

MECANISMO CINETICO 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 Básicas y Farmacéuticas

por

GABRIEL CAMPOS TRINCADO

1984



Director de Tesis: Jorge Babul C.
con la colaboración de Victoria Guixé L.

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

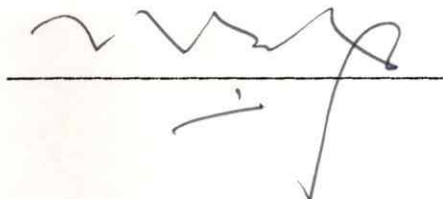
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Magister de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por el Candidato

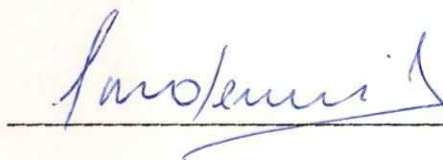
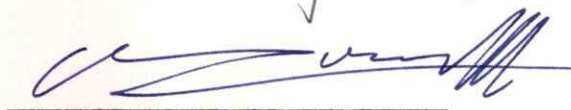
Gabriel Campos Trincado

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

Director de Tesis



Comisión Informante
de Tesis



Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, bajo la dirección de los Profesores Victoria Guixé L. y Jorge Babul C.



AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos:

Al Dr. Jorge Babul C., por la oportunidad de poder realizar esta Tesis y por su valiosa dirección.

A Victoria Guixé, por su constante cooperación en el desarrollo experimental de este trabajo, su paciencia, preocupación, consejos y críticas constructivas.

Al Dr. Hermann Niemeyer, por su permanente y desinteresado apoyo y estímulo, tanto en lo científico como en lo personal.

Al Dr. Dan G. Fraenkel, por la donación de las cepas de E. coli utilizadas en esta investigación.

A todos los integrantes del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas y a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo.

A Ximena Espinosa y Claudio Retamal, por su eficiente colaboración en la purificación de las enzimas.

A Ana María Amaro, Juan Carlos Guzmán, Sergio Sanhueza y Eliseo Campos, por su valiosa amistad y oportunos consejos.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE ESQUEMAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	6
1. Fuente de las enzimas	6
2. Purificación de las enzimas	6
3. Estabilidad y mantención de las enzimas	6
4. Determinación de la actividad enzimática	7
a. Medición de fructosa-1,6-P ₂	7
b. Medición de ADP	8
c. Estudios cinéticos de inhibición	9
5. Determinación de la concentración de los reactivos	9
6. Análisis estadístico de los resultados	10
7. Reactivos usados	11
RESULTADOS	13
1. Estudios cinéticos preliminares	13
a. Determinación de K _m aparentes	13

	Pág.
b. Inhibición por los sustratos	14
c. Coeficientes de Hill de Pfk-2 y Pfk-2*	14
2. Estudios cinéticos en velocidad inicial	14
3. Estudios de inhibición por los productos	24
a. Inhibición de Pfk-2 por los productos	25
b. Inhibición de Pfk-2* por los productos	30
4. Estudios de inhibición por análogos de los sustratos	43
a. Inhibición de Pfk-2 por los análogos	46
b. Inhibición de Pfk-2* por los análogos	51
DISCUSION	58
Estudios en velocidad inicial	59
Inhibición por los productos	59
Inhibición por análogos de los sustratos	64
BIBLIOGRAFIA	72

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Fosfofructoquinasas de <u>E. coli</u>	3
Tabla 2	Constantes de Michaelis aparentes de Pfk-2 y Pfk-2*	13
Tabla 3	Constantes cinéticas de Pfk-2 y Pfk-2*	17
Tabla 4	Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2 por los productos	28
Tabla 5	Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2* por los productos	37
Tabla 6	Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2 por análogos de los sustratos	51
Tabla 7	Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2* por análogos de los sustratos	57
Tabla 8	Inhibición de Pfk-2 por los productos	60
Tabla 9	Inhibición de Pfk-2* por los productos	62
Tabla 10	Inhibición de Pfk-2 por análogos de los sustratos	65
Tabla 11	Inhibición de Pfk-2* por análogos de los sustratos	65

LISTA DE ESQUEMAS

		Pág.
Esquema 1	Estructura química de ATP y AMP-PNP	44
Esquema 2	Estructura química de fructosa-6-P, ribosa-5-P y sorbitol-6-P	45
Esquema 3	Mecanismo cinético de Pfk-2	61
Esquema 4	Mecanismo cinético de Pfk-2*	63
Esquema 5	Inhibición de Pfk-2 por AMP-PNP	66
Esquema 6	Inhibición de Pfk-2* por sorbitol-6-P	68

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad de Pfk-2 y Pfk-2*	15
Figura 2. Gráficas de Hill de las funciones de saturación de Pfk-2 y Pfk-2* para fructosa-6-P y ATP	16
Figura 3. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 cuando fructosa-6-P es el sustrato variable	18
Figura 4. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2* cuando fructosa-6-P es el sustrato variable	18
Figura 5. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 cuando ATP es el sustrato variable	20
Figura 6. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2* cuando ATP es el sustrato variable	21
Figura 7. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 donde las concentraciones de ATP y fructosa-6-P se variaron en una razón constante	22
Figura 8. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2* donde las concentraciones de ATP y fructosa-6-P se variaron en una razón constante	23
Figura 9. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por fructosa-1,6-P ₂ cuando fructosa-6-P es el sustrato variable	26
Figura 10. Inhibición de Pfk-2 por fructosa-1,6-P ₂	27
Figura 11. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por fructosa-1,6-P ₂ cuando ATP es el sustrato variable a una concentración subsaturante de fructosa-6-P (0,10 mM)	29

- Figura 12. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por fructosa-1,6-P₂ cuando ATP es el sustrato variable a una concentración saturante de fructosa-6-P (2,0 mM) 31
- Figura 13. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por ADP usando ATP como sustrato variable 32
- Figura 14. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por ADP usando fructosa-6-P como sustrato variable 33
- Figura 15. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por ADP cuando ATP es el sustrato variable 34
- Figura 16. Inhibición de Pfk-2* por ADP 35
- Figura 17. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por ADP cuando fructosa-6-P es el sustrato variable a una concentración subsaturante de ATP (0,08 mM) 38
- Figura 18. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por ADP cuando fructosa-6-P es el sustrato variable a una concentración saturante de ATP (1,0 mM) 39
- Figura 19. Gráfica de dobles recíprocos para inhibición de Pfk-2* por fructosa-1,6-P₂ cuando fructosa-6-P es el sustrato variable 40
- Figura 20. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por fructosa-1,6-P₂ cuando ATP es el sustrato variable a una concentración subsaturante de fructosa-6-P (0,10 mM) 41

- Figura 21. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por fructosa-1,6-P₂ cuando ATP es el sustrato variable a una concentración saturante de fructosa-6-P (1,0 mM) 42
- Figura 22. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por AMP-PNP cuando ATP es el sustrato variable 47
- Figura 23. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por AMP-PNP cuando fructosa-6-P es el sustrato variable 48
- Figura 24. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por ribosa-5-P cuando fructosa-6-P es el sustrato variable 49
- Figura 25. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por ribosa-5-P cuando ATP es el sustrato variable 50
- Figura 26. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por AMP-PNP cuando ATP es el sustrato variable 52
- Figura 27. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por AMP-PNP cuando fructosa-6-P es el sustrato variable 53
- Figura 28. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por sorbitol-6-P cuando fructosa-6-P es el sustrato variable 55
- Figura 29. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por sorbitol-6-P cuando ATP es el sustrato variable 56

ABREVIATURAS

AMP-PNP	Adenililimidodifosfato
DEAE-	Dietilamonoetil-
DTT	Ditiotreitol
F6P	fructosa 6-fosfato
fructosa-6-P	fructosa 6-fosfato
FDP	fructosa-1,6-bisfosfato
fructosa-1,6-P ₂	fructosa-1,6-bisfosfato
ribosa-5-P	ribosa 5-fosfato
sorbitol-6-P	sorbitol 6-fosfato
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

RESUMEN

La cepa silvestre de E. coli contiene una fosfofructoquinasa alostérica, isoenzima principal, Pfk-1 y una isoenzima minoritaria, aparentemente no alostérica, Pfk-2. La mutación pfkB1 aumenta los niveles de Pfk-2, permite el crecimiento de mutantes que carecen de Pfk-1 y no afecta el crecimiento en sustratos gluconeogénicos. La mutación pfkB10 genera una forma alterada de Pfk-2 de mayor labilidad y propiedades cinéticas diferentes, llamada Pfk-2*. Cepas con altos niveles de Pfk-2* crecen bien en azúcares pero muy lentamente en compuestos gluconeogénicos. El propósito de esta investigación fue determinar el mecanismo cinético de Pfk-2 y Pfk-2*.

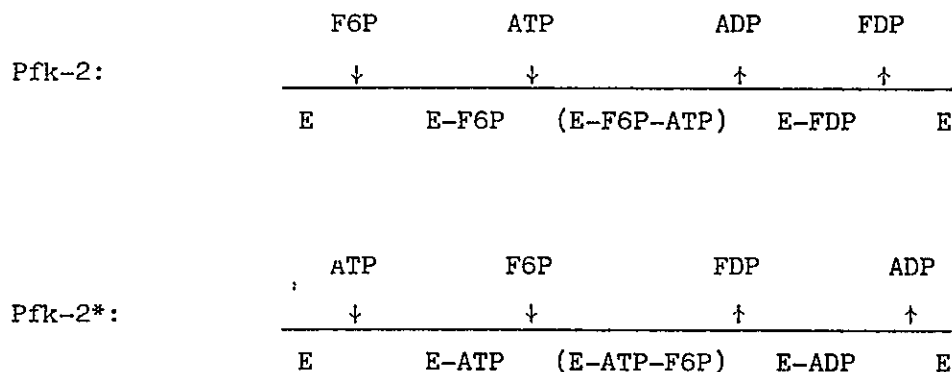
La función de saturación de ambas enzimas para ATP y fructosa-6-P resultó ser hiperbólica. Estudios en velocidad inicial dieron como resultado líneas convergentes en gráficas de dobles recíprocos, indicando una adición consecutiva de los sustratos a las enzimas y la formación de un complejo ternario previo a la liberación de los productos. Esto fue confirmado al obtenerse una parábola en gráficas de dobles recíprocos cuando se varió la concentración de ambos sustratos en una razón constante.

Estudios de inhibición por producto para Pfk-2 mostraron inhibición competitiva de fructosa-1,6-P₂ con respecto a fructo-

sa-6-P; en cambio, la inhibición de fructosa-1,6-P₂ con respecto a ATP resultó no competitiva. Las otras inhibiciones, de ADP con respecto a ATP y de ADP con respecto a fructosa-6-P, fueron de tipo no competitivo.

Para Pfk-2*, sólo se obtuvo inhibición competitiva de ADP con respecto a ATP; la inhibición de ADP con respecto a fructosa-6-P resultó no competitiva. Las otras inhibiciones, de fructosa-1,6-P₂ con respecto a ATP y de fructosa-1,6-P₂ con respecto a fructosa-6-P, fueron de tipo no competitivo.

Estos estudios permitieron postular los siguientes mecanismos cinéticos para Pfk-2 y Pfk-2*:



Estos mecanismos se confirmaron mediante el uso de análogos de sustratos que actúan como inhibidores de punto muerto.

Para ambas enzimas se usó AMP-PNP como análogo de ATP. Como análogo de fructosa-6-P se usó ribosa-5-P en el caso de Pfk-2 y sorbitol-6-P en el caso de Pfk-2*. Para ambas enzimas se obtuvo inhibición incompetitiva cuando se estudió el análogo del segundo sustrato en relación al primer sustrato que se adiciona a la enzima, confirmando así los mecanismos en secuencia ordenada propuestos.

ABSTRACT

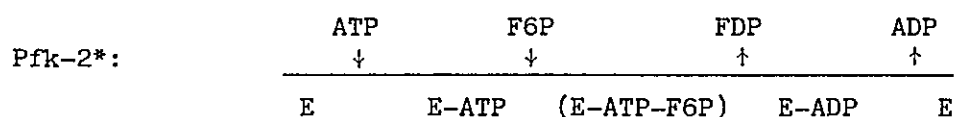
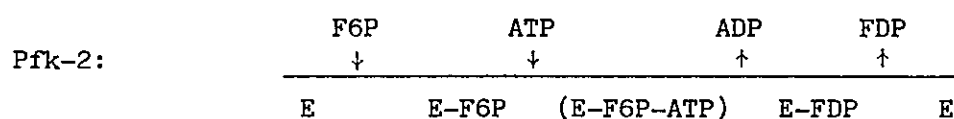
The wild type strain of E. coli contains an allosteric phosphofructokinase, the principal isozyme, Pfk-1, and a minor isozyme, apparently non-allosteric, Pfk-2. The pfkB1 mutation increases the amount of Pfk-2, allows growth of mutants lacking Pfk-1 and does not affect growth on gluconeogenic substrates. The pfB10 mutation produces an altered form of Pfk-2 called Pfk-2* which is cold labile and has different kinetic characteristics. Strains with high levels of Pfk-2* grow well on sugars, but very slowly on gluconeogenic compounds. The purpose of this work was to determine the kinetic mechanism of Pfk-2 and Pfk-2*.

Both enzymes showed hyperbolic saturation kinetics with respect to fructose-6-P and ATP. Initial velocity studies gave intersecting straight lines on double-reciprocal plots indicating a consecutive order of addition of the substrates to the enzymes and the formation of a ternary complex prior to the release of products. When a constant concentration ratio of both substrates was used, a parabola was obtained in double-reciprocal plots, confirming the sequential mechanisms.

Product inhibition studies with Pfk-2, showed competitive inhibition of fructose-1,6-P₂ with respect to fructose-6-P, but noncompetitive with respect to ATP. The inhibition of ADP with respect to fructose-6-P and ADP with respect to ATP were both

noncompetitive. Pfk-2* showed competitive inhibition of ADP with respect of ATP, but noncompetitive with respect to fructose-6-P. The inhibition of fructose-1,6-P₂ was noncompetitive with respect to ATP and also with respect to fructose-6-P.

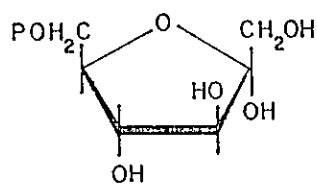
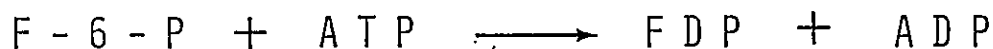
These results suggest the following kinetic mechanisms for the enzymes:



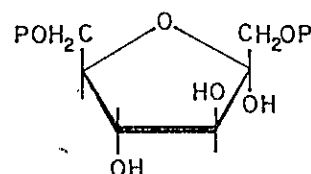
The kinetic mechanisms were confirmed by the use of substrate analogs acting as dead-end inhibitors. AMP-PNP was used as an ATP analog for both enzymes. Ribose-5-P and sorbitol-6-P were used as fructose-6-P analogs for Pfk-2 and Pfk-2* respectively. Uncompetitive inhibition was obtained when the inhibitor was dissimilar to the varied substrate with both, Pfk-2 and Pfk-2*, in accordance with the ordered sequential reaction mechanism suggested above.

INTRODUCCION

Los hidratos de carbono son una fuente importante de energía para la mayoría de los organismos vivos. Su utilización se realiza a través de la vía glicolítica, serie de reacciones en la cual los hidratos de carbono son degradados con la producción concomitante de ATP. De todas las reacciones involucradas, la que cataliza la fosfofructoquinasa (Pfk) ha sido considerada uno de los pasos claves de esta vía (1-3). Esta enzima cataliza la transferencia del fosfato terminal del ATP al hidroxilo del C-1 de la fructosa-6-P, produciendo fructosa-1,6-P₂, como se muestra en la siguiente reacción:



D-Fructosa 6-fosfato



D-Fructosa 1,6-difosfato

Esta es una de las reacciones irreversibles de la glicólisis y presenta así numerosas posibilidades de regulación metabólica. La fosfofructoquinasa ha sido aislada pura de una variedad de fuentes (1,2), lo que ha permitido a muchos investigadores estudiar el mecanismo de acción de la enzima y las relaciones entre su estructura y función. Las principales características regulatorias de las fosfofructoquinasas obtenidas de diferentes fuentes son: inhibición por altas concentraciones de ATP (generalmente este compuesto disminuye la afinidad de la enzima por fructo-

sa-6-P), inhibición por citrato, disminución de la inhibición producida por ATP en presencia de fosfato inorgánico, AMP, cAMP, fructosa-1,6-P₂ y fructosa-6-P y función de saturación sigmoideal con respecto a fructosa-6-P (2).

La cepa silvestre de E. coli presenta dos isoenzimas que fosforilan fructosa-6-P a expensas de ATP y otros nucleótidos (4,5). La fosfofructoquinasa 1 (Pfk-1), codificada por el gen pfkA (6), es la isoenzima mayoritaria (90 % de la actividad total de fosfofructoquinasa) y ha sido ampliamente estudiada (7). Presenta una función de saturación sigmoideal con respecto a fructosa-6-P, inhibición por fosfoenolpiruvato y activación por ADP (5,7). Pfk-1 es un tetrámero de subunidades de M_r 34.000 (5,8). La fosfofructoquinasa 2 (Pfk-2), codificada por el gen pfkB (9), está presente en bajos niveles en la cepa silvestre (10 % de la actividad total), presenta una función de saturación hiperbólica con respecto a fructosa-6-P, no presenta inhibición por fosfoenolpiruvato y no es activada por ADP. A diferencia de Pfk-1, Pfk-2 es inhibida por fructosa-1,6-P₂ y puede usar tagatosa-6-P como sustrato (5). Esta enzima también es un tetrámero, pero la M_r de sus subunidades es de 36.000 (5,10). La función que desempeña esta isoenzima en la célula aún se desconoce. Sin embargo, mutantes carentes de Pfk-1 crecen bien en azúcares si los niveles de Pfk-2 son elevados (11).

Cepas con la mutación pfkB1 (Tabla 1), presentan niveles de Pfk-2 treinta veces mayores que los de la cepa silvestre (5). Una mutación cercana, pfkB10, afecta la estructura de la enzima produciendo una Pfk-2 de propiedades alteradas, llamada Pfk-2* (9,12). Así, es posible disponer de una cepa con ambas mutaciones pfkB1 y pfkB10, denominada pfkB1*, que posee altos niveles de Pfk-2*. Cepas con una delección completa del gen que especifica a Pfk-1, pero con altos niveles de Pfk-2, crecen bien en azúcares y en sustratos gluconeogénicos. En cambio, dobles mutantes con altos niveles de Pfk-2* y también carentes de Pfk-1, crecen bien en azúcares, pero lentamente en sustratos gluconeogénicos (11).

Tabla 1
FOSFOFRUCTOQUINASAS DE E. coli.

CEPAS	GENES	ACTIVIDAD ENZIMATICA
Silvestre	<u>pfkA</u> + <u>pfkB</u> +	90 % Pfk-1; 10 % Pfk-2
Delección en <u>pfkA</u>	Δ <u>pfkA</u> <u>pfkB</u> +	Pfk-2, bajos niveles
	Δ <u>pfkA</u> <u>pfkB1</u>	Pfk-2, altos niveles
	Δ <u>pfkA</u> <u>pfkB1</u> <u>pfkB10</u>	Pfk-2*, altos niveles

En nuestro laboratorio se ha purificado la enzima proveniente de ambas cepas (11) y se están estudiando sus características cinéticas y estructurales, para tratar de explicar la diferencia de crecimiento entre ellas.

