

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Elizabeth Lira Silva¹, Ricardo Jasso Chávez¹ y Juan Pablo Pardo Vázquez²

¹Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología.

²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Correo: eli_lira_sil@hotmail.com

En la figura 1 se muestra la dependencia de la velocidad v vs $[Fru-6P]$ a concentraciones fijas variables de ATP, y se observa que la enzima tiene un sitio catalítico y un sitio alostérico por ATP, ya que concentraciones crecientes de ATP inhiben la actividad, como previamente se ha reportado para otras PFK-1. Para una enzima alostérica con cooperatividad positiva, el gráfico de dobles recíprocos ($1/v$ vs $1/S^n$) genera una curva cóncava hacia arriba, y la velocidad máxima se puede obtener al graficar ($1/v$ vs $1/S^n$), donde “n” se aproxima al número de sitios activos de la enzima. Se ha reportado que la PFK-1 es un tetramero, por lo que “n” debería tener un valor máximo de 4 (Moreno-Sánchez et al, 2012). A partir de la abscisa al origen del gráfico $1/v$ vs $1/S^4$, ver figura 1, se determinó que la V_{max} = 63.2 mU/mg.

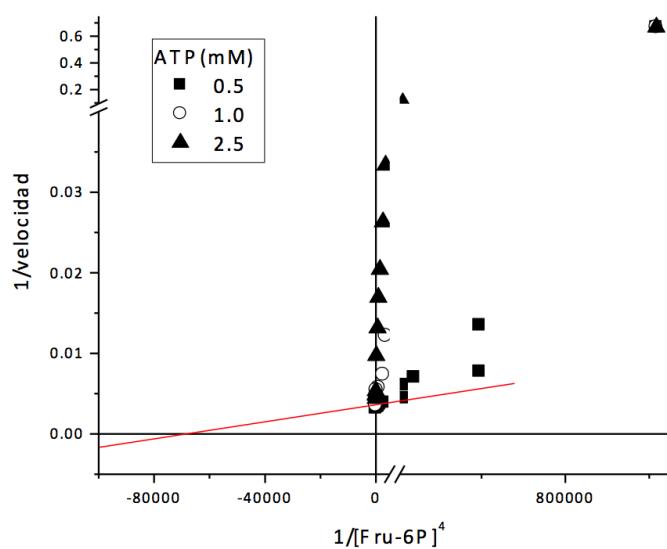


Fig. 1. Gráfica de $1/\text{velocidad}$ vs $1/(Fru-6P)^4$ a pH 7.0.

Para conocer la afinidad del sitio alostérico por el ATP, se debe determinar el número de sitios o subunidades que forman la enzima.

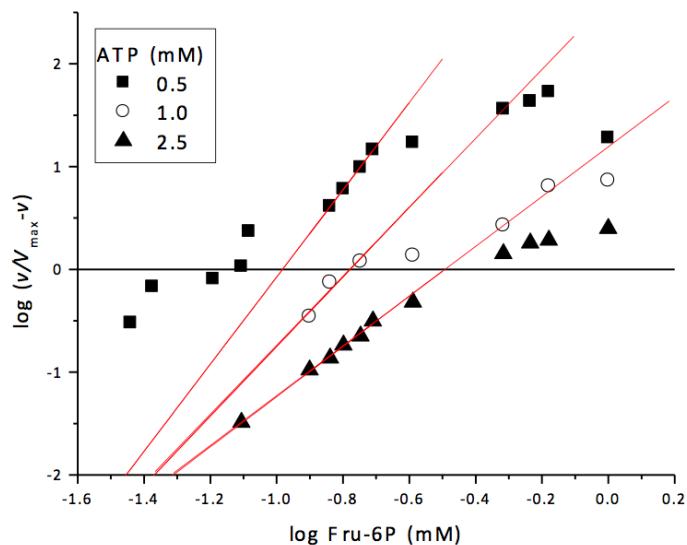


Fig. 2. Gráfico de Hill ($\log (v/V_{max}-v)$ vs $\log (Fru-6P)$).

