

UCH-FC
DOC-B
T693

**CONSECUENCIAS METABOLICAS DE FOSFOFRUCTOQUINASAS
CON PROPIEDADES CINETICAS DIFERENTES
EN *Escherichia coli***

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

JUAN CARLOS TORRES PETERS

Julio 1995

01-0222433

Director de Tesis: Dr. Jorge Babul C.



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado Presentada por el candidato.

Juan Carlos Torres Peters

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día XX del mes de Julio de 1995.

Director de Tesis:

Dr. Jorge Babul C.



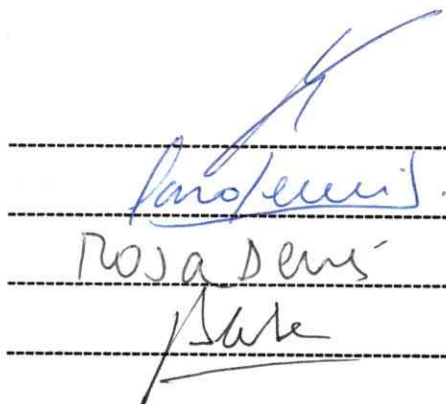
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Osvaldo Alvarez A.

Dr. Emilio Cardemil U.

Dr. Rosa Devés A.

Dr. Juan Carlos Slebe T.



FUENTES DE FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento proporcionado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, proyectos 1120-89 (al Dr. Jorge Babul) y 90-0027 (a Juan Carlos Torres) y una beca de postgrado a Juan Carlos Torres.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la colaboración y apoyo de las siguientes personas: Dr. Jorge Babul, Dr. Hermann Niemeyer, Dr. Tito Ureta, Dra. Victoria Guixé, Dr. Octavio Monasterio, Dra. Rosaiba Lagos, Dra. María de la Luz Cárdenas, Carlos Medina, Eduardo Kessi, Patricio Rodríguez, Claudio Retamal, Juan Carlos Guzmán, Carlos González y Marcela Wilkens. Además a todas las personas con las que me ha tocado convivir en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular y que han prestado su colaboración en diversos aspectos de mi trabajo.

INDICE DE MATERIAS

	pág.
Fuentes de Financiamiento	i
Agradecimientos	ii
Indice de Materias	iii
Lista de Tablas	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Abreviaturas	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
I INTRODUCCION	1
1. Metabolismo de carbonos, direccionalidad del flujo metabólico y ciclos fútiles	1
2. Fosfofructoquinasas y ciclo fútil	8
II MATERIALES Y METODOS	16
1. El modelo de ensayo <i>in vitro</i> del ciclo fútil entre Pfk y Fbpasa	16
2. Simulación numérica del modelo <i>in vitro</i>	19
3. Cepas bacterianas	19
4. Purificación de las enzimas	20
i. Pfk-1	20
ii. Pfk-2 y Pfk-2*	21
iii. Fructosabisfosfatasa	22
5. Ensayos enzimáticos	22
6. Curso temporal de concentración de intermediarios	24

7. Determinación de $^{14}\text{CO}_2$ producido por bacterias en resuspensión	25
8. Separación cromatográfica de intermediarios marcados	25
9. Estimación de porcentajes de ciclo por marcación reversa	26
i. Ensayos acoplados <i>in vitro</i>	26
ii. Experimentos de marcación por flujo inverso	33
iii. Análisis cromatográfico de los compuestos marcados	34
iv. Cálculo del porcentaje de ciclo fútil	35
10. Marcación por flujo inverso <i>in vivo</i>	37
11. Un modelo para la producción de CO_2 en gluconeogénesis	37
i. Producción de CO_2 a partir de glicerol como fuente de masa y marca radiactiva	37
ii. Producción de CO_2 marcado a partir de glicerol como fuente de masa y $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa y $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa como fuente de marca radiactiva	42
III. RESULTADOS	54
1. MODELO DE ENSAYO <i>IN VITRO</i>	54
i. Propiedades cinéticas relevantes de las fosfofructoquinásas purificadas	54
ii. El modelo de simulación numérica del modelo <i>in vitro</i>	55
iii. Curvas de progreso de NADH en el modelo <i>in vitro</i>	58
iv. El porcentaje de ciclo y la relación de actividades Pfk/Pgi	71
v. El porcentaje de ciclo y la concentración de MgATP	73
2. MÉTODO DE MEDICIÓN DE TASA DE CICLO FÚTIL POR MARCACIÓN POR FLUJO INVERSO	74
i. Ensayo de flujo neto gluconeogénico	74
a. Porcentaje de ciclo fútil como función de la actividad de Pfk	74
b. Marcación por flujo inverso de fructosa-1,6-bisP como función del porcentaje de ciclo fútil	78
ii. Ensayo glicolítico neto	81

a. Porcentaje de ciclo como función de la actividad de la Fbpasa	81
b. Marcación por flujo reverso de fructosa-6-P como función del porcentaje de ciclo fútil	83
3. TASA DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE <i>E. coli</i> CON DISTINTAS FOSFOFRUCTOQUINASAS	86
4. NIVELES INTRACELULARES DE FRUCTOSA-1,6-BISP CON GLICEROL O GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO	89
5. MARCACIÓN POR FLUJO INVERSO DE FRUCTOSA-1,6-BISP A PARTIR DE [¹⁴ C-U]GLUCOSA DURANTE GLUCONEOGÉNESIS <i>in vivo</i>	94
6. PRODUCCIÓN DE CO ₂ POR CEPAS CON DIFERENTES FOSFOFRUCTOQUINASAS A PARTIR DE [U- ¹⁴ C]GLICEROL	101
7. PRODUCCIÓN DE ¹⁴ CO ₂ POR CEPAS CON DISTINTAS FOSFOFRUCTOQUINASAS AL USAR GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO Y [1- ¹⁴ C]GLUCOSA O [6- ¹⁴ C]GLUCOSA COMO FUENTE DE RADIATIVIDAD	108
IV DISCUSIÓN	110
1. Modelo de ensayo <i>in vitro</i>	110
2. Niveles intracelulares de fructosa-1,6-bisP y glucosa-6-P	115
3. Método de medición del porcentaje de ciclo fútil por marcación por flujo inverso	123
4. Marcación glicolítica de fructosa-1,6-bisP durante gluconeogénesis	125
5. Producción de CO ₂ por diferentes cepas a partir de [U- ¹⁴ C]glicerol	127
6. Producción de CO ₂ con glicerol como fuente de carbono y [1- ¹⁴ C]glucosa o [6- ¹⁴ C]glucosa como fuente de radiactividad	130
7. Discusión General	134
i. Propiedades de las enzimas <i>in vitro</i> y roles <i>in vivo</i>	134
ii. Metabolismo y crecimiento en bacterias	137
V CONCLUSIONES	140
VI REFERENCIAS	142

