 5, destacándose la similitud de su reacción con la que cataliza la enzima glucosamina 6-fosfato isomerasa (formadora de glutamina), E.C. 5.3.1.19 ; anteriormente denominada glucosamina 6-fosfato sintetasa o glutamina-fructosa 6-fosfato aminotransferasa, (antes, E.C. 2. 6. 1.16).

Tradicionalmente se ha considerado que ambas enzimas poseen funciones fisiológicas opuestas, ya que la reacción catalizada por la isomerasa desaminante presenta un equilibrio desplazado hacia transformación del aminoazúcar en fructosa.

En la figura No. 1, se representan las relaciones metabólicas de estas dos enzimas con respecto a la vía de síntesis de los N-acetil hexosamina-nucleótidos y la vía glucolítica.

Desde el punto de vista biosintético, la formación de  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  tiene importancia como precursor de los componentes de aminoazúcar en el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias, y también de los lipopolisacáridos, en caso de las especies Gram negativas. En los animales se utiliza para la síntesis de la quitina, en la formación de los hexosaminoglicanos de la sustancia fundamental de los tejidos conectivos y de los residuos de aminoazúcar y ácido siálico de las glicoproteínas.

La glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) fue descrita por primera vez por Leloir y Cardini en riñón de cerdo(4) y estudiada posteriormente en cerebro humano (5), Proteus vulgaris (6), Escherichia coli (7), Bacillus subtilis (8), Musca domestica (9), Drosophila virilis (10), Aerobacter cloacae (11), y Bifidobacterium bifidum (12).

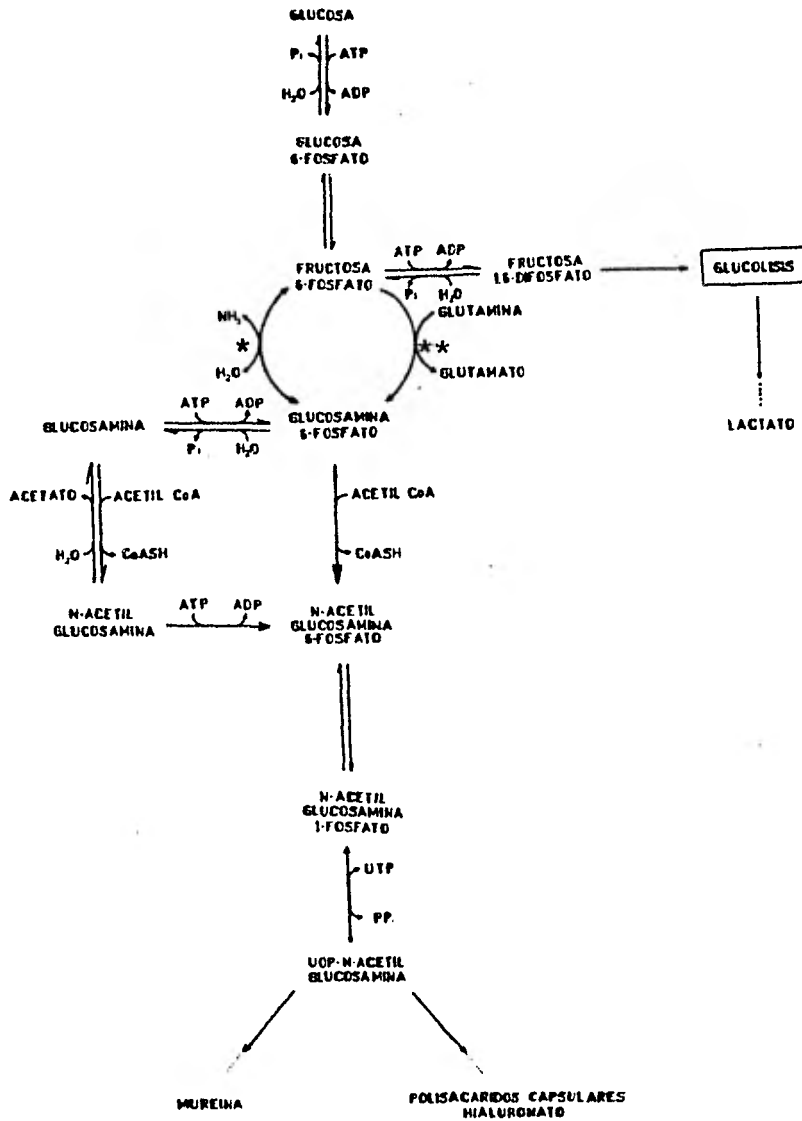


Figura No. 1 .

- \* Glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa).
- \*\* Glucosamina 6-fosfato isomerasa (formadora de glutamina).

La reacción catalizada por la glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) es reversible,  $\left[ K_{eq} = \frac{(\text{NH}_3)(\text{Fru6P})}{(\text{GlcNH}_2\text{6P})} = 0.18 \text{ mM a } 30^\circ \text{ C pH } 7.7, \text{ considerando la concentración del agua igual a la unidad} \right]$  (4), con el equilibrio desplazado en sentido catabólico. Sin embargo, el paso metabólico siguiente en la formación de los aminoazúcar-nucleótidos es una reacción de transacetilación entre la acetil-CoA y la glucosamina 6-fosfato, para formar N-Acetil glucosamina 6-fosfato (GlcNAc6P). Esta reacción es muy exergónica, de modo que acoplada a la reacción entre la Fru6P y el  $\text{NH}_3$  se forma fácilmente GlcNAc6P a partir de esos sustratos. Se han aislado mutantes de *E. coli* K-12, que carecen de la enzima que cataliza la reacción entre la glutamina y la Fru6P (13,14) lo cual confirma la función biosintética de la isomerasa desaminante.

Recientemente se han publicado resultados que indican que en las glándulas salivales de *Drosophila virilis*, a partir del tercer estado larvario no existe otra vía para la formación de los precursores de la quitina, que la reacción entre el  $\text{NH}_3$  y la Fru6P (10). La isomerasa dependiente de la glutamina no está presente tampoco en adultos jóvenes de *Musca domestica* (9).

La glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) de todas las fuentes estudiadas, excepto una, la enzima de *P. vulgaris*, es activada por la GlcNAc6P. Salvo la enzima de cerebro humano que parece ser activada por cationes divalentes, la enzima no requiere

ningún tipo de ion metálico o cofactor.

Comb y Roseman en 1958 (7) obtuvieron un preparado de esta enzima con un elevado grado de purificación (120X) y realizaron con ella un estudio preliminar. Estos autores comprobaron también que la GlcNAc6P es un activador de la enzima de E.coli

Midelfort y Rose (15), publicaron en 1977 un trabajo muy completo acerca del mecanismo químico de la reacción catalizada por esta enzima. Estos autores concluyen que el anómero alfa de la GlcNH<sub>2</sub>6P es la forma activa del sustrato. También proponen un mecanismo de reacción (figura No.2), basado en los resultados de sus experimentos de intercambio isotópico.



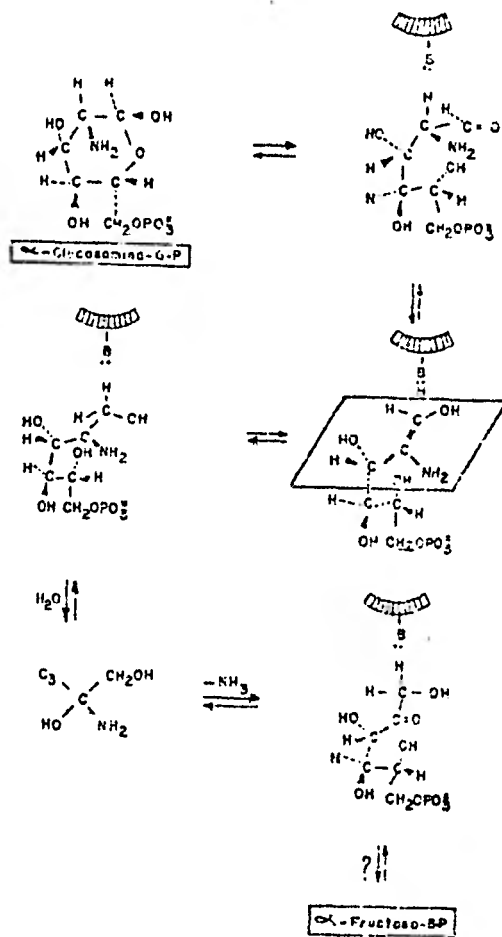


Figura No. 2.- Mecanismo de la reacción catalizada por la glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) de acuerdo a Midelfert y Rose (15). La forma anomérica del sustrato es  $\alpha$ -D-GlcNH<sub>2</sub>6P de acuerdo a los resultados de estos autores. La enzima fija en su sitio activo la forma pirrofónica abierta de la hexosamina fosforilada que se enlaza por sustracción de un protón por una función básica en el sitio activo. La enamina formada con estereoisomería *cis* se convierte en un imino alcohol que se hidrata dando un intermediario inestable que pierde NH<sub>3</sub>, dando la Fru6P.

## 2.- OBJETIVOS

2.1.- Describir el mecanismo cinético de la enzima, es decir, -  
establecer la secuencia al azar u ordenada en que los sustratos  
se adicionan y los productos se liberan de ella. Con este fin se  
propone proceder de acuerdo a las siguientes etapas:

2.1.1.- Producir cantidad suficiente de enzima para desarrollar -  
los puntos siguientes.

2.1.2.- Establecer condiciones de cinética de Michaelis en -  
ambos sentido de la reacción.

2.1.3.- Estudios de velocidades iniciales en ambos sentidos de  
la reacción, en ausencia de productos.

2.1.4.- Estudios de la inhibición por productos, en ambos senti-  
dos de la reacción.

2.1.5.- Estudios de la inhibición por análogos estructurales de los  
sustratos, en ambos sentidos de la reacción (inhibidores compe -  
titivos y sustratos alternativos).

2.1.6.- Estudios mediante procedimientos en equilibrio: Experi -  
mentos de Filtración-Equilibrio con Fru6P marcada.

2.2.- Determinar las constantes cinéticas en ambos sentidos de  
la reacción.

2.3.- Plantear una ecuación y un modelo de mecanismo que des -  
criba el comportamiento cinético de la enzima.

### 3.- FUNDAMENTACION DEL TEMA

El mecanismo químico propuesto por Midelfort y Rose (15) (figura No. 2), implica un ataque nucleofílico del  $\text{NH}_3$  al carbono carbonílico de la forma cetónica (abierta) de la Fru6P, ligada a la enzima. El producto de este primer paso pierde agua y forma una imina que se enoliza en una cis-enamina, la que se isomeriza en la forma carbonílica de la alfa-D-glucosamina 6-fosfato.

Este mecanismo, sustentado por los experimentos de Midelfort y Rose, podría tener una cinética de diferentes tipos. Dadas las características de la reacción, no es posible plantear un mecanismo de doble sustitución con la alternancia de dos formas de la enzima y liberación de un producto entre ambos estados (Mecanismo de "ping pong" de acuerdo a la nomenclatura propuesta por W.W. Cleland) (16, 17). La presencia de una unión transitoria entre el  $\text{NH}_3$  y la proteína, si existe, deberá ser detectada cinéticamente. En caso contrario, podría plantearse un mecanismo de Theorell y Chance, en el que el  $\text{NH}_3$  reacciona directamente con el sustrato ligado a la superficie de la enzima, en este caso la Fru6P. En el caso de la existencia de un complejo ternario central E- $\text{NH}_3$ -Fru6P, interesa establecer la secuencia de adición de los ligandos. Existen básicamente dos posibilidades: la adición al azar (Mecanismo secuencial al azar) y la adición ordenada (Mecanismo secuencial ordenado).

En este último caso debe indicarse el orden de adición de los sustratos o de liberación de productos.

#### 4.- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE ESTA ENZIMA.

La glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa), ha despertado el interés de varios autores, tanto por el carácter de la reacción que cataliza como por su posible funcionalidad en ambos sentidos. También es interesante destacar que es la única enzima de la clase de las isomerasas que cataliza una reacción reversible para la que se ha descrito un modulador alostérico, es este caso, la GlcNAc6P. Nuestro interés en esta reacción, parte justamente del hecho de tratarse de un sistema alostérico reversible, que en caso de tener significación funcional en ambos sentidos, constituiría un ejemplo único en el metabolismo.

Un estudio detallado de las propiedades regulatorias de esta enzima, requiere conocer previamente su comportamiento cinético fundamental y establecer expresiones que describan su cinética de velocidad inicial. En consecuencia, en este trabajo se encara el estudio del mecanismo cinético a los efectos de interpretar los datos de velocidad inicial.

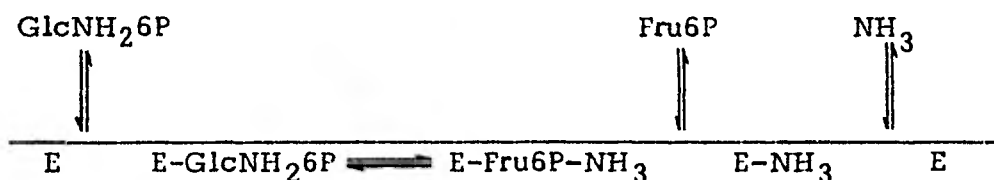
## 5.- HIPOTESIS.

Los mecanismos enzimáticos pueden ser divididos en dos clases: SECUENCIALES y DE DOBLE SUSTITUCION (PING PONG); a su vez, los primeros, se dividen en dos tipos: ordenados y al azar, cuando se trata de reacciones birreactantes.

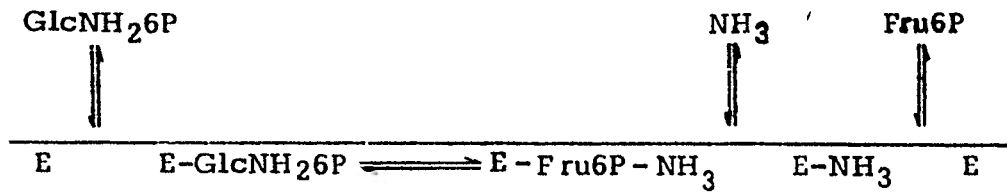
La característica de los mecanismos secuenciales es que la familia de rectas intersectan en un punto común cuando los datos experimentales se trazan en gráficas de doble recíprocos, mientras que los mecanismos de doble sustitución muestran rectas paralelas.

Las posibilidades del mecanismo cinético para la glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) están representados en los siguientes esquemas, sin tener en cuenta el agua puesto que cinéticamente no es detectable cuando un estudio se realiza en medio acuoso .

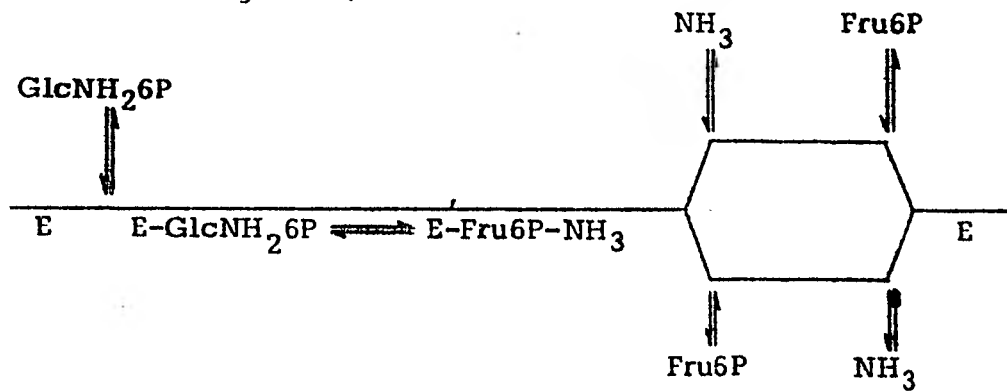
a) Secuencial ordenado. Primero se libera Fru6P luego  $\text{NH}_3$



b) Secuencial ordenado. Primero se libera  $\text{NH}_3$  luego Fru6P.



c) Secuencial al azar. La liberación de productos no sigue una secuencia obligatoria.



