

UCH-FC
MAG-B
E 77
C.L

EFFECTO DE LOS SUSTRATOS EN LA MODIFICACION
DE LOS GRUPOS SULFHIDRILO DE FOSFOFRUCTOQUINASAS TIPO 2
DE Escherichia coli

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Bioquímica

Facultad de Ciencias

por

LUZ XIMENA ESPINOSA MEDINA

1987

Director de Tesis: Dr. Jorge Babul C.



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

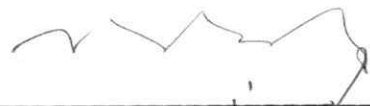
I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E M A G I S T E R

Se informa al Consejo de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

Ximena Espinosa Medina

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Bioquímica, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de Abril de 1987

Director de Tesis
Dr. Jorge Babul



Comisión Informante de Tesis

Dr. Sergio Basaez



Dr. Hermann Niemeyer M.

Dr. Octavio Monasterio



Dr. Juan C. Slebe

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile bajo la dirección del Dr. Jorge Babul C. (Departamento de Química, Facultad de Ciencias) y fue financiada parcialmente por la Dirección de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile (Proyectos B-110, B-1368 y B-1998), por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo PNUD-UNESCO (Proyecto CHI-81/001), por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Proyectos 0255 y 1134) y por la Organización de los Estados Americanos, OEA.

A Fernando y a mis hijos
Fernando, X. Paulina
María del Pilar y Claudia,
por su cariño, comprensión
y paciencia.

A mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que me han ayudado en esta etapa de mi vida profesional, en especial

A Jorge Babul C., por sus enseñanzas y cooperación otorgada durante la dirección de esta tesis y quien con su personalidad hizo llevaderos algunos momentos difíciles.

Al Dr. Hermann Niemeyer F., quien con sus cualidades humanas, enseñanzas y críticas oportunas me hizo comprender el sentido de la rigurosidad científica y la enseñanza de ella.

A Eliana, Tito, Octavio, Any, Vicky y Rosalba, por todos estos años en que me han permitido crecer junto a ellos.

A Patricia, Claudio, Juan Carlos, Sergio y Ana María, quienes han compartido alegrías y desazones en la búsqueda de esta meta.

A Soledad, Carmen y Manuel, por su apoyo a nuestra labor.

A las autoridades de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, por darme las facilidades necesarias para llegar al término de este perfeccionamiento.

Y en fin, a todos los que siempre me han apoyado con su amistad y que sería largo enumerar.

Gracias

INDICE DE MATERIAS

	pág.
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCION	1
Estructura y función de enzimas	1
Fosfofructoquinasas de <u>E. coli</u>	4
Modificación química	9
MATERIALES Y METODOS	14
Reactivos	14
Obtención y purificación de las enzimas	14
Estabilidad y mantención de las enzimas	15
Determinación de la actividad enzimática	16
Remoción del ditiotreitól de las preparaciones enzimáticas	18
Modificación química de Pfk-2 y Pfk-2*	18
RESULTADOS	20
Estabilidad de Pfk-2 y Pfk-2* en ausencia de DTT	20
Inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB a 25°C	20
Reversión de la modificación por DTT	20
Cálculo de las constantes de inactivación	23
Variación de la velocidad de inactivación con la concentración de DTNB	26

	pág.
Efecto de ligandos sobre la inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB	36
Efecto de los sustratos y de ATP ⁻⁴	36
Efecto de los productos	40
Efecto de los sustratos en la inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por NEM	40
DISCUSION	49
Inactivación de las enzimas por DTNB	50
Efecto de los sustratos en la modificación	52
Fosfofructoquinasa-2	52
Fosfofructoquinasa-2*	56
Efecto de los productos en la inactivación de las enzimas	57
Modificación química de grupos-SH de otras fosfofructoquinasas	58
REFERENCIAS	62

LISTA DE TABLAS

		pág
Tabla 1	Fosfofructoquinasas de la cepa silvestre y de mutantes de <u>E. coli</u>	6
Tabla 2	Constantes cinéticas para la inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB	30

LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 1	Estabilidad de Pfk-2 y Pfk-2* a 25°C en ausencia de DTT	21
Figura 2	Inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB a 25°C	22
Figura 3	Reactivación por DTT de Pfk-2 y Pfk-2* inactivadas por DTNB	24
Figura 4	Determinación de las constantes de inactivación de las enzimas por DTNB	25
Figura 5	Inactivación de Pfk-2 por DTNB	27
Figura 6	Inactivación de Pfk-2* por DTNB	29
Figura 7	Influencia de la concentración de DTNB sobre la constante de inactivación (k_{i1}) de Pfk-2	31
Figura 8	Influencia de la concentración de DTNB sobre la constante de inactivación (k_{i1}) de Pfk-2*	32
Figura 9	Gráfica de dobles recíprocos de la constante de inactivación de Pfk-2 con respecto a la concentración de DTNB	34
Figura 10	Gráfica de dobles recíprocos de la constante de inactivación de Pfk-2* con respecto a la concentración de DTNB	35
Figura 11	Efecto de $MgATP^{-2}$ 1 mM sobre la inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB	37
Figura 12	Inactivación de Pfk-2 en presencia de los sustratos (1 mM)	38
Figura 13	Inactivación de Pfk-2* en presencia de los sustratos (1 mM)	39
Figura 14	Efecto de la concentración de los sustratos en la inactivación de Pfk-2	41

		pág.
Figura 15	Efecto de la concentración de los sustratos en la inactivación de Pfk-2*	42
Figura 16	Inactivación de Pfk-2 en presencia de los productos	43
Figura 17	Inactivación de Pfk-2* en presencia de los productos	44
Figura 18	Inactivación de Pfk-2 por NEM en presencia de los sustratos	45
Figura 19	Inactivación de Pfk-2* por NEM en presencia de ATP ⁻⁴	46
Figura 20	Inactivación de Pfk-2* por NEM en presencia de los sustratos	48

ABREVIATURAS

fructosa-6-P	fructosa-6-fosfato
F6P	fructosa-6-fosfato
fructosa-1,6-P ₂	fructosa-1,6-bisfosfato
FDP	fructosa-1,6-bisfosfato
DTT	ditiotreitól
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
NEM	N-etilmaleimida
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

La cepa silvestre de E. coli presenta dos isoenzimas de fosfofructoquinasa. Pfk-1 es la isoenzima principal y Pfk-2 la minoritaria. Cepas con la mutación pfkB1 presentan niveles aumentados de Pfk-2, y cepas con la mutación cercana pfkB10 presentan una enzima alterada estructuralmente, Pfk-2*.

Cepas que no contienen Pfk-1 pero con altos niveles de Pfk-2 crecen bien en glucosa y en sustratos gluconeogénicos, mientras que cepas isogénicas con altos niveles de Pfk-2* crecen bien en glucosa pero muy lentamente en compuestos gluconeogénicos.

Pfk-2 y Pfk-2* difieren en su estabilidad a temperaturas bajas, en su mecanismo cinético, susceptibilidad a la inhibición por fructosa-1,6-P₂ y MgATP⁻², y en el efecto de ligandos en el estado de agregación.

En esta Tesis se continúa la caracterización estructural de las enzimas por medio del estudio de la modificación química de grupos-SH y la importancia de éstos en la actividad de Pfk-2 y Pfk-2*.

Se observó una mayor reactividad de Pfk-2*, comparada con Pfk-2, hacia DTNB y NEM. En ambos casos Pfk-2 y Pfk-2* presentan dos fases de inactivación con cinética de pseudoprimer orden, una rápida y otra lenta. El proceso de inactivación es dependiente de la concentración del

reactivo modificador y ocurre sin la formación previa de un complejo enzima-reactivo. El valor de la constante de segundo orden para la primera fase de inactivación de Pfk-2* a 0°C es 25 veces superior al de Pfk-2. Estos resultados sugieren, entre otras posibilidades, que grupos-SH importantes para la actividad de las enzimas que reaccionan con los reactivos modificadores son más reactivos en Pfk-2* que en Pfk-2, están más accesibles, o ambos a la vez.

MgATP⁻² actuó como protector frente a la inactivación de Pfk-2 por DTNB y NEM, mientras que el efecto protector del fructosa-6-P fue parcial. Al aumentar la concentración de fructosa-6-P en presencia de MgATP⁻² disminuyó el efecto protector de este último. Estos resultados se relacionan con los obtenidos mediante estudios cinéticos y fisicoquímicos en los cuales fructosa-6-P, por una parte, disminuye la inhibición que produce MgATP⁻² y, por otra, revierte la tetramerización producida por el nucleótido. La unión del fructosa-6-P junto con ATP⁻⁴ no protege a la inactivación. Estos experimentos sugieren que los grupos SH no están ubicados en el sitio activo y que la protección por MgATP⁻² está relacionada con la unión del nucleótido a un sitio alostérico regulatorio para el mismo.

En el caso de Pfk-2*, MgATP⁻² no actuó como protector de la inactivación y el efecto del fructosa-6-P fue también parcial. Sin embargo, al aumentar la concentración

de MgATP^{-2} en presencia de fructosa-6-P la protección aumentó notablemente. En forma diferente a lo observado para Pfk-2, la reacción de los grupos-SH de Pfk-2* provocó la inactivación total de la enzima. Estos resultados sugieren que la protección observada por fructosa-6-P y MgATP^{-2} en conjunto, se debe a la unión de éstos al sitio activo. Esto enmascararía a los grupos-SH ubicados en este sitio o provocaría un cambio conformacional que impediría la reacción de los grupos SH importantes para la actividad ubicados en un sitio distinto del activo.

ABSTRACT

The wild type strain of E. coli contains two phospho-fructokinase isozymes. Pfk-1 is the main isozyme and Pfk-2 the minor one. Strains with the pfkB1 mutation present increased levels of Pfk-2 while strains with a closely linked mutation contain a structurally altered enzyme, Pfk-2*. Strains lacking Pfk-1 that contain high levels of Pfk-2 grow well on sugars and gluconeogenic compounds, while isogenic strains with high levels of Pfk-2* grow well on sugars, but very slowly under gluconeogenic conditions.

Pfk-2 and Pfk-2* differ in their stability at low temperatures, kinetic reaction mechanism, inhibitability by fructose-1,6-P₂ and MgATP⁻², and effect of ligands on their aggregation states. In this Thesis advances will be made in the structural characterization of the enzymes by chemical modification of SH-groups important for the activity of Pfk-2 and Pfk-2*.

Pfk-2* reacted more readily towards DTNB and NEM compared with Pfk-2. In both cases, Pfk-2 and Pfk-2* showed two inactivation phases with pseudofirst order kinetics, a fast and a slow one. The inactivation process was dependent on the concentration of the reagent and proceeds without the previous formation of an enzyme-reagent complex. The second order rate constant for the

fast inactivation phase of Pfk-2* at 0°C is 25-fold higher than the one for Pfk-2. These results suggest, between other possibilities, that SH-groups important for the activity of the enzymes that react with the reagent are more reactive in Pfk-2* than Pfk-2, and/or are more accessible.

MgATP²⁻ protected Pfk-2 against inactivation by DTNB and NEM, while the effect of fructose-6-P was only partial. The protective effect of the nucleotide diminished upon increasing the fructose-6-P concentration in the presence of MgATP²⁻. These results are related with the those obtained by kinetic and sedimentation studies in which, on the one hand, fructose-6-P diminishes the inhibitability of Pfk-2 by MgATP²⁻, and on the other, reverts the tetramerization produced by the nucleotide. The binding of fructose-6-P together with ATP⁴⁻ did not show protection against inactivation. These results, taken together, suggest that the SH groups are not located at the active site and that the MgATP²⁻ protection is related to the binding of the nucleotide to an allosteric regulatory site.

In the case of Pfk-2* MgATP²⁻ did not protect the enzyme against inactivation, and the effect of fructose-6-P was only partial. Nevertheless, the protective effect increased considerably upon increasing the MgATP²⁻ in the presence of fructose-6-P. Contrary to the results obtained with Pfk-2, the reaction of the

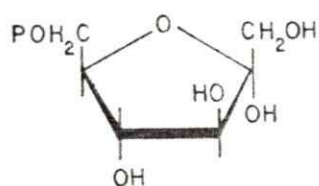
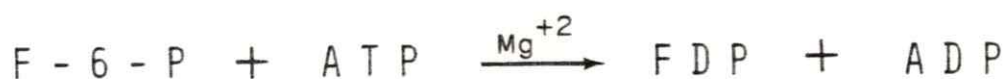
SH-groups in Pfk-2* resulted in a complete inactivation of the enzyme. These results suggest that the effect observed in the presence of fructose-6-P and $MgATP^{2-}$ is due to the binding of these compounds to the active site of the enzyme. This could mask the SH-groups located at this site or would provoke a conformational change that does not allow the reaction of the SH groups important for the activity located at a site other than the active site.

INTRODUCCION

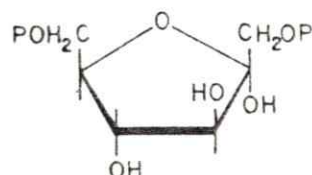
Estructura y función de enzimas

La actividad biológica de una enzima está asociada con una estructura tridimensional específica de la molécula. Sin embargo, sólo una pequeña fracción de los aminoácidos constituyentes participa como elementos activos de la actividad biológica; la mayoría de ellos son elementos estabilizadores. Por otra parte, se sabe que muchas enzimas están compuestas por más de una cadena polipeptídica, pero no se conocen bien las ventajas de esta asociación. Aún cuando se han estudiado las propiedades de una gran variedad de enzimas de diversas fuentes, aún no están claras las relaciones entre su estructura y la función que desempeñan en la célula. En el caso de las enzimas reguladoras, estas relaciones son más difíciles de establecer por la complejidad estructural de ellas.

Un grupo de enzimas que ha sido muy estudiado es el que participa en la secuencia de reacciones que convierten a la glucosa en piruvato y en especial aquellas consideradas claves en la regulación de esta vía metabólica, como la fosfofructoquinasa (ATP: D-fructosa-6-fosfato 1 fosfo-transferasa, EC 2.7.1.11). Esta enzima cataliza la transferencia del fosfato terminal del ATP al hidroxilo del C-1 de la fructosa-6-P para formar fructosa-1,6-P₂, según la siguiente reacción:



D-Fructosa 6-fosfato



D-Fructosa 1,6-difosfato

La enzima ha sido aislada y purificada de diversas fuentes y se ha demostrado que una variedad de ligandos puede afectar su actividad (Bloxham y Landy, 1973; Uyeda, 1979; Kemp y Foe, 1983). Los ligandos incluyen sustratos, productos, cationes divalentes, AMP, cAMP y otros metabolitos intermediarios tales como citrato y 3-P-glicerato. En general se ha visto que las principales características en la regulación de la mayoría de las fosfofructoquinasas son: inhibición por altas concentraciones de ATP e inhibición por citrato. La inhibición producida por ATP disminuye en presencia de Pi, AMP, cAMP, fructosa-1,6-P₂ y fructosa-6-P. Además, presentan una función de saturación sigmoideal con respecto a fructosa-6-P. En los últimos años se ha descrito al fructosa-2,6-P₂ como un activador muy potente de la fosfofructoquinasa; revierte la inhibición por ATP a concentraciones muy bajas y aumenta la afinidad de la enzima por fructosa-6-P (Hers y Van Schaftingen, 1982; Uyeda y col., 1981).

Otro modo de regulación de la actividad de la fosfo-

fructoquinasa es por medio de reacciones que cambian el estado de agregación de la enzima debido a la acción de sustratos y efectores (Mansour, 1972; Hesterberg y Lee, 1982; Luther y col., 1983; Gottschalk y col., 1983; Reinhart, 1983; Mayr, 1984a; Guixé, 1985; Luther y col., 1985). Las enzimas de músculo y de levadura tienen estructuras oligoméricas complejas con subunidades de M_r de 85.000 y 100.000 respectivamente. En contraste, las enzimas de bacterias son más pequeñas y tienen propiedades más simples de control (Sols y col., 1981; Baumann y Wright, 1968; Babul, 1978; Evans y Hudson, 1979; Guixé y Babul, 1985a, 1985b; Kotlarz y Buc, 1981).

Debido a la complejidad estructural de la fosfofructoquinasa, el conocimiento de las relaciones entre su estructura y función es aún muy incompleto. Varios son los estudios que han contribuido a tener una mejor comprensión del problema. Entre éstos se destacan los de cinética enzimática, de fisicoquímica de macromoléculas en solución, de difracción de rayos X y los de modificación química de cadenas laterales de aminoácidos. Debido a la complejidad estructural mencionada, se hace necesario simplificar el sistema estudiando un aspecto a la vez, como por ejemplo comparando dos sistemas casi idénticos. Al respecto, la obtención de proteínas mutadas de bacterias, donde se ha producido uno o unos pocos cambios de aminoácidos que afectan la función de la proteína, ha resultado

de gran utilidad (Fraenkel y Vinopal, 1973; Fraenkel, 1981; Fraenkel, 1986; Babul, 1978; Daldal y col., 1982; Campos y col., 1984; Guixé y Babul, 1985a, 1985b; Sedivy y col., 1986).

Fosfofructoquinasas de Escherichia coli

Escherichia coli presenta dos isoenzimas de fosfofructoquinasa (Fraenkel y col., 1973): Pkf-1 es la enzima mayoritaria y representa alrededor del 90% de la actividad fosfofructoquinásica y ha sido ampliamente estudiada (Blangy y col., 1968; Kotlarz y Buc, 1977; Babul y col., 1977; Babul, 1978). Presenta cinética sigmoideal con respecto a fructosa-6-P, inhibición por fosfoenolpiruvato y activación por ADP. Es un tetrámero de subunidades de M_r 34.000 (Thornburgh y col., 1978; Kotlarz y Buc, 1977; Babul, 1978) y está especificada por el gen pfkA (Thomson, 1977).

Pfk-2 es la isoenzima minoritaria y representa el 10% de la actividad total en la cepa silvestre. Es un dímero de subunidades de M_r 36.000 (Babul, 1978; Guixé, 1985; Guixé y Babul, manuscrito en preparación), presenta cinética de saturación hiperbólica con respecto a fructosa-6-P, no es inhibida por fosfoenolpiruvato pero, a diferencia de Pfk-1, es inhibida por fructosa-1,6- P_2 (Babul, 1978). Recientemente se ha demostrado que posee algunas propiedades reguladoras in vitro (Kotlarz y Buc, 1981;

Daldal y col., 1982; Guixé y Babul, 1985a). Pfk-2 está especificada por el gen pfkB (Daldal y Fraenkel, 1981; Daldal, 1983, 1984).

Cepas con la mutación pfkB1 presentan niveles aumentados de Pfk-2, alrededor de 30 veces con respecto a la cepa silvestre (Babul, 1978); cepas con una mutación cercana, pfkB10, presentan una Pfk-2 de menor estabilidad llamada Pfk-2* (Daldal y col., 1982) y cepas con ambas mutaciones, pfkB1 pfkB10, presentan altos niveles de Pfk-2* (Tabla 1).