Pfk-2* presenta mayor labilidad que Pfk-2 tanto en extractos crudos como en preparaciones purificadas. Las enzimas también difieren en sus propiedades cinéticas; Pfk-2* es menos sensible a la inhibición por fructosa-1,6-P₂. Al correlacionar las propiedades cinéticas de ambas enzimas con las concentraciones de metabolitos claves no es posible comprender la diferencia de crecimiento de las cepas (11). La diferencia cinética más notable entre Pfk-2 y Pfk-2*, es la inhibición de las enzimas por el producto fructosa-1,6-P₂ cuando se usa fructosa-6-P como sustrato variable (11). En el caso de Pfk-2 la inhibición es de tipo competitivo, mientras que en el de Pfk-2* es de tipo no competitivo. Estos resultados sugieren cambios estructurales en el sitio activo de Pfk-2 como consecuencia de la mutación pfkB10, los que podrían establecerse mediante el estudio del mecanismo cinético de cada enzima.

El mecanismo cinético de la fosfofructoquinasa obtenida de diferentes fuentes ha sido estudiado por varios investigadores (1,2) y ha sido materia de controversia por muchos años. Así, para la enzima de la misma fuente se han informado diferentes mecanismos (13-16). Los principales problemas que se presentan son la inhibi-

ción por altas concentraciones del sustrato ATP y la cooperatividad con respecto a fructosa-6-P. Estos problemas no se presentan en el caso de las fosfofructoquinasas tipo 2 de E. coli, ya que ellas poseen una cinética de saturación hiperbólica en relación a fructosa-6-P y ATP y no presentan inhibición por este último en el rango de concentraciones utilizado en los estudios cinéticos que se presentan en este trabajo.

El objetivo general de esta tesis es dilucidar el orden de interacción de los sustratos y productos con Pfk-2 y Pfk-2* mediante estudios en velocidad inicial, de inhibición por los productos de la reacción y por análogos de los sustratos. Estos estudios indican que ambas enzimas poseen un mecanismo en secuencia ordenada. Para Pfk-2, fructosa-6-P es el primer sustrato que se une a la enzima y fructosa-1,6-P₂ el último producto que se libera, mientras que para Pfk-2* ATP es el primer sustrato en unirse y ADP el último producto en liberarse.

MATERIALES Y METODOS

1. Fuente de las enzimas.

Se utilizaron dos cepas isogénicas de E. coli, DF903 para la obtención de Pfk-2 y DF905 para la de Pfk-2*, cuyo origen y construcción describen Daldal y Fraenkel (9). Ambas cepas poseen una delección completa del gen estructural de Pfk-1 (pfkA). DF903 contiene la mutación pfkB1 y DF905 posee la doble mutación pfkB1 pfkB10.

2. Purificación de las enzimas.

Las enzimas Pfk-2 y Pfk-2*, se purificaron hasta la etapa de cromatografía en azul de Cibacron Sepharose según el procedimiento descrito por Babul (5) y Daldal y col. (11). En algunas preparaciones de Pfk-2*, se sustituyó la cromatografía en DEAE-celulosa por una en hidroxilapatita.

3. Estabilidad y mantención de las enzimas.

La estabilidad de las enzimas se medía a concentraciones saturantes (1 mM) de ambos sustratos, ATP y fructosa-6-P, determinando la formación de fructosa-1,6-P₂ como se describe más adelante. Después de la cromatografía en azul de Cibacron Sepharose, Pfk-2 y Pfk-2* se concentraban por ultrafiltración y se mantenían a -20° C en un amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, que contenía: MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, EDTA 1 mM y glicerol 50%; en el caso de Pfk-2* el amortiguador contenía además etanol

5%. En estas condiciones las enzimas mantenían su actividad por varios meses.

Para medir su actividad, las enzimas se diluían en los siguientes amortiguadores, con los agregados que se indican. Pfk-2 se diluía en Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM y glicerol 20 %. Pfk-2* se diluía en el mismo amortiguador pero se agregaba etanol al 5 % en vez de glicerol. En estas condiciones las enzimas mantenían su actividad al menos dos semanas. Las reacciones enzimáticas se iniciaban agregando entre 5 y 25 μ l de enzima diluída, de modo que el cambio de absorbancia por minuto a 340 nm no fuera mayor que 0,45.

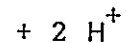
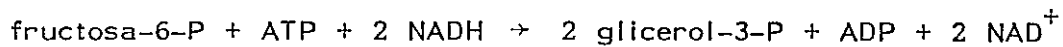
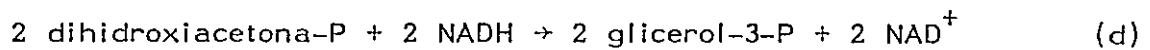
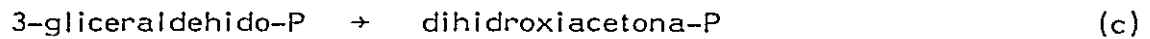
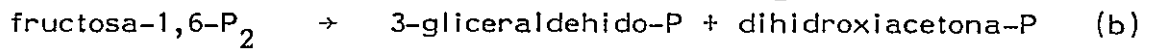
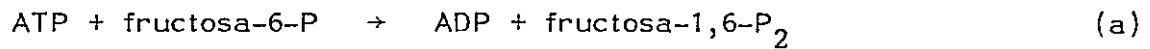
4. Determinación de la actividad enzimática.

La actividad enzimática se determinó a 30° C, en un espectrofotómetro Gilford modelo 2400, usando uno de los siguientes ensayos:

a) Medición de fructosa-1,6- P_2 .

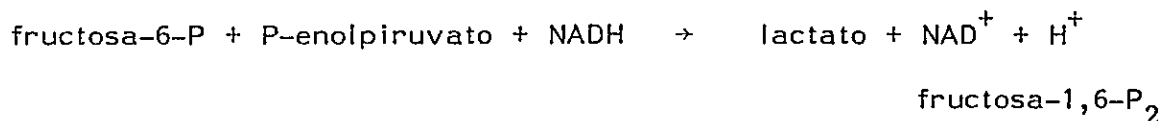
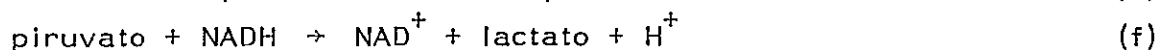
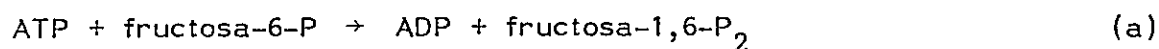
En este ensayo la actividad se medía espectrofotométricamente a 340 nm, acoplando la formación de fructosa-1,6- P_2 a la oxidación del NADH en presencia de aldolasa (Ecuación b), triosafosfatoisomerasa (Ecuación c) y α -glicerofosfatodeshidrogenasa (Ecuación d) (5,17). La mezcla de reacción, en un volumen final de 0,5 ml, contenía: Tris-HCl 100 mM, pH 8,2, DTT 1 mM, $MgCl_2$ 10 mM, NH_4Cl 2 mM, NADH 0.2 mM, 0,36 U de aldolasa, 15 U de triosafosfatoisomerasa y 5 U de α -glicerofosfatodeshidrogenasa. La

concentración de ATP y fructosa-6-P se variaba según se indica en cada caso y la reacción se iniciaba agregando la enzima. La reacciones involucradas son las siguientes:



b) Medición de ADP.

En este caso la actividad fosfofructoquinásica también se medía espectrofotométricamente a 340 nm, acoplado la formación de ADP a la oxidación del NADH en presencia de piruvatoquinasa (Ecuación e) y lactatodeshidrogenasa (Ecuación f), según lo descrito por Kornberg (18) y Babul (5). La mezcla de reacción, en un volumen final de 0,5 ml, contenía: Tris-HCl 100 mM, pH 8,2, fosfoenolpiruvato 0,2 mM, MgCl₂ 10 mM, KCl 10 mM, NH₄Cl 2 mM, NADH 0,2 mM, 4 U de piruvatoquinasa y 5,5 U de lactatodeshidrogenasa. La concentración de ATP y fructosa-6-P se variaba según se indica en cada caso y la reacción también se iniciaba agregando la enzima previamente diluída. Las reacciones son las siguientes:



c) Estudios cinéticos de inhibición.

Al estudiar la cinética de inhibición por el producto fructosa-1,6-P₂, la actividad enzimática se midió usando el ensayo acoplado a la formación de ADP descrito en 4b. Cuando se estudió la cinética de inhibición por ADP, la actividad enzimática se determinó usando el ensayo acoplado a la formación de fructosa-1,6-P₂, descrito en 4a. En los estudios de inhibición por análogos de los sustratos (AMP-PNP, sorbitol-6-P y ribosa-5-P) la actividad enzimática se determinó en ensayos acoplados a la formación de fructosa-1,6-P₂.

5. Determinación de la concentración de los reactivos.

a) 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 (17). 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, 0,2 U de glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa y 0,004 U de hexoquinasa.

La concentración de ATP también se determinó usando el ensayo enzimático descrito en 4a para la medición de fructosa-1,6-P₂. Al calcular la concentración de ATP usando el coeficiente de extinción del mismo ($15,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se pudo comprobar que la concentración era la misma a la obtenida según los dos métodos antes descritos. Esto indica que la contaminación por ADP y AMP era despreciable.

b) La concentración de ADP se determinó según lo descrito en 4b y también se verificó espectrofotométricamente en condiciones iguales a las utilizadas para medir el ATP.

c) La concentración de fructosa-6-P, se determinó según lo descrito en 4a y se utilizó Pfk comercial de músculo de conejo.

d) La concentración de fructosa-1,6-P₂, se determinó según el procedimiento descrito en 4a.

6. Análisis estadístico de los resultados.

El análisis de los resultados cinéticos se realizó empleando las transformaciones de Lineweaver-Burk (19) y sus respectivas gráficas secundarias. Las curvas se ajustaron a los valores experimentales por medio del método de regresión lineal (20). Las inhibiciones por ADP, fructosa-1,6-P₂, AMP-PNP, sorbitol-6-P y ribosa-5-P también fueron analizadas en gráficas de dobles recíprocos

y los tipos de inhibición resultantes fueron confirmados haciendo uso de las transformaciones gráficas de Dixon (21) y de Cornish-Bowden (22). El coeficiente de correlación (r) de las curvas resultantes tanto de gráficas primarias como de secundarias varió entre 0,989 y 0,999. La constante de inhibición se calculó a partir de gráficas secundarias de pendientes en función de la concentración del inhibidor (21). Para distinguir entre inhibición competitiva y no competitiva, se aplicó el test de Student a los valores experimentales de las intersecciones de las rectas obtenidas con el eje de la ordenada ($1/V$) en gráficas de dobles recíprocos, según lo descrito por Plapp (23). El test de Student considera los valores de las intersecciones de las rectas que más difieren entre sí. Si el valor de (t) de estas rectas es menor que 1,96 la inhibición se supone competitiva, mientras que si el valor de (t) es mayor que 2,58, la inhibición se supone de tipo no competitivo.

7. Reactivos usados.

Piruvatoquinasa (de músculo de conejo), lactatodeshidrogenasa (de músculo de conejo), hexoquinasa (de levadura), glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (de L. mesenteroides), Pfk (de músculo de conejo), ditiotreitól, Tris, NADH, NADP⁺, sorbitol-6-P, ribosa-5-P, AMP-PNP, ATP, ADP, fructosa-1,6-P₂, glucosa, fosfoenolpiruvato, glicerol, etanol, fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. E.E. U.U.). KCl, EDTA, MgCl₂, NH₄Cl, fueron obtenidos de Merck AG Darmstadt, Alemania Federal. Aldolasa (de

músculo de conejo), α -glicerofosfatodeshidrogenasa (de músculo de conejo), triosafosfatoisomerasa (de músculo de conejo), fructosa-6-P, fueron obtenidos de Boehringer Mannheim GmbH, Alemania Federal.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS CINÉTICOS PRELIMINARES

a. Determinación de K_m aparentes.

Con el objeto de elegir las concentraciones de sustratos apropiadas para los estudios en velocidad inicial, se determinaron las constantes de Michaelis aparentes para ATP y fructosa-6-P de Pfk-2 y Pfk-2*. En la Tabla 2 se resumen los valores de dichas constantes.

Tabla 2
CONSTANTES DE MICHAELIS APARENTES DE Pfk-2 Y Pfk-2*^a

Enzima	Sustrato Variable ^b	Sustrato Fijo ^c	K_m (mM)
Pfk-2	fructosa-6-P	ATP	0,050
	ATP	fructosa-6-P	0,025
Pfk-2*	fructosa-6-P	ATP	0,044
	ATP	fructosa-6-P	0,027

a. La actividad enzimática se midió con el ensayo 4a, descrito en Materiales y Métodos.

b. 0,01 a 0,2 mM.

c. 1 mM.

b. Inhibición por los sustratos.

ATP es inhibidor de las fosfofructoquinasas obtenidas de diferentes fuentes (1-3). Por esta razón fue necesario determinar la posible inhibición de Pfk-2 y Pfk-2* por ATP en el rango de concentraciones a usar en los experimentos cinéticos de este trabajo. Como se ilustra en la Figura 1, no se observó inhibición por ATP en el rango de concentraciones usado (0,05-1,0 mM). Resultados similares se obtuvieron al estudiar el efecto de fructosa-6-P.

c. Coefficiente de Hill de Pfk-2 y Pfk-2*.

La mayoría de las fosfofructoquinasas estudiadas presenta una función de saturación sigmoideal para fructosa-6-P (1-3), lo que ha dificultado la aplicación de los protocolos habituales usados para la determinación del mecanismo cinético de enzimas con cinética michaeliana. La Figura 2 muestra las gráficas de Hill para Pfk-2 y Pfk-2* para ambos sustratos. Los valores del coeficiente de Hill variaron entre 0,98 y 1,08, indicando que ambas enzimas presentan una función de saturación hiperbólica con respecto a fructosa-6-P y ATP en los rangos de concentraciones usados.

2. ESTUDIOS CINÉTICOS EN VELOCIDAD INICIAL

Al estudiar el efecto de concentraciones variables de fructosa-6-P a diferentes concentraciones fijas de ATP sobre la velocidad

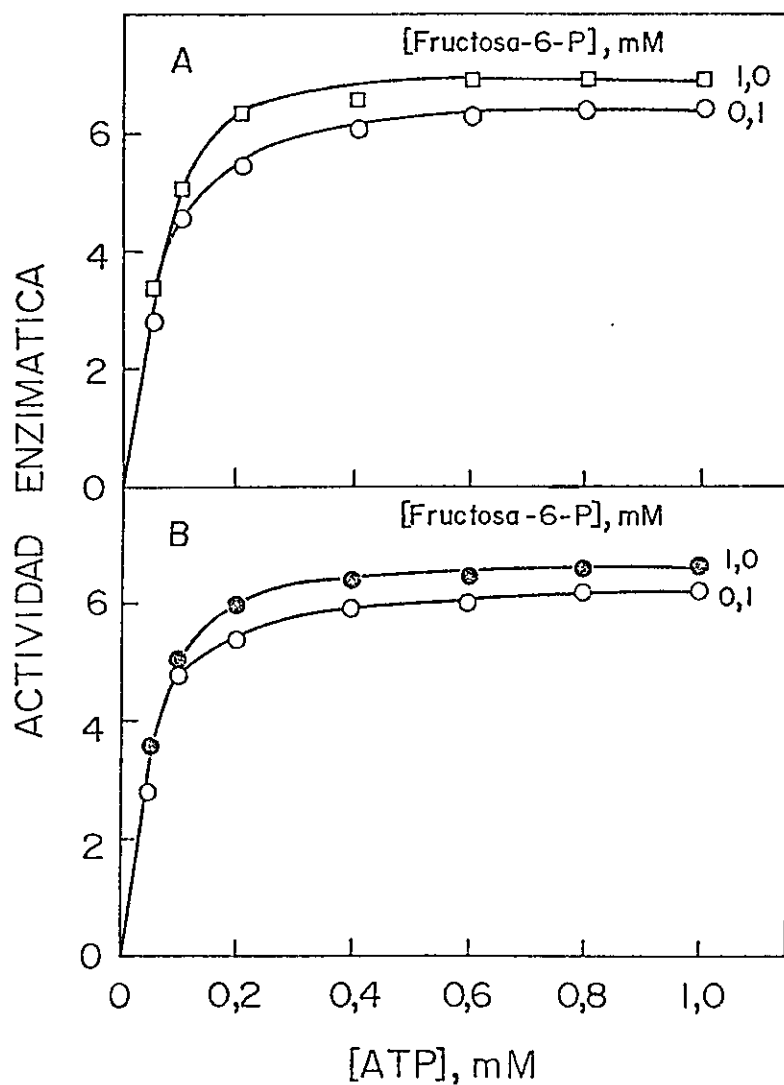


Figura 1. Efecto de la concentración de ATP sobre la actividad de Pfk-2 y Pfk-2*. El medio de reacción, en un volumen final de 0,5 ml, contenía: Tris-HCl 100 mM, pH 8,2, DTT 1 mM, MgCl₂ 10 mM, NH₄Cl 2 mM, NADH 0,2 mM, 0,36 U de aldolasa, 15 U de triosafosfatoisomerasa⁴ y 5 U de α -glicerofosfatodeshidrogenasa. A, Pfk-2; B, Pfk-2*. En ambos casos el experimento se realizó a dos concentraciones de fructosa-6-P, 0,1 y 1,0 mM. La actividad enzimática se expresa como A₃₄₀/min ml/50.