En los esquemas a y b, la liberación de los productos es en forma ordenada, primero la Fru6P luego el  $\text{NH}_3$  o viceversa. En el esquema c, una vez que ocurre la formación del complejo central, la liberación de los productos no sigue una secuencia ordenada, sino que ocurre al azar.

Para determinar cuál de los esquemas representa el comportamiento de la enzima, es necesario realizar estudios de la reacción en ambos sentidos en ausencia y presencia de productos, productos alternativos e inhibidores competitivos.

Si el mecanismo sucede al azar, el  $\text{NH}_3$  y la Fru6P serán inhibidores competitivos con respecto a la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  (sentido catabólico), y la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  será inhibidor competitivo con respecto a la Fru6P y al  $\text{NH}_3$  (sentido biosintético). Por otro lado, si el mecanismo es ordenado, el primer producto liberado (la Fru6P o el  $\text{NH}_3$ ), se comportará como inhibidor no competitivo, y el último producto liberado mostrará un patrón de tipo competitivo con respecto a la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  (sentido catabólico); y la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  será inhibidor competitivo con respecto al primer sustrato ligado (sentido biosintético).

La información directa del mecanismo cinético, es detectar la formación de complejos binarios o ternarios mediante el uso de sustrato marcado. En un mecanismo al azar, la enzima debe formar dos tipos de complejos: E-Fru6P en ausencia de  $\text{NH}_3$  y E- $\text{NH}_3$  en ausencia de Fru6P. En caso de tratarse de un mecanismo ordenado, solo debe formarse un complejo binario con el primer sustrato ligado.

Puesto que la enzima presenta cooperatividad termodinámica, se obtendrá cinética de Michaelis, por medio de la saturación con  $\text{GlcNAc6P}$ , modulador alostérico positivo.

## 6.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) presenta una intensa cooperatividad homotrópica positiva con respecto a la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  y cierto grado de cooperatividad con respecto a la Fru6P (18). Esta cooperatividad es máxima a pH 7.6 -7.8, (ver anexo), y en el sentido biosintético es ajustable a un modelo de fijación exclusiva con tres sitios interactuantes. Para poder realizar este estudio en condiciones de cinética de Michaelis, podría eliminarse la cooperatividad por extremos de pH (menor de 6.0 o mayor de 8.8), pero esto nos alejaría considerablemente de las condiciones fisiológicas y podría crear dificultades debido a modificaciones de la estabilidad de la enzima. Otro posible método para obtener cinética de tipo hiperbólico, particularmente útil en el sentido catabólico de la reacción es la saturación con el modulador positivo  $\text{GlcNAc6P}$ .

En el sentido biosintético, la cooperatividad es débil ( $h=1.4$ ) y puede anularse fácilmente trabajando a elevadas concentraciones de Fru6P. La enzima no presenta cooperatividad con respecto al  $\text{NH}_3$ .



## 7.- MATERIAL Y METODOS.

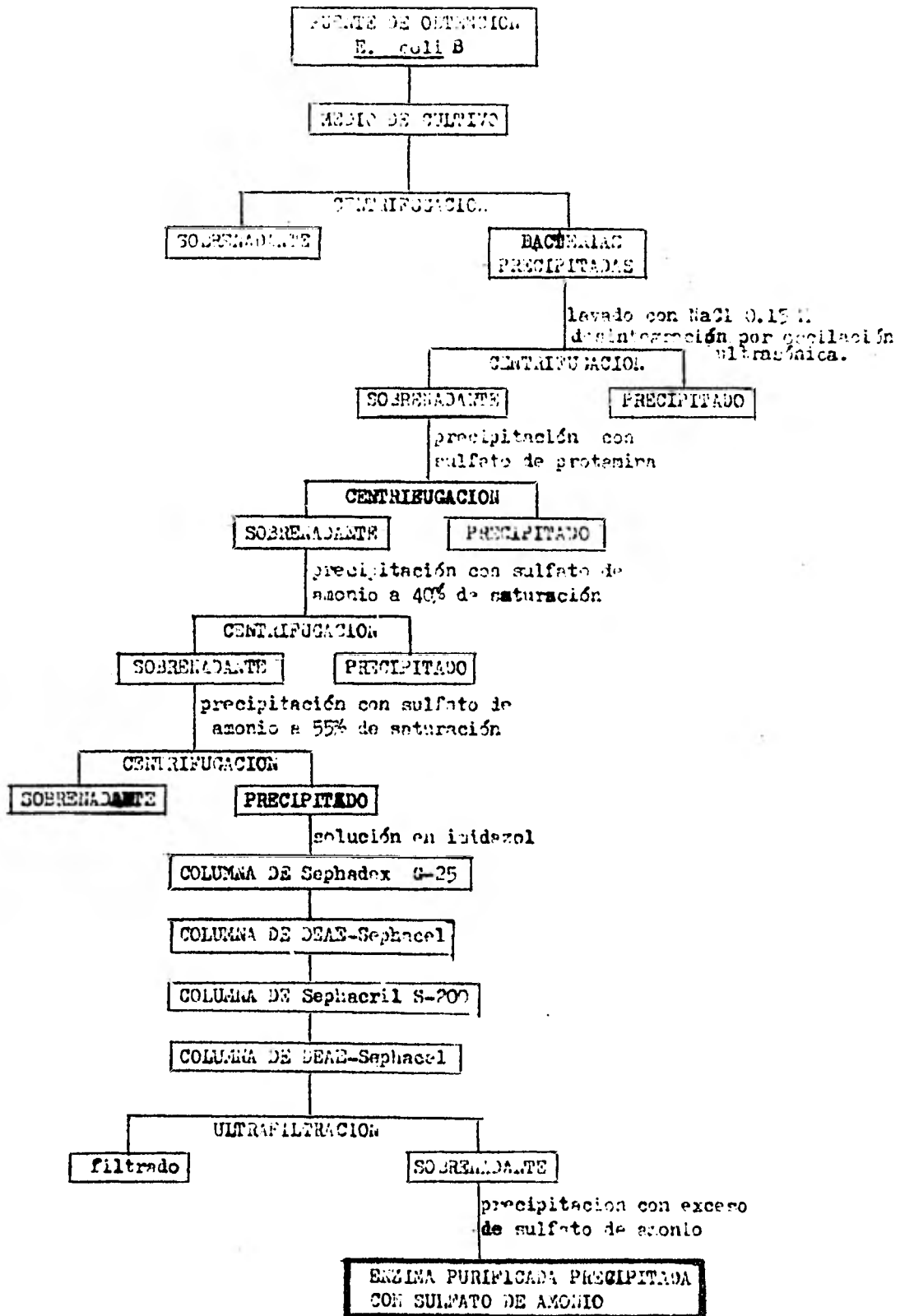
### 7.1.- Purificación de la enzima.

Se cultivó *E. coli* B bajo condiciones aerobias a 36° C - en el medio salino amortiguado de Comb y Roseman (7) utilizando glucosamina como única fuente de carbono y nitrógeno (5 g/ l); las bacterias se cosecharon por centrifugación al final del crecimiento exponencial y se conservaron a -20° C hasta el momento de su utilización. La enzima fué purificada de acuerdo al siguiente procedimiento llevado a cabo a 4° C; las células bacterianas centrifugadas (de 150 a 200 g de peso húmedo en una preparación típica), se lavaron dos veces en cloruro de sodio 0.15 M y se desintegraron por oscilación ultrasónica con dos volúmenes de solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0 con cloruro de magnesio 5 mM; el extracto fue centrifugado a 48 000 X g durante una hora. Bajo agitación suave se agregó lentamente una solución de sulfato de protamina al 0.5% en la proporción de 0.3 mg / mg de proteína. Después de 15 min el precipitado se recogió por centrifugación (48 000 X g, una hora), se ajustó el pH del sobrenadante a 7.0 con NH<sub>3</sub> 5N y se agregaron 226 mg de sulfato de amonio/ml de solución, (equivalente a 40% de saturación a 4° C). El precipitado fue recogido por centrifugación (25 000 X g, 5 min). El sobrenadante decantado fue adicionado con 89 mg de sulfato de amonio/ ml de solución (equivalente a 55% de saturación a 4° C),

y el precipitado, que contiene la enzima, se recogió por centrifugación (25 000 X g, 5 min) se disolvió en un volumen mínimo de amortiguador de imidazol-HCl 50 mM pH 7.4. La muestra se pasó por una columna de Sephadex G-25 de 2,6 x 100 cm equilibrada con el mismo amortiguador y se eluyó con dicha solución, recogándose el volumen eluido. Éste que contiene la enzima equilibrada con el amortiguador y liberada del sulfato de amonio, se aplicó a una columna de DEAE-Sephacel previamente equilibrada con el mismo amortiguador de imidazol. Luego de lavar con este amortiguador para desechar la proteína no adsorbida, se eluyó por medio de un gradiente lineal de cloruro de potasio de 0.00 a 0.35 M en amortiguador de imidazol 40 mM pH 7.4. El gradiente fue obtenido por medio de una bomba peristáltica de tres canales mediante el procedimiento descrito por Lackshmanan y col. (20). El volumen total de elución fue de 400 ml y la enzima salió de la columna como un pico único a la concentración de cloruro de potasio de 0.09 a 0.10 M. Se reunieron las fracciones de actividad específica mayor de 40 unidades/mg de proteína, se concentró por precipitación con sulfato de amonio (0.40 mg/ml) y se disolvió en un volumen mínimo de amortiguador de tris-HCl 75 mM pH 7.8. Esta solución se aplicó a una columna de Sephacril S-200 superfino, (1.6 x 100 cm) equilibrada con el mismo amortiguador. La elución se realizó a un flujo constante con la bomba peristáltica recogándose fracciones de 1.8 ml. Las fracciones correspondientes al pico de actividad enzimática

(con coeficiente de partición aparente de 0.31) se reunieron, se ajustó el pH a 7.4 y se re-cromatografiaron en DEAE-Sephacel bajo las mismas condiciones de la primera columna. El pico de actividad enzimática, que es el pico principal en el perfil de elución tiene una actividad de 600 a 700 unidades/mg de proteína; esta fracción se concentró por medio de una celda de ultrafiltración bajo presión por medio de un ultrafiltro con un corte de 50 000 daltons (Diaflo XM 50, Amicon Inc.). La enzima se conservó precipitada en un exceso de sulfato de amonio a 4°C, condiciones a las cuales demostró ser suficientemente estable. El diagrama No.1 resume las diferentes etapas de la purificación.

Diagrama No. 1. PROCESO DE PURIFICACION DE LA ENZIMA



## 7.2.- Medidas de actividad enzimática.

Las medidas de rutina para seguir la marcha de la purificación de la enzima, se hicieron en sentido catabólico midiendo la concentración de Fru6P formada por medio de un procedimiento colorimétrico basado en el método de Roe (22). Para la medida de la Fru6P se incubaron 200  $\mu$ l de mezcla que contenía 50  $\mu$ moles de amortiguador de tris-HCl pH 7.7, concentraciones variables de GlcNH<sub>2</sub>6P solución de tris-HCl pH 7.7 y 10  $\mu$ l de muestra de enzima. Las soluciones de este sustrato se prepararon antes del uso a partir de la forma ácida de la GlcNH<sub>2</sub>6P ajustando su pH con tris base; la mezcla se incubó por tiempos variables en cada caso y la reacción se detuvo por el agregado de 2 ml de HCl 10 N y 0.5 ml de resorcinol al 0.1% en etanol. La mezcla se calentó por 7 min a 70°C y se leyó en el espectrofotometro a 512 nm contra un blanco de reactivos, esta reacción basada en el método de Roe (22) da absorbividades molares iguales para la fructosa y la fructosa 6-fosfato (23).

Parte de los estudios cinéticos se hicieron midiendo el NH<sub>3</sub> formado en la reacción (sentido catabólico) acoplado la reacción catalizada por la glutamato deshidrogenasa: En una celda de vidrio termostaticada a 30°C se agregó 0.5 ml de mezcla que contenía 50  $\mu$ moles de amortiguador de tris-HCl pH 7.25, 5  $\mu$ moles de alfa-ceto-glutarato de potasio, 0.2  $\mu$ moles de NADH, cantidades variables de GlcNH<sub>2</sub>6P solución de

tris-HCl, 10  $\mu$ l de glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) y un exceso de glutamato deshidrogenasa. La concentración de la enzima auxiliar fué calculada de acuerdo al método de McClure (24). La reacción se desencadenó con el agregado de la glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) y se registró la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro registrador de doble haz PIE Unicam SP-8 con el accesorio para el control de la temperatura de las celdas. El fundamento de este método se basa en la medida de la desaparición de NADH a 340 nm.

En el sentido biosintético se midió la velocidad de la reacción a través de la formación de  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ . Se incubaron a 30°C 200  $\mu$ l de mezcla que contenía 30  $\mu$ moles de amortiguador de tris-HCl pH 7.7 y concentraciones variables de Fru6P sal de potasio o de sodio y cloruro de amonio. La reacción se detuvo por inmersión de los tubos en un baño a 100°C (mezcla de agua y etilén glicol) durante dos minutos y se midió la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  mediante el método colorimétrico de Reissig y Leloir (25). Con esta técnica la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  y la glucosamina dan la misma reacción de color (26) por lo cual se utilizó como patrón una solución de glucosamina-HCl.

### 7.3.- Medidas de proteínas.

Se midió la concentración de proteínas con el método - - turbidimétrico de Bücher (27) como guía durante los primeros pasos de la purificación. Como procedimiento general se utilizó el método de Bradford (28) basado en el cambio de color del extracto ácido del azul de comassie G en presencia de proteínas. En ambos casos se utilizó como patrón la albúmina de suero de bobino. El perfil de elución de las columnas durante la preparación de la enzima se monitorizó a 280 nm. La concentración de enzima pura se calculó a partir de su absorción a 275 nm, en base al coeficiente de absorptividad molar de  $8.1 \times 10^4$  ( $\epsilon_{1\%}^{275} = 4.55$ ). Calculado por composición de aminoácidos.

#### 7.4.- Experimentos en equilibrio.

Con la finalidad de detectar la formación de complejos entre la Fru6P y la enzima en presencia o no del segundo sustrato, se utilizó la técnica de filtración en equilibrio descrita por Hummel y Dreyer (29). Se utilizó una columna de 4 x 65 mm, (volumen total 1.0 ml), preparada en una jeringa desechable de polipropileno, empacada con Sephadex G-25 fino, equilibrada con amortiguador de tris-HCl 40 mM pH 7.25, con GlcNac6P 1 mM y Fru6P sal de sodio 0.1 M. La marca radiactiva se logró agregando a la solución de Fru6P, una cantidad adecuada de Fru6P marcada con  $^{14}\text{C}$  de actividad específica de 280 mCi/mmol (obtenida a través del Radiochemical Center, Amersham, Gran Bretaña) de modo de obtener finalmente una actividad de 2.25 mCi/mmol. Todos los experimentos se realizaron a 21°C. El eluyente de la columna fue recogido en gotas por separado (de 25  $\mu\text{l}$ , aproximadamente) en diferentes viales desechables para medidas de centelleo, que contenían 15 ml de mezcla de centelleo. Esta mezcla consistió en una solución de p-feniloxazol (PPO) al 0.5 % en un disolvente formado por dos volúmenes de tolueno y uno de tritón X-100. Las medidas se realizaron en un contador de centelleo líquido Beckman LS-300, con ventana amplia para  $^{14}\text{C}$ . Las muestras se contaron hasta un error estandar de 0.2%. El apagamiento valorado a través de la relación de canales con fuente externa, (sistema que forma parte del aparato) resultó ser sustancialmente constante en todas las muestras analizadas.



#### 7.5.- Procesamiento de datos.

Cada vez que los resultados siguieron la cinética de Michelis, se calcularon los parámetros cinéticos (  $K_m$  y  $V_{max}$  ) por medio del procedimiento de ajuste de Johansen y Lumry (30 , 31) en el que se supone una varianza constante. Para su presentación, se utilizó la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver y Burk (32, 33).