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Valores calculados de actividad de Pfk y Fbpasa y tasas de ciclo fútil para datos experimentales	63
Tabla 2	Valores calculados de actividad de Pfk y Fbpasa y tasas de ciclo fútil para datos de simulación numérica	63
Tabla 3	Tasa de crecimiento de cepas de <i>E. coli</i> con distintas fosfofructoquinasas en una fuente de carbono glicolítica (glucosa) y en una gluconeogénica (glicerol)	87
Tabla 4	Concentración intracelular máxima de fructosa-1,6-bisP en resuspensiones celulares de cepas con distintas fosfofructoquinasas con glicerol como fuente de carbono	92
Tabla 5	Distribución de la radiactividad de [U- ¹⁴ C]glicerol en varias fracciones de cepas de <i>E. coli</i> con distintas fosfofructoquinasas	104

LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 1	Esquema de la glicólisis y su relación con el ciclo de Krebs y el ciclo de las Pentosas.	4
Figura 2	Esquema del modelo de ensayo <i>in vitro</i> del ciclo fútil entre Pfk y Fbpasa.	18
Figura 3	Esquemas de los sistemas de ensayo gluconeogénico y glicolítico.	29
Figura 4	Puntos de producción de CO ₂ en relación a reacciones de Pfk y Fbpasa.	40
Figura 5	Simulación matemática de producción de CO ₂ en el tiempo para niveles variables de <i>g</i> máximo.	43
Figura 6	Flujo de masa y radiactividad en torno a la reacción catalizada por triosa-P isomerasa.	45
Figura 7	Simulación matemática de producción de CO ₂ radiactivo a partir de [1- ¹⁴ C]glucosa y [6- ¹⁴ C]glucosa durante gluconeogénesis: efecto de niveles variables de <i>c</i> máximo.	50
Figura 8	Simulación matemática de producción de CO ₂ radiactivo a partir de [1- ¹⁴ C]glucosa y [6- ¹⁴ C]glucosa durante gluconeogénesis: efecto de posición relativa de curvas que rigen <i>c</i> y <i>J_m</i> .	52
Figura 9	Efecto de la concentración de fructosa-6-P y acción de efectores sobre la actividad de Pfk-1.	56
Figura 10	Actividad de Pfk-2 y Pfk-2* como función de la concentración de MgATP a dos concentraciones de fructosa-6-P.	57
Figura 11	Ajuste de las funciones de velocidad usadas en la simulación numérica del modelo <i>in vitro</i> .	59
Figura 12	Curvas de progreso de serie de ensayos representativos del modelo <i>in vitro</i> .	62
Figura 13	Curvas de progreso de concentración de NADH simuladas de acuerdo al modelo.	64

Figura 14	Ensayo de desacoplamiento.	69
Figura 15	Simulación de ensayo de desacoplamiento con función de velocidad para Pgi sin un componente de velocidad inversa	70
Figura 16	Simulación de ensayo de desacoplamiento con función de velocidad para Pgi con un componente de velocidad inversa	72
Figura 17	Tasa de ciclo fútil como función de la razón de actividades Pfk/Pgi.	75
Figura 18	Tasa de ciclo fútil como función de la concentración de MgATP.	76
Figura 19	Relación entre la actividad de Pfk agregada y ciclo fútil en el ensayo gluconeogénico.	77
Figura 20	Separación por HPLC de moléculas marcadas radiactivamente tras marcación por flujo inverso en ensayo gluconeogénico.	79
Figura 21	Relación entre marcación por flujo inverso de fructosa-1,6-bisP y tasa de ciclo fútil para ensayo gluconeogénico.	80
Figura 22	Relación entre actividad agregada de Fbpasa y ciclo fútil en ensayo glicolítico.	82
Figura 23	Separación por HPLC de moléculas marcadas radiactivamente tras marcación por flujo inverso en ensayo glicolítico.	84
Figura 24	Relación entre marcación por flujo inverso de fructosa-6-P y tasa de ciclo fútil para ensayo glicolítico.	85
Figura 25	Curso temporal de concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP y glicerol en el medio para cepas con diferentes fosfofructoquinasas.	91
Figura 26	Curso temporal de concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP y glucosa en medio en cepas con diferentes fosfofructoquinasas.	93
Figura 27	Patrón de elución de HPLC de extractos perclóricos de cepas con distintas fosfofructoquinasas incubadas con glicerol como fuente de carbono y [^{14}C -U]glucosa como fuente de marca.	96

Figura 28	Patrón de elución de HPLC de extractos perclóricos de cepas con distintas fosfofructoquinasas incubadas con glicerol como fuente de carbono y [U- ¹⁴ C]glucosa como fuente de marca.	98
Figura 29	Curso temporal de marcación radiactiva de fructosa-1,6-bisP a partir de [U- ¹⁴ C]glucosa durante gluconeogénesis.	100
Figura 30	Producción de CO ₂ a partir de [U- ¹⁴ C]glicerol y distribución final de la radiactividad en diversas fracciones.	102
Figura 31	Curso temporal de producción de ¹⁴ CO ₂ con glicerol como fuente de masa y [1- ¹⁴ C]glucosa o [6- ¹⁴ C]glucosa como fuente de marca radiactiva.	107
Figura 32	Curso temporal de producción de ¹⁴ CO ₂ con glicerol como fuente de masa y [1- ¹⁴ C]glucosa o [6- ¹⁴ C]glucosa como fuente de marca radiactiva.	109
Figura 33	Modelo para efecto de ciclo sobre concentración de fructosa-1,6-bisP.	122

LISTA DE ABREVIATURAS

fructosa-6-P	: D-fructosa-6-fosfato
fructosa-1,6-bisP	: D-fructosa-1,6-bisfosfato
glucosa-6-P	: D-glucosa-6-fosfato
gliceraldehído-3-P	: D-gliceraldehído-3-fosfato
dihidroxiacetona-P	: dihidroxiacetona fosfato
HPLC	: cromatografía líquida de alta resolución
DTT	: ditioneitol
PCA	: ácido perclórico

Nota: Otras abreviaturas se definen en el texto y leyendas de las figuras.

