

Laboratorio de Fisiología Animal
Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Sobre la purificación y propiedades de la cetohehexoquinasa hepática

por

J. M. Llinás y F. Ponz

(Recibido para publicar el 7 de junio de 1962)

Desde que LEUTHARDT y TESTA (11, 12) aislaron de hígado de rata un preparado que fosforilaba fructosa, sorbosa y tagatosa, sin fosforilar las aldohexosas, sugiriendo que con la fructosa el producto de la reacción era fructosa-1-fosfato, lo que fue luego confirmado (17), se han descrito fundamentalmente tres métodos para la purificación del enzima (4, 8, 13).

La enzima es una ATP : D-fructosa 1-fosfotransferasa (E.C. 2, 7, 1, 3,). El ADP que se forma inhibe a la enzima (13, 8, 9). El Mg^{++} es indispensable para la actividad y los cationes monovalentes son activadores. La velocidad de reacción es independiente del pH entre 5,5 y 7,8 (4). La enzima es relativamente estable al calor, se inhibe por metales pesados, pirofosfato y molibdato (8). El sustrato debe ser una cetosa en forma cíclica con el hidroxilo en C₂ orientado en posición L (8).

Nos propusimos establecer una técnica sencilla de purificación de la cetohehexoquinasa, que permitiera un grado de enriquecimiento conveniente y bien reproducible, para investigar algunas propiedades de la enzima.

Material y métodos

La actividad cetohehexoquinásica se ha determinado de acuerdo con la técnica de HERS (4, 5). Para la valoración de fructosa se ha seguido una modificación (6) a la técnica de ROE (15),

suprimiendo la hidrólisis previa de la solución standard de sacarosa, que se ha demostrado innecesaria. La misma reacción ha sido utilizada para la sorbosa.

El análisis de ATP se ha verificado determinando la proporción de fosfato lábil, según FISKE (3).

El nitrógeno proteico se ha determinado por micro-Kjeldahl (2), salvo para valoraciones de orientación en que se ha acudido a la turbidimetría (1).

La actividad enzimática se expresa en $\mu\text{g.}$ de fructuosa esterificada por mg. de N. proteico en 20 minutos a 37°C.

Resultados

I. Purificación de la cetohecoquinasa. — Inicialmente se ensayó sustituir en la técnica de HERS el segundo fraccionamiento con sulfato amónico a $\text{pH } 4,6$, que, con frecuencia, disminuye de modo notable el rendimiento, por un tratamiento térmico a 60°C con separación de proteínas inactivas. El pH más adecuado que se encontró para ello era el de $6,5$ y el enriquecimiento obtenido por este proceso fue de 1,5 veces, aproximadamente, sin apenas disminución de rendimiento. Se investigó también la aplicación de técnicas de adsorción sobre gel de fosfato cálcico (7). Se consiguió adsorción positiva de la enzima a $\text{pH } 5,5$ con elución posterior a $\text{pH } 6,2$, lo que permitía un enriquecimiento de hasta 3,3 veces, pero que resultó poco reproducible.

Intentos de fraccionamiento con etanol entre 0° y -5°C permitieron cierto enriquecimiento, aunque los riesgos de desnaturalización y la poca reproducibilidad lo hicieron desaconsejable.

La digestión con papaína produjo la simultánea destrucción de la enzima.

El fraccionamiento con metanol a -10°C que utilizan PARKS y col. (13) dio buenos resultados, aun cuando algo inferiores a los indicados por los autores.

Como consecuencia de los anteriores ensayos, se adoptó un método, basado fundamentalmente en el de PARKS, hasta después del primer fraccionamiento con metanol entre 40 y 70 %. Prescindimos del segundo fraccionamiento, que resultaba engorroso con nuestros medios de trabajo.

TÉCNICA: Material. — Hígado vacuno de animales recién sacrificados.

1. *Homogenado.* — Cortado el hígado en porciones pequeñas y lo más limpio posible de grasa y conjuntivo, se lava dos veces con agua helada y se homogenizan 500 g., durante 2-3 mi-

nutos, con 600 ml. de tampón de fosfato 0,15 M, pH 7,8, en batidora tipo Turmix.

2. *Desnaturalización a pH 4,5.* — El homogenado se ajusta a pH 4,5 con ácido acético 5 N e inmediatamente se eleva el pH a 5,5 con hidróxido sódico 2,5 N. Por centrifugación (30 min. a $5.000 \times g$) se separa gran cantidad de proteína inerte desnaturalizada.