#### 7.6.- Materiales.

Salvo cuando se indique lo contrario, todos los productos bioquímicos utilizados fueron obtenidos de fuentes comerciales. La GlcNAc6P fue preparada a partir de la GlcNH<sub>2</sub>6P por acetilación con anhídrido acético en solución de bicarbonato de sodio y purificada por cromatografía de intercambio iónico en Dowex 1-acetato de acuerdo al procedimiento original de Leloir y Cardini (21). La concentración de GlcNAc6P se determinó por medio del procedimiento de Reissig y Leloir (25).

La sorbitolamina 6-fosfato se obtuvo también a partir de la GlcNH<sub>2</sub>6P por reducción con borohidruro de potasio en una relación de 1.5 moles / mol de GlcNH<sub>2</sub>6P en borato de potasio 20 mM pH 8.5 a temperatura ambiente. La mezcla se ajustó a pH 6.0 y se pasó por una columna de Dowex 50 H<sup>+</sup> (9 x 150 mm) y se eluyó con HCl 0.05 N. Las fracciones que dieron -

positiva la reacción con la ninhidrina (34) se reunieron y se liofilizaron.

Las proteínas, sustratos y demás productos bioquímicos - utilizados fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. ( St. Louis Missouri U.S.A.). Los demás reactivos fueron de pureza analítica obtenidos de J.T. Baker S.A. de C.V. (México) ó de Merck de México S.A.

#### REACTIVOS COMERCIALMENTE OBTENIDOS

##### ANALITICOS.

Ac. acético glacial.  
Ac. clorhídrico.  
Ac. tricloroacético.  
Anhídrido acético.  
Azul de conmasse G.  
Borato de potasio.  
Borohidruro de potasio.  
Clorhidrato de imidazol.  
Clorhidrato de hidroxilamina.  
Clorhidrato de hidrazina.  
Clorhidrato de metilamina.  
Clorhidrato de tris-hidroximetil-aminometano.  
Cloruro de amonio.  
Cloruro de magnesio.  
Cloruro de potasio.  
Cloruro de sodio.  
DEAE- Sephadex.  
Dowex 1-acetato.  
Dowex 50 H<sup>+</sup>.  
Etanol.  
Etilénglicol.  
Fosfato de potasio.  
Ninhidrina.  
para-dimetilamino benzaldehído.  
para-fenil oxal.  
Resorcinol.  
Sephacryl S-200.  
Sephadex G-25.  
Sulfato de amonio.  
Tolueno.  
Trítón X-100

##### BIOQUIMICOS.

Albumina sérica bovina.  
Alfa-ceto-glutarato de potasio.  
Fructosa.  
Fructosa 6-fosfato.  
Glucosamina.  
Glucosamina 6-fosfato.  
Glutamato deshidrogenasa.  
Dinucleótido de adenina nicotinamida reducido (NADH).

## 8.- RESULTADOS

### 8.1.- Obtención y purificación de la enzima.

La tabla No. 1 resume la preparación de la enzima y la figura No. 3 muestra el patrón electroforético de algunas fracciones de la purificación.

### 8.2.- Obtención de cinética de Michaelis.

Con la finalidad de suprimir la cooperatividad homotrópica positiva con respecto a los sustratos  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  y  $\text{Fru6P}$ , se estudió la magnitud de la cooperatividad en función de la concentración de  $\text{GlcNAc6P}$ , que actúa como modulador alostérico positivo con efecto K (18). La magnitud de la cooperatividad se valoró por medio del valor extremo del número de Hill ( $h$ ), en base a los fundamentos teóricos desarrollados por Wyman (35). Los resultados se analizaron mediante el gráfico de Hill en el que se representa el  $\log v / V_{\max} - v$  en función del  $\log$  de la concentración del sustrato. El valor máximo de la pendiente, que corresponde a una amplia zona en la que se puede ajustar una recta, es el coeficiente de Hill. En la figura No. 4 se muestra el valor del coeficiente de Hill, en función de la concentración de  $\text{GlcNAc6P}$ . Estos datos fueron obtenidos por medio de diferentes series en las que la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  fue el sustrato variado, realizada cada una de ellas a diferentes valores fijos de concentración de  $\text{GlcNAc6P}$ . De acuerdo a estos resultados, se esco-

gió la concentración de 0.12 mM de GlcNAc6P , para ser agregada en nuestros sistemas , a los efectos de garantizar la supresión de los efectos cooperativos. El valor de Km para la - - GlcNH<sub>2</sub>6P obtenido en estas condiciones es de aproximadamente 1 mM . En el sentido biosintético, en estas condiciones se obtiene también cinética de tipo hiperbólico clásico. En la figura No. 5 se muestra el efecto de la GlcNAc6P , a concentración fija de 0.12 mM sobre la velocidad de reacción en ambos sentidos .

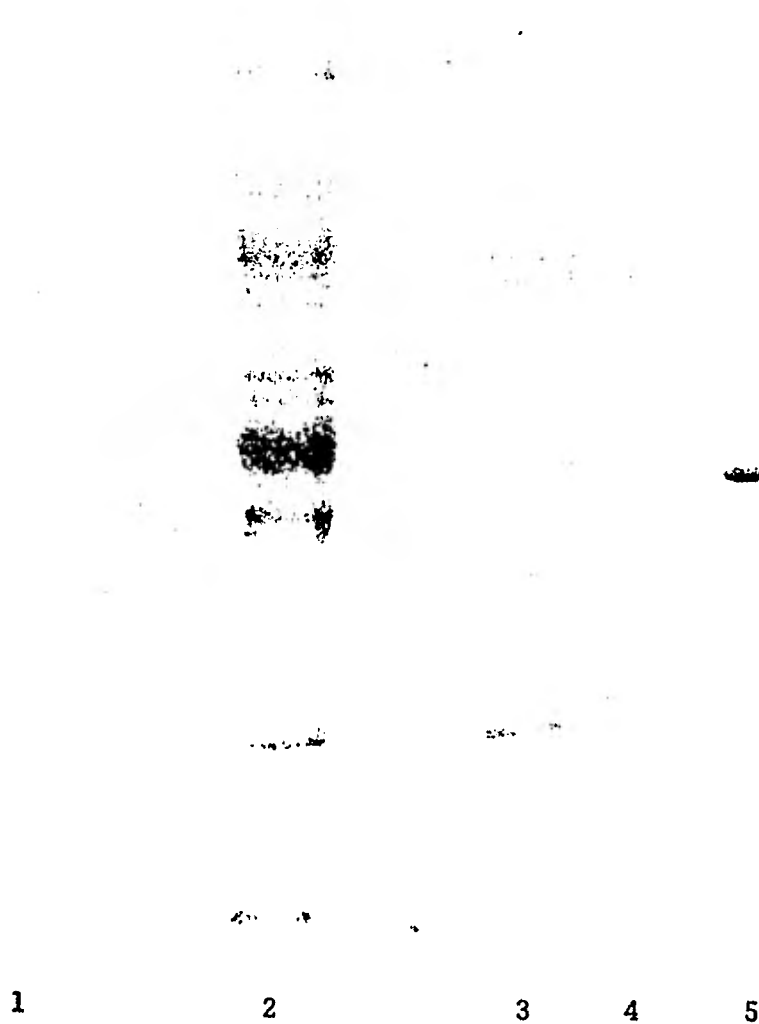


Figura No. 3. Patrón electroforético de algunas de las fracciones de la purificación.

- 1.- Extracto de sonicación.
- 2.- Fracción con sulfato de protamina.
- 3.- Fracción sulfato de amonio 40 - 55 % saturación.
- 4.- Eluido de la primera columna de DEAE-Sephacel.
- 5.- Eluido para (segunda columna de DEAE-Sephacel).

PURIFICACION DE LA GLUCOSAMINA 6-P ISOMERASA ( DESAMINASA ) DE E. COLI

Material de partida : 180 g de E. coli B, peso húmedo

Unidad :  $\mu\text{Mol ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  a 30°C, PH 7.8

	VOLUMEN ml	U/ml	U. TOTALES	PROTEINA mg/ml	ACTIVIDAD ESPECIFICA U/mg prot.	RENDIMIENTO %	PURIFICACION
1 EXTRACTO INICIAL	630	11.3	7120	21	0.54	100	1
2 SULFATO DE PROTA MINA	700	9.74	6878	5.6	1.74	96	3.2
3 SULFATO DE AMO-- NIO 40-55% SATU- RACION	37	329	12173	21	15.7	—	—
4 1 <sup>a</sup> CROMATOGRAFIA EN DE AE SEPHACEL	8	490	3920	5.3	92.4	55	171
5 CROMATOGRAFIA EN SEPHACRYL S-200	2.3	1102	2535	2.5	440	36	815
6 2 <sup>a</sup> CROMATOGRAFIA EN DE AE SEPHACEL	1.2	846	1015	1.2	705	14	1305

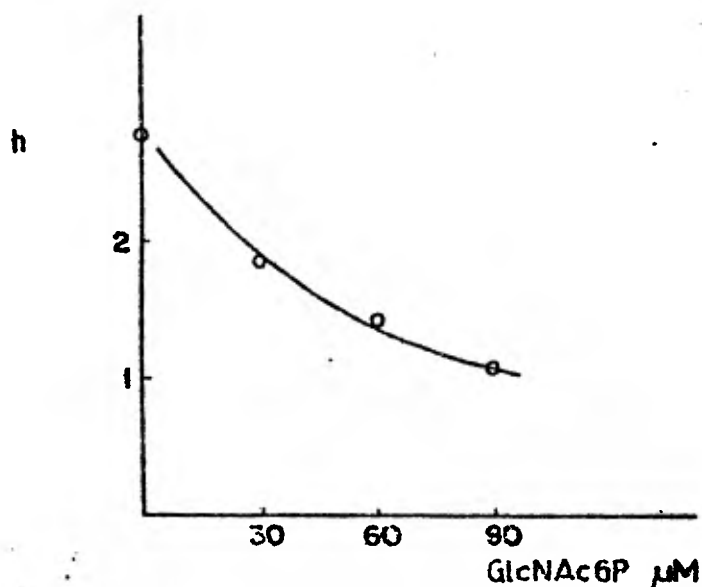


Figura No. 4.- Variación del número de III ( $h$ ) en función de la concentración de GlcNAc6P en sentido catalítico de la reacción. En cada punto el valor de  $h$  no calculó en base a un valor de velocidad de velocidad en función de la concentración de GlcNAc6P. Los resultados se analizaron por medio de la ecuación simplificada de III, obteniendo los  $v/V_{max} = v$  en función de  $1/\log(\text{GlcNAc6P})$ . El valor de la pendiente se calculó como número de III. El significado de  $h$  como resultado de la cooperatividad se sigue demostrando por la ecuación (15).

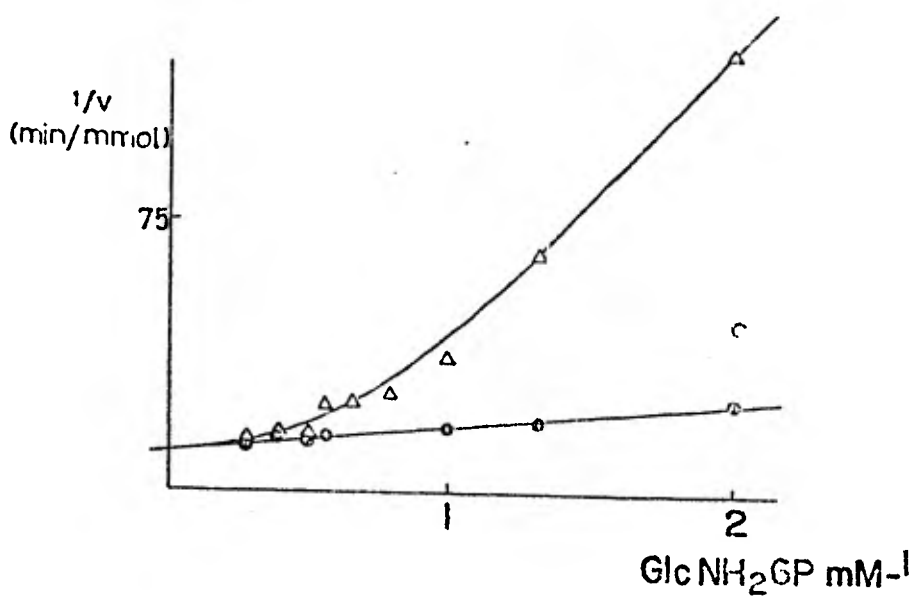


Figura No. 5 A.- Efecto de la adición de GlcNAc6P sobre la cinética de la reacción en sentido catabólico, gráfica doble recíproca de Lineweaver y Burk;  $\Delta$  en ausencia de GlcNAc6P y  $\bullet$  en presencia de GlcNAc6P 0.12 mM. La mezcla de reacción contenía  $\text{MgCl}_2$  25 mM - pH 7.7 y concentraciones variables de sustrato en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ .

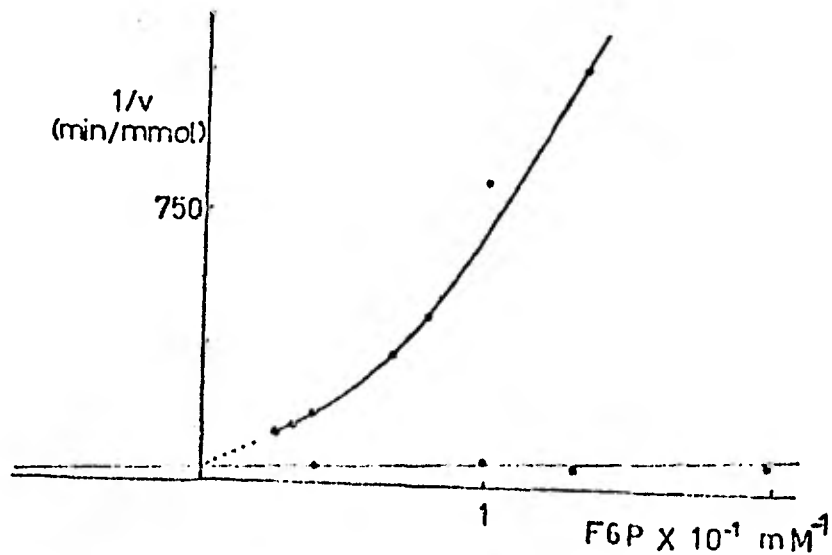


Figura No. 5 B.- Efecto de la adición de GlcNAc6P sobre la cinética de la reacción en sentido biosintético, gráfica doble recíproca de Lineweaver y Burk. Curva superior en ausencia de GlcNAc6P, curva inferior en presencia de GlcNAc6P 0.12 mM. La mezcla de reacción contenía  $\text{MgCl}_2$  25 mM - pH 7.7;  $\text{MgCl}_2$  45 mM y otras condiciones variables de sustrato en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ . Procedimiento analítico descrito en el capítulo 4 de este libro. A bajas concentraciones de sustrato se observó un comportamiento de tipo Michaelis-Menten.



### 8.3.- Patrones de velocidad inicial.

En la figura No. 6, se muestran los resultados de los estudios de velocidad inicial en el sentido biosintético de la reacción en el cuál es birreactante. En cada caso, se muestra un experimento representativo en el cual se ha variado la concentración de uno de los sustratos a distintas concentraciones fijas del segundo.

Se observa un patrón de líneas intersectantes en el eje de las abscisas tanto para uno como para el otro sustrato variable. La constante relacionada con el sustrato, es del orden de 3 mM, para la Fru6P, y de 35 mM para el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , a pH 7.7 a 30°C. El valor corregido para  $\text{NH}_3$  equivale a una constante de 0.45mM. Cuando fué necesario calcular la  $V_{\text{max}}$  en el sentido birreactante se regraficó el valor de la ordenada en el origen en función de la inversa de la concentración del sustrato. En este caso, la ordenada en el origen da la inversa de la  $V_{\text{max}}$ . El corte en el eje de las abscisas, en este tipo particular de patrón de velocidad inicial, es el mismo tanto se grafiquen pendientes o intersecciones, y proporcionan los mismos valores de constantes relacionadas con cada uno de los dos sustratos.