Una forma de calcular el número aproximado de sitios es realizando un gráfico de Hill (Figura 2). En la figura 2 se graficó el $\log (v/ [V_{max}-v])$ vs $\log (Fru-6P)$ a diferentes concentraciones de ATP, donde la $n = 2.4$. Puesto que “n” representa un número aproximado del verdadero número de sitios que interactúan, el valor cercano a 2 se pueden interpretar de dos maneras: que la enzima tiene dos sitios catalíticos con alta cooperatividad, o que hay cuatro sitios catalíticos con baja cooperatividad. Se ha descrito que en células de mamífero la PFK-1 es un homo o heterotetrámero (Moreno-Sánchez et al, 2012). Es importante mencionar que para calcular la pendiente se consideraron solo los puntos entre 0.12-0.26 mM de Fru-6P, debido a que a muy bajas concentraciones de sustrato la velocidad ya no es lineal debido a que la Fru-6P puede unirse a sitios reguladores no catalíticos antes de unirse a los sitios catalíticos. Sin embargo, a concentraciones altas también es posible encontrar desviaciones de la linealidad, debido a la dificultad para detectar

pequeños cambios en la velocidad conforme se incrementa la concentración de sustrato o a que los sitios catalíticos poseen afinidades diferentes (Segel, 1975).

Para determinar la afinidad del sitio alostérico por el ATP se puede utilizar la ecuación de Búc para inhibidores alostéricos (ecuación 3) o activadores alostéricos (ecuación 4). En el gráfico de Búc (Fig. 3) se observa que a partir de la intersección en el eje de las abscisas se puede obtener la constante de disociación del sitio alostérico. El ATP inhibió con una $K_i = 0.95$ mM, mientras que la afinidad por ATP fue mayor ($K_{sATP} = 0.1-0.34$ mM), obtenida a partir del regráfico de $1/(La)^{1/n}$ vs $[S]$, ver figura 4 y ecuación 3a. La constante de transición alostérica fue $L=1.66$, lo que indica que la abundancia de ambos estados (T y R) es muy similar.

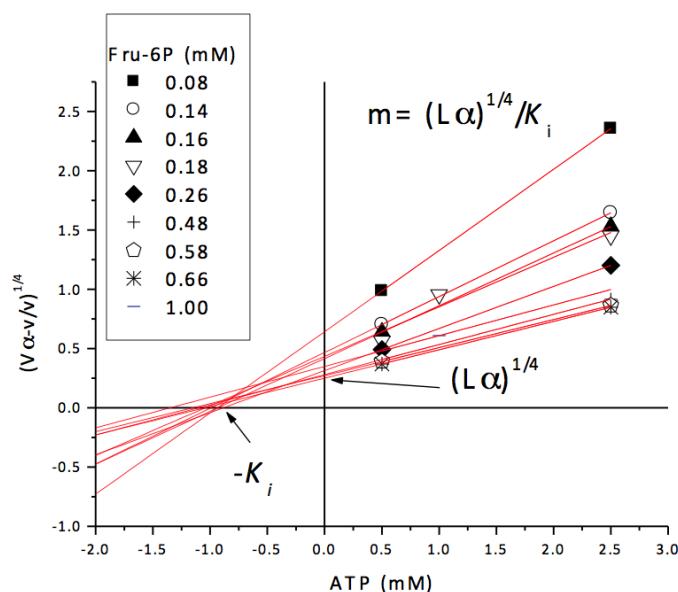


Fig. 3. Gráfico de Búc.