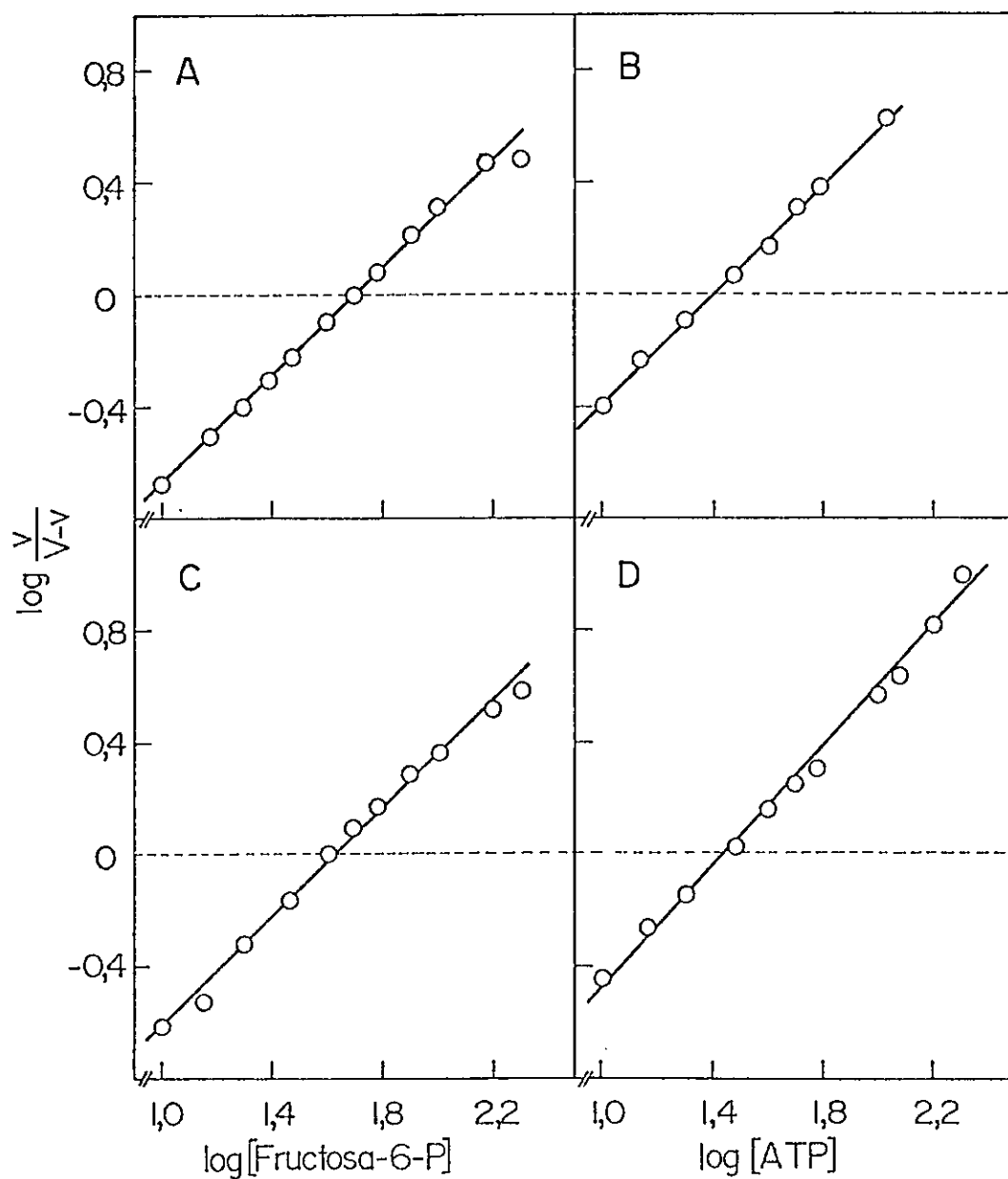


Figura 2. Gráficas de Hill de las funciones de saturación de Pfk-2 y Pfk-2* para fructosa-6-P y ATP. Las condiciones experimentales son las descritas en la Fig. 1. A y B, Pfk-2; C y D, Pfk-2*. En A y C la concentración de ATP fue 1,0 mM. En B y D la concentración de fructosa-6-P fue 1,0 mM. Las velocidades iniciales se expresan como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

de la reacción de Pfk-2 y Pfk-2*, se obtuvieron líneas que se intersectaron sobre el eje horizontal, a la izquierda de la ordenada, en gráficas de dobles recíprocos (Figuras 3 y 4). Cuando ATP fue el sustrato variable las gráficas fueron del mismo tipo (Figuras 5 y 6). En todos los casos, las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones fueron lineales y se usaron para calcular las constantes cinéticas que se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

CONSTANTES CINÉTICAS DE Pfk-2 Y Pfk-2*

CONSTANTE	Pfk-2	Pfk-2*
K_m (fructosa-6-P), mM	0,032	0,023
K_m (ATP), mM	0,020	0,038
K_{ia} , mM	0,090	0,040

Estos estudios indican que ambas enzimas presentan un mecanismo en secuencia, el cual se confirmó al obtener una parábola en gráficas de dobles recíprocos (24), para Pfk-2 (Figura 7) y para Pfk-2* (Figura 8), cuando se varió la concentración de ATP y fructosa-6-P en una razón constante.

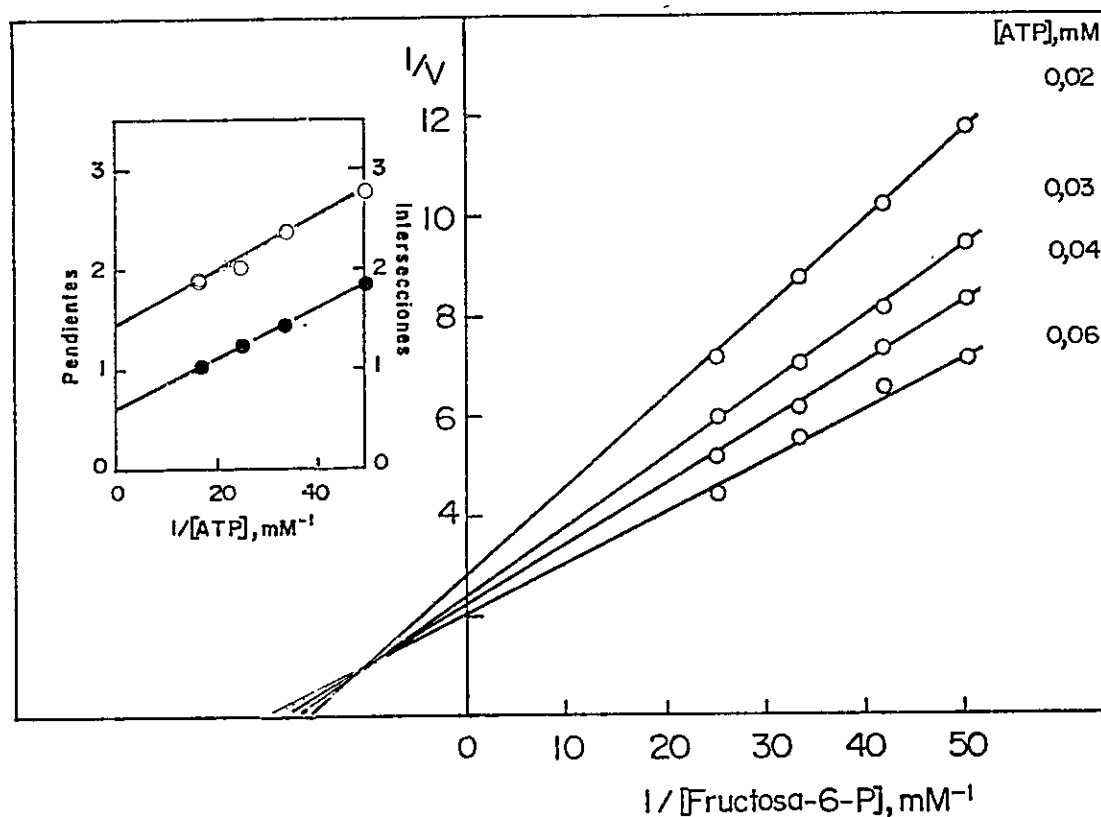


Figura 3. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 cuando fructosa-6-P es el sustrato variable. Las condiciones experimentales son las descritas en la Fig. 1. Las velocidades iniciales se expresan como $A_{340}/\text{min ml}/100$. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de las pendientes e intersecciones en función del recíproco de la concentración de ATP. En el recuadro de esta figura y en el de las que continúan, los valores de las intersecciones y de las pendientes están representados de la siguiente manera: (\circ) intersecciones y (\bullet) pendientes.

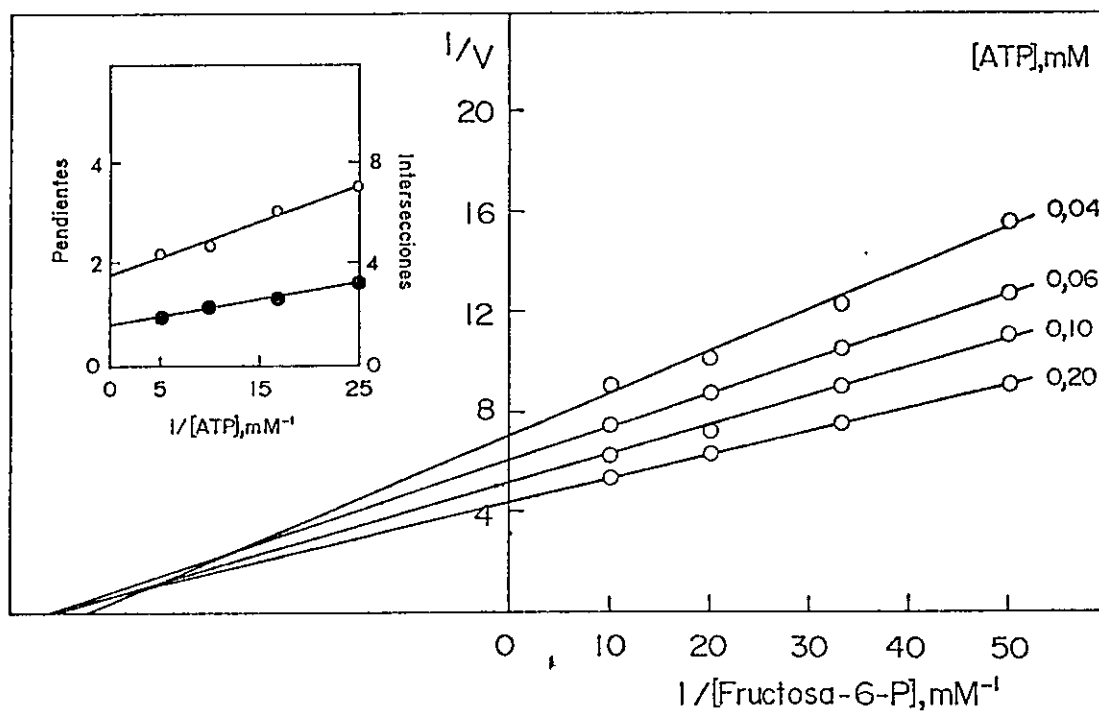


Figura 4. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2* cuando fructosa-6-P es el sustrato variable. Las condiciones experimentales fueron las descritas en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de las pendientes e intersecciones en función del recíproco de la concentración de ATP. Las velocidades iniciales se expresan como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

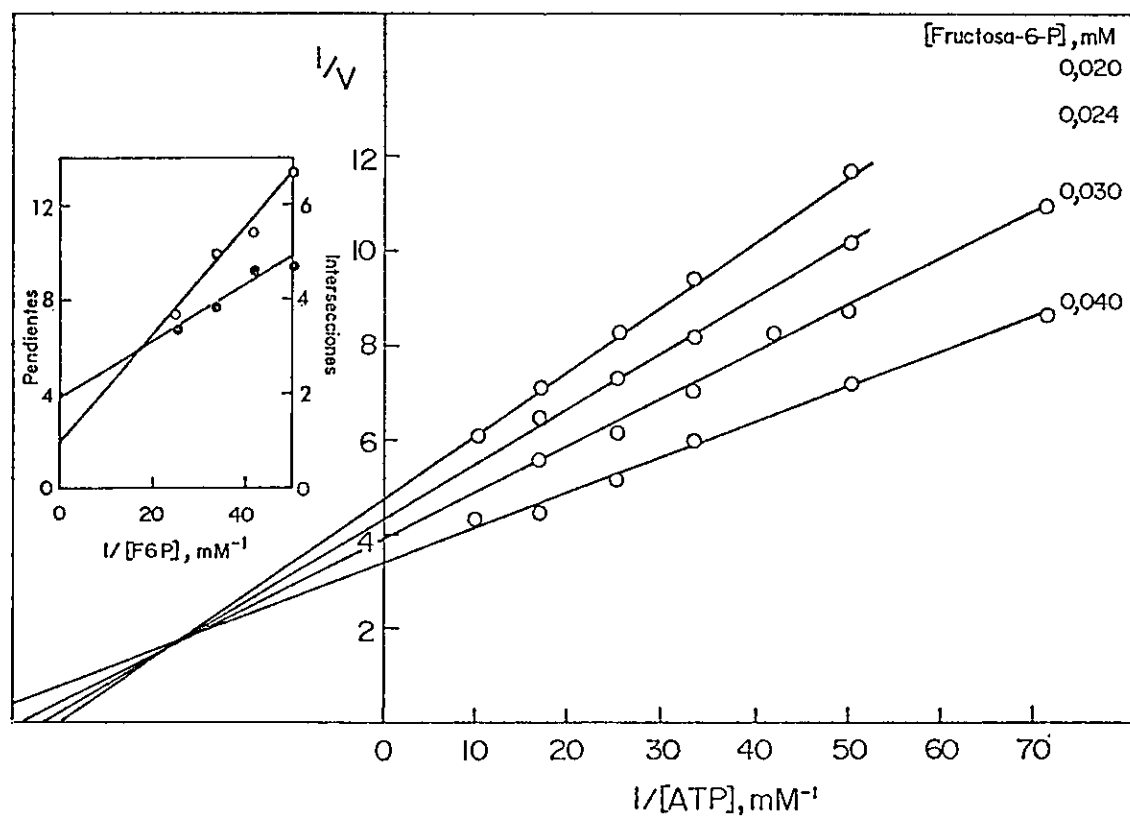


Figura 5. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 cuando ATP es el sustrato variable. Las condiciones experimentales fueron las de la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de las pendientes e intersecciones en función del recíproco de la concentración de fructosa-6-P. Las velocidades iniciales se expresan como $A_{340}/\text{min ml}/100$.

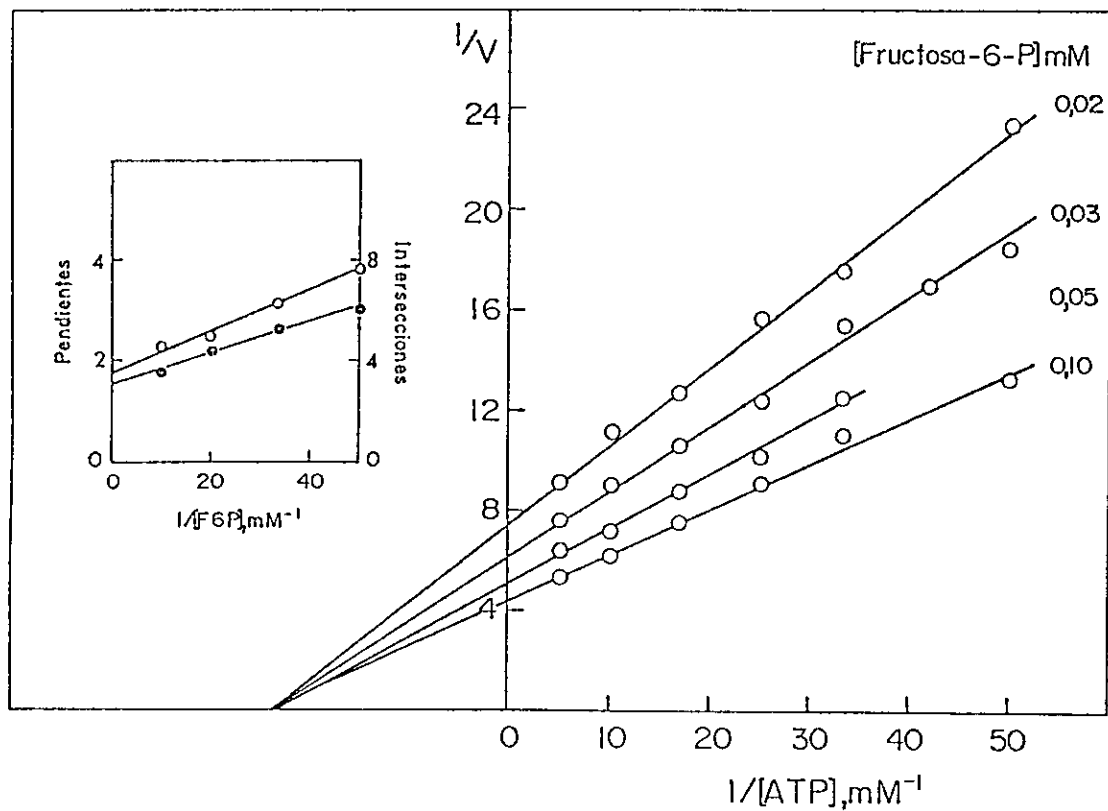


Figura 6. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2* cuando ATP es el sustrato variable. Las condiciones experimentales fueron las de la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de las pendientes e intersecciones en función del recíproco de la concentración de fructosa-6-P. Las velocidades iniciales se expresan como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

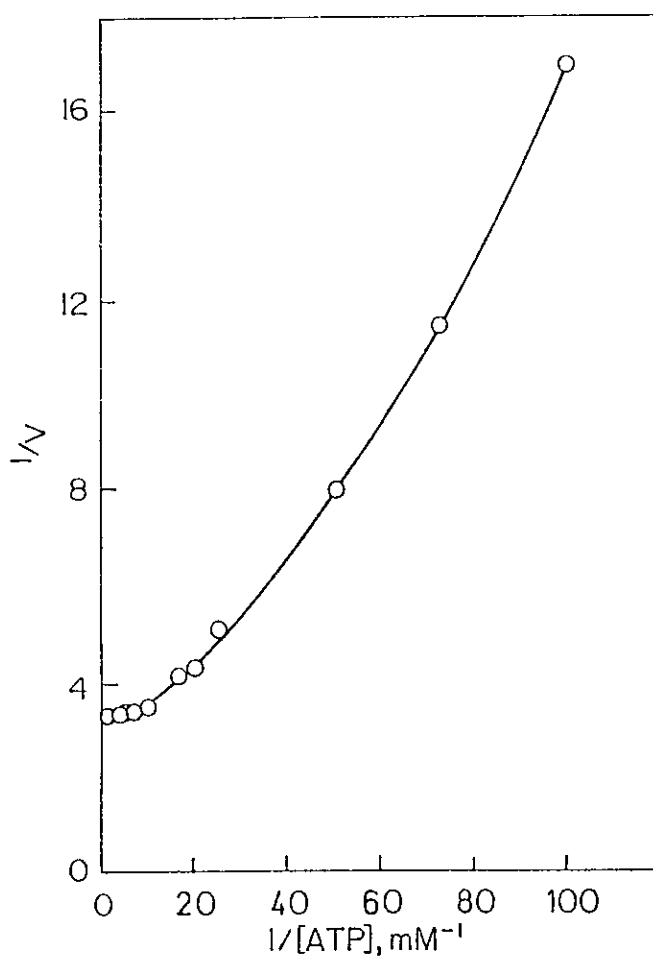


Figura 7. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 donde las concentraciones de ATP y fructosa-6-P se variaron en una razón constante. El medio de reacción es similar al descrito en la Fig. 1. La razón entre la concentración de ATP y fructosa-6-P fue 1,0. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/20$.