Cuando estos experimentos se realizan en ausencia de G1CNAC6P se observa, como ya se ha mencionado, un importante desviación con respecto a la cinética hiperbólica. Sin embargo,

a concentraciones elevadas de Fru6P , que también se comporta - como un ligando cooperativo la cinética se aproxima a la de Michaelis y es posible obtener patrones de velocidad inicial semejantes con valores de constantes para la Fru6P de 60 a 70 mM . Los valores para el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  , no se modifican por el agregado de GlcNAc6P .

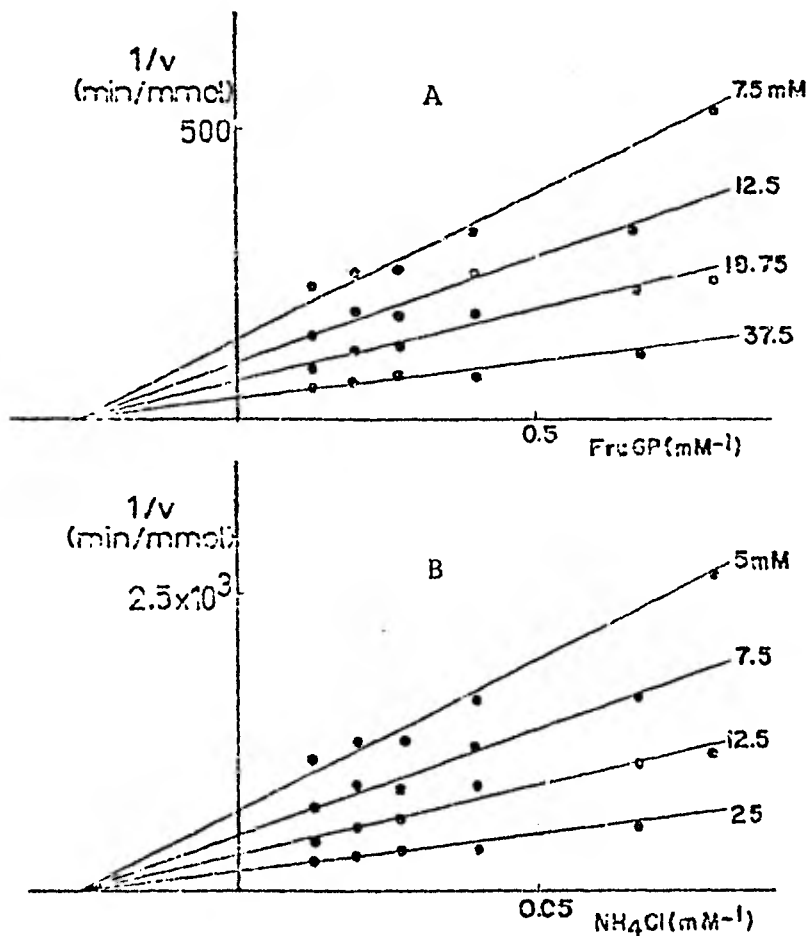


Figura No.6.- Patrones de velocidad inicial en sentido biosintético, gráficas de doble recíprocos.

A.- Patrones de velocidad en función de la concentración de Fru6P, a diferentes concentraciones fijas de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  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 constante de 5  $\mu\text{moles/ml}$  con un tiempo de incubación fijo de 20'.

#### 8.4.- Inhibición por productos.-

En la figura (7), se muestran los patrones de inhibición de la reacción en el sentido catabólico, en presencia de diferentes valores fijos de concentración de cada uno de los dos productos de la reacción, la Fru6P y el  $\text{NH}_3$ , (agregado éste último en forma de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). En la parte ~~inferior~~<sup>inferior</sup> de la figura, se muestra la inhibición por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  que presenta un patrón de tipo competitivo. Las gráficas secundarias de pendientes en función de la concentración de inhibidor, muestran una constante de inhibición de 30 a 40 mM.

En la parte ~~superior~~<sup>superior</sup> de la figura, muestra la inhibición en presencia de Fru6P; el patrón es de tipo no competitivo simple, con intersección de la familia de rectas sobre el eje de las abscisas. En este caso, el valor de la constante de inhibición obtenido por regráficoado de estos datos como pendientes en función de la concentración de Fru6P, es de 3 mM.

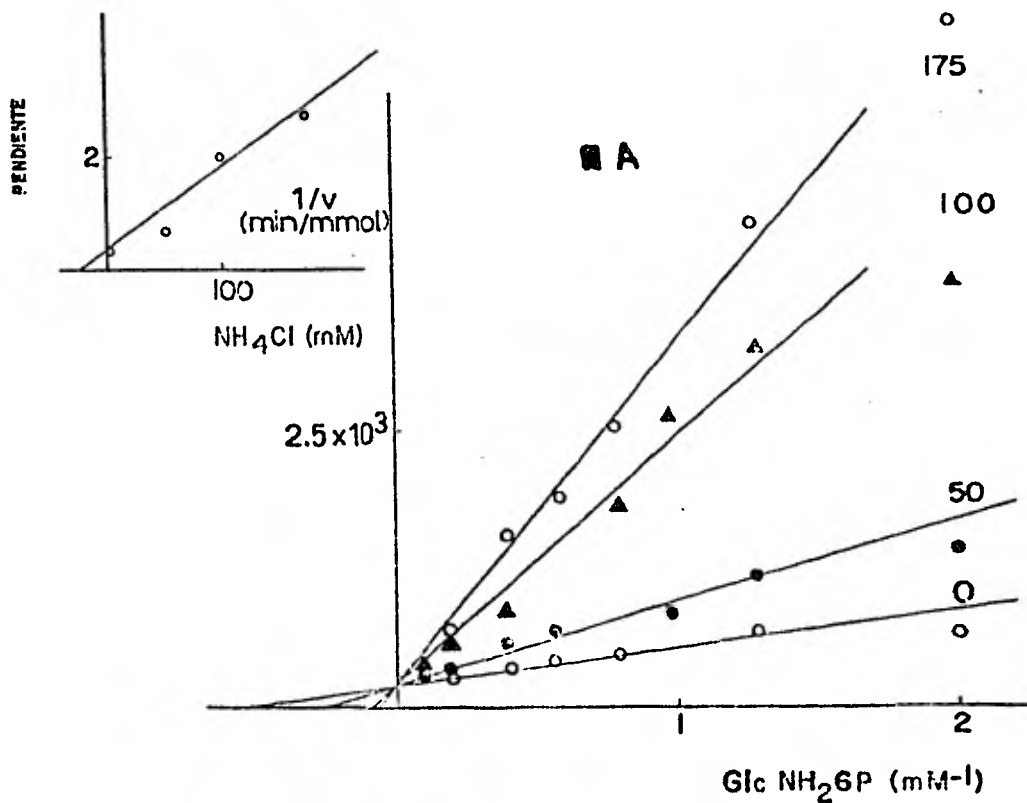
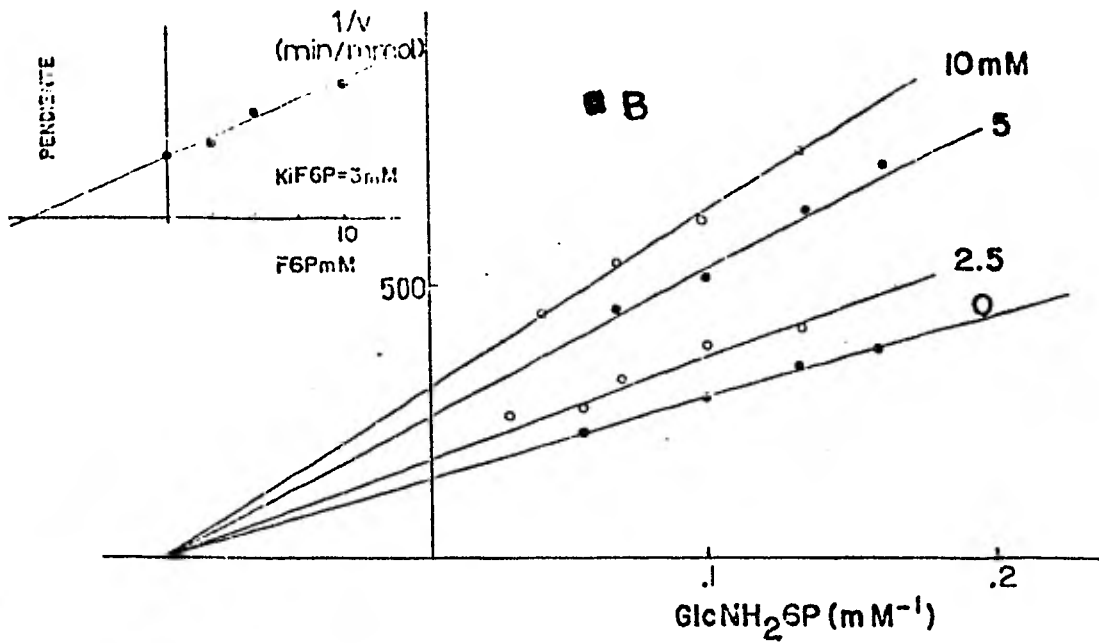


Figura No.7.- Patrón de inhibición por productos, en sentido catábólico de la reacción en presencia de GlcNH<sub>2</sub>6P.

7A.- Patrón de inhibición por NH<sub>4</sub>Cl. Las velocidades de reacción se midió a tiempo fijo cuantificando el <sup>14</sup>C por el método de Libby (1947). La mezcla contenía: 10mM F6P (pH 7.7), GlcNH<sub>2</sub>6P 0.25 mM y concentraciones variables de sustrato.

7B.- Patrón de inhibición por F6P. Las velocidades se midieron por el método de acoplamiento con L-glutamato (Hirogawa, 1964) mediante el receptor de radioactividad en línea. La mezcla contenía: 10mM F6P (pH 7.7), 5 mM de sustrato, 0.25 unidades de sustrato, 0.25 unidades de sustrato, cantidad variable de sustrato, 10 mM de sustrato de sustrato y sustrato de glutamato deshidrogenasa en un volumen final de 0.5 ml.

En los cálculos se usó un factor de conversión de 10<sup>3</sup> para el eje de las velocidades. La concentración del sustrato en la inhibición que tiene por sustrato principal es 10 mM. El sustrato principal de sustrato.

8,5.- Inhibición por productos alternativos e inhibidores competitivos.

El estudio de los patrones de inhibición por análogos de los sustratos, ya sea que éstos actúen como inhibidores competitivos o también como sustratos, permite completar la información sobre el mecanismo cinético. Con la finalidad de buscar inhibidores competitivos con respecto al  $\text{NH}_3$ , se ensayaron aminas primarias, hidrazinas e hidroxilaminas.

Observaciones previas (38), han demostrado que la hidrazina, la metilhidrazina y la N,N-dimetil hidrazina son sustratos de la reacción en sustitución del  $\text{NH}_3$ . En estos casos, se forma la hidrazona correspondiente de la Fru6P.

Cuando se estudia la inhibición de la reacción en sentido catabólico, por concentraciones variables de la hidrazina e hidroxilamina se obtienen patrones competitivos. La metilamina (cloruro de metilamonio) también da un patrón de inhibición competitiva con una constante de inhibición de 30 mM a pH 7.7 a  $30^\circ\text{C}$ . Se ensayaron otros compuestos en busca de inhibidores competitivos con respecto al  $\text{NH}_3$ , que carecieron de efecto sobre la enzima. Estos fueron la N,N-dimetilhidrazina, la fenil hidrazina, la etiléndiamina y la etanolamina.

Con respecto a la Fru6P, tampoco se ha podido hallar -- ningún inhibidor competitivos. Se ensayaron con resultados negativos la Fru 1,6, difosfato, la ribosa 5-fosfato y el piridoxal - fosfato; éste último puede considerarse un análogo estructural de la forma carbonílica abierta de la Fru6P (35). Existe en cambio un poderoso inhibidor competitivo con respecto a la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ , que es la sorbitolamina 6-fosfato ( $\text{SNH}_2\text{6P}$ ), descrita por Midelfort y Rose (15). En sentido catabólico inhibe en forma competitiva con un  $K_i$  de  $7 \times 10^{-3}$  mM a pH 7.7,  $30^\circ\text{C}$ . Cuando se - utiliza como inhibidor de la reacción en sentido biosintético, se obtienen los patrones de inhibición que se muestran en la figura - No. 8. En la parte superior de esta figura se observa la inhibi - de este compuesto con respecto al  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como sustrato varia - do a una concentración fija de Fru6P; el patrón correspondiente es de tipo competitivo. Cuando el sustrato variado es en cambio la Fru6P se obtiene una inhibición de tipo no competitiva clási - ca, en la cual el punto de intersección del haz de rectas, se - encuentra en el eje de las abcisas.

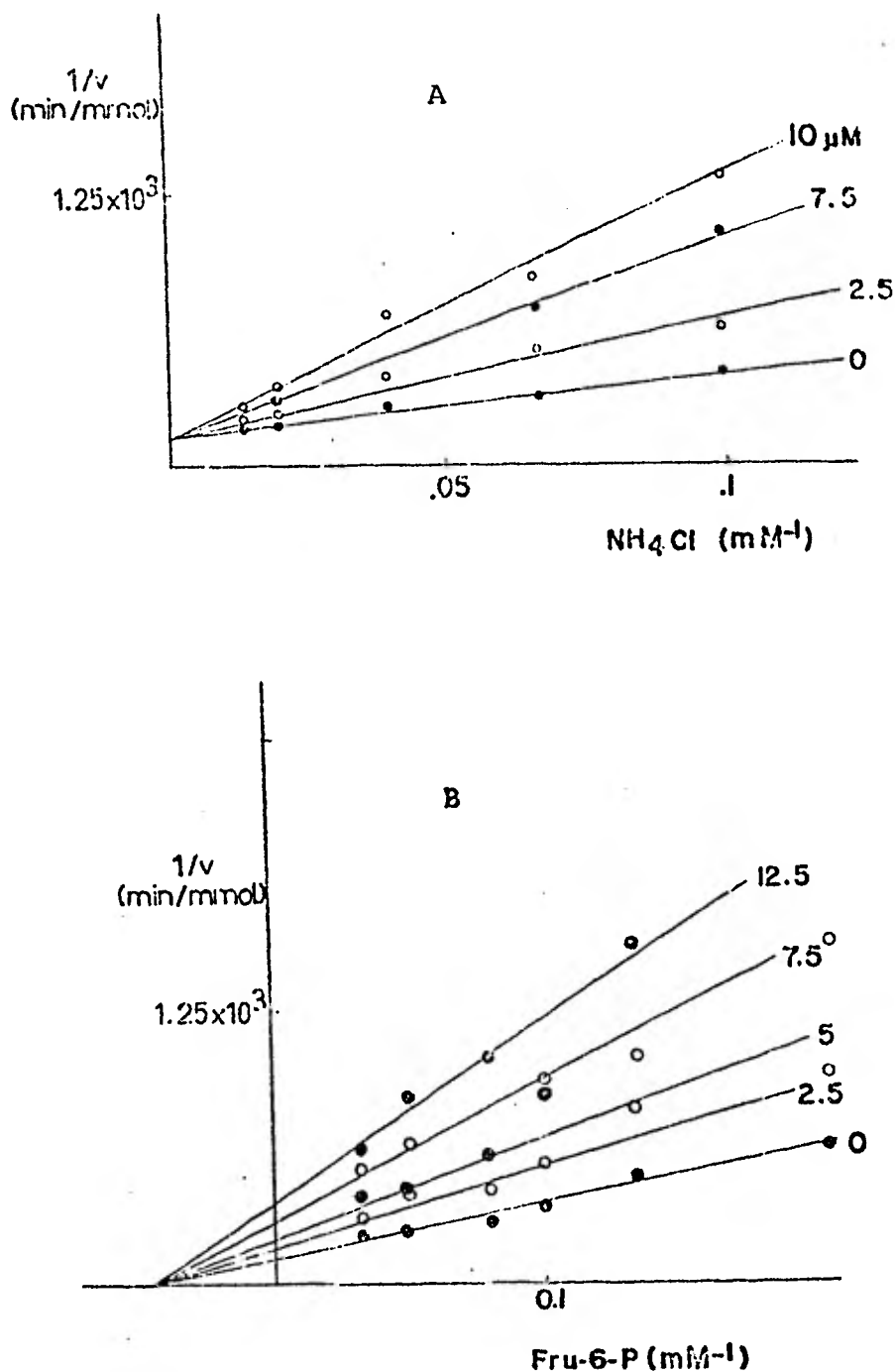


Figura No. 8.- Inhibición por SMH<sub>2</sub>GP, en sustrato biosintético.

