

ENZIMAS RESPONSABLES DE LA FOSFORILACION DE LA GLUCOSA EN *Saccharomyces carlsbergensis*

Por
P. HERRERO, F. MORENO

y
S. GASCON

Departamento Interfacultativo de Bioquímica.
Universidad de Oviedo.

INTRODUCCION

Desde que se describió la existencia de la hexoquinasa (ATP: D-hexosa-6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.1.) (1, 2) y la glucoquinasa (ATP: D-glucosa-6-fosfotransferasa, EC 2.7.1.2.) (3, 4) en *Saccharomyces cerevisiae*, las propiedades cinéticas de estos enzimas se han estudiado extensivamente (5, 6, 7). Así mismo ha recibido una gran atención la regulación de su síntesis, aunque MAZÓN y col. (8) describieron la naturaleza constitutiva de estos enzimas en *Rhodotorula glutinis*, se conoce muy poco acerca de la regulación de los niveles de estos enzimas en levaduras. En el hígado se describió que glucoquinasa era un enzima inducible con propiedades cinéticas diferentes a las de la hexoquinasa (6).

Nosotros hemos realizado un estudio de las actividades capaces de fosforilar la glucosa en *Saccharomyces carlsbergensis*, en varios sentidos diferentes, por un lado se ha estudiado la variación de la actividad fosforiladora de la glucosa con el tiempo de cultivo y con diferentes fuentes de carbono, en otro sentido hemos identificado mediante criterios de filtración a través de geles de cambio iónico y exclusión molecular la existencia de al menos tres formas enzimáticas con actividad fosforiladora de glucosa, procediendo al estudio de algunas de las propiedades cinéticas de cada una de estas actividades, habiendo encontrado diferencias entre ellas en cuanto a la afinidad por la glucosa y también en cuanto a estabilidad.

En el trabajo precedente, se describe el efecto de la D-xilosa en la síntesis de la invertasa de levaduras y se relaciona éste, con el posible papel inhibitor del azúcar sobre la hexoquinasa. En este trabajo describimos el efecto de la D-xilosa

y la D-lixosa sobre la hexoquinasa parcialmente purificada a partir de *Saccharomyces carlsbergensis*.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Se han obtenido de Sigma Chemical Co. los siguientes productos: Glucosa oxidasa tipo V; peroxidasa tipo III; o-dianisidina; adenosina 5' trifosfato y ácido etilendianino tetracético (EDTA). De Pharmacia se obtuvo el Sephadex G-100 y la Dietil aminoetil celulosa. De Difco, el extracto de levadura y de Merck la glucosa, la xilosa, la lixosa y la galactosa.

Microorganismo y su cultivo

Hemos utilizado en este trabajo la cepa de levadura *Saccharomyces carlsbergensis* G-517 (C.E.C.T. n.º 1.317) descrito por GILLILAND (9).

Las células se crecieron en un agitador rotacional a 28°C en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de medio con 1 % de extracto de levadura y 1 % de glucosa. Después de 16 horas, las células se recogieron y lavaron dos veces con extracto de levadura al 1 % por centrifugación a 4000xg durante 10 min.

Los extractos libres de células se obtuvieron por rotura mecánica con polvo de vidrio Ballotini suministrado por H. Mickle. Laboratory, Surrey (Inglaterra) con un diámetro medio de 0,4 mm. La proporción óptima de Ballotini con respecto a la suspensión celular ha sido descrita como del 50 % (v/v) (10). El conjunto se somete a una vibración circular de 4.000 rpm durante 1 min., asegurándonos de esta forma un 100 % de células rotas. El sistema no sufre calentamiento debido a la refrigeración proporcionada por una botella de nieve carbónica. Los extractos celulares se obtienen por centrifugación a 18.000xg durante 25 min.

Toluenización de las levaduras

Se tomaron 0,5 ml de cultivo a los tiempos que se especifican en los diferentes experimentos, añadiendo 0,3 ml de agua destilada y 0,025 ml de una mezcla que contenía tolueno, etanol y triton X-100 al 20 % en proporciones 1 : 4 : 1. Esta mezcla se agita durante un minuto añadiéndose a continuación 5 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 6,8, separándose a continuación las células por centrifugación a 4.000xg durante 10 min. y resuspendiéndose el precipitado celular en 0,5 ml del mismo tampón.

Ensayo de la hexoquinasa

La hexoquinasa se determinó de acuerdo con el método descrito por A. SOLS y col. (11). Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que

hidroliza 1 μ mol de sustrato en un min. a 30°C en 0,1 M de Tris-ClH pH 8,0 conteniendo 0,008 M de Cl_2Mg y 0,008 M de ATP utilizando como sustrato glucosa 0,002 M.