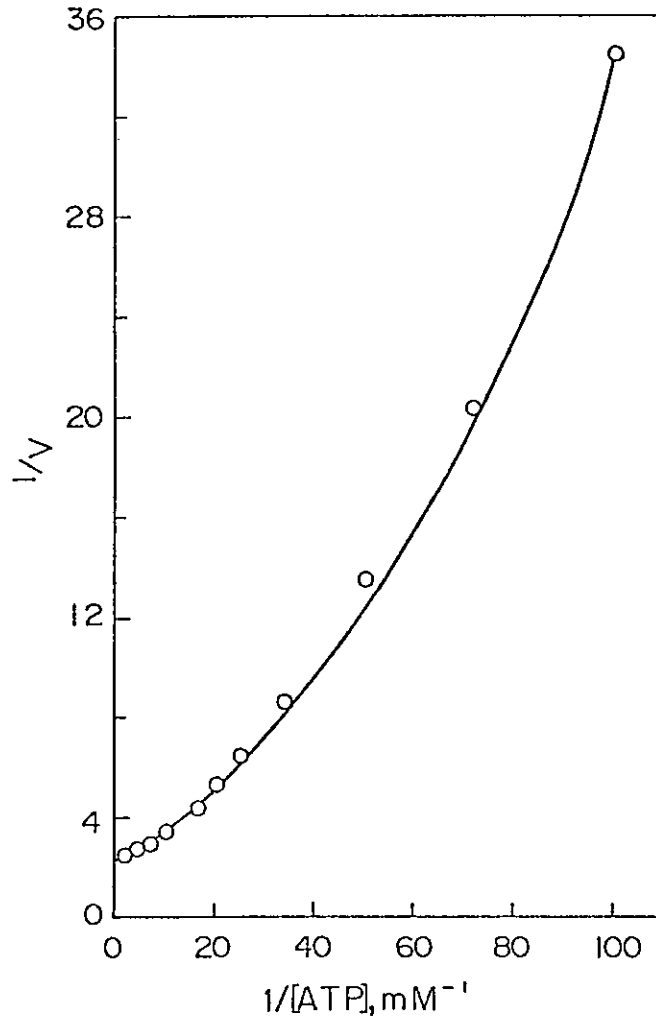


Figura 8. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2* donde las concentraciones de ATP y fructosa-6-P se variaron en una razón constante. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. La razón entre la concentración de ATP y fructosa-6-P fue 1,0. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/25$.

Con el objeto de dilucidar el orden de interacción de los sustratos y los productos con las enzimas, fue necesario realizar estudios de inhibición por los productos de la reacción.

3. ESTUDIOS DE INHIBICION POR LOS PRODUCTOS

Generalmente los productos de una reacción enzimática se comportan como inhibidores de la reacción directa. Estas inhibiciones se pueden analizar en gráficas de dobles recíprocos por variaciones en las pendientes e intersecciones de las rectas.

Inhibición competitiva (C). Sólo se observa variación en las pendientes de las rectas. Este tipo de inhibición puede ser confirmada mediante las transformaciones gráficas de Dixon ($1/V$ en función de $[I]$) (21) y de Cornish-Bowden ($[S]/V$ en función de $[I]$) (22). En el primer caso se obtienen rectas que se intersectan y en el segundo caso las rectas son paralelas.

Inhibición no competitiva (NC). En este caso se obtienen líneas rectas que varían en sus pendientes y en sus intersecciones con el eje de las ordenadas.

Inhibición incompetitiva (I). Sólo se observa variación en las intersecciones de las rectas con el eje de la ordenada, sin cambio en las pendientes de las mismas.

a. Inhibición de Pfk-2 por los productos.

Inhibición por fructosa-1,6-P₂

Al estudiar el efecto de la variación de la concentración de fructosa-1,6-P₂ sobre la velocidad de la reacción, a concentraciones variables de fructosa-6-P (0,02 a 0,20 mM) y a concentración fija de ATP (0,10 mM), se obtuvieron líneas rectas que se intersectaron en un punto de la ordenada en una gráfica de dobles recíprocos (Figura 9). Este resultado corresponde a una inhibición de tipo competitivo, la que fue confirmada por las representaciones gráficas de Dixon (Figura 10 A) y de Cornish-Bowden (Figura 10 B). Las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones en función de la concentración de fructosa-1,6-P₂ resultaron ser lineales (recuadro Figura 9). Este experimento se realizó a varias concentraciones de ATP obteniéndose en todos los casos una inhibición competitiva. Los valores de K_i se resumen en la Tabla 4.

Al realizar experimentos similares de inhibición por fructosa-1,6-P₂, usando ahora ATP como sustrato variable (0,02 a 0,20 mM) y manteniendo fija la concentración de fructosa-6-P (0,10 mM), se obtuvo la gráfica que se muestra en la Figura 11. En este caso las rectas convergen en un punto por encima de la abscisa, lo que indica una inhibición no competitiva. Al usar fructosa-6-P 0,40 mM la inhibición también resultó ser no competitiva.

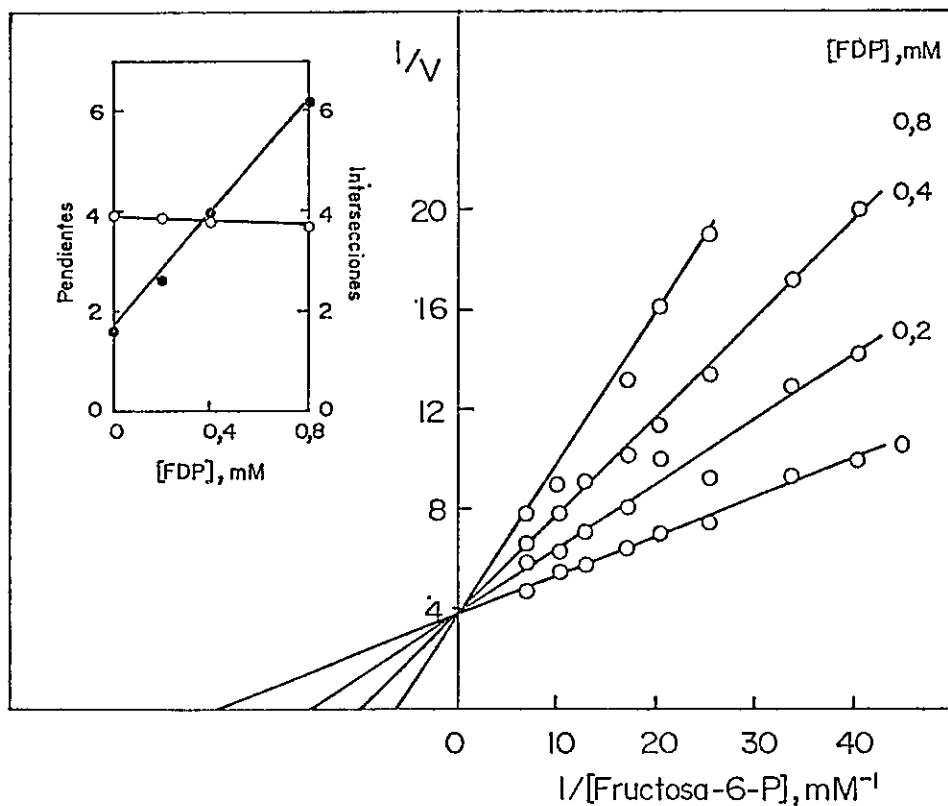


Figura 9. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por fructosa-1,6- P_2 cuando fructosa-6-P es el sustrato variable. La concentración de ATP fue 0,10 mM. El medio de reacción, en un volumen final de 0,5 ml, contenía: Tris-HCl 100 mM, pH 8,2, fosfoenolpiruvato 0,2 mM, MgCl_2 10 mM, NH_4Cl 2 mM, NADH 0,2 mM, 20 μg de piruvatoquinasa y 10 μg de lactatodeshidrogenasa. El recuadro muestra la gráfica secundaria de las pendientes e intersecciones en función de la concentración de fructosa-1,6- P_2 . La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/25$.

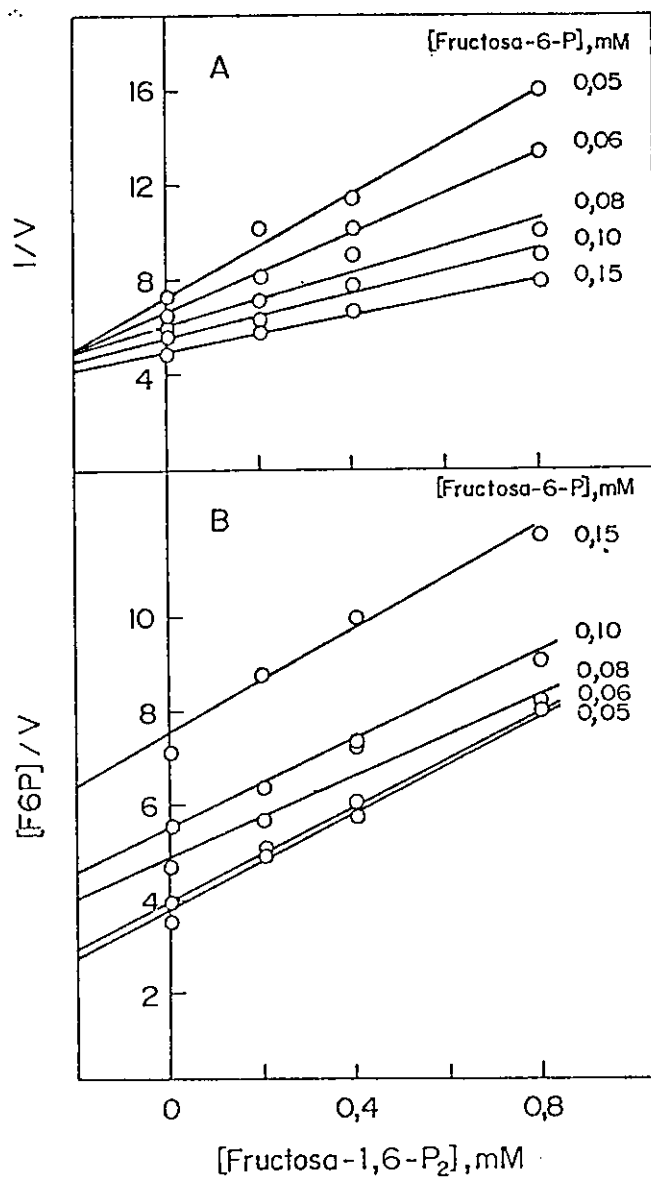


Figura 10. Inhibición de Pfk-2 por fructosa-1,6- P_2 . Gráfica de Dixon (A) y gráfica de Cornish-Bowden (B) correspondiente a los resultados de la Figura 9.

Tabla 4

CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA INHIBICIÓN DE Pfk-2
POR LOS PRODUCTOS

PRODUCTOS	SUSTRATO VARIABLE	SUSTRATO FIJO (mM)	K_i (mM)
FDP	F6P	ATP 0,10	0,24
		0,20	0,17
		0,40	0,15
		0,80	0,19
FDP	ATP	F6P 0,10	0,27
		0,40	2,03
		2,0	— ^a
ADP	ATP	F6P 0,05	1,0
		1,0	0,83
ADP	F6P	ATP 0,10	3,6

a. No hubo inhibición.

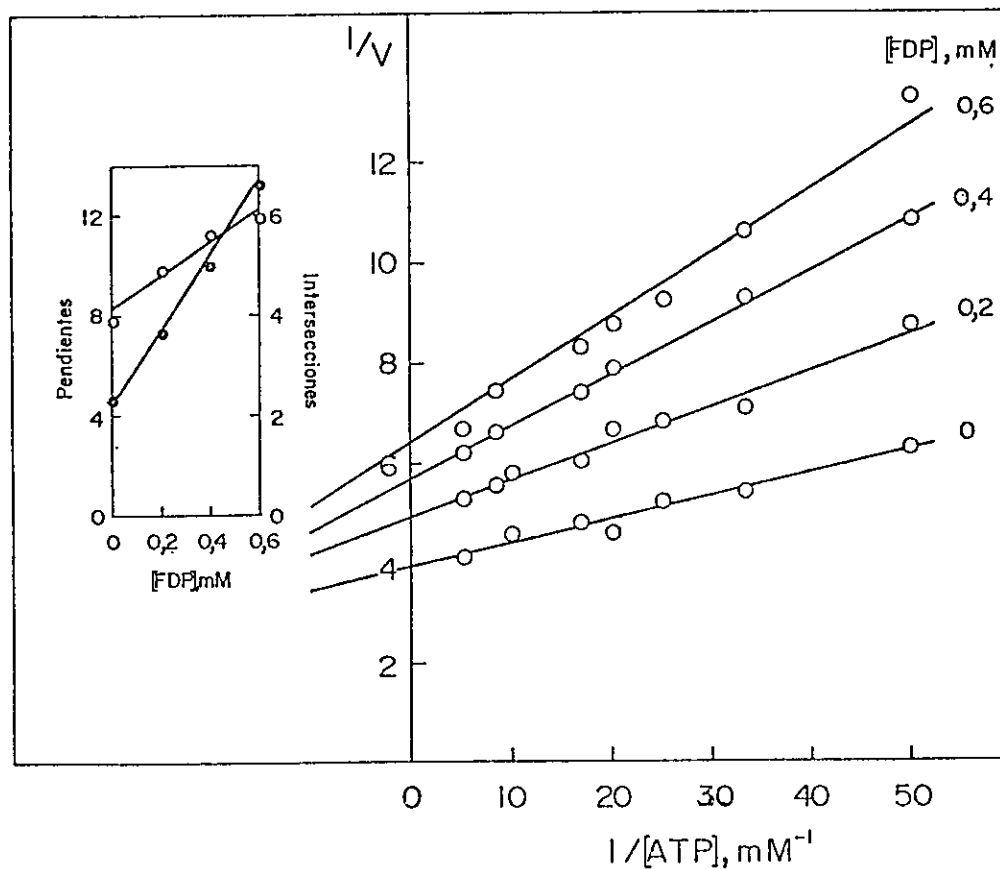


Figura 11. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por fructosa-1,6- P_2 cuando ATP es el sustrato variable a una concentración subsaturante de fructosa-6-P (0,10 mM). El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 9. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de las pendientes e intersecciones en función de la concentración de fructosa-1,6- P_2 . La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

Cuando la inhibición por fructosa-1,6-P₂ se estudió a una concentración saturante de fructosa-6-P (60 veces el valor de su K_m verdadera) y la concentración de ATP se varió entre 0,008 y 0,08 mM, no se obtuvo inhibición (Figura 12).

Las constantes de inhibición se obtuvieron de las gráficas secundarias (Tabla 4).

Inhibición por ADP

Cuando se estudió el efecto de la concentración de ADP sobre la velocidad de la reacción usando como sustrato variable ATP (0,03 a 0,20 mM) a una concentración fija de fructosa-6-P (0,05 mM), se obtuvo una inhibición no competitiva (Figura 13). La inhibición fue del mismo tipo cuando el experimento se realizó a una concentración de fructosa-6-P de 1,0 mM (no se muestra).

Al estudiar la inhibición por ADP usando ahora fructosa-6-P como sustrato variable (0,015 a 0,10 mM) la inhibición fue no competitiva (Figura 14).

b. Inhibición de Pfk-2* por los productos.

Inhibición por ADP

La Figura 15 muestra la gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por ADP usando ATP como sustrato variable (0,030-0,20 mM). En este caso las rectas se intersectaron en un

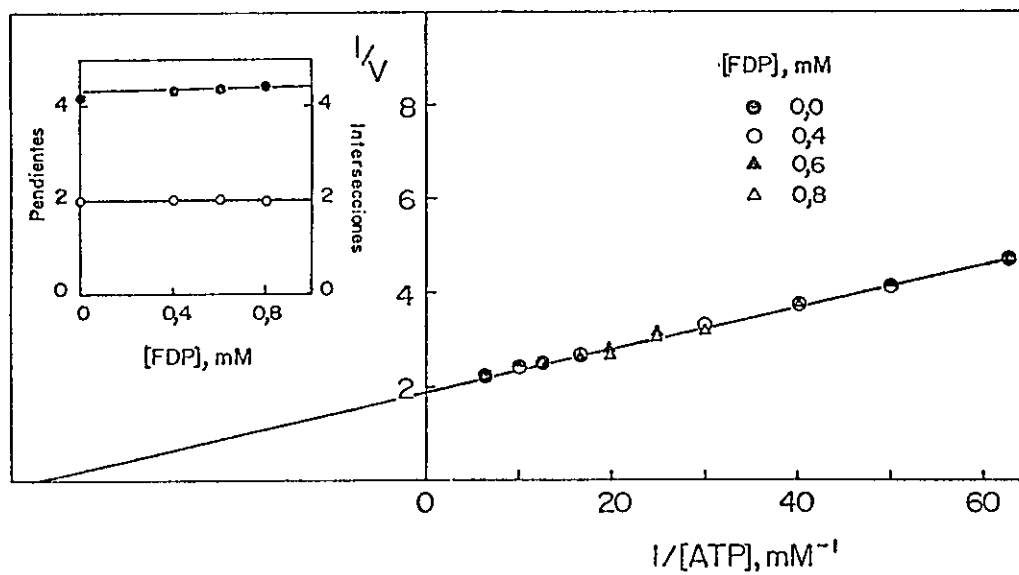


Figura 12. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por fructosa-1,6-P₂ cuando ATP es el sustrato variable a una concentración saturante de fructosa-6-P (2,0 mM). El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 9. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de las pendientes e intersecciones en función de la concentración de fructosa-1,6-P₂. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/100$.