En el gráfico de Horn Börnig (figura 5) es posible calcular el número aproximado de subunidades "n" a partir de la pendiente de cada línea recta. En este caso, un valor de $n = 1.93$ sugiere que esta enzima puede ser un tetrámero, en concordancia con los resultados de la gráfica logarítmica de Hill (Fig. 2). La constante de transición alostérica determinada a partir de la ordenada al origen de la recta en ausencia de efector fue $L = 3.04$ y $L' = 270$ y 140 para 1.0 y 2.5 mM de ATP respectivamente. Los inhibidores incrementan la constante alostérica efectiva de L a L' , lo que hace que la línea recta se desplace por encima y de forma paralela a la línea control.

Al analizar el efecto alostérico del ATP sobre

la actividad de la PFK-1L, mediante el ajuste no lineal a partir de la ecuación de enlazamiento exclusivo (ecuación 5) utilizando el programa Origin 5.0 (Fig. 6), se observa como el comportamiento hiperbólico de las curvas disminuye a partir de 1.0 mM de ATP. A pesar de que el ATP es un potente inhibidor alostérico para la PFK-1, es difícil observar el comportamiento sigmoidal de la curva de velocidad en presencia del ATP debido a que la actividad de esta enzima se determinó utilizando un buffer de reacción que contenía K^+ y NH_4^+ (potentes activadores alostéricos de la PFK-1L) (Moreno-Sánchez et al., 2012). Se ha descrito que el ATP a bajas concentraciones actúa como sustrato mientras que a concentraciones altas se puede unir a un sitio no catalítico (inhibidor alostérico), causando un cambio conformacional que impide la catálisis. La inhibición de la PFK-1L por ATP tiene un sentido fisiológico debido a que la función principal de la glucólisis es la producción de ATP, es decir el flujo glucolítico se regula por la velocidad de producción y consumo de ATP (Reed et al., 2010).

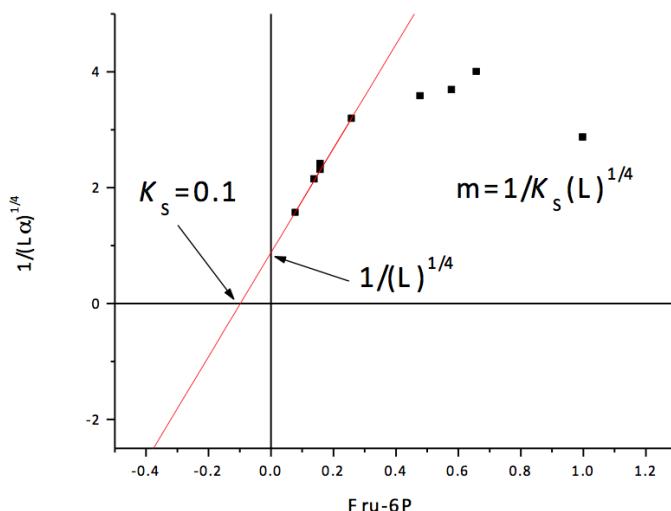


Fig. 4. Rengráfico de $1/(L\alpha)^{1/4}$ vs $[Fru-6P]$ para la obtención de K_s y L .

El efecto de la [Fru-2,6BP] (un activador alostérico) sobre la PFK-1, se puede analizar a partir de la curva de velocidad (Fig. 7), donde se observa que esta enzima presenta un comportamiento hiperbólico; la presencia de 5 μ M de Fru-2,6BP lleva al mínimo la cooperatividad de la PFK-1L (donde $n=1$). Esto correlacionó con los datos obtenidos por ajuste lineal mediante la ecuación de Hill y por ajuste no lineal utilizando la ecuación de enlazamiento exclusivo (Figuras 7 y 8). En la figura 8, se graficó $\log(v/V_{max}-v)$ vs $\log(Fru-6P)$ en