RESUMEN

La reacción catalizada por la fosfofructoquinasa es uno de los tres puntos del metabolismo del carbono en que la transformación en un sentido, el glicolítico, ocurre vía una reacción distinta a aquella por la cual ocurre la transformación en el sentido inverso, gluconeogénico. La fosfofructoquinasa cataliza la fosforilación en posición 1 de la fructosa-6-P por MgATP. En cambio, la remoción del fosfato en posición 6 de fructosa-1,6-bisP, para producir fructosa-6-P y fosfato inorgánico, es catalizada por la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fbpassa). En *Escherichia coli* se han descrito dos tipos de fosfofructoquinasas: fosfofructoquinasa-1 (Pfk-1), la forma predominante, y fosfofructoquinasa-2 (Pfk-2), una forma minoritaria en las cepas silvestres, codificadas por genes independientes, y evolutivamente muy distanciados. Como agentes catalíticos, ambas enzimas son igualmente específicas y eficientes, difiriendo, sin embargo, en aspectos regulatorios. Mientras que la Pfk-1 es una enzima inhibida alostéricamente por fosfoenol piruvato y activada por difosfonucleósidos, la Pfk-2 presenta cinética hiperbólica, pero es inhibida por uno de sus sustratos, MgATP, a concentraciones bajas del otro, fructosa-6-P. Adicionalmente, se ha descrito una forma mutada de la Pfk-2, la Pfk-2*, cuya diferencia principal con la forma silvestre es que ha perdido la propiedad de ser inhibida por MgATP. Las cepas de *E. coli* con diferentes combinaciones de estas fosfofructoquinasas crecen a velocidades similares en un medio mínimo con una fuente de carbono glicolítica. En cambio, en presencia de una fuente de carbono gluconeogénica, las cepas que tienen Pfk-2*, ya sea como única Pfk o en combinación con Pfk-1, tienen tiempos de duplicación 3 a 4 veces mayores que cepas con sólo Pfk-1, Pfk-2, o una combinación de ambas. La hipótesis central de esta tesis ha sido que el mecanismo metabólico que subyace a este fenotipo de crecimiento lento en fuentes de carbono gluconeogénicas, es la

generación de tasas importantes de ciclo fútil en cepas con Pfk-2*, lo que sería consecuencia de que no es inhibida por MgATP.

En primer lugar se presenta una caracterización cinética de las distintas fosfofructoquinasas purificadas de *E. coli*, las que se usarán en la etapa siguiente.

En seguida se presenta un modelo de ensayo *in vitro* que permite estudiar en un intervalo de condiciones, las tasas de ciclo fútil sostenidas por las distintas fosfofructoquinasas purificadas en presencia de Fbpasa, también purificada de *E. coli*, y en condiciones que simulan un flujo gluconeogénico. Se muestra que para una diversidad de situaciones, Pfk-2* sostiene tasas de ciclo fútil mucho más altas que Pfk-2, y ésta a su vez que Pfk-1, la que en las condiciones del ensayo no produce ciclo fútil. El modelo se presenta como una base cinética para la demostración de la hipótesis. La interpretación de los resultados del modelo se refuerza con una simulación numérica, que produce resultados similares a los observados experimentalmente, usando como única base la conducta cinética y regulatoria de las diferentes enzimas.

A continuación, se presenta una serie de resultados experimentales obtenidos *in vivo* que apuntan, en su conjunto, a demostrar la hipótesis del trabajo. El problema central es demostrar que *in vivo* también Pfk-2* sustenta tasas de ciclo más altas que las otras fosfofructoquinasas, en condiciones gluconeogénicas. Para ello, se midió primero el curso temporal de la concentración intracelular de fructosa-1,6-bisfosfato en resuspensiones celulares de cepas con distintas fosfofructoquinasas, teniendo como fuente de carbono glicerol o glucosa. Se muestra que las tasas de consumo de estas fuentes de carbono no difieren entre las cepas. En cambio, durante incubación con glicerol (fuente de carbono gluconeogénica) una cepa con Pfk-2* como única Pfk, desarrolla niveles intracelulares mucho más altos de fructosa-1,6-bisP, que las cepas con Pfk-1 o Pfk-2. Esto no ocurre cuando la fuente de carbono es glucosa. Se discute por qué este hecho es una consecuencia esperable de la hipótesis planteada.

Se presenta un nuevo método para determinar la operación de un ciclo fútil tanto durante flujo neto glicolítico como gluconeogénico. Este aporte metodológico, basado en la marcación radiactiva de un compuesto cuando la dirección del flujo de marca radiactiva es opuesta a la del flujo neto de masa, se ilustra en un modelo de ensayo *in vitro*. El método se aplica a las cepas con diferentes fosfofructoquinasas, incubadas con glicerol como única fuente de carbono, y trazas radiactivas de glucosa, midiéndose la marcación en el tiempo de fructosa-1,6-bisP. De acuerdo al método, los resultados indican un nivel claramente mayor de ciclo fútil en la cepa con Pfk-2* como única fosfofructoquinasa.

Se miden los niveles de producción de CO₂ marcado radiactivamente en las cepas con las distintas fosfofructoquinasas, a partir de glicerol marcado uniformemente con ¹⁴C, que es además la única fuente de carbono. Se muestra que la cepa con Pfk-2* produce niveles finales significativamente más altos que las otras cepas. Adicionalmente, se muestra que en la cepa con Pfk-2* se destina una proporción menor de átomos de carbono del glicerol a la síntesis de moléculas grandes. Se presenta una formalización matemática que clarifica el nexo entre ciclo fútil y estos resultados. Adicionalmente, se miden los niveles de producción de CO₂ marcado radiactivamente en cepas con distintas fosfofructoquinasas, a partir de glucosa marcada con ¹⁴C en posición 1 o posición 6, cuando el flujo de carbonos es gluconeogénico. Se encuentran diferencias significativas entre la cepa con Pfk-2* y las con Pfk-1 o Pfk-2. Se presenta una formalización matemática que establece un nexo entre estos resultados y la hipótesis.

