

# Uso de resonancia magnética nuclear de $^{31}\text{P}$ y $[\gamma(\text{S})-^{16}\text{O}, ^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}]\text{ATP}$ quiral para investigar los cursos estereoquímicos de las reacciones catalizadas por enzimas

Use of  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance and chiral  $[\gamma(\text{S})-^{16}\text{O}, ^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}]\text{ATP}$  for investigating the stereochemical courses of enzyme-catalysed reactions

ATHEL CORNISH-BOWDEN<sup>1</sup>

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile.

The development of methods for determining the stereochemical course of substitution reactions at phosphorus atoms has made it possible to understand the chemical details of many enzyme-catalysed reactions much more fully than purely kinetic measurements would allow. Although methods based on circular dichroism and mass spectrometry have been attempted, the most successful approach has been to use  $^{31}\text{P}$  n.m.r., taking advantage of the chemical shifts produced by  $^{18}\text{O}$  atoms covalently bound to  $^{31}\text{P}$ , and the virtual elimination from the spectrum of  $^{31}\text{P}$  atoms covalently linked to  $^{17}\text{O}$ . This method has been applied to hexokinase D from rat muscle and has shown that the reaction catalysed by this enzyme proceeds with inversion of configuration at phosphorus, in common with other kinase-catalysed reactions that have been studied.

En nuestra comprensión actual de los mecanismos de las reacciones de sustitución a átomos de carbono, la investigación de los cursos estereoquímicos de estas reacciones fue por lo menos tan útil como la investigación cinética, y la clasificación en las bien conocidas categorías  $\text{S}_{\text{N}}1$  o  $\text{S}_{\text{N}}2$  habría sido casi imposible sin saber si la configuración del átomo sustituido sufrió retención, inversión o racemización. La información estereoquímica ha sido igualmente importante en el estudio de reacciones enzimáticas de sustitución a átomos de carbono, y, en verdad, la clasificación original de las reacciones de transferencia de grupos como mecanismos de desplazamiento-sólo o desplazamiento-doble (Koshland, 1954) fue hecha principalmente sobre la base de estereoquímica.

En principio, es posible estudiar la sustitución en átomos de fósforo de una manera similar a aquella utilizada con éxito para la sustitución a átomos de carbono, es decir, con una combinación de las investigaciones estereoquímicas y cinéticas. La sustitución en átomos de fósforo tiene una importancia particular en enzimología, porque hay un

gran número de reacciones de importancia bioquímica que incluyen este tipo de sustitución. Desafortunadamente, sin embargo, aunque los átomos quirales de carbono son muy frecuentes en la naturaleza, los átomos de fósforo casi jamás son quirales en las moléculas bioquímicas naturales, porque cada átomo de fósforo está normalmente unido a lo menos a dos átomos de oxígeno. Aunque uno de estos enlaces de fósforo-oxígeno se escribe normalmente como enlace doble para satisfacer la valencia, no es posible normalmente distinguir uno del otro. En consecuencia, hasta tan tarde como 1975 no había información de la sustitución a fósforo, y la información existente acerca de los mecanismos de las quininas y otras enzimas había sido derivada casi totalmente de las investigaciones cinéticas.

El estudio moderno de las sustituciones enzimáticas a átomos de fósforo comenzó con el desarrollo por Eckstein (1975, 1979, 1983, 1985) de métodos para la síntesis de compuestos con  $^{16}\text{O}$  sustituido por  $\text{S}$  o  $^{18}\text{O}$ , lo que permitía distinguir un átomo unido a fósforo de otro, es decir,

<sup>1</sup> Dirección actual: Centre de Biochimie et de Biologie Moléculaire. CNRS. Marseille, France.

átomos de fósforo normalmente simétricos podían hacerse quirales. Usualmente, sin embargo, los fosforotioatos son mucho peores sustratos para las enzimas que los sustratos normales de oxígeno (típicamente las velocidades son alrededor de un 1% de las encontradas con los sustratos correctos), y por eso hay un riesgo de que las conclusiones obtenidas de investigaciones que usan sustratos sustituidos no sean válidas en relación con los mecanismos normales de las enzimas. Más aún, algunas enzimas no aceptan en absoluto sustratos sustituidos con azufre.

