

EFFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD 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

JUAN CARLOS GUZMAN WESTON

1989

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

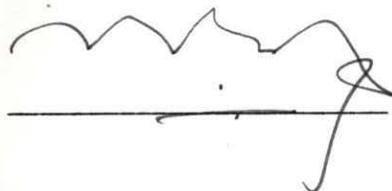
Se informa al Consejo de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Juan Carlos Guzmán Weston

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 19 de Diciembre de 1989.

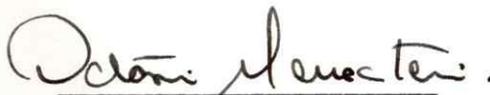
Director de Tesis

Dr. Jorge Babul



Comisión Informante de Tesis

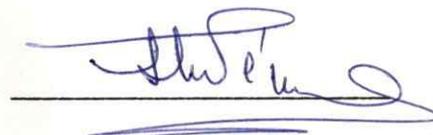
Dr. Octavio Monasterio



Dr. Hermann Niemeyer M.



Dra. Luz María Pérez



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. y fue financiada parcialmente por el Departamento Técnico de Investigación de la Universidad de Chile (Proyectos 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 482-87, 1120-89) y por la Organización de los Estados Americanos, OEA.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jorge Babul, por la posibilidad de realizar esta tesis bajo su valiosa dirección y en especial por su permanente amistad y tolerancia.

Al Dr. Hermann Niemeyer, quien me brindó su orientación y apoyo con críticas y consejos para el logro de un mejor desarrollo profesional.

A la Dra. Victoria Guixé por su valiosa cooperación a través de permanentes críticas constructivas en el desarrollo de esta tesis.

A los Drs. Tito Ureta y Octavio Monasterio por su constante y fraternal estímulo.

A Carlos Medina por su contribución en el desarrollo de los programas computacionales y por compartir su singular talento intelectual.

A Claudio Retamal por su generosa amistad y colaboración en la purificación de las enzimas.

A Eliana Rabajille, Ximena Espinosa, Sergio Sanhueza, Gabriel Campos, Patricia Varela, Marina Acoria, Sergio Zepeda, Carlos Cerpa y Juan Carlos Torres por su apoyo y amistad.

A Soledad Luzanto por mecanografiar esta tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, quienes me brindaron su cariño y aprecio.



A mis padres

A mi hermano y sobrinos

INDICE DE MATERIAS

	pág.
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCION	1
Fosfofructoquinasas de <u>E. coli</u>	2
Efecto del pH sobre la actividad enzimática	7
MATERIALES Y METODOS	11
Reactivos	11
Preparación de Pfk-2 y Pfk-2*	11
Purificación de Pfk-2 y Pfk-2*	12
Estabilidad y mantención de las enzimas	12
Determinación de la actividad enzimática	13
Determinación de la concentración de los reactivos	14
Determinación de los parámetros cinéticos $K_m(ap)$ y $V_{m\acute{a}x}$	15
Determinación de los valores de pK_a y de ΔH° de ionización	16
RESULTADOS	18
Efecto del pH sobre la actividad de Pfk-2 y Pfk-2*	18
Efecto del pH y la temperatura sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 y Pfk-2*	18
Determinación del ΔH° de ionización	19

	pág.
Efecto del dimetilsulfóxido sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 y PFK-2*	19
DISCUSION	61
BIBLIOGRAFIA	71

LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1.	Fosfofructoquinasas de la cepa silvestre y de mutantes de <u>Escherichia coli</u> .	4
Tabla 2.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 33°.	20
Tabla 3.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 30°.	21
Tabla 4.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 27°.	22
Tabla 5.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 24°.	23
Tabla 6.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 21°.	24
Tabla 7.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2* a 33°.	25
Tabla 8.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2* a 30°.	26
Tabla 9.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2* a 27°.	27
Tabla 10.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2* a 24°.	28
Tabla 11.	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos del Pfk-2* a 21°.	29
Tabla 12.	Valores de pKa obtenidos de las gráficas de Dixon a diferentes temperaturas para Pfk-2. (ATP, sustrato variable)	30
Tabla 13.	Valores de pKa obtenidos de las gráficas de Dixon a diferentes temperaturas para Pfk-2. (fructosa-6-P, sustrato variable)	31
Tabla 14.	Valores de pKa obtenidos de las gráficas de Dixon a diferentes temperaturas para Pfk-2*. (ATP, sustrato variable)	32

Tabla 15.	Valores de pKa obtenidos de los gráficas de Dixon a diferentes temperaturas para Pfk-2*. (fructosa-6-P, sustrato variable)	33
Tabla 16.	ΔH° de ionización de grupos catalíticamente importantes de Pfk-2.	34
Tabla 17.	ΔH° de ionización de grupos catalíticamente importantes de Pfk-2*.	35
Tabla 18.	Efecto del dimetilsulfóxido sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2, con ATP como sustrato variable.	36
Tabla 19.	Efecto del dimetilsulfóxido sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2, con fructosa-6-P como sustrato variable.	37
Tabla 20.	Efecto del dimetilsulfóxido sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2*, con ATP como sustrato variable.	38
Tabla 21.	Efecto del dimetilsulfóxido sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2*, con fructosa-6-P como sustrato variable.	39
Tabla 22.	Efecto del Me_2SO sobre los valores de pKa obtenidos de las gráficas de Dixon para Pfk-2.	40
Tabla 23.	Efecto del Me_2SO sobre los valores de pKa obtenidos de las gráficas de Dixon para Pfk-2*.	40
Tabla 24.	Valores de pKa y ΔH° de ionización de grupos presentes en proteínas.	66

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Efecto del pH sobre la actividad de Pfk-2.	41
Figura 2. Efecto del pH sobre la actividad de Pfk-2*.	42
Figura 3. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 33°.	43
Figura 4. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 30°.	44
Figura 5. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 27°.	45
Figura 6. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 24°.	46
Figura 7. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 21°.	47
Figura 8. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 33°.	48
Figura 9. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 30°.	49
Figura 10. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 27°.	50
Figura 11. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 24°.	51
Figura 12. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 21°.	52
Figura 13. Gráficas de Arrhenius para Pfk-2.	53
Figura 14. Gráficas de Arrhenius para Pfk-2.	54
Figura 15. Gráficas de Arrhenius para Pfk-2*.	55
Figura 16. Gráficas de Arrhenius para Pfk-2*.	56
Figura 17. Gráficas de Dixon log $V_{m\acute{a}x}/K_m(ap)$ en funci3n del pH para Pfk-2 a 30° en presencia y ausencia de dimetilsulf3xido.	57
Figura 18. Gráficas de Dixon log $V_{m\acute{a}x}$ para Pfk-2 en funci3n del pH a 30° en presencia y ausencia de dimetilsulf3xido.	58
Figura 19. Gráficas de Dixon log $V_{m\acute{a}x}/K_m(ap)$ en funci3n del pH para Pfk-2* a 30° en presencia y ausencia de dimetilsulf3xido.	59
Figura 20. Gráficas de Dixon log $V_{m\acute{a}x}$ en funci3n del pH para Pfk-2* a 30° en presencia y ausencia de dimetilsulf3xido.	60

ABREVIATURAS

Fructosa-1,6-P ₂	Fructosa-1,6-bisfosfato
Fructosa-6-P	Fructosa-6-fosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
Fructosa-2,6-P ₂	Fructosa-2,6-bisfosfato
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
DTT	ditiotreitol
Me ₂ SO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Acido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)
NEM	N-etilmaleimida

RESUMEN

La cepa silvestre de E. coli contiene dos isoenzimas de fosfofructoquinasa; la forma principal, Pfk-1, responsable del 90-95% de la actividad fosfofructoquinásica total y la forma minoritaria, Pfk-2. Ambas isoenzimas están codificadas por genes diferentes, pfkA y pfkB, respectivamente. Cepas con la mutación pfkB1 en el promotor tienen altos niveles de Pfk-2, mientras que una mutación en el gen estructural, pfkB10, produce altos niveles de una Pfk-2 (Pfk-2*) con propiedades cinéticas y estructurales diferentes.

Cepas que no contienen Pfk-1 y poseen altos niveles de Pfk-2 crecen bien en glucosa y en fuentes de carbono gluconeogénicas, mientras que cepas isogénicas con Pfk-2* crecen bien en glucosa y exhiben un lento crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas. Pfk-2 y Pfk-2* difieren en varios aspectos: mecanismo cinético, susceptibilidad a la inhibición por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P, efecto de ligandos sobre el estado de agregación y efecto de los sustratos sobre la inactivación por modificación química de grupos -SH. El objetivo de esta tesis es obtener información comparativa sobre los residuos de aminoácidos involucrados en la unión de los sustratos y actividad de Pfk-2 y Pfk-2* de E. coli. Se estudió la variación de los parámetros cinéticos para los sustratos ATP y fructosa-6-P con el pH, usando como variables la temperatura y la presencia de dimetilsulfóxido.

Para ambas enzimas las gráficas de Dixon obtenidas fueron simples, con pendientes negativas cuando se graficó $\log V_{\max}/K_m(\text{ap})$ en

función del pH y pendientes positivas cuando se graficó $\log V_{\text{máx}}$ en función del pH. Resultados similares se obtuvieron al variar el pH a distintas temperaturas y al incluir al dimetilsulfóxido. En ambos casos el cambio de actividad, para Pfk-2 y Pfk-2*, ocurre en el intervalo ácido de la escala de pH y la pérdida de ella está asociada a la protonación de uno o más grupos con valores similares de pKa. También se presentan las curvas teóricas obtenidas de un análisis computacional de los datos experimentales.

Los valores de pKa obtenidos de la gráficas de Dixon, cuando se varió uno u otro sustrato, sugieren que los grupos involucrados en la catálisis y en la unión de los sustratos son del mismo tipo para ambas enzimas, probablemente residuos histidina.

Experimentos similares a diferentes temperaturas sirvieron para determinar el ΔH° de ionización. Estos resultados sugieren la participación de residuos histidina en la unión de los sustratos, en la catálisis, o en ambos casos. La observación que el dimetilsulfóxido no incrementa significativamente los valores de pKa apoyan estas conclusiones.

ABSTRACT

Wild type E. coli has two phosphofructokinase isozymes: a major form (Pfk-1; 90-95% of the total phosphofructokinase activity) and a minor one (Pfk-2), coded by different genes (pfkA and pfkB, respectively). Strains with a promoter mutation in pfkB (pfkB1) have high levels of Pfk-2, while a mutation in the structural gene (pfkB10) produces a Pfk-2 (Pfk-2*) with different kinetic and structural properties.

Strains deficient for Pfk-1 and with high levels of Pfk-2 grow well on glycolytic and gluconeogenic carbon sources, while isogenic strains with Pfk-2* grow faster on sugars but exhibit greatly impaired growth on gluconeogenic carbon sources.

Pfk-2 and Pfk-2* differ in several aspects: kinetic mechanism, susceptibility to inhibition by MgATP at low fructose-6-P concentrations, effect of ligands on the state of aggregation and effect of substrates to inactivation by chemical modification of SH groups. This thesis is aimed at obtaining comparative information on the amino acid residues involved in substrate binding and activity of Pfk-2 and Pfk-2* of E. coli. The variation of the kinetic parameters for the substrates ATP and fructose-6-P with pH was studied using as variables the temperature and presence of dimethylsulfoxide.

For both enzymes the corresponding Dixon plots obtained were simple and of negative slopes when $\log (V_{max}/K_m(ap))$ was plotted versus pH. Similar results were obtained when the pH was varied at different temperatures and in the presence of dimethylsulfoxide. In

both cases the changes in activity for both, Pfk-2 and Pfk-2*, occur in the acid range of the pH scale, i.e. the decrease in activity is due to the protonation of one or more groups with similar pKa values. Theoretical curves obtained from a computer analysis are also presented.

The pKa values obtained from the Dixon plots when varying either substrate suggest that for both enzymes the groups involved in catalysis and substrate binding are of the same type, probably histidine residues.

Similar experiments at different temperatures allowed to determine the ΔH° of ionization. These results also support the possible involvement of histidine residues in substrate binding and/or catalysis. The observation that dimethylsulfoxide does not increase significantly the pKa values further supports the latter conclusion.

INTRODUCCION

El control de la actividad catalítica de las enzimas es uno de los principales modos de regulación del metabolismo celular (Hammes, 1982). La función que desempeñan las enzimas está asociada con una conformación dada, determinada por las diferentes uniones entre los aminoácidos que constituyen la cadena polipeptídica, tanto por la unión de sustratos como de efectores de la enzima. Además, como consecuencia de la unión de estos ligandos pueden alterarse la interacción entre las cadenas polipeptídicas y el estado de agregación de las enzimas, rasgos de gran importancia en la regulación de aquellas enzimas que están constituidas por más de una cadena polipeptídica (Monod y col., 1963 y 1965; Koshland, 1970).

Se han estudiado muchas enzimas con propiedades reguladoras con el propósito de establecer las relaciones que existen entre su estructura y función, lo que exige conocer la estructura de las proteínas a diferentes niveles, como la secuencia de residuos aminoácidos unidos covalentemente, las posteriores organizaciones tridimensionales de la molécula, los estados de agregación en presencia o ausencia de ligandos, junto a otras características relacionadas con la catálisis misma, tales como el número y el tipo de grupos de la enzima que participan en la unión de sustratos y efectores.

Un grupo de enzimas muy requeridas para el estudio de la relación estructura-función son aquellas que participan en el metabolismo hidrocarbonado, principalmente las que catalizan la conversión de glucosa en piruvato en la vía glicolítica. En particular la

fosfofructoquinasa, que se considera crucial en la regulación del flujo metabólico de dicha vía, que es multinodulada por diversos efectores y por cambios en su estado de agregación (Bloxham y Lardy, 1973; Uyeda, 1979; Sols y col., 1981).

La fosfofructoquinasa (ATP: D-Fructosa-6-fosfato-1-fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.11) cataliza la transferencia del grupo fosforilo terminal desde el ATP al hidroxilo del C₁ del fructosa-6-P para dar como producto fructosa-1,6-P₂ y ADP. Esta enzima ha sido estudiada extensamente en tejidos de animales superiores, bacterias y levaduras y en la mayoría de ellos presenta una función de saturación sigmoidea con respecto a fructosa-6-P y es modulada por varios metabolitos, tales como cAMP, AMP, ADP, y fructosa-6-P, los cuales actúan como activadores y citrato, ATP, 3-fosfoglicerato y fosfoenolpiruvato, que son inhibidores (Bloxham y Lardy, 1973; Uyeda, 1979; Sols y col., 1981). La inhibición producida por ATP disminuye en presencia de Pi, cAMP, fructosa-6-P y fructosa-1,6-P₂. En la presente década se ha descrito un potente activador de fosfofructoquinasa, el fructosa-2,6-P₂, el cual disminuye la inhibición de la enzima por ATP y aumenta su afinidad por el sustrato fructosa-6-P (Uyeda y col., 1981; Hers y Van Schaftingen, 1982).

Fosfofructoquinasas de Escherichia coli.

La cepa silvestre de E. coli presenta dos isoenzimas que fosforilan fructosa-6-P a expensas de ATP y otros nucleótidos (Fraenkel y col., 1973; Babul, 1978). Pfk-1 es la isoenzima principal y representa alrededor del 90% de la actividad fosfofructoquinásica, es codificada

por el gen pfkA (Thomson, 1977) y está compuesta por cuatro subunidades de Mr 34.000 (Blangy y col., 1968; Kotlarz y Buc, 1977; Babul, 1978; Thornburgh y col., 1978). Presenta una función de saturación sigmoidea con respecto a fructosa-6-P, inhibición por fosfoenolpiruvato y activación por ADP (Blangy y col., 1968; Babul, 1978).

La otra isoenzima, Pfk-2, responsable del 10% de la actividad total, es codificada por el gen pfkB (Daldal y Fraenkel, 1981; Daldal, 1983), es un dímero de subunidades de Mr 36.000, (Babul, 1978; Guixé, 1985; Guixé y Babul, 1988), presenta cinética de saturación hiperbólica con respecto a fructosa-6-P, no es inhibida por fosfoenolpiruvato o activada por ADP pero, a diferencia de Pfk-1, es inhibida por fructosa-1,6-P₂ (Babul, 1978).