ABSTRACT

The reaction catalysed by phosphofructokinase is one of the three points of carbon metabolism where the transformation in the glycolytic direction occurs by a reaction that is different from that by which it occurs the transformation in the gluconeogenic direction. Phosphofructokinase catalyses the phosphorylation of carbon 1 of fructose-6-P by MgATP. The equivalent reverse reaction, the removal of phosphate from carbon 6 of fructose-1,6-bisphosphate, is catalysed by fructose-1,6-bisphosphatase (Fbpasa). Two phosphofructokinases have been described in *Escherichia coli*: phosphofructokinase-1 (Pfk-1), the major form, and phosphofructokinase-2 (Pfk-2), a minor form in wild type strains, that are codified by independent genes with no apparent evolutionary relationship. Both enzymes are equally specific and efficient as catalytic agents, but they differ as to their regulatory characteristics. While Pfk-1 is an enzyme allosterically inhibited by phosphoenol pyruvate and activated by diphosphonucleosides, Pfk-2 shows hyperbolic kinetics and it is inhibited by one of its substrates, MgATP, at low concentrations of the other substrate, fructose-6-P. Also, a mutant form of Pfk-2 has been described, Pfk-2*, which main difference with the wild type enzyme is that it has lost the sensitivity to inhibition by MgATP. Strains of *E. coli* with different combinations of these phosphofructokinases grow at similar rates on minimal medium with a glycolytic carbon source. However, when the carbon source is gluconeogenic, strains with Pfk-2*, either as their only Pfk or in combination with Pfk-1, have doubling times that are 3 to 4 fold greater than strains with either Pfk-1, Pfk-2, or a combination thereof. The central hypothesis of this work has been that the metabolic mechanism underlying the slow gluconeogenic growth phenotype is the generation of higher futile cycle rates by Pfk-2*, as a consequence of its insensitivity to MgATP inhibition.

A kinetic characterization of the different phosphofructokinases, purified from *E. coli*, and to be used in the next stage, is presented first.

An *in vitro* assay model, allowing to study, across a range of conditions, the futile cycle rates that are sustained by each phosphofructokinase coupled to *E. coli* Fbpase, in simulated gluconeogenic conditions, is presented next. We show that, for a variety of conditions, Pfk-2* sustains significantly higher futile cycle rates than either Pfk-1 or Pfk-2. The model is offered as a kinetic basis for the hypothesis. The interpretation of the results is supported by a numerical simulation model that produces results similar to those experimentally obtained, solely on the basis of the kinetic and regulatory properties of the enzymes.

A set of *in vivo* experimental evidences supporting the hypothesis is presented. To show that also *in vivo* Pfk-2* sustains higher futile cycle rates under gluconeogenic conditions, the time course of the intracellular concentration of fructose-1,6-bisP was measured in cell resuspensions of different strains with glycerol or glucose as only carbon source. We show that the carbon source consumption rate does not differ among the strains. However, during incubation with glycerol, the strain with Pfk-2* as its only Pfk, develops intracellular fructose-1,6-bisP levels that are significantly higher than those found in Pfk-1 or Pfk-2 bearing strains. This is not the case when glucose is the carbon source. We discuss why this is an expected consequence of the hypothesis.

A new method to assess the occurrence of futile cycles, both during glycolytic and gluconeogenic net flux, is presented. This methodological contribution, based on the radioactive labeling of a compound when the radioactive label flux is opposed to the net mass flux, is illustrated with an *in vitro* assay model. The method is applied to cell resuspensions of strains with different phosphofructokinases supplied with glycerol as only carbon source, and traces of ^{14}C uniformly labeled glucose as label source, and measuring the radioactive labeling of fructose-1,6-bisP. According to the method, the results clearly show a higher level of futile cycling in the strain bearing Pfk-2* as its only phosphofructokinase.

The levels of radioactively labeled CO₂ production in strains with different phosphofructokinases, with ¹⁴C labeled glycerol as only carbon and label source, were measured. We show that a strain with Pfk-2* produces higher levels of CO₂ than strains with either Pfk-1 or Pfk-2. Also, we show that the strain with Pfk-2* allots less glycerol carbons to large molecules, possibly products of macromolecular synthesis. A mathematical formalization of a link between this result and higher rates of cycling is presented. The levels of radioactively labeled CO₂ production in strains with different phosphofructokinases, with glycerol as only carbon source and glucose radioactively labeled in carbon 1 or carbon 6 as label source, were also measured. Significant differences were found between the Pfk-2* and the Pfk-1 and Pfk-2 bearing strains. A mathematical formalization establishing a link between these results and the hypothesis is presented.

I. INTRODUCCION

1. Metabolismo de carbonos, direccionalidad del flujo metabólico y ciclos fútiles

Entendemos por metabolismo de carbonos la serie de transformaciones por las cuales los organismos vivos generan, a partir de moléculas simples, las porciones carbonadas de las moléculas que los componen. En la gran mayoría de los organismos la red central de reacciones del metabolismo de carbonos está constituida por la glicólisis. En la Figura 1 se presenta un esquema de la serie de metabolitos y reacciones que convencionalmente se considera parte de la glicólisis, su relación con otras importantes partes de la red del metabolismo de hidratos de carbono, así como la enzima que cataliza cada transformación. En el esquema se han incluido reacciones que habitualmente se consideran parte de la gluconeogénesis.

Como se aprecia en el esquema, hay tres puntos en esta red de reacciones en que la transformación en un sentido, el glicolítico, ocurre vía una reacción distinta a aquella por la cual ocurre la transformación en el sentido inverso, gluconeogénico. Estos son: la interconversión de glucosa y glucosa-6-P; la de fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP; y la de fosfoenolpiruvato y piruvato. Obviamente, cada reacción es catalizada por una enzima diferente. Además, mientras que en la reacción catalizada por Pfk se consume un equivalente de ATP por equivalente de fructosa-6-P transformado, en la otra no se produce, ni consume, ATP. Esto implica que la operación simultánea de ambas resulta en consumo fútil de ATP, es

decir en cada vuelta del ciclo se consume un equivalente de ATP y se obtiene la misma hexosa de la cual se partió. Esto es lo que se ha denominado "ciclo fútil" o "ciclo de sustratos". Por otra parte, también en estos tres casos, las reacciones en uno y otro sentido tienen constantes de equilibrio de tal magnitud, que en condiciones fisiológicas las velocidades de las reacciones inversas respectivas serán prácticamente despreciables. En otras palabras, las reacciones directas están muy favorecidas termodinámicamente, y ambas tenderán a ocurrir simultáneamente. Todas las otras reacciones de la glicólisis tienen constantes de equilibrio no muy alejadas del valor unitario, y por lo tanto el sentido del flujo neto a través de ellas responde con relativa rapidez a la razón de masas de sustratos a productos.