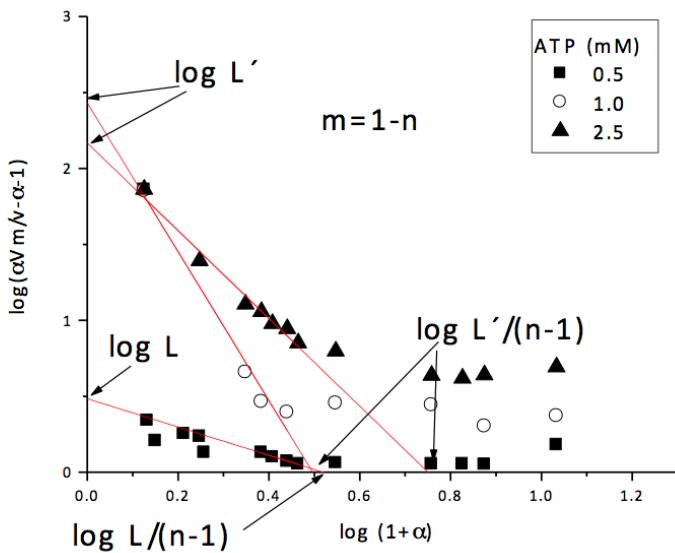


Fig. 5. Gráfico de Horn-Börnig. $\log (\alpha V_{max}/v-\alpha-1)$ vs $\log (1+\alpha)$ con diferentes concentraciones de inhibidor.

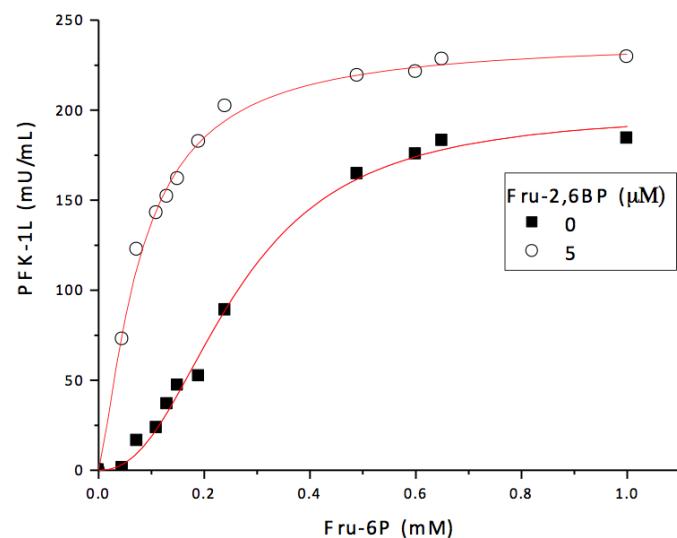


Fig. 7. Efecto de fru-2,6BP sobre la actividad de PFK-1L a varias concentraciones de Fru-6P a pH 7.0 y 2.5mM ATP. Los valores se ajustaron a la ecuación de enlazamiento exclusivo.

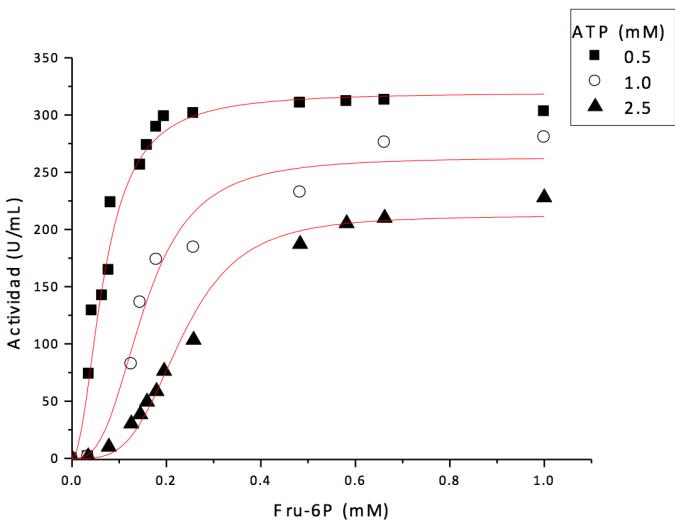


Fig. 6. Efecto del ATP sobre la actividad de PFK-1L a diferentes concentraciones de Fru-6P a pH 7.0. Los valores se ajustaron a la ecuación de enlazamiento exclusivo.