Cepas con la mutación pfkB1 poseen niveles de Pfk-2 alrededor de 30 veces mayores que los de la cepa silvestre (Babul, 1978) (Tabla 1), en tanto que cepas con una mutación cercana, pfkB10, presentan una Pfk-2 de menor estabilidad llamada Pfk-2* (Daldal y col., 1982) (Tabla 1). Al disponer de una cepa con ambas mutaciones, pfkB1 pfkB10 se observan 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 crecen bien en azúcares y en sustratos gluconeogénicos (Daldal y col., 1982), sin embargo, cepas isogénicas que contienen altos niveles de Pfk-2* crecen bien en azúcares, pero lentamente en sustratos gluconeogénicos como glicerol (Daldal y col., 1982), (Tabla 1).

Se ha intentado explicar esta diferencia de crecimiento mediante

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>pfkB1</u> <u>pfkB2</u>	Pfk-1, niveles altos	80	95
<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).

estudios in vitro de las características de Pfk-2 y Pfk-2* purificada (Daldal y col., 1982; Campos y col., 1984; Guixé y Babul, 1985a; Guixé y Babul, 1985b; Guixé, 1985; Guixé y Babul, 1988). Ambas enzimas poseen un mecanismo cinético en secuencia ordenada, sin embargo, difieren en el orden de adición de los sustratos y liberación de los productos, lo que sugiere diferencias estructurales en el sitio activo de las enzimas (Campos y col., 1984).

Por otra parte, ambas enzimas presentan un comportamiento diferente hacia MgATP^{-2} (Guixé y Babul, 1985a), 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* no es inhibida en condiciones similares. A altas concentraciones de fructosa-6-P (1 mM) ninguna de las enzimas es inhibida por MgATP^{-2} . ATP^{-4} es un inhibidor competitivo con respecto a MgATP^{-2} tanto de Pfk-2 como Pfk-2* (Guixé y Babul, 1985a).

Los resultados anteriores sugieren que la inhibición de Pfk-2 por MgATP^{-2} se produce por la unión de este compuesto a un sitio alostérico que estaría alterado en Pfk-2*, lo que indicaría que la mutación pfkB10 afecta la estructura de la enzima y su estabilidad (Daldal y col., 1982; Guixé y Babul, 1985a; Campos y col., 1984). Sin embargo, el cambio estructural no altera la actividad catalítica de Pfk-2 y tanto ésta como Pfk-2* presentan constantes cinéticas similares para ATP y fructosa-6-P (Campos y col., 1984).

La actividad de algunas fosfofructoquinasas es afectada por cambios en el estado de agregación de las enzimas producidos por la

acción de ligandos (Bloxham y col., 1973; Kotlarz y Buc., 1981; Guixé y Babul, 1985b y Guixé, 1985). Experimentos de sedimentación zonal en gradientes de sacarosa muestran que Pfk-2 puede estar presente como dímero o tetrámero, dependiendo de las concentraciones relativas de $MgATP^{-2}$, ATP^{-4} y fructosa-6-P (Guixé, 1985; Guixé y Babul, 1988; Retamal, 1988). Bajo las condiciones en que Pfk-2 es inhibida por $MgATP^{-2}$, a concentraciones bajas de fructosa-6-P, ésta se encuentra como tetrámero, en tanto que al elevar la concentración de fructosa-6-P, el efecto inhibitorio de $MgATP^{-2}$ desaparece y la enzima se convierte en dímero. Estas observaciones sugieren que la inhibición de Pfk-2 está relacionada con la existencia del estado de agregación tetramérico prevaleciente de la enzima. Pfk-2* no sería capaz de existir como tetrámero por una alteración en el sitio regulatorio para $MgATP^{-2}$. Los resultados expuestos anteriormente indican que ambas enzimas difieren estructuralmente como consecuencia de la mutación pfkB10. La caracterización estructural de Pfk-2 y de su forma mutada, Pfk-2* (Retamal, 1988), se encuentra en estudio en nuestro laboratorio.

Se han realizado estudios de modificación química de grupos-SH de Pfk-2 y Pfk-2* (Espinosa, 1987) y se ha sugerido que grupos-SH de importancia en la actividad de las enzimas son más reactivos en Pfk-2* que en Pfk-2. En Pfk-2, $MgATP^{-2}$ actúa como protector a la inactivación por los reactivos modificadores, mientras que el efecto protector de fructosa-6-P es sólo parcial. Al aumentar la concentración de fructosa-6-P en presencia de $MgATP^{-2}$ disminuye el efecto

protector del nucleótido. Esto sugiere que los grupos -SH no se encuentran en el sitio activo de Pfk-2 que el MgATP^{-2} evita la inactivación de la enzima al unirse a un sitio alostérico de la misma. En cambio, MgATP^{-2} no actúa como protector en Pfk-2* y el efecto de fructosa-6-P es similar al obtenido en Pfk-2, sin embargo, al aumentar la concentración de MgATP^{-2} , en presencia de fructosa-6-P, la protección aumenta. Esto sugiere que la acción protectora conjunta del fructosa-6-P y MgATP^{-2} se debe a la unión de éstos al sitio activo (Espinosa, 1987).

Efecto de pH sobre la actividad enzimática

Las velocidades de reacción en los sistemas enzimáticos son muy sensibles a la variación del pH del medio, tanto en su eficiencia catalítica, afinidad por el sustrato y estabilidad. En general, las enzimas exhiben una actividad catalítica máxima a un pH definido y su sitio activo está frecuentemente compuesto por grupos ionizables que pueden estar presente en formas iónicas apropiadas para mantener la conformación del sitio activo, la unión del sustrato o la catálisis de la reacción.

Desde hace mucho tiempo se ha reconocido la importancia de grupos ionizables en la función de las enzimas. Los efectos de los cambios de ionización de estos grupos pueden deberse a numerosas causas relacionadas entre sí. Tanto la enzima libre, el complejo enzima-sustrato o el sustrato pueden sufrir cambios de ionización, ya que las enzimas contienen muchos grupos ionizables, los que pueden

existir en diferentes estados de ionización. La cantidad de una enzima presente en las diferentes formas iónicas es dependiente del pH y de la constante de ionización de los diferentes grupos. Para definir el efecto del pH sobre la actividad enzimática es importante evaluar los parámetros cinéticos, K_m y $V_{m\acute{a}x}$, a diferentes valores de pH. Con estos parámetros es posible determinar los pK_a de grupos ionizables que participan tanto en la unión de la enzima con el sustrato, como en la catálisis enzimática (Solheim y Fromm, 1980).

La fosfofructoquinasa de diversos tejidos animales es conocida por su extrema sensibilidad a pequeños cambios de pH en el intervalo fisiológico (Trivedi y Danforth, 1966), con manifiesta inhibición a valores de pH bajo este intervalo. Bock y Frieden (1976) han demostrado que en la enzima de músculo de conejo, fructosa-6-P se une preferencialmente a la forma no protonada de la enzima, mientras que el ATP se une preferencialmente a la forma protonada (Pettigrew y Frieden, 1979; Wolfman y col., 1979). Además, el grado de inhibición por ATP a pH cercanos a 7,0 es más notorio al disminuir la concentración de fructosa-6-P (Bock y Frieden, 1974).

Otra propiedad dependiente del pH tiene relación con la reacción de polimerización-despolimerización donde la enzima existe como un tetrámero a concentraciones fisiológicas y a valores de pH alrededor de 7,0, sin embargo, a valores de pH más bajos (entre 6,0 y 7,0), la enzima se encuentra en un equilibrio entre dímero y tetrámero (Pavelich y Hammes, 1973).

Pfk-2 de E. coli, al igual que la enzima de levadura, presenta

el fenómeno contrario a las enzimas de mamíferos ya que es más sensible a la inhibición por MgATP^{-2} a valores de pH más alcalinos (Guixé, 1985). Al determinar la actividad de Pfk-2 y Pfk-2* en un intervalo de pH entre 5,5 y 9,0 en función de la concentración de MgATP^{-2} , se observó que la inhibición por MgATP^{-2} fue más pronunciada a pH alcalino y fue parcialmente revertida al disminuir el pH del medio de la reacción. Pfk-2* no presentó inhibición por MgATP^{-2} en el intervalo de pH estudiado (Guixé, 1985). Al estudiar la sedimentación de Pfk-2 a valores de pH entre 5,5 y 9,0, Pfk-2 sedimentó como un dímero, indicando que la concentración de H^+ no tiene efecto en el estado de agregación de Pfk-2 (Guixé, 1985).

Los valores de ΔH° de ionización también aportan información acerca de los grupos participantes en la unión de la enzima con el sustrato y en la catálisis, los cuales son característicos para diferentes residuos aminoacídicos, tales como el grupo imidazolio de histidina, el carboxilo de glutamato o aspartato, el $-\text{SH}$ de cisteína, el grupo OH de tirosina y grupos α -amino de la cadena polipeptídica o ϵ -amino de lisina (Solheim y Fromm, 1980; Cohn y Edsall, 1974).

Al determinar las variaciones de los parámetros cinéticos con respecto al pH en presencia de solventes orgánicos, también es posible obtener información de los grupos aminoacídicos implicados tanto en la catálisis como en la unión de la enzima con el sustrato (Solheim y Fromm, 1980).

El objetivo de este trabajo es realizar estudios del efecto del pH en las actividades de Pfk-2 y Pfk-2* utilizando como variables la

temperatura y la presencia de solvente orgánico, para obtener información comparativa de Pfk-2 y Pfk-2* de E. coli con relación a los grupos responsables de la unión de los sustratos y los que participan en la catálisis.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. EE.UU) se obtuvieron los siguientes productos: ATP, NADH, ditiotreitól, Tris, glicerol, NADPH. Acido maleico, KCl, EDTA, $MgCl_2$, NH_4Cl y dimetilsulfóxido se obtuvieron de MERCK AG (Darmstadt, Alemania Federal). De Boehringer Mannheim GmbH (Alemania Federal) se obtuvieron fructosa-6-P y las enzimas de músculo de conejo, aldolasa, α -glicerofosfato deshidrogenasa y triosa-fosfatoisomerasa.

Preparación de Pfk-2 y Pfk-2*

a) Cepas bacterianas:

Las cepas usadas fueron DF903 (Δ pfkA pfkB1) para Pfk-2 y DF905 (Δ pfkA pfkB1 pfkB10) para Pfk-2*. Las cepas son isogénicas derivadas de la cepa K12 prototrófica Hfr de E. coli llamada también K10. El alelo pfkA está eliminado y por lo tanto estas cepas no poseen fosfofructoquinasa-1. Los alelos para las mutantes pfkB son: pfkB1 (altos niveles de pfk-2) y pfkB1 y pfkB10 (altos niveles de Pfk-2*). El origen y construcción de las cepas usadas está descrita por Daldal y Fraenkel (1981) y por Daldal y col. (1982).

b) Crecimiento de las cepas.

Las células empleadas en la purificación de las enzimas se crecieron aeróbicamente hasta fase estacionaria en un medio salino que contenía 10 g/l de Bactotripton, 4 g/l de extracto de levadura, 4 g/l de glucosa y 50 mg/l de uracilo en medio salino 63. (Babul, 1978).

Purificación de Pfk-2 y Pfk-2*.

El procedimiento usado fué el descrito por Babul (1978) y Daldal y col. (1982), utilizando una etapa de calentamiento a 65° durante 5 minutos en presencia de los sustratos y DTT 2 mM, en reemplazo de la cromatografía en AMP-agarose, seguida de una recromatografía en azul de Cibacron Sepharose (Retamal, 1988). 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 Sepharose se concentraban por ultrafiltración en membranas Amicon PM 10 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*, la solución contenía además etanol al 5%. En estas condiciones Pfk-2 y Pfk-2* mantenían al menos el 90% de su actividad en un período de dos semanas.

La estabilidad de las enzimas se seguía determinando las actividad de ellas a concentraciones saturantes (1 mM) de ambos sustratos, ATP y fructosa-6-P, a través de la formación de fructosa-1,6-P₂ como se describirá continuación.

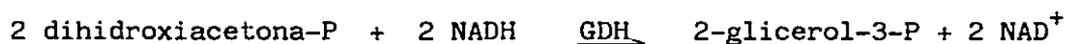
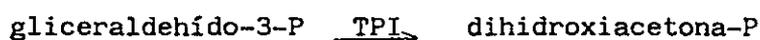
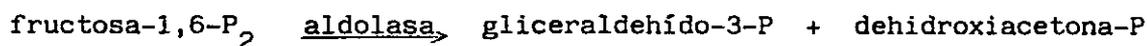
Para medir su actividad, las enzimas se diluían primero en los siguientes amortiguadores. Pfk-2 se diluía en Tris-HCl 20 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM y glicerol 20%, pH 7,6. Pfk-2* se diluía en el mismo amortiguador pero etanol al 5% reemplazaba al glicerol.

Para estudiar el efecto del pH sobre la estabilidad de Pfk-2 y Pfk-2*, ambas enzimas fueron expuestas un breve período (3 minutos), a determinados valores de pH en un intervalo entre pH 5 y pH 10 y luego se determinó su actividad reajustando el pH a un valor de 8,2, correspondiente a las condiciones de medición estándar (Dixon y Webb, 1958; Babul, 1978). Se observó que la actividad de las enzimas no se alteraba al ser preincubadas a diferentes pH en el tiempo descrito (resultados no se muestran).

Determinación de la actividad enzimática

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: amortiguador Tris-maleato 100 mM, MgCl_2 10 mM, NH_4Cl 2 mM, fructosa-6-P 1 mM, ATP 1 mM, NADH 0,2 mM, pH 8,2 y una mezcla de 40 μg de aldolasa, 3 μg de triosafosfato isomerasa y 30 μg de α -glicerofosfato deshidrogenasa (ensayo estándar). La temperatura de los ensayos se variaba entre 21 y 33°C. Cuando se realizaron experimentos para determinar el efecto del pH, temperatura y solvente orgánico, en el intervalo de pH comprendido entre pH 6,0 y pH 8,4, se utilizó el amortiguador Tris-maleato a una concentración de 100 mM cuyo pKa está comprendido entre dichos valores de pH.

En los experimentos descritos más adelante, las concentraciones de fructosa-6-P y ATP se variaron según se indica. La reacción se iniciaba con la adición de enzima, de modo que el cambio de absorbancia por minuto a 340 nm no fuese mayor que 0,45.

Determinación de la concentración de los reactivos.

La concentración de ATP se midió espectrofotométricamente a 30°C siguiendo la reducción del NADP^+ a 340 nm en presencia de glucosa,

hexoquinasa y glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (Racker, 1947). El medio de reacción contenía, en un volumen final de 0,5 ml: Tris-HCl 80 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, NADP⁺ 0,5 mM, glucosa 1 mM, MgCl₂ 12 mM, pH 8,0; 0,2 unidades de glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa y 0,004 unidades de hexoquinasa.

La concentración de ATP también se determinó por el método enzimático para la medición de fructosa-1,6-P₂ ya descrito. Usando el coeficiente de extinción del ATP a 260 nm ($15,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) también se pudo calcular su concentración, la cual era aproximadamente igual que la obtenida por los métodos antes descritos.

Para determinar los valores de los parámetros cinéticos, Km y Vmáx, tanto de Pfk-2 como Pfk-2*, fue necesario calcular, para cada experimento, las concentraciones de MgATP⁻² (sustrato de la enzima), ATP⁻⁴ y Mg⁺² libre por medio de un programa de equilibrios múltiples (Storer y Cornish-Bowden, 1976), ya que debido al equilibrio existente entre ATP⁻⁴ y Mg⁺², los cambios en la concentración de una especie producen cambios en la concentración de los otros.

La concentración de fructosa-6-P, se determinó por el ensayo de medición de fructosa-1,6-P₂ ya descrito.

Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmáx.

El análisis de los resultados cinéticos se realizó empleando las transformaciones de Lineweaver-Burk (1943). Al graficar el recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración de uno y otro sustrato, ATP y fructosa-6-P, manteniéndose uno saturante y fijo

y el otro variable, se obtuvieron los valores de $K_m(ap)$ y $V_{m\acute{a}x}$, tanto para Pfk-2 como Pfk-2*. Las curvas de dichas gráficas se ajustaron a los valores experimentales por medio del método de regresión lineal (Wilkinson, 1961). Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ obtenidos en cada caso son variables debido a que las concentraciones de enzima utilizadas variaban levemente.

Determinación de los valores de pKa y de ΔH° de ionización.