Resulta evidente que los tres puntos en que las transformaciones opuestas ocurren por reacciones diferentes constituyen las únicas instancias en que la dirección del flujo metabólico de carbonos puede ser regulado de forma rápida y eficiente, de acuerdo con los requerimientos metabólicos del organismo y con independencia de la razón de masas existente en una condición dada.

Estas dos situaciones, potencial ciclo fútil y posibilidad de regulación direccional, se han usado como argumentos para la "necesidad" de que exista regulación de las enzimas que catalizan reacciones opuestas (Atkinson, 1977). En realidad resulta intelectualmente más satisfactorio el argumento de la posibilidad de regulación, y ello por dos razones.

Primero, un ciclo de sustratos sólo será metabólicamente deletéreo si tiene como resultado reducir el flujo de una reacción limitante bajo un umbral dado. De hecho es en este contexto que tradicionalmente se habla de "ciclo fútil", basado en la noción que el ATP, por su ubicuo papel en el metabolismo, es generalmente limitante

Sin embargo, esto no ha sido demostrado y existen buenas razones para pensar que no lo es (Marr, 1991).

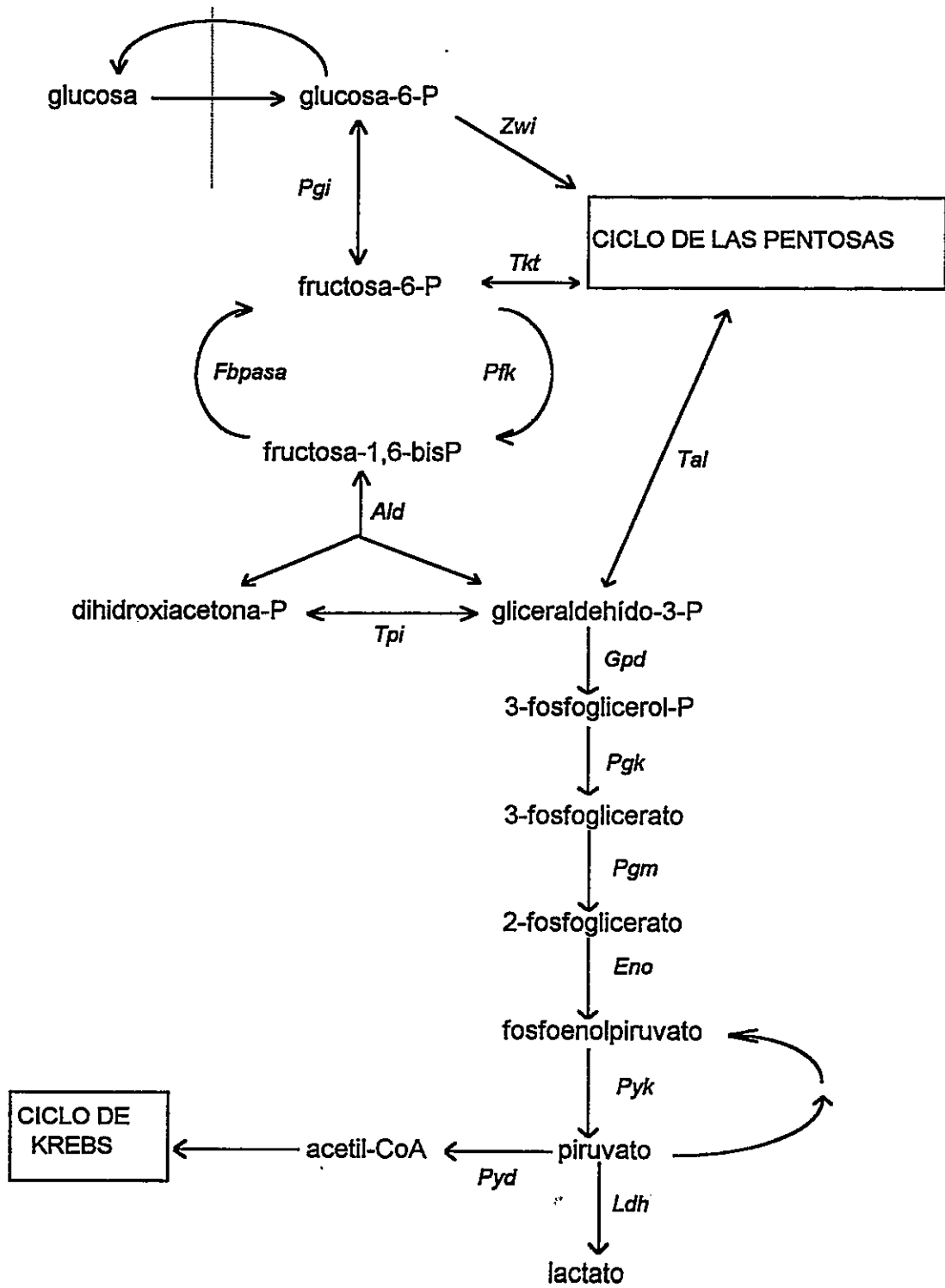
Segundo, el funcionamiento de un ciclo de sustratos puede ser metabólicamente ventajoso en ciertas condiciones, especialmente si su ocurrencia y magnitud pueden ser reguladas por señales que reflejan la situación metabólica general. De hecho, la ocurrencia de un ciclo de sustratos a nivel de la dupla fosfofructoquinasa - fructosa-1,6-bisfosfatasa ha sido demostrada en algunos casos, aunque debe señalarse que los sistemas experimentales usados no permiten evaluar un eventual efecto ventajoso o deletéreo de su ocurrencia (Challiss *et al.*, 1984; Clark *et al.*, 1974; Clark *et al.*, 1974). Es claro, en cambio, que en los músculos del vuelo del abejorro (*bumblebee*) un ciclo de sustratos a este nivel genera el calor necesario para hacer posible el vuelo a bajas temperaturas (Clark *et al.*, 1973).

Por último, Newsholme y sus colaboradores han discutido extensamente las posibilidades de que un ciclo de este tipo cumpla un papel regulatorio amplificador, en el cual un cambio relativamente pequeño en la concentración de un efector produciría una variación importante en la magnitud del flujo en uno u otro sentido (Newsholme *et al.*, 1984). Desafortunadamente la misma sensibilidad postulada por esta hipótesis hace difícil concebir una forma experimental de ponerla a prueba.