Para muchas enzimas, incluyendo todas las que se han investigado hasta el momento, la estereoquímica encontrada con sustratos sustituidos con azufre es la misma que la encontrada con sustratos normales. Sin embargo, no se puede estar seguro *a priori*, y en el caso de cada enzima en particular se debería verificar la dicha correspondencia en algún momento. Tal examen se ha hecho posible con el desarrollo de métodos de síntesis y caracterización estereoquímica de fosfatos quirales con  $^{16}\text{O}$  sustituido tanto por  $^{17}\text{O}$  como por  $^{18}\text{O}$  (Abbott *et al.*, 1978, 1979; Cullis y Lowe, 1978).

Tres métodos diferentes se han propuesto para investigar las configuraciones de átomos de  $^{31}\text{P}$  sustituidos por isótopos de oxígeno. (1) dicroísmo circular (Cullis y Lowe, 1978), (2) espectroscopia de masa (Abbott *et al.*, 1978), y (3) espectroscopia de n.m.r. de  $^{31}\text{P}$  (Jarvest *et al.*, 1981). El dicroísmo circular tiene la ventaja de ser la técnica más directamente estereoquímica en carácter, pero aunque los efectos de sustitución isotópica son detectables, ellos son demasiado pequeños para constituir la base de un método general para seguir el curso estereoquímico de una reacción. Es útil mencionar, sin embargo, que los efectos de dicroísmo circular pueden incrementarse en la presencia de un ion metálico apropiado. Por ejemplo, ribosa fosfato pirofosfoquinasa acepta  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4 \text{ATP}]^-$  como sustrato, el que tiene un gran dicroísmo circular (Li *et al.*, 1978), y fue posible determinar que la reacción procede con inversión de configuración.

La espectroscopia de masa fue también

inicialmente muy atractiva, debido a su simplicidad conceptual, pero en la práctica hay grandes problemas de detalle experimental, que aunque eventualmente pueden eliminarse se requiere de gran habilidad práctica e instrumentos que generalmente no están disponibles. No obstante, el método de espectroscopia de masa se ha utilizado con éxito para determinar los cursos estereoquímicos de las reacciones catalizadas por fosfatasa alcalina (Jones *et al.*, 1978) y por glicerol quinasa (Blattler y Knowles, 1979).

El método con n.m.r. de  $^{31}\text{P}$  ha resultado ser el más exitoso y ahora se le considera el método preferido (Gerlt, 1984). En esta revisión introductoria voy a discutir este método, como ha sido aplicado por Lowe y otros a numerosas enzimas (ver Lowe, 1983), y lo ilustraré haciendo referencia a la investigación del curso estereoquímico de la reacción catalizada por hexoquinasa D del hígado de rata.

#### TEORIA

##### *Efectos de $^{17}\text{O}$ y $^{18}\text{O}$ en la n.m.r. de $^{31}\text{P}$*

El núcleo de  $^{18}\text{O}$  tiene un espín nuclear de cero, y en consecuencia no tiene efecto alguno en núcleos vecinos fuera de un corrimiento químico a alto campo (Cohn y Hu, 1978). Este es muy pequeño, pero se detecta en un espectrómetro de n.m.r. sensible: por ejemplo, espectros de n.m.r. de  $^{31}\text{P}$  registrados a 121.5 MHz exhiben corrimientos de cerca de 3 Hz para un enlace simple de  $^{18}\text{O}$ - $^{31}\text{P}$  (en relación al enlace normal de  $^{16}\text{O}$ - $^{31}\text{P}$ ); la sustitución en un enlace doble produce un corrimiento más grande, y cuando más de un enlace con un átomo de  $^{31}\text{P}$  es sustituido isotópicamente los efectos son aditivos. Estos corrimientos químicos constituyen la base de los métodos analíticos desarrollado por Lowe. Sin embargo, debido a que átomos de  $^{17}\text{O}$  también están presentes es necesario considerar sus efectos.