La función de PFK-2 en la cepa silvestre no se conoce bien. Cepas carentes de Pfk-1 pero con altos niveles de Pfk-2 (mutación pfkB1) crecen bien en glucosa y en sustratos gluconeogénicos (Robinson y Fraenkel, 1978; Daldal y col., 1982). Sin embargo, cepas isogénicas que contienen altos niveles de PFK-2* (doble mutación pfkB1 pfkB10) crecen bien en glucosa pero lentamente en sustratos gluconeogénicos como glicerol (Daldal y col., 1982) (Tabla 1).

Se ha intentado explicar esta diferencia en crecimiento por medio del estudio in vitro de las características cinéticas de Pfk-2 y Pfk-2* purificadas (Daldal y col., 1982; Campos y col., 1984; Guixé y Babul 1985a; Guixé y Babul, 1985b; Guixé, 1985). Ambas enzimas poseen un mecanismo en secuencia ordenada con un orden diferente de entrada de los sustratos y salida de los productos (Campos

Tabla 1

FOSFOFRUCTOQUINASAS DE LA CEPA SILVESTRE

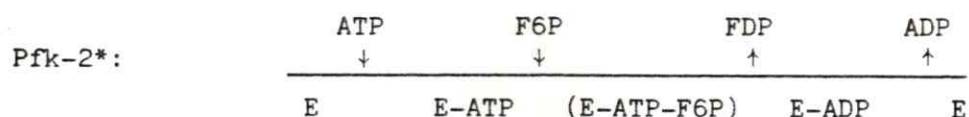
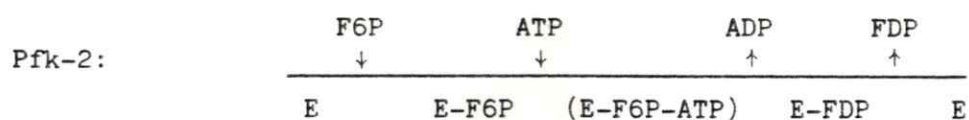
Y DE MUTANTES DE Escherichia coli.

Crecimiento en glucosa y en glicerol.

CEPAS (genotipo relevante)	ENZIMAS	TIEMPOS DE DUPLICACION ^a	
		GLUCOSA	GLICEROL
			min
<u>pfkA</u> ⁺ <u>pfkB</u> ⁺ , silvestre	90% Pfk-1 + 10% Pfk-2	58	80
<u>pfkA</u> ⁻ <u>pfkB</u> ⁺	Pfk-2, niveles bajos	250	110
<u>pfkA</u> ⁻ <u>pfkB1</u>	Pfk-2, niveles altos	80	95
<u>pfkA</u> ⁻ <u>pfkB1</u> <u>pfkB10</u>	Pfk-2*, niveles altos	60	350

^aDatos tomados de Daldal y col. (1982).

y col., 1984), lo que indica diferencias estructurales en los sitios activos de las enzimas. Los esquemas son los siguientes:



Ambas enzimas presentan un comportamiento diferente hacia MgATP^{-2} (Guixé y Babul, 1985a), un inhibidor de la mayoría de las fosfofructoquinasas estudiadas. Pfk-2 es inhibida por MgATP^{-2} a bajas concentraciones de fructosa-6-P (0,1 mM), mientras que Pfk-2*, en condiciones similares, no es inhibida. A altas concentraciones de fructosa-6-P (1 mM) ninguna de las enzimas es inhibida por MgATP^{-2} . Sin embargo, ATP^{-4} se comporta como un inhibidor competitivo con respecto a MgATP^{-2} tanto de Pfk-2 como Pfk-2*. Estos resultados sugieren que la inhibición de Pfk-2 por MgATP^{-2} se produce por la unión de este compuesto a un sitio alostérico, el que estaría alterado en Pfk-2*.

Es interesante destacar que el cambio estructural generado por la mutación pfkB10 no altera la actividad catalítica de Pfk-2. Ambas enzimas, Pfk-2 y Pfk-2*, presen-

tan constantes cinéticas similares para ATP y fructosa-6-P (Campos y col., 1984).

Se ha observado que el mecanismo de acción de algunos ligandos que afectan la actividad de algunas fosfofructoquinisas es por medio de cambios en el estado de agregación de las enzimas (Hammes, 1982; Bloxham y Lardy, 1973; Kotlarz y Buc, 1981; Uyeda, 1979; Guixé y Babul, 1985b; Guixé, 1985). Experimentos de ultracentrifugación zonal en gradientes de sacarosa de Pfk-2 muestran que la enzima puede estar presente como tetrámero o dímero dependiendo de las concentraciones relativas de $MgATP^{-2}$, ATP^{-4} y fructosa-6-P (Guixé, 1985; Guixé y Babul, 1985b; Guixé y Babul, manuscrito en preparación). En condiciones bajo las cuales Pfk-2 es inhibida (concentraciones bajas de fructosa-6-P y altas de $MgATP^{-2}$) la enzima se presenta como un tetrámero. A medida que se aumenta la concentración de fructosa-6-P el efecto inhibitorio de $MgATP^{-2}$ desaparece y la enzima es convertida a un dímero. Por otra parte, Pfk-2* se comporta como un dímero en estas condiciones. Estos resultados sugieren una relación entre el estado de agregación de la enzima y el sitio alostérico para $MgATP^{-2}$ presente en Pfk-2 pero aparentemente alterado en Pfk-2*.

En nuestro laboratorio se ha continuado la caracterización estructural y cinética de Pfk-2 y Pfk-2*. Por una parte, se están comparando las estructuras primarias de ambas enzimas para determinar la magnitud del cambio

estructural provocado en Pfk-2 por la mutación pfkB10 (Retamal, 1987) y se está estudiando el efecto del pH en la actividad de las enzimas para obtener información acerca de los aminoácidos que forman parte del sitio activo de las enzimas (Guzmán, 1987).

Modificación química

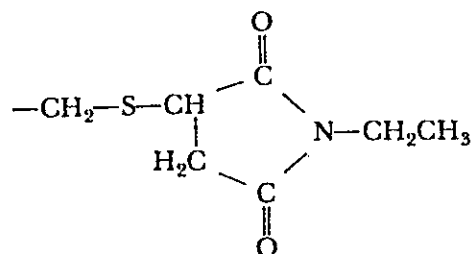
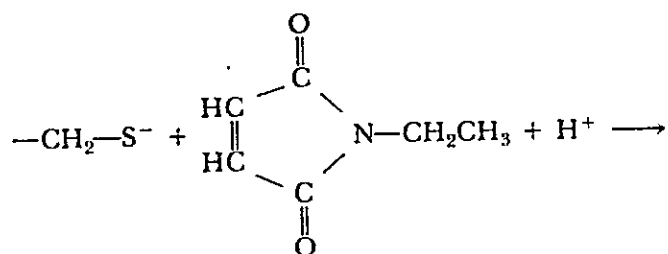
Los estudios de modificación química, tanto en fosfofructoquinasa como en otras enzimas, constituyen una herramienta valiosa para la determinación de las relaciones estructura-función a través de la identificación y localización de los residuos de aminoácidos de los sitios activos y reguladores de ellas. La metódica de modificación química ha permitido además estudiar la magnitud de los cambios conformacionales de enzimas, inducidos por interacción con sustratos y otros ligandos. Muchas características de los sitios catalíticos y alostéricos de la fosfofructoquinasa han sido dilucidados por modificación química de grupos específicos y mediante marcadores de afinidad (Mansour, 1972; Bloxham y Lardy, 1973; Uyeda, 1979; Shaw, 1970; Sigman y Mooser, 1975; Ogilvie, 1983). La modificación de residuos específicos de aminoácidos también ha permitido realizar estudios relacionados con cambios en el estado de agregación de las enzimas (Frieden y col., 1976; Sharma, 1982; Satre y col., 1982; Kemp y Foe, 1983).

Desde que Engelhardt y Sakov indicaron en 1943 la posibilidad que los grupos sulfhidrilo fueran importantes

para la estabilidad y actividad óptima de la fosfofructoquinasa, mediante experimentos de inhibición de la actividad por agentes oxidantes, numerosos investigadores han realizado estudios de modificación de estos grupos de la enzima aislada de diferentes fuentes (Kemp y Forest, 1968; Mansour, 1972; Bloxham y Lardy, 1973; Uyeda, 1979; Mathias y Kemp, 1972). En la mayoría de los casos estudiados se encontró una relación directa entre la modificación de grupos-SH y la inactivación de las enzimas, indicando esto que los grupos tioles juegan un papel importante en la actividad enzimática. Así, es frecuente el uso de agentes reductores para mantener la actividad de las diferentes fosfofructoquinasas purificadas.

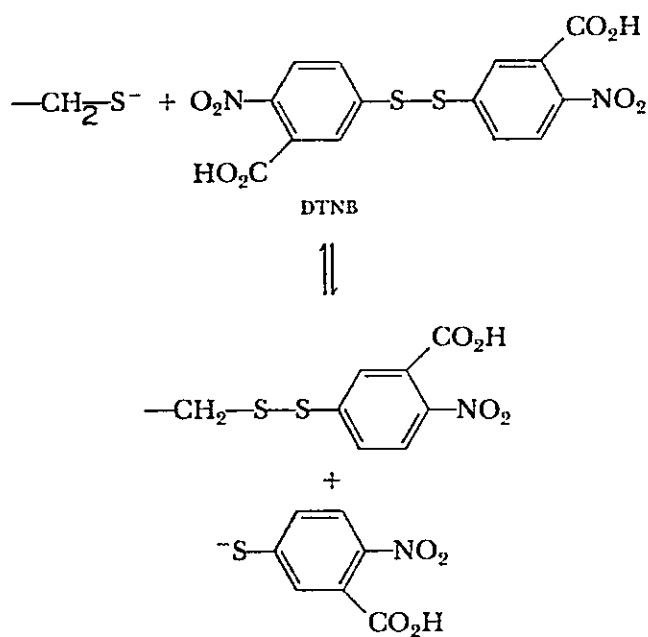
Por otra parte, el efecto de sustratos y productos sobre la inactivación de muchas enzimas por agentes modificadores de grupos-SH ha permitido establecer relaciones entre su estructura y función (Younathan y col., 1968; Mathias y Kemp, 1972; Redkar y Kenkare, 1975; Soper y col., 1979; Tijane y col., 1980; Sharma, 1982; Satre y col., 1982; Foe y col., 1983; Reyes y col., 1985).

Entre los reactivos modificadores de grupos SH, los más utilizados han sido N-etilmaleimida (NEM) y el ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB). El primero es un reactivo con un doble enlace activado que sufre la adición nucleofílica de un grupo sulfhidrilo de la proteína formando un tio-éter estable (Riordan y Vallee, 1967).



Un rasgo importante de este reactivo es que forma un derivado alquilado que resiste la hidrólisis ácida. Su espectro de absorción tiene un máximo a 305 nm que desaparece cuando el agente se combina estequiométricamente con un tiol. Así, es posible determinar espectrofotométricamente el número de grupos reaccionantes.

La reacción de un tiol con DTNB es la siguiente:



El anión p-nitrotiofenolato es fuertemente coloreado por lo que puede utilizarse para medir la concentración de los grupos sulfhidrilos en proteínas a 412 nm (Ellman, 1959). Una reacción incompleta de los grupos SH para formar puentes disulfuros mixtos permite que ocurran reacciones intramoleculares que llevan a la formación de enlaces disulfuros (Glazer y col., 1975)

Con los antecedentes existentes sobre estudios de modificación química de fosfofructoquinasas de numerosas fuentes nos pareció importante realizar estos estudios con Pfk-2 y Pfk-2* para ampliar el conocimiento de las relaciones que existen entre su estructura y función y determinar el efecto de la mutación pfkB10 en la reactividad de los grupos SH de Pfk-2. El objetivo de esta tesis fue determinar el papel de los residuos de cisteína en la función catalítica de Pfk-2 y Pfk-2*, el número de ellos relacionados con la actividad de las enzimas, el mecanismo de inactivación por DTNB y el efecto de los sustratos y productos en la cinética de inactivación por los agentes modificadores.

Se observó una mayor y más rápida inactivación de Pfk-2* comparada con Pfk-2 al reaccionar con DTNB y NEM. Ambas enzimas presentaron al menos dos tipos de grupos SH responsables de la inactivación; uno de reactividad rápida y el otro lenta. El efecto de los sustratos en la inactivación de las enzimas sugiere que los grupos SH reactivos

comprometidos con la actividad están ubicados en sitios diferentes en cada enzima.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Los reactivos siguientes se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., E.E. U.U.): ditiotreitól, Tris, NADH, ATP, ADP, fructosa-1,6-P₂, glicerol, piruvatoquinasa (de músculo de conejo), deshidrogenasa láctica (de músculo de conejo), fosfoenolpiruvato, DTNB, gli-cil-glicina, 2-mercaptoetanol, NEM y el azul de Cibacron Agarose (Reactive Blue 2-Agarose, type 3000). KCl, EDTA y MgCl₂ fueron obtenidos de Merck AG (Darmstadt, Alemania Federal). Aldolasa (de músculo de conejo), α -glicerofosfa-todeshidrogenasa (de músculo de conejo) y fructosa-6-P, fueron obtenidos de Boehringer Mannheim, GmbH, Alemania Federal. Sephadex G-25 de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala-Suecia). La hidroxilapatita, Bio-gel HTP, se obtu-vo de BioRad (Richmond, CA. E.E. U.U.); la celulosa CF1 de Whatman Biochemicals (E.E. U.U.); Coomassie Brilliant Blue G-250 Serva, fue adquirido a través de Accurate Chemical & Scientific Corp. (Hicksville, NY. E.E. U.U.).

Obtención y purificación de las enzimas

Se utilizaron 2 cepas isogénicas de E. coli: DF903 para la obtención de Pfk-2 y DF905 para la de Pfk-2* (Daldal y Fraenkel, 1981; Daldal y col., 1982). Ambas

cepas poseen una deleción completa del gen estructural de Pfk-1 (pfkA); DF903 contiene la mutación pfkB1 y DF905 la doble mutación pfkB1 pfkB10. En algunos experimentos se utilizó Pfk-2 proveniente de una cepa con el gen pfkB clonado (DF1020/pFD110, D. Fraenkel, no publicado).

Pfk-2 y Pfk-2* se purificaron según el procedimiento descrito por Babul (1978) y Daldal y col. (1982), utilizando una etapa de calentamiento a 65° durante 5 minutos en presencia de fructosa-6-P 2 mM y DTT 2 mM en vez de la cromatografía en AMP-Agarose, seguida de una recromatografía en este último material (Retamal, 1987). Las enzimas obtenidas presentaban una banda de proteínas después de electroforesis en geles en ausencia (Davis, 1964) y en presencia de dodecilsulfato de sodio (Laemmli, 1970). Las actividades específicas fueron 160 U/mg para Pfk-2 y 150 U/mg para Pfk-2*.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976).

Estabilidad y mantención de las enzimas

Las soluciones de Pfk-2 y Pfk-2*, provenientes de la recromatografía en azul de Cibacron Agarose se concentraban por ultrafiltración en membranas Amicon PM10 y se mantenían a -20°C en amortiguador Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM y glicerol 50%, pH 7,6. En el caso de Pfk-2* contenía además etanol al 5%. En estas

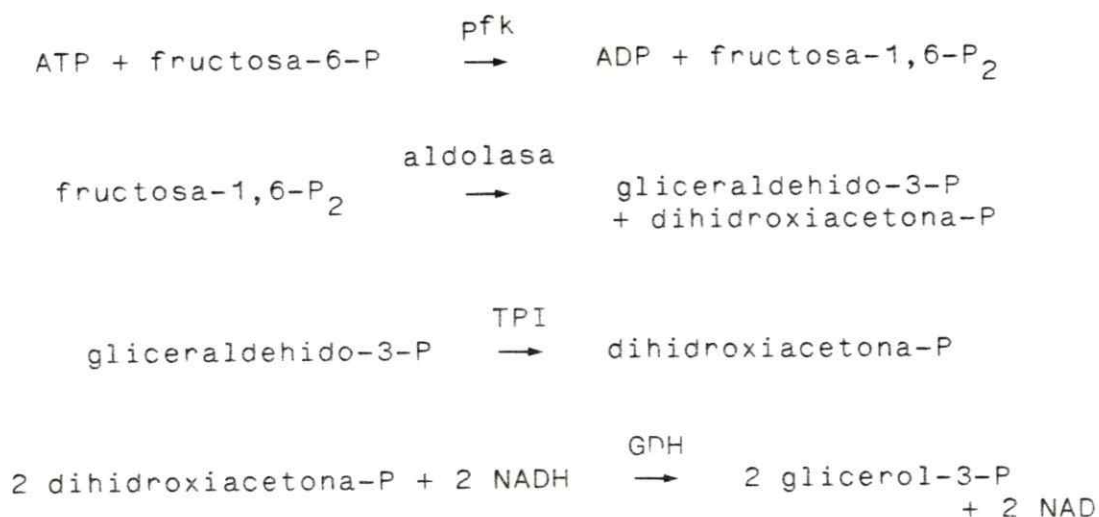
condiciones Pfk-2 y Pfk-2* mantenían su actividad por varios meses.

Determinación de la actividad enzimática

La actividad de las enzimas se determinó a 30°C en un espectrofotómetro Gilford 2400, utilizando los siguientes ensayos.

a) Medición de fructosa-1,6-P₂

Para medir la formación de fructosa-1,6-P₂ se acoplaba la formación de éste a la oxidación del NADH en presencia de aldolasa, triosafosfato isomerasa (TPI) y α-glicerofosfato deshidrogenasa (GDH) (Racker, 1947). Las reacciones son las siguientes:

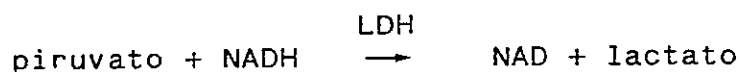
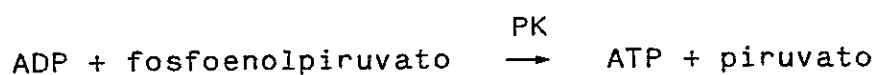
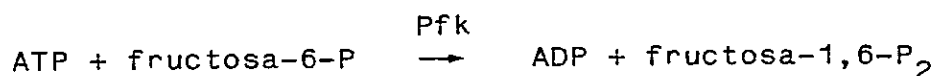


La oxidación del NADH se seguía espectrofotométricamente a 340 nm. La mezcla de reacción, en un volumen final de 0,5 ml, contenía: Tris-HCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, NH₄Cl 2 mM, NADH 0,2 mM, 40 µg de aldolasa, 3 µg de

triosafosfato isomerasa y 30 μg de α -glicerofosfato deshidrogenasa a pH 8,2 (Babul, 1978). La reacción se iniciaba al agregar la preparación enzimática.

b) Medición de ADP

En los experimentos de modificación química donde se estudió el efecto del fructosa-1,6- P_2 sobre la inactivación de las enzimas, se utilizó una medición en la que se acoplaba la formación de ADP a la oxidación del NADH en presencia de piruvato-quinasa (PK) y deshidrogenasa láctica (LDH)(Kornberg y Pricer, 1951). Las reacciones son las siguientes:



Al igual que en el método anterior la actividad fosfofructoquinásica se medía espectrofotométricamente a 340 nm y 30°C. La mezcla de reacción, en un volumen final de 0,5 ml, contenía: Tris-HCl 100 mM, pH 8,2, fosfoenolpiruvato 0,2 mM, MgCl_2 10 mM, KCl 10 mM, NH_4Cl 2 mM, NADH 0,2 μg de piruvato-quinasa y 10 μg de deshidrogenasa láctica. La reacción se iniciaba con el agregado de la enzima.