En todo caso, la expectativa de que enzimas involucradas en potenciales ciclos de sustrato sean reguladas ha sido ampliamente satisfecha, quizás en gran medida debido al afán con que han sido sometidas a escrutinio experimental en este sentido. La siguiente Tabla muestra una lista de efectores para las fosfofructoquinasas de distintos organismos, compilada el año 1978 (Tejwani, 1978).

Figura 1 Esquema de la glicólisis y su relación con el ciclo de Krebs y el ciclo de las pentosas.

Los nombres de las enzimas se han abreviado: *Zwi*, glucosa-6-P deshidrogenasa; *Pgi*, fosfoglucosa isomerasa; *Tkt*, transquetolasa; *Fbpasa*, fructosa-1,6-bisfosfatasa; *Pfk*, fosfofructoquinasa; *Ald*, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; *Tal*, Transaldolasa; *Tpi*, triosafosfato isomerasa; *Gpd*, 3-fosfogliceraldehído deshidrogenasa; *Pgk*, fosfogliceratoquinasa; *Pgm*, fosfogliceratomutasa; *Eno*, enolasa; *Pyd*, piruvato descarboxilasa; *Pyk*, piruvato quinasa; *Ldh*, lactato deshidrogenasa.



Efectores de fosfofructoquinasa

Inhibidores	Activadores	Desinhibidores
ATP	NH ₄ ⁺	3',5'-AMP cíclico
Mg ⁺²	Pi	5'-AMP
Ca ⁺²	5'-AMP	ADP
P-creatina	3',5'-AMP cíclico	fructosa-6-P
3-P-glicerato	ADP	Pi
P-enolpiruvato	fructosa-1,6-bisP	glucosa-1,6-bisP
2-P-glicerato		
2,3-glicerato-bisP		

A esta lista se agregó años más tarde fructosa-2,6-bisP, que es simultáneamente activador de la fosfofructoquinasa e inhibidor de la fructosa-1,6-bisfosfatasa, al menos en tejidos de mamíferos y en levaduras (Pilkis *et al.*, 1981). Resulta difícil contemplar esta Tabla sin meditar sobre los excesos a los que puede llevar una bioquímica que por operar esencialmente *in vitro* termina por divorciarse de lo biológicamente plausible. Sin embargo, debe agregarse que nadie ha mostrado que estos efectores no cumplan un papel *in vivo*.

De hecho, quizás la falencia más evidente de la mera búsqueda de moléculas reguladoras *in vitro*, fue la imposibilidad práctica de demostrar su importancia *in vivo*. Instrumentalmente, aún no somos capaces de determinar directamente, excepto en condiciones muy acotadas y poco flexibles, concentraciones intracelulares de metabolitos ni las actividades *in situ* de las enzimas que los producen o consumen. Los enfoques empleados, y los únicos

disponibles hasta este momento, son indirectos y se limitan a determinar ambas variables (concentración y actividad) en extractos que se obtienen tras un grado variable, pero generalmente importante, de perturbación de la situación *in vivo*. La perturbación necesariamente incluye, nada menos, la destrucción del organismo o tejido, lo que ha tenido como consecuencia una despreocupación, sólo recientemente reconocida, por los aspectos arquitectónicos de la organización intracelular del metabolismo. Esta es un área de estudios que aún espera su mejor momento, al menos en lo que se refiere al metabolismo de moléculas pequeñas. En el caso de tejidos pluricelulares, se agrega el problema de la heterogeneidad de las muestras sometidas al proceso de extracción, el mismo problema de arquitectura llevado a otro nivel de organización.

A pesar de lo expuesto, no cabe duda que sabemos bastante acerca del metabolismo de hidratos de carbonos. Desde los trabajos pioneros de los bioquímicos del siglo XIX e inicios del XX se ha llegado a un cuadro coherente y satisfactorio de la red básica, la más antigua evolutivamente, de transformaciones por las cuales los organismos adquieren los esqueletos carbonados, el ATP y las moléculas con poder reductor requeridos para su crecimiento. Sin embargo, desde la década del 70 hasta ahora el estudio del metabolismo de precursores parece haber llegado a un *plateau* particularmente estéril.

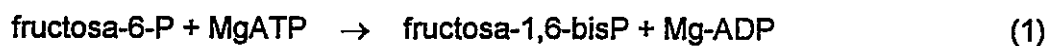
En esta tesis se ha abordado el problema de la importancia *in vivo* de las propiedades regulatorias de una enzima, determinadas *in vitro*, aprovechando las herramientas ofrecidas por la genética bacteriana, la que aporta enfoques que pueden soslayar algunos obstáculos metodológicos. De hecho, los estudios del metabolismo realizados utilizando cepas mutantes han hecho importantes contribuciones (Fraenkel y Vinopal, 1973). Sin embargo, por una variedad de

razones, el alcance de éstas no han sido lo profundo que hubiera podido esperarse.

A continuación revisaremos brevemente las características de las fosfofructoquinasas de *Escherichia coli*, y plantearemos cómo las hemos aprovechado para abordar el problema del rol de las propiedades cinéticas de una enzima en el metabolismo.

2. Fosfofructoquinasas y ciclo fútil

La fosfofructoquinasa (Pfk) es la enzima que cataliza la siguiente reacción de la glicólisis:



Como se muestra en el esquema de reacciones de la Figura 1, ésta es la última reacción de las hexosas antes de ser convertidas en triosas. La constante de equilibrio (K_{eq}) de esta reacción es de tal magnitud que para las razones fisiológicas típicas de concentración de MgATP a MgADP, la reacción tenderá a proceder en la dirección indicada siempre que la razón de fructosa-1,6-bisP a fructosa-6-P sea menor que 10^4 (Atkinson, 1977).

Por otra parte, la conversión de fructosa-1,6-bisP en fructosa-6-P, requerida durante gluconeogénesis, ocurre por medio de la siguiente reacción:



Esta reacción es catalizada por fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fbpassa), enzima que no tiene ninguna relación genética con la Pfk. La constante de equilibrio de esta reacción es del mismo orden que la de la catalizada por Pfk, i.e. también ocurrirá en la dirección indicada en casi todas las condiciones fisiológicas plausibles.