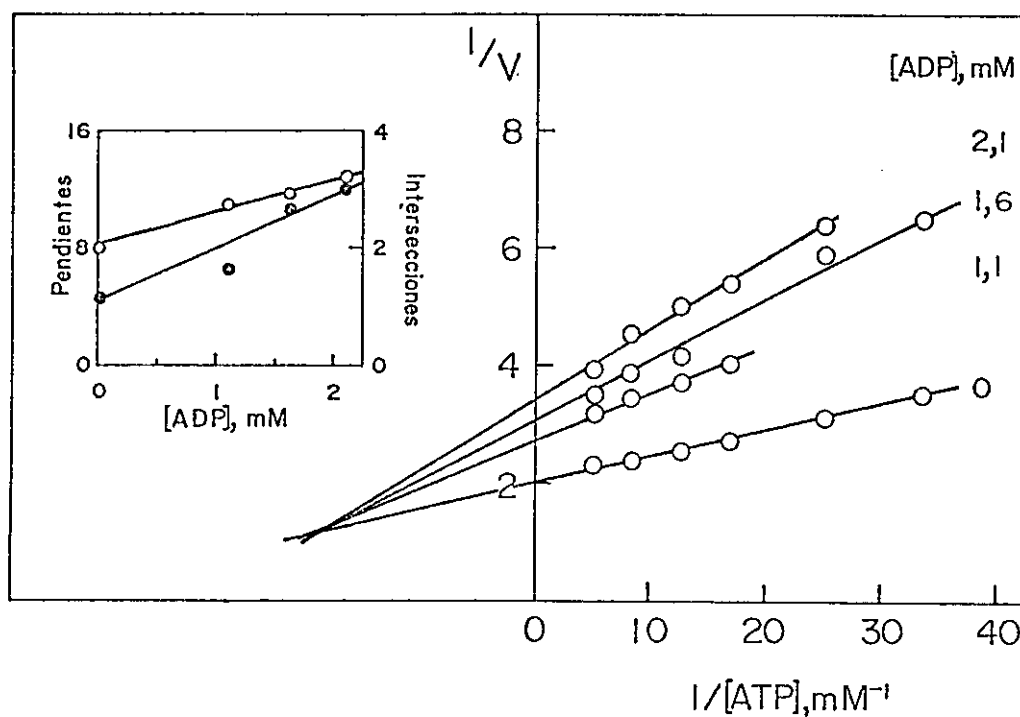


Figura 13. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por ADP usando ATP como sustrato variable. La concentración de fructosa-6-P fue 0,05 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de ATP. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

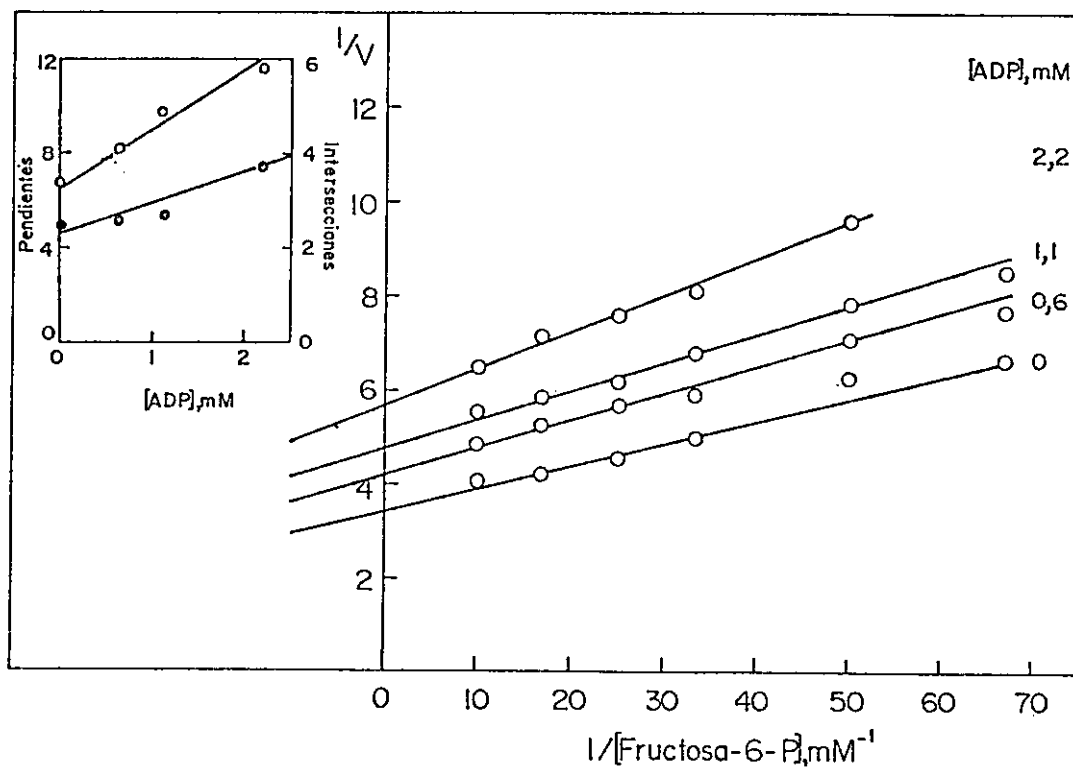


Figura 14. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por ADP usando fructosa-6-P como sustrato variable. La concentración de ATP fue 0,10 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de ADP. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

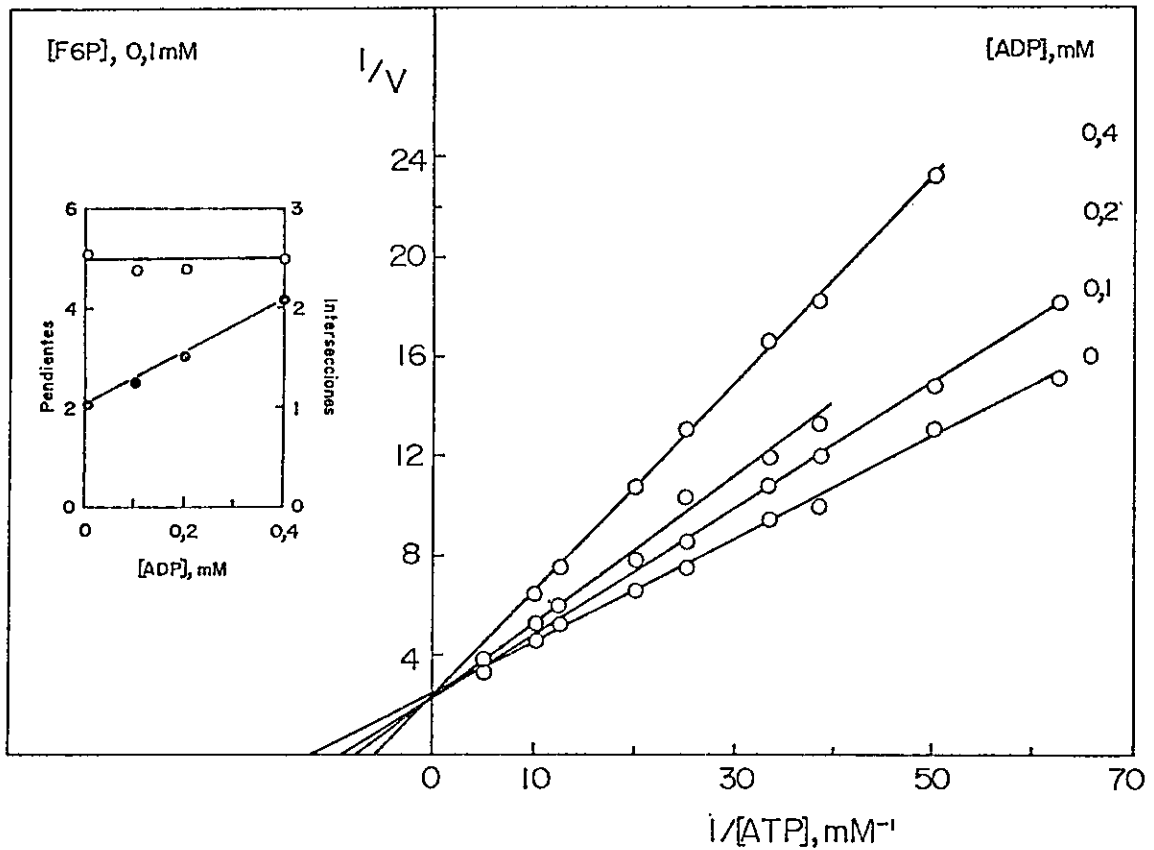


Figura 15. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por ADP cuando ATP es el sustrato variable. La concentración de fructosa-6-P fue 0,05 mM. El medio de reacción es similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de ADP. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

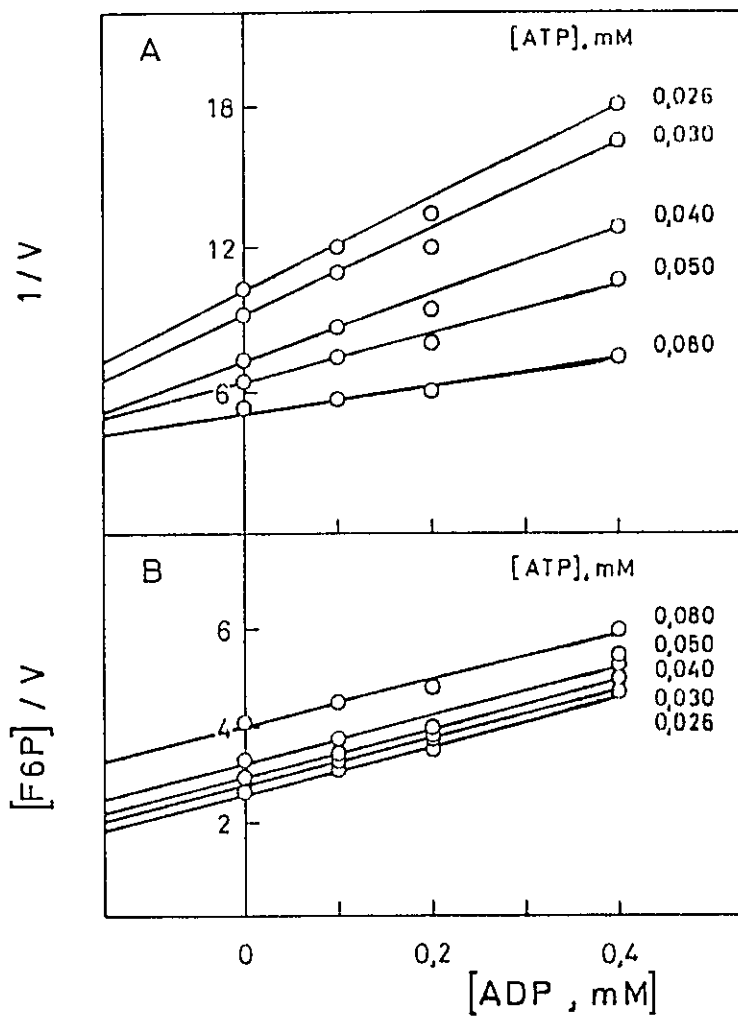


Figura 16. Inhibición de Pfk-2* por ADP. Gráfica de Dixon (A) y gráfica de Cornish-Bowden (B) correspondiente a los resultados presentados en la Fig. 15.

punto en el eje de las ordenadas, lo que indica una inhibición competitiva. Este resultado fue confirmado mediante las transformaciones gráficas de Dixon (Figura 16 A) y de Cornish-Bowden (Figura 16 B). Al efectuar este experimento a diferentes concentraciones fijas de fructosa-6-P no se observó cambio en el tipo de inhibición (no se muestra). Los valores de K_i se resumen en la Tabla 5.

Cuando la inhibición por ADP se estudió usando fructosa-6-P como sustrato variable (0,02-0,10 mM) a una concentración fija de ATP (0,08 mM), la inhibición resultó ser no competitiva (Figura 17). No se observó inhibición cuando la concentración de ATP fue aproximadamente 25 veces el valor de su K_m verdadera (Figura 18).

Inhibición por fructosa-1,6-P₂

Al estudiar la inhibición de fructosa-1,6-P₂ con respecto a fructosa-6-P (0,025-0,15 mM) a ATP 0,10 mM (Figura 19) y 1,0 mM (no se muestra), se obtuvo inhibición no competitiva. Cuando se usó ATP como sustrato variable (0,014-0,20 mM) a una concentración de fructosa-6-P de 0,10 mM, las rectas de las gráficas de dobles recíprocos se intersectaron en el segundo cuadrante, indicando una inhibición no competitiva (Figura 20). Cuando la concentración de fructosa-6-P fue 1,0 mM las rectas resultaron paralelas (Figura 21), lo que indica inhibición incompetitiva. Esto fue confirmado por las transformaciones gráficas de Dixon y de Cornish-Bowden (no se muestran).

Tabla 5
 CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA INHIBICIÓN DE Pfk-2*
 POR LOS PRODUCTOS

PRODUCTOS	SUSTRATO VARIABLE	SUSTRATO FIJO (mM)	K_i (mM)
ADP	ATP	F6P 0,10	0,37
		0,50	0,26
		1,0	0,37
ADP	F6P	ATP 0,08	4,1
		1,0	— ^a
FDP	F6P	ATP 0,10	0,22
FDP	ATP	F6P 0,10	0,44
		1,0	

a. No hubo inhibición.

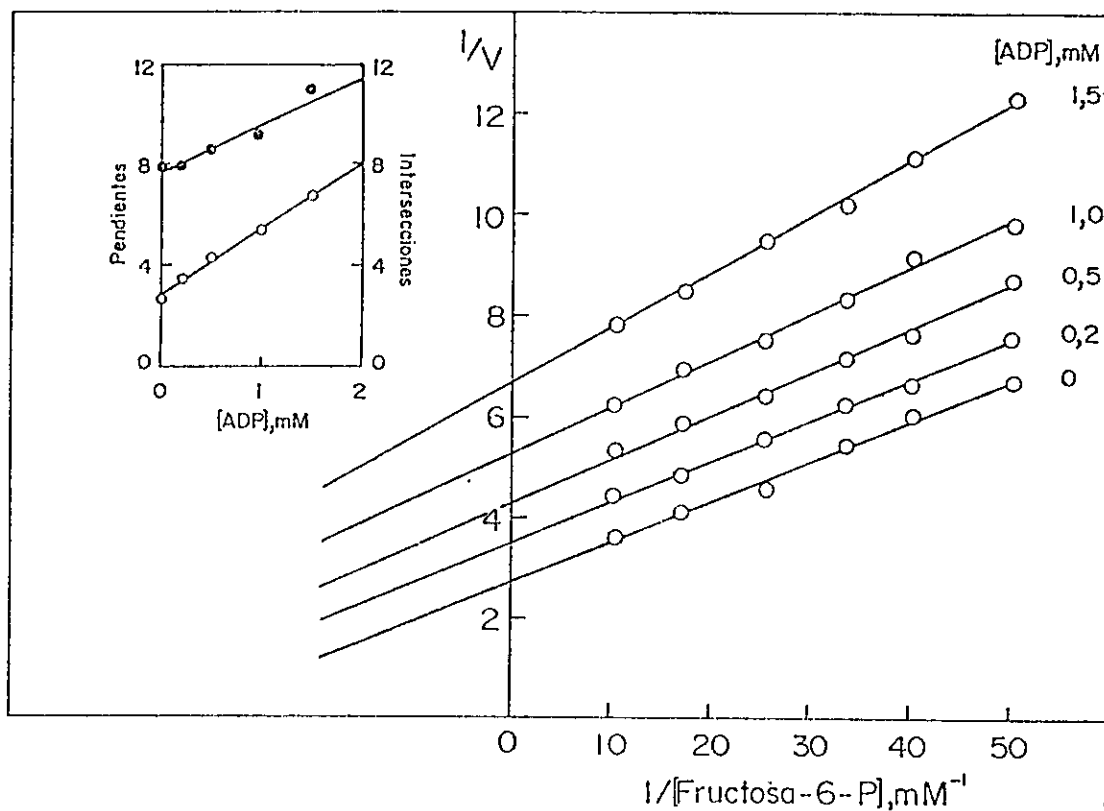


Figura 17. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por ADP cuando fructosa-6-P es el sustrato variable a una concentración subsaturante de ATP (0,08 mM). El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig.1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de ADP. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/25$.

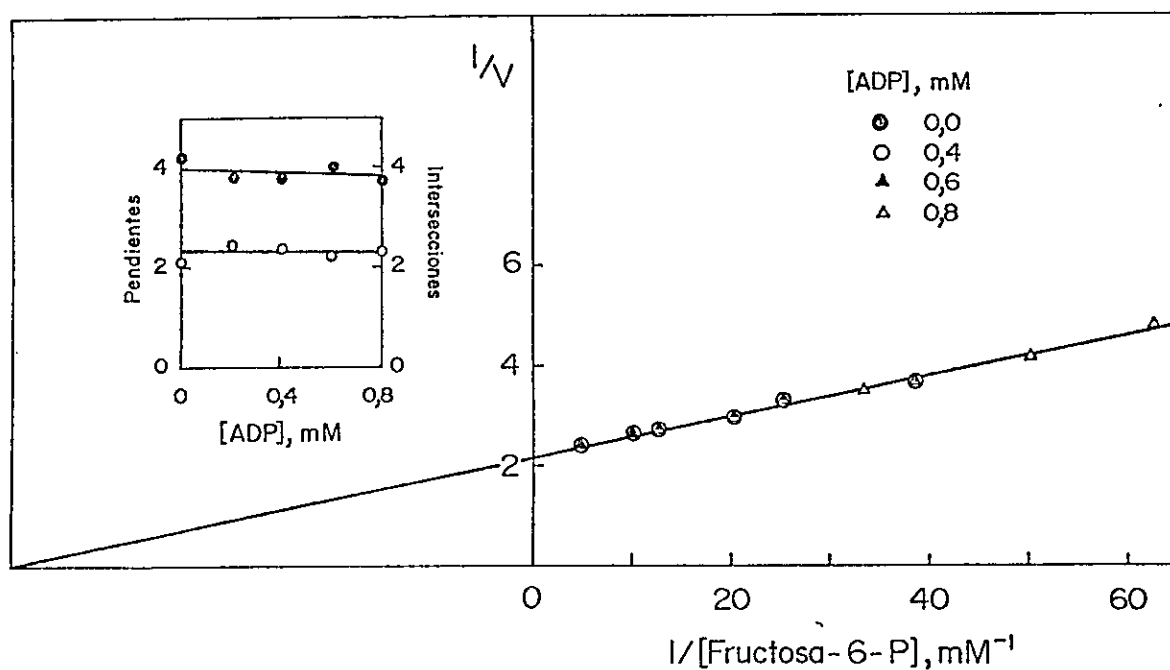


Figura 18. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por ADP cuando fructosa-6-P es el sustrato variable a una concentración saturante de ATP (1,0 mM). El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de ADP. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/25$.

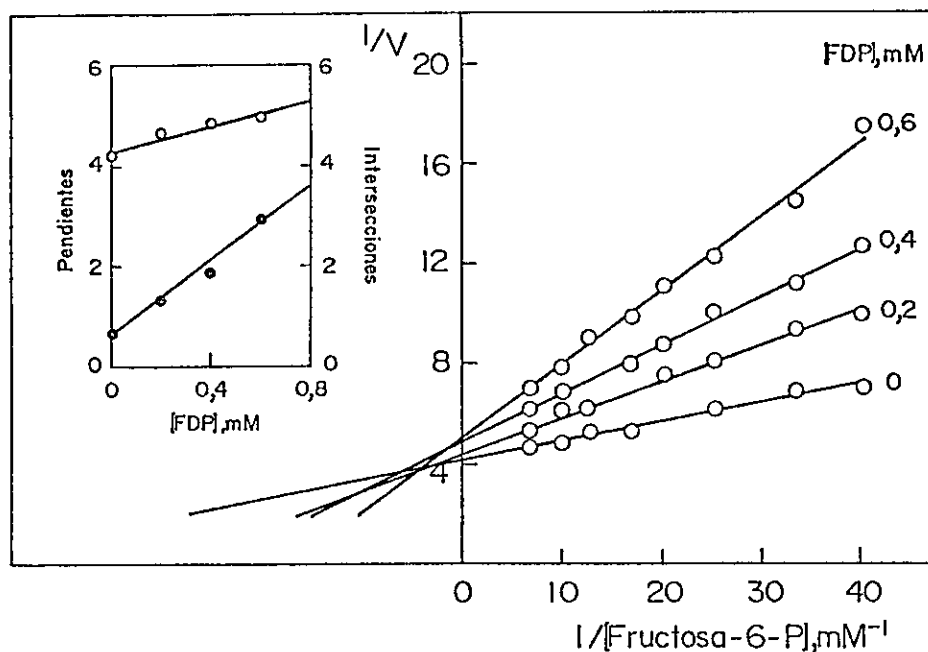


Figura 19. Gráfica de dobles recíprocos para inhibición de Pfk-2* por fructosa-1,6-P₂ cuando fructosa-6-P es el sustrato variable. La concentración de ATP fue 0,10 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 9. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de fructosa-1,6-P₂. La actividad enzimática se expresa como A₃₄₀/min ml/50.