Remoción del ditioneitol de las preparaciones enzimáticas

Para eliminar el DTT presente en las preparaciones de Pfk-2 y Pfk-2*, se usaba una columna de Sephadex G-25 de 3 ml equilibrada con una solución de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,6 que contenía EDTA 1 mM, glicerol 10%, $MgCl_2$ 5 mM. Se utilizaba un volumen de 40-120 μ l de fosfofructoquinasa y se recogían fracciones de 0,8 ml. En los experimentos donde se estudiaba el efecto de ligandos sobre la inactivación de las enzimas por agentes modificadores de grupos SH, la columna se equilibraba con la concentración apropiada de cada uno.

Modificación química de Pfk-2 y Pfk-2*

La modificación química de Pfk-2 y Pfk-2* se realizó utilizando preferentemente DTNB como reactivo modificador y en algunos casos NEM, como se indica en resultados. El DTNB se disolvía en amortiguador glicil-glicina 20 mM pH 8,0, a una concentración de 2 mM. El NEM se preparaba en H_2O desionizada a una concentración de 2 mM. Ambas soluciones se preparaban frescas antes de cada experimento. Las reacciones de modificación se realizaban generalmente a 25°C en baño termoregulado. La mezcla de reacción contenía: Tris-HCl 20 mM pH 7,6, EDTA 1 mM, glicerol 10%, $MgCl_2$ 5 mM (excepto en los estudios del efecto de ATP^{-4}), entre 0,1 y 0,2 unidades de enzima y DTNB o NEM a las concentraciones indicadas. El control consistía en una

muestra de Pfk-2 o Pfk-2* tratada igual a la del experimento de modificación pero se le agregaba el mismo volumen de amortiguador en reemplazo del reactivo modificador. En los experimentos en que se realizaba la modificación en presencia de ligandos, la enzima se preincubaba durante 3 minutos a la temperatura respectiva y luego se iniciaba la reacción agregando DTNB o NEM. Se extraían alícuotas de 10 μ l a diferentes tiempos deteniéndose la reacción por dilución en la mezcla de reacción para la determinación de actividad y se determinaba la actividad residual según los métodos descritos. Las curvas de progreso para ambas enzimas eran lineales al menos por 20 minutos, lo que indica que una dilución de 50 veces del medio de reacción detenía la acción del agente modificador. En los experimentos controles sin DTNB la pérdida de actividad fue menor que 3% en el caso de Pfk-2 y aproximadamente 10% en el caso de Pfk-2*, durante el tiempo que duraban los experimentos (generalmente 30 min).

RESULTADOS

Estabilidad de Pfk-2 y Pfk-2* en ausencia de DTT.

La Figura 1 muestra el efecto de remover el DTT de las soluciones de Pfk-2 y Pfk-2* sobre la estabilidad de las mismas a 25°C. Se observó una pérdida más rápida de la actividad de Pfk-2* que de Pfk-2; después de 3 h la inactivación de Pfk-2* fue total. En presencia de DTT no se observó pérdida de la actividad de ambas enzimas en el mismo tiempo de incubación.

Inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB a 25°C.

Se modificó cada una de las enzimas con DTNB 40 μ M a 25°C luego de la remoción del DTT (Figura 2). Ambas enzimas presentaron una cinética de pseudoprimer orden no lineal, lo que sugiere la presencia de más de un tipo de grupo SH relacionado con la actividad de cada enzima. Se observó una mayor velocidad de inactivación en el caso de Pfk-2*. Debido a la alta reactividad de Pfk-2* comparada con Pfk-2, fue necesario realizar experimentos de inactivación a diferentes concentraciones de DTNB para cada enzima para determinar las constantes de inactivación (ver más adelante).

Reversión de la modificación por DTT.

Ambas fosfofructoquinasas inactivadas recobraron la

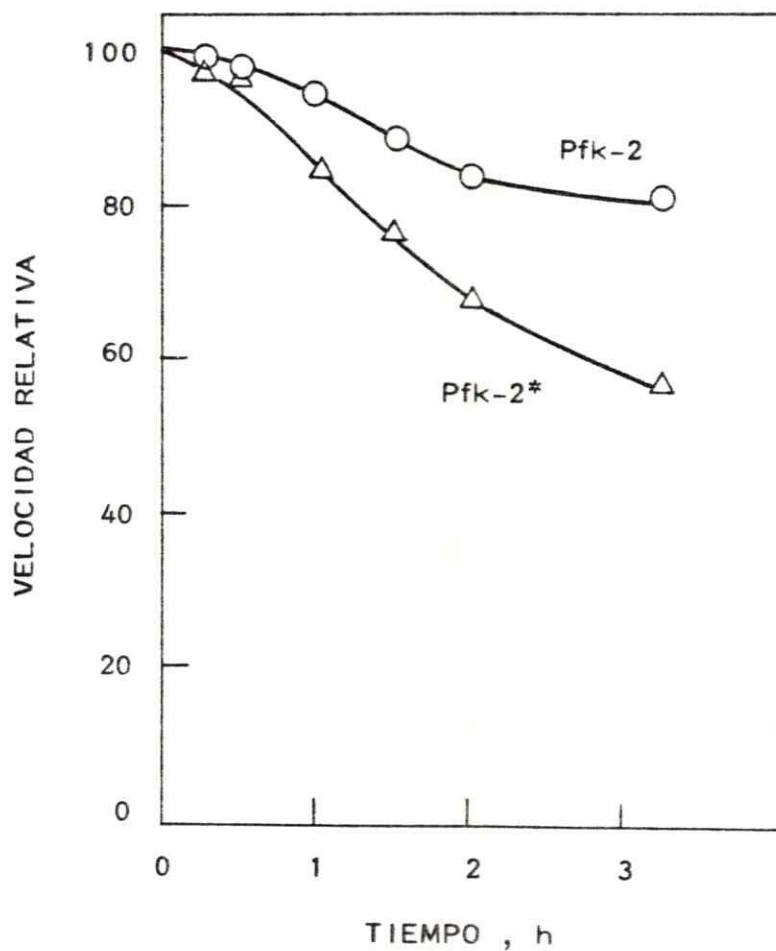


Figura 1. Estabilidad de Pfk-2 y Pfk-2* a 25°C en ausencia de DTT. El DTT se removi6 de las soluciones de las enzimas por medio de filtraci6n en geles como se describe en Materiales y M6todos. La actividad se midi6 por la formaci6n de fructosa-6-P.

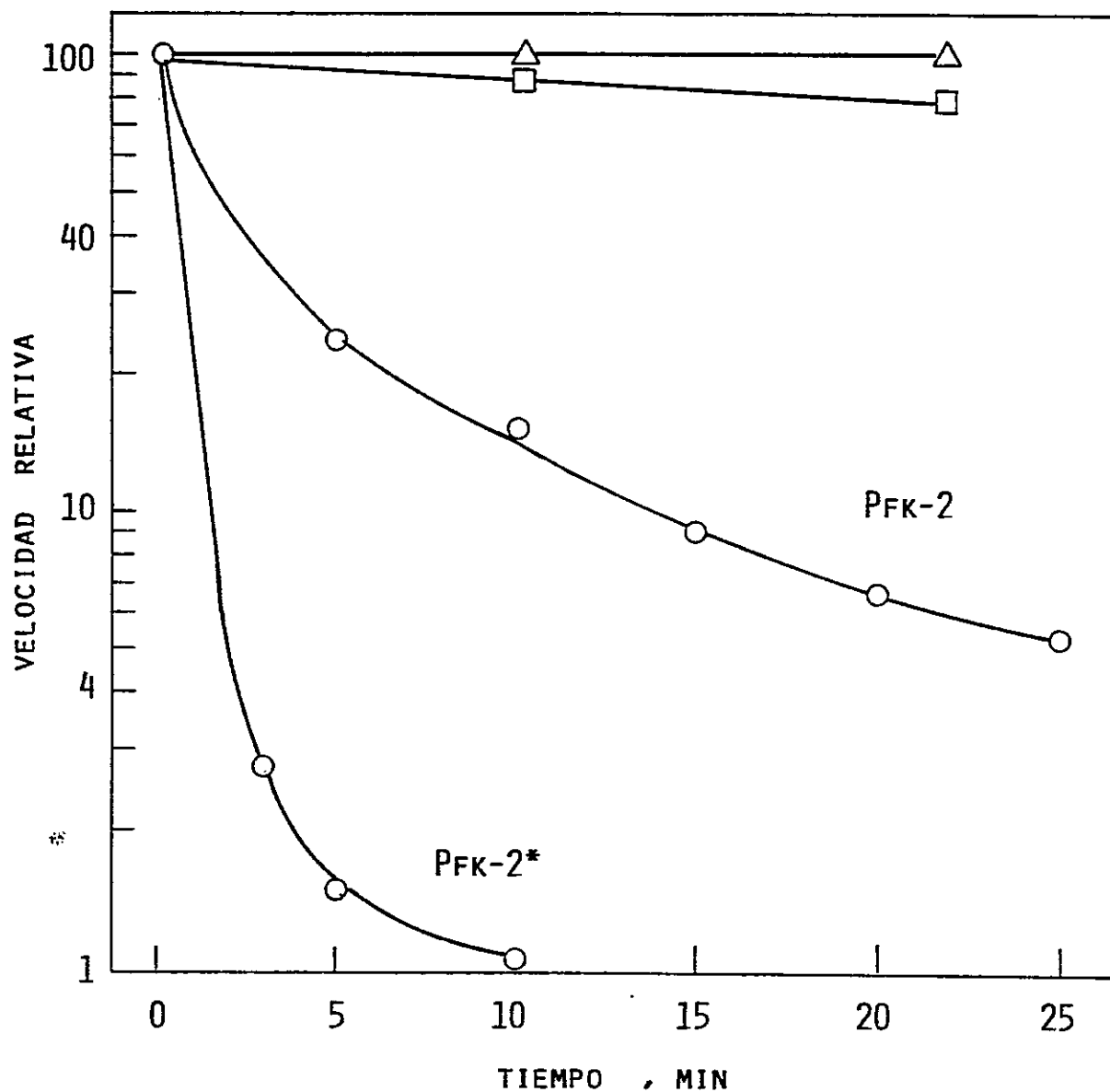


Figura 2. Inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB a 25°C. La reacción de inactivación se efectuó a 25°C incubando 0,2 ml de cada enzima (200 mU) con DTNB 40 μ M. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 0,01 ml para la medición de actividad. Controles sin DTNB: (Δ) Pfk-2, (\square) Pfk-2*.

mayor parte de su actividad al ser incubadas con DTT 20 mM (Figura 3). La enzima modificada puede ser reactivada por el DTT a varios tiempos después de iniciada la reacción de inactivación. El DTT desplaza al TNB y puede reducir los puentes disulfuros, como los que se forman al modificar una enzima con DTNB.

Cálculo de las constantes de inactivación.

La Figura 4 muestra una gráfica semilogarítmica para la inactivación de Pfk-2 por DTNB. Se observan dos fases de inactivación; una rápida y una lenta. Los valores de la constante para la fase lenta (k_{i2}) se calcularon de la pendiente de la curva 2, mientras que los valores de la constante de inactivación de la fase rápida (k_{i1}) se calcularon de la pendiente de la curva 3. Esta última se obtiene al restar los valores de la curva 2 (extrapolación de la recta obtenida con los puntos experimentales de la fase lenta, línea punteada) a los de la actividad remanente en función del tiempo (curva 1). Se procedió de igual manera en todos los experimentos de determinación de las constantes de velocidad que se muestran más adelante.

Cada una de las fases de inactivación corresponde a una caída exponencial de la concentración de enzima activa con el tiempo. Si se toma al tiempo inicial como t_1 y al tiempo al final del intervalo como t_2 , se tiene

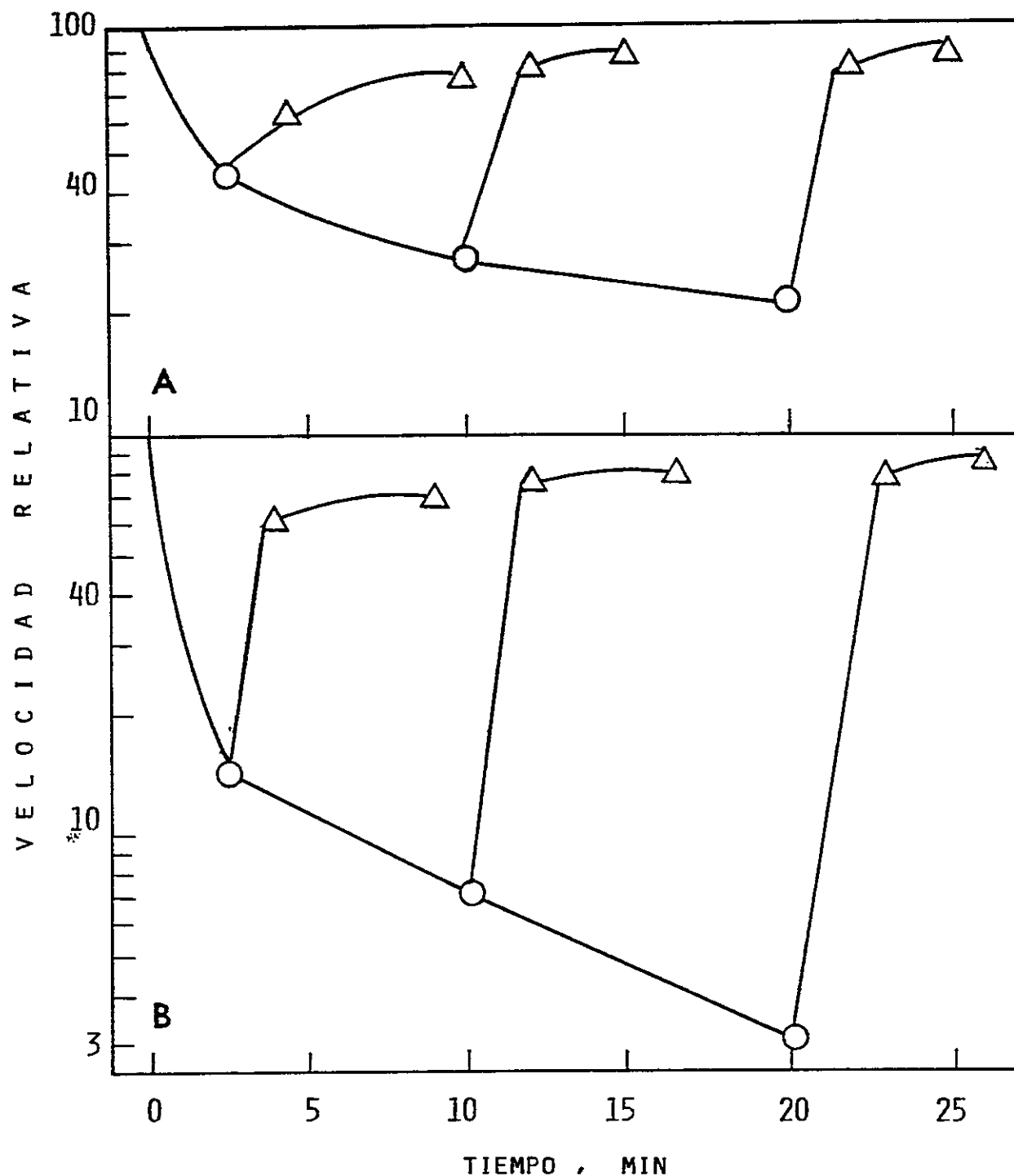


Figura 3. Reactivación por DTT de Pfk-2 y Pfk-2* inactivadas por DTNB. En cada caso se inactivaron 200 mU de enzima con DTNB 40 μ M a 25°C. Panel A: se agregó DTT 20 mM a tres experimentos consecutivos después de 2, 10 y 20 min de inactivación de Pfk-2. Panel B: se agregó DTT 20 mM a tres experimentos consecutivos después de 2, 10 y 20 min de inactivación de Pfk-2*. (○), actividad de las enzimas en ausencia de DTT; (△), actividad de las enzimas después del agregado de DTT.