E. coli es, hasta ahora, el único organismo en el cual se han encontrado dos fosfofructoquinasas, las que aquí denominaremos Pfk-1 y Pfk-2. Se determinó que la Pfk-1 era codificada por un gen ubicado a 87 minutos en el mapa génico de *E. coli* (Vinopal *et al.*, 1975). En 1968 Morrissey y Fraenkel (Morrissey y Fraenkel, 1968) encontraron una mutación supresora del fenotipo característico de cepas que carecían del gen *pfkA*: la incapacidad de crecer en fuentes de carbono glicolíticas. Esta mutación supresora restauraba los niveles de actividad de Pfk, pero con características cinéticas diferentes, y se encontraba asociada a otro gen, *pfkB*, ubicado a 38 minutos en el mapa génico. Eventualmente se encontró la actividad de la enzima denominada Pfk-2, la que da cuenta de entre un 5% y 10% de la actividad de Pfk en cepas silvestres (Fraenkel *et al.*, 1973). La mutación supresora resultó ser una mutación en la región reguladora del gen *pfkB*, que aumenta el nivel transcripcional del gen, restaurando así la capacidad glicolítica de la bacteria (Daldal, 1983). Eventualmente ambos genes fueron clonados y secuenciados, y en el caso de Pfk-1 se conoce la estructura terciaria de la proteína (Daldal, 1983; Daldal, 1984; Schirmer y Evans, 1990; Shirakihara y Evans, 1988). La comparación entre las secuencias de aminoácidos, deducidas a partir de la secuencia de bases nucleotídicas en ambos casos y corroborada por secuenciación peptídica en el caso de Pfk-1, no revela ninguna similitud significativa entre ambas (Carlos Medina, comunicación personal), i.e. la relación

evolutiva entre ellas es demasiado distante como para reflejarse a nivel de secuencia. Pfk-1, por su parte, guarda una clara relación filogenética con las fosfofructoquinasas de *Bacillus stearothermophilus*, y con todas las enzimas secuenciadas de eucariontes (Poorman *et al.*, 1984). También se conoce su estructura tridimensional, la que es muy similar a la de cada subunidad de la enzima de *B. stearothermophilus* (Poorman, *et al.*, 1984).

Los pesos moleculares monoméricos de Pfk-1 y Pfk-2 son 35.000 y 37.000, respectivamente (Babul, 1978; Evans *et al.*, 1981). La forma activa de Pfk-1 es un tetramero, mientras que la forma activa de Pfk-2 sería un dímero (Guixé y Babul, 1988; Schirmer y Evans, 1990).

En términos de afinidad por los sustratos, ambas enzimas son muy similares:

	K_m (μM)	
	fructosa-6-P	ATP
Pfk-1	12,5	60
Pfk-2	11,0	50

Ninguno de una serie de sustratos alternativos a fructosa-6-P dio valores similares de K_s para Pfk-2 (Babul, 1978). Además, las cepas de *E. coli* que carecen del gen *pfkA* (Pfk-1) y tienen altos niveles de expresión del gen *pfkB* (Pfk-2), crecen a velocidades similares tanto en fuentes de carbono glicolíticas como gluconeogénicas (Daldal *et al.*, 1982). En otras palabras, Pfk-2 puede "reemplazar" funcionalmente a Pfk-1, al menos en el intervalo de condiciones estudiadas experimentalmente.

En términos de secuencia, Pfk-2 guarda un grado significativo de similitud con fructosa-1-P quinasa (la enzima que fosforila a la fructosa-1-P en posición 6) y riboquinasa de *E. coli*, y con el producto del gen *lacC* de *Staphylococcus aureus* (Orchard y Jornsberg, 1990). Bork y colaboradores (Bork *et al.*, 1993) colocan a Pfk-2 como una rama en el árbol filogenético de las riboquinasas.

Si bien en cuanto a su afinidad por los sustratos Pfk-1 y Pfk-2 son muy similares, en cuanto a propiedades regulatorias son totalmente diferentes. Pfk-1 es un caso clásico de enzima alostérica, con una cinética sigmoidea con respecto a fructosa-6-P y con dos efectores que alteran dramáticamente la forma de la curva de saturación: fosfoenolpiruvato (inhibidor) y ADP (activador). De hecho esta enzima sirvió como sistema modelo para un verdadero hito bibliográfico en el campo de la cinética de enzimas alostéricas (Blangy *et al.*, 1968). Pfk-2, en cambio, tiene una cinética hiperbólica para ambos sustratos, pero es inhibida por MgATP, uno de los sustratos, a concentraciones bajas del otro, fructosa-6-P (Guixé y Babul, 1985).

En 1981, Daldal y Fraenkel (Daldal y Fraenkel, 1981) aislaron una cepa con una mutación del gen *pfkB* (denominada *pfkB10*) que producía una Pfk-2 más inestable en extractos, a la que se denominó Pfk-2*. La posterior caracterización de esta enzima mutada reveló que además de su inestabilidad en extractos (remediable por la adición de etanol al 5% al medio de extracción) se diferenciaba de la enzima silvestre en que no era inhibida por concentraciones elevadas de MgATP a concentraciones bajas de fructosa-6-P (Daldal, *et al.*, 1982; Guixé y Babul, 1985).

Una de las ventajas de trabajar con bacterias es que se pueden obtener con relativa facilidad cepas que tengan diversas versiones de un gen o

combinaciones seleccionadas de ellas. En cuanto a las diversas fosfofructoquinasas, en *E. coli* es posible tener cepas con sólo Pfk-1, con Pfk-1 y niveles elevados de Pfk-2, con Pfk-1 y niveles elevados de Pfk-2*, con sólo Pfk-2, con sólo Pfk-2*...etc, es decir con una diversidad de combinaciones.

¿Qué consecuencias tiene para una cepa bacteriana el tener estas distintas combinaciones de fosfofructoquinasas? En particular, ¿en qué medida el tipo de Pfk afecta la capacidad de la bacteria de metabolizar diferentes fuentes de carbono y traducir eso en crecimiento? Daldal y colaboradores (Daldal, et al., 1982) midieron las velocidades de duplicación de estos distintos tipos de cepas y encontraron que en presencia de fuentes de carbono glicolíticas (glucosa, glucosa-6-P, manitol...etc) todas estas cepas crecían a velocidades similares. En presencia de fuentes carbono gluconeogénicas en cambio (glicerol, glicerol-3-P, lactato) las cepas que tenían Pfk-2* tienen tiempos de duplicación 3 a 4 veces mayores que las otras cepas. Este fenotipo de crecimiento lento en fuentes de carbono gluconeogénicas (al que denominaremos fenotipo Pfk-2*) es dominante, i.e. también lo presentan cepas que tienen Pfk-2* en combinación con niveles silvestres de Pfk-1. Esta observación nos pareció digna de atención, y es la base del presente trabajo, porque ofrece una situación ideal para abordar el problema de la función *in vivo* de las propiedades cinéticas *in vitro* de una enzima del metabolismo.