El núcleo de  $^{17}\text{O}$  tiene un espín nuclear de 5/2 y un gran momento eléctrico cuadrupolar. En consecuencia, aunque produce corrimientos químicos pequeños del mismo

tipo de los producidos por <sup>18</sup>O, su efecto más impresionante en un espectro de n.m.r. de <sup>31</sup>P es generar un ensanchamiento extremo de la señal para cada núcleo de <sup>31</sup>P que está unido por enlace covalente con <sup>17</sup>O, constituyendo en la práctica una eliminación virtual de esas señales del espectro. Tsai (1979) ha utilizado este efecto de una manera semicuantitativa como un método para "contar" enlaces de <sup>31</sup>P-<sup>17</sup>O. En el método de Lowe, en cambio, se usa solamente como un método para simplificar el espectro de n.m.r., de modo que se observen únicamente los átomos de <sup>31</sup>P que no estén unidos a átomos de <sup>17</sup>O.

*Determinación de la configuración del átomo de fósforo en glucosa 6-[(S)-<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]fosfato*

Suponiendo que [γ(S)-<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]ATP esté disponible en una condición pura, tanto en isótopos como en quiralidad, el problema esencial para determinar el curso estereoquímico de la reacción catalizada por hexoquinasa D es analizar la configuración en el fósforo de la glucosa-6-[(<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O) fosfato producida en la reacción. Para hacer esto, primero, es necesario impedir la rotación del grupo fosfato alrededor del enlace que lo une a la molécula de glucosa, y segundo, es necesario introducir una diferencia química entre los dos átomos de oxígeno que están unidos con fósforo, tal que se produzcan corrimientos químicos distinguibles en estudios de n.m.r. de <sup>31</sup>P.

En el método desarrollado por Lowe y colaboradores, el primero de estos requerimientos se logró por ciclación produciendo un fosfodiéster cíclico, en una reacción que realmente procede con inversión de configuración en el fósforo (Cullis *et al.*, 1981), no obstante un reporte anterior que indicaba lo contrario (Jarvest *et al.*, 1980). Sin embargo, debido a que un átomo de oxígeno se pierde en la ciclación, hay tres productos posibles de glucosa 6-[(S)-<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]fosfato quiral, dependiendo de cuál de los átomos isotópicamente diferentes se pierda (Fig. 1).

Los otros dos átomos de oxígeno se han hecho químicamente diferentes por metilación, así que ahora hay un enlace simple de P-OCH<sub>3</sub> y un enlace doble de P=O. Esto también se muestra en la Fig. 1, donde se supone que la metilación ocurre en el átomo axial de oxígeno. En la práctica, la metilación ocurre también en el átomo ecuatorial de oxígeno, de modo que hay tres productos más fuera de los mostrados. Sin embargo, se halla que normalmente los productos axiales predominan, aunque los rendimientos relativos sean variables (en los estudios con hexoquinasa D el rendimiento del producto ecuatorial no fue bastante para espectros adecuados). Por otra parte, las resonancias de los triésteres ecuatoriales y axiales están bastante bien separadas en el espectro de n.m.r. de <sup>31</sup>P, de modo que una separación física previa no es necesaria.