A través de las gráficas de Dixon (Dixon y Webb, 1958; Cleland, 1970) de $\log V_{m\acute{a}x}$ en función del pH y $\log V_{m\acute{a}x}/K_m(ap)$ en función del pH se pueden obtener los valores de pKa para los grupos ionizables involucrados en la catálisis y en la unión del sustrato y efectores. Cuando se obtienen los valores de pKa a diferentes temperaturas, es posible obtener los valores de ΔH° de ionización de dichos grupos utilizando una gráfica de pKa en función de $1/T$, desde cuya pendiente se puede obtener el valor de entalpía estándar de ionización (Segel, 1975). El análisis computacional de las gráficas de Dixon se realizó a través del programa Habel (Cleland, 1979), el que permitió construir las curvas teóricas $\log V_{m\acute{a}x}/K_m(ap)$ en función del pH y $\log V_{m\acute{a}x}$ en función del pH, cuando se supone que es uno el grupo responsable de la disminución de la actividad registrada en cada una de las curvas. La ecuación utilizada en dicho programa es la siguiente:

$$\log y = \log (c/(1+H/K_1))$$

donde y es el valor del parámetro observado como una función del pH, ($K_m(ap)$ y $V_{m\acute{a}x}/K_m(ap)$) y c es el valor independiente de y (pH). K_1

corresponde a la constante de disociación del grupo ionizado.

Los parámetros cinéticos de los experimentos obtenidos a distintos valores de pH, a temperatura constante (30°), en ausencia y presencia de dimetilsulfóxido, fueron graficados de acuerdo al procedimiento de Dixon (1953), lo que permitió obtener valores de pKa en estas condiciones. El solvente orgánico, dimetilsulfóxido, se agregó a la mezcla de reacción enzimática en una concentración final de 25% v/v.

RESULTADOS

Efecto del pH sobre la actividad de Pfk-2 y Pfk-2*

Para obtener las curvas de pH de ambas enzimas se determinó el efecto del pH sobre la actividad de Pfk-2 y Pfk-2*. Se eligió un intervalo de valores de pH comprendido entre pH 5 y pH 10, utilizando para ello dos amortiguadores; tris-maleato y glicina (Figura 1 y 2).

Efecto del pH y la temperatura sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 y Pfk-2*

Para determinar el efecto del pH y la temperatura sobre los parámetros cinéticos, K_m y $V_{m\acute{a}x}$, se midió la actividad enzimática de Pfk-2 y Pfk-2* a diferentes pH en un intervalo comprendido entre pH 6,0 y pH 8,4 a diferentes temperaturas 33°, 30°, 27°, 24° y 21° respectivamente. Mediante las transformaciones de Lineweaver-Burk se obtuvieron los valores de $K_m(ap)$ y $V_{m\acute{a}x}$ para cada enzima (Tablas 2, 3, 4, 5 y 6 para Pfk-2 y Tablas 7, 8, 9, 10 y 11 para Pfk-2*).

Con estos valores se construyeron las gráficas de Dixon ya descritas, las cuales permiten obtener los valores de pKa para cada una de las temperaturas (Figuras 3, 4, 5, 6 y 7 para Pfk-2 y Figuras 8, 9, 10, 11 y 12 para Pfk-2*).

Los valores de pKa obtenidos para ambas enzimas en las condiciones descritas se muestran en las Tablas 12 y 13 para Pfk-2 y 14 y 15 para Pfk-2*.

Determinación del ΔH° de ionización

Las entalpías estándar de ionización de los grupos ionizables involucrados en el sitio activo de Pfk-2 y Pfk-2* se obtienen de la pendiente de las rectas, al graficar los valores de pKa generados a cada una de las temperaturas descritas en función del inverso de la temperatura (Figuras 13 y 14 para Pfk-2 y Figuras 15 y 16 para Pfk-2*).

Los valores de ΔH° de ionización obtenidos para cada enzima se muestran en la Tabla 16 para Pfk-2 y en la Tabla 17 para Pfk-2*.

Efecto del dimetilsulfóxido sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 y Pfk-2*.

Al estudiar el efecto del dimetilsulfóxido sobre los parámetros cinéticos de ambas enzimas se realizó un procedimiento similar a los descritos, sólo que la temperatura era constante (30°).

Se obtuvieron valores de $K_m(ap)$ y $V_{m\acute{a}x}$ para Pfk-2 y Pfk-2* en presencia y ausencia del dimetilsulfóxido (Tablas 18 y 19 para Pfk-2 y Tablas 20 y 21 para Pfk-2*).

A través de los valores de los parámetros cinéticos se construyeron las gráficas de Dixon para obtener valores de pKa en presencia y ausencia del dimetilsulfóxido (Figuras 17 y 18 para Pfk-2 y Figuras 19 y 20 para Pfk-2*). Los valores de pKa obtenidos se muestran en la Tabla 22 para Pfk-2 y Tabla 23 para Pfk-2*.

Tabla 2

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 33°

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	Km(ap)	Vmáx	Km(ap)	Vmáx
6,0	35,0	4,4	57,0	3,6
6,5	37,0	11,0	38,0	5,5
7,0	34,0	17,5	27,5	7,6
7,2	35,0	19,1	26,5	8,0
7,4	37,0	20,0	24,8	7,4
7,6	37,0	20,0	26,5	8,0
8,0	37,0	20,0	21,0	6,6
8,4	37,0	20,0	24,0	7,1

Km(ap), μM Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 3

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 30°

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	Km(ap)	V _{máx}	Km(ap)	V _{máx}
6,0	32,0	3,5	39,0	2,9
6,5	38,0	9,6	35,5	6,4
7,0	30,0	13,5	24,0	7,5
7,2	31,0	15,1	25,0	8,0
7,4	37,0	16,0	23,0	7,6
7,6	35,0	16,0	25,0	8,0
8,0	34,5	15,1	27,0	7,6
8,4	35,0	16,0	26,0	8,3

Km(ap), μM V_{máx}, $\Delta\text{A}/\text{min}/\text{ml}$

Tabla 4

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 27°

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	Km(ap)	Vmáx	Km	Vmáx
6,0	68,0	4,2	40,0	4,5
6,5	35,0	6,8	43,0	7,1
7,0	28,0	12,0	23,0	8,0
7,2	26,0	14,1	21,0	8,7
7,4	26,0	16,2	21,0	8,3
7,6	28,0	17,4	21,0	8,3
8,0	28,0	17,4	20,5	8,0
8,4	28,0	17,4	20,5	8,3

Km(ap), μM Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 5

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 24°

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	Km(ap)	Vmáx	Km	Vmáx
6,0	22,0	2,1	35,0	2,1
6,5	25,0	3,2	50,0	4,2
7,0	24,0	4,0	40,0	5,4
7,2	22,0	4,0	38,0	5,4
7,4	25,0	4,3	37,0	5,2
7,6	24,0	4,0	37,0	5,2
8,0	24,0	4,1	40,0	5,6
8,4	28,0	4,2	40,0	5,6

Km(ap), μM Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 6

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2 a 21°

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	Km(ap)	Vmáx	Km	Vmáx
6,0	40,0	2,8	32,0	3,3
6,5	40,0	4,4	37,0	4,5
7,0	34,0	9,1	37,0	5,8
7,2	38,0	12,0	40,0	6,1
7,4	35,0	13,5	36,0	5,6
7,6	36,0	13,7	35,0	5,8
8,0	30,0	14,2	36,5	5,8
8,4	32,0	13,2	39,0	6,1

Km(ap), μM Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 7

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2* a 33° .

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	Km(ap)	Vmáx	Km	Vmáx
6,0	35,0	2,2	27,0	2,6
6,5	31,0	3,6	27,0	6,0
7,0	44,0	6,5	27,0	6,7
7,2	30,0	4,4	29,0	7,3
7,4	28,0	4,2	25,0	6,5
7,6	25,0	4,4	26,5	6,7
8,0	29,0	4,4	25,0	6,7
8,4	27,0	4,4	28,0	6,5

Km(ap), μM
 Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 8

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2* a 30°

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	Km(ap)	V _{máx}	Km	V _{máx}
6,0	25,0	3,9	33,0	3,2
6,5	26,0	6,6	25,0	4,9
7,0	23,0	7,3	21,0	5,3
7,2	22,0	7,4	23,0	5,6
7,4	27,0	8,0	22,0	5,3 ^{~2}
7,6	23,0	7,6	20,0	5,0
8,0	21,5	7,0	21,0	5,3
8,4	23,0	7,0	23,0	5,4

Km(ap), μM V_{máx}, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 9

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2* a 27°

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	Km(ap)	Vmáx	Km	Vmáx
6,0	43,0	2,4	30,0	2,1
6,5	22,0	5,4	32,0	5,0
7,0	26,0	13,0	32,0	6,0
7,2	26,0	17,5	32,0	6,0
7,4	33,0	22,0	33,0	6,0
7,6	34,0	23,0	32,0	6,0
8,0	33,0	18,5	32,0	6,0
8,4	34,5	19,0	32,0	6,0

Km(ap), μM Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 10

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2* a 24°

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	K _m (ap)	V _{máx}	K _m	V _{máx}
6,0	55,0	4,5	25,0	3,1
6,5	41,0	6,5	23,0	4,1
7,0	24,0	7,3	22,0	5,4
7,2	23,8	7,5	19,0	5,0
7,4	28,0	10,0	22,0	5,4
7,6	23,0	8,0	22,0	5,4
8,0	23,0	8,0	23,0	5,5
8,4	23,0	8,3	21,0	4,9

K_m(ap), μMV_{máx}, ΔA/min ml

Tabla 11

Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Pfk-2* a 21°

pH	ATP variable		fructosa-6-P variable	
	Km(ap)	Vmáx	Km	Vmáx
6,0	53,0	8,1	23,5	2,8
6,5	45,0	10,5	23,5	5,4
7,0	24,0	12,5	21,0	8,0
7,2	23,0	13,0	22,5	8,0
7,4	23,0	13,0	24,5	8,4
7,6	22,0	13,0	21,0	8,0
8,0	21,5	11,7	21,5	8,3
8,4	21,5	11,7	21,5	8,3

Km(ap), μM Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 12

Valores de pKa obtenidos de las gráficas
de Dixon a diferentes temperaturas para Pfk-2

ATP variable			
gráfica		gráfica	
log $V_{m\acute{a}x}/K_m(ap)$ vs pH		log $V_{m\acute{a}x}$ vs pH	
Temperatura	Valores de pKa	Temperatura	Valores de pKa
33°	6,14	33°	6,52
30°	6,18	30°	6,55
27°	6,25	27°	6,58
24°	6,31	24°	6,65
21°	6,35	21°	6,71

Tabla 13

Valores de pKa obtenidos de las gráficas
de Dixon a diferentes temperaturas para Pfk-2

F6P variable			
gráfica		gráfica	
log V _{máx} /K _m (ap) vs pH		log V _{máx} vs pH	
Temperatura	Valores de pKa	Temperatura	Valores de pKa
33°	6,18	33°	5,92
30°	6,23	30°	5,92
27°	6,27	27°	6,02
24°	6,34	24°	6,10
21°	6,40	21°	6,14

Tabla 14

Valores de pKa obtenidos de las gráficas
de Dixon a diferentes temperaturas para Pfk-2*

ATP variable			
gráfica		gráfica	
log V _{máx} /K _m (ap)	vs pH	log V _{máx}	vs pH
Temperatura	Valores de pKa	Temperatura	Valores de pKa
33°	6,01	33°	5,74
30°	6,06	30°	5,80
27°	6,12	27°	5,84
24°	6,14	24°	5,93
21°	6,22	21°	6,30

Tabla 15

Valores de pKa obtenidos de las gráficas
de Dixon a diferentes temperaturas para Pfk-2*

F6P variable			
gráfica		gráfica	
log V _{máx} /K _m (ap) vs pH		log V _{máx} vs pH	
Temperatura	Valores de pKa	Temperatura	Valores de pKa
33°	6,01	33°	5,81
30°	6,06	30°	5,87
27°	6,10	27°	5,95
24°	6,17	24°	5,98
21°	6,24	21°	6,10

Tabla 16

ΔH° de ionización de grupos catalíticamente importantes de Pfk-2

Sustrato variable	pKa obtenido de las gráficas	ΔH_i°
ATP	Vmáx vs pH	6,91
	Vmáx/Km(ap) vs pH	7,59
Fructosa-6-P	Vmáx vs pH	7,23
	Vmáx/Km(ap) vs pH	7,18

ΔH_i° está expresado en Kcal/mol

Tabla 17

ΔH° de ionización de grupos catalíticamente importantes de Pfk-2*

Sustrato variable	pKa obtenido de las gráficas	ΔH_i°
ATP	V _{máx} vs pH	8,28
	V _{máx} /K _m (ap) vs pH	6,08
Fructosa-6-P	V _{máx} vs pH	8,28
	V _{máx} /K _m (ap) vs pH	6,65

ΔH_i° está expresado en Kcal/mol

Tabla 18

Efecto del dimetilsulfóxido (Me_2SO) sobre los
parámetros cinéticos de Pfk-2

pH	ATP variable			
	(-) Me_2SO		(+) Me_2SO	
	Km(ap)	Vmáx	Km	Vmáx
6,0	39,0	4,0	95,0	4,0
6,5	28,0	4,8	55,0	6,6
7,0	23,5	5,5	45,0	7,5
7,2	26,0	5,7	45,0	8,0
7,4	24,0	5,8	56,0	8,7
7,6	26,0	5,8	46,0	7,9
8,0	32,0	6,8	44,0	8,0
8,4	28,0	5,9	46,0	8,0

Km(ap), μM
Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 19

Efecto del dimetilsulfóxido (Me_2SO) sobre los
parámetros cinéticos de Pfk-2

pH	F6P variable			
	(-) Me_2SO		(+) Me_2SO	
	Km(ap)	Vmáx	Km	Vmáx
6,0	27,0	2,8	67,0	2,8
6,5	22,5	4,0	40,0	5,0
7,0	16,0	3,8	22,0	5,0
7,2	17,0	4,6	27,0	5,7
7,4	19,0	5,0	29,0	6,6
7,6	15,0	4,2	29,0	6,3
8,0	18,0	4,8	31,5	6,5
8,4	18,0	4,8	30,0	6,5

Km(ap), μM

Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 20

Efecto del dimetilsulfóxido (Me_2SO) sobre los
parámetros cinéticos de Pfk-2*

pH	ATP variable			
	(-) Me_2SO		(+) Me_2SO	
	Km(ap)	Vmáx	Km	Vmáx
6,0	40,0	3,1	37,0	2,6
6,5	35,0	4,5	37,0	4,1
7,0	30,0	5,0	33,0	4,6
7,2	28,0	5,0	33,0	4,6
7,4	31,5	5,0	33,0	4,6
7,6	31,0	5,1	33,0	4,6
8,0	30,0	5,0	33,0	4,6
8,4	33,0	5,5	33,0	4,6

Km(ap), μM

Vmáx, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 21

Efecto del dimetilsulfóxido (Me_2SO) sobre los
parámetros cinéticos de Pfk-2*

pH	F6P variable			
	(-) Me_2SO		(+) Me_2SO	
	$K_m(\text{ap})$	$V_{\text{máx}}$	K_m	$V_{\text{máx}}$
6,0	65,0	2,6	42,0	2,8
6,5	45,0	3,6	31,0	3,8
7,0	24,0	3,5	23,0	4,0
7,2	25,0	4,0	25,0	4,2
7,4	25,0	4,0	21,0	3,9
7,6	22,0	3,7	22,0	3,9
8,0	25,0	4,0	22,0	3,9
8,4	28,0	4,2	24,0	4,0

$K_m(\text{ap})$, μM

$V_{\text{máx}}$, $\Delta\text{A}/\text{min ml}$

Tabla 22

Efecto del Me_2SO sobre los valores de pKa obtenidos de las gráficas de Dixon para Pfk-2

Sustrato variable	Gráficas de Dixon	pKa en ausencia del Me_2SO	pKa en presencia del Me_2SO
ATP	V _{máx} vs pH	6,49	6,57
	V _{máx} /K _m (ap) vs pH	6,00	6,10
Fructosa-6-P	V _{máx} vs pH	5,95	6,01
	V _{máx} /K _m (ap) vs pH	6,20	6,15

Tabla 23

Efecto del Me_2SO sobre los valores de pKa obtenidos de las gráficas de Dixon para Pfk-2*

Sustrato variable	Gráficas de Dixon	pKa en ausencia del Me_2SO	pKa en presencia del Me_2SO
ATP	V _{máx} vs pH	5,82	5,88
	V _{máx} /K _m (ap) vs pH	6,00	6,00
Fructosa-6-P	V _{máx} vs pH	5,81	5,87
	V _{máx} /K _m (ap) vs pH	6,10	6,15

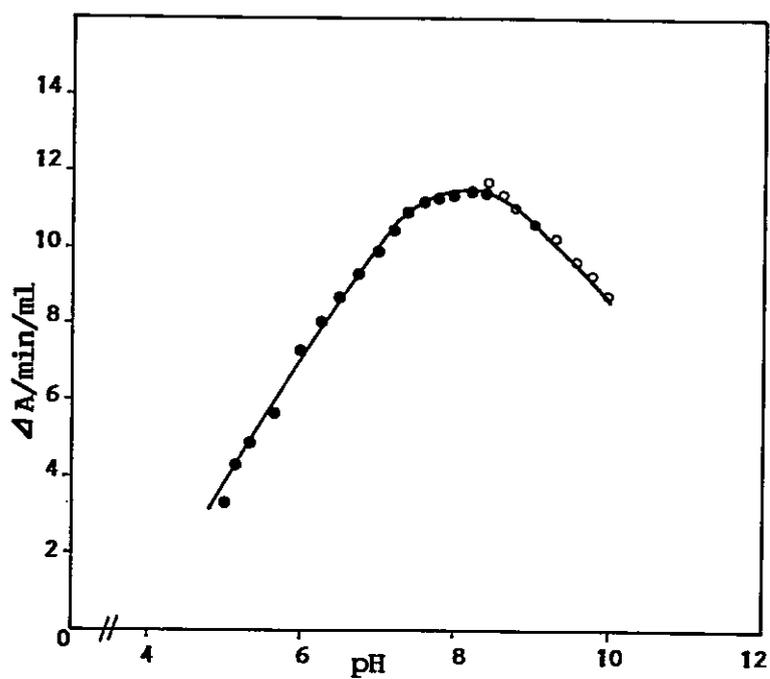


Figura 1. Efecto del pH en la actividad de Pfk-2. La actividad se determinó como se describe en Materiales y Métodos utilizando ATP y fructosa-6-P 1 mM y se expresa como cambio de absorbancia a 340 nm/min ml. Para obtener los valores de pH indicados se utilizó amortiguador Tris/maleato (●) y glicina (○) 0,1 M.