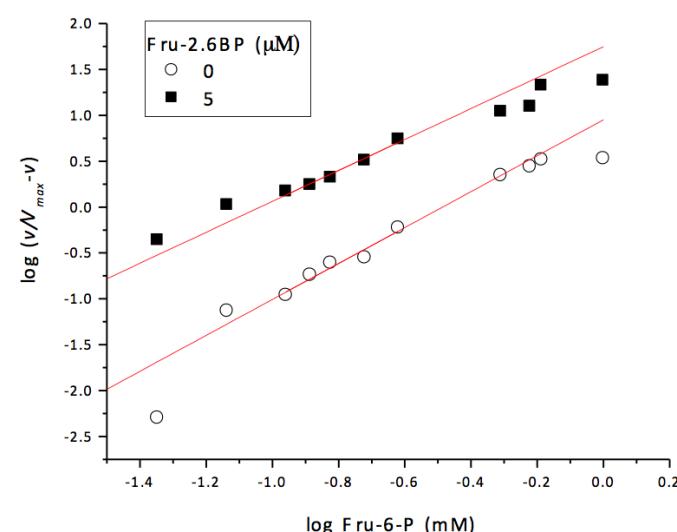


Fig. 8. Gráfico de Hill, $\log (v/V_{max}-v)$ vs $\log (Fru-6P)$ en presencia y ausencia de Fru-2,6BP.

ausencia y presencia de [Fru-2,6BP] para conocer el valor de "n". Se determinó que $n= 1.66$; esto no significa que la enzima no sea un tetramero, sino que los activadores en la mezcla de reacción minimizaron la cooperatividad de la PFK-1L.

Para determinar la afinidad de la Fru-2,6-BP por el sitio alostérico se puede utilizar la ecuación de Búc para activadores alostéricos (ecuación 4). En el gráfico de Búc (Fig. 9) la intersección en el eje

de las abscisas indica la constante de disociación para el sitio alostérico. La K_A fue de $2.38 \mu M$. Al realizar el regráfigo de $1/(L\alpha)^{1/4}$ vs $[S]$ (Fig. 10), se puede obtener el valor de $L\alpha=222$ a partir de la ordenada al origen y la $K_s=0.34 \text{ mM}$ a partir de la abscisa al origen (ver ecuación 4a). A partir de este regráfigo es posible obtener la constante de transición alostérica $L=22.7$.