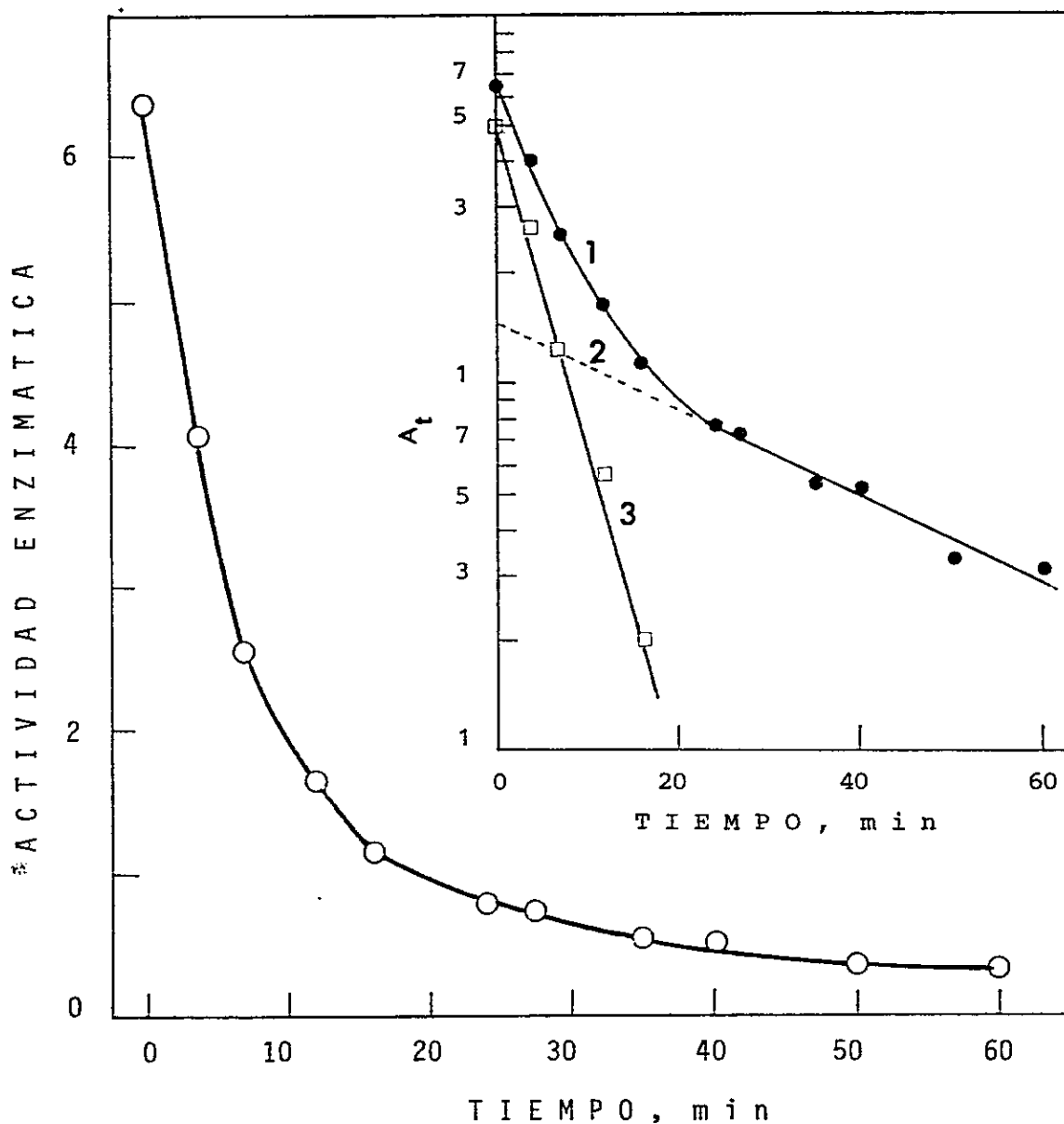


Figura 4. Determinación de las constantes de inactivación de las enzimas por DTNB. Inactivación de Pfk-2 producida por incubación con DTNB $20 \mu\text{M}$ a 20°C . En el recuadro se ilustra el cálculo de las constantes de pseudoprimer orden. Los valores de k_{i2} se calcularon de la pendiente de la curva 2; los valores de k_{i1} se calcularon de la pendiente de la curva 3, la que se obtiene después de restar los valores de la curva 2 (punteada) a los valores de la actividad remanente (A_t) en función del tiempo (curva 1).

$$k = (2,303 \log A_1 / A_2) / (t_2 - t_1)$$

Variación de la velocidad de inactivación con la concentración de DTNB.

La velocidad de la reacción de Pfk-2* con DTNB que se muestra en la Figura 2 (40 μM DTNB a 25°C) es muy rápida para poder determinar las constantes de inactivación de la enzima. Fue necesario disminuir tanto la temperatura de incubación del reactivo como la concentración del mismo para lograr la determinación de las constantes. Debido a que es necesario mantener un exceso del reactivo modificador con respecto a la concentración de enzima para que la reacción sea de pseudoprimer orden (en el caso de Pfk-2* fue al menos 50 veces), fue necesario realizar la reacción de modificación a 0°C.

La Figura 5 muestra las gráficas de inactivación de Pfk-2 por DTNB entre 30 y 100 μM . En todos los casos las gráficas semilogarítmicas de actividad con respecto al tiempo de reacción presentan dos fases. La primera, la fase más rápida, alcanza un 40 a 65% de inactivación en los primeros 15 min. La segunda fase es más lenta, es responsable del resto de la inactivación y no fue total hasta los 60 min.

Pfk-2* se inactivó utilizando concentraciones de DTNB en el intervalo 1,25-20 μM . Al igual que para el caso de

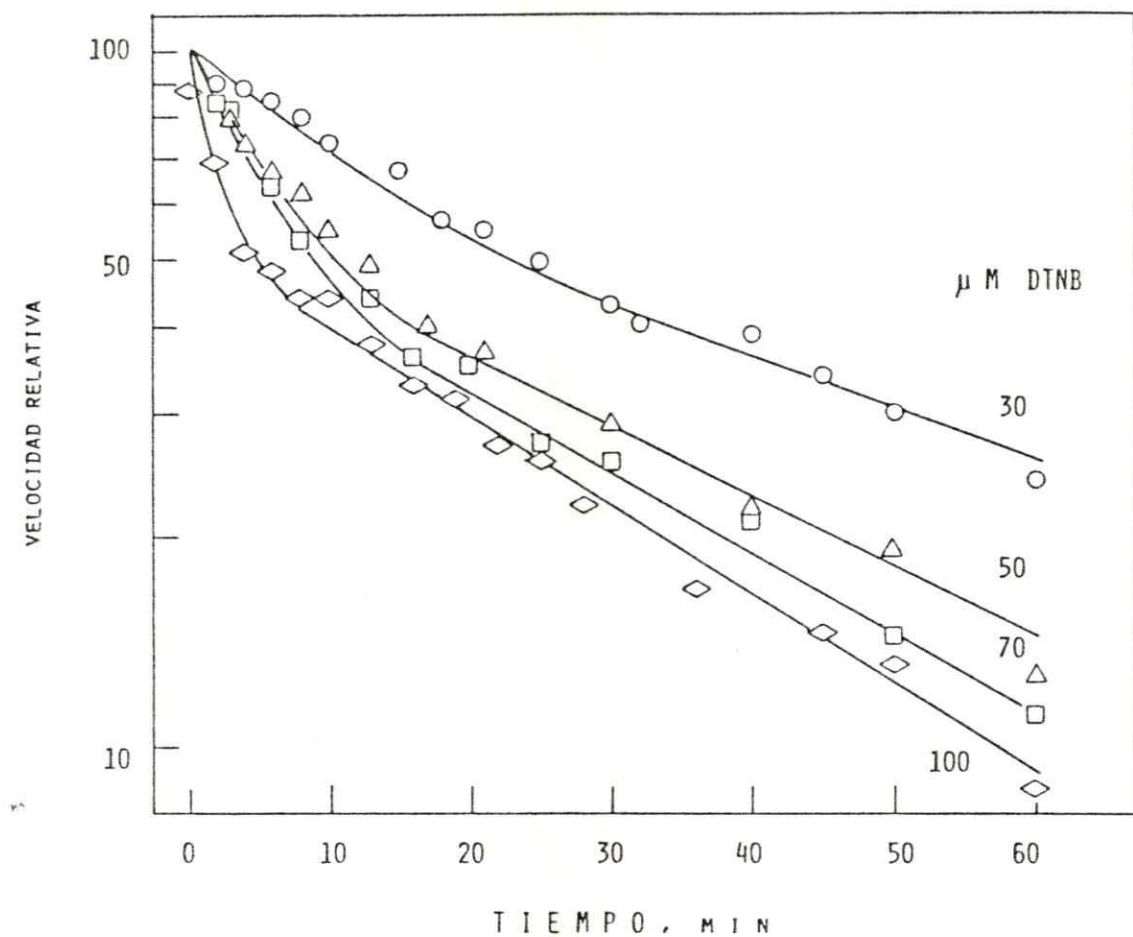


Figura 5. Inactivación de Pfk-2 por DTNB. La reacción se efectuó a 0°C incubando 0,2 ml de enzima (180 mU) con las concentraciones de DTNB indicadas. La actividad remanente se midió como se indica en la Figura 2.

Pfk-2, la inactivación es bifásica (Fig. 6). A pesar de que las concentraciones de DTNB utilizadas en este caso, son menores que las utilizadas con Pfk-2, la velocidad de inactivación es mucho mayor. A una concentración de DTNB de 20 μM , se alcanza un 90% de inactivación a los 2 minutos; la inactivación total se alcanza a los 30 min de reacción.

La Tabla 2 muestra los valores de k_{i1} y k_{i2} para la inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB. En el caso de Pfk-2 los valores de k_{i1} son entre 3 y 11 veces superiores a los de k_{i2} . Al graficar k_{i1} con respecto a la concentración de DTNB (Figura 7) se obtuvo una constante de segundo orden igual a $3,2 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. La constante para la fase lenta, k_{i2} , no mostró variación con la concentración de DTNB. En el caso de Pfk-2* los valores de k_{i1} fueron entre 4 y 25 veces superiores a los de k_{i2} y la constante de segundo orden para la fase rápida fue $85 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, aproximadamente 25 veces mayor que la correspondiente a Pfk-2 (Figura 8). Al igual que para Pfk-2 los valores de k_{i2} no experimentaron grandes variaciones con la concentración de DTNB.

La reacción de inactivación puede ocurrir a través de 2 tipos de mecanismos. En uno de ellos se produce la unión reversible del DTNB a la enzima antes que ocurra la modificación covalente del DTNB con los grupos SH relacionados con la actividad. La ecuación es la siguiente:

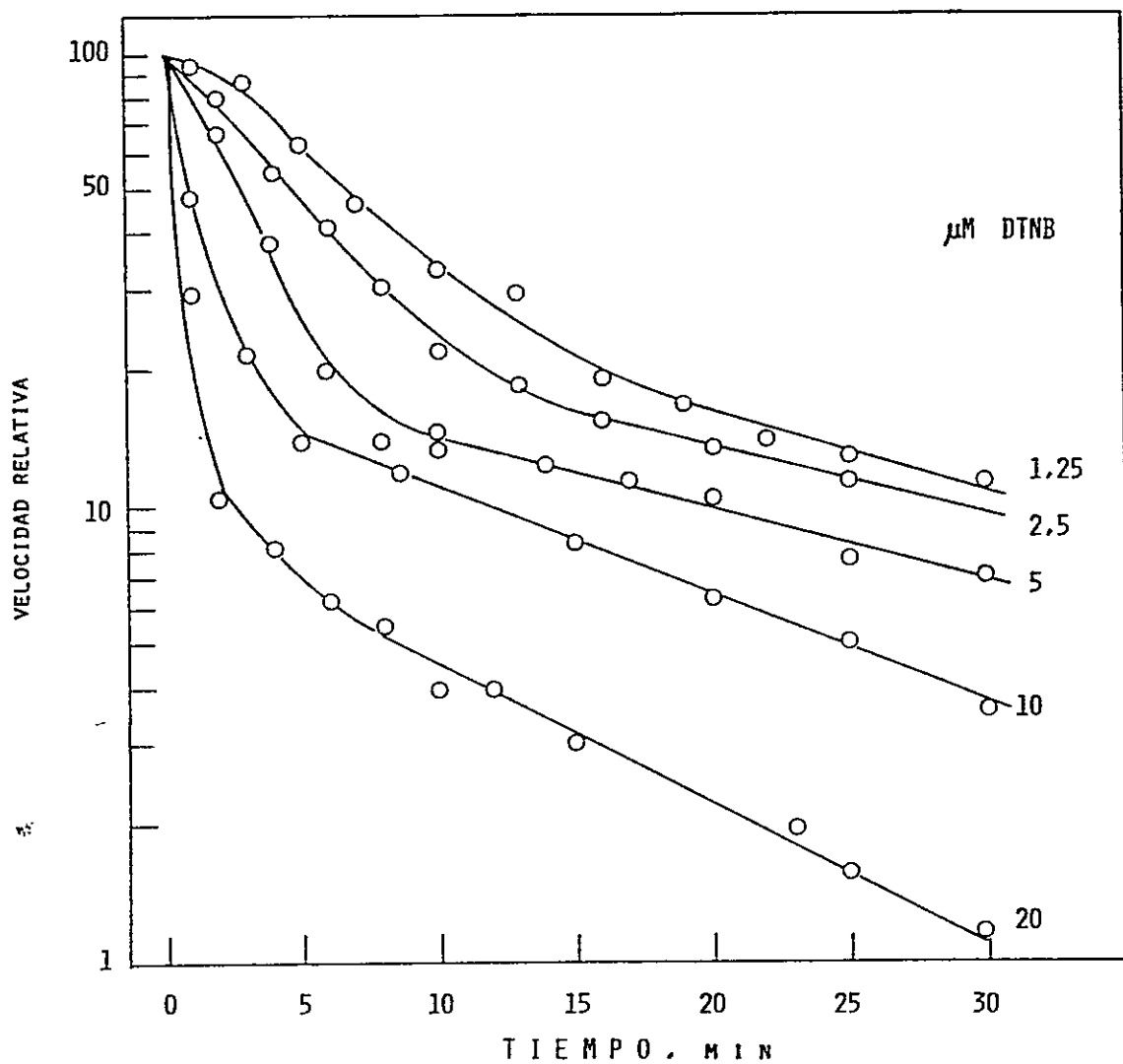


Figura 6. Inactivación de Pfk-2* por DTNB. 110 mU de enzima en 0,2 ml se incubaron con las concentraciones de DTNB indicadas a 0°C.

Tabla 2

CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA INACTIVACIÓN DE Pfk-2 y Pfk-2*

POR DTNB A 0°C

FOSFOFRUCTOQUINASA - 2

μ M	DTNB	k_{i1}	min^{-1}	k_{i2}
30		0,102		0,032
50		0,142		0,028
70		0,222		0,030
100		0,330		0,030

**

FOSFOFRUCTOQUINASA - 2*

1,25		0,17		0,040
2,5		0,29		0,034
5		0,61		0,036
10		0,87		0,054
20		1,81		0,071

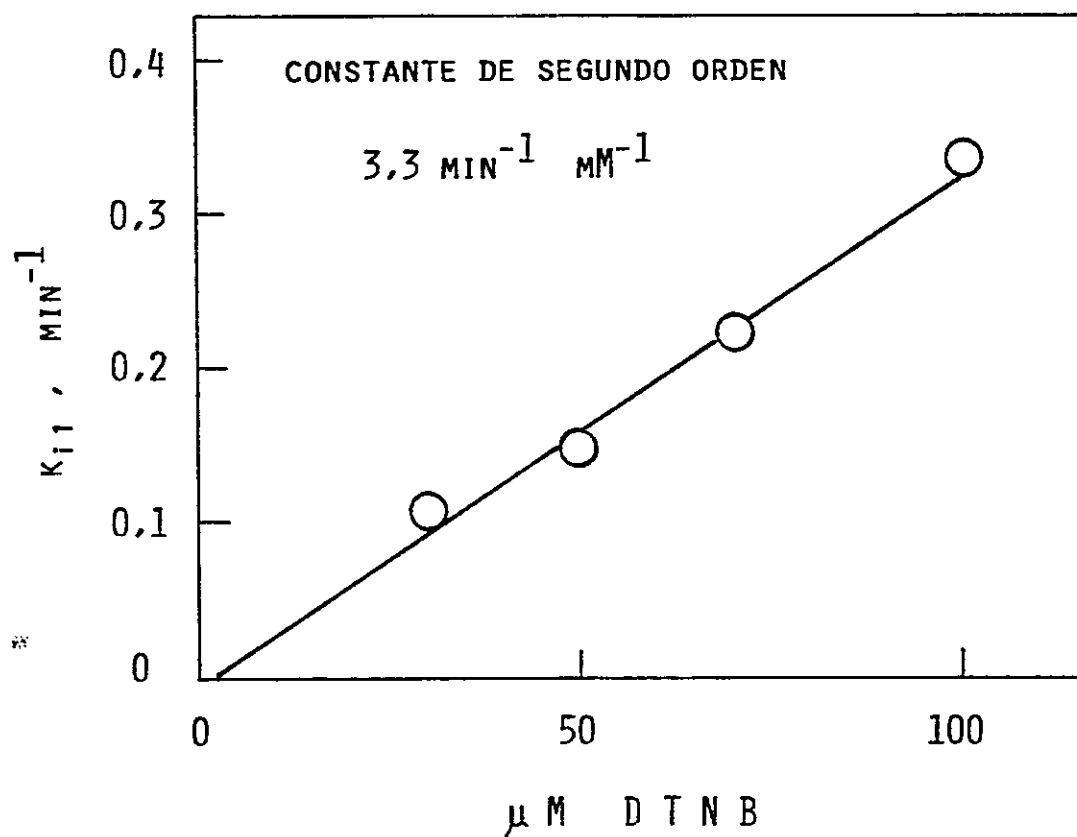


Figura 7. Influencia de la concentración de DTNB sobre la constante de inactivación (k_1) de Pfk-2. Los valores de las constantes aparentes de inactivación corresponden a los datos experimentales de la Figura 5 y se calcularon como se indica en la Figura 4.

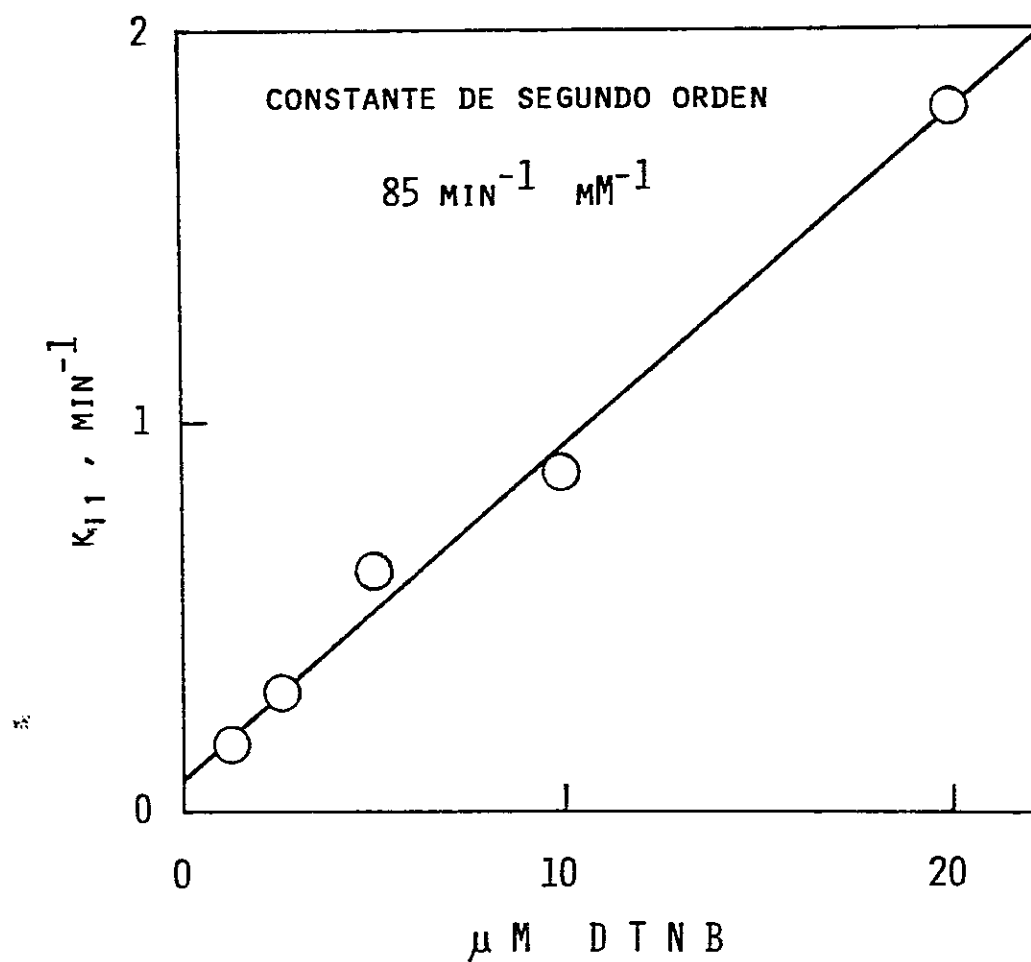
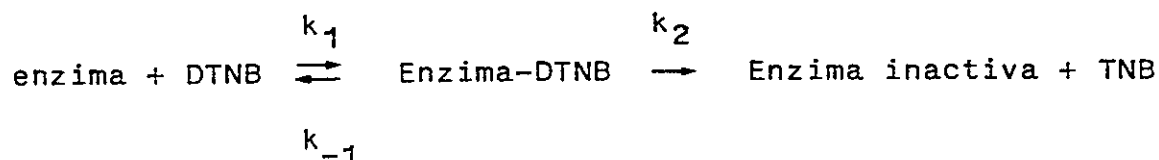


Figura 8. Influencia de la concentración de DTNB sobre la constante de inactivación (k_1) de Pfk-2*. Los valores de las constantes aparentes de inactivación corresponden a los datos de la Figura 6.



donde k_1 y k_{-1} son las constantes de formación y de disociación del complejo enzima-DTNB, respectivamente, y k_2 la constante de inactivación del complejo enzima-DTNB.