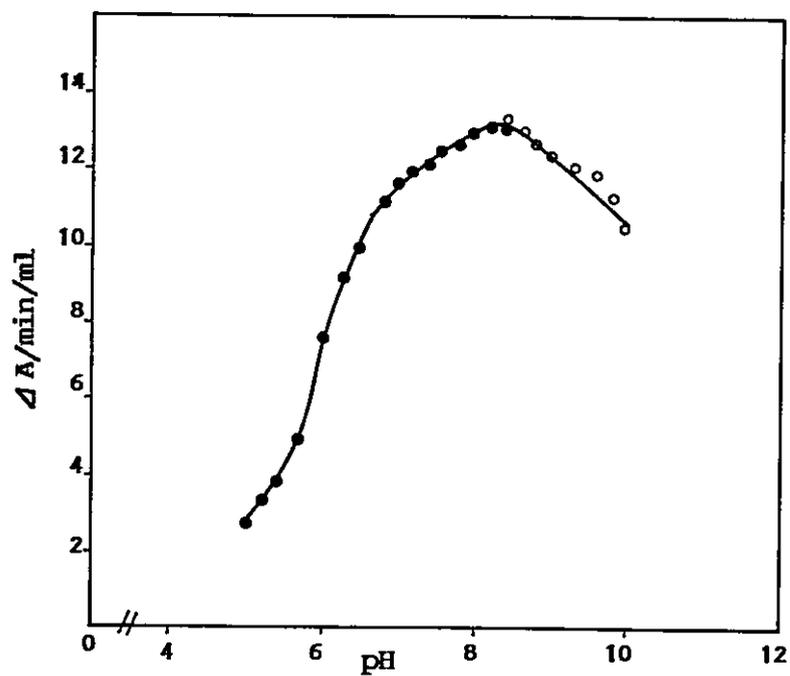


Figura 2. Efecto del pH en la actividad de Pfk-2*. Los detalles experimentales son los que aparecen en la leyenda de la Figura 1.

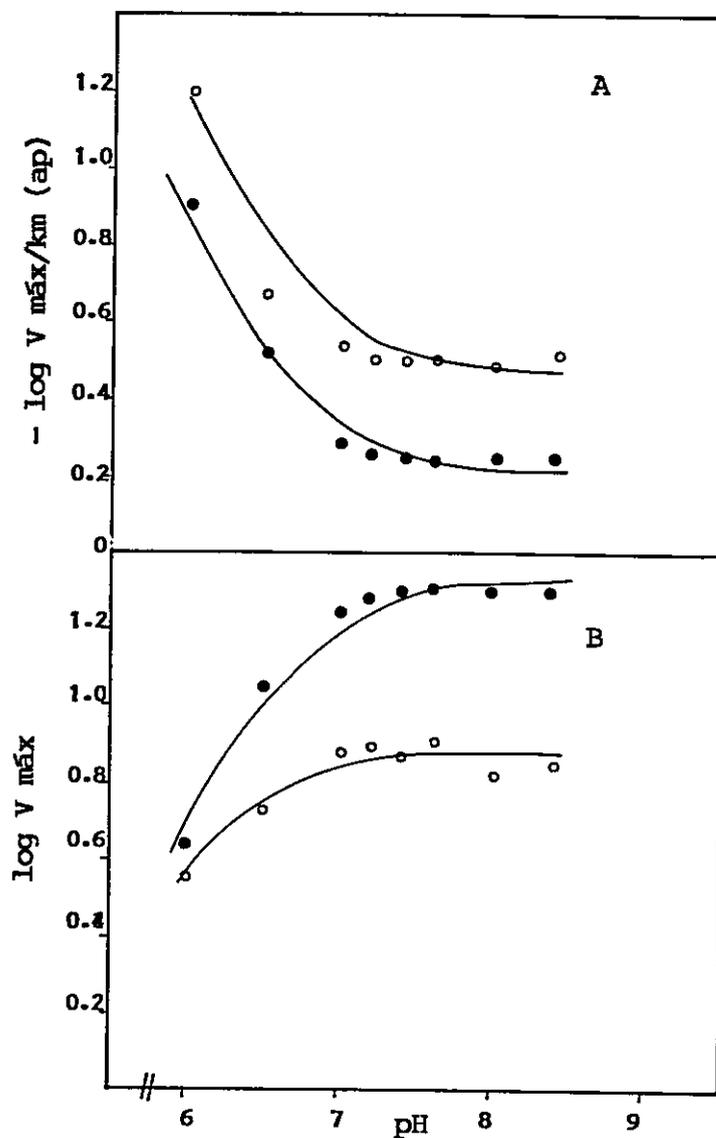


Figura 3. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 33°. A. $\log V_{\text{máx}}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\text{máx}}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

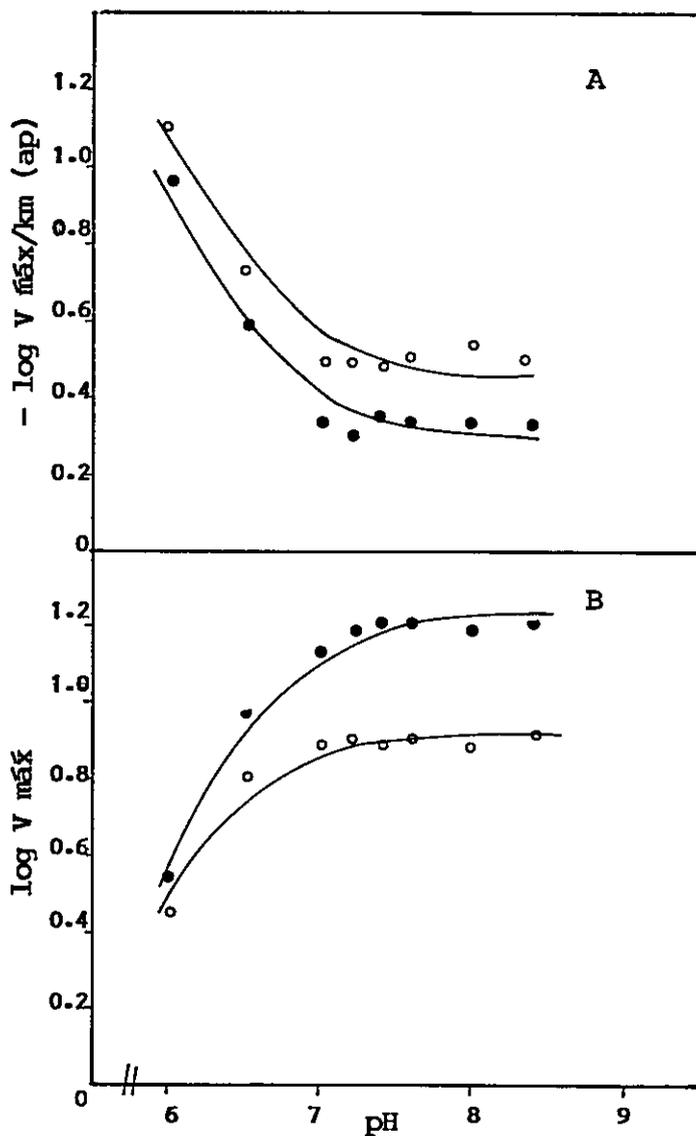


Figura 4. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 30°. A. $\log V_{\max}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\max}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

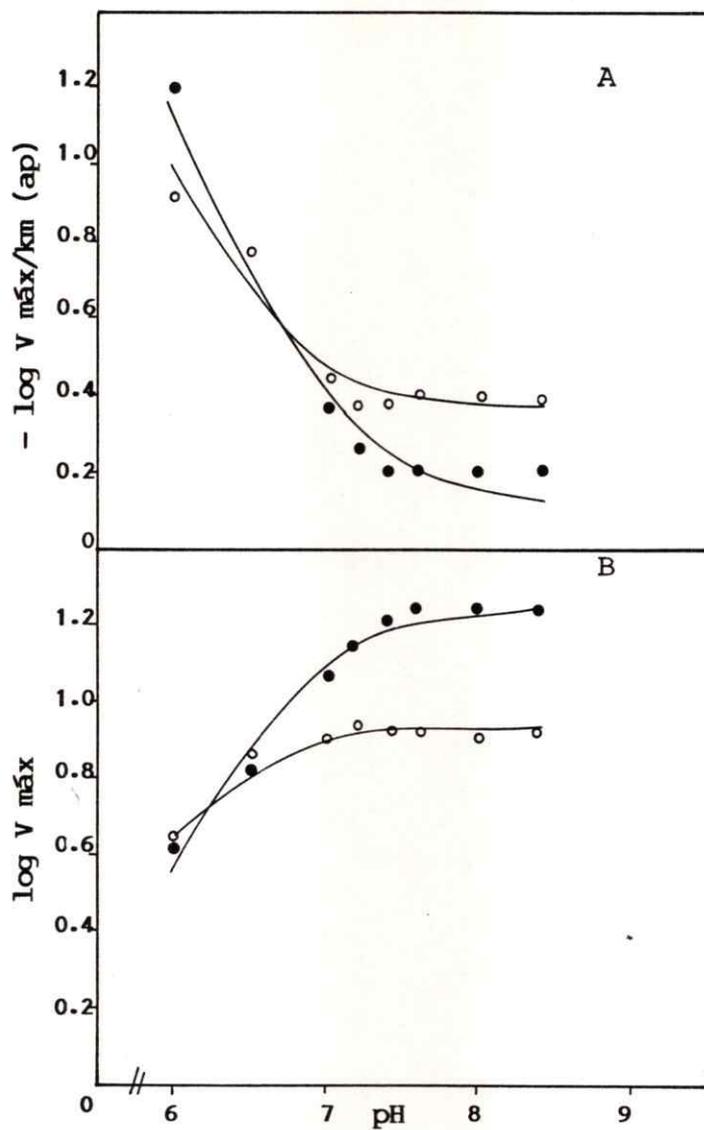


Figura 5. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 27°. A. $\log V_{\max}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\max}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

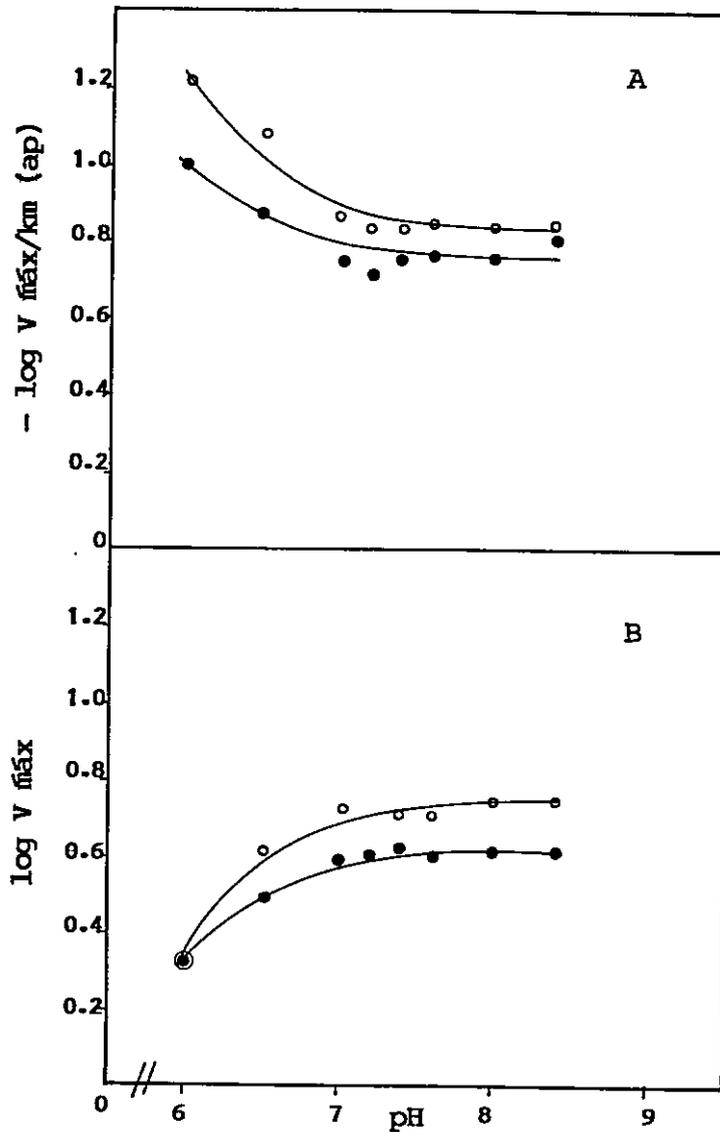


Figura 6. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 24°. A. $\log V_{\text{máx}}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\text{máx}}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

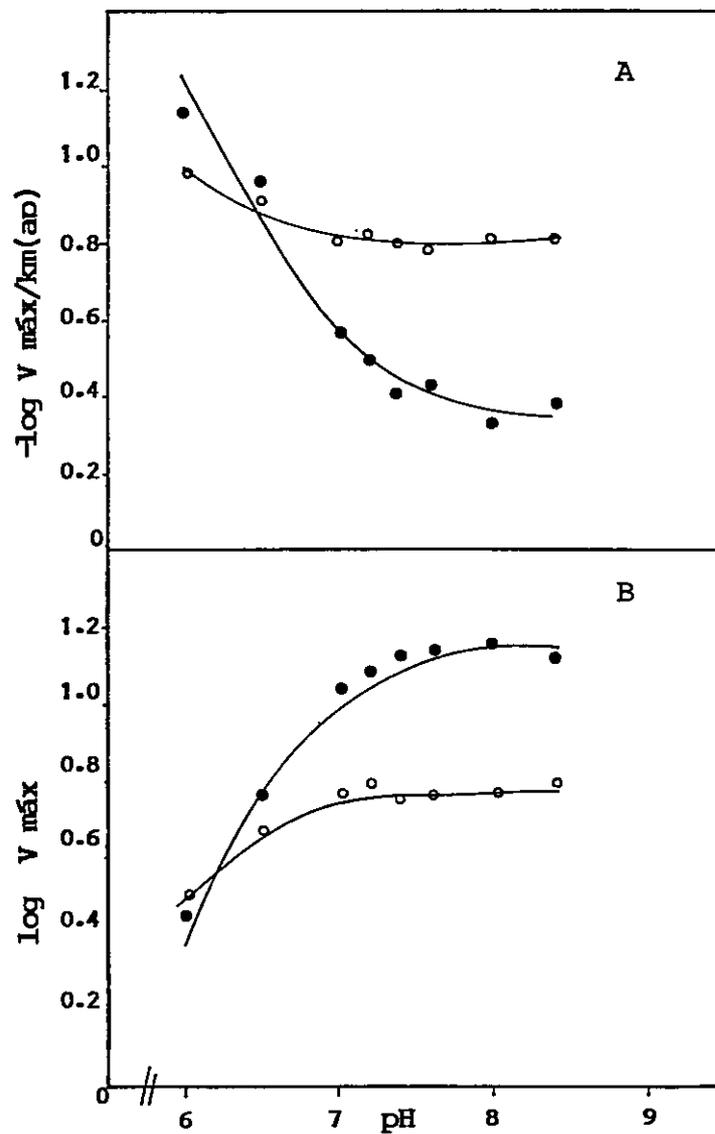


Figura 7. Gráficas de Dixon para Pfk-2 a 21°. A. $\log V_{\max}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\max}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