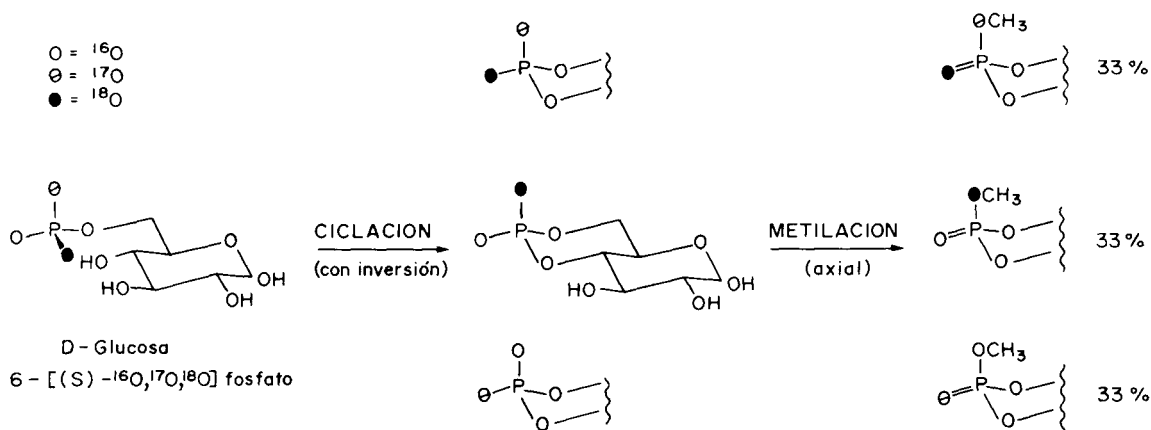


Fig. 1: Ciclación y metilación de D-glucosa-6-[(S)-<sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O] fosfato. Los átomos de <sup>16</sup>O aparecen como O, los de <sup>17</sup>O como Ø, y los de <sup>18</sup>O como ●. La metilación también puede proceder en los átomos ecuatoriales de oxígeno, pero los productos no se muestran en la Figura.

*Consecuencias de usar ATP isotópicamente impuro*

Aunque ahora esté disponible [ $^{18}\text{O}$ ]agua esencialmente pura (aproximadamente 99%), lo mismo no es de ningún modo verdadero para [ $^{17}\text{O}$ ]agua, en que poco más de un 50% de los átomos de oxígeno son en realidad  $^{17}\text{O}$ : aproximadamente 50% son  $^{18}\text{O}$  y hay una pequeña proporción de  $^{16}\text{O}$ . En consecuencia, el mejor ATP quiral disponible contiene sólo 28% aproximadamente de [ $\gamma$ -(*S*)- $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ]ATP, y por eso durante la ciclación y metilación de la glucosa-6-fosfato producida por la reacción enzimática se forman tres triésteres axiales aparte de los mostrados en la Fig. 1. Aunque puede aparecer como una complicación no deseada, provee una norma interna para determinar los corrimientos químicos producidos por el átomo de  $^{18}\text{O}$ , y el análisis de cuatro especies diferentes permite examinar los resultados por consistencia interna.

Para cada una de las cuatro especies de ATP que existen en el sustrato original, se pueden calcular las proporciones de los seis triésteres axiales producidos, suponiendo dos inversiones de la configuración, una en la reacción enzimática y una en la ciclación, y se pueden calcular las intensidades relativas de los cuatro picos esperados en el espectro de n.m.r., como se ilustra en la Tabla 1. Se puede hacer un cálculo similar suponiendo que la reacción enzimática procede con retención de la configuración o con racemización: en el primer caso los valores mostrados con estrellas (\*) en la Tabla 1 deben intercambiarse entre sí en cada columna, y en el segundo caso deben ser el promedio de ambos valores. Nótese bien que las intensidades esperadas para las especies con dos o cero átomos de  $^{18}\text{O}$  no se afectan por la estereoquímica de la reacción, y en consecuencia la comparación entre la intensidad observada y esperada de los picos de estas especies permite una prueba independiente para algunas anomalías en el espectro de n.m.r.

Dos complicaciones adicionales deben mencionarse. En primer lugar, cada uno de los triésteres está presente en dos estados anoméricos con corrimientos químicos dife-

rentes. Así, los cuatro triésteres axiales observables generan ocho picos y no cuatro, pero los dos grupos de cuatro picos están bien separados y no interfieren con las determinaciones de intensidades dentro de los grupos; al contrario, permiten una prueba adicional de consistencia. En el caso de los triésteres ecuatoriales (no usados en la investigación de la hexoquinasa D), la separación entre los picos para los pares anoméricos es mucho menor, pero con una selección apropiada del solvente se pueden evitar complicaciones por fusión de los dobletes anoméricos en picos únicos (ver, por ejemplo, Lowe y Potter, 1981).