8 A.- Patrones de inhibición por SMH<sub>2</sub>GP en función de la concentración de NH<sub>4</sub>Cl a una concentración fija de Fru-6-P (30 mM) en presencia de GlcNAc-6P 0.14 mM. La gráfica de las pendientes en función de la concentración de sustrato (no se muestra), es una recta - de la que se puede calcular un valor de  $K_i$  de  $3 \times 10^{-6}$  M.

8 B.- Patrones de inhibición por SMH<sub>2</sub>GP en función de la concentración de Fru-6-P a una concentración fija de NH<sub>4</sub>Cl (20 mM) y de GlcNAc-6P 0.18 mM. La gráfica de las pendientes en función de la concentración de sustrato (no se muestra), permite obtener un  $K_i$  de aproximadamente  $3 \times 10^{-6}$  M.

Cada recta corresponde a un nivel de experimentos con diferentes concentraciones del sustrato variable y a una concentración fija de inhibidor. Se usó como el control, 0.15 sustrato por medio de las células, sobre cada recta y se expresaron los datos en Z.U.



## 8.6.- Medida de la constante de equilibrio.

Con la finalidad de establecer el valor de la constante de equilibrio para la reacción catalizada por la glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa), en las mismas condiciones de trabajo en que se realizaron los experimentos cinéticos (pH 7.7 en amortiguador de tris-HCl a 30° C), se siguió el curso en el tiempo de la reacción en sentido biosintético, hasta alcanzar el punto de equilibrio (figura No. 9). El cálculo de la constante de equilibrio  $K_{eq} = \frac{(\text{GlcNH}_2\text{6P})}{(\text{Fru6P})(\text{NH}_4\text{Cl})}$ , se realizó en base a la medida de GlcNH<sub>2</sub>6P formada y las concentraciones iniciales conocidas de NH<sub>4</sub>Cl y Fru6P. Los valores de concentración de NH<sub>4</sub>Cl se convirtieron en concentraciones de NH<sub>3</sub>, en base a la ecuación de Henderson y Hasselbach, tomando el valor de 9.3 como pKa del ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. El valor obtenido en un experimento realizado por duplicado fue de  $5.5 \times 10^{-3}$  M. Expresando el NH<sub>3</sub> como NH<sub>4</sub>Cl, la constante es de  $4.3 \times 10^{-6}$  M.

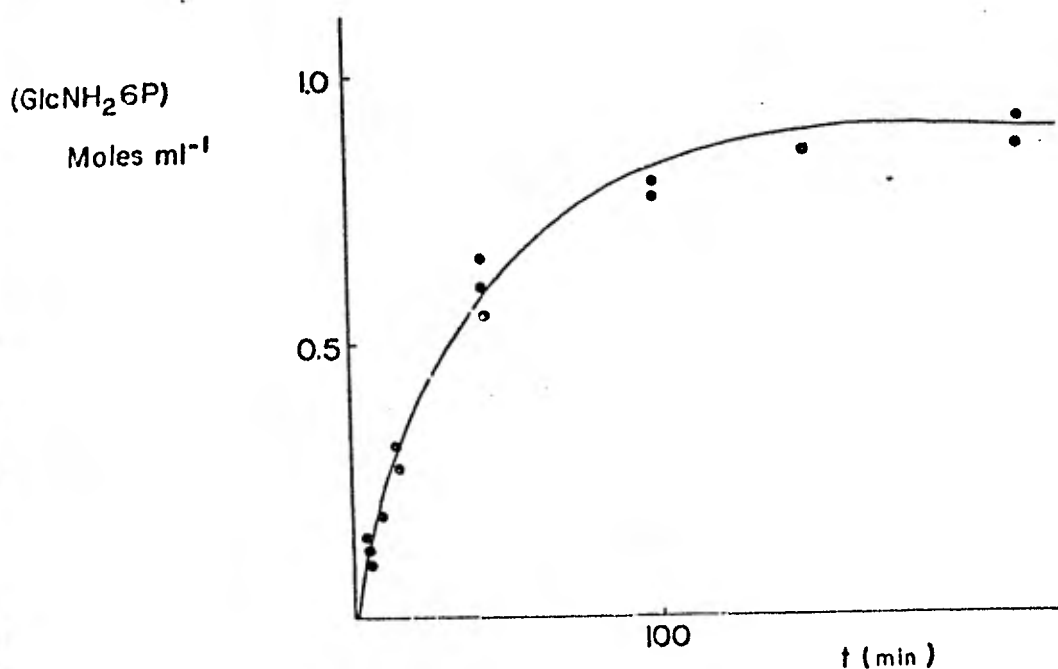


Figura No. 9.- Producto formado en función del tiempo en el sentido biosintético de la reacción. Se incubaron diferentes tubos con mezcla de igual composición que fueron analizados para: - - -  $(\text{GlcNH}_2)_6\text{P}$  a diferentes tiempos. Composición de la mezcla: Fru6P 30 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  25 mM, - - -  $(\text{GlcNH}_2)_6\text{P}$  0.14 mM, tris-HCl 25 mM pH 7.7, glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa) 10 unidades/ml. Simultáneamente se hizo una curva de calibración para convertir el valor de la ordenada en unidades de concentración. Esta concentración,  $x$ , se utilizó para calcular la constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) mediante la siguiente expresión:

$$K_{eq} = \frac{x}{(\text{Fru6P} - x)(\text{NH}_3 - x)}$$

La concentración de  $\text{NH}_3$  de la mezcla, se calculó a partir de la concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y el pKa del ion  $\text{NH}_4^+$  (9.3). El valor de la  $K_{eq}$  calculada es de  $5.5 \times 10^3$  l.

8.7.- Medidas de las velocidades máximas biosintética y catabólica.

Se realizaron medidas de  $V_{max}$  en ambos sentidos de la reacción catalizada por la enzima, con la finalidad de disponer de datos que permitieran comprobar la validez de las ecuaciones de Haldane que puede establecerse de acuerdo a estos resultados (vease la discusión). Debido a que la  $V_{max}$  es un parámetro que depende de la concentración de enzima y que ésta puede resultar una magnitud poco controlable desde el punto de vista experimental, se procedió a realizar ambas medidas de velocidad máxima en el mismo día y con la misma dilución de la enzima.

En el sentido catabólico de la reacción se calculó  $V_{max}^c$  (velocidad máxima catabólica) en la forma habitual, a partir de los datos de velocidad inicial, de una serie a diferentes concentraciones de  $GlcNH_26P$ . En el sentido biosintético, se realizaron medidas de velocidad a diferentes concentraciones de  $NH_4Cl$  y  $Fru6P$ , en ausencia de  $GlcNAc6P$ . Las intersecciones en el eje vertical, en las correspondientes gráficas de dobles recíprocos, se regraficaron en función de la inversa del otro sustrato variado a distintos valores fijos. De esta forma se obtuvieron dos velocidades máximas, aproximadamente iguales. Se consideró como  $V_{max}^b$  (velocidad máxima en sentido biosintético) a la media de ambos valores (figura No. 10).

En las condiciones experimentales, los valores obtenidos fueron:  $V_b = 5$  nmoles / min;  $V_c = 52$  nmoles / min . La concentración de la enzima fué de  $0.35$  ug / ml , lo que equivale a aproximadamente  $1.96$  nmoles / ml . La actividad molecular, es decir el cociente entre la velocidad máxima y la concentración de la enzima, puede calcularse y resulta ser de --  $44.2$  / seg para el sentido catabólico y  $4.25$  / seg para el sentido biosintético.

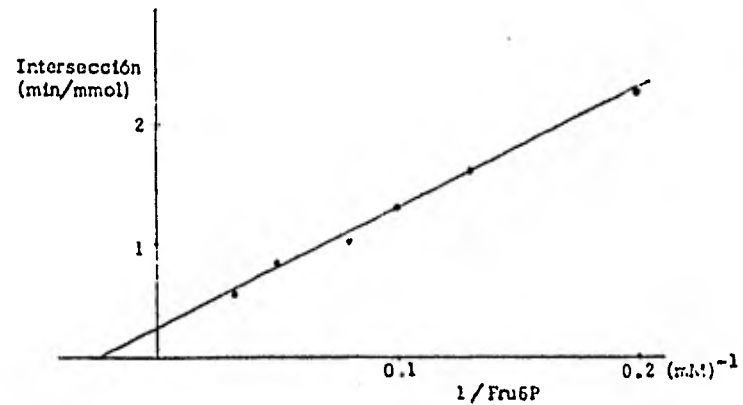
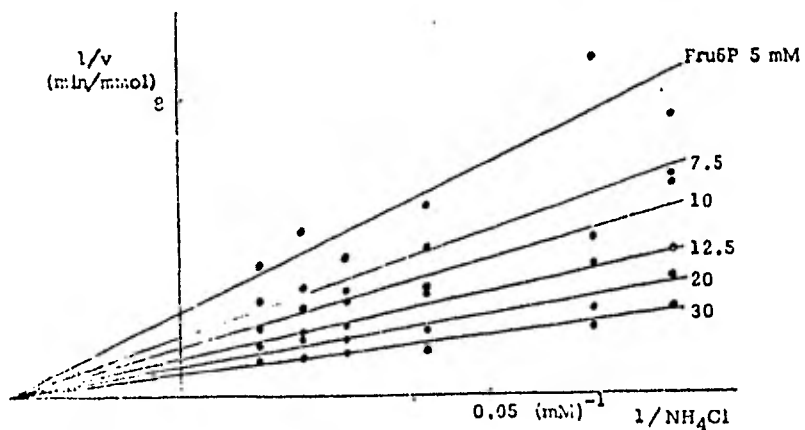
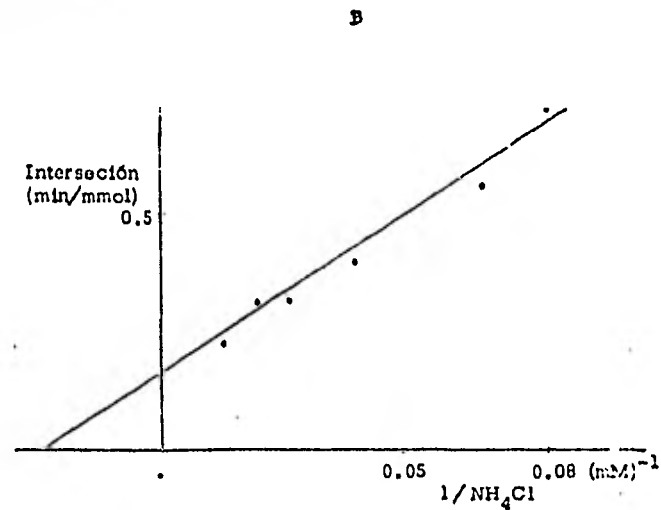
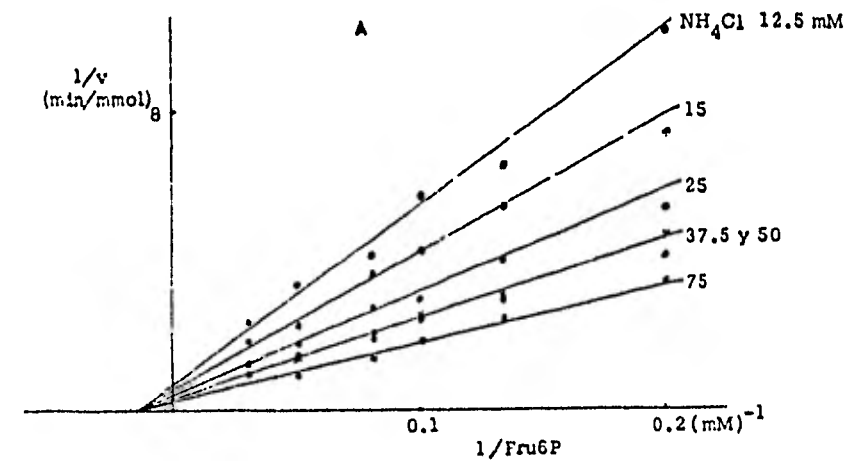


Figura No. 10.- Cálculo de la  $V_b$  (velocidad máxima en sentido biosintético). Se realizaron medidas de velocidad a 6 diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y a 5 diferentes concentraciones de Fru6P en ausencia de GlcNAc6P, obteniéndose los patrones de la figura A. Las intersecciones en el eje vertical, se regraficaron en función de la inversa del otro sustrato, variado a distintos valores fijos (figura B). Se obtuvieron dos velocidades máximas, las cuales se promediaron para determinar la velocidad máxima en sentido biosintético.

### 8.8.- Experimentos en equilibrio.

En la figura No. 11 se muestra el perfil de elución de dos experimentos de filtración en equilibrio, de acuerdo a la técnica de Hunmel y Dreyer (29), en la que se utilizó Fru6P marcada con  $^{14}\text{C}$ , en la forma en que se describe en la sección de materiales y métodos. En un experimento, estando la columna equilibrada con Fru6P no se detectó la aparición de un pico positivo coincidente con el pico de proteína, seguido de un pico negativo. Cuando se agrega al sistema el sustrato alternativo, el cloruro de metilamonio 50 mM, se puede observar en cambio un perfil de elución que revela la captación de la marca radiactiva por la enzima. Este sustrato presenta con la enzima una  $V_{\text{max}}$  aproximadamente 10 veces menor que con el sustrato natural  $\text{NH}_3$ , pero para el cual muestra un valor aproximadamente igual de  $K_m$ . En este caso, el pico positivo corresponde al volumen de exclusión y contiene la enzima; éste, es seguido por un pico negativo, de aproximadamente igual área, dentro del error experimental.

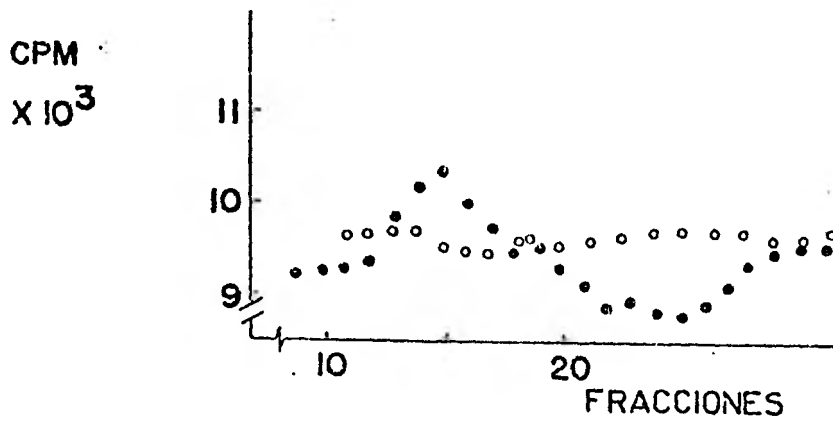


Figura No. 11.- Perfil de elución de dos experimentos de filtración en equilibrio. Se usó una columna de 4 x 65 mm empacada con Sephadex G-25, equilibrada con  $\text{vrta-HCl}$  40 mM pH 7.25, GlicilAc6P 1 mM y Fru6P 0.1 M. Los experimentos se realizaron a 21°C. El eluyente fué recojido en gotas por separado en diferentes viales desechables con mezcla para medidas de centelleo. (ver material y métodos).

## 9.- DISCUSION.

La mayoría de los estudios se realizaron en condiciones de cinética de Michaelis, aboliendo la cooperatividad con exceso de GlcNAc6P, modulador alostérico positivo de la glucosamina 6-fosfato isomerasa (desaminasa).