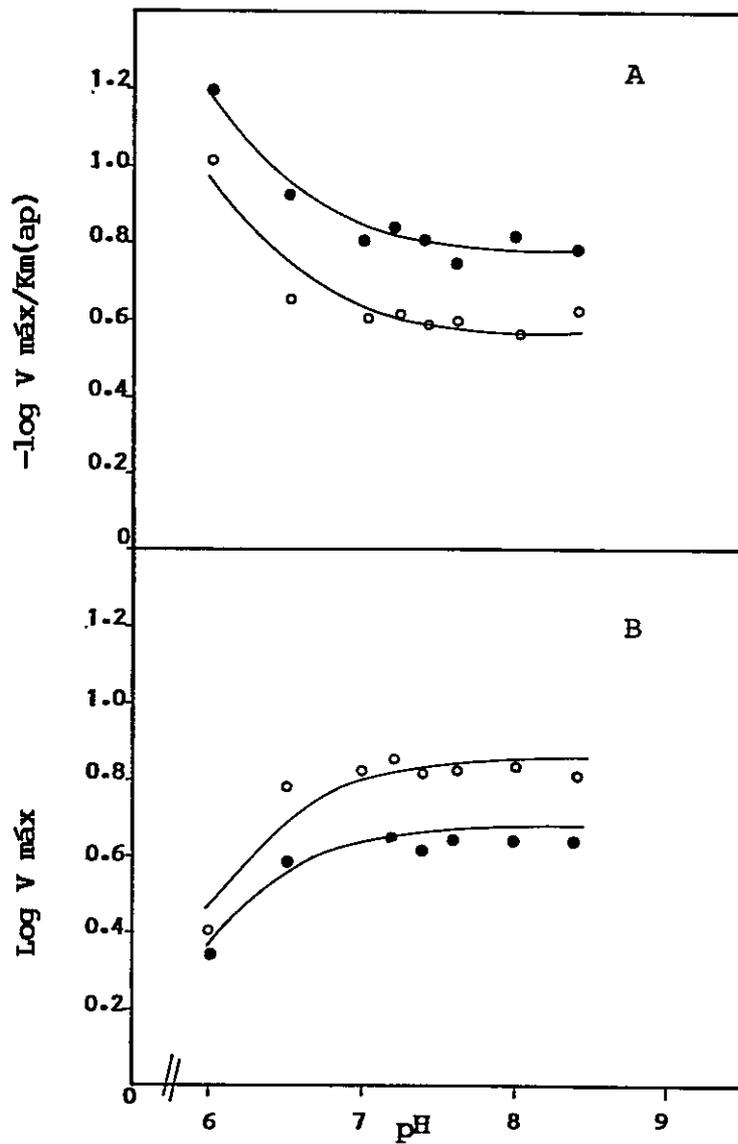


Figura 8. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 33°. A. $\log V_{\max}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\max}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

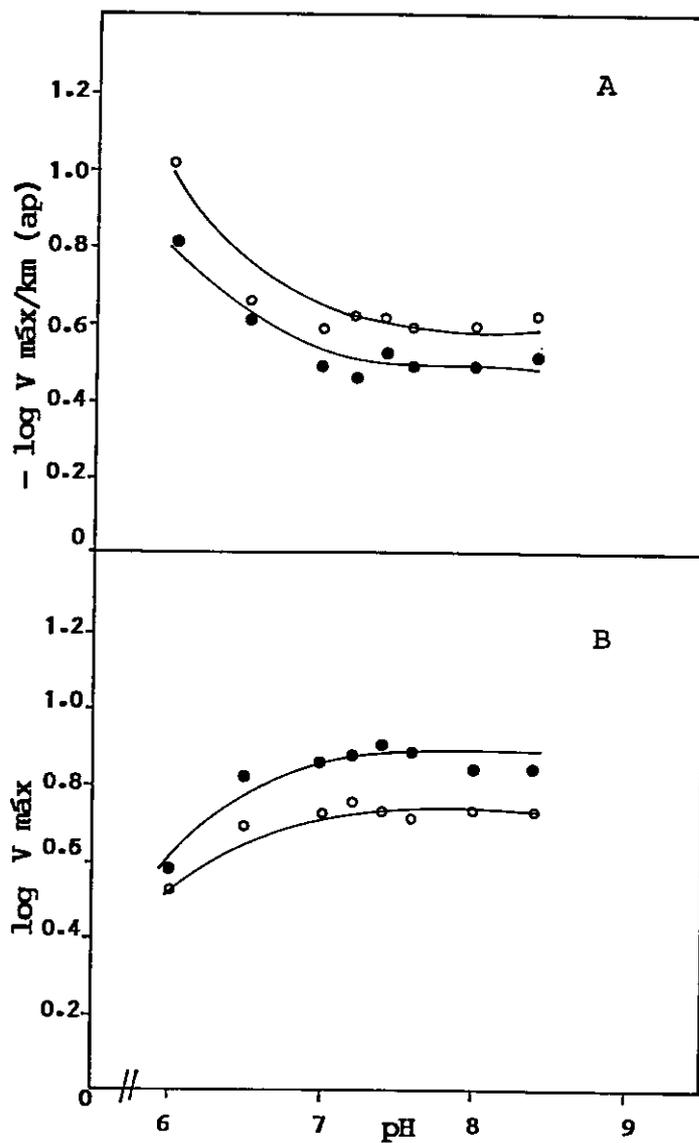


Figura 9. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 30°. A. $\log V_{\max}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\max}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

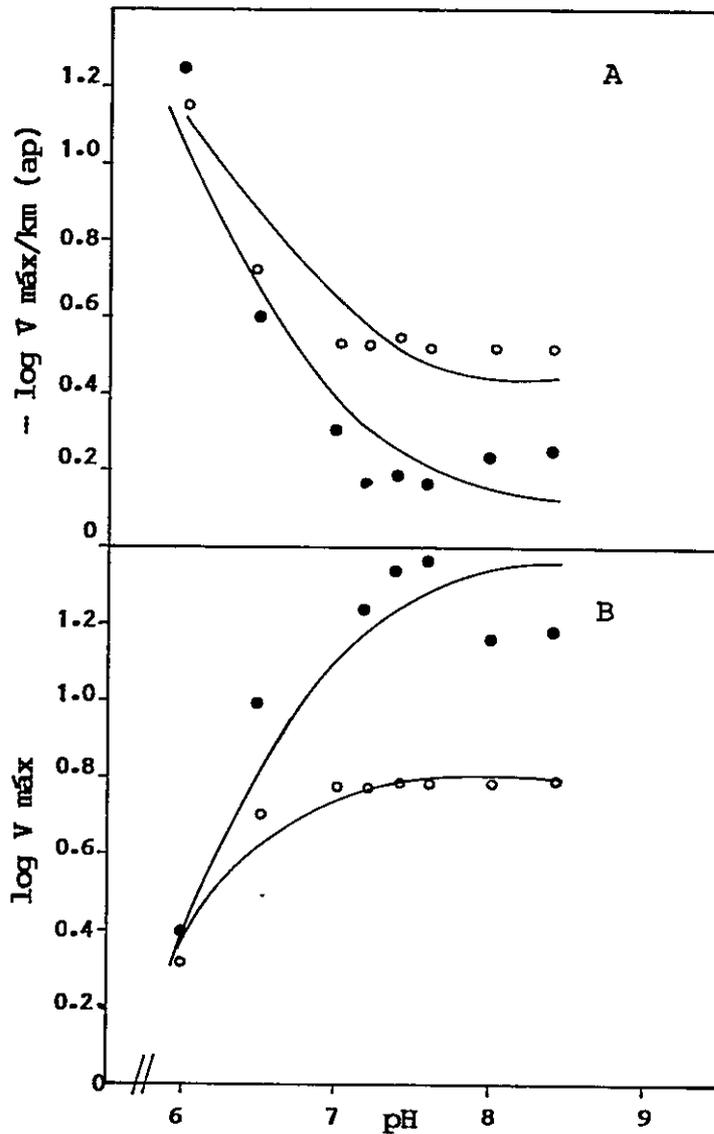


Figura 10. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 27°. A. $\log V_{\max}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\max}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

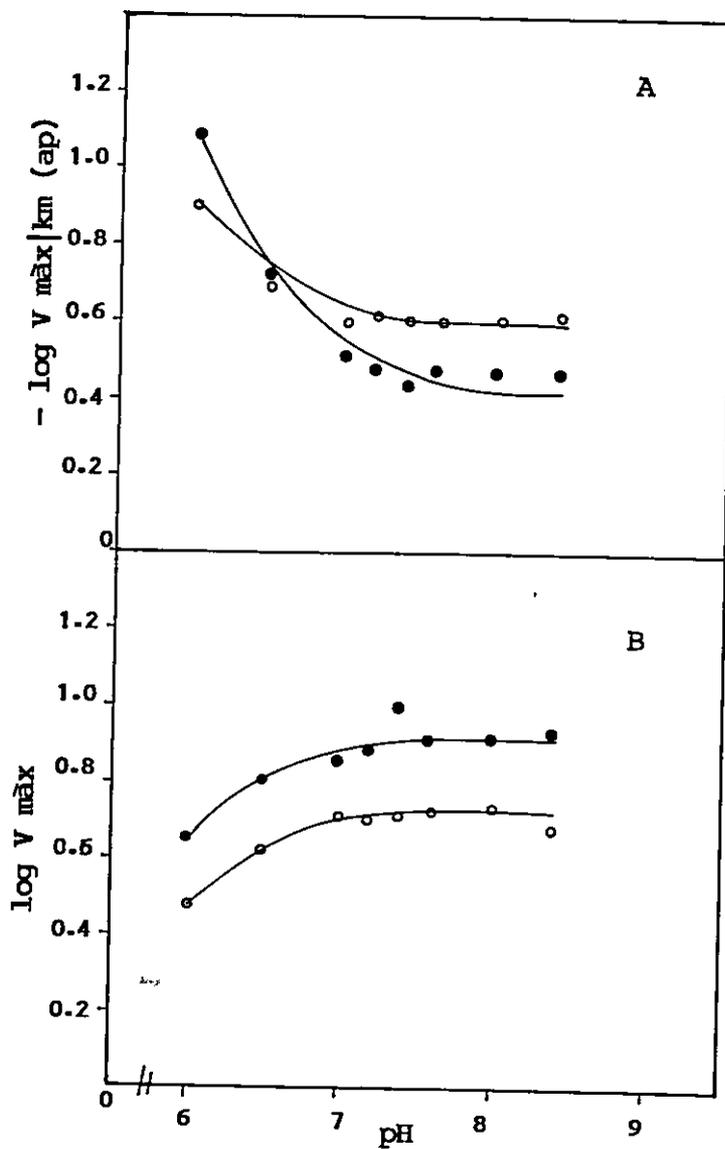


Figura 11. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 24°. A. $\log V_{\max}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\max}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

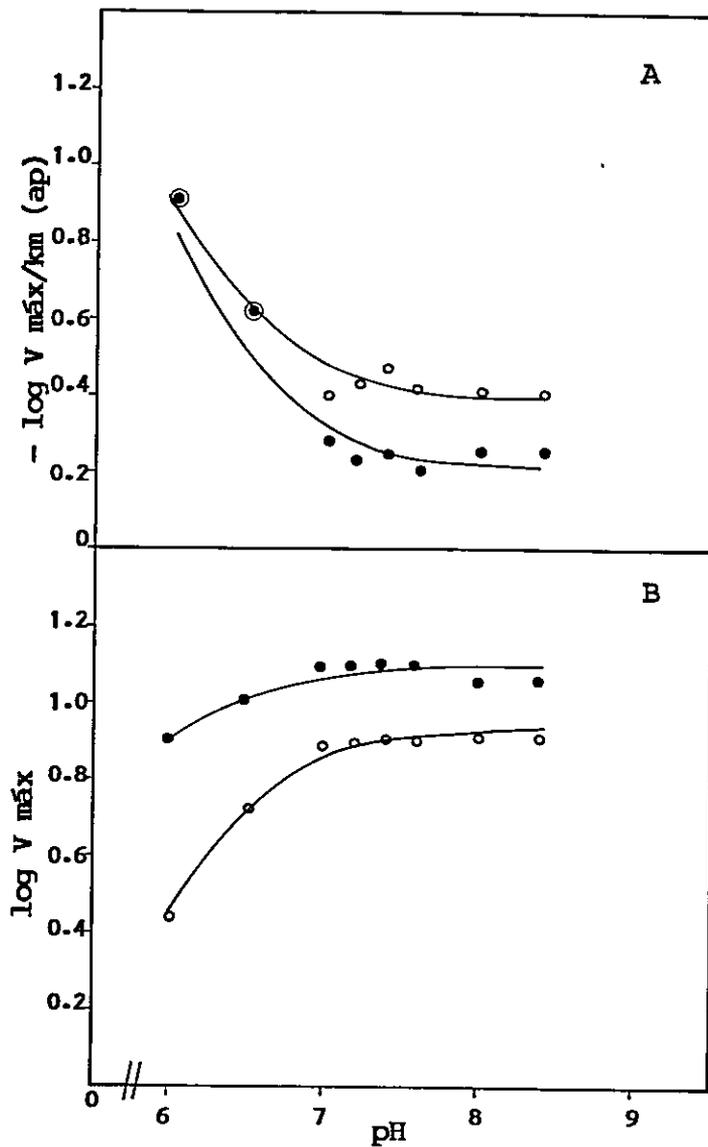


Figura 12. Gráficas de Dixon para Pfk-2* a 21°. A. $\log V_{\text{máx}}/K_m(\text{ap})$ en función del pH. B. $\log V_{\text{máx}}$ en función del pH. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

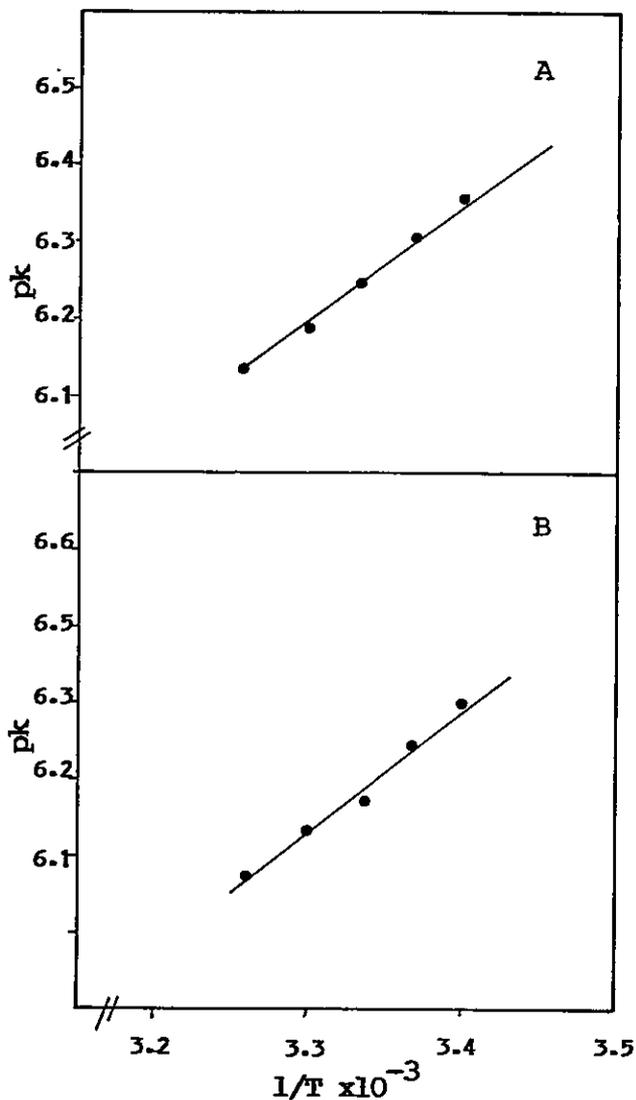


Figura 13. Gráficas de Arrhenius para Pfk-2. A. Los valores de pKa se determinaron de las gráficas de Dixon $\log V_{\text{máx}}/K_m(\text{ap})$ en función del pH a distintas temperaturas; concentración de ATP fue variable y la de fructosa-6-P 1 mM. B. Los valores de pKa se obtuvieron igual que en A pero la concentración de fructosa-6-P fue variable y la de ATP 1 mM.