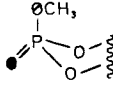
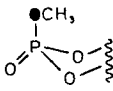
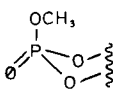
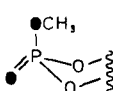
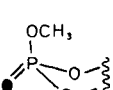
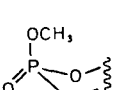
La segunda complicación es que en los primeros experimentos de este tipo el ATP estaba impuro, no sólo isotópicamente sino también en relación a su quiralidad, tal que sólo 87% del (*S*)-material putativo tenía la (*S*)-configuración en realidad (Lowe y Potter, 1981). Por eso, en este caso el cálculo correspondiente al mostrado en la Tabla 1 debió considerar los productos originados por el (*R*)-componente de la mezcla original. En estudios posteriores, por ejemplo la investigación de la hexoquinasa D (Pollard-Knight *et al.*, 1982), esta complicación pudo evitarse por el uso de ATP puro en relación de su quiralidad.

APLICACION A LA HEXOQUINASA D DEL HIGADO DE RATA

La hexoquinasa D (ATP: hexosa-6-fosfato 6-fosfotransferasa; número 2.7.1.1 de la Comisión de Enzimas) es una de cuatro isoenzimas de hexoquinasa que se encuentran en los mamíferos, y es la isoenzima particular de los hepatocitos. A menudo en el pasado fue conocida como "glucoquinasa", pero ahora se sabe que su supuesta mayor especificidad era una concepción errónea, y el nombre de glucoquinasa y el número 2.7.1.2 debiera guardarse para aquellas enzimas encontradas en ciertas bacterias y en invertebrados que realmente son específicas para la glucosa (Cárdenas *et al.*, 1984). La hexoquinasa D es muy diferente de las otras isoenzimas de los mamíferos con respecto a sus propiedades cinéticas, propiedades que parecen muy adecuadas para un rol mayor de esta enzi-

TABLA 1

Triésteres axiales producidos de cuatro especies de ATP

|   | 28,2%  | 38,6%                                 | 18,1%                   | 15,1% | Total | <sup>31</sup> P n.m.r. |            |
|---|--|---------------------------------------|-------------------------|-------|-------|------------------------|------------|
|   | [γ(S)- <sup>16</sup> O, <sup>17</sup> O, <sup>18</sup> O]ATP | [γ- <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ]ATP | [γ- <sup>18</sup> O]ATP | ATP   |       | Corrimiento alto campo | Intensidad |
|    | 9,4  | 0,0                                   | 0,0                     | 0,0   | 9,4   | (invisible)            |            |
|    | 9,4*   | 12,9                                  | 6,0                     | 0,0   | 28,3* | 3 Hz                   | 1,00*      |
|    | 9,4  | 0,0                                   | 0,0                     | 0,0   | 9,4   | (invisible)            |            |
|   | 0,0  | 12,9                                  | 0,0                     | 0,0   | 12,9  | 10 Hz                  | 0,46       |
|  | 0,0*   | 12,9                                  | 6,0                     | 0,0   | 18,9* | 7 Hz                   | 0,67*      |
|  | 0,0  | 0,0                                   | 6,0                     | 15,1  | 21,1  | cero                   | 0,75       |

El ATP quiral usado para estudiar el curso estereoquímico de la reacción catalizada por la hexoquinasa D fue una mezcla de las cuatro especies dadas en la primera línea de la Tabla, con las proporciones mostradas. Si la reacción enzimática procede con inversión de la configuración del átomo de fósforo, la ciclación (con una segunda inversión) del glucosa-6-fosfato producido, seguida por metilación en la posición axial, produce una mezcla de los seis triésteres indicados en la columna izquierda, cada uno de los cuales existe en dos formas anoméricas. Los cuatro triésteres que contienen <sup>17</sup>O no son visibles en el espectro de n.m.r. de <sup>31</sup>P, el que así contiene sólo ocho picos – dos anómeros para cada triéster que no contiene <sup>17</sup>O. Si la reacción enzimática procede con retención de la configuración, los valores indicados por \* deben intercambiarse en cada columna (y existirían dos triésteres adicionales que contienen <sup>17</sup>O). Por eso, la comparación entre los picos del [CH<sub>3</sub><sup>18</sup>O-] triéster (segunda línea) y del [<sup>18</sup>O=] triéster (quinta línea) indica si la reacción enzimática ha ocurrido con inversión o con retención de la configuración, o algún caso intermedio.