Observaciones preliminares sobre el comportamiento alostérico de esta enzima (18), indican que en el sentido catabólico, se puede ajustar la ecuación para la fijación exclusiva del ligando que presenta cooperatividad; en este caso, la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ . Esto significa, que es aplicable el modelo restringido de Wyman, Changeux y Monod, en el cual se supone que uno de los conformeros de la proteína, la forma denominada R (relajada), tiene afinidad por el ligando, mientras que la otra forma, denominada T (tensa), carece de capacidad ligante con respecto a dicha molécula. El hecho de que la saturación de GlcNAc6P o por lo menos el agregado de una concentración igual a aproximadamente 10 veces la correspondiente constante, dé lugar a una cinética perfectamente hiperbólica, es una indicación de que existe fijación exclusiva también del modulador positivo. Este resultado se aprecia en la gráfica de la figura No.4, en la que se representa el valor del coeficiente de Hill (h), en función de la concentración de GlcNAc6P. En esta gráfica, se aprecia que al aumentar la concentración de GlcNAc6P, el valor de h se aproxima sen-



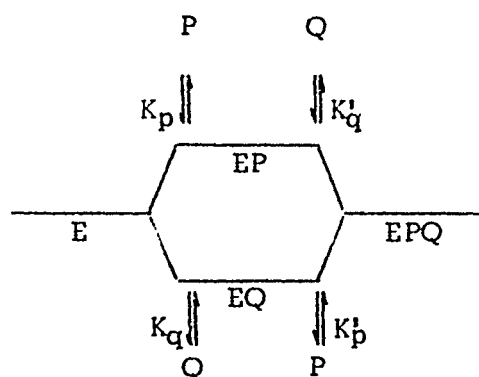
siblemente a la unidad, lo que indica la desaparición de la cooperatividad. Fué en base a esta información que se escogieron los valores de concentración de modulador positivo utilizados en los experimentos realizados bajo condiciones de cinética hiperbólica o de Michaelis. En el sentido catabólico de la reacción, no existe en principio ningún inconveniente en utilizar un exceso de modulador positivo. En sentido biosintético, en cambio, el único método de medida de la reacción enzimática de que disponemos, se basa en la cuantificación colorimétrica de la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  formada, por medio del procedimiento de Reissig y Leloir (25). En éste o en una gran variedad de técnicas relacionadas, se cuantifica el aminoazúcar, previa acetilación con anhídrido acético en solución alcalinizada con bicarbonato de sodio; se forma entonces  $\text{GlcNAc6P}$ , compuesto que da la reacción colorida de Elson y Morgan, con el p-dimetil amino benzaldehído en solución acética. La presencia de  $\text{GlcNAc6P}$  en nuestras mezclas de reacción para el estudio del sentido biosintético constituye por la tanto una interferencia. Sin embargo, la concentración utilizada de 0.12 mM puede ser compensada adecuadamente si se incluyen en cada serie, los correspondientes blancos que contienen la mezcla de reacción, pero a los que no se les agrega enzima. En estas condiciones de cinética de Michaelis, realizaron estudios de velocidad inicial en ambos sentidos de la reacción. Las técnicas para las mediciones de velocidad fueron de dos tipos, uno de ellos, consistió en la

monitorización continua de la formación del  $\text{NH}_3$ , en el sentido catabólico de la reacción, mediante el uso del sistema acoplado de la glutamato deshidrogenasa. Los otros dos métodos, pertenecen al tipo denominado a tiempo fijo, en los cuales se mide la cantidad formada de Fru6P o de  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ , en un tiempo fijo predeterminado. En estos procedimientos, es necesario controlar que el tiempo de reacción no sea tal que la reacción se exceda de aproximadamente el 5% de su grado de avance. El conocimiento de la constante de equilibrio permite verificar si las lecturas de absorbancia en una serie dada, exceden o no de éste límite. Los experimentos que no cumplieron este requisito, fueron descartados, aunque en muchos casos es posible introducir la corrección de los valores de velocidad tomando en cuenta el grado de avance, para calcular velocidades iniciales. Este procedimiento ha sido descrito por Lee y Wilson (38) y utilizado en este trabajo solo ocasionalmente.

La medida de la formación de la Fru6P mediante un sistema de dos enzimas acopladas, la glucosa 6-fosfato isomerasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, ha sido descartada por su mayor complejidad y costo. En el sentido biosintético, es teóricamente posible desarrollar un método de monitorización continua basado en el hecho de que la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ , actúa como sustrato alternativo de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (15); de

esta manera sería posible seguir la reacción por la formación de NADH. Sin embargo, el  $K_m$  para el sustrato alternativo es muy elevado y resulta prácticamente imposible eliminar los periodos de latencia.

El estudio de los patrones de velocidad inicial en sentido biosintético (figura No.6), revela un comportamiento perfectamente simétrico con haces intersectantes en el eje de las abscisas. Este patrón corresponde a un mecanismo secuencial, en el cual basta con dos constantes relacionadas con los sustratos y una velocidad máxima para describir la variación de la velocidad de la reacción en función de la concentración de los sustratos. La absoluta independencia del  $K_m$  aparente para uno de éstos, con respecto a la concentración del otro, podría interpretarse como consecuencia de un sistema de adición al azar de este tipo:



en el cual, la afinidad de cada ligando no es modificada por la presencia del otro sobre la superficie de la enzima (constantes  $K$  iguales a constantes  $K'$  en el esquema). Sin embargo, como

ha hecho notar Cleland (17), estos resultados, si se interpretan en términos del estado estacionario, no permiten ni afirmar ni descartar un mecanismo secuencial al azar. La ecuación de velocidad inicial (en ausencia de productos) para una reacción bi- reactante es:

$$v = \frac{V_{max} P Q}{K_{iQ} K_p + K_q P + K_p Q + P Q} \dots\dots\dots(1)$$

Del análisis de esta ecuación resulta evidente, que el haz de rectas se entrecruza por arriba del eje de las abscisas si  $K_{iQ}$  es mayor que  $K_q$  y viceversa. La posición vertical del punto de corte depende solo de la relación  $K_{iQ} / K_q$  y carece de valor diagnóstico en lo que se refiere al mecanismo. "La igualdad entre estas constantes relacionadas con el sustrato Q es un hecho puramente fortuito, independiente del mecanismo cinético y no debe tomarse en cuenta como una evidencia al azar" (17). El sistema es perfectamente simétrico y lo que se acaba de mencionar implica necesariamente que en nuestro sistema  $K_{iQ} = K_q$ . De esta forma, no es posible establecer si el  $NH_3$  y la Fru6P se unen a la enzima al azar o en forma ordenada y si fuese éste último lo correcto cuál sería Q (primer sustrato ligado o último producto liberado) y cuál P. La ecuación que describe estos resultados, en ausencia de productos en el sentido biosintético es:

$$v = \frac{V_{max} P Q}{K_q K_p + K_q P + K_p Q + P Q} \dots\dots\dots(2)$$

El único producto que puede manifestarse cinéticamente en nuestro sistema, es la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ , ya que el otro producto formado en la reacción es el agua.

El valor diagnóstico de estos patrones resulta limitado. La aparición de haces convergentes, permite descartar la existencia de mecanismos en los que se alternan dos formas estables de la enzima (mecanismos de doble sustitución o "ping pong"). Pero por otra parte, este tipo de mecanismos resulta excluido a priori, por la naturaleza de la reacción química que cataliza la enzima; además el carácter simétrico de la cinética observada, permite excluir ciertos tipos de mecanismos especiales que dan cinéticas que se expresan por ecuaciones asimétricas con respecto a los dos sustratos; este es el caso del mecanismo denominado de equilibrio rápido ordenado (39).

Cuando se estudia la reacción en el sentido catabólico, en presencia de Fru6P y  $\text{NH}_3$  (éste último agregado como  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) es necesario obtener una ecuación de velocidad que incluya los tres ligandos (suponiendo que la concentración del agua es igual a la unidad), las dos velocidades máximas y la constante de equilibrio. De esta forma, podemos plantear una ecuación para un sistema Bi-seudo Uni reactante secuencial. La ecuación de velocidad correspondiente, en presencia de productos, denominando como siempre P al primer producto liberado y Q al segundo,

será la siguiente (39) :

$$v = \frac{V_c A - \frac{P Q}{K_{eq}}}{K_a + A + \frac{V_c K_q P}{V_b K_{eq}} + \frac{V_c K_p Q}{V_b \cdot K_{eq}} + \frac{A P}{K_p} + \frac{V_c P Q}{V_b K_{eq}}}$$

que también puede escribirse:

$$v = \frac{V_b (P Q - A K_{eq})}{\frac{V_b K_a K_{eq}}{V_c} + \frac{V_b A K_{eq}}{V_c} + K_q P + K_p Q + \frac{V_b A P K_{eq}}{V_c K_p} + P Q}$$

En este caso, se han utilizado sólo tres constantes, relacionadas cada una con el respectivo sustrato ( o producto ),  $K_a$ ,  $K_p$  y  $K_q$ . En un sistema Uni Bi, secuencial ordenado, analizado en base al estado estacionario (39), se requieren normalmente cuatro constantes, pero como ya se ha mencionado, el análisis de velocidades iniciales en sentido biosintético en ausencia de producto - demuestra que en nuestro caso particular, bastan sólo tres, ( $K_a$ ,  $K_p$  y  $K_q$ ) ( ecuación N . 2 ). También las dos ecuaciones de Haldane, que se describen para este mecanismo (39), se reducen a una sola, que tiene la siguiente forma:

$$K_{eq} = \frac{V_c K_q K_p}{V_b K_a} \dots\dots\dots(5)$$

$K_{eq}$  definida como  $(GlcNH_26P) / (Fru6P)(NH_4Cl) ,(H_2O) = 1$  .

Para analizar el efecto de inhibición por productos, se utilizan las expresiones (3) y (4), en las que se hace la concentración del producto que no se ensaya y está ausente, igual a cero . La  $K_{eq}$

se elimina mediante la ecuación de Haldane.

La validez de la ecuación de Haldane, queda puesta en evidencia, mediante los experimentos de velocidades iniciales en sentido biosintético, en ausencia de productos, del tipo de los que se muestran en la figura No. 6. Cuando se utiliza una misma dilución de enzima, preparada en las mismas condiciones y en la misma jornada de trabajo, a los efectos de anular las posibles variaciones de la concentración de enzima activa, se puede aplicar la ecuación No.(5) a éstos resultados, Con este fin se calcularon los valores de  $V_c$  y  $V_b$ . La primera de estas velocidades máximas se obtuvo mediante un experimento en sentido catabólico, en el que se varió la concentración de  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ , obteniendo los parámetros cinéticos en la forma descrita.

En sentido biosintético, los datos de  $V_c$  se obtienen por regráficoado de las intersecciones de las gráficas de dobles recíprocos correspondientes a experimentos del tipo de los que se muestran en la figura No. 10. En este caso, se obtienen dos valores de  $V_b$  (muy semejantes) uno en cada regráficoado, los cuales se promediaron para obtener el valor de  $V_{\text{max}}$  en el sentido biosintético. Los valores obtenidos fueron:  $V_b = 5.0$  nmoles/min,  $V_c = 52$  nmoles/min; utilizando los valores de las constantes (pH 7.7. a  $30^\circ\text{C}$ )  $K_{\text{GlcNH}_2\text{6P}} = 3$  mM,  $K_{\text{NH}_4\text{Cl}} = 30$  mM y  $K_{\text{Fru6P}} = 4$  mM, obtenidos en las mis-

mas series en las que se calcularon las  $V_{max}$ , se obtiene un valor de  $K_{eq} = 2.27 \times 10^5$   $K_{eq}$  definida en sentido biosintético:  $K_{eq} = (\text{GlcNH}_2\text{6P}) / (\text{Fru6P})(\text{NH}_4\text{Cl})$ .

Si se convierte  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en  $\text{NH}_3$  en base a la ecuación de Henderson y Hasselbach, tomando un  $pK_a$  de 9.3 para el  $\text{NH}_4^+$ , la constante de equilibrio coincide con el valor experimental que hemos reportado. Este resultado nos confirma la validez de Haldane propuesta. En consecuencia podemos utilizarla para expresar en otra forma la ecuación (3), con la finalidad de analizar el efecto de la inhibición por productos, de esta manera, se considera el sistema en sentido catabólico en presencia de uno de los productos (P o Q), haciendo la concentración del otro, igual a cero. La  $K_{eq}$  se elimina mediante la ecuación de Haldane; tenemos así para Q como inhibidor:

$$v = \frac{V_c P}{K_a \left(1 + \frac{Q}{K_q}\right) + A} \dots\dots\dots(6)$$

y para P como inhibidor :

$$v = \frac{V_c P}{\left(1 + \frac{P}{K_p}\right) (K_a + A)} \dots\dots\dots(7)$$

Se observa que Q, el último producto liberado, en sentido catabólico (o primer sustrato ligado en sentido biosintético) es un inhibidor competitivo, mientras que P, es un inhibidor no com-



petitivo. En nuestro caso particular la inhibición es de tipo no competitiva clásica en la cual el punto de corte de los haces de rectas en las gráficas de dobles recíprocos, se encuentran en el eje de las abscisas y con constantes de inhibición idénticas a las correspondientes de Michaelis.

La inhibición que muestra la ecuación (7), es muy poco frecuente; las inhibiciones no competitivas que se observan predominantemente, muestran un término en el denominador del tipo  $(1 + I / K_i)$  que multiplica al valor del  $K_m$  y a la concentración de sustrato en el denominador. En cada caso, el valor de  $K_i$  suele ser diferente del punto de corte de los haces de rectas. En las gráficas como la de la figura (7), suele encontrarse por encima o por debajo de las abscisas, según sea mayor o menor que la unidad, el cociente entre estas dos constantes.

Nuestros resultados son una consecuencia de lo que se ha deducido en base a los patrones de velocidad inicial (figura No. 6) y de la correspondiente ecuación de velocidad (2), en la que no aparecen constantes de inhibición.

Los resultados que se muestran en la figura (7) indican que  $Q = \text{NH}_3$  y  $P = \text{Fru6P}$ ; la coincidencia entre los valores de las constantes de inhibición y las correspondientes de Michaelis, resulta también evidente. Estos resultados permiten descartar un mecanismo al azar, en el cuál, ambos ligandos,  $\text{NH}_3$

y Fru6P pueden formar complejos binarios con la enzima .

Otro estudio de inhibición por producto, que se podría plantear para este sistema, es el correspondiente en sentido biosintético. En este caso, existe un solo producto, que es el utilizado para la medición de la velocidad de reacción. La obtención de los patrones de inhibición de la reacción biosintética por GlcNH<sub>2</sub>6P (con respecto a la Fru6P y al NH<sub>3</sub>, podría dar información complementaria valiosa. Sin embargo, esto no resulta técnicamente posible, ya que en los experimentos de este tipo habría que medir las velocidades de reacción por el consumo de uno de los sustratos en este sentido (NH<sub>3</sub> o Fru6P), ya que el sistema contendría un exceso de producto (GlcNH<sub>2</sub>6P) cuya inhibición se trata de investigar. Los valores elevados del Km para los sustratos del sentido biosintético, hacen imposible este enfoque. A su vez, la medida de la formación de GlcNH<sub>2</sub>6P en presencia de un exceso de la misma sustancia, no resulta factible. En este caso, dado el valor de la constante de Michaelis para el aminoazúcar fosfato, habría que detectar mínimos incrementos en su concentración y los resultados adolecerían de un error considerable.

Como es de esperar, los sustratos alternativos, metilamina, hidrazina e hidroxilamina, dan el mismo patrón de inhibición que el NH<sub>3</sub>. El uso de sustratos (o productos), alternativos de este tipo constituye además, una interesante herramienta para

el análisis de los mecanismos cinéticos (40). El procedimiento se basa en la obtención de los parámetros cinéticos para el sustrato o producto natural y el sustrato o producto alternativo por separado. Este procedimiento ha sido utilizado por Wong y Hanes (41), y se necesita de un método analítico que discrimine entre los dos productos o sustratos en cuestión. En nuestro caso, no disponemos de métodos espectrofotométricos adecuados para realizar un estudio cinético, que nos permita discriminar entre la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$  y el N-metil derivado, posible producto de la reacción entre la Fru6P y la metilamina. Tampoco es posible medir la oxíma de la Fru6P (posible producto de la reacción entre la Fru6P y la hidroxilamina), ya que la hidroxilamina presente interfiere con el método analítico utilizado para la medida de la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ . Los productos alternativos correspondientes a estos sustratos, no han sido estudiados sistemáticamente y quedà aún por realizarse su identificación precisa.