3. *Fraccionamiento con metanol 40-70 %.* — Al sobrenadante límpido se añade un noveno de su volumen de tampón ftalato potásico 0,5 M, pH 6, y se ajusta el conjunto a este pH con NaOH 2,5 N. Lentamente y agitando, se añade un volumen igual de metanol al 80 %, frío a -10°C , con lo que el alcohol queda al 40 %. Esta solución se calienta hasta 20°C en baño de agua a 40°C , con lo que se inicia la floculación de nueva proteína inactiva, que se separa por centrifugación a $4.000 \times g$. Al sobrenadante enfriado a -10°C se añaden 1,5 volúmenes de metanol al 90 %, a igual temperatura (concentración alcohólica final: 70 %). Después de una o dos horas se centrifuga en frío a $4.000 \times g$ durante 5 minutos y se descarta el sobrenadante. El sedimento se extrae rápidamente dos veces con tampón fosfato 0,05 M, pH 7, centrifugando cada vez.

4. *Diálisis y liofilización.* — El extracto obtenido se dializa en frío para eliminar el metanol. La solución resultante se liofiliza.

Se obtienen de 0,28 a 0,33 g. de liofilizado seco por cada 100 g. de hígado (peso fresco).

La actividad de los preparados enzimáticos oscila notablemente según el material de partida. Suelen fosforilar de 1.600 a $2.400 \mu\text{g.}$ de fructosa por miligramo de N proteico, en 20 minutos, a 37°C , lo que supone una purificación de cerca de 40 veces sobre la actividad del homogenado inicial.

II. Influencia de la concentración de sustrato. — La cinética de la reacción sigue bastante bien la ecuación de Michaelis-Menten.

El valor de K_m respecto de la fructosa es aproximadamente de $4,6 \times 10^{-4} \text{ M}$ (fig. 1), lo que coincide con la estimación de Hers (4), que indicó debía ser inferior a $5 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Respecto del complejo ATP-Mg, el valor de K_m es de $1,6 \times 10^{-3} \text{ M}$ (fig. 2), poco diferente del calculado por HERS manométricamente (5).

III. Sustratos de la cetohechoquinasa. — La preparación fosforila a la sorbosa, aunque a velocidad bastante inferior que a la fructosa (57 % frente a sustrato 0,0018 M).

No fosforila 3-metilfructosa (*), 1 : 5-gluconolactona, glucuronolactona, ácido ascórbico, inosita, sorbita y manita.

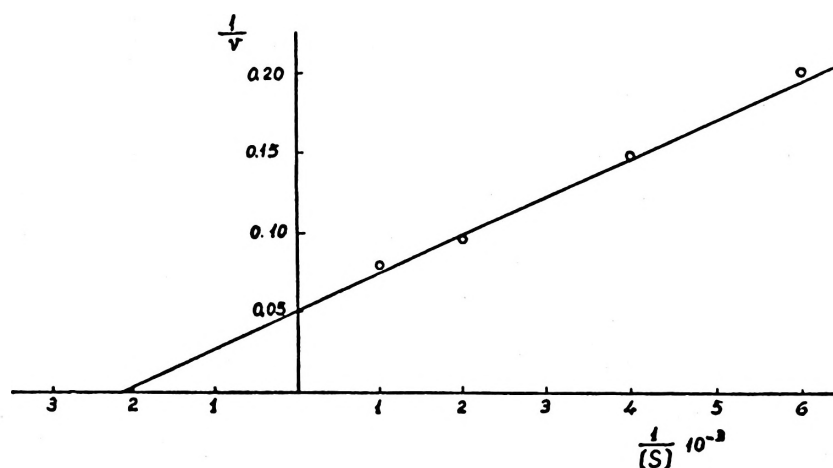


FIGURA 1. — Determinación de la constante de Michaelis de la cetohexoquinasa respecto de la fructosa. Las velocidades de reacción v se expresan en $\mu\text{g.}$ de fructosa esterificada en 6 minutos.

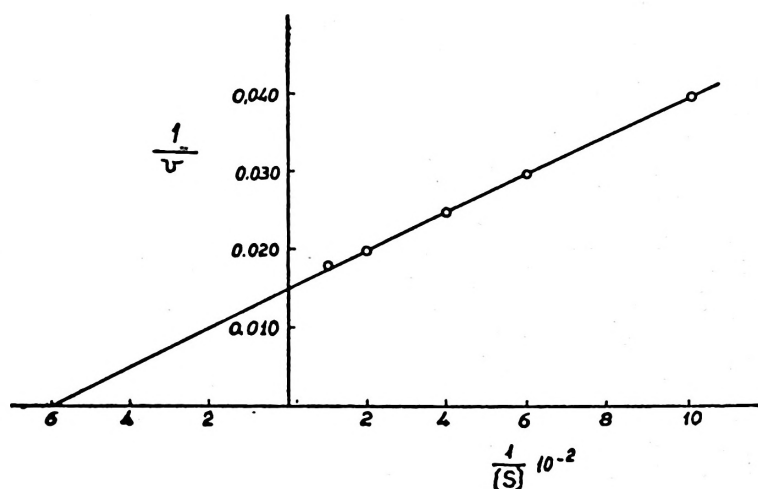


FIGURA 2. — Determinación de la constante de Michaelis de la cetohexoquinasa respecto del complejo ATP-Mg. Las velocidades de reacción v se expresan en $\mu\text{g.}$ de fructosa esterificada en 20 minutos.