RESULTADOS

Producción del enzima

La Fig. 1 resume los resultados obtenidos acerca de la síntesis de la actividad fosforiladora de la glucosa cuando las levaduras utilizan glucosa o galactosa como fuentes de carbono. En ambos casos el enzima se sintetiza a una velocidad idéntica a la con que se produce el crecimiento celular, deteniéndose la síntesis cuando se detiene el crecimiento, para posteriormente cuando las levaduras comienzan a utilizar el etanol producido en la fermentación de los azúcares reanudar la síntesis de esta actividad. Estos resultados nos conducen a la conclusión de que tanto hexoquinasa como glucoquinasa de *Saccharomyces carlsbergensis* son enzimas constitutivos, no encontrándose indicios de un carácter inducible de la glucoquinasa como el descrito anteriormente (6) para el enzima hepático.

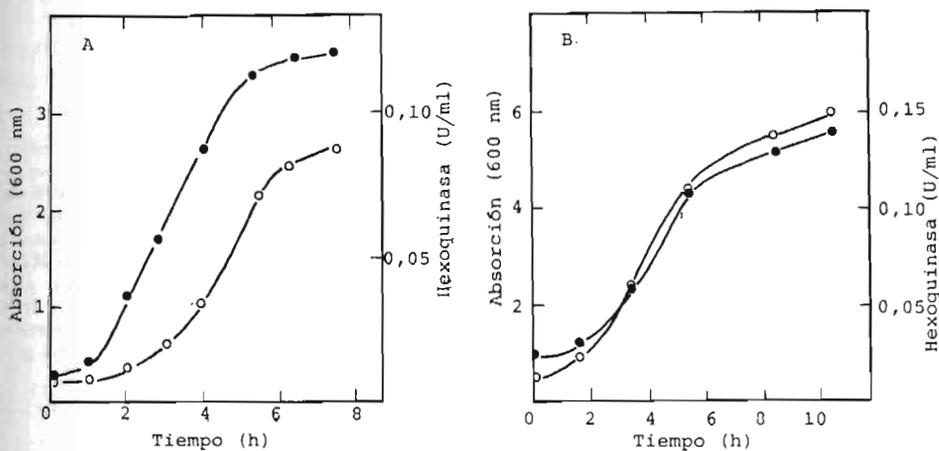


Fig. 1.—Producción de hexoquinasa por *Saccharomyces carlsbergensis*.

Las células se crecieron en un medio constituido por un 1 % de extracto de levadura y un 0,5 % de glucosa (A) o un 1 % de galactosa (B). A los tiempos señalados en la figura, se tomaron muestras de los cultivos de 3 ml y después de centrifugadas las células a $4.000 \times g$ durante 10 min. se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron en tampón fosfato 0,05 M, pH 7,0 a un volumen final de 3 ml. En dichas muestras se determinó la absorción a 600 nm y se procedió a toluenizar, según se describió en Materiales y Métodos, alícuotas de 100 μ l para ensayar las actividades fosforiladoras de la glucosa «in situ» (●—●) actividad hexoquinasa; (○—○) absorción.

Isoenzimas de la actividad fosforiladora de la glucosa

a) Cromatografía en DEAE-celulosa.

Células de *S. carlsbergensis* 1.317 se incubaron en 1 % de extracto de levadura y 1 % de glucosa, como fuente de carbono durante 16 horas, a partir de estas células se obtuvo un extracto según se describió en Materiales y Métodos, dicho extracto fue sometido a precipitación con sulfato amónico al 60 % de saturación durante 16 h. a 4°C. El precipitado se recogió por centrifugación a 18.000xg durante 30 min.

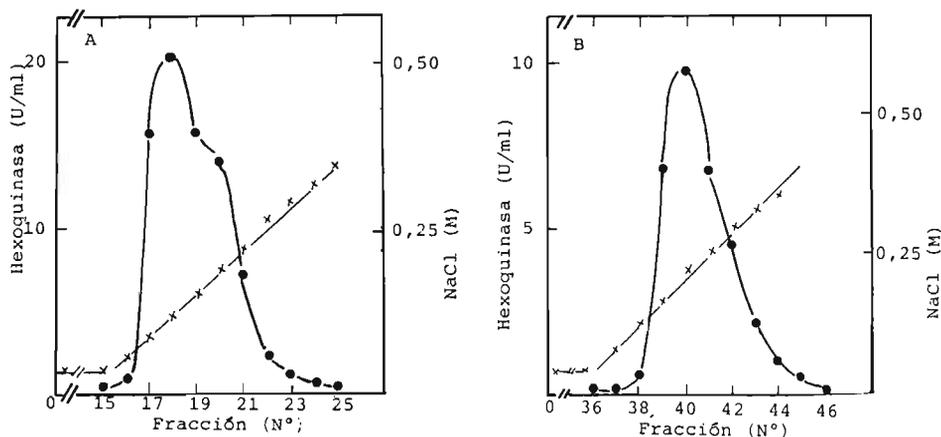


Fig. 2.—Diferencias en la carga neta de las actividades fosforiladoras de la glucosa.