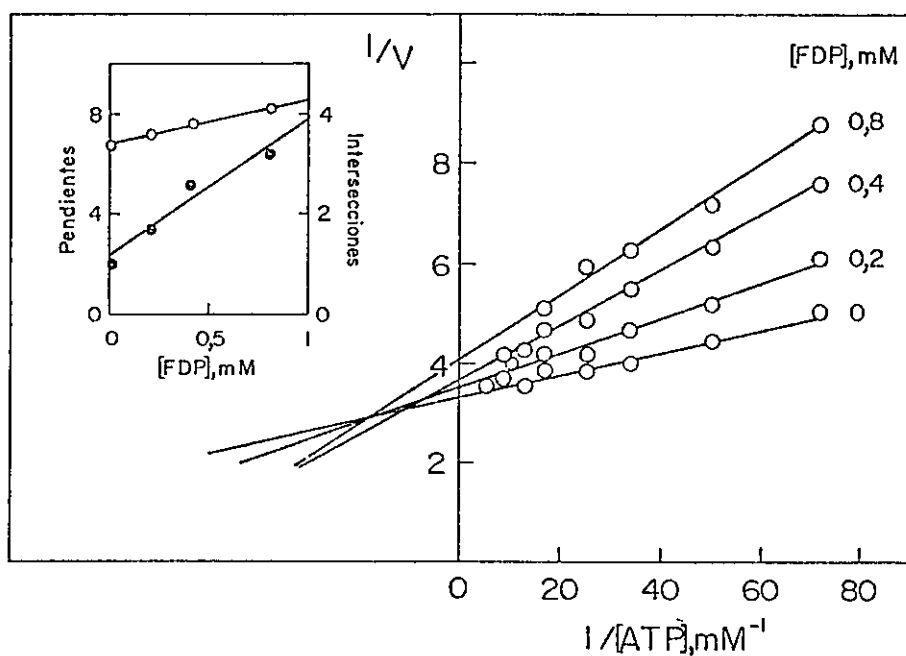


Figura 20. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por fructosa-1,6-P₂ cuando ATP es el sustrato variable a una concentración subsaturante de fructosa-6-P (0,10 mM). El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 9. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de fructosa-1,6-P₂. La actividad enzimática se expresa como A₃₄₀/min ml/20.

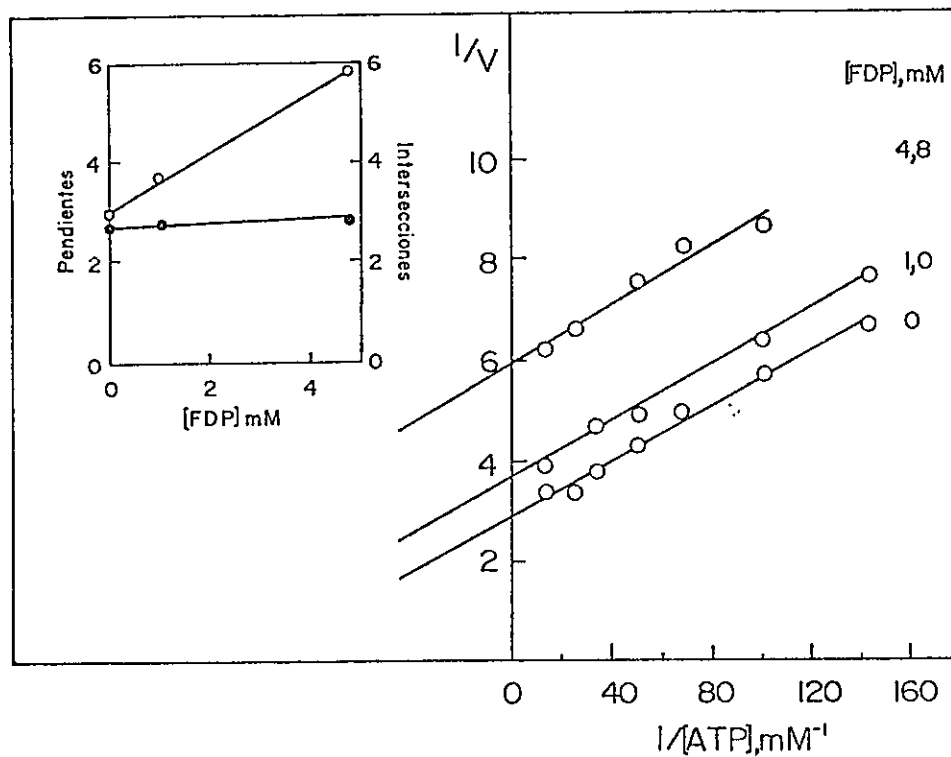


Figura 21. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por fructosa-1,6-P₂ cuando ATP es el sustrato variable a una concentración saturante de fructosa-6-P (1,0 mM). El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 9. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de fructosa-1,6-P₂. La actividad enzimática se expresa como A₃₄₀/min ml/50.

Para Pfk-2 y Pfk-2* las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones obtenidas de los experimentos de inhibición por producto (recuadro de las respectivas figuras), resultaron lineales.

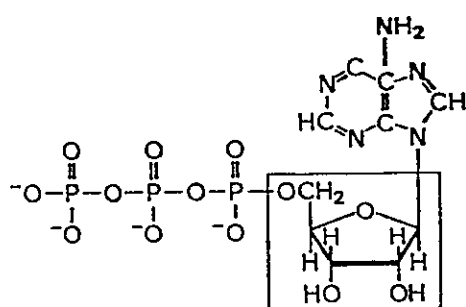
4. ESTUDIOS DE INHIBICION POR ANALOGOS DE LOS SUSTRATOS

Estos compuestos no son sustratos de la enzima y habitualmente tienen estructuras semejantes a ellos, pudiendo formar complejos reversibles con una o más formas de enzima, los que se denominan complejos de punto muerto. Los estudios de inhibición por análogos de los sustratos permiten distinguir entre un mecanismo en secuencia ordenada y uno en secuencia al azar y permiten incluso averiguar el orden de entrada de los sustratos en el caso de un mecanismo en secuencia ordenada (25).

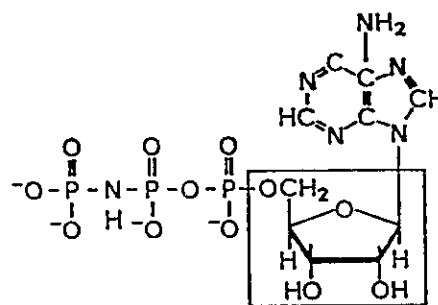
Se usó AMP-PNP (adenililimidodifosfato) (26) como análogo de ATP para Pfk-2 y Pfk-2* (ver esquema 1). Como análogo de fructosa-6-P se usó ribosa-5-P en el caso de Pfk-2 y sorbitol-6-P en el caso de Pfk-2* (ver esquema 2). No se detectó actividad enzimática con ninguno de estos compuestos al usarlos como sustratos a concentraciones de 1 mM y 10 mM.

Esquema 1

ANALOGO DE ATP PARA PFK 2 Y PFK 2*



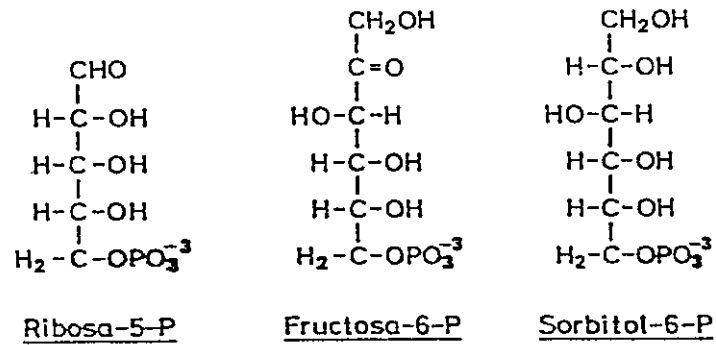
Adenosin trifosfato
(ATP)



Adenilimidodifosfato
(AMP-PNP)

Esquema 2

ANALOGOS DE FRUCTOSA-6-P PARA PFK-2 Y PFK-2*



a. Inhibición de Pfk-2 por los análogos

Inhibición por AMP-PNP

Al estudiar la inhibición por AMP-PNP usando como sustrato variable ATP (0,01 a 0,08 mM) a fructosa-6-P 0,10 mM, las rectas de las gráficas de dobles recíprocos se intersectaron en un punto en la ordenada, característica de una inhibición competitiva (Figura 22). Este tipo de inhibición se confirmó al hacer las transformaciones gráficas de Dixon y Cornish-Bowden con los datos obtenidos. Cuando fructosa-6-P fue el sustrato variable (0,08 a 0,10 mM) y la concentración de ATP se mantuvo constante (0,10 mM), la inhibición fue incompetitiva (Figura 23).

Inhibición por ribosa-5-P

Ribosa-5-P resultó ser inhibidor competitivo de fructosa-6-P (Figura 24) cuando la concentración de éste se varió entre 0,02 y 0,10 mM, a una concentración fija de ATP (0,10 mM). Nuevamente las transformaciones gráficas de Dixon y de Cornish-Bowden de los datos experimentales apoyan este tipo de inhibición.

En un experimento similar la inhibición fue de tipo no competitivo cuando se usó ATP como sustrato variable (0,014 a 0,16 mM) a una concentración constante de fructosa-6-P (0,05 mM) (Figura 25).

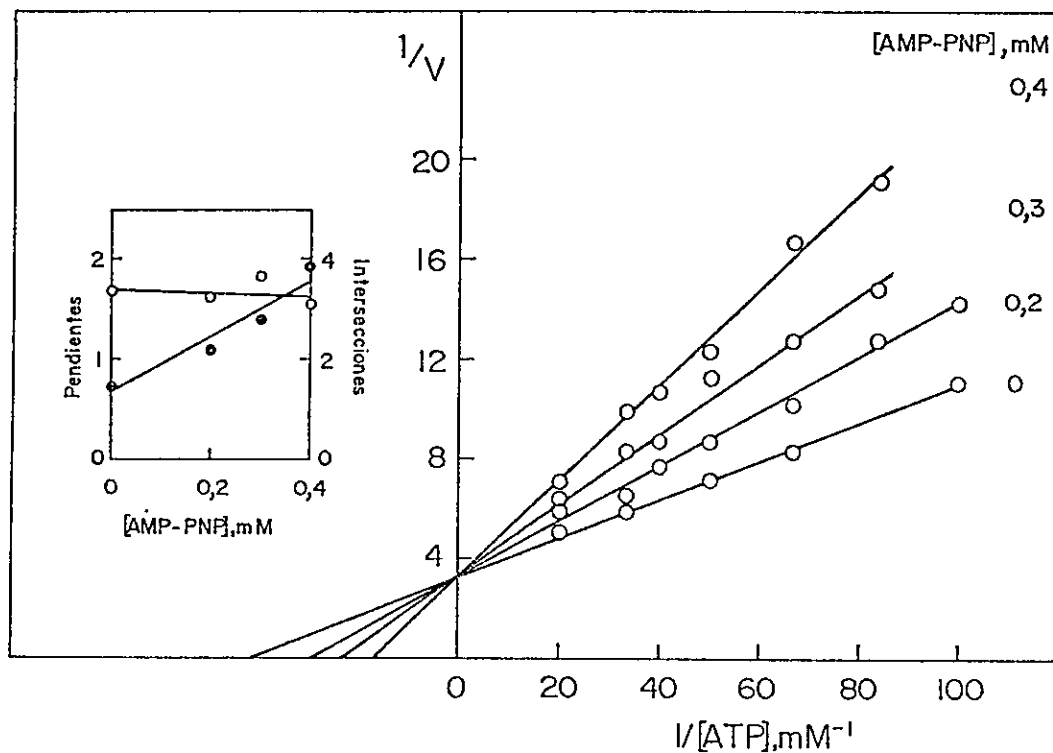


Figura 22. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por AMP-PNP cuando ATP es el sustrato variable. La concentración de fructosa-6-P fue 0,10 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de AMP-PNP. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/20$.

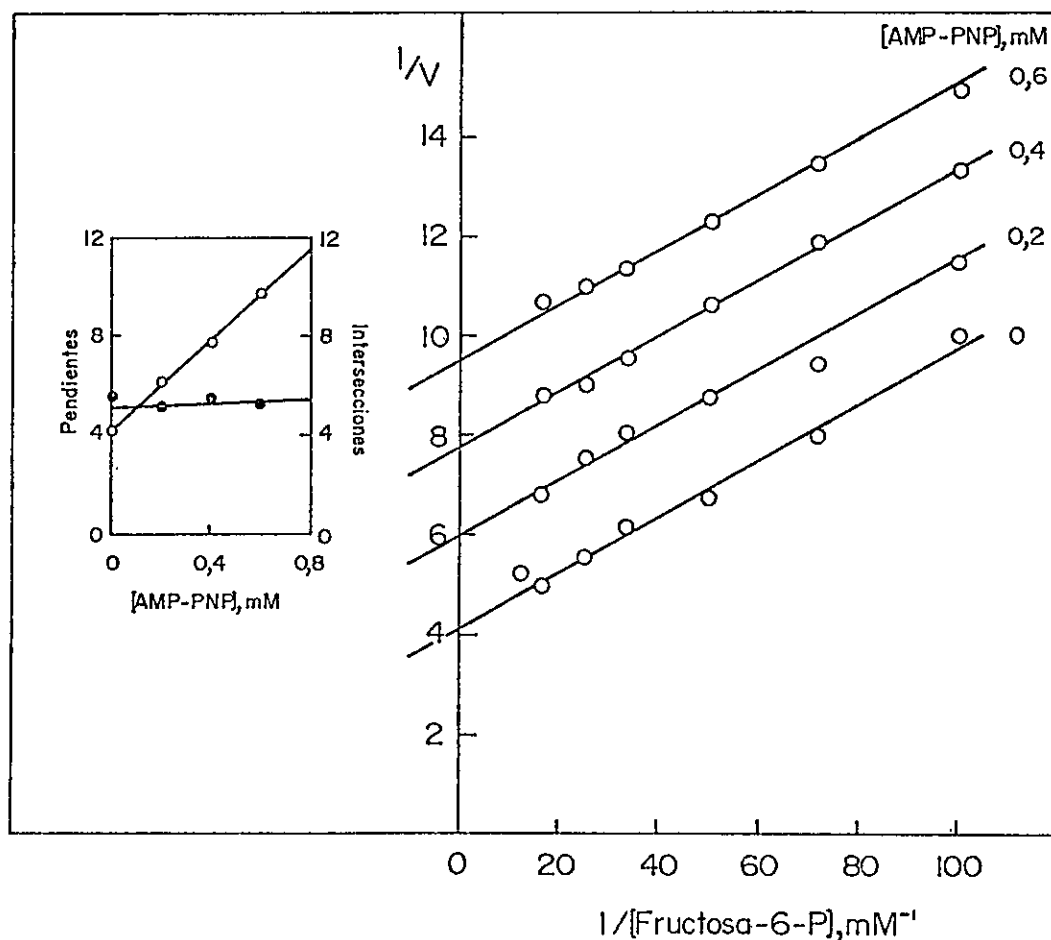


Figura 23. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por AMP-PNP cuando fructosa-6-P es el sustrato variable. La concentración ATP fue 0,10 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de AMP-PNP. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/20$.

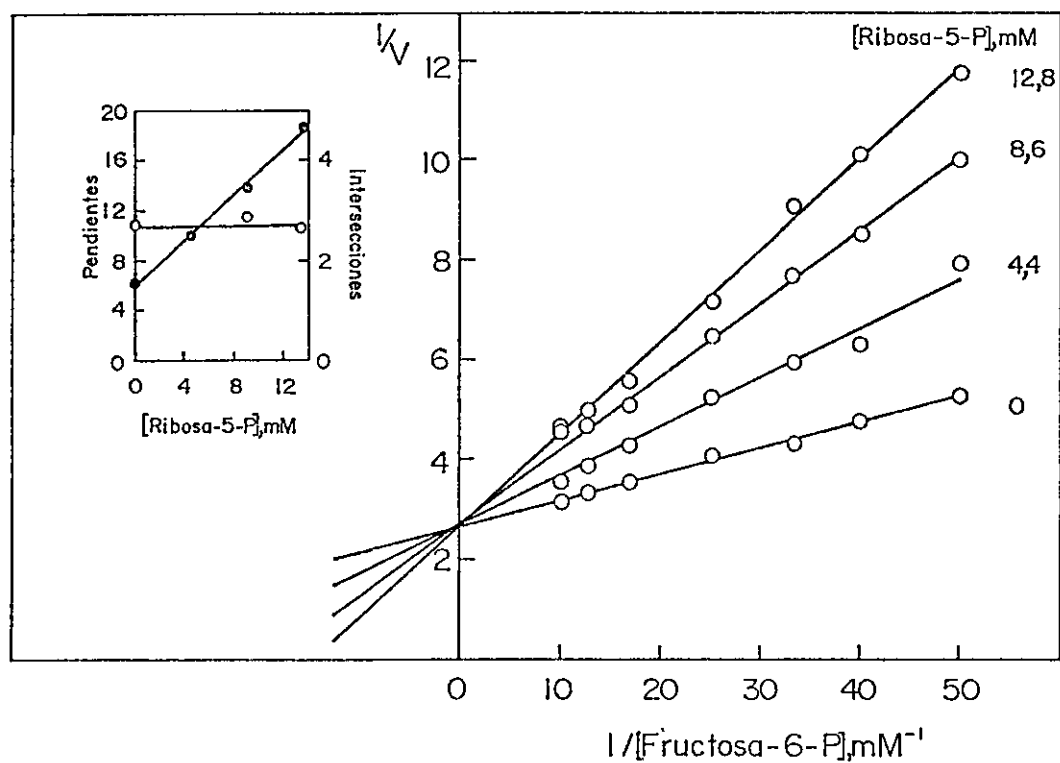


Figura 24. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por ribosa-5-P cuando fructosa-6-P es el sustrato variable. La concentración de ATP fue 0,10 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de ribosa-5-P. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

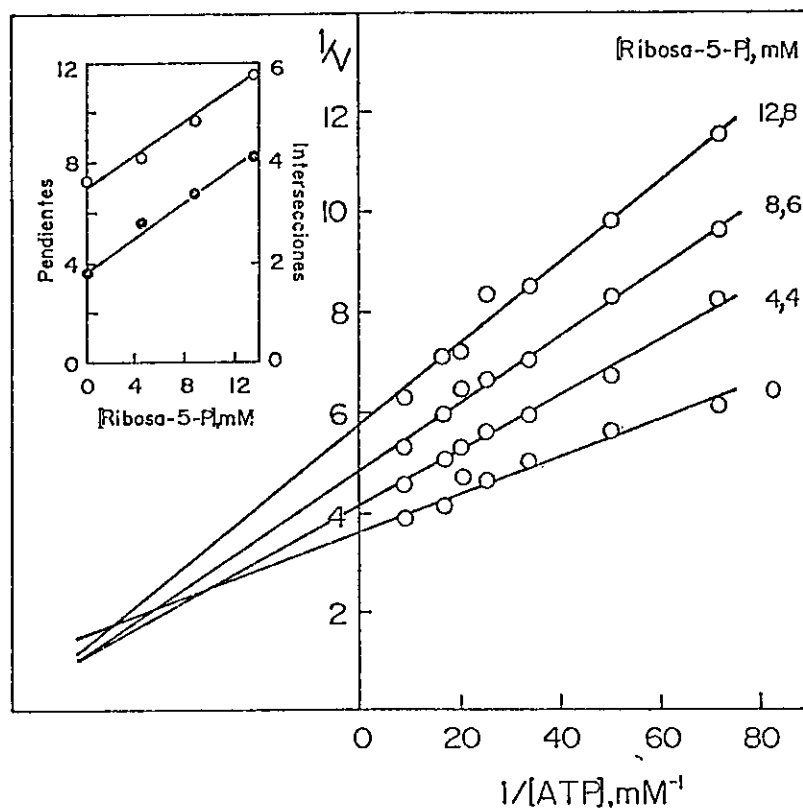


Figura 25. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 por ribosa-5-P cuando ATP es el sustrato variable. La concentración de fructosa-6-P fue 0,05 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de ribosa-5-P. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