En el gráfico de Horn Börnig en presencia del

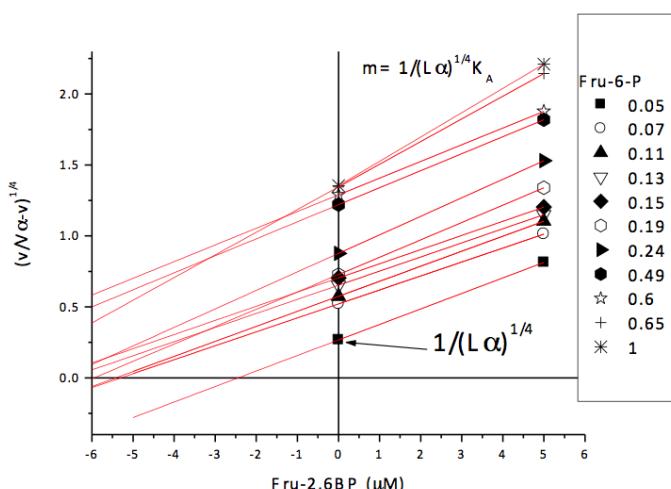
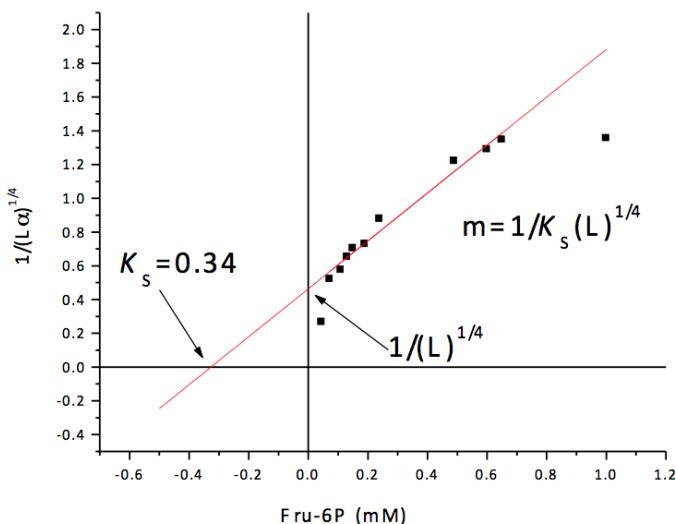
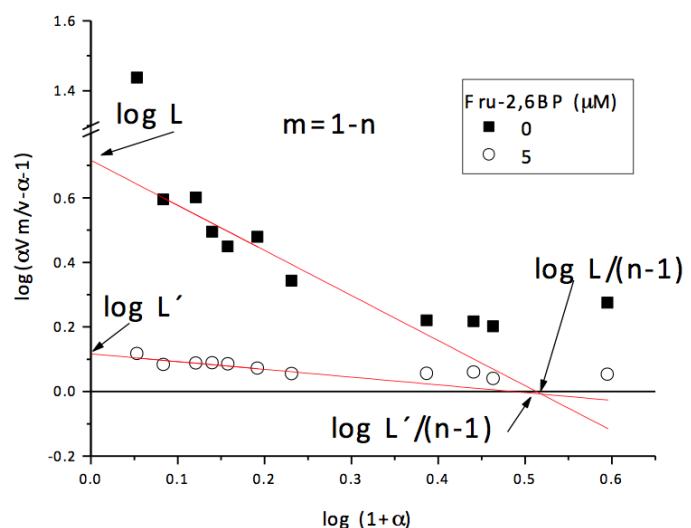


Fig. 9. Gráfico de Búc.

Fig. 10. Regráfico de $1/(L\alpha)^{1/4}$ vs [Fru-6-P].

activador (Fig. 11) se obtuvo que $n=2.39$. Esto correlaciona con los valores obtenidos a partir del ajuste lineal. Se determinó la constante de transición alostérica $L=5$ a partir de la recta en ausencia de activador y $L'=1.28$ obtenida partir de la recta en presencia de activador. Se ha descrito que los activadores disminuyen la constante de transición alostérica efectiva de L a L' , lo que hace que la línea recta se desplace por debajo y de forma paralela a la línea control. Es importante mencionar que la pendiente de estas rectas no fue de -3 como se esperaba teóricamente (porque la PFK-1L es un tetrámero $n=4$). Esto se debió quizás a los errores introducidos durante el proceso de transferencia de datos a partir de datos publicados

Fig. 11. Gráfico de Horn-Börnig. $\log(\alpha V_{max}/v - \alpha - 1)$ vs $\log(1 + \alpha)$ con diferentes concentraciones de activador.

previamente (Mediavilla et al, 2007), los cuales se digitalizaron usando el software WinDig 2.5. Estos errores pueden interferir en los cálculos y causar la dispersión de datos, sobre todo cuando los valores de $\log(1 + \alpha)$ son muy bajos o muy altos.