ma en el control de la concentración de la glucosa en la sangre (revisión en Pollard-Knight y Cornish-Bowden, 1982). Dadas estas diferencias, y en particular la propiedad, muy rara en una enzima monomérica, de mostrar una cooperatividad cinética, fue de interés determinar si sus propiedades estereoquímicas eran también peculiares para una quinasa.

Los detalles experimentales de la investigación del curso estereoquímico de la reacción catalizada por la hexoquinasa D pueden

encontrarse en otra parte (Pollard-Knight *et al.*, 1982). Es suficiente mencionar acá que se aplicó el método desarrollado por Lowe y colaboradores, usando los efectos de <sup>17</sup>O y <sup>18</sup>O en la n.m.r. de <sup>31</sup>P, y los espectros se registraron en un espectrómetro de Bruker WH 300 FT, con detección de cuadratura en 121,5 MHz. Los resultados se resumen en la Tabla 2. La razón de las intensidades de los picos para el [CH<sub>3</sub><sup>18</sup>O-] triéster y el [<sup>18</sup>O=] triéster (primera y tercera líneas de la Tabla) es

TABLA 2

Curso estereoquímico de la reacción catalizada por la hexoquinasa D

|  | Intensidades de picos de $^{31}\text{P}$ n.m.r. |                |           |
|--|---|----------------|-----------|
|  | Observado                                       | Calculado para |           |
|  |   | Inversión      | Retención |
|  | 1,00  | 1,00           | 0,67      |
|  | 0,50  | 0,46           | 0,46      |
|  | 0,69  | 0,67           | 1,00      |
|  | 0,63  | 0,74           | 0,74      |

La Tabla muestra las intensidades observadas en el espectro de n.m.r. de  $^{31}\text{P}$  para los picos de los cuatro triésteres axiales observables, producidos por ciclación y metilación del glucosa-6-fosfato generado en la reacción catalizada por la hexoquinasa D del hígado de rata. Con fines comparativos se muestran también los valores esperados para inversión y retención de la configuración en la fosforilación de la glucosa.

1,00/0,69, en excelente concordancia con la razón de 1,00/0,67 esperada si la reacción enzimática procede con inversión de la configuración del átomo de fósforo, y en completo desacuerdo con la razón de 0,67/1,00 esperada para retención de configuración, o con la de 1,00/1,00 esperada para racemización. La intensidad de 0,50 para el pico correspondiente al  $[\text{CH}_3^{18}\text{O}-, ^{18}\text{O}]=$  triéster está, además, en buen acuerdo con el valor esperado de 0,46. La concordancia para el triéster no marcado no es muy buena, pero es aceptable. Así, los resultados experimentales no permiten duda de que la reacción catalizada por la hexoquinasa D procede en esencia completamente con inversión de la configuración del átomo de fósforo.

## DISCUSION

De los tres métodos para analizar la estereoquímica de los productos de las reacciones de sustitución en átomos de fósforo, sólo el método de n.m.r. de  $^{31}\text{P}$  ha probado en la práctica ser de utilidad general. Si la sensibilidad de los instrumentos del dicroísmo circular se mejorara mucho, la determinación de esa propiedad puede llegar a ser el método más conveniente, porque es una propiedad con una relación directa con la estereoquímica y en principio no requiere el que se apliquen transformaciones químicas a los productos de la reacción. En este momento los efectos de sustitución isotópica son, sin embargo, demasiado pequeños para que el método de dicroísmo circular sea útil. Similarmente, las dificultades formidables asociadas con el uso de la espectrometría de masa no han permitido que este sea un método general.