Para este mecanismo, la gráfica de dobles recíprocos de la constante aparente de velocidad de inactivación (k_i) con respecto a la concentración de DTNB muestra una relación lineal, pero la recta no pasa por el origen (Glazer y col., 1975).

En el segundo mecanismo de inactivación no hay formación previa de un complejo enzima-DTNB (o es muy rápida), de modo que se produce una reacción bimolecular entre la enzima y el DTNB sin que se una previamente al DTNB.



Para este mecanismo la gráfica de $1/k_i$ con respecto a $1/(\text{DTNB})$ debe dar una línea recta que parte desde el origen.

Las Figuras 9 y 10 muestran este tipo de gráficas para Pfk-2 y Pfk-2* respectivamente. Para ambas enzimas se obtiene una relación lineal que pasa cerca del origen, indicando que para estas enzimas la inactivación sucedería por el segundo mecanismo.

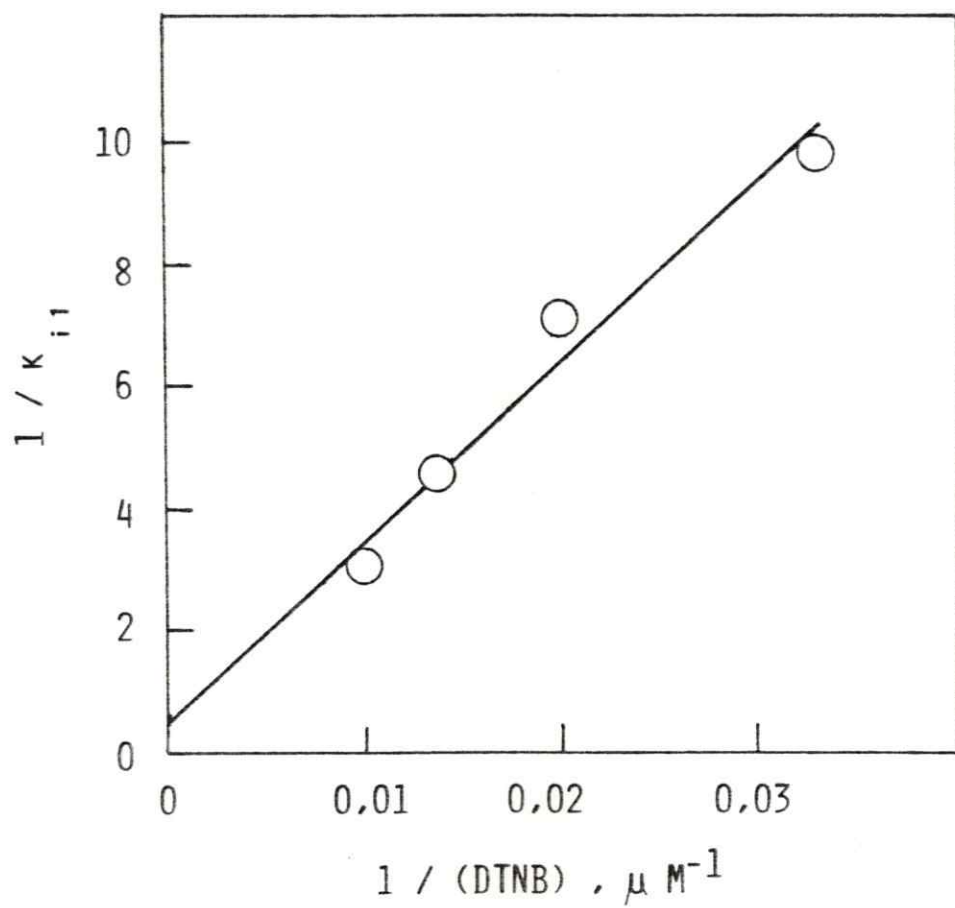


Figura 9. Gráfica de dobles recíprocos de la constante de inactivación de Pfk-2 con respecto a la concentración de DTNB. Datos experimentales de la Figura 5.

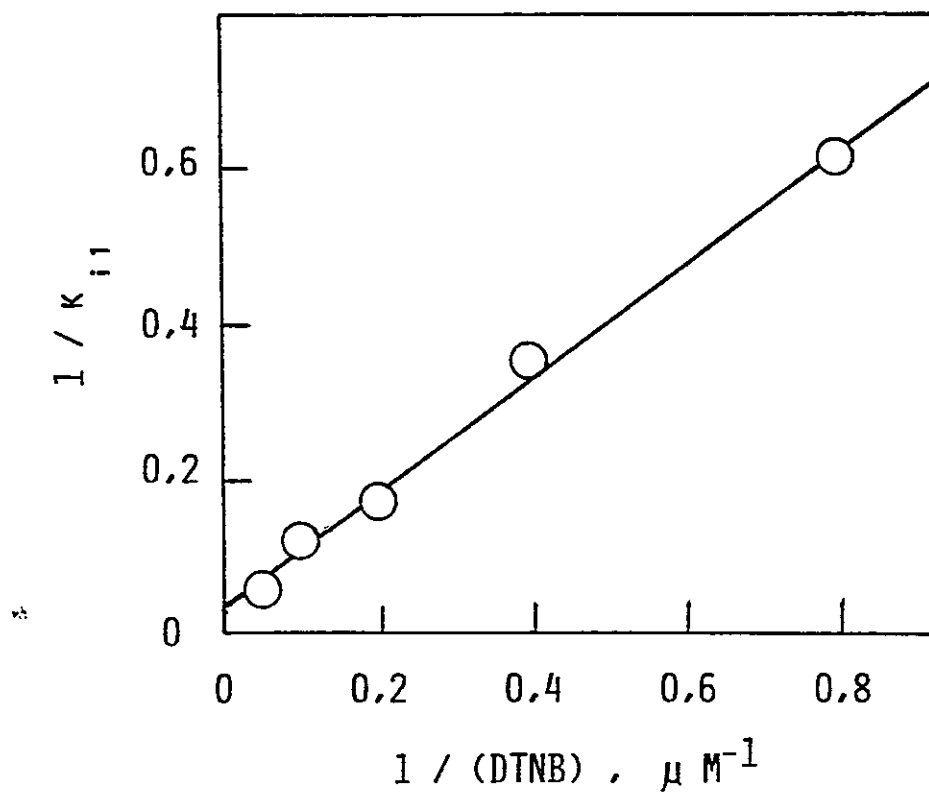


Figura 10. Gráfica de dobles recíprocos de la constante de inactivación de Pfk-2* con respecto a la concentración de DTNB. Datos experimentales de la Figura 6.

Efecto de ligandos sobre la inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB

Efecto de los sustratos y de ATP^{-4}

Las enzimas se modificaron con DTNB $40 \mu\text{M}$ a 25°C en ausencia y en presencia de MgATP^{-2} 1 mM (concentración saturante). Los resultados se presentan en la Figura 11. Este sustrato tuvo un fuerte efecto protector a la inactivación de Pfk-2, cerca de 100% de la actividad inicial después de 10 min de reacción. Contrariamente, en el caso de Pfk-2* la protección fue casi nula observándose una inactivación total en el mismo tiempo.

También se estudió el efecto del fructosa-6-P, de fructosa-6-P y MgATP^{-2} agregados simultáneamente y de ATP^{-4} en la inactivación de Pfk-2, todos a una concentración 1 mM (Figura 12). El efecto protector de fructosa-6-P y de fructosa-6-P más MgATP^{-2} fue parcial, mientras que el de ATP^{-4} fue nulo.

La inactivación de Pfk-2* se realizó utilizando los mismos ligandos y condiciones que en el experimento anterior (Figura 13). Se observó una protección parcial en presencia de fructosa-6-P y de fructosa-6-P y MgATP^{-2} agregados en conjunto.

Debido a que se conoce el efecto de la concentración de fructosa-6-P y de MgATP^{-2} sobre el estado de agregación de las enzimas (Guixé, 1985), se averiguó el efecto de

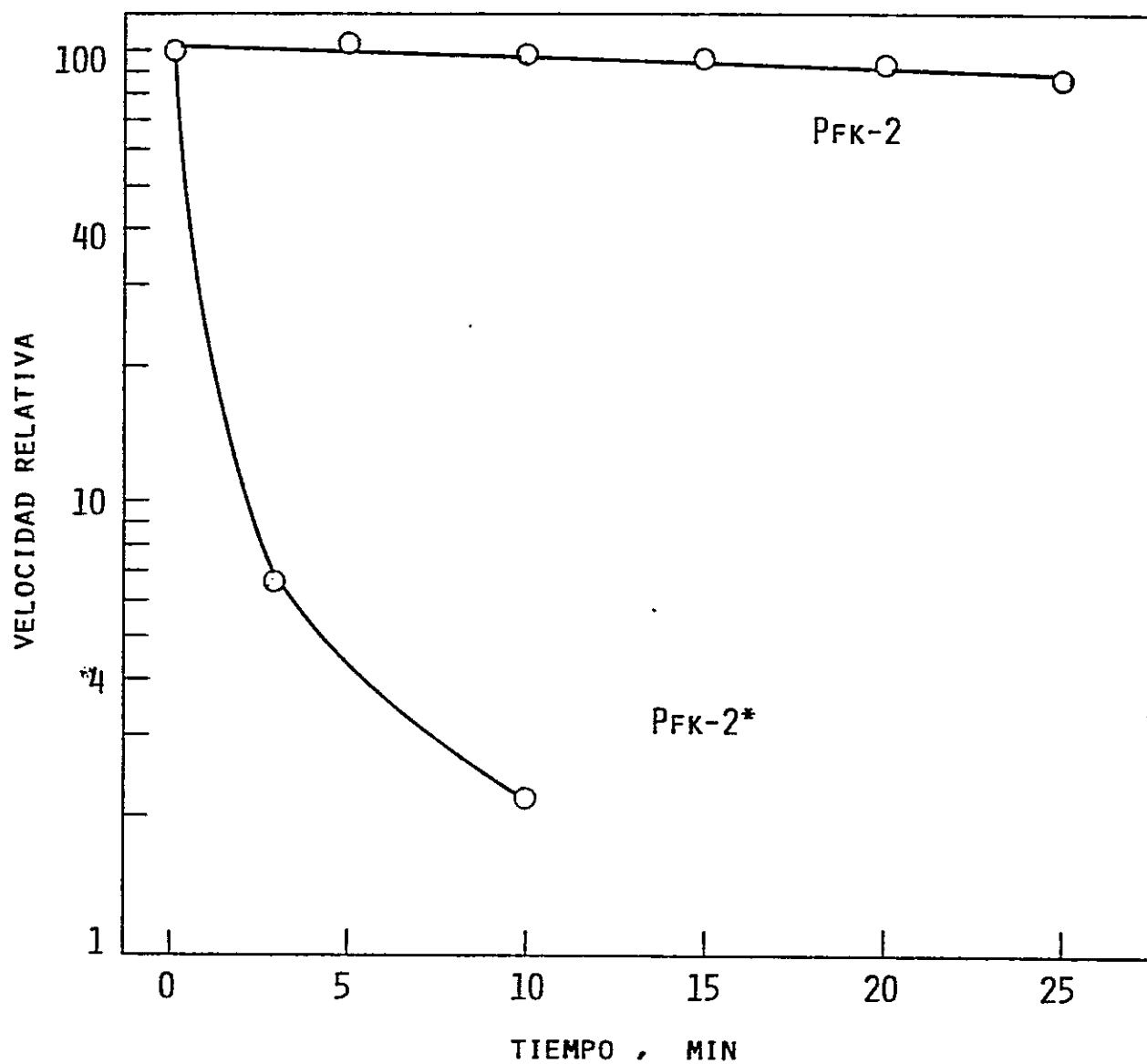


Figura 11. Efecto de MgATP^{-2} 1 mM sobre la inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por DTNB. Condiciones experimentales como en la Figura 2. La concentración de DTNB fue $40 \mu\text{M}$.

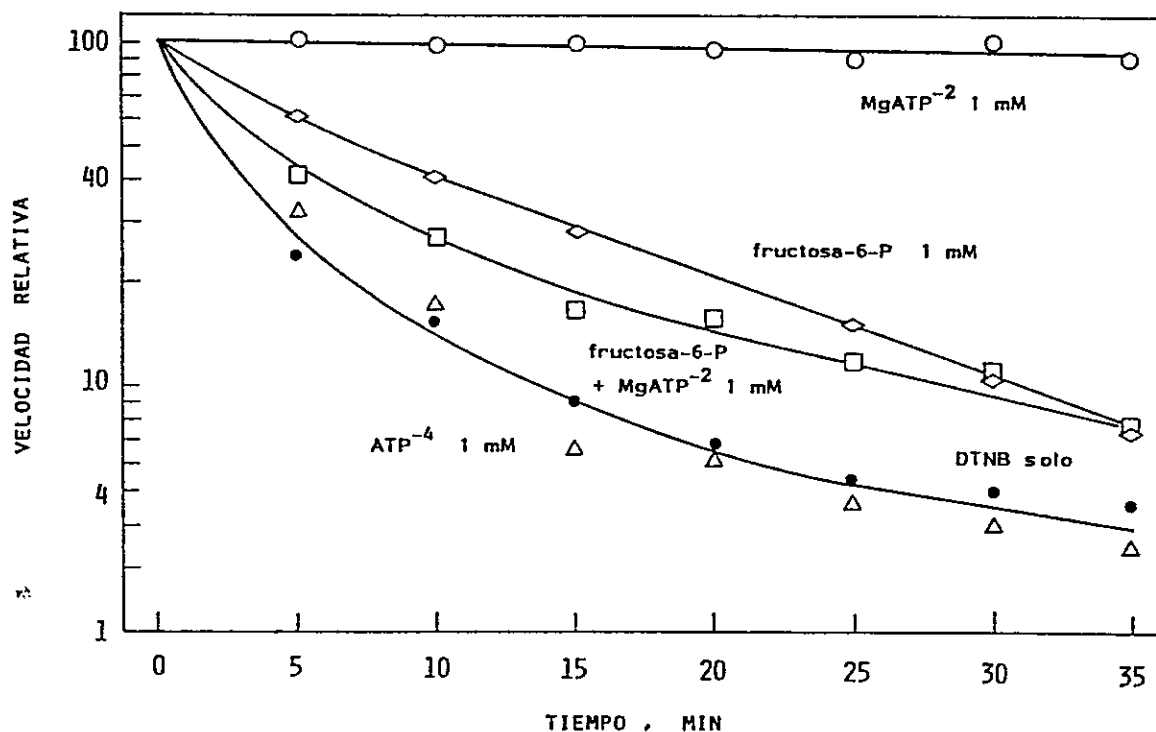


Figura 12. Inactivación de Pfk-2 en presencia de los sustratos (1 mM). Se modificaron 180 mU de enzima (0,2 ml) en cada experimento usando DTNB $40 \mu\text{M}$ a 25°C . (●), sin agregados; (○), en presencia de MgATP^{-2} 1 mM; (◇), fructosa-6-P 1 mM; (□), fructosa-6-P 1 mM más MgATP^{-2} 1 mM; (△), ATP^{-4} 1 mM.