Células de *Saccharomyces carlsbergensis* se crecieron durante 16 h. en un medio constituido por extracto de levadura al 1 % y glucosa al 1 %. A partir de dichas células se obtuvo un extracto, el cual se sometió durante 16 h. a una concentración de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ del 60 % de saturación. Obteniéndose un sobrenadante y un precipitado por centrifugación a $18.000 \times g$ durante 30 min. El precipitado se resuspendió en tampón fosfato 0,05 M pH 7,0 y tanto el precipitado como el sobrenadante se dializó durante 16 h. frente a tampón fosfato 0,05 M pH 7,0. La cromatografía del precipitado de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en DEAE-celulosa (A) da lugar a la diferenciación de dos proteínas con diferente carga y la cromatografía del sobrenadante de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ en DEAE-celulosa (B) da lugar a la separación de una tercera actividad fosforiladora de glucosa. (●—●) actividad hexoquinasa; (x—x) molaridad del gradiente lineal de NaCl. Teniendo las fracciones un volumen de 5 ml.

En la Fig. 2 A están representados los resultados obtenidos cuando cromatografiamos en DEAE celulosa el precipitado de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$. Se utilizó una columna de 20 cm de longitud y 2 cm de diámetro equilibrada con tampón fosfato 0,05 M pH 7,0. El volumen de la muestra introducida en la columna fue de 39 ml con una actividad de 10 U/ml, a continuación se conectó un gradiente lineal de NaCl hasta 1 M. En dicha figura representamos los picos de actividad fosforiladora de glucosa eluidos a diferentes concentraciones de ClNa. A una concentra-

ción de NaCl de 0,12 M podemos observar cómo se libera un primer pico de actividad para más tarde a 0,16 M aparecer otro máximo de actividad.

En la Fig. 2 B están representados los resultados obtenidos cuando cromatografiamos en DEAE celulosa el sobrenadante de la precipitación con sulfato amónico al 60 % de saturación. La columna cromatográfica fue de iguales características que en el caso anterior, siendo el volumen de muestra eluido 139 ml que contenía 1,0 U/ml, así mismo se conectó un gradiente lineal de NaCl hasta 1 M.

En este caso se eluye un solo máximo de actividad el cual muestra su máximo a una molaridad de 0,25 M máximo que no corresponde con los encontrados en el precipitado de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ y que parece indicar que es una forma diferente a las representadas en la Fig. 2 A.

Filtración en Sephadex G-100

Los máximos de actividad fosforiladora de glucosa separados por cromatografía en DEAE-celulosa, se filtraron, después de concentrar, a través de Sephadex G-100 con el fin de observar si existían entre ellos diferencias en peso molecular al igual que poseían diferentes cargas netas dichas proteínas enzimáticas.

La columna utilizada tenía unas dimensiones de 2 cm de diámetro y una longitud de 85 cm de longitud. Como eluyente se utilizó tampón fosfato 0,05 M pH 7,0. El volumen muerto de la columna se determinó mediante la cromatografía de Azul Dextrano recogiendo fracciones de 5 ml y leyendo su absorción a 600 nm.