Estas sustancias no han producido efecto alguno sobre la fosforilación de la fructosa a las concentraciones siguientes:

(*) Esta sustancia nos fue amablemente cedida por la firma Ayerst, McKenna and Harrison Ltd., de Montreal (Canadá).

ácido ascórbico 0,01 M, inosita 0,002 M, sorbita 0,002 M, manita 0,002 M, glucuronolactona 0,002 M y 0,008 M, 1:5-gluconolactona 0,002 M y 0,02 M y 3-metilfructosa 0,002 M y 0,004 M.

La inhibición a veces observada con 1:5-gluconolactona se vio era debida a la considerable disminución del pH por la hidrólisis espontánea de la lactona. Soluciones recién preparadas carecen de efecto inhibidor.

IV. Grupos —SH esenciales en la enzima. — Inhibición de la cetohehexoquinasa por el ion mercurio, señalada por KUYPER, sugirió el interés de investigar la importancia de los grupos —SH para la actividad enzimática, a pesar del resultado negativo indicado por el mismo autor ante el monoiodoacetato (8).

La fuerte inhibición de la enzima por el p-cloromercuribenzoato, el o-iodosobenzoato y la N-etilmaleimida, bien conocidos reactivos de grupos —SH, no dejó lugar a duda acerca del carácter esencial de estos grupos para la actividad de la cetohehexoquinasa. Los resultados obtenidos se analizan en otro trabajo en el que, asimismo, se explica el comportamiento de la enzima respecto del monoiodoacetato, que también revela efecto inhibidor en determinadas condiciones.

V. Inhibición por el 1,2,4-fluorodinitrobenceno (FDNB). — Este reactivo, ampliamente utilizado (16) por su capacidad de

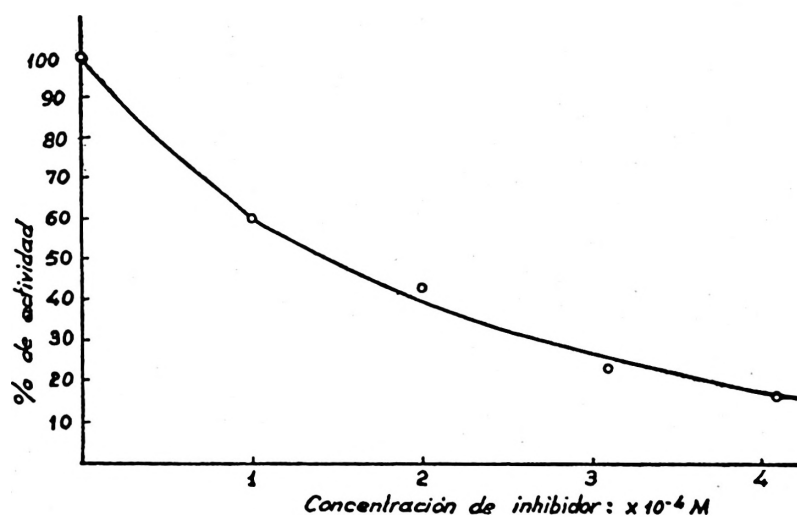


FIGURA 3. — Inhibición de la cetohehexoquinasa en función de la concentración de 1,2,4-fluorodinitrobenceno.

arilación de proteínas, especialmente en los grupos amino, se mostró claro inhibidor de la cetohecoquinasa (fig. 3).

El FDNB se adicionaba disuelto en alcohol a la solución de enzima, en frío. Se mantenía 90 minutos a temperatura ambiente, a pH 7,8 (tampón fosfato 0,15 M) y, a continuación, se determinaba la actividad enzimática que era comparada con la de una muestra de solución de enzima a la que se había añadido el mismo volumen de alcohol sin inhibidor, siendo tratada de la misma manera.

Con el FDNB 4×10^{-4} M se llega a alcanzar una inhibición de más del 80 %.

Discusión

La técnica de purificación adoptada ha resultado suficientemente práctica y sencilla para conseguir enriquecimientos del orden de 35-40 veces la actividad del homogenado inicial. Sustancialmente se ha seguido el método de PARKS y *col.*, con ligeras modificaciones que lo hacían más apto para nuestras condiciones de trabajo.

La liofilización permite una prolongada conservación del preparado, sin pérdida sensible de actividad durante períodos superiores a un año.

La cinética de la reacción, a las concentraciones de sustratos a que se ha operado, se adaptaba a la de Michaelis-Menten, a pesar de tratarse de una reacción de transferencia con dos sustratos. Esto ha de atribuirse a que la concentración de fructosa era suficientemente alta en relación con la cantidad de cetosa fosforilada (10).