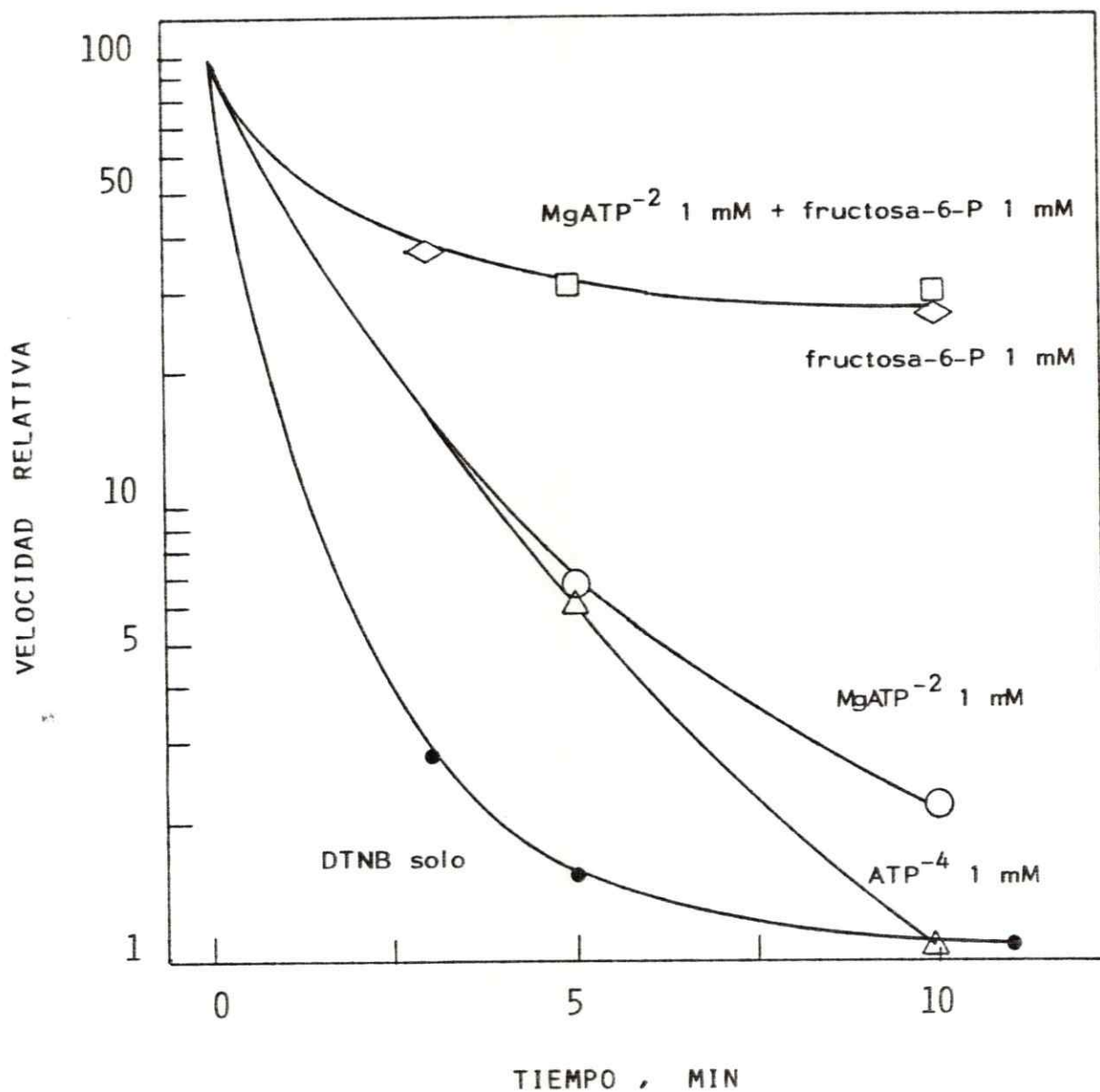


Figura 13. Inactivación de Pfk-2* en presencia de los sustratos (1 mM). Se utilizaron 124 mU de enzima en 0,2 ml en cada experimento. La concentración de DTNB fue 40 μ M. (●), sin agregados; (□), MgATP⁻² 1 mM más fructosa-6-P 1 mM; (◇), fructosa-6-P 1 mM; (○), MgATP⁻² 1 mM; (△), ATP⁻⁴ (1 mM).

ellos, agregados a diferentes concentraciones, sobre la inactivación por DTNB. En la Figura 14 se observa que la protección de Pfk-2 por MgATP^{-2} disminuye al aumentar la concentración relativa de fructosa-6-P.

En el caso de Pfk-2* (Figura 15) se observó mayor protección por fructosa-6-P al aumentar su concentración; el agregado de MgATP^{-2} mejoró la protección por fructosa-6-P.

Efecto de los productos

La Figura 16 muestra el efecto de MgADP^{-1} y de fructosa-1,6- P_2 1 mM sobre la inactivación de Pfk-2 por DTNB 40 μM . Sólo fructosa-1,6- P_2 mostró una protección considerable a la concentración ensayada.

En un experimento similar realizado con Pfk-2* (Figura 17) se observó que ninguno de los productos actúa como protector a la inactivación por DTNB.

Efecto de los sustratos en la inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* por NEM

La inactivación de ambas enzimas se efectuó utilizando NEM 40 μM a 25°C (Figuras 18 y 19). Los resultados fueron similares a los obtenidos con DTNB, observándose dos fases en la inactivación de las enzimas y una inactivación más rápida de Pfk-2*. En el caso de Pfk-2 sólo MgATP^{-2} actuó como protector y el agregado de fructosa-6-P

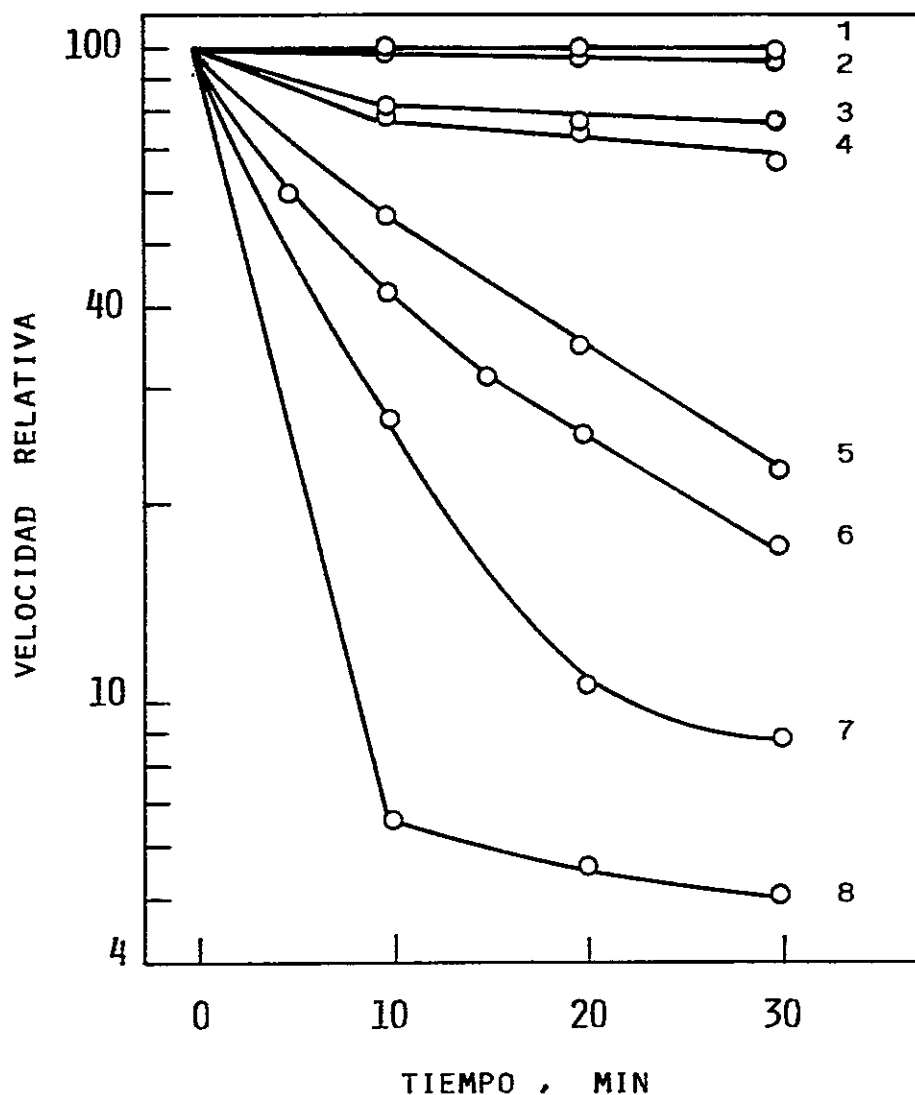


Figura 14. Efecto de la concentración de los sustratos en la inactivación de Pfk-2. Se incubaron 153 mU de enzima, en 0,15 ml, con DTNB 40 μ M a 25°C. (1), MgATP^{-2} 4 mM más fructosa-6-P 0,1 mM; (2), MgATP^{-2} 4 mM; (3), MgATP^{-2} 4 mM más fructosa-6-P 1 mM; (4), MgATP^{-2} 0,1 mM; (5), MgATP^{-2} 0,1 mM más fructosa-6-P 0,1 mM; (6), fructosa-6-P 1 mM; (7), fructosa-6-P 0,1 mM; (8), sin agregados.

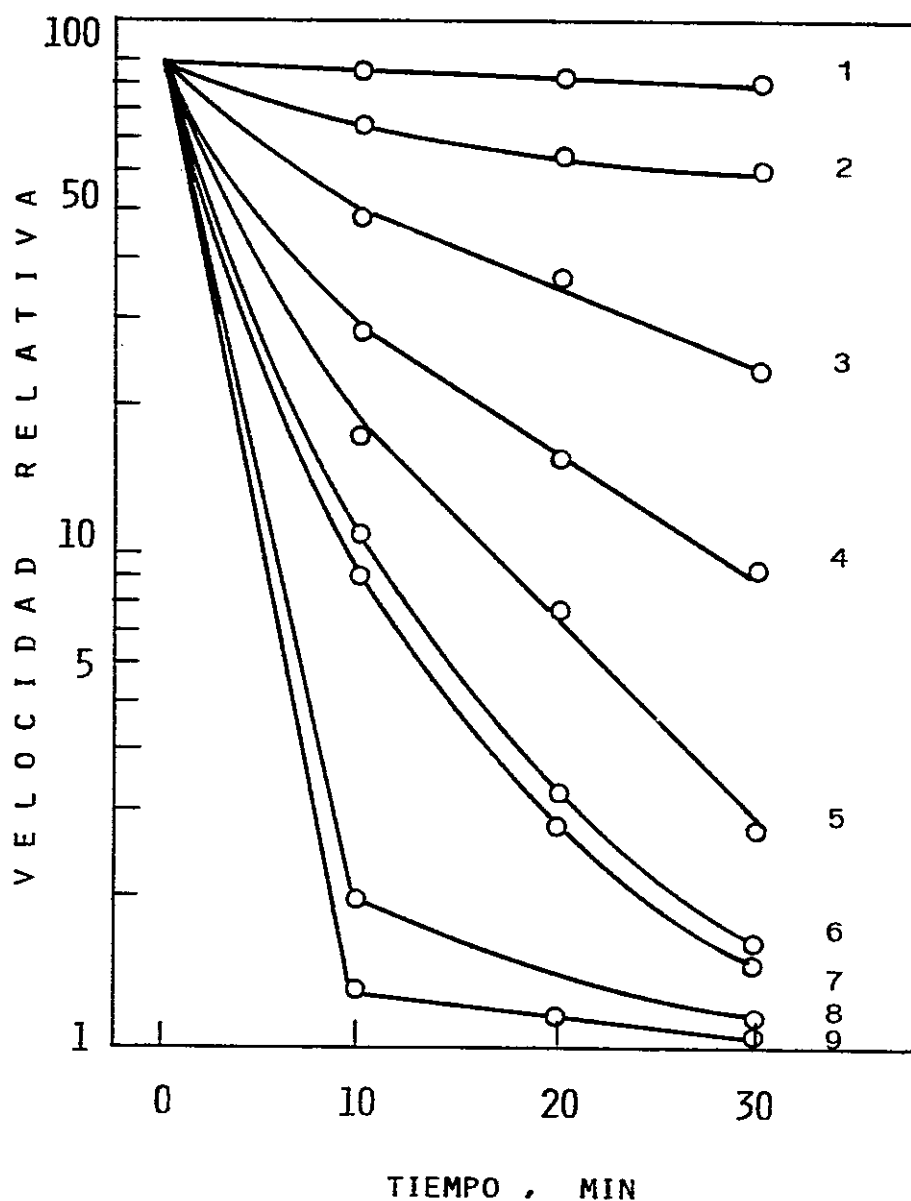


Figura 15. Efecto de la concentración de los sustratos en la inactivación de Pfk-2*. Se incubaron 151 mU de enzima, en 0,15 ml, con DTNB 40 μ M a 25°C. (1), sin DTNB; (2), MgATP^{-2} 4 mM más fructosa-6-P 1 mM; (3), MgATP^{-2} 4 mM más fructosa-6-P 0,1 mM; (4), fructosa-6-P 1 mM; (5), MgATP^{-2} 0,1 mM más fructosa-6-P 0,1 mM; (6), MgATP^{-2} 4 mM; (7) fructosa-6-P 0,1 mM; (8), MgATP^{-2} 0,1 mM; (9), sin agregados.

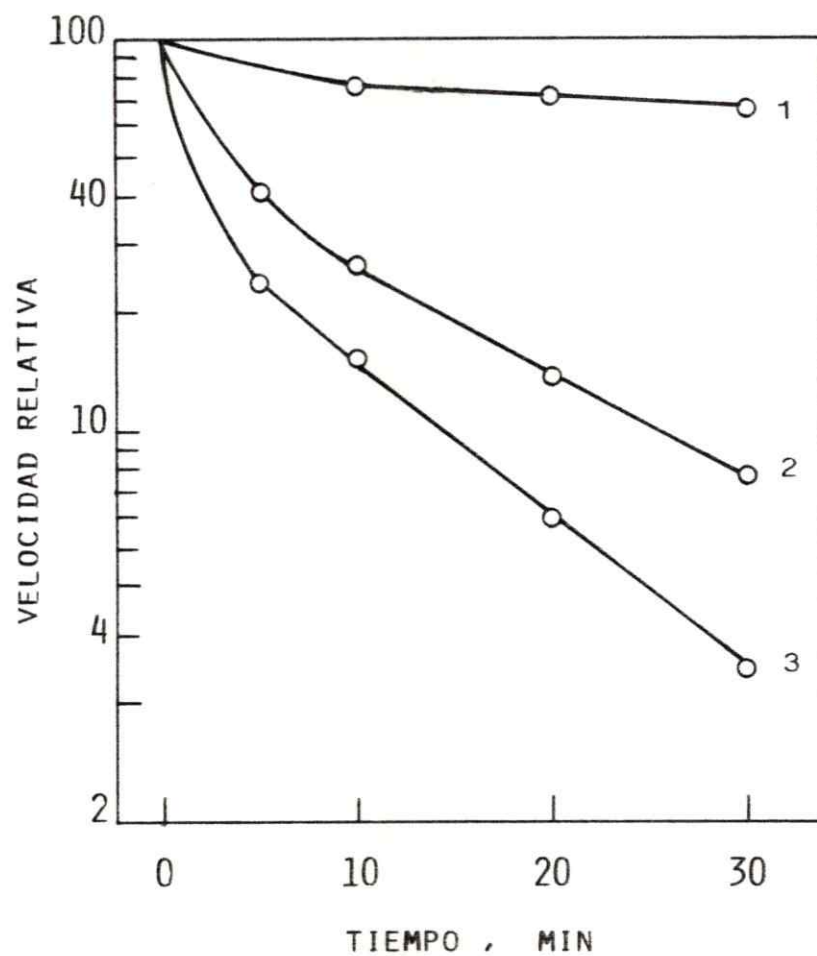


Figura 16. Inactivación de Pfk-2 en presencia de los productos. Se utilizaron 220 mU de enzima en 0,1 ml en presencia de DTNB 40 μ M a 25°C. (1), fructosa-1,6-P₂ 1 mM; (2), MgADP⁻¹ 1 mM; (3), sin agregados.

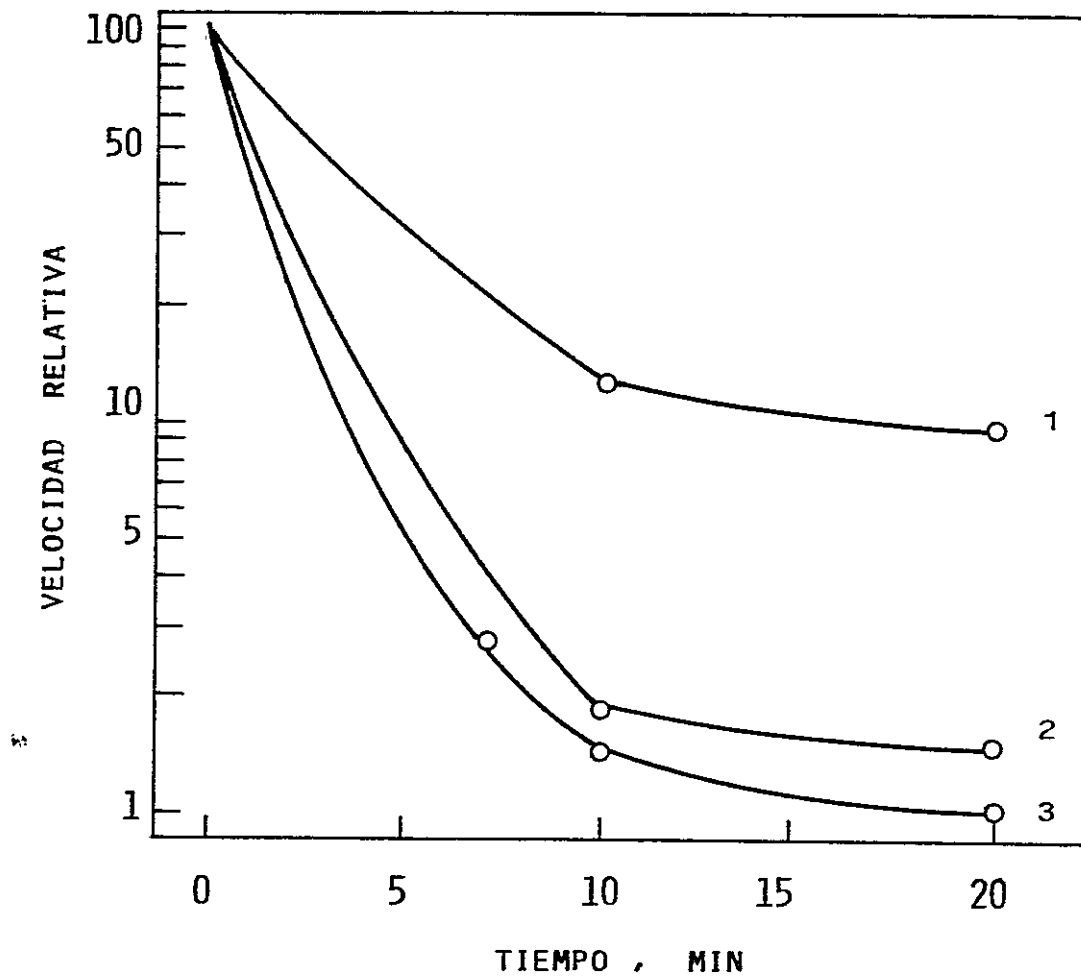


Figura 17. Inactivación de Pfk-2* en presencia de los productos. Se modificaron 152 mU de enzima en 0,1 ml con DTNB 40 μ M a 25°C. (1), fructosa-1,6-P₂ 1 mM; (2), MgADP⁻¹ 1 mM; (3), sin agregados.