El manejo de inhibidores competitivos con respecto a los sustratos en el sentido en el que la reacción es birreactante, permite también realizar experimentos que confirmen o descarten el esquema de adición ordenado que se propone para este mecanismo secuencial. En nuestro caso, deberíamos de disponer de por lo menos un inhibidor competitivo con respecto a la Fru6P y otro con respecto al  $\text{NH}_3$ . En este caso, sería aplicable el aná

lisis que propone Fromm (42). Sería de esperar que cuando el inhibidor competitivo con respecto a la Fru6P se estudiase en función de la concentración de  $\text{NH}_3$ , diese un patrón de tipo no competitivo, mientras que un inhibidor competitivo con respecto al  $\text{NH}_2$  será no competitivo con respecto a la Fru6P. Al no disponer de inhibidores con estas características, no ha sido posible buscar la confirmación de nuestro esquema de adición ordenado por este camino. Se buscó entonces, otro procedimiento de confirmación, basándose en la existencia de un inhibidor competitivo, que forma un complejo sin salida con la enzima, en lugar de la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ , que es la sorbitolamina 6-fosfato ( $\text{SNH}_2\text{6P}$ ). En el caso que nos ocupa, cuando se estudian los patrones de inhibición de la reacción en sentido biosintético en presencia de distintas concentraciones fijas de  $\text{SNH}_2\text{6P}$ , se encuentra que este inhibidor dá patrones de tipo competitivo con respecto al  $\text{NH}_3$  y no competitivo con respecto a la Fru6P. Estos resultados que se muestran en la figura (8), confirman la existencia de un complejo binario  $\text{E-NH}_3$ , cuya formación es excluyente con la del complejo  $\text{E-SNH}_2\text{6P}$ . De esta forma, por otro medio, comprobamos que el  $\text{NH}_3$  se une directamente a la enzima, formando un complejo binario. El patrón obtenido con respecto a la Fru6P, es incompatible con la existencia de un complejo  $\text{E-Fru6P}$ , que coexistiría con el anterior, sólo si se tratase de un mecanismo de adición al azar y se manifestaría por un patrón de inhibición de la  $\text{SNH}_2\text{6P}$  con respecto a la

Fru6P , también competitivo.

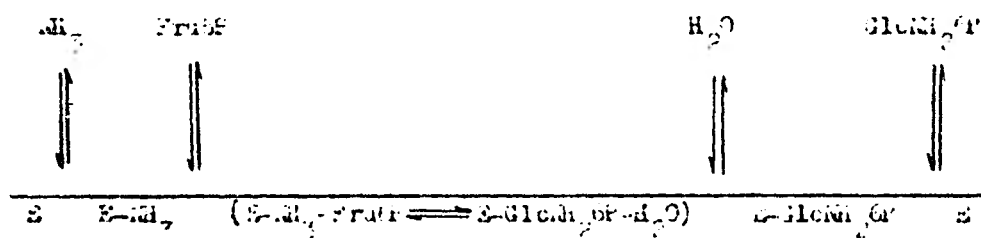
Aún no se ha investigado la existencia o no de modificación del patrón de inhibición competitivo de la  $\text{SNH}_2\text{6P}$  con respecto al  $\text{NH}_3$  , a Fru6P saturante. En la práctica esta saturación es inalcanzable , pero se puede estudiar la variación de los  $K_i$  en función de la concentración del sustrato fijo (Fru6P) . Es evidente que de acuerdo a los resultados obtenidos , es de esperar que esta modificación no exista. Interesa también ver la modificación de la inhibición con respecto a la Fru6P , a diferentes concentraciones fijas de la sal de amonio. Se comprueba que la inhibición disminuye a medida que aumenta ésta , pero dado el elevado valor de la correspondiente constante , es necesario utilizar concentraciones que producen una fuerza iónica - tal que puede interferir con las propiedades ligantes de la enzima y generar efectos inespecíficos.

En la figura (11) se muestran los experimentos en equilibrio realizados con la técnica de filtración-equilibrio en columna de Sephadex G-25 , desarrollada por Hummel y Dreyer (29). Si el mecanismo es al azar , deben existir dos complejos binarios ,  $\text{E-NH}_3$  y  $\text{E-Fru6P}$  . En los círculos abiertos , se representa la elución de una columna equilibrada con Fru6P marcada con  $^{14}\text{C}$  . Se colocó una muestra de enzima y se eluyó con el medio de equilibración ; no se observó ninguna alteración en el nivel de

la marca radioactiva, lo que indica que no se detecta complejo binario E-Fru6P. Cuando la columna es equilibrada con un medio igual al anterior, pero que también tiene metilamina (sustrato análogo del  $\text{NH}_3$ ), se obtiene un pico positivo, seguido de uno negativo por debajo de la línea de base. Esto revela que la Fru6P, que es la marca radioactiva, se fija a la enzima, pero sólo en presencia de metilamina y confirma la existencia del postulado complejo terciario E-MA-Fru6P. Esto indica que se trata de un mecanismo secuencial ordenado, en el que el orden obligatorio es el de el  $\text{NH}_3$  primero y la Fru6P después. Se utilizó el sustrato análogo, dado que tiene una velocidad máxima mucho menor que el sustrato natural  $\text{NH}_3$  y se trabajó a  $4^\circ\text{C}$  porque el complejo terciario no es estable ya que es el complejo central de la secuencia catalítica.

## 10.- CONCLUSIONES.

Los resultados precedentes constituyen un conjunto de evidencias que apoyan un mecanismo secuencial en el que el  $\text{NH}_3$  es el primer sustrato ligado ó último producto liberado:



El agua no se manifiesta en este tipo de experimentos, pero su ubicación en la secuencia surge de los experimentos - sobre el mecanismo químico de la reacción, de Midelfort y Rose.

Una verificación de nuestros datos proviene de la coincidencia de las constantes de los experimentos de inhibición por productos, con las correspondientes  $K_m$ , tal como lo predice el tipo particular de patrón de velocidades iniciales intersectantes en el eje de las abcisas (gráficas de -doubles recíprocos. Para este caso sólo existe una relación de Haldane, la cual se verifica también con nuestros datos de constantes cinéticas y de equilibrio.

Estos resultados concluyen también, la existencia de

complejos improductivos E-NH<sub>3</sub>-GlcNH<sub>2</sub>6P y E-Fru6P-GlcNH<sub>2</sub>6P (o su análogo, E-Fru6P-SNH<sub>2</sub>6P). Además, este último complejo abortivo daría lugar a una inhibición no competitiva - por sustrato (Fru6P) en el sentido biosintético, lo cual no se detecta. Por otra parte, estos complejos resultan estructuralmente poco probables, si se considera un sitio activo con grupos ligantes para una función éster fosfato y para un grupo amino, no duplicados en el mismo dominio.

Nuestros resultados tampoco hacen necesario introducir otras complejidades en el mecanismo cinético, como por ejemplo isomerizaciones.

La existencia de un complejo binario, formado entre el sustrato NH<sub>3</sub> y la molécula de enzima, que surge como consecuencia de nuestros resultados experimentales, plantea una importante dificultad desde el punto de vista del mecanismo químico de la reacción catalizada por esta enzima.

Es concebible que el NH<sub>3</sub> se una a su sitio ligante sobre la superficie de la enzima, a través del par de electrones no compartidos, ya que son éstos los que le confieren capacidad de enlace. Dado que son también los que le confieren reactividad, la unión del NH<sub>3</sub> a la enzima bloquearía su capacidad de reacción como reactivo nucleofílico. El mecanismo de la figura (2), implica que el NH<sub>3</sub> ataque como



nucleófilo al carbono carbonílico de la forma abierta de la Fru6P. Si bien este mecanismo de reacción es hipotético, la naturaleza de los productos de reacción, lo hacen el más - verosímil. Los experimentos en los que se emplean como sustratos análogos la hidrazina (35) o la hidroxilamina, también constituyen evidencias a favor de que en la secuencia catalítica, existe un ataque nucleofílico al carbono 2 de la Fru6P.

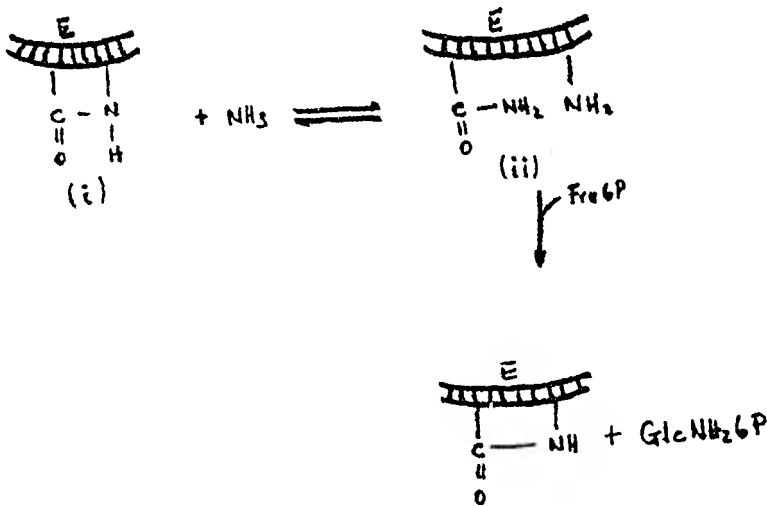
Un posible grupo funcional en el sitio activo capaz de ligar un  $\text{NH}_3$ , o sus análogos (metilamina, hidrazina e hidroxilamina) o al grupo  $-\text{NH}_2$  sustituyente en el carbono 2 de la  $\text{GlcNH}_2\text{6P}$ , podría ser, una función carbonilo. En los mecanismos químicos es frecuente encontrar reacciones enzimáticas basadas en un ataque nucleofílico a un carbono carbonílico. Sin embargo, dado que no existe ningún aminoácido - o derivado de aminoácido natural que contenga esta función, el mecanismo que mencionamos tiene lugar sólo cuando el grupo  $\text{C}=\text{O}$  pertenece al sustrato, como en el conocido caso de la reacción catalizada por la fructosa difosfato-aldolasa, o bien cuando al carbonilo se localiza en el grupo prostético, como en las enzimas que utilizan piridoxal fosfato. En nuestra enzima no se ha detectado la existencia de un grupo prostético y la composición de aminoácidos, explica por completo la masa molecular. Ni el espectro de la enzima ni el estudio de sus productos de hidrólisis ácida, permiten suponer

la existencia de otro componente en su estructura , que no sean los aminoácidos .

De esta forma , la existencia de una unión entre el  $\text{NH}_3$  y un posible grupo carbonilo para dar una imina (o una base - de Schiff, en el caso de la metilamina), debe descartarse como posible estructura del complejo binario. Esto nos lleva a plantear la existencia de una unión a un grupo carboxilo de un residuo de aminoácido dicarboxílico , en forma de amida.

De acuerdo a estos resultados y a los nuestros , - consideramos que el  $\text{NH}_3$  debe fijarse a la enzima en una - forma que pueda readquirir sus propiedades de nucleófilo en el complejo ternario (complejo central o de Michaelis ,  $\text{E-NH}_3\text{-Fru6P}$ ). Una posible estructura del sitio del  $\text{NH}_3$  , podría con tener una amida cíclica, formada por un grupo carboxílico de un glutámico o aspártico con un grupo épsilon amino de - una lisina (i) (ver esquema). Esta unión amida sería rota por - la entrada de un  $\text{NH}_3$  en una reacción perfectamente rever- sible (ii). La entrada de la Fru6P en un sitio próximo del domi - nio del sustrato daría lugar a una reacción de tipo concer- tado, en la que el  $\text{NH}_3$  reaccione como nucleófilo desde su posición ligada. Nuestras observaciones en el sentido de que la metilamina puede actuar como sustrato de esta enzima, pue den explotarse para intentar un marcado del sitio activo para

el  $\text{NH}_3$  mediante el uso de  $^{14}\text{C}$ . La reversibilidad de la reacción (i); podría evitarse mediante la desnaturalización instantánea de la enzima, que alejaría al  $-\text{NH}_2$  libre, de una posible lisina, como consecuencia de la pérdida de la estructura.



## 11.- PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES.

El programa de trabajo que proponemos a continuación, - busca completar el estudio del mecanismo cinético y al mismo tiempo obtener datos sobre la estequiometría de los sitios, que permitan avanzar en el área estructural .

### 11.1.- Técnicas de filtración-equilibrio en Sephadex G-25.

Ya hemos incursionado en esta metodología pero en condiciones poco favorables. La imposibilidad de lograr un complejo ternario estable mediante el uso de inhibidores competitivos , nos ha impedido utilizar esta técnica para el cálculo de las constantes de relaciones de estequiometría. Es importante - en consecuencia, continuar la búsqueda de alguna amina que pueda funcionar como competidor del sitio del  $\text{NH}_3$ . Las hidrazinas se han estudiado sistemáticamente pero no se ha encontrado el compuesto adecuado. Sin embargo, la reacción de la Fru6P con la hidrazina , que forma la hidrazona de la Fru6P , ha dado lugar a una interesante derivación de este trabajo, - además de un nuevo método para monitorizar la reacción en el ultravioleta. En caso de obtener este inhibidor, se podrán llevar a cabo los experimentos de equilibrio ya mencionados y la investigación del patrón de inhibición de dicho compuesto con respecto a la Fru6P . Este es el único aspecto accesible del

análisis de Fromm, pero sería útil para confirmar nuestros resultados.

#### 11.2.- Técnicas para titulación con ligandos.

Se propone utilizar un diseño experimental basado en la técnica de titulación de la proteína con sustratos, inhibidores y otros ligandos, basada en la medida del apagamiento de su fluorescencia (43, 44, 45). Estos experimentos pueden confirmar nuestra hipótesis sobre el mecanismo cinético, pero también proporcionarán constantes termodinámicas y datos estequiométricos, éstos últimos muy importantes para la evolución futura del trabajo.

Una previsible dificultad provendrá, una vez más, de la baja afinidad de la enzima por el  $\text{NH}_3$  y sus análogos. No se podrá por ejemplo, realizar una titulación de la proteína con Fru6P a  $\text{NH}_3$  saturante, que daría información en forma muy directa.

Si bien el manejo de esta técnica en cuanto a sustratos tendrá que ser semicuantitativa (existencia o no de interacción), esto basta para confirmar el mecanismo cinético. En cambio se dispone de dos ligandos muy adecuados para desarrollar todas las posibilidades cuantitativas de esta técnica, que

son la  $\text{SNH}_2\text{6P}$  ( $K_1 = 5 \times 10^{-3}$  mM) para el sitio activo y la  $\text{GlcNAc6P}$  ( $K_{eq} = 0.12$  mM) para el sitio alostérico. De esta forma, se hace posible establecer las relaciones de estequiometría correspondientes.

Otra dificultad podría provenir de la necesidad de conocer con precisión la concentración molar de la enzima y no tener presente enzima inactiva en el sistema. En este momento se dispone de un valor confiable del coeficiente de absorptividad molar de la enzima (por composición de aminoácidos) y de un procedimiento rápido y confiable para eliminar posibles formas inactivas de la enzima, que es la cromatografía de bioafinidad. La forma de conservación de la enzima que usamos actualmente (en glicerol al 50 %, con modulador alostérico e inhibidor, a  $-20^\circ\text{C}$ ) ha dado excelentes resultados.

Con este plan de trabajo, además de avanzar en información estructural, nos permite confirmar nuestra hipótesis sobre el mecanismo cinético, pero no es necesario continuar experimentando sobre este punto. En caso de que se obtuviesen resultados contradictorios con los anteriores, o que no se lograsen interpretar, se podría recurrir a la cinética de intercambio isotópico. A continuación se desarrolla un breve esquema de trabajo en base a este tipo de técnicas.

Una característica propia de las técnicas de cinética de intercambio de isótopos, es que el agua puede manejarse como un reactivo ya que pasa a ser un componente medible del sistema.

En nuestro caso, sería posible disponer de marcas en el carbono o en el fosfato del par Fru6P-GlcNH<sub>2</sub>6P y de marcas con tritio en éstos y en el agua. Lamentablemente, uno de los componentes, el NH<sub>3</sub> no puede ser marcado, lo cuál limita considerablemente las posibilidades del análisis.