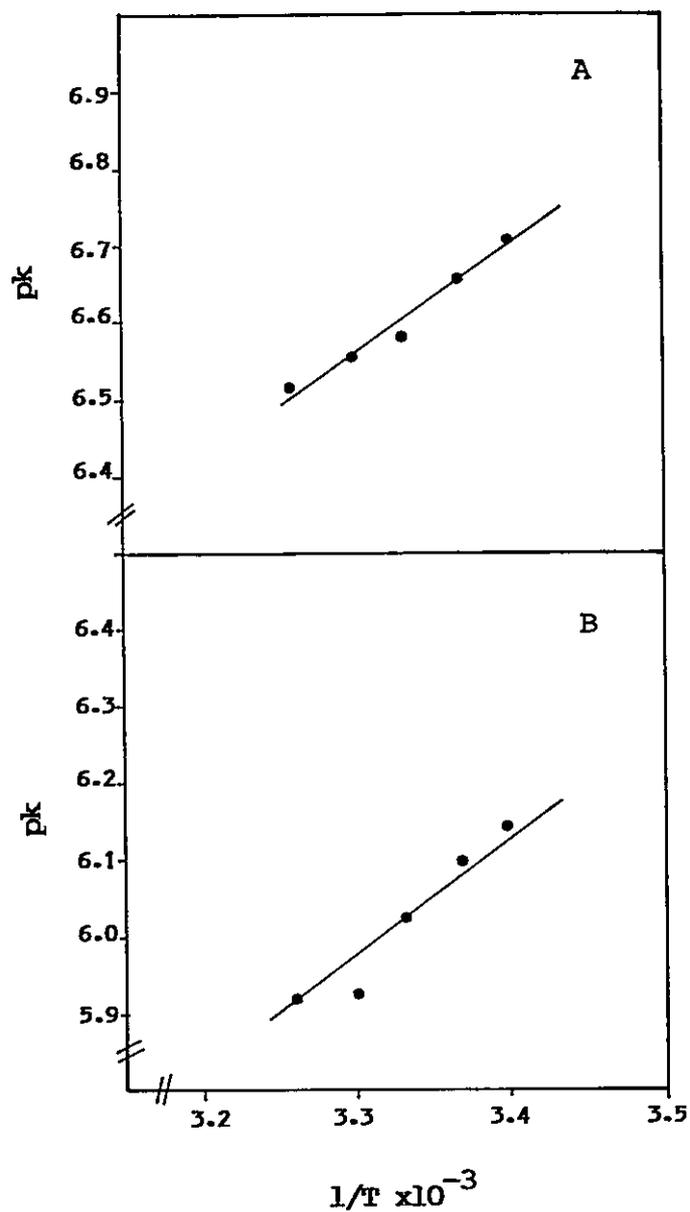


Figura 14. Gráficas de Arrhenius para Pfk-2. A. Los valores de pKa se determinaron de las gráficas de Dixon $\log V_{\text{máx}}$ en función del pH a distintas temperaturas; concentración de ATP fue variable y la de fructosa-6-P 1 mM. B. Los valores de pKa se obtuvieron igual que en A pero la concentración de fructosa-6-P fue variable y la de ATP 1 mM.

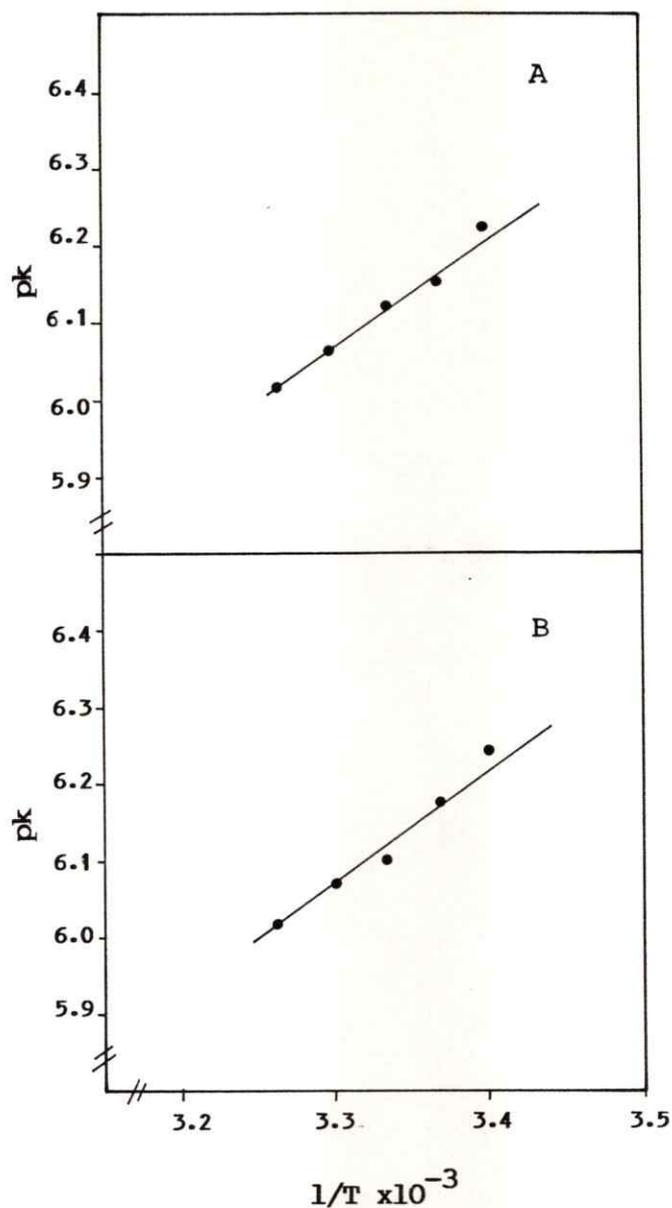


Figura 15. Gráficas de Arrhenius para Pfk-2*. A. Los valores de pKa se determinaron de las gráficas de Dixon $\log V_{\text{máx}}/K_m(\text{ap})$ en función del pH a distintas temperaturas; concentración de ATP fue variable y la de fructosa-6-P 1 mM. B. Los valores de pKa se obtuvieron igual que en A pero la concentración de fructosa-6-P fue variable y la de ATP 1 mM.

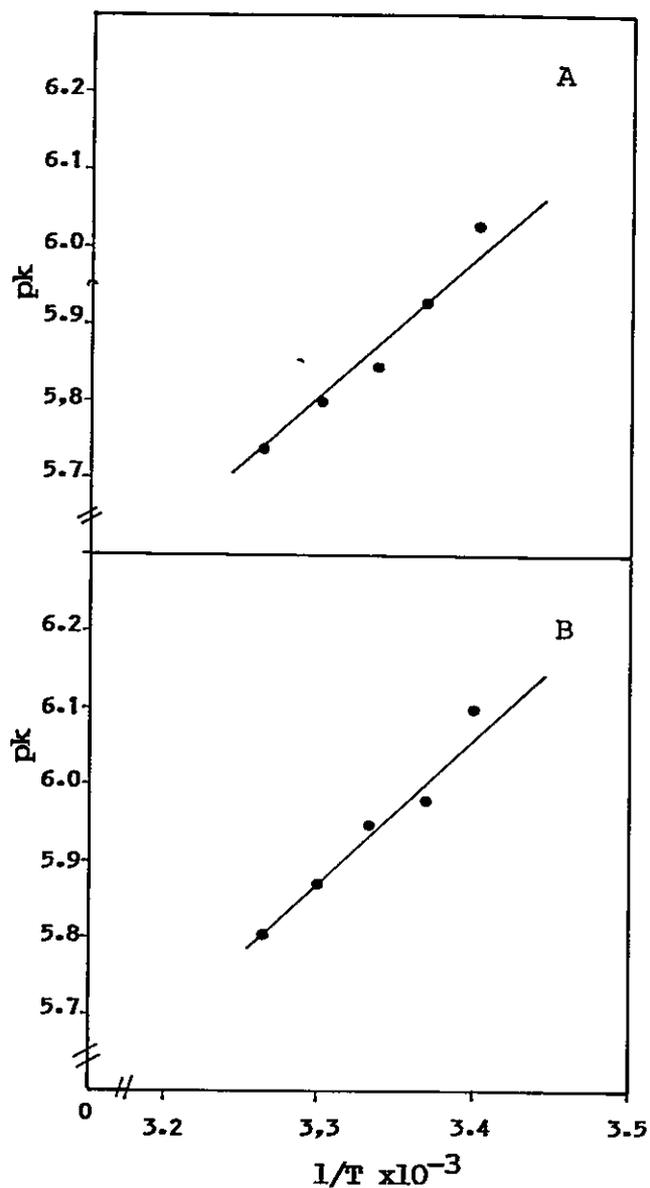


Figura 16. Gráficas de Arrhenius para Pfk-2*. A. Los valores de pKa se determinaron de las gráficas de Dixon log V_{máx} en función del pH a distintas temperaturas; concentración de ATP fue variable y la de fructosa-6-P 1 mM. B. Los valores de pKa se obtuvieron igual que en A pero la concentración de fructosa-6-P fue variable y la de ATP 1 mM.

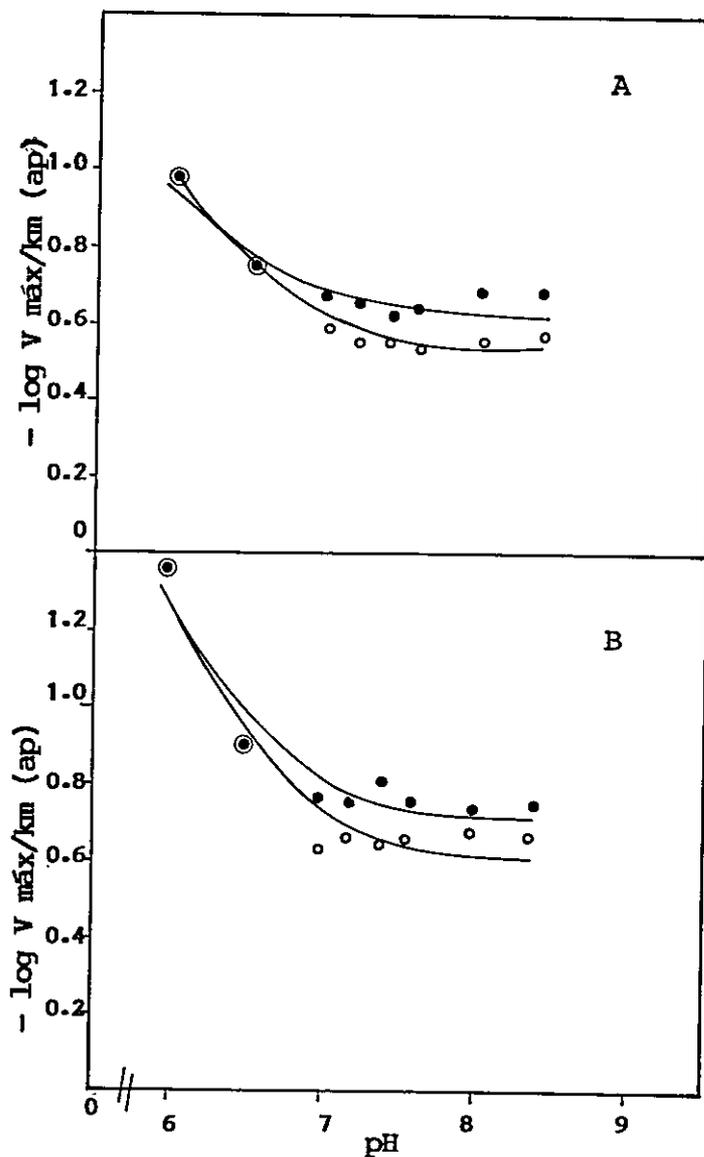


Figura 17. Gráficas de Dixon $\log V_{\text{máx}}/K_m(\text{ap})$ en función del pH para Pfk-2 a 30° en presencia y ausencia de dimetilsulfóxido. A. En ausencia de dimetilsulfóxido. B. En presencia de dimetilsulfóxido. (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

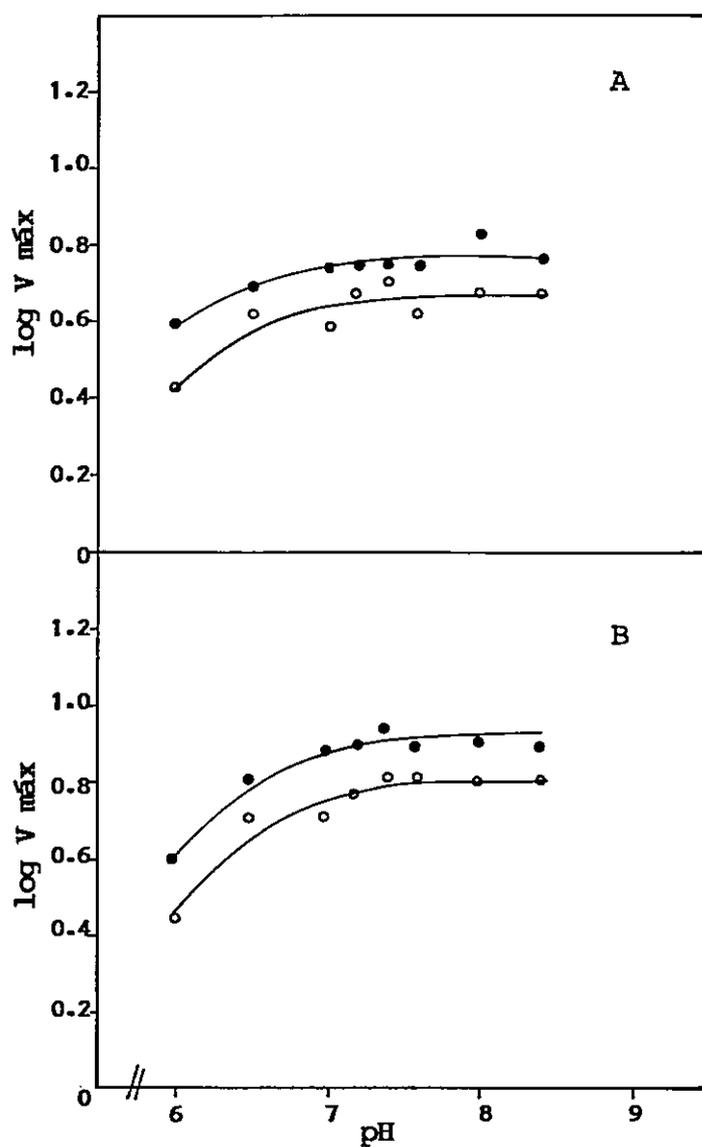


Figura 18. Gráficas de Dixon $\log V_{\text{máx}}$ en función del pH para Pfk-2 a 30° en presencia y ausencia de dimetilsulfóxido. A. En ausencia de dimetilsulfóxido. B. En presencia de dimetilsulfóxido (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