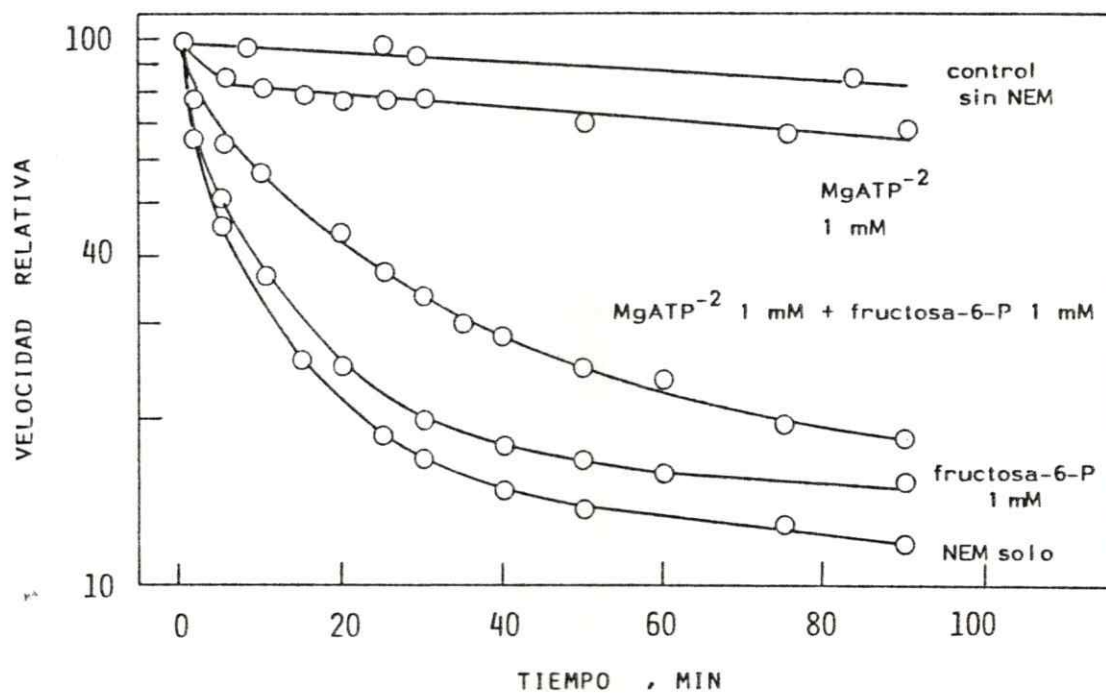


Figura 18. Inactivación de Pfk-2 por NEM en presencia de los sustratos. Se modificaron 230 mU de enzima en cada experimento. El volumen de la mezcla de reacción fue 0,2 ml y la concentración de NEM 40 μ M, a 25°C.

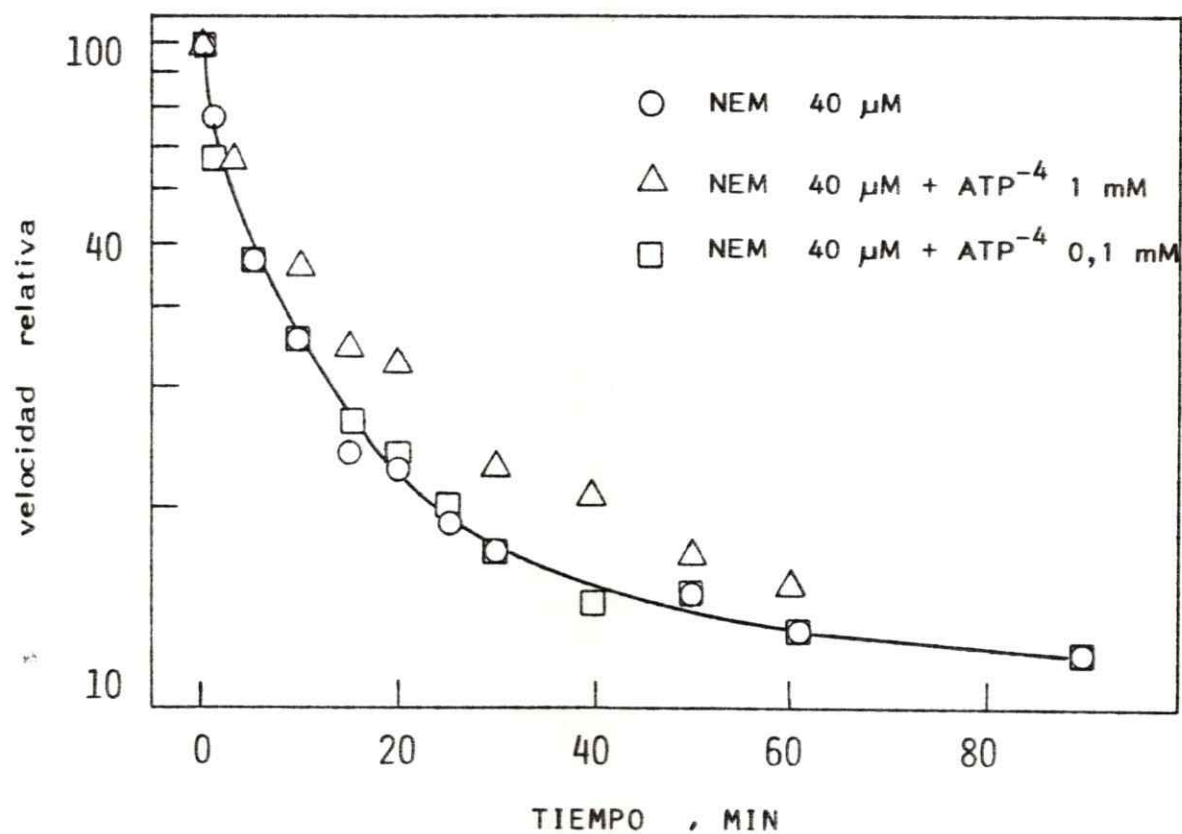


Figura 19. Inactivación de Pfk-2 por NEM en presencia de ATP⁻⁴. En cada experimento se modificaron 280 mU de enzima en 0,2 ml con NEM 40 μ M a 25°C.

disminuyó su efecto. En el caso de Pfk-2* sólo fructosa-6-P actuó como protector, pero su efecto fue parcial a la concentración ensayada (1 mM) (Figura 20).

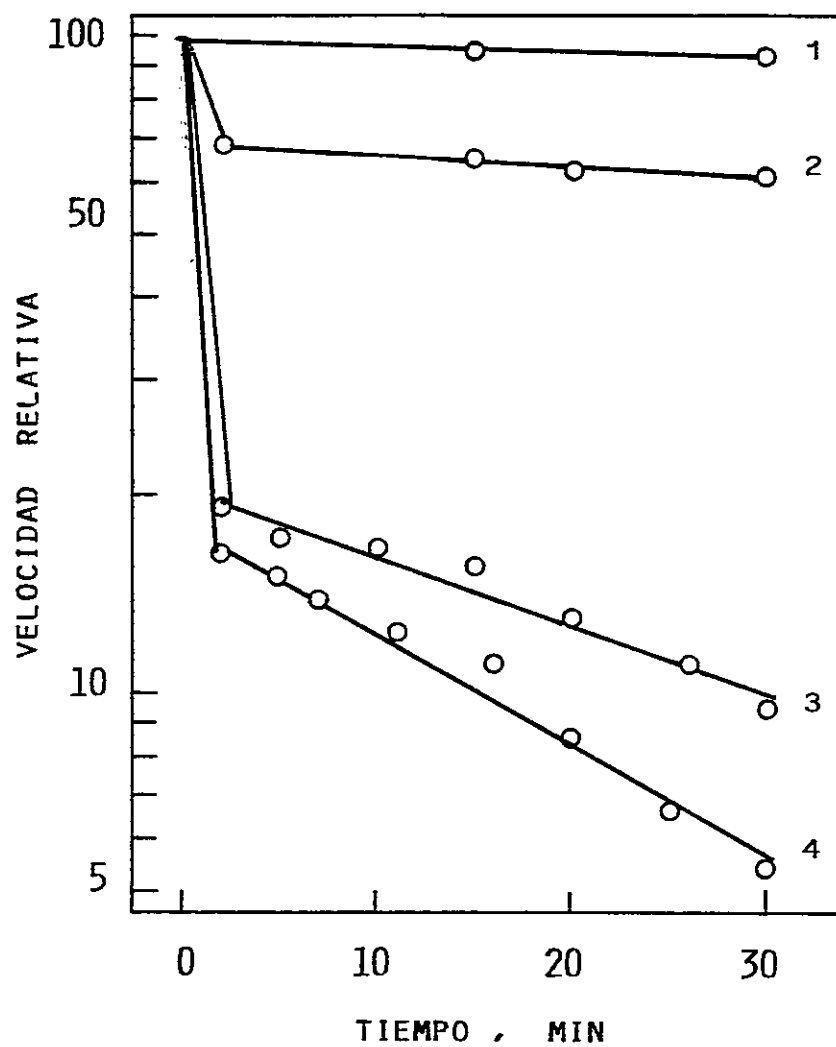


Figura 20. Inactivación de Pfk-2* por NEM en presencia de los sustratos. Se incubaron 140 mU de enzima en 0,2 ml con NEM $40 \mu\text{M}$ a 25°C . (1), sin NEM; (2), fructosa-6-P 1 mM; (3), MgATP^{-2} 1mM; (4), con NEM pero sin agregados.

DISCUSION

La investigación de las relaciones entre las propiedades biológicas y residuos específicos de proteínas es una de las aplicaciones más corrientes de la modificación química de las proteínas. Esta técnica ha sido utilizada para estudiar la naturaleza de los residuos de aminoácidos que participan en el proceso catalítico y de aquellos que son importantes para la unión de los sustratos (ver Glazer y col., 1975; Sigman y Mooser, 1975). Un punto débil de estos estudios proviene de la dificultad de distinguir entre residuos esenciales para la actividad, los del sitio activo y aquellos adyacentes a él. El uso de reactivos dirigidos específicamente a residuos ubicados en dichos sitios o a sitios reguladores de la actividad de una enzima ha permitido solucionar en parte el problema (Shaw, 1970; Lundblad y Noyes, 1984).

La principal aproximación al estudio de residuos importantes para la actividad catalítica comprende el modificar todos los residuos de un cierto tipo y determinar si la modificación provoca cambios o pérdida de la actividad. Los cambios en la actividad enzimática se pueden atribuir a la modificación del sitio activo, pero esta es sólo una de varias posibilidades. Aún cuando la especificidad del reactivo sea conocida, cambios en la actividad pueden resultar indirectamente debido a cambios estructurales o

a la modificación de residuos en sitios alostéricos. Por otra parte, si la modificación química no tiene efecto en las propiedades biológicas, es razonable suponer que los residuos modificados no son necesarios para la actividad.

Inactivación de las enzimas por DTNB

En el presente estudio se compara la reactividad de los grupos SH de la fosfofructoquinasa-2 de E. coli y de una enzima mutada que provoca una gran alteración en el crecimiento de las cepas que la contienen (Daldal y col., 1982). Las enzimas difieren en varios aspectos entre los que se incluyen el mecanismo cinético (Campos y col., 1984), la susceptibilidad a la inhibición por el sustrato $MgATP^{-2}$ (Guixé y Babul, 1985a) y efecto de ligandos en su estado de agregación (Guixé, 1985). Además, las enzimas poseen diferentes estabilidades a bajas temperaturas, ya sea en extractos crudos o en preparaciones puras (Daldal y col., 1982). Para purificar la enzima mutada fue necesario el agregado de etanol o glicerol a las soluciones, además de reactivos protectores de grupos SH. Al remover conjuntamente estos agentes estabilizadores de la actividad de Pfk-2*, ésta se pierde rápidamente de modo que no es posible caracterizar a la enzima. Este efecto no es tan marcado con la enzima normal Pfk-2. Estos hechos, indican la importancia de los grupos SH para ambas enzimas y de la diferencia estructural entre las mismas,

nos llevaron a estudiar el rol de los grupos SH en la mantención de la actividad y estructura de las enzimas por medio de modificación química de estos grupos.

La reactividad de Pfk-2* hacia DTNB y NEM fue mayor que la de Pfk-2. Para ambos reactivos Pfk-2 y Pfk-2* presentaron dos fases de inactivación, una rápida y una lenta. El porcentaje de inactivación que acompaña a cada fase varía con la concentración de agente modificador usado, por lo que es posible que existan tres tipos de grupos SH que reaccionan con velocidades diferentes y que a las concentraciones relativamente altas de agente modificador no sea posible distinguir entre los dos tipos que reaccionan más rápido. Así, el resultado será la observación de sólo dos fases de inactivación. Generalmente los valores de actividad residual eran muy bajos en la segunda fase, lo que complicaba la determinación de la misma. Por otra parte, también es posible que la modificación química provoque cambios conformacionales que alteren la reactividad de algunos grupos, obteniéndose así más de una fase de inactivación.

La inactivación de las enzimas con los reactivos modificadores es el resultado de una reacción entre los grupos SH de las enzimas y los reactivos, y no la consecuencia de una inactivación térmica; las enzimas incubadas en las mismas condiciones pero en ausencia del reactivo conservan su actividad durante el tiempo del experimento.

Por otra parte, el hecho de que el DTT sea capaz de revertir la inactivación de las enzimas sugiere que la pérdida de la actividad se debe a la formación del disulfuro enzima-TNB, o R-S-S-R en la enzima.

En ambas enzimas se observó que la inactivación era dependiente de la concentración del reactivo modificador, manteniéndose las dos fases señaladas anteriormente. Debido a la alta reactividad de los grupos SH de Pfk-2*, comparada con Pfk-2, fue posible determinar la constante de segundo orden para la primera fase de inactivación sólo a 0°C y a concentraciones relativamente bajas de agente modificador. El valor correspondiente a Pfk-2* es 30 veces superior al de Pfk-2. Es posible explicar esta diferencia suponiendo que la mutación pfkB10 afecta de tal manera la conformación de Pfk-2 que en Pfk-2* los grupos SH importantes para la actividad que reaccionan con DTNB están más expuestos para reaccionar con el reactivo. También es posible que la mutación comprenda cambios en el contenido de grupos SH de Pfk-2*.

Efecto de los sustratos en la modificación

Fosfofructoquinasa-2

En el caso de Pfk-2 se observó que $MgATP^{-2}$ actúa como protector frente a la inactivación producida por DTNB y NEM, mientras que a la misma concentración (1 mM) el efecto protector del fructosa-6-P es muy bajo cuando se usa DTNB (Fig. 12) y casi nulo cuando se usó NEM. Al

aumentar la concentración de fructosa-6-P en presencia de MgATP^{-2} disminuye el efecto protector de éste. Para explicar estos resultados es necesario resumir el efecto que tienen estos sustratos tanto en la actividad de la enzima como en su estado de agregación (Campos y col., 1984; Guixé y Babul, 1985a; Guixé, 1985). Por un lado, el mecanismo cinético en secuencia ordenada de Pfk-2 (fructosa-6-P - MgATP^{-2} - MgADP^{-1} - fructosa-1,6- P_2) indica que si los grupos SH reactivos están ubicados en o cerca del sitio activo se debería observar protección por fructosa-6-P o por fructosa-6-P más MgATP^{-2} , pero no por MgATP^{-2} solo. Cuando se usó DTNB se observó un aumento de la protección al aumentar la concentración de fructosa-6-P, pero la protección fue parcial. En ausencia de fructosa-6-P, MgATP^{-2} no debiera unirse al sitio activo y por lo tanto no actuaría como protector. Como este no es el caso, MgATP^{-2} debe estar ejerciendo su acción por unión a un sitio distinto del sitio activo. Guixé y Babul (1985a) demostraron la existencia de un sitio alostérico inhibitorio para MgATP^{-2} en Pfk-2 que estaría alterado en Pfk-2*. MgATP^{-2} es sustrato de la reacción, pero se comporta como inhibidor a concentraciones elevadas. Este efecto sólo se observa a concentraciones bajas del otro sustrato fructosa-6-P (0,1 mM), mientras que el efecto inhibitorio desaparece cuando se aumenta la concentración de fructosa-6-P (1 mM). Por otra parte, se sabe que la enzima existe como

un tetrámero en presencia de MgATP^{-2} sobre 0,2 mM o con MgATP^{-2} a bajas concentraciones de fructosa-6-P (0,1 mM), condiciones en las que se observa inhibición por el complejo metal-nucleótido (Guixé, 1985). Sin embargo, al aumentar la concentración de fructosa-6-P, en presencia de MgATP^{-2} a altas concentraciones, la inhibición desaparece y la enzima se convierte en dímero. Así, es posible que la protección por MgATP^{-2} a la inactivación por DTNB se deba a que la unión del nucleótido provoca un cambio conformacional que tiene como consecuencia la conversión de un dímero en un tetrámero. En el estado tetramérico los grupos SH reactivos responsables de la inactivación no estarían disponibles para la modificación química, mientras que la modificación de ellos en el estado dimérico produciría la inactivación de la enzima por medio de un mecanismo que dependería de su ubicación. Existen varias posibilidades, entre las que se incluyen la presencia de grupos SH en el sitio alostérico, en el sitio activo o en otro lugar. Si los grupos SH están ubicados en el sitio alostérico, es posible que la protección se deba a que la unión del nucleótido impide la modificación química y el cambio conformacional que provocaría la inactivación. Quizás es conveniente recalcar que a pesar de que en las condiciones en que se observa protección (altas concentraciones de MgATP^{-2} y bajas o nulas de fructosa-6-P) la enzima se encuentra en el estado tetramérico y es inactiva, la actividad en el espectrofotómetro se mide en presen-

cia de fructosa-6-P 1 mM y $MgATP^{-2}$ 1 mM, condiciones bajo las cuales la enzima es un dímero activo.

Por otra parte, si los grupos SH están ubicados en el sitio activo es posible que la protección por $MgATP^{-2}$ se deba a que su unión al sitio alostérico provoque un cambio conformacional en el sitio activo. La tetramerización de la enzima podría tener este efecto. Si éste fuera el caso, la unión de fructosa-6-P y $MgATP^{-2}$ al sitio activo debería proteger contra la inactivación. Como es necesaria la presencia de fructosa-6-P para que $MgATP^{-2}$ se una al sitio activo, y como no es posible separar completamente la unión del nucleótido a este sitio de la unión al sitio alostérico, la situación es compleja. Para resolver este problema es deseable obtener la unión del nucleótido sólo al sitio activo, lo que es posible lograr incubando la enzima con ATP y fructosa-6-P en ausencia de Mg. Guixé y Babul (1985a) demostraron que ATP^{-4} es un inhibidor de la enzima y que se comporta como inhibidor competitivo con respecto a $MgATP^{-2}$, por lo que debiera unirse al sitio activo en presencia de fructosa-6-P. Cuando la modificación se realizó en presencia de estos ligandos no se observó una protección apreciable (no se muestra en resultados) lo que sugiere que los grupos SH no están ubicados en el sitio activo. Por otra parte, no se observaron grandes diferencias en la inactivación de Pfk-2 y Pfk-2* cuando los experimentos se realizaron en presencia o en ausencia de Mg^{+2} . De esta manera, los grupos SH

responsables de la inactivación pueden estar ubicados en el sitio regulatorio o en otro sitio distinto del activo. Con los experimentos disponibles no es posible diferenciar entre ambas posibilidades. En ambos casos, la modificación de estos grupos tendría como resultado un cambio en la geometría del sitio activo.