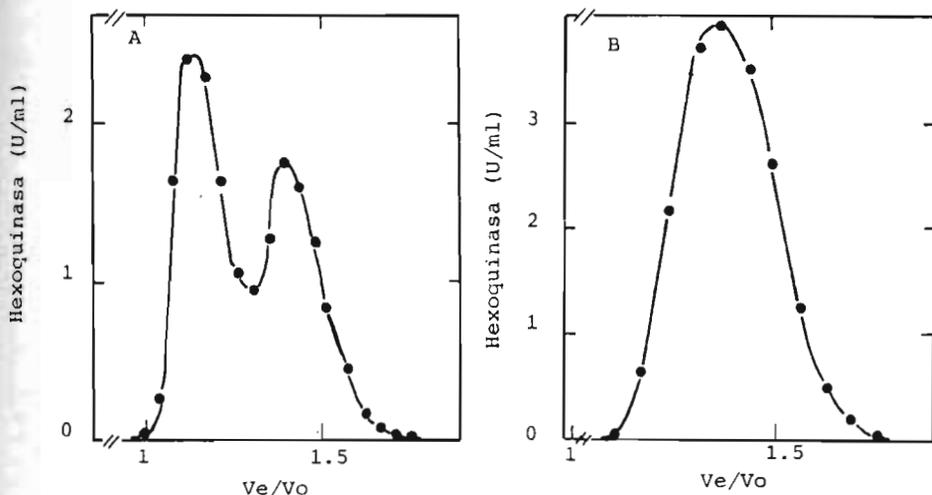


Fig. 3.—Diferencias en peso molecular de las actividades fosforiladoras de la glucosa.

Las fracciones 17 a 22 de la Fig. 2 A se recogieron y concentraron, filtrándose 182 U a través de una columna de Sephadex G-100 (A). Las fracciones 38 a 43 de la Fig. 2B se recogieron y concentraron, filtrándose 91 U a través de una columna de Sephadex G100(B).

En el primer caso (Fig. 3 A), las fracciones correspondientes a los n.º 17 a 22 se concentraron con «Aquacide 1-A» durante 16 h. La filtración de 13 ml de muestra que contenían 14 U/ml se nos resuelve en dos máximos de actividad hexoquinasa con V_e/V_o de 1,14 y 1,41; máximos que hemos llamado hexoquinasa I y II y que posteriormente hemos caracterizado cinéticamente.

La Fig. 3 B nos presenta el cromatograma de la forma que se eluía a una concentración de NaCl de 0,25 M.

Las características de la columna utilizada, fueron iguales a las descritas anteriormente.

El volumen de muestra que se cromatografió fue de 7 ml con una actividad de 13 U/ml.

El cromatograma como se observa en la Fig. 3 B se nos resuelve en un solo máximo cuyo V_e/V_o es de 1,41, volumen que coincide con la forma que denominamos hexoquinasa II pero que, como posteriormente se describe, presenta diferencias con la hexoquinasa II en estabilidad al pH y afinidad por el sustrato por lo que nosotros denominamos hexoquinasa III.

Estabilidad a diferentes pH y afinidad por la glucosa de la hexoquinasa, I, II y III

La Fig. 4 muestra que hexoquinasa II es estable en un rango de pH 6-8,5 inactivándose rápidamente cuando el pH baja de 5,5 ó sube de 8,5.

En el caso de la hexoquinasa III el enzima es estable en un rango de pH 8-9 por debajo de 8 y por encima de 9 la actividad desciende rápidamente. Estas apreciables diferencias entre hexoquinasa II y III, representan uno de los criterios utilizados para diferenciar ambas a pesar de poseer volúmenes relativos de elución en Sephadex G-100 iguales.

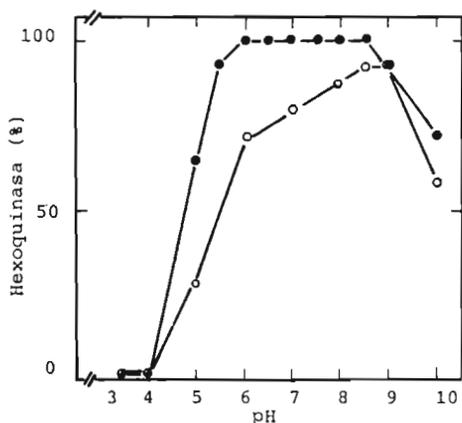


Fig. 4.—Estabilidad de las actividades hexoquinasa II y III a diferentes pH.

20 μ l de hexoquinasa II o III, parcialmente purificadas fueron tratadas con 50 μ l de un tampón universal compuesto por ácido maleico, ácido acético concentrado y Tris-hidroxi metil-amino metano a diferentes pH, durante 15 min. La actividad residual fue estimada por el método de la glucosa oxidasa. (●-●) hexoquinasa II; (o-o) hexoquinasa III.

La Tabla I muestra los valores de K_m obtenidos para las tres formas de hexoquinasa encontradas. El sustrato empleado en este estudio ha sido glucosa y los datos se han calculado a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk.