Las constantes para la inhibición de Pfk-2 por AMP-PNP y ribosa-5-P se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6
CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA INHIBICIÓN DE Pfk-2
POR ANALÓGOS DE LOS SUSTRATOS

ANALOGO	SUSTRATO VARIABLE	SUSTRATO FIJO (mM)	K_i (mM)
AMP-PNP	ATP	F6P 0,10	0,25
AMP-PNP	F6P	ATP 0,10	
Ribosa-5-P	F6P	ATP 0,10	5,3
Ribosa-5-P	ATP	F6P 0,05	11,0

b. Inhibición de Pfk-2* por los análogos

Inhibición por AMP-PNP

Como se muestra en la Figura 26, AMP-PNP resultó ser un inhibidor competitivo cuando se usó ATP como sustrato variable (0,024 a 0,20 mM) a una concentración de fructosa-6-P de 0,10 mM. Este resultado se confirmó mediante las transformaciones gráficas de Dixon y de Cornish-Bowden. Cuando se usó fructosa-6-P como sustrato variable (0,02 a 0,10 mM) a ATP 0,10 mM, las rectas de las gráficas de dobles recíprocos se intersectaron en el

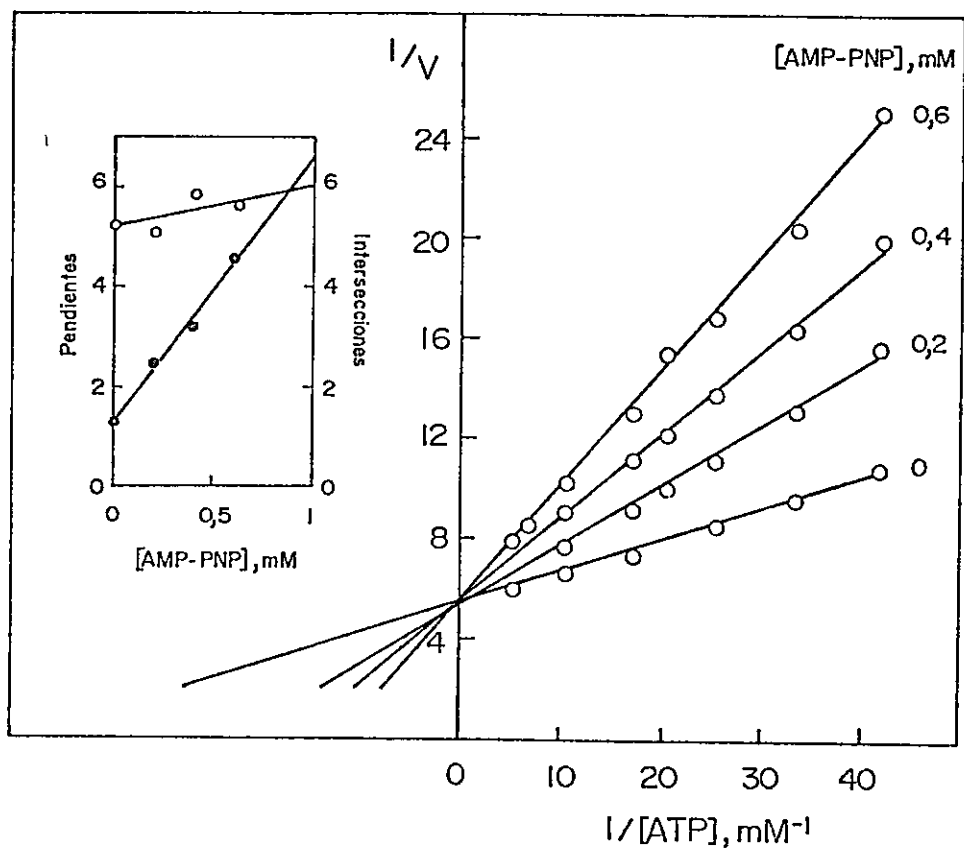


Figura 26. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por AMP-PNP cuando ATP es el sustrato variable. La concentración de fructosa-6-P fue 0,10 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de AMP-PNP. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

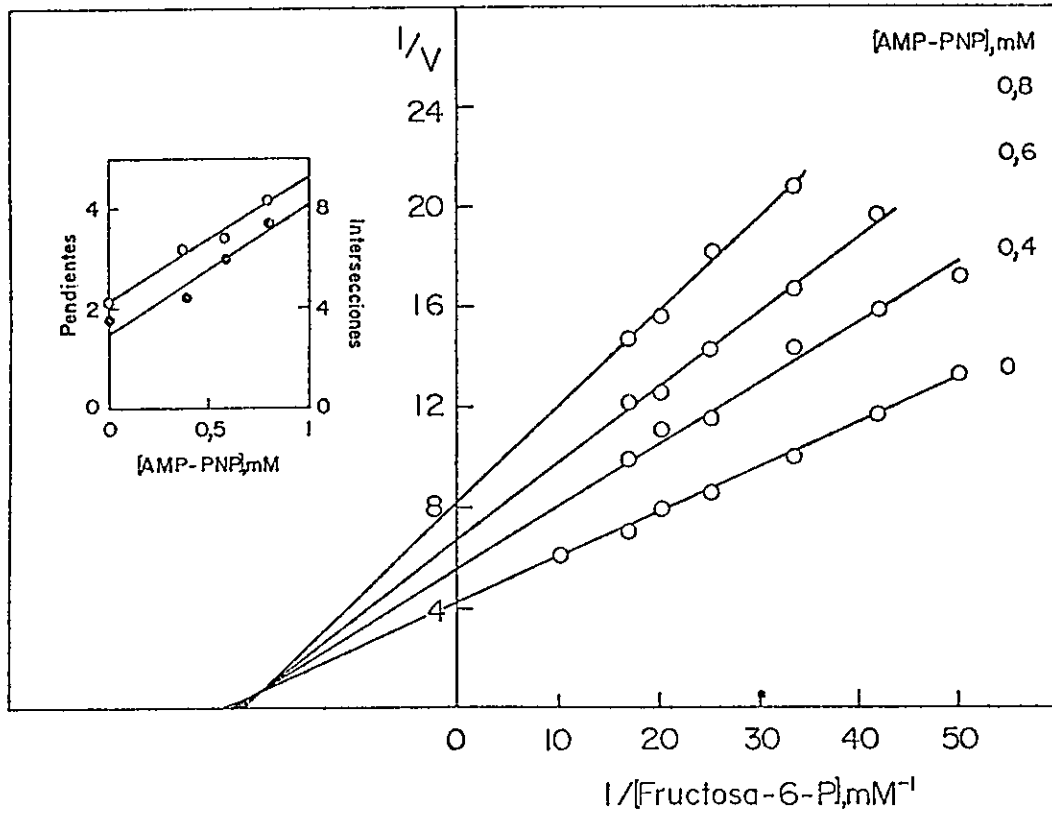


Figura 27. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por AMP-PNP cuando fructosa-6-P es el sustrato variable. La concentración de ATP fue 0,10 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de AMP-PNP. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

segundo cuadrante (Figura 27), indicando una inhibición no competitiva.

Inhibición por sorbitol-6-P

La inhibición por sorbitol-6-P de Pfk-2* al usar fructosa-6-P como sustrato variable (0,02 a 0,10 mM) a ATP 0,10 mM, resultó ser competitiva (Figura 28). Este tipo de inhibición se confirmó mediante las transformaciones gráficas de Dixon y de Cornish-Bowden. Al realizar un experimento similar variando ATP (0,03 a 0,20 mM) a una concentración constante de fructosa-6-P (0,05 mM) se obtuvieron rectas paralelas en una gráfica de dobles recíprocos (Figura 29), lo que indica una inhibición incompetitiva. Las constantes de inhibición de Pfk-2* por los análogos de los sustratos se resumen en la Tabla 7.

Como se muestra en cada figura, las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones de los estudios de inhibición por análogos de los sustratos, fueron lineales.

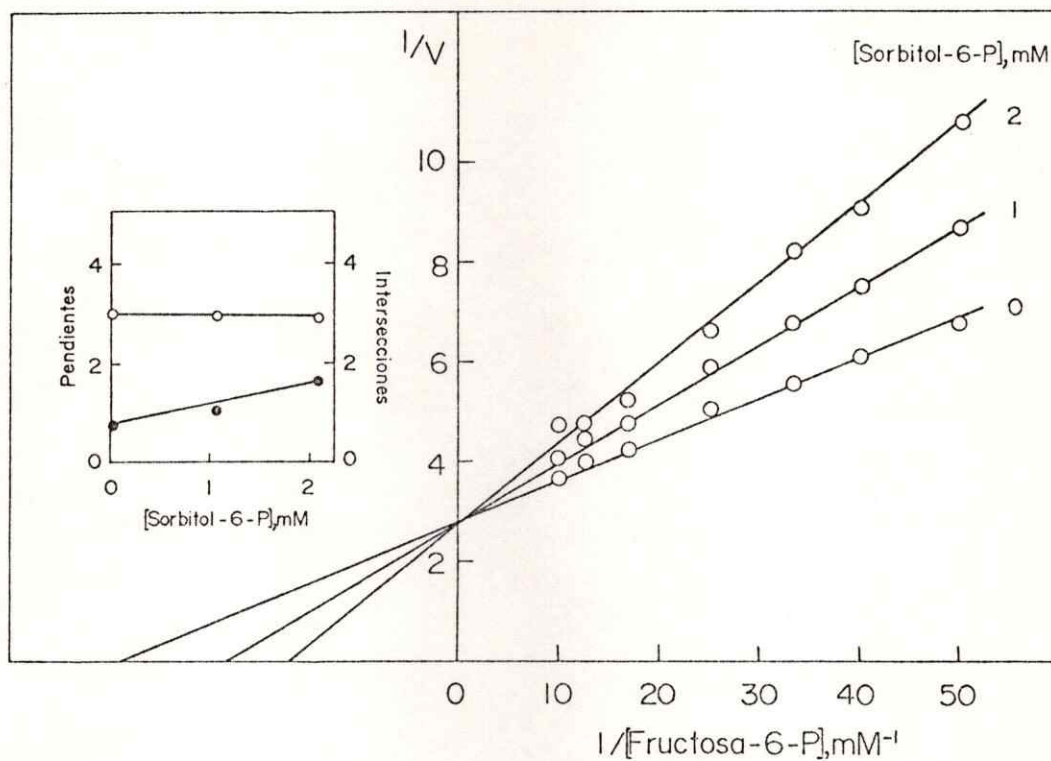


Figura 28. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por sorbitol-6-P cuando fructosa-6-P es el sustrato variable. La concentración de ATP fue 0,10 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de sorbitol-6-P. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

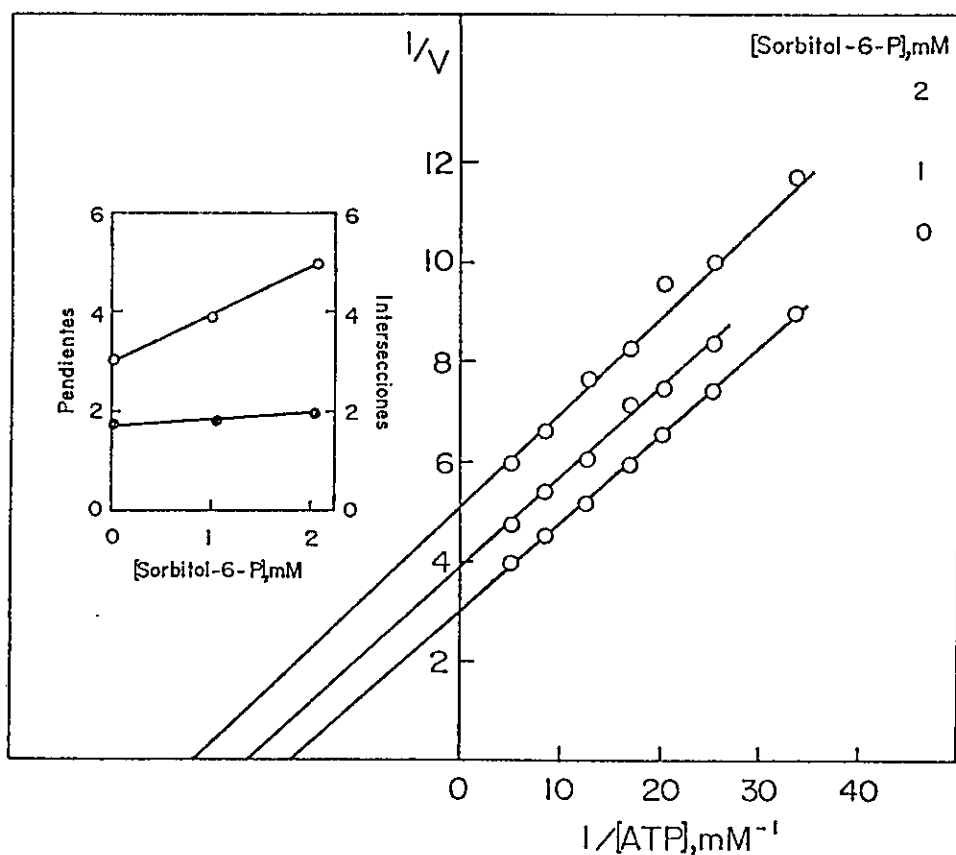


Figura 29. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2* por sorbitol-6-P cuando ATP es el sustrato variable. La concentración de fructosa-6-P fue 0,05 mM. El medio de reacción fue similar al descrito en la Fig. 1. En el recuadro se muestra la gráfica secundaria de pendientes e intersecciones en función de la concentración de sorbitol-6-P. La actividad enzimática se expresa como $A_{340}/\text{min ml}/50$.

Tabla 7

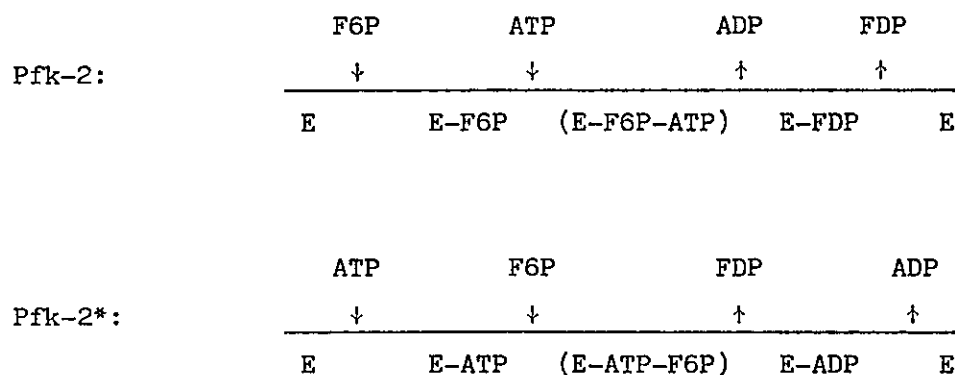
CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA INHIBICIÓN DE Pfk-2*
 POR ANALOGOS DE LOS SUSTRATOS

ANALOGO	SUSTRATO VARIABLE	SUSTRATO FIJO (mM)	K_i (mM)
AMP-PNP	ATP	F6P 0,10	0,24
AMP-PNP	F6P	ATP 0,10	0,65
sorbitol-6-P	F6P	ATP 0,10	1,9
sorbitol-6-P	ATP	F6P 0,05	

C. DISCUSION

La mutación pfkB10 está probablemente ubicada en el gen estructural de Pfk-2 y genera la mutante Pfk-2* (9-12). Las enzimas difieren en su estabilidad en preparaciones crudas y purificadas y en su movilidad cromatográfica en diversos sistemas (azul de Cibacron Sepharose, hidroxilapatita, DEAE-celulosa y AMP-Agarose). Las enzimas poseen movilidades electroforéticas similares en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (27), lo cual indica que sus subunidades no presentan grandes diferencias en masa molecular. Cepas que carecen de la fosfofructoquinasa principal de E. coli, Pfk-1, y que tienen niveles altos de Pfk-2* crecen lentamente en sustratos gluconeogénicos. Sin embargo, cepas isogénicas con altos niveles de Pfk-2 no presentan este comportamiento. Se han considerado varias explicaciones para esta disminución del crecimiento, basado en las propiedades de las fosfofructoquinasas de ambas cepas y en la acción posible de algunos efectores de la actividad enzimática (11).

Los resultados presentados en esta tesis demuestran que Pfk-2 y Pfk-2* tienen mecanismos cinéticos diferentes. Estos mecanismos se presentan en los siguientes esquemas:



Estudios en Velocidad Inicial

Estudios en velocidad inicial dieron como resultado líneas convergentes en gráficas de dobles recíprocos para Pfk-2 y Pfk-2*, lo cual indica que ambas enzimas presentan un mecanismo en secuencia. En el caso de un mecanismo Ping-Pong, las líneas deberían ser paralelas.

El mecanismo en secuencia se confirmó al obtener una parábola en una gráfica del recíproco de la velocidad con respecto al recíproco de la concentración de sustrato, al variar la concentración de ATP y fructosa-6-P en una razón constante (26). Si el mecanismo fuese Ping-Pong se habría obtenido una recta.

Inhibición por los Productos

Con el objeto de determinar el orden de interacción de los

sustratos y los productos con las enzimas se realizaron estudios cinéticos de inhibición por los productos de la reacción. Los resultados obtenidos para Pfk-2 se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8
INHIBICION DE Pfk-2 POR LOS PRODUCTOS

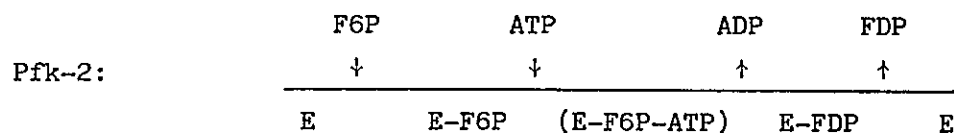
PRODUCTO	SUSTRATO VARIABLE	SUSTRATO FIJO	TIPO DE INHIBICION
FDP	F6P	ATP (subsaturante)	C
		ATP (saturante)	C
	ATP	F6P (subsaturante)	NC
		F6P (saturante)	— ^a
ADP	F6P	ATP (subsaturante)	NC
	ATP	F6P (subsaturante)	NC
		F6P (saturante)	NC

a. No hubo inhibición.

Los tipos de inhibición obtenidos concuerdan con un mecanismo cinético, en el que fructosa-6-P es el primer sustrato que se adiciona a la enzima y fructosa-1,6-P₂ es el último producto que se libera (Esquema 3).

Esquema 3

MECANISMO CINETICO DE Pfk-2



La única inhibición competitiva que se obtiene es la de fructosa-1,6-P₂ con respecto a fructosa-6-P a diferentes concentraciones fijas de ATP, y en todos los casos los valores de K_i son similares.