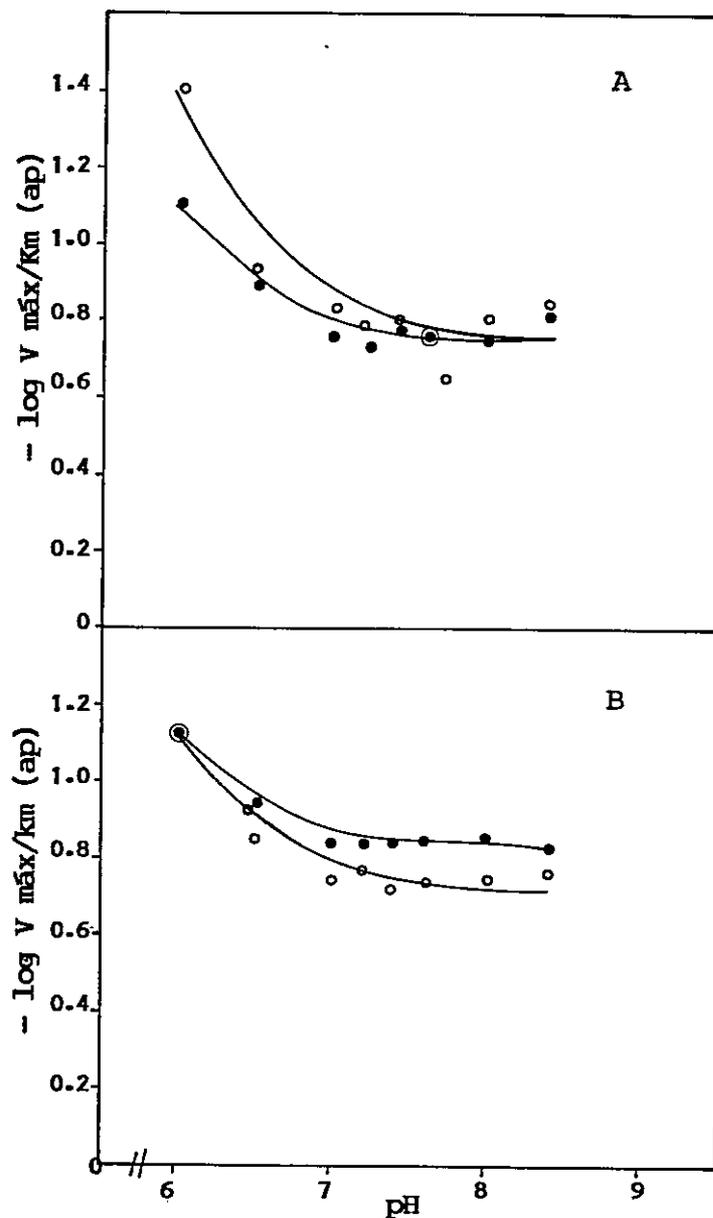


Figura 19. Gráficas de Dixon $\log V_{\text{m\acute{a}x}}/K_m(\text{ap})$ en función del pH para Pfk-2* a 30° en presencia y ausencia de dimetilsulfóxido. A. En ausencia de dimetilsulfóxido. B. En presencia de dimetilsulfóxido (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

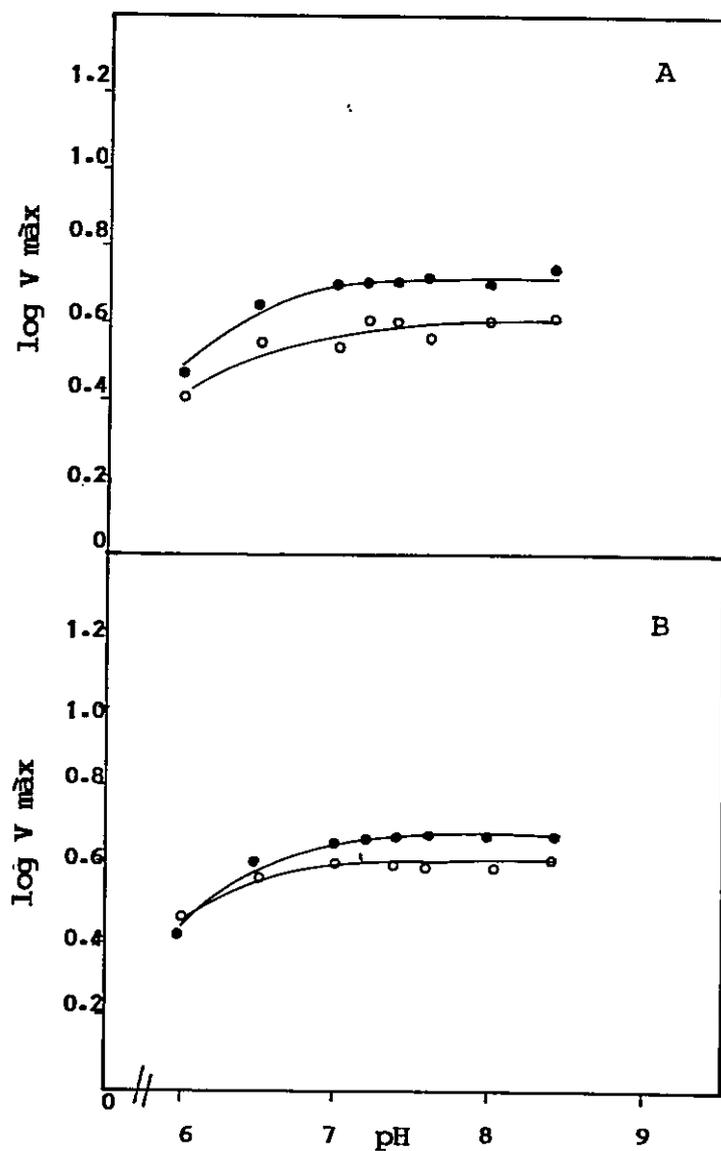


Figura 20. Gráficas de Dixon $\log V_{\max}$ en función del pH para Pfk-2* a 30° en presencia y ausencia de dimetilsulfóxido. A. En ausencia de dimetilsulfóxido. B. En presencia de dimetilsulfóxido (●) concentración de ATP variable y fructosa-6-P 1 mM; (○) concentración de fructosa-6-P variable y ATP 1 mM.

DISCUSION

Ambas fosfofructoquinasas, Pfk-2 y Pfk-2*, se han estudiado desde un punto de vista cinético y estructural. Estas enzimas presentan varias diferencias, entre las que se destacan, el tipo de inhibición por fructosa-1,6-P₂ (Daldal y col., 1982), el mecanismo cinético (Campos y col., 1984), la susceptibilidad a la inhibición por MgATP (Guixé y Babul, 1985a), la acción de ligandos sobre el estado de agregación en ausencia y presencia de los sustratos (Guixé, 1985; Guixé y Babul, 1988; Retamal, 1988) y el efecto protector de los sustratos en la inactivación por la modificación química de grupos-SH (Espinosa y col., 1985; Espinosa y Babul, 1986; Espinosa, 1987).

En esta tesis se han realizado estudios del efecto del pH en las actividades de Pfk-2 y Pfk-2* con el fin de obtener información comparativa de los residuos de aminoácidos responsables de la unión de los sustratos y de la catálisis de ambas enzimas.

Para distinguir si la variación de la actividad de Pfk-2 y Pfk-2* al variar el pH se debía más bien a un efecto sobre el estado de ionización de residuos de aminoácidos de las enzimas que a variaciones en el estado de ionización de los sustratos, se calcularon las concentraciones de las especies iónicas para ATP y fructosa-6-P en función del pH y el porcentaje de la V_{máx} que se obtendría en estas condiciones, con el fin de compararlos con los valores de V_{máx} experimentales. Si uno supone que las variaciones en V_{máx} se deben únicamente a cambios en el estado de ionización de los sustratos, los

valores de porcentaje de $V_{\text{máx}}$ que se obtienen son superiores a 94% para fructosa-6-P y al 89% para ATP a pH 6, el pH más bajo utilizado. Sin embargo, los valores experimentales de $V_{\text{máx}}$ para fructosa-6-P a pH 6 son aproximadamente el 25% de los obtenidos a pH 7,2, donde se obtiene la máxima actividad; en el caso del ATP este valor es aproximadamente un 50%. Estos datos indican que las variaciones de la actividad en el pH se deben principalmente a la ionización de grupos presentes en la enzima. En el caso del ATP, se sabe que el sustrato verdadero de Pfk-2 y Pfk-2* es MgATP^{-2} .

Para averiguar la identidad de los grupos ionizables involucrados en los procesos enzimáticos, fue necesario obtener los valores de los parámetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ y $K_{\text{m(ap)}}$ a diferentes valores de pH y temperatura, y a diferentes pH en presencia y en ausencia de dimetil-sulfóxido a 30°. Los valores de $V_{\text{máx}}$ y $K_{\text{m(ap)}}$ obtenidos, permitieron construir las gráficas de Dixon, las que presentan curvas simples con pendientes negativas cuando se graficaba $-\log V_{\text{máx}}/K_{\text{m(ap)}}$ en función del pH y pendiente positiva cuando se graficaba $\log V_{\text{máx}}$ en función del pH, a cada una de las temperaturas utilizadas. Las dos pendientes descritas están situadas en el lado ácido de la escala de pH y no se observaron variaciones de los parámetros cinéticos en la región básica. El análisis computacional de los datos obtenidos permitió construir las curvas teóricas para cada caso, suponiendo que la pérdida de la actividad se debe a la ionización de sólo un grupo.

Los valores de pKa obtenidos de las gráficas $\log V_{\text{máx}}$ en función del pH y $-\log V_{\text{máx}}/K_{\text{m(ap)}}$ a distintas temperaturas, se resumen en las

Tablas 12-13 para Pfk-2 y 14-15 para Pfk-2*. A la temperatura de 30°C los valores de pKa obtenidos, al variar tanto fructosa-6-P como ATP, fluctúan entre 5,9 y 6,5 para Pfk-2 y entre 5,8 y 6,0 para Pfk-2*, lo que sugiere que para ambas enzimas los grupos responsables de la formación del complejo ternario E-F6P-ATP como de la unión de los sustratos son del mismo tipo, posiblemente cadenas laterales de histidina.

Las variaciones en los valores de pKa obtenidos de las gráficas de Dixon al variar uno u otro sustrato podrían ser causadas por cambios conformacionales que ocurren en las enzimas después de la unión de un sustrato. McDonald y col. (1979) y Pickover y col. (1979) demostraron esto en el caso de la hexoquinasa y fosfoglicerato quinasa y especularon que puede ser un fenómeno general de las quinastas.

Los valores de ΔH° de ionización se resumen en la Tabla 16 para Pfk-2 y 17 para Pfk-2*. En el caso de Pfk-2 los valores de ΔH° de ionización obtenidos de las gráficas de Arrhenius para el complejo E-F6P-ATP son aproximadamente 7,0 Kcal/mol para Pfk-2 y 8,3 Kcal/mol para Pfk-2*. Los ΔH° obtenidos para la unión de ATP y fructosa-6-P son aproximadamente 7,4 Kcal/mol para Pfk-2 y entre 6,1 y 6,7 Kcal/mol para Pfk-2*.

La comparación de los valores de ΔH° obtenidos en los casos de Pfk-2 y Pfk-2* con los datos de la Tabla 24 apoyan la sugerencia derivada del análisis de los valores de pKa, esto es, que son grupos histidina los que participan en la catálisis y en la unión de los

sustratos. La observación que el dimetilsulfóxido no produce un aumento significativo de los valores de pKa apoyan la sugerencia de la participación de los grupos histidina en esos procesos.

El hecho que no se hayan observado diferencias apreciables tanto en los valores de pKa como en los valores de ΔH° de ionización de los grupos de importancia catalítica entre Pfk-2 y Pfk-2*, sugiere que la mutación estructural no afecta grandemente el microambiente de estos grupos. Por otra parte se ha observado (Campos y col., 1984) que ambas enzimas poseen valores de Km similares, lo que está de acuerdo con la observación anterior.

Experimentos realizados por Fevzi Daldal (comunicación personal a Jorge Babul) de secuenciación parcial del gen estructural de Pfk-2*, indican al menos dos cambios de aminoácidos con respecto a Pfk-2. En la posición 23 de la cadena polipeptídica de Pfk-2 existe una Tyr mientras que en Pfk-2* esta es reemplazada por Asp; en la posición 45 este cambio es de Arg en Pfk-2 a Pro en Pfk-2*. Resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de trabajo (Juan C. Torres, experimentos no publicados) al secuenciar parcialmente los genes estructurales de ambas enzimas, confirman el cambio en la posición 23 pero no indican que existe el cambio en la posición 45.

En este laboratorio se realizaron estudios de modificación química de Pfk-2 y Pfk-2* para averiguar la importancia de los grupos-SH en la actividad de las enzimas (Espinosa y col., 1985; Espinosa y Babul, 1986; Espinosa, 1987). Ambas enzimas fueron inactivadas al reaccionar con el ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB), sin embargo,

sólo en el caso de Pfk-2* la inactivación fue total. Por otra parte al usar los sustratos como protectores frente a la inactivación de las enzimas por DTNB, se encontró que MgATP y no MgATP más fructosa-6-P, protegía a Pfk-2 frente a la inactivación por DTNB, posiblemente por unión del nucleótido al sitio regulatorio para el mismo y por lo tanto los grupos-SH no estarían ubicados en el sitio activo de Pfk-2. En el caso de Pfk-2* no se observó protección por MgATP pero el efecto protector aumentó notablemente en presencia de ambos sustratos, por lo que los autores sugieren que este efecto se debe a la unión de fructosa-6-P y MgATP 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 sulfhidrilo importantes para la actividad ubicados en un sitio distinto del activo. Si los grupos-SH estuvieran ubicados en el sitio activo de Pfk-2* los resultados de la presente tesis estarían de acuerdo con esta conclusión siempre cuando el microambiente de estos grupos fuera tal que disminuyera su pK en al menos una unidad con respecto a los valores que aparecen en la Tabla 24.

No se han realizado estudios del efecto del pH sobre los parámetros cinéticos en fosfofructoquinasas de E. coli, sin embargo, existen estudios de modificación química de ciertos residuos aminoácidos, en fosfofructoquinasas de diversas fuentes.

Estos estudios están dirigidos principalmente a grupos tales como sulfhidrilo, histidina, lisina, arginina y tirosina. Younathan y col. (1968) y Froede y col. (1968) han demostrado que las fosfofructo-

Tabla 24

Valores de pKa y ΔH° de ionización de grupos
presentes en proteínas

Grupo	pKa	ΔH° (Kcal/mol)
α -carboxilo	3,0 - 3,2	$\pm 1,5$
β o γ carboxilo	3,0 - 5,0	$\pm 1,5$
imidazolio	5,5 - 7,0	6,9 - 7,5
α -amino	7,5 - 8,5	10,0 - 13,0
ϵ -amino	9,5 - 10,6	10,0 - 13,0
sulfhidrilo	8,0 - 8,5	6,5 - 7,0
fenólico	9,8 - 10,5	6,0
guanidinio	11,6 - 12,6	12,0 - 13,0

Datos obtenidos de Segel, (1975)

quinasas de músculo de conejo y de corazón de bovino presentan varios tipos de grupos sulfhidrilos y que la modificación con DTNB provoca una disminución parcial de la actividad enzimática. Estos investigadores sugieren que estos grupos no están en el sitio activo y que la menor actividad sería la resultante de cambios conformacionales de la proteína. Sin embargo, Mathias y Kemp (1972) demostraron que MgATP protegía contra la inactivación provocada por el agente modificador.

Ahlfors y col. (1969) demostraron por experimentos de fotooxidación en presencia de azul de metileno, que un residuo histidina de la fosfofructoquinasa de corazón de bovino estaría involucrado en el sitio regulatorio o cercano a él, lo que fue confirmado posteriormente por el grupo de Setlow y Mansour (1970). Uyeda (1969) y Setlow y Mansour (1972), realizaron estudios en fosfofructoquinasa de músculo esquelético de conejo y de corazón de bovino con reactivos que reaccionan con grupos amino y observaron una inhibición virtualmente completa de la actividad enzimática acompañada de la disociación de las subunidades de la enzima, lo que indicaría una inhibición por un mecanismo no específico. Sin embargo, la inhibición con piridoxal-fosfato, quien presenta una menor tendencia a disociar la enzima, sugeriría un rol de los grupos amino en el proceso catalítico. El grado de inhibición era dependiente de la cantidad de piridoxal-fosfato y de la presencia de los sustratos; fructosa-6-P protegía contra la inhibición y ATP sólo dio protección parcial. Esta observación sugiere que al menos algún residuo lisina está ubicado en el sitio catalítico.

Los estudios en la fosfofructoquinasa relacionados con el pH están principalmente dirigidos a procesos de activación o inactivación dependientes de la protonación o desprotonación de grupos en el tetrámero. Bock y Frieden (1976a, 1976b) demostraron que la inactivación y disociación de la fosfofructoquinasa de músculo esquelético de conejo de tetrámero a dímero, involucra la protonación de un residuo en la forma tetramérica de la enzima, presumiblemente histidina, y que ATP se une preferencialmente a una forma protonada de la enzima (inactiva), mientras que fructosa-6-P se uniría a una forma no protonada (activa).