Por el contrario, el método de n.m.r. de  $^{31}\text{P}$  ha probado ser apropiado para el uso ordinario, y ahora ha sido usado para estudiar numerosas enzimas en varios laboratorios. En todos los casos en que se hace una comparación entre los resultados obtenidos por este método, con sustratos naturales sustituidos isotópicamente y con los obtenidos con fosforotioatos, el curso estereoquímico de la reacción ha probado ser el mismo. Inicialmente hubo desacuerdo en relación con la reacción catalizada por 3':5'-nucleotidocíclico fosfodiesterasa, porque el uso del fosforotioato como sustrato sugirió inversión de la configuración (Burgers *et al.*, 1979), mientras que el uso del  $[^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}]$  sustrato sugirió retención (Jarvest y Lowe, 1980); más tarde Coderre *et al.* (1981), usando un  $[^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}]$  sustrato, encontraron inversión. Con el tiempo el desacuerdo fue resuelto en favor de la inversión cuando se detectó que se había hecho una asignación incorrecta de los isómeros geométricos del compuesto de referencia usado para la n.m.r. de  $^{31}\text{P}$  (Cullis *et al.*, 1981). El acuerdo actual entre los resultados con  $[^{17}\text{O}, ^{18}\text{O}]$  sustratos y con fosforotioatos existe en un contexto más amplio que el referente a las enzimas particulares que se han estudiado de ambas maneras, debido a que las enzimas parecen

clasificarse en clases estereoquímicas bien definidas, y las generalizaciones sugeridas por los dos métodos también están de acuerdo: por ejemplo, todas las quinasas, aparte de nucleósido-difosfato-quinasa (Sheu *et al.*, 1979), que, como se discute más adelante, es una excepción muy informativa, catalizan reacciones que proceden con inversión de la configuración.

Así surge la pregunta de si es necesario usar [<sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]sustratos, porque los fosforotioatos son en general más fáciles de preparar y los productos son más fáciles de analizar. Sin embargo, no solamente es útil tener un método que no dependa de ninguna suposición, no importa cuán bien justificada ella esté por resultados anteriores, sino que también hay algunas enzimas que no aceptan en absoluto fosforotioatos como sustratos, por ejemplo mutasas. Aunque no se conocen ejemplos de reacciones en que el curso estereoquímico cambie por sustitución de oxígeno por azufre, Jaffe y Cohn (1978) han comunicado que cuando ATPβS se usa como sustrato de la hexoquinasa de levadura o de la piruvato quinasa del músculo de conejo, la estereoespecificidad se cambia si el Cd<sup>2+</sup> se usa en lugar del Mg<sup>2+</sup> usual. Adicionalmente, si se debe analizar el curso estereoquímico de una reacción que presenta fosfato inorgánico como producto, la sustitución con <sup>18</sup>O y S y la sustitución con <sup>17</sup>O y <sup>18</sup>O son insuficientes para hacer quiral este producto, y se debe usar [<sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O]tiofosfato: Cardemil *et al.* (1986) describen el uso de este compuesto en otra parte de este simposio.

Para terminar, voy a discutir las posibles razones de por qué las quinasas catalizan reacciones que proceden, aparentemente en general, con inversión de configuración, pero en cambio las mutasas catalizan reacciones que proceden con retención, y por qué la nucleósido-difosfato-quinasa es una excepción única entre las quinasas. Como ha sido comentado por Lowe (1983), la gran mayoría de las quinasas catalizan reacciones en que un sustrato es MgATP y el otro es una molécula que no tiene ninguna similitud con MgATP, por ejemplo glucosa en el caso de la hexoquinasa. La quinasa debe poder reconocer dos