TABLA I

Enzima	Sustrato	K_m (mM)
Hexoquinasa I	Glucosa	0,3
Hexoquinasa II	Glucosa	0,5
Hexoquinasa III	Glucosa	0,2

Efecto de la D-xilosa sobre la actividad hexoquinasa

En la Fig. 5 se pueden observar los efectos producidos sobre la actividad de la hexoquinasa en presencia de diferentes concentraciones de D-xilosa. Una concentración de D-xilosa en la mezcla de reacción cien veces superior a la concentración de sustrato proporciona un 50 % de inhibición de la actividad enzimática. Teniendo en cuenta que la D-xilosa es un azúcar no metabolizable por las levaduras y que se transporta rápidamente al interior de las células (12) estas concentraciones se alcanzan muy rápidamente «in vivo» cuando se adiciona al medio de cultivo la D-xilosa, pudiendo como se apunta en el trabajo precedente ocasionar un descenso en los niveles intracelulares de la glucosa-6-fosfato u otros metabolitos de la glucosa.

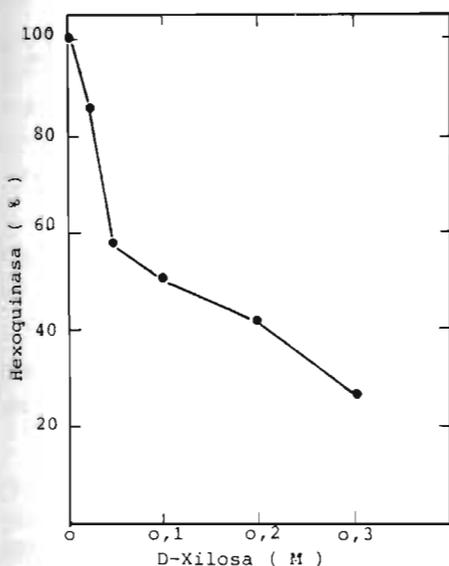


Fig. 5.-Efecto de la D-xilosa sobre la actividad hexoquinasa.

20 μ l de hexoquinasa II o III, parcialmente purificadas, se ensayaron según el método descrito anteriormente en presencia de cantidades de D-xilosa en el rango de 0 a 0,3 M. Dándose el valor de 100 % al ensayo que carecía de D-xilosa.

DISCUSION

De los resultados obtenidos en la purificación parcial, de las actividades responsables de la fosforilación de la glucosa en *Saccharomyces carlsbergensis* se puede establecer que al menos existen dos isoenzimas de hexoquinasa considerando que la tercera forma es la glucoquinasa. Estas tres actividades ha sido posible identificarlas por diferencias en la carga neta de las proteínas y aunque por criterios de peso molecular se muestran dos de ellas no separables (hexoquinasa II y III), estas se pueden diferenciar por su estabilidad al pH y por su afinidad por el sustrato.

Las actividades responsables de la fosforilación de la glucosa se muestran sensibles a la presencia de D-xilosa en la mezcla de reacción (Fig. 5) actuando la D-xilosa como un inhibidor competitivo (13).

REFERENCIAS

- (1) LAZARUS, N. R., RAMEL, A. M., RUSTUN, Y. M. y BARNARD, E. A. (1966).-*Biochemistry*, **5**, 4.003-4.016.
- (2) SCHULZE, I. T. y COLOWICK, S. P. (1969). *J. Biol. Chem.*, **244**, 2.306-2.316.
- (3) MAITRA, P. K. (1970).-*J. Biol. Chem.*, **245**, 2.423-2.431.
- (4) RAMEL, A. H., RUSTUN, Y. M., JONES, J. G. y BARNARD, E. A. (1971).-*Biochemistry*, **10**, 3.499-3.508.
- (5) COLOWICK, S. P. (1973).-En *the Enzymes* (Boyer, P. D., ed). Tercera Edición. Vol. 9 pp. 1-48, Academic Press, New York.
- (6) Purich, D. L., Fromm, H. J. y Rudolph, F. B. (1973).-En *Advances in Enzymology* (Meister, A. ed.), vol. 39, pp. 249-326, John Wiley and Sons, New York.
- (7) BARNARD, E. A. (1975).-En *Methods in Enzymology* (Wood, W. A. ed), vol. 42, pp. 6-25, Academic Press, New York.
- (8) MAZÓN, M. J., GANCEDO, J. M. y GANCEDO, C. (1975).-*Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 452-457.
- (9) GILLILAND, R. R. (1969).-*Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, **35**, 13-23.
- (10) SALTON, M. R. T. y HORNE, R. W. (1951).-*Biochem. Biophys. Acta*, **7**, 177-181.
- (11) SOLS, A., DE LA FUENTE, G. VILLAR-PALASI, C. y ASENSIO, C. (1958).-*Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 12-101.
- (12) HEREDIA, C. F., SOLS, A. y DE LA FUENTE, G. (1968).-*Eur. J. Biochem.*, **5**, 321-329.