Una dificultad propia de estos procedimientos, es la necesidad de disponer de técnicas rápidas y confiables para separar los componentes del par en el cual se estudia el intercambio. En el caso del par de hexosas fosfato, se trataría de procedimientos cromatográficos bastante laboriosos. Sólo se puede considerar en estos casos el uso de estos procedimientos sobre una base semicuantitativa.

Un experimento que podría permitir la diferenciación entre el mecanismo con Fru6P como primer ligando y el mecanismo con NH<sub>3</sub> con esta característica, es el de la medida del intercambio de una marca en el par Fru6P-GlcNH<sub>2</sub>6P en función de la concentración de NH<sub>3</sub>. Si el NH<sub>3</sub> es el primer ligando, no hay inhibición por alta concentración de NH<sub>3</sub>.

Midelfort y Rose (15), en su trabajo sobre el mecanismo químico de la reacción catalizada por esta enzima, hacen un experimento de intercambio de tritio entre la Fru6P y el agua con el fin de estudiar la etapa de enolización del complejo central. Concluyen que para que exista este intercambio, debe haber  $\text{NH}_3$  presente.

Las dificultades mencionadas y la posibilidad de lograr una demostración sólida del mecanismo cinético con otros procedimientos, nos inclinaron a dejar de lado las técnicas de intercambio.



12.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Catálogo de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica en Dixon M. y Webbs E.C. Enzymes, 3a. edición; -- Longmans (1980).
- 2.- Hodge J.E., Adv. Carbohydr. Chem. (1955)10, 169.
- 3.- Catálogo de enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica en Florkin M. y Slotz E., Comprehensive Biochemistry, Vol. 13. Elsevier (1969).
- 4.- Leloir L.F. y Cardini C.E., Biochim. Biophys. Acta (1956) 20, 33.
- 5.- Pattabiraman T.N. y Bachhawat B.K., Biochim. Biophys. Acta (1961) 54, 273.
- 6.- Nakada H.I. en Methods en Enzymology (1966) IX, 575. - Wood W.A. Academic Press, New York.
- 7.- Comb D.G. y Roseman S., J. Biol. Chem. (1958)232, 807.
- 8.- Bates C.J. y Pasternak C.A., Biochem. J. (1965) 96, 147.
- 9.- Benson R.L. y Friedman S., J. Biol. Chem. (1970) 245, 2219.
- 10.- Enhoter E. y Kress H., Dev. Biol. (1980) 78, 63.
- 11.- Imanaga I., J. Biochem. (Tokio) (1957) 44, 69.
- 12.- Veerkamp J.H., Arch. Biochem. Biophys. (1969) 129, 248.
- 13.- Sarvas M., J. Bacteriol. (1971) 105, 467.
- 14.- Wu H.C. y Wu T.C., J. Bacteriol. (1971) 105, 455.
- 15.- Midelfort C.F. y Rose I.A., Biochemistry (1977) 16, 1590.

- 16.- Cleland W.W., *Biochim. Biophys. Acta* (1963) 67, 104.
- 17.- Cleland W.W., en *The Enzymes* (1970) II, 1, Boyer P.D. - Academic Press, New York.
- 18.- Jasso J. Cantellano E. y Calcagno M. Comunicación a l XV congreso Mexicano de Química Pura y Aplicada.- - Rev. Soc. Mex. de Química.(1980)
- 19.- Suástegui J. Silva A. y Calcagno M. Comunicación a l XVI congreso Mexicano de Química Pura y Aplicada. Rev. Soc. Mex. de Química . (1981).
- 20.- Lackshmanan T.K. y Lieberman S., *Arch. Biochem. Biophys.* (1954) 53, 258.
- 21.- Leloir L.F. y Cardini C.E., en *Methods in Enzymology*(1962) V, 418. Colowick S. y Kaplan N.O. Academic Press, New - York.
- 22.- Roe J.H., *J. Biol. Chem.* (1934) 107, 15.
- 23.- Davis J.S. y Gander J.E., *Anal. Biochem.* (1967) 19, 72.
- 24.- McClure W.R., *Biochemistry* (1969) 8, 2782.
- 25.- Reissig J.L. Strominger J.L. y Leloir L.F., *J. Biol Chem .* (1955) 217, 959.
- 26.- Levvy G.A. y McAllan A., *Biochem. J.* (1959) 73, 127.
- 27.- Bucher T., *Biochim. Biophys. Acta* (1947) 1, 192.
- 28.- Bradford M.M., *Anal. Biochem.* (1976) 72, 248.
- 29.- Hummel J.P. y Dreyer W ., *Biochim. Biophys. Acta* (1962) 63, 530.

- 30.- Johansen G. y Lumry R., C.r. trav lab Carlberg (1961) 32, 530.
- 31.- Cornish Bowden A., Fundamentals of Enzymes Kinetics. -  
Butterworths London (1979).
- 32.- Lineweaver H. y Burk D.J., Amer Chem Soc(1934) 56, 658.
- 33.- Linewaver H., Burk D.J. y Deming W.E., J Amer Chem -  
Soc (1934) 56, 225.
- 34.- Hirs C.H.W., en Methods in Enzymology (1967) IX, 325.  
Wood W.A. Academic Press, New York.
- 35.- Wyman J., Adv ptein Chem (1948) 4, 407.
- 36.- Calcagno M., Regla J.I. y González de León G., Comunica-  
ción al VII Congreso Internacional de Biofísica y III Congreso  
Panamericano de Bioquímica. México (1981).
- 37.- Rippa M. (comunicación personal).
- 38.- Lee H.J. y Wilson I.B. Biochim Biophys Acta (1941) 242, -  
519.
- 39.- Segel I.H. Enzyme Kinetic, Wiley, New York (1975).
- 40.- Huang C.Y. en Methods in Enzymology (1979) 63, 486.
- 41.- Wong J.T. y Hanes C.S., Can J Biochem (1962) 40, 763.
- 42.- Fromm H.J., en Methods in Enzymology (1979) 63, 467.
- 43.- Grove T.H. Ishaque A. y Levy H.R., Arch Biochim Bio-  
phys (1976) 177, 307.
- 44.- Luisi P.L. Olomucki A. Baici A. y Karlovic D., Biochemis-  
try (1973) 12, 4110.
- 45.- Klotz I. M.; Walker F.M. y Pivan R.B., J Amer Chem Soc  
(1946) 68, 1486.

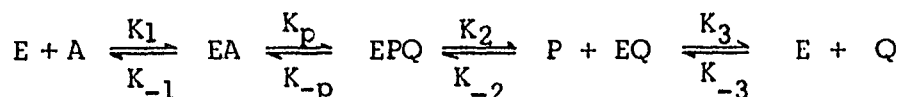
46.- Cantellano E., Tesis de licenciatura, ENEP Zaragoza UNAM  
( en preparación ).

47.- Suástegui J. Viveros R. Cantellano E. y Calcagno M., Co-  
municación al XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexi-  
cana de Bioquímica, Rev Soc Mex Bioq, Guadalajara (1982).

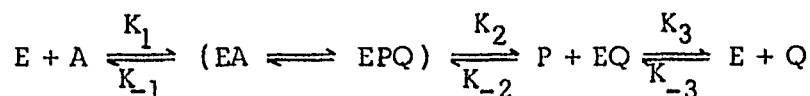
## 13.- ANEXOS.

13.1.- Derivación de la ecuación de velocidad por el método de King-Altman para el sistema ordenado Uni-Bi.

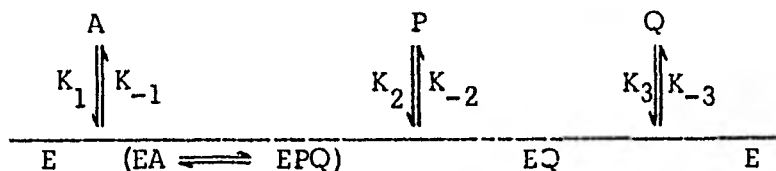
La reacción ordenada Uni-Bi puede ser escrita de la siguiente forma:



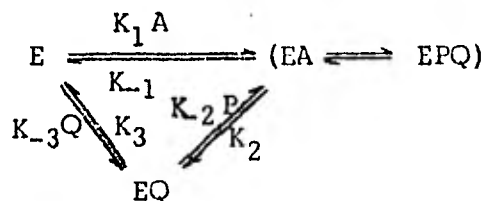
hay 4 especies enzimáticas: E, EA, EPQ y EQ. Sin embargo, puesto que el complejo central no tiene efecto sobre la forma final de la ecuación de velocidad, podemos combinar EA y EPQ como se muestra en la siguiente reacción:



o, en la notación Cleland:



Ahora, tenemos solamente 3 especies enzimáticas las cuales producen la figura básica de King-Altman mostrada abajo:



La distribución de las especies enzimáticas es obtenida de los patrones de interconversión de dos líneas:

$$\frac{E}{E_t} = \frac{K_{-2}K_{-1}P + K_3K_{-1} + K_2K_3}{\text{denominador}}$$

$$\frac{(EA + EPQ)}{E_t} = \frac{K_1K_{-2}AP + K_1K_3A + K_{-2}K_{-3}PQ}{\text{denominador}}$$

$$\frac{EQ}{E_t} = \frac{K_1K_2A + K_{-2}K_{-3}Q + K_{-1}K_{-3}Q}{\text{denominador}}$$

El denominador es igual a los 9 términos del numerador:

$$E_t = K_{-1}K_3 + K_2K_3 + (K_1K_3 + K_1K_2)A + K_{-1}K_{-2}P + (K_2K_{-3} + K_{-1}K_{-3})Q \\ + (K_1K_{-2})AP + (K_{-2}K_{-3})PQ.$$

La velocidad neta en el estado estacionario está dada por:

$$v = K_1(E)(A) - K_{-1}(EA + EPQ)$$

$$v = \frac{K_1(K_2K_3 + K_{-1}K_{-2}P + K_3K_{-1})(A)(E_t) - K_{-1}(K_{-3}Q + K_{-2}P +$$

$$+ K_1AK_{-2}P + K_3K_1A)E_t}{\text{denominador}}$$

agrupando los términos del denominador y simplificando el numerador:

$$\frac{v}{E_t} = \frac{K_1 K_2 K_3 (A) - K_{-1} K_{-2} K_{-3} (P)(Q)}{K_3 (K_{-1} + K_2) + K_1 (K_2 + K_3) (A) + (K_{-1} K_{-2}) (P) + \frac{K_{-3} (K_2 + K_{-1}) (Q) + K_1 K_{-2} (A)(P) + K_{-2} K_{-3} (P)(Q)}{}}$$

Cuando  $P = 0$  y  $Q = 0$ , después de dividir numerador y denominador por  $\text{Coef}_A$ , obtenemos la ecuación de velocidad en el sentido catabólico:

$$v = \frac{\frac{\text{num}_1}{\text{Coef}_A} A}{\frac{\text{const}}{\text{Coef}_A} + A} = \frac{V_{\text{max}} A}{K_a + A}$$

Cuando  $A = 0$ , obtenemos la ecuación de velocidad para la reacción en sentido biosintético:

$$v = \frac{\text{num}_2 P Q}{\text{const} + \text{Coef}_P P + \text{Coef}_Q Q + \text{Coef}_{PQ} PQ}$$

En nuestro caso particular:  $K_3 = K_{-1}$  y  $K_{-2} K_{-1} = 1$

por lo tanto:  $\text{Coef}_{PQ} = 1$ .

Como:  $\text{const} = K_3 (K_2 + K_{-1})$

y  $K_P K_Q = K_{-3} (K_2 + K_{-1}) (K_{-1} K_{-2}) = (K_{-3} K_{-2}) K_{-1} (K_2 - K_{-1}) =$

( 77 )

$$K_p K_q = a_{-1} (K_p + K_{-1}) = K_3 (K_p + K_{-1})$$

entonces :            const =  $K_p K_q$

y la ecuación se reduce a:

$$v = \frac{\text{num}_2 P Q}{K_p K_q + \text{Coef}_P P + \text{Coef}_Q Q + P Q} = \frac{V_b P Q}{K_p K_q + K_q P + K_p Q + P Q}$$



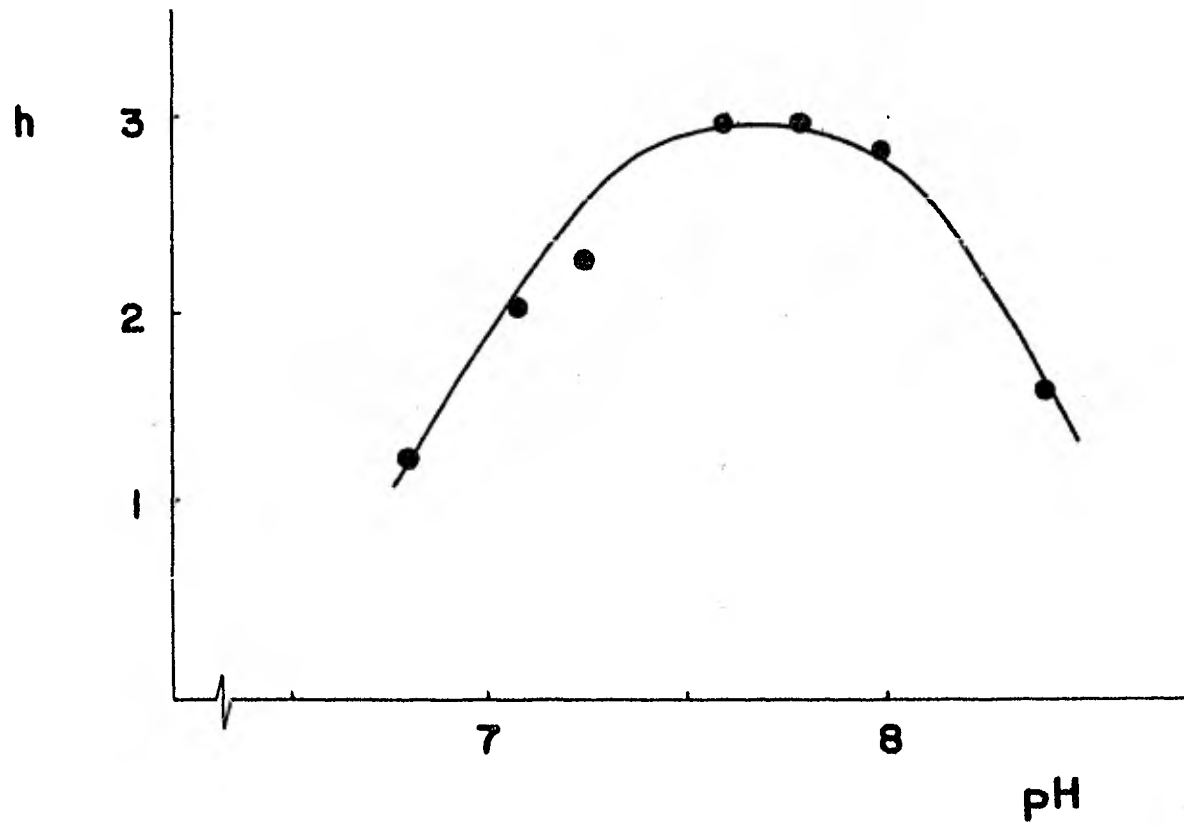
(7)

Espectro de Absorción de la enzima (papaína) (Cofactor:  $\text{Ca}^{++}$  (determinado)). Solvente:  $\text{H}_2\text{O}$ . Concentración:  $1.75 \text{ mg/ml}$  (para determinación por análisis de absorbencia).

SAMPLE	E-13	2.0 M <sub>2</sub> C	REFERENCE	M <sub>2</sub> C	PATH LENGTH	10	
$\lambda$ SPEED	58	mm <sup>2</sup> /s	%/s	20	CYCLE TIME	—	
$\lambda$	510	—	—	10	TEMP	60°C	
RECORD RANGE	1	0.5C	A-B.5	BANDWIDTH	1	DATE	12-14-65
				OPERATOR	ALC.SL		PIE PAPER FROM THE SHREVE

250

300



(72)

Variación del número de Hill (h) en función del pH.