Tiene interés especial el hecho de que la 3-metilfructosa no sea fosforilada y tampoco inhiba la fosforilación de la fructosa. Ello implica que el hidroxilo en C₃ no sólo ha de estar orientado en posición L, sino que debe estar libre. Al menos, basta metilarlo para que el azúcar deje de ser sustrato del enzima e incluso pierda su afinidad para fijarse en sus grupos activos.

La investigación de la importancia de los grupos —SH parece concluyente en sentido afirmativo, dada la diversidad de reactivos empleados.

El FDNB señala que pueden ser asimismo importantes los grupos —NH₂ libres, aun cuando el reactivo tiene también capacidad para arilar grupos fenol, imidazol e incluso los mismos —SH (14), lo que quita especificidad a su acción.

Resumen

Se describen brevemente varios ensayos de purificación de la cetohehexoquinasa de hígado y se expone el método elegido, fundamentalmente basado en la técnica de PARKS y col. Se comprueba que la liofilización proporciona preparados estables que se utilizan para el estudio de las propiedades de la enzima. La cinética de ésta sigue bastante bien la ecuación de Michaelis-Menten y los valores de K_m hallados no se apartan sustancialmente de los descritos. Para que un azúcar sea sustrato de la cetohehexoquinasa debe tener libre el hidroxilo en C_3 (además de orientado en posición L). La molécula enzimática posee grupos $-SH$ esenciales. La inhibición por FDNB insinúa la posibilidad de que grupos $-NH_2$ puedan también ser importantes para la actividad.

Summary

On the purification and properties of the liver ketohexokinase

Several assays for the purification of liver ketohexokinase (ATP : D-fructose 1-phosphotransferase) are described.

A thermic treatment at 60° C is effective in separating much inert protein without sensible yield detriment if it is applied upon scantily purified preparations.

The enrichments got by positive adsorption upon calcium phosphate gel, as well as by fractionation with ethanol, are not easily reproducible. Digestion by papain is not applicable, owing to destruction of the enzyme.

A method based on the Parks and col. technique is adopted, which gives, very quickly, preparations of notable activity, 35-40 times higher than that of the initial homogenate. Very stable preparations are obtained by lyophilization.

The reaction follows the Michaelis-Menten kinetics well, and the K_m values found are not substantially different from those previously described.

The presence in L-position of the $-OH$ in C_3 had been shown as a substrate requirement for ketohexokinase. Now it has been proved that introduction of a methyl in this group prevents phosphorylation of the sugar and the affinity for the enzyme is lost. 3-methyl fructose is not phosphorylated, nor does it inhibit the phosphorylation of fructose.

The ketohexokinase has essential HS-groups, as has been shown with several specific reagents. Dinitrofluorobenzene also inhibits the enzyme, suggesting a possible role of the free H_2N -groups in its action mechanism.

Bibliografía

- (1) BÜCHER, T. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1**, 292 (1947).
- (2) Comité para la standarización de aparatos microquímicos. División de Química Analítica de la Am. Chem. Soc. : *Anal. Chem.*, **23**, 523 (1951).
- (3) FISKE and SUBBAROW : *J. Biol. Chem.*, **66**, 375 (1925).
- (4) HERS, H. G. : *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 416 (1952).
- (5) HERS, H. G. : *Biochim. Biophys. Acta*, **8**, 424 (1952).
- (6) HERS, H. G., BEAUFAYS, H. and DE DUVE, C. : *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 416 (1953).
- (7) KEILIN, D. and HARTREE, E. F. : *Proc. Roy. Soc. (London)*, B **124**, 397 (1938).
- (8) KUYPER, CH. : *Tesis doctoral*, Utrecht (1955).
- (9) KUYPER, CH. and HOENSELAARS, J. : *Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap.*, Proc. Ser. C, **62**, 484 (1959).
- (10) LAIDLER, K. J. : *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford (1958).
- (11) LEUTHARDT, F. and TESTA, E. : *Helv. Chim. Acta*, **33**, 1919 (1950).
- (12) LEUTHARDT, F. and TESTA, E. : *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **8**, C 67 (1950).
- (13) PARKS, R. E., BEN-GERSHOM, E. and LARDY, H. A. : *J. Biol. Chem.*, **227**, 231 (1957).
- (14) PORTER, R. R. : *Methods in Enzymology*, IV, 221, New York (1957).
- (15) ROE, J. H., EPSTEIN J. H. and GOLDSTEIN, N. P. : *J. Biol. Chem.*, **178**, 839 (1949).
- (16) SANGER, F. : *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
- (17) STAUB, A. and VESTLING, C. S. : *J. Biol. Chem.*, **191**, 395 (1951).