Otros estudios del efecto del pH en la actividad de las fosfofructoquinasas están relacionados con la inhibición por ATP (Uyeda y Racker, 1965; Trivedi y Danforth, 1966). En la enzima de músculo de conejo se produce inhibición a pH 7,0, la que disminuye progresivamente hasta no observarse a pH 9,0. Lo mismo ocurre en la fosfofructoquinasa de corazón (Mansour, 1963), cerebro (Lowry y Passonneau, 1966) e hígado (Kemp, 1971). En cambio, Pfk-2 de *E. coli* (Guixé y Babul, 1988) al igual que fosfofructoquinasa de levadura (Lindell y Stellwagen, 1968), presentan el fenómeno contrario, es decir, la enzima es más sensible a la inhibición por MgATP a valores de pH más alcalinos. Sin embargo, a medida que disminuye el pH, hasta un valor de 5,5, se ha demostrado que la concentración de otras especies iónicas de MgATP (MgHATP^{-1} , HATP^{-3}) son aproximadamente la mitad de la de MgATP^{-2} (Storer y Cornish-Bowden, 1976). Esto indicaría que el sitio alostérico para MgATP^{-2} , responsable de la inhibición de la

enzima por este compuesto, es altamente específico para una especie iónica en particular, en este caso, $MgATP^{-2}$.

Una manera de apoyar las conclusiones de la presente tesis sería por medio de estudios de modificación química con el fin de caracterizar el tipo y número de residuos involucrados en la acción enzimática es decir, la reacción de una proteína con un reactivo específico para un determinado residuo de aminoácido y su posterior análisis para correlacionar los cambios en la actividad enzimática, con la modificación del residuo. Sin embargo, esta es una técnica que presenta varios inconvenientes, entre otros, que no existe un reactivo específico para un tipo único de residuo.

Otra posibilidad es realizar mutagénesis dirigida, en la medida que se conozcan las secuencias de aminoácidos de Pfk-2 y de Pfk-2* o de los respectivos genes estructurales, para reemplazar residuos aminoacídicos específicos que, por estudios de cristalografía de rayos X, se hayan evaluados como importantes tanto en la unión de los sustratos en el sitio activo como en la unión de ligandos en sitios para los efectores. Estudios en este sentido realizaron Hellings y Evans (1987), quienes demostraron la función esencial de un aspartato (Asp 127) y en menor grado el residuo arginina (Arg 171) en la transferencia de un grupo fosforilo desde el ATP al fructosa-6-P en fosfofructoquinasa-1 de E. coli. Usando mutagénesis dirigida, se cambió el codón para dichos aminoácidos por los de serina en el gen de Pfk-1.

Lau y Fersht (1987) demostraron en el caso de Pfk-1 de E. coli,

que al reemplazar Glu 187 por Ala el fosfoenolpiruvato, inhibidor de la enzima, se convierte en activador.

La única estructura tridimensional que se conoce de una fosfofructoquinasa es la de Bacillus stearothermophilus (Evans y Hudson, 1979; Evans y col., 1986). Se han publicado las secuencias de la enzima de músculo de conejo (Poorman y col., 1984; Lee y col., 1987), músculo humano (Nakajima y col., 1987; Sharma y col., 1989), hígado de ratón (Gehrich y col., 1988), B. stearothermophilus (Kolb y col., 1980) y de las isoenzimas de fosfofructoquinasa de E. coli, Pfk-1 (Hellings y Evans, 1985) y Pfk-2 (Daldal, 1984). Todas estas secuencias son homólogas entre sí, salvo la de Pfk-2 de E. coli (Hellings y Evans, 1985; C. Medina, comunicación personal).

Se han identificado los residuos de aminoácidos importantes para la catálisis y para la unión de ligandos en la estructura cristalina de los complejos de la enzima de B. stearothermophilus con los ligandos (Evans y col., 1981). Al alinear la secuencia de la enzima de B. stearothermophilus con la Pfk-1 de E. coli, se observa que los aminoácidos presentes tanto en el sitio de unión de fructosa-6-P como en el de ATP son prácticamente los mismos en ambas enzimas. En ambos sitios de unión aparecen residuos de His. Otros grupos presentes en estos sitios de unión y que pueden presentar cargas son los residuos de Asp, Glu, Arg y Cys.

BIBLIOGRAFIA

- Ahlfors, Ch. E. & Mansour, T.E. (1969) Studies on heart phosphofructokinase. Desensitization of the enzymes to adenosine triphosphate inhibition. *J. Biol. Chem.* 244, 1247-1251
- Babul, J. (1978) Phosphofructokinases from Escherichia coli. Purification and characterization of the nonallosteric isozyme. *J. Biol. Chem.* 253, 4350-4355.
- Blangy, D., Buc, H., & Monod, J. (1968) Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 31, 13-35.
- Bloxham, D.P., & Lardy, H.A. (1973) Phosphofructokinase. *The Enzymes* 8, 239-278.
- Bock, P., & Frieden, C. (1974) pH induced cold lability of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase. *Biochemistry* 13, 4191-4196.
- Bock, P.E., & Frieden, C. (1976a) Phosphofructokinase. I Mechanism of the pH dependent inactivation and reaction of the rabbit muscle enzyme. *J. Biol. Chem.* 251, 5630-5636.
- Bock, P.E., & Frieden, C. (1976b) Phosphofructokinase. II. Role of ligands in the pH dependent structural changes of the rabbit muscle enzyme. *J. Biol. Chem.* 251, 5637-5643.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Campos, G., Guixé, V., & Babul, J. (1984) Kinetic mechanism of phosphofructokinase-2 from Escherichia coli. A mutant enzyme with a different mechanism. *J. Biol. Chem.* 259, 6147-6152.
- Cleland, W.E. (1970) Steady state kinetics. En *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) Vol. II. Third Edition. Academic Press, New York, pp. 1-65.

- Cleland, W.W. (1979) Statistical analysis of enzyme kinetics data. *Methods in Enzymology* 63, 103-138.
- Cohn, E., & Edsall, J. (1974) Proteins, aminoacids, and peptides. p. 444, van Nostrand-Reinhold, New York.
- Chapman, A., Sarmer, T. & Pihl, A. (1969) Modification of regulatory properties of phosphofructokinase by acetylation. *Eur. J. Biochem.* 7, 588-593.
- Daldal, F., & Fraenkel, D.G. (1981) Tn10 insertions in the pfkB region of *Escherichia coli*. *J. Bact.* 147, 935-943.
- Daldal, F., Babul, J., Guixé, V., & Fraenkel, D.G. (1982) An alteration in phosphofructokinase 2 of *Escherichia coli* which impairs gluconeogenic growth on sugars. *Eur. J. Biochem.* 126, 373-379.
- 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 Pfk B encoding the minor phosphofructokinase of *E. coli* K-12. *Gene* 28, 337-342.
- Dixon, M. (1953a) The effect of pH on the affinities of enzymes for substrates and inhibitors. *Biochem. J.* 55, 161-170.
- Dixon, M. (1953b) The determination of enzyme inhibitors constants. *Biochem. J.* 55, 170-171.
- Dixon, M. & Webb, E. (1958) *The Enzymes*, 1^a, ed., pp. 123-150, Longmans, London.
- Espinosa, X., Retamal, C. & Babul, J. (1985) Un mutante de fosfofructoquinasa-2 de *E. coli* con propiedades cinéticas alteradas. Caracterización estructural. *Arch. Biol. Med. Exp.* 18, R131.

- Espinosa, X. & Babul, J. (1986) Efecto de ligandos en la inactivación de las formas mutadas y normal de fosfofructoquinasa-2 de E. coli por modificación de grupos-SH. Arch. Biol. Med. Exp. 19, R202.
- Espinosa, X. (1987) Efecto de los sustratos en la modificación de los grupos sulfhidrilo de fosfofructoquinasas tipo 2 de Escherichia coli. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Evans, P.R. & Hudson, P.J. (1979) Structure and control of phosphofructokinase from Bacillus stearothermophilus. Nature 279, 500-504.
- Evans, P.R., Farrant, G.W. & Hudson, P.J. (1981) Phosphofructokinase: structure and control. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 293, 53-62.
- Evans, P.R., Farrants, G.W. & Lawrence, M.C. (1986) Crystallographic structure of allosterically inhibited phosphofructokinase at 7A resolution. J. Mol. Biol. 191, 713-720.
- Fraenkel, D.G., Kotlarz, D., & Buc, H. (1973) Two fructose 6-phosphate kinase activities in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 248, 4865-4866.
- Frieden, C., Gilbert, H.R., & Bock, P.E. (1976) Phosphofructokinase. III Correlation of the regulatory and molecular properties of the rabbit muscle enzyme. J. Biol. Chem. 251, 5644-5647.
- Froede, H.C., Geraci, G. & Mansour, T. (1968) "Studies on heart phosphofructokinase". J. Biol. Chem. 243? 6021-6029.
- Gehnrich, S., Gekakis, N. & Sul, H.S. (1988) Liver (β -type) phosphofructokinase mRNA. Cloning, structure and expression. J. Biol. Chem. 263, 11755-11759.
- Guixé, V., & Babul, J. (1985a) Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from Escherichia coli. A mutant enzyme altered in the allosteric site for MgATP. J. Biol. Chem. 260, 11001-11005.

- Guixé, V., & Babul, J. (1985b) A phosphofructokinase mutant of Escherichia coli altered in its allosteric properties impairs gluconeogenic growth. *Arch. Biol. Med. Exp.* 18, 301-307.
- Guixé, V. (1985) Mecanismo cinético y regulación de fosfofructoquinasa-2 de Escherichia coli. Una mutante con propiedades alteradas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Guixé, V., & Babul, J. (1988) Influence of ligands on the aggregation of the normal and mutant forms of phosphofructokinase-2 of Escherichia coli. *Arch. Biochem. Biophys.* 264, 519-524.
- Hammes, G.G. (1982) Enzyme Catalysis and Regulation. Academic Press, New York.
- Hellinga, H.W. & Evans, P.R. (1985) Nucleotide sequence and high-level expression of the major Escherichia coli phosphofructokinase. *Eur. J. Biochem.* 149, 363-373.
- Hellinga, H.W. & Evans, P.R. (1987) Mutation in the active site of Escherichia coli phosphofructokinase. *Nature* 327, 437-439.
- Hers, H.G., & Van Schaftingen, E. (1982) Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* 206, 1-12.
- Kemp, R.G. (1971) Rabbit liver phosphofructokinase. Comparison of same properties with those of muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 246, 245-252.
- Kolb, E., Hudson, P.J. & Harris, J.I. (1980) Phosphofructokinase: complete amino-acid sequence of the enzyme from Bacillus stearothermophilus. *Eur. J. Biochem.* 108, 587-597.
- Koshland, D.E. (1970) The molecular basis for enzyme regulation. *The Enzymes* 1, 341-396.
- Kotlarz, D., & Buc, H. (1977) Two Escherichia coli fructose 6-phosphate kinase. Preparative purification, oligomeric structure and immunological studies. *Biochim. Biophys. Acta* 484, 35-48.

- Kotlarz, D.G., & Buc, H. (1981) Regulatory properties of phosphofructokinase-2 from Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 117, 569-574.
- Lau, F. & Fersht, A. (1987) Conversion of allosteric inhibition to activation in phosphofructokinase by protein engineering. Nature 326, 811-812.
- Lee, Ch., Kao, M., French, B., Putney, S. & Chang, S. (1987) The rabbit muscle phosphofructokinase gene implications for protein structure, function and tissue specificity. J. Biol. Chem. 262, 4195-4199.
- Lindell, T. & Stellwagen, E. (1968) Purification and properties of phosphofructokinase from yeast. J. Biol. Chem. 243, 907-912.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1943) The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658-666.
- Lowry, O.H. & Passonneau, J.V. (1966) Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 241, 2268-2279.
- Mansour, T.E. (1963) Studies en heart phosphofructokinase. Purification, inhibition and activation. J. Biol. Chem. 238, 2285-2292.
- Mathias, M.M. & Kemp, R.G. (1972) Allosteric properties of muscle phosphofructokinase. III Thiol Reactivity as an indicator of conformational state. Biochemistry, 11, 578-584.
- McDonald, R.C., Steitz, T.A., & Engelman, D.M. (1979) Yeast hexokinase in solution exhibits a large conformational change upon binding glucose or glucose 6-phosphate. Biochemistry 18, 338-342.
- Monod, J., Changeaux, J.P., & Jacob, F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. J. Mol. Biol. 6, 306-329.
- Monod, J., Wyman, J., & Changeaux, J.P. (1965) On the nature of allosteric interactions: a plausible model. J. Mol. Biol. 12, 88-118.

- Nakajima, H., Noguchi, T., Yamasaki, T., Kono, N., Tanaka, T. & Tarui, S. (1987) Cloning of human muscle phosphofructokinase cDNA. *FEBS Letters* 223, 113-116.
- Pavelich, M.J. & Hammes, G.G. (1973) Aggregation of rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochemistry*, 12, 1408-1414.
- Pettigrew, D.W., & Frieden, C. (1979) Binding of regulatory ligands to rabbit muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 254, 1887-1895.
- Pickover, C.A., McKay, D.B., Engelman, D.M. & Steitz, T.A. (1979) Substrate binding closes the cleft between the domains of yeast phosphoglycerate kinase. *J. Biol. Chem.* 254, 11323-11329.
- Poorman, R.A., Randolph, A., Kemp, R.G. & Henrikson, R.L. (1984) Evolution of phosphofructokinase-gene duplications and creation of new effector sites. *Nature* 309, 467-469.
- Racker, E. (1947) Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphofructokinase activity. *J. Biol. Chem.* 167, 843-854.
- Ray, Jr.W.J. & Koshlawa, Jr. D.E. (1961) A method for characterizing the type and numbers of groups involve in enzyme action. *J. Biol. Chem.* 236, 1973-1979.
- Retamal, C. (1988) Caracterización estructural de las formas mutada y normal de fosfofructoquinasa de *E. coli*. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Segel, I.H. (1975) Enzyme kinetics. John Wiley & Sons. New York. pp. 274-320.
- Setlow, B. & Mansour, T.E. (1970) Studies on heart phosphofructokinase. Nature of the enzyme desensitized to allosteric control by photooxidation and by acylation with ethoxy formic anhydride. *J. Biol. Chem.* 245, 5524-5533.
- Setlow, B. & Mansour, T.E. (1972) Studies on heart phosphofructokinase. The effect of pyridoxal 5'-phosphate on enzyme activity and dissociation. *Biochem. Biophys. Acta.* 258, 106-112.

- Sharma, P., Reddy, R., Vora, S., Babior, B. & McLachlan, A. (1989) Cloning and expression of a human muscle phosphofructokinase cDNA. *Gene* 77, 177-183.
- Solheim, L., & Fromm, H. (1980) pH kinetic studies of bovine brain hexokinase. *Biochemistry* 19, 6074-6080.
- Sols, A., Castaño, J.G., Aragón, J.J., Domenech, C., Lazo, P.A., & Nieto, A. (1981) Multimodulation of phosphofructokinase in metabolic regulation. En *Metabolic Interconversion of Enzymes*. (Holzer, H., ed.), pp. 111-123, Springer Verlag, New York.
- Storer, A.C. & Cornish-Bowden, A. (1976) Concentration of $MgATP^{2-}$ and other ions in solution. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochem. J.* 159, 1-5.
- Thomson, J.A. (1977) *E. coli* phosphofructokinase synthesized in vitro from a ColE1 plasmid. *Gene* 1, 347-356.
- Thornburgh, B.N., Wu, L., & Griffin, C.C. (1978) Phosphofructokinase from *Escherichia coli*: further evidence for identical subunits. *Can. J. Biochem.* 56, 836-838.
- Trivedi, B., & Danforth, W. (1966) Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 241, 4110-4114.
- Uyeda, K. & Racker, E. (1965) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolisms. VII. Hexokinase and phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 240, 4682-4688.
- Uyeda, K. (1969) Reaction of phosphofructokinase with maleic anhydride, succinic anhydride, and pyridoxal 5'-phosphate. *Biochemistry*, 8, 2366-2373.
- Uyeda, K. (1979) Phosphofructokinase. *Advan. Enzymol.* 48, 193-244.
- Uyeda, K., Furuya, E., & Luby, L.J. (1981) The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases. *J. Biol. Chem.* 256, 8394-8399.

- Wilkinson, G.N. (1961) Statistical estimations in enzyme kinetics. **Biochem. J.** 80, 324-332.
- Wilson, J.E. (1982) Involvement of arginine residues in catalysis by rat brain hexokinase. **Archives of Biochemistry and Biophys.** 218, 254-262.
- Wolfman, N.M., Thompson, W.R., & Hammes, G.G. (1978) Study of the interaction of adenyl imidophosphate with rabbit muscle phosphofructokinase. **Biochemistry** 17, 1813-1817.
- Younathan, E., Paetkau, V. & Lardy, H. (1968) Rabbit muscle phosphofructokinase. **J. Biol. Chem.** 243, 1603-1608