CONCLUSIONES

En este trabajo se determinaron los parámetros cinéticos para la enzima alostérica PFK-1L de *Sparus aurata*, en presencia de ATP (inhibidor alostérico) o Fru-2,6BP (activador alostérico). Se utilizaron diferentes métodos mediante ajuste lineal (Hill, Búc, Horn Börnig) y no lineal (utilizando la ecuación de Hill y la ecuación de enlazamiento exclusivo para inhibidores y activadores). Los parámetros cinéticos obtenidos bajo estas diferentes aproximaciones se resumen en la Tabla III, donde se puede observar que la K_s para el ATP está en el intervalo μM , por lo que con 0.5 mM ya se observa inhibición. Por esto el ensayo enzimático debería realizarse con concentraciones menores de ATP que no sean inhibitorias.

Con base en el análisis cinético realizado, es posible concluir que ningún método lineal por sí solo permite obtener todos los parámetros cinéticos K_s , n , L , K_i , K_A . Mientras que el ajuste no lineal permitió obtener todos los parámetros cinéticos con valores muy similares a los obtenidos con los diferentes métodos gráficos (ajuste lineal) excepto para la K_s para ATP y el valor de L , en donde los distintos métodos dan valores muy diferentes,

Tabla III

Parametros cinéticos obtenidos a partir de los diferentes métodos por ajuste lineal y ajuste no lineal

Parámetros cinéticos	Ajuste lineal				Ajuste no lineal
	Lineal	Hill	Búc	Horn Börnig	Enlazamiento exclusivo
V_{max} (mU/mg)	63.2				41.4-63.8
K_s (mM) ATP	0.34		0.1-0.34		0.005-0.006
K_i (mM) ATP			0.95		0.9
K_A (μ M) Fru-2,6BP			2.38		2.38
L	1.6-1.98		1.66	3-5	116
n	1.6-2.4			1.93-2.39	2.01

esto probablemente se debe a que por simplicidad el análisis se realizó utilizando consideraciones de equilibrio rápido y quizás esto no se aplique del todo a una enzima alostérica, por lo que para fines experimentales debería realizarse otro tipo de análisis complejos.

Aunque el análisis cinético sugiere que la PFK-1L es un tetrámero, con esto no es posible concluir el estado oligomérico de la enzima, por lo cual sería conveniente realizar experimentos de exclusión molecular para determinar la estructura de la enzima.

Finalmente, es importante mencionar que el interés por estudiar enzimas como la PFK-1L de *Sparus aurata*, radica en identificar el posible papel que esta enzima tiene en la adaptación metabólica frente a un cambio de dieta (proteínas por carbohidratos). Por lo que analizar sus características cinéticas y conocer sus moduladores alostéricos podría permitir modificarla ya que puede ser un punto de control metabólico en la glicolisis y con ello favorecer el desarrollo de fármacos (activadores alostéricos). En este caso podría ofrecer alternativas terapéuticas para mejorar el tratamiento de la diabetes II en mamíferos.

REFERENCIAS

1. Mediavilla D, Metón L, Baanante IV (2008) Purification and Kinetic Characterization of 6-Phosphofructo-1-kinase from the Liver of Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*). J Biochem 144, 235-244.
2. Marín-Hernández A, Rodríguez-Enríquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Macías-Silva M, Sosa-Garrocho M, Moreno-Sánchez R (2006) Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. FEBS Journal 273, 1975-1988.
3. Sharma Bechan (2011) Kinetic Characterization of Phosphofructokinase Purified from *Setaria cervi*: A Bovine Filarial Parasite. Enzyme Research. Vol. 11 doi:10.4061/2011/939472.
4. Horn y Börnig (1969) Analyses of kinetic data of allosteric enzymes by a linear plot. 3(5):325,329
5. Moreno-Sánchez R, Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Quezada H, Encalada R, Rodríguez-Enríquez S, Saavedra E (2012) Phosphofructokinase type 1 kinetics, isoform expression, and gene polymorphisms in cancer cells. J Cell Biochem. 113(5):1692-703.