De acuerdo al mecanismo propuesto no debería obtenerse inhibición del último producto que se libera de la enzima con respecto al segundo sustrato cuando se usan concentraciones saturantes del primer sustrato. Este resultado es el que se obtuvo cuando se estudió la inhibición de fructosa-1,6-P₂ con respecto a ATP a una concentración de fructosa-6-P de 2,0 mM y apoya el mecanismo sugerido anteriormente para Pfk-2.

Se descarta la posibilidad que el mecanismo cinético para Pfk-2 sea al azar en equilibrio rápido, ya que en este caso se debería obtener inhibición de tipo competitivo de cada producto en relación a cada uno de los sustratos. También se podría descartar un mecanismo cinético al azar en estado estacionario, ya que en

este caso solo se esperarían inhibiciones de tipo no competitivo. Así mismo se descarta la posible formación de los complejos de punto muerto (E-F6P-ADP) y (E-FDP-ATP) ya que las gráficas secundarias para la inhibición por los productos resultaron lineales.

Los resultados de inhibición de Pfk-2* por los productos se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9

INHIBICION DE Pfk-2* POR LOS PRODUCTOS

PRODUCTO	SUSTRATO VARIABLE	SUSTRATO FIJO	TIPO DE INHIBICION
ADP	ATP	F6P (subsaturante)	C
		F6P (saturante)	C
	F6P	ATP (subsaturante)	NC
		ATP (saturante)	<u>—</u> ^a
FDP	ATP	F6P (subsaturante)	NC
		F6P (saturante)	I
	F6P	ATP (subsaturante)	NC
		ATP (saturante)	NC

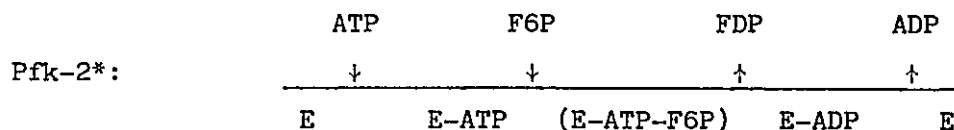
a. No hubo inhibición.

b. C, competitiva; NC, no competitiva e I, incompetitiva

En este caso, la única inhibición competitiva es la de ADP con respecto a ATP, obteniéndose el mismo resultado a distintas concentraciones de fructosa-6-P. Estos resultados concuerdan con un mecanismo cinético en el que ATP es el primer sustrato que se adiciona a la enzima y ADP es el último producto que se libera (Esquema 4)

Esquema 4

MECANISMO CINETICO DE Pfk-2*



En forma similar a lo observado con Pfk-2, para Pfk-2* no se observa inhibición del último producto que se libera (ADP) con respecto al segundo sustrato que se adiciona a la enzima (fructosa-6-P), a concentraciones saturantes del primer sustrato (ATP).

Por las mismas razones dadas para Pfk-2 se pueden descartar, en el caso de Pfk-2*, los mecanismos cinéticos al azar en equilibrio rápido y al azar en estado estacionario, tanto como la formación de los complejos de punto muerto (E-ATP-FDP) y (E-ADP-F6P).

Si el mecanismo cinético propuesto para Pfk-2* es correcto (Esquema 4), se debería esperar un cambio en el tipo de inhibición, de no competitivo a incompetitivo, cuando se estudia la inhibición del primer producto que se libera (fructosa-1,6-P₂) con respecto al primer sustrato que se adiciona (ATP) a concentraciones saturantes del segundo sustrato (28). Este cambio en el tipo de inhibición es el que se observa al aumentar la concentración de fructosa-6-P desde 0,10 a 1,0 mM (Figura 19 y Figura 20).

Inhibición por Análogos de los Sustratos

Para confirmar los mecanismos propuestos para Pfk-2 y Pfk-2* se realizaron estudios cinéticos de inhibición por análogos de los sustratos. Estos resultados se resumen en las Tablas 10 y 11 para Pfk-2 y Pfk-2* respectivamente.

Los tipos de inhibición obtenidos por los análogos de los sustratos, ribosa-5-P y AMP-PNP, para el caso de Pfk-2 y sorbitol-6-P y AMP-PNP, para el caso de Pfk-2*, confirman los mecanismos propuestos para ambas enzimas. Así, para un mecanismo cinético Bi-Bi en secuencia ordenada se espera que el análogo del segundo sustrato que se adiciona a la enzima presente una inhibición de tipo incompetitivo con respecto al primer sustrato.

Para el caso de Pfk-2 la inhibición es de tipo incompetitivo cuando se usa AMP-PNP como análogo de ATP y fructosa-6-P como

Tabla 10
INHIBICION DE Pfk-2 POR ANALOGOS DE LOS SUSTRATOS

ANALOGO	SUSTRATO VARIABLE	SUSTRATO ^a FIJO	TIPO DE INHIBICION
AMP-PNP	ATP	F6P	C
AMP-PNP	F6P	ATP	I
Ribosa-5-P	F6P	ATP	C
Ribosa-5-P	ATP	F6P	NC

a. Concentración subsaturante.

Tabla 11
INHIBICION DE Pfk-2* POR ANALOGOS DE LOS SUSTRATOS

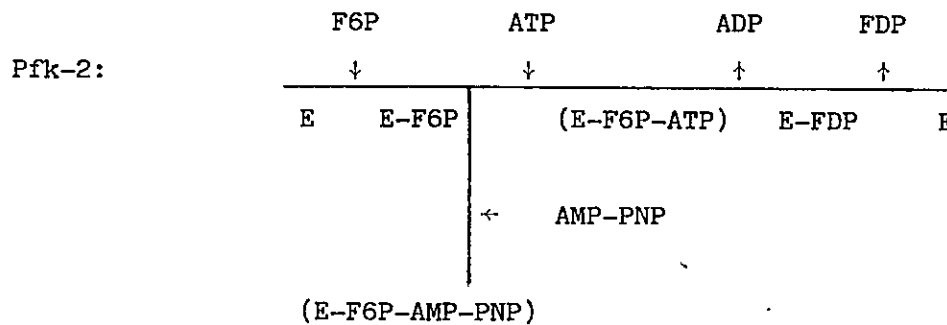
ANALOGO	SUSTRATO VARIABLE	SUSTRATO ^a FIJO	TIPO DE INHIBICION
AMP-PNP	ATP	F6P	C
AMP-PNP	F6P	ATP	NC
Sorbitol-6-P	F6P	ATP	C
Sorbitol-6-P	ATP	F6P	I

a. Concentración subsaturante

sustrato variable (Figura 23), mientras que en el caso de Pfk-2* la inhibición de tipo incompetitivo se obtiene cuando se usa sorbitol-6-P como análogo de fructosa-6-P y ATP como sustrato variable (Figura 29).

La acción de los análogos AMP-PNP y sorbitol-6-P se puede visualizar en los esquemas 5 y 6.

Esquema 5
INHIBICION DE Pfk-2 POR AMP-PNP



En el caso de Pfk-2, AMP-PNP es inhibidor competitivo de ATP ya que ambos compuestos se unen a la misma especie enzimática, el complejo (E-F6P). El efecto del inhibidor se puede explicar por la siguiente ecuación:

$$1/v = K_b/V_{max} (1 + K_{i_a}/[A] + [I]/K_i) 1/[B] + 1/V_{max} (1 + K_a/[A])$$

Cuando B es el sustrato variable, la ecuación describe la inhibición competitiva; K_i es la constante de disociación del complejo de punto muerto (E-F6P-AMP-PNP), K_a la constante de Michaelis para el primer sustrato que se adiciona a la enzima, K_b la constante de Michaelis para el otro sustrato y K_{ia} la constante de disociación del complejo (E-F6P-ATP) (28). De acuerdo a la ecuación anterior se observa que solo la pendiente de la recta es afectada por el inhibidor.

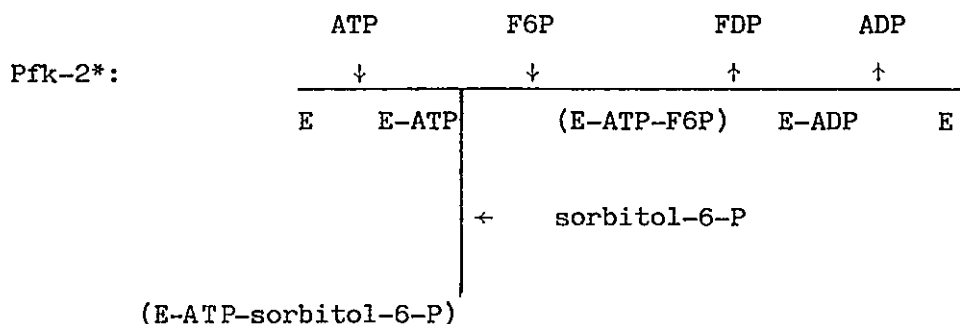
Cuando se estudia la inhibición de AMP-PNP con respecto al primer sustrato que se adiciona a la enzima (F6P), a una concentración subsaturante de ATP, se obtiene una serie de líneas rectas paralelas en gráficas de dobles recíprocos, lo que indica inhibición incompetitiva (Figura 23). De acuerdo a la siguiente ecuación (28), no debería observarse variaciones en las pendientes de las rectas, ya que el inhibidor no afecta la unión del primer sustrato (F6P) a la enzima.

$$1/v = K_a/V_{max} (1 + K_{ia} K_b/K_a [B]) 1/[A] + 1/V_{max} (1 + K_b/[B] + K_b [I]/K_i [B])$$

La misma explicación es válida para el inhibidor sorbitol-6-P en el caso de Pfk-2* como se indica en el esquema 6, de donde se desprende que sorbitol-6-P no debe afectar la unión de ATP a la enzima.

Esquema 6

INHIBICION DE Pfk-2* POR SORBITOL-6-P



Tanto en el caso de Pfk-2 como en el de Pfk-2* se obtiene inhibición incompetitiva al estudiar la inhibición por análogos del segundo sustrato que se adiciona a la enzima con respecto al primero, confirmando los mecanismos cinéticos sugeridos por estudios de inhibición por productos para ambas enzimas.

Se descarta un mecanismo cinético Bi-Bi al azar en equilibrio rápido ya que en este caso se espera obtener inhibición no competitiva cuando el inhibidor no es análogo del sustrato que se varía e inhibición competitiva cuando el inhibidor es análogo del sustrato que se varía.

Se ha estudiado el mecanismo cinético de las fosfofructoquinasas obtenidas de fuentes tales como bacterias, levaduras y mamíferos (1,2). En la mayoría de los casos la enzima presenta una cinética de saturación sigmoideal con respecto a fructosa-6-P e inhibición por ATP (3). Para eliminar los problemas derivados de la cinética no Michaeliana y de la inhibición por ATP, se ha

estudiado el mecanismo cinético de fosfofructoquinasas no alostéricas (29,30), se ha cambiado el pH de la mezcla de reacción (15,16)), se ha usado ITP en vez de ATP como sustrato (13) y también se ha estudiado la reacción reversa (31).

En el caso de Pfk-2 y Pfk-2* a las concentraciones subsaturantes de sustratos usados, las enzimas no presentan inhibición por ATP y presentan cinética de saturación hiperbólica con respecto a fructosa-6-P y ATP. Por lo tanto sus mecanismos fueron estudiados por medio de los protocolos habituales para una cinética clásica.

Se han propuesto varios mecanismos para las diferentes fosfofructoquinasas estudiadas y aún mecanismos contradictorios para la enzima de la misma fuente (15,16). En los casos de las enzimas de músculo de conejo (13), corazón de buey (32), levadura (33), Dictyostelium discoideum (29), músculo esquelético humano y eritrocito humano (34), hígado de ternera (35) y Flavobacterium thermophilum (36) y corazón de oveja (31) se han descrito líneas paralelas en gráficas de dobles recíprocos, sin embargo este tipo de resultado no es una prueba concluyente para determinar si el mecanismo cinético es de tipo Ping-Pong. En el caso de un mecanismo en secuencia ordenada la ecuación de velocidad es (28):

$$v = V_{max}[A][B] / K_{ia} K_b + K_b[A] + K_a[B] + [A][B]$$

Cuando el término K_{ia} del denominador es mucho más pequeño que K_a , la ecuación de velocidad se transforma en la correspondiente a un mecanismo de tipo Ping-Pong:

$$v = V_{max}[A][B] / K_b[A] + K_a[B] + [A][B]$$

Por otro lado, el uso de sustratos alternativos ha complicado el estudio del mecanismo cinético. Así, para la enzima de músculo de conejo se obtienen líneas paralelas cuando se usan como sustratos fructosa-6-P e ITP y líneas convergentes cuando se usa fructosa-1-P y ATP (13-14). Por otra parte para la enzima de la misma fuente Bar-Tana y Cleland al usar ATP, UTP y GTP obtuvieron líneas aparentemente paralelas (37); en cambio, al usar ITP o CTP obtuvieron líneas que se intersectan. En el último caso, los valores de K_{ia} obtenidos fueron mucho mayores que los valores de K_m , lo que facilita la detección de convergencia de las rectas obtenidas de los estudios en velocidad inicial.

El mecanismo cinético de Pfk-2 propuesto en este trabajo es el mismo que se ha descrito para la fosfofructoquinasa no alostérica de Lactobacillus plantarum (30) y para la enzima de hígado de rata (38). Este mecanismo concuerda con el sugerido por Kotlarz y Buc (39) basado en estudios de sitios de unión mediante experimentos de diálisis al equilibrio. Estos investigadores encontraron que ATP no se une a la enzima en ausencia de fructosa-6-P. Por otro

lado, el mecanismo cinético de Pfk-2* es igual al descrito para Pfk-1 de Escherichia coli (40).

Hasta el momento no se ha descrito un caso similar al de este trabajo, en el cual la alteración estructural de una enzima, provocada por una mutación, se traduce en un cambio en el mecanismo cinético. Será necesario conocer la estructura primaria y tridimensional de ambas fosfofructoquinasas para determinar los cambios en la estructura que afectan los sitios de unión de los sustratos.

BIBLIOGRAFIA

1. Bloxham, D.P. y Lardy, H.A. (1973) en The Enzymes (Boyer, P.D., ed.) 3ª Ed., Vol. 8, pp. 239-278. Academic Press, New York.
2. Uyeda, K. (1979) Phosphofructokinase. Advan. Enzymol. 48, 193--244.
3. Sols, A. (1981) en Metabolic Interconversion of Enzymes (Holzer, H., ed) pp. 111-123. Springer-Verlag, New York.
4. Fraenkel, D.G., Kotlarz, D. y Buc, H. (1973) Two fructose-6-phosphate kinase activities in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 248, 4865-4865.
5. Babul, J. (1978) Phosphofructokinases from Escherichia coli. Purification and characterization of the nonallosteric isozyme. J. Biol. Chem. 253, 4350-4355.
6. Thomson, J.A. (1977) E. coli phosphofructokinase synthesized in vitro from a ColE1 hybrid plasmid. Gene 1, 347-356.
7. Blangy, D., Buc, H. y Monod, J. (1968) Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from Escherichia coli. J. Mol. Biol. 31, 13-35.
8. Blangy, D. (1968) Phosphofructokinase from E. coli: evidence for a tetrameric structure of the enzyme. FEBS Lett. 2, 109-111.
9. Daldal, F. y Fraenkel, D.G. (1981) Tn10 insertions in the pfkB region of Escherichia coli. J. Bacteriol. 147, 935-943.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Uyeda, K. (1970) Studies on the reaction mechanism of skeletal muscle phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 245, 2268-2275.
14. Uyeda, K. (1972) Studies on the fructose-1-phosphate kinase activity of rabbit muscle phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 247, 1692-1698.
15. Kee, A. y Griffin, C. (1972) Kinetic studies of rabbit muscle phosphofructokinase. Arch. Biochem. Biophys. 149, 361-368.
16. Hanson, R.L., Rudolph, F.B. y Lardy, H. (1973) Rabbit muscle phosphofructokinase. The kinetic mechanism of action and the equilibrium constant. J. Biol. Chem. 248, 7852-7859.
17. Racker, E. (1947) Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphofructokinase activity. J. Biol. Chem. 167, 843-854.
18. Kornberg, A. y Pricer, W.E. (1951) Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. J. Biol. Chem. 193, 481-495.

19. Lineweaver, H., y Burk, D. (1934) The determination of dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658-666.
20. Wilkinson, G.N. (1961) Statistical estimations in enzyme kinetics. Biochem. J. 80, 324-332.
21. Dixon, M. (1953) The determinations of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55, 170-171.
22. Cornish-Bowden, A. (1974) A simple graphical method for determining the inhibition of mixed uncompetitive and non-competitive inhibitors. Biochem. J. 137, 143-144.
23. Plapp, B.V. (1970). Enhancement of the activity of horse liver alcohol dehydrogenase by modification of amino groups at the active site. J. Biol. Chem. 245, 1727-1735.
24. Gulbinsky, J.S. y Cleland, W.W. (1968) Kinetic studies of Escherichia coli galactokinase. Biochemistry 7, 566-575.
25. Cleland, W.W. (1970) Steady state kinetics. En The Enzymes (Boyer, P.D., ed), vol. 2, pp. 1-65. Academic Press, N.Y.
26. Yount, R.G., Babcock, D. y Ojala, D. (1971) Adenylii imido-diphosphate, an adenosine triphosphate analog containing a P-N-P linkage. Biochemistry 10, 2484-2489.
27. Retamal, C. y Babul, J., resultados no publicados.
28. Segel, I.H. (1975) Enzyme kinetics, pp. 767-780. John Wiley & Sons, New York.
29. Baumann, P. y Wright, B.E. (1968) The phosphofructokinase of Dictyostelium discoideum. Biochemistry 7, 3653-3661.

30. Simon, W.A. y Hoffer, H.W. (1978) Reaction mechanism of non-allosteric phosphofructokinase. Eur. J. Biochem. 88, 175-181.
31. Lorenson, M.Y. y Mansour, T.E. (1968) Studies on heart phosphofructokinase. Reversibility of the reaction. J. Biol. Chem. 243, 4677-4682.
32. Hulme, E.C. y Tipton, K.F. (1971) The isotope exchange reactions of ox heart phosphofructokinase. Biochem. J. 122, 181-187.
33. Viñuela, E., Salas, M.L. y Sols, A. (1963) End-product inhibition of phosphofructokinase by ATP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 140-145.
34. Layzer, R.B., Rowland, L.P. y Bank, W.J. (1969) Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes. J. Biol. Chem. 244, 3823-3831.
35. Lou, M.F. y Kinoshita, J.H. (1967) Control of lens glycolysis. Biochim. Biophys. Acta 141, 547-559.
36. Yoshida, M. (1972) Allosteric nature of thermostable phosphofructokinase from an extreme thermophilic bacterium. Biochemistry 11, 1087-1093.
37. Bar-Tana, J. y Cleland, W.W. (1974) Rabbit muscle phosphofructokinase. I. Anomeric specificity; initial velocity kinetics. J. Biol. Chem. 249, 1263-1270.
38. Brand, I.A. y Söling, H-D (1974) Rat liver phosphofructokinase. Purification and characterization of its reaction mechanism. J. Biol. Chem. 249, 7824-7831.

39. Kotlarz, D. y Buc, H. (1981) Regulatory properties of phospho-fructokinase 2 from Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 117, 569-574.
40. Blangy, D (1971) Propriétés allostériques de la phospho-fructokinase d'E. coli. Étude de la fixation des ligands par dialyse à l'équilibre. Biochimie 53, 135-149.