moléculas de tipos muy diferentes, y, por tanto, debe poder proveer dos sitios de unión bastante distintos. Debido a esto no hay ninguna razón conceptual para que ambos sustratos no puedan estar unidos a la enzima simultáneamente, lo que habría permitido la evolución de un mecanismo con una única reacción de sustitución. Con esta interpretación no debe sorprender que la nucleósido-difosfato-quinasa sea una excepción, porque es una enzima para la cual los dos sustratos son muy similares en estructura: uno es ATP, un nucleósido-trifosfato, y el otro corresponde a una amplia gama de nucleósidos-difosfatos. Desde un punto de vista evolutivo, sería más económico, por eso, en este singular caso, que la enzima provea solamente un sitio de unión en que ambos sustratos se unen en sucesión, y hubiera desarrollado un mecanismo en que hay dos reacciones de sustitución, una primera en que el ATP fosforila la enzima, seguida por una segunda, en que la fosfoenzima fosforila el sustrato nucleósido-difosfato. Así, esta excepción aparente, en realidad provee apoyo excelente para la interpretación general sugerida por las otras quinasas. Después de este análisis aparece obvio que en el caso de las mutasas, para las cuales ambos sustratos son en general muy similares, el mecanismo de la reacción deba ocurrir a través de dos reacciones de sustitución y, por ende, con retención de la configuración.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. María Luz Cárdenas por su ayuda en la preparación de la versión castellana de este artículo. Ayuda financiera de la Royal Society de Londres, de CONICYT y de la Universidad de Chile me permitió presentar este trabajo en Chile.

#### REFERENCIAS

- ABBOTT, S.J.; JONES, S.R.; WEINMAN, S.A. y KNOWLES, J.R. (1978) *J. Amer. Chem. Soc.* 100: 2558-2560.
- ABBOTT, S.J.; JONES, S.R.; WEINMAN, S.A., BOCKHOFF, F.M.; McLAFFERTY, F.W. y KNOWLES, J.R. (1979) *J. Amer. Chem. Soc.* 101: 4323-4332.
- BLATTNER, W.A. y KNOWLES, J.R. (1978) *J. Amer. Chem. Soc.* 101: 510-511.

- BURGERS, P.M.J.; ECKSTEIN, F.; HUNNEMAN, D.H.; BARANIAK, J.; KINAS, R.W.; LESIAK, K. y STEC, W.J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 9959-9961.
- CARDEMIL, E.; IYENGAR, R. y FREY, P.A. (1986) *Arch. Biol. Med. Exper.* 19, R-381 (Abstract).
- CARDENAS, M.L.; RABAJILLE, E. y NIEMEYER, H. (1984) *Biochem. J.* 222: 363-370.
- COHN, M. y HU, A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 75: 200-203.
- CULLIS, P.M. y LOWE, G. (1978) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 512-514.
- ECKSTEIN, F. (1975) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 14: 160-166.
- ECKSTEIN, F. (1979) *Accts. Chem. Res.* 12: 204-210.
- ECKSTEIN, F. (1983) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22: 423-506.
- ECKSTEIN, F. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54: 367-402.
- GERLT, J.A. (1984) en *Phosphorus-31 NMR: Principles and Applications* (Gorenstein, D.G., ed.), pp. 199-232, Academic Press, Orlando.
- JAFFE, E.K. y COHN, M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4823-4825.
- JARVEST, R.L.; LOWE, G. y POTTER, B.V.L. (1980) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1142-1147.
- JARVEST, R.L.; LOWE, G. y POTTER, B.V.L. (1981) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 3186-3195.
- JONES, S.K.; KINDMAN, L.A. y KNOWLES, J.R. (1978) *Nature, Lond.* 275: 564-565.
- KOSHLAND, D.E., JR. (1954) en *A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action* (McElroy, W.D. y Glass, B., eds.), pp. 608-664, Johns Hopkins Press, Baltimore.
- LI, T.M.; MILDVAN, A.S. y SWITZER, R.L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 3918-3923.
- LOWE, G. y POTTER, B.V.L. (1981) *Biochem. J.* 199: 227-233.
- POLLARD-KNIGHT, D. y CORNISH-BOWDEN, A. (1982) *Mol. Cell. Biochem.* 44: 71-80.
- POLLARD-KNIGHT, D.; POTTER, B.V.L.; CULLIS, P.M.; LOWE, G. y CORNISH-BOWDEN, A. (1982) *Biochem. J.* 201: 421-423.
- SHEU, K.-F.R.; RICHARD, J.P. y FREY, P.A. (1979) *Biochemistry* 18: 5548-5556.
- TSAI, M.-D. (1979) *Biochemistry* 18: 1468-1472.