Fosfofructoquinasa-2*

Para Pfk-2* se realizaron los mismos experimentos de protección por los sustratos que para Pfk-2. En este caso, contrariamente a lo observado para Pfk-2, no se observó protección por MgATP^{-2} 1 mM y al igual que para Pfk-2, la protección por fructosa-6-P 1 mM fue parcial. Este resultado no está de acuerdo con el mecanismo cinético de Pfk-2* donde MgATP^{-2} es el primer sustrato que se une a la enzima (Campos y col., 1984). Por otra parte, los experimentos de Guixé y Babul sugieren que en Pfk-2* el sitio para MgATP^{-2} está alterado como consecuencia de la mutación pfkB10. La enzima mutada no presenta inhibición por MgATP^{-2} a concentraciones bajas de fructosa-6-P y tampoco experimenta cambios en el estado de agregación en presencia de varias combinaciones de sustratos y productos (Guixé, 1985). De esta manera se explica la diferencia en el comportamiento de ambas enzimas frente al agente modificador en presencia de MgATP^{-2} 1 mM.

El porcentaje de inactivación por DTNB en fructosa-6-P 1 mM y en fructosa-6-P 1 mM más MgATP^{-2} 1 mM fue

similar y parcial (10% de actividad remanente a los 30 min, Fig. 12). Sin embargo, al aumentar la concentración de MgATP^{-2} a 4 mM en presencia de fructosa-6-P 1 mM, la protección, aún cuando también fue parcial, aumentó considerablemente (aproximadamente 70% a los 30 min.). MgATP^{-2} 4 mM en ausencia de fructosa-6-P ofrece una protección casi nula. Como Pfk-2* aparentemente no une MgATP^{-2} a un sitio alostérico, el efecto del nucleótido se debe a la unión al sitio activo. En el caso de Pfk-2* el mecanismo cinético también es en secuencia ordenada (Campos y col., 1984) y es el siguiente: MgATP^{-2} - fructosa-6-P - fructosa-1,6- P_2 - MgADP^{-1} . Así, fructosa-6-P no se une a la enzima en ausencia de MgATP^{-2} y el efecto protector de los sustratos se debería a su unión al sitio activo al enmascarar a los grupos SH reactivos e importantes para la actividad. A diferencia de Pfk-2, esta situación es posible ya que se obtiene una inactivación total por reacción con DTNB. También es posible que la unión de los sustratos provoque un cambio conformacional en la enzima que impida la accesibilidad del reactivo a los grupos-SH relacionados con la actividad, ubicados en un sitio distinto del activo.

Efecto de los productos en la inactivación de las enzimas

Los resultados obtenidos al realizar la inactivación por el agente modificador en presencia de los productos de la reacción que catalizan las enzimas son menos claros

que en el caso de los sustratos. Las protecciones fueron muy bajas, salvo en el caso de fructosa-1,6-P₂ para Pfk-2 en que se observó un 70% de actividad remanente después de 30 min de reacción. Es posible que la protección se deba a la unión de este compuesto al sitio activo ya que se comporta como un inhibidor competitivo del fructosa-6-P, primer sustrato que se une a la enzima. Por otra parte, también es posible que su efecto sea más bien inespecífico y se una al sitio alostérico para MgATP⁻². Esta posibilidad es menos probable ya que la protección por MgADP⁻¹ es menor.

Modificación química de grupos-SH de otras fosfofructoquinanas

Los experimentos de modificación química de grupos-SH están generalmente dirigidos a la titulación de los grupos-SH de la enzima, determinación del efecto de los sustratos en la accesibilidad de los reactivos hacia estos grupos y a la determinación del rol de los mismos en la catálisis y cinética enzimática.

Se ha demostrado por medio de estudios cinéticos (Uyeda y Racker, 1965) y de estudios conformacionales basados en la reactividad de grupos-SH (Kemp, 1969), que en la fosfofructoquinasa de músculo de conejo el sitio catalítico puede aceptar varios nucleósidos trifosfato además de ATP y que el sitio inhibitorio es más específico para MgATP⁻². Kemp y Forest (1968) encontraron cinco tipos

de grupos sulfhidrilo que varían en reactividad y en el efecto de los sustratos sobre ésta. En el tipo I existe un residuo altamente reactivo que es protegido por MgATP^{-2} . El tipo II comprende dos grupos menos reactivos que se protegen por fructosa-6-P y nucleótidos de adenina. El tipo III tiene un grupo y el IV comprende cinco grupos cuyas reactividades dependen del pH; dos de ellos son protegidos por fructosa-6-P. El resto de los grupos SH reacciona lentamente en la enzima nativa. La modificación de sólo un grupo-SH, el más reactivo de la enzima, resulta en una gran disminución de las interacciones cooperativas con MgATP^{-2} . Este nucleótido impide que ese grupo reaccione con DTNB por lo que su reactividad aparece como un indicador de la interacción de MgATP^{-2} con este sitio regulatorio de la enzima (Kemp, 1969) y del estado conformacional de la enzima (Kemp, 1969; Mathias y Kemp, 1972; Gottschalk y col., 1983). Por otra parte, se ha observado que activadores de la enzima tales como AMP, cAMP, ADP, fructosa-1,6- P_2 , provocan un aumento en la reactividad de este grupo SH. Estos cambios han sido interpretados en términos de una interconversión entre una conformación activa y una inactiva de la enzima. Los activadores de la enzima se unen a la forma activa mientras que los inhibidores se unen a la inactiva.

Gottschalk y col. (1983) han demostrado que las propiedades alostéricas de la fosfofructoquinasa de músculo se mantienen en la enzima proteolizada con subtilisina e

inactiva. La proteína digerida presenta cambios conformacionales inducidos por los ligandos, detectados por cambios en la reactividad de grupos SH hacia DTNB. La enzima proteolizada mantiene todos los grupos SH de la enzima nativa; AMP protege a dos grupos altamente reactivos mientras que fructosa-6-P y $MgATP^{-2}$ no los protegen. Estos datos sugieren que la proteína inactivada mantiene los sitios de unión para los activadores e inhibidores.

La titulación de la enzima de corazón de oveja con DTNB resulta en la modificación de aproximadamente cinco grupos SH por mol de subunidad de la enzima (Froede y col. 1968). El efecto de fructosa-6-P y de $MgATP^{-2}$ parece depender del agente modificador. Ninguno de los sustratos modificó el número de grupos SH titulados con DTNB. La reacción con p-cloromercuribenzoato resultó en la modificación de tres grupos-SH junto con la disminución de la afinidad de la enzima por fructosa-6-P, pero no por $MgATP^{-2}$.

Estudios de marcación por afinidad (Weng y col., 1980) indican que se obtiene una enzima menos sensible a la inhibición por $MgATP^{-2}$ e insensible a los activadores. Pareciera que estos marcadores modifican específicamente al sitio alostérico donde se unen los activadores, aparentemente distinto del sitio regulatorio para $MgATP^{-2}$.

La fosfofructoquinasa de levadura ha sido descrita como un octámero con dos tipos de subunidades (Tijane y col., 1980). La enzima contiene aproximadamente 83 resi-

duos de cisteína, clasificados en tres grupos de acuerdo a su reactividad hacia DTNB. La marcación diferencial en presencia y ausencia de fructosa-6-P demuestra que hay tres grupos-SH por subunidad asociados con el sitio alostérico para MgATP^{-2} (Tijane y col., 1980). Al separarse las subunidades alfa y beta de la enzima, se observó que la radioactividad se incorporaba sólo en las subunidades beta y que fructosa-6-P protege a los grupos-SH de la modificación. Esto permitió concluir que los sitios de unión para los sustratos están localizados en las subunidades beta.

En el caso de las fosfofructoquinasas tipo 2 de E. coli, los experimentos de inactivación por DTNB muestran la existencia de más de un grupo SH relacionado con la actividad de ambas enzimas. En el caso de Pfk-2 la protección por MgATP^{-2} estaría relacionada con la unión del nucleótido al sitio alostérico regulatorio, mientras que en el caso de Pfk-2* la protección estaría relacionada con la unión de fructosa-6-P al sitio activo. Tanto la ubicación como el número de grupos SH que reaccionan en cada enzima está por determinarse. Especial énfasis merecen los estudios de determinación del número de grupos SH de cada enzima, en presencia y en ausencia de agentes desnaturantes y de los principales ligandos. Posteriormente se podría establecer la ubicación en la secuencia de Pfk-2 y Pfk-2* de los grupos SH relacionados con la actividad.

REFERENCIAS

- Babul, J. (1978). Phosphofructokinases from Escherichia coli. Purification and characterization of the non allosteric isozyme. *J. Biol. Chem.* 253, 4350-4355.
- Babul, J., Robinson, J.P. y Fraenkel, D.G. (1977). Are the aerobic and anaerobic phosphofructokinases of Escherichia coli different? *Eur. J. Biochem.* 74, 533-537.
- Baumann, P. y Wright, B.E. (1968). The Phosphofructokinase of Dictyostelium discoideum. *Biochemistry* 7, 3653-3661.
- Blangy, D., Buc, H. y Monod, J. (1968). Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 31, 13-35.
- Bloxham, D.P. y Lardy, H.A. (1973). Phosphofructokinase. En *The Enzymes*. (Boyer, P.D., ed.) 3a Ed., Vol. 8, pp. 239-278. Academic Press, New York.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Campos, G., Guixé, V. y Babul, J. (1984). Kinetic mechanism of phosphofructokinase-2 from Escherichia coli. A mutant enzyme with a different mechanism. *J. Biol. Chem.* 259, 6147-6152.
- Daldal, F. (1983). Molecular cloning of the gene for phosphofructokinase-2 of Escherichia coli and the nature of a mutation, pfkB1, causing a high level of the enzyme. *J. Mol. Biol.* 168, 285-305.
- Daldal, F. (1984). Nucleotide sequence of gene pfkB encoding the minor phosphofructokinase of Escherichia coli K-12. *Gene*, 28, 337-342.

- Daldal, F. y Fraenkel, D.G. (1981). Tn10 insertions in the *pfkB* region of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 147, 935-943.
- Daldal, F., Babul, J., Guixé, V. y Fraenkel, D.G. (1982). An alteration in phosphofructokinase-2 of Escherichia coli which impairs gluconeogenic growth on sugars. *Eur. J. Biochem.* 126, 373-379.
- Davis, B.J. (1964). Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Evans, P.R. y Hudson, P.J. (1979). Structure and control of phosphofructokinase from Bacillus stearothermophilus. *Nature* 279, 500-504.
- Foe, L.G., Latshaw, S.P. y Kemp, R.G. (1983). Binding of hexose bisphosphates to muscle phosphofructokinase. *Biochemistry* 22, 4601-4606.
- Fraenkel, D.G. (1981). The biochemical genetics of glycolysis in microbes. En Hollander, A. (ed.) *Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals. Basic Life Sciences*, Vol. 18, 201-215.
- Fraenkel, D.G. (1986). Mutants in glucose metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 317-337.
- Fraenkel, D.G. y Vinopal, R.T. (1973). Carbohydrate metabolism in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 69-100.
- Fraenkel, D.G., Kotlarz, D. y Buc, H. (1973). Two fructose 6-phosphate kinase activities in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 248, 4865-4866.

- Frieden, C., Gilbert, H.R. y Bock, P.E. (1976). Phosphofructokinase. III Correlation of the regulatory kinetic and molecular properties of the rabbit muscle enzyme. *J. Biol. Chem.* 251, 5644-5647.
- Froede, H., Geraci, G. y Mansour, T. (1968). Studies on heart phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 243, 6021-6029.
- Glazer, A.N., Delange, R.J. y Sigman, D.S. (1975). Chemical modification of proteins. North Holland Publishing Co., Amsterdam. pp 113-126.
- Gottschalk, M., Catshaw, S.P. y Kemp, R. (1983). Retention of allosteric properties in an inactive, proteolyzed form of phosphofructokinase. *Biochemistry* 22, 1082-1087.
- Guixé, V. (1985). Tesis Doctorado en Ciencias, Mención Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Guixé, V. y Babul, J. (1985a). Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme altered in the allosteric site for $MgATP^{-2}$. *J. Biol. Chem.* 260, 11001-11005.
- Guixé, V. y Babul, J. (1985b). A phosphofructokinase mutant of *Escherichia coli* altered in its allosteric properties impairs gluconeogenic growth. *Arch. Biol. Med. Exp.* 18, 301-307.
- Guzmán, J.C. (1987). Tesis en realización. Magister en Ciencias Biológicas, Mención Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Hammes, G.G. (1982). Enzyme catalysis and regulation. Academic Press, New York, pp. 200-207.
- Hers, H.G. y Van Schaftingen, E. (1982). Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* 206, 1-12.

- Hesterberg, L.K. y Lee, J.C. (1982). Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase at pH 7.0: stoichiometry. *Biochemistry* 20, 2974-2980.
- Kemp, R.G. (1969). Allosteric properties of muscle phosphofructokinase. I. Binding of magnesium adenosine triphosphate to the inhibitory site. *Biochemistry* 8, 3162-3168.
- Kemp, R. y Forest, P. (1968). Reactivity of sulfhydryl groups of muscle phosphofructokinase. *Biochemistry* 7, 2596-2603.
- Kemp, R. y Foe, L.G. (1983). Allosteric regulatory properties of muscle phosphofructokinase. *Mol. Cel. Biochem.* 57, 147-154.
- Kornberg, A. y Pricer, W.E. (1951). Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6 diaminopurine riboside. *J. Biol. Chem.* 193, 481-495.
- Kotlarz, D. y Buc, H. (1977). Two Escherichia coli fructose-6-phosphate kinases. Preparative purification, oligomeric structure and immunological studies. *Biochim. Biophys. Acta* 484, 35-48.
- Kotlarz, D. y Buc, H. (1981). Regulatory properties of phosphofructokinase 2 from Escherichia coli. *Eur. J. Biochem.* 117, 569-574.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Lundblad, R.L. y Noyes, C.M. (1984). En **Chemical reagents for protein modification**, vol I. The modification of cysteine, pp 55-93. CRC Press, Florida.
- Luther, M., Gilbert, H. y Lee, J.C. (1983). Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: role of subunit interaction in regulation of enzymatic activity. *Biochemistry* 22, 5494-5500.

- Luther, M.A., Hesterberg, L.K. y Lee, J.C. (1985). Subunit interaction of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of purification procedures. *Biochemistry*, 24, 2463-2470.
- Mansour, T.E. (1972). Phosphofructokinase. *Curr. Top. Cell. Reg.* 5, 1-46.
- Mathias, M.M. y Kemp, R.G. (1972). Allosteric properties of muscle phosphofructokinase. III. Thiol reactivity as an indicator of conformational state. *Biochemistry*, 11, 578-584.
- Mayr, G.W. (1984a). Interaction of calmodulin with muscle phosphofructokinase. Changes of the aggregation state, conformation and catalytic activity of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 143, 513-520.
- Mayr, G.W. (1984b). Interaction of calmodulin with muscle phosphofructokinase. Interplay with metabolic effectors of the enzyme under physiological conditions. *Eur. J. Biochem.* 143, 521-529.
- Ogilvie, J.W. (1983). Rabbit muscle phosphofructokinase. 2. Inactivation by the affinity label 5'-(p-(fluorosulfonyl)benzoyl)-1,N⁶-ethenadenosine. *Biochemistry* 22, 5915-5921.
- Racker, E. (1947). Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphofructokinase activity. *J. Biol. Chem.* 167, 843-854.
- Redkar, V.D. y Kenkare, U.W. (1975). Effect of ligands on the reactivity of essential sulfhydryls of brain hexokinase. Possible interactions between substrates binding sites. *Biochemistry* 14, 4704-4712.
- Reinhart, G.D. (1983). Influence of fructose-2,6-bisphosphate on the aggregation properties of rat liver phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 258, 10827-10830.

- Retamal, C. (1987). Tesis en realización. Magister en Ciencias Biológicas, Mención Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Reyes, A., Hubert, E. y Slebe, J.C. (1985). The reactive cysteine residue of pig kidney fructose 1,6-bisphosphate is related to a fructose-2,6-bisphosphate allosteric site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 373-379.
- Riordan, J.F. y Valle, B.L. (1967). Reactions with N-ethylmaleimide and p-mercuribenzoate. *Meth. Enzymol.* 11, 541-548.
- Robinson, J.P. y Fraenkel, D.G. (1978). Allosteric and non-allosteric E. coli phosphofructokinases: effects on growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 858-863.
- Satre, M., Bof, M., Issartel, J.P. y Vignais Pierre, V. (1982). Chemical modification of F1-ATPase by dicyclohexyl carbodiimide. Application to analysis of the stoichiometry of subunits in Escherichia coli F1. *Biochemistry* 21, 4772-4776.
- Sedivy, J.M., Babul, J. y Fraenkel, D.G. (1986). AMP-insensitive fructose bisphosphatase in Escherichia coli and its consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1656-1659.
- Sols, A., Castaño, J.G., Aragón, J.J., Domenech, c., Lazo, P.A. y Nieto, A. (1981). Multimodulation of phosphofructokinases in metabolic regulation. En **Metabolic Interconversion of Enzymes**. (Holzer, H., ed.) pp. 111-123. Springer Verlag, New York.
- Sharma, H.K. (1982). The fast reacting sulfhydryl group of rat muscle phosphoglycerate kinase is necessary for activity and maintenance of tertiary structure. *Biochemistry* 21, 6661-6668.

- Shaw, E. (1970). Chemical modification by active-site-directed reagents. En **The Enzymes**. (Boyer, P.D., ed.) 3a Ed., Vol 1, pp. 91-146.
- Sigman, D.S. y Mooser, G. (1975). Chemical studies of enzyme active sites. **Ann. Rev. Biochem.** 44, 889-931.
- Soper, T.S., Jones, W.M. y Manning, J.M. (1979). Effects of substrates on the selective modification of the cysteinyl residues of D-amino acid transaminase. **J. Biol. Chem.** 254, 10901-10905.
- Thomson, J.A. (1977). E. coli phosphofructokinase synthesized in vitro from a colE1 hybrid plasmid. **Gene**, 1, 347-356.
- Tijane, M., Chaffotte, A., Seydoux, F., Roucous, C. y Laurent, M. (1980). Sulfhydryl groups of yeast phosphofructokinase. Specific location on beta-subunits of fructose-6-phosphate binding site as demonstrated by a differential chemical labeling study. **J. Biol. Chem.** 255, 10188-10193.
- Thornburgh, B.N., Liu Wu, L. y Griffin, C.C. (1978). Phosphofructokinase from Escherichia coli: Further evidence for identical subunits. **Can. J. Biochem.** 56, 836-838.
- Weng, L., Heinrikson, R.L. y Mansour, T.E. (1980). Amino-acid sequence at the allosteric site of sheep heart phosphofructokinase. **J. Biol. Chem.** 255, 1492-1496.
- Uyeda, K. (1979). Phosphofructokinase. **Adv. Enzymol.** 48, 193-244.
- Uyeda, K. y Racker, E. (1965). Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and phosphofructokinase. **J. Biol. Chem.** 240, 4682-4688.
- Uyeda, K., Furuya, E. y Luby, L.J. (1981). The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on

the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 256, 8394-8399.

Younathan, E.S, Paetkau, V. y Lardy, H.A. (1968). Rabbit muscle phosphofructokinase. Reactivity and function of thiol groups. *J. Biol. Chem.* 243, 1603-1608.