A primera vista el fenotipo Pfk-2* resulta paradójal: la mutación de una enzima que actúa en la dirección glicolítica no afecta el crecimiento en fuentes de carbono glicolíticas pero sí en fuentes de carbono que son metabolizadas en dirección gluconeogénica. Pero basta recordar que el fenotipo es dominante para ver que la paradoja es sólo aparente. En general, las mutaciones dominantes lo

son por hiper morfismo: exceso de función en relación al fenotipo silvestre. Y sabemos que la única forma en que el flujo metabólico puede tener una dirección neta es que las enzimas que participan en los potenciales ciclos de sustratos sean reguladas de tal manera que una está irihibida cuando la otra está activada. Ya hemos mencionado cómo algunas de las moléculas efectoras tienen, *in vitro*, efectos opuestos sobre Pfk y Fbpasa. De manera que resulta intelectualmente satisfactorio pensar que el fenotipo dominante Pfk-2* tiene como causa justamente el que esta Pfk esté activa cuando no debería estarlo. La proposición resulta aún más satisfactoria si se considera que Pfk-2*, a diferencia de su versión silvestre, no es inhibida por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P ni tampoco, como Pfk-1, tiene un inhibidor alostérico, como fosfoenolpiruvato (ver más arriba). En otras palabras, de los tres tipos de fosfofructoquinasas que puede tener una cepa de *E. coli*, la única que parece no tener alguna característica regulatoria produce un fenotipo que es el que uno predeciría como consecuencia de la falta de regulación. En el siguiente párrafo calificaremos esta afirmación.

¿Qué consecuencia tendría la falta de inhibición de Pfk sobre el metabolismo de fuentes de carbono gluconeogénicas? Como ya lo indicamos, si ambas enzimas actúan simultáneamente se produciría un ciclo de sustratos. Este ciclo debe tener dos tipos de consecuencias metabólicas. Primero, el flujo neto de hexosa en la dirección gluconeogénica se debe ver reducido, en la medida que Pfk, una enzima con alta afinidad por fructosa-6-P, compite con las otras enzimas involucradas en el uso gluconeogénico de esa hexosa, fosfoglucosa isomerasa (para producir glucosa-6-P) y transquetolasa (vía no oxidativa del ciclo de pentosas). Segundo, el consumo de ATP aumenta en proporción directa a la magnitud del ciclo. En síntesis, el ciclo debe afectar las vías anabólicas de dos

maneras: reduciendo el suministro de esqueletos de carbono requeridos para sintetizar macromoléculas y reduciendo el nivel intracelular de ATP, requerido en diversos puntos para esa misma síntesis. Si uno de estos efectos, o la combinación de ambos, pueden afectar la eficiencia del metabolismo al punto de reducir la tasa de crecimiento a los niveles observados, es un punto que analizaremos en la Discusión. Por ahora, haremos explícita la hipótesis que ha dirigido el trabajo de esta tesis.

Hipótesis

El fenotipo de crecimiento lento en fuentes de carbono gluconeogénicas de cepas de *E. coli* con Pfk-2* resulta de la existencia en estas cepas de niveles más elevados de ciclo fútil de sustratos durante metabolismo gluconeogénico. Esto es consecuencia de que esta enzima mutada no es inhibida por MgATP.

Dando por entendido que la metodología disponible nos reduce a enfoques experimentales indirectos, abordaremos el problema desde diversos puntos de vista. Primero, ofreceremos una caracterización básica de las diferentes fosfofructoquinasas de *E. coli*, incluyendo la enzima mutada Pfk-2*, y de las cepas de *E. coli* con las diferentes enzimas. Segundo, presentaremos un modelo de ensayo *in vitro* que nos permita determinar si al menos bajo algún conjunto de condiciones las tres fosfofructoquinasas que hemos descrito son capaces de generar diferentes niveles de ciclo de sustratos. Tercero, presentaremos un nuevo método para estimar tasas de ciclo fútil *in vitro* y veremos cómo los resultados *in vivo* son coherentes, *vis a vis* el método, con nuestra hipótesis. Finalmente, presentaremos una serie de evidencias experimentales obtenidas *in vivo* que apoyan nuestra hipótesis. Adicionalmente, se ha

desarrollado una formulación matemática muy simple que permite conectar nuestra hipótesis con los resultados experimentales.

II. MATERIALES Y METODOS

1. El modelo de ensayo *in vitro* del ciclo fútil entre Pfk y Fbpasa

La idea del modelo de ensayo *in vitro* es tener un sistema de ensayo cinético que reúna en una cubeta a una de las tres fosfofructoquinasas más la Fbpasa de *E. coli*, purificadas a partir de las cepas correspondientes, con enzimas auxiliares que permitan visualizar, en diferentes condiciones iniciales de sustratos y efectores, el comportamiento de cada combinación de Pfk y Fbpasa (Pfk-1/Fbpasa, Pfk-2/Fbpasa y Pfk-2*/Fbpasa) en términos de la magnitud y dirección de un flujo gluconeogénico simulado. Debe tenerse siempre presente que este modelo de ensayo no pretende simular la situación intracelular de estas enzimas, intermediarios y efectores. Más bien su objetivo es buscar si hay al menos un conjunto de condiciones en las que las diferentes fosfofructoquinasas den lugar a tasas diferentes de ciclo de sustratos *in vitro*.

En la Figura 2 se presenta un esquema del modelo de ensayo *in vitro*. Consiste en un sistema de ensayo para el ciclo Pfk/Fbpasa en condiciones iniciales cualitativamente similares a las que uno esperaría que predominen en una vía glicolítica tras proporcionarle una fuente de carbono gluconeogénica. En el modelo esta condición se traduce en una concentración inicial alta de fructosa-1,6-bisP y nula de fructosa-6-P.

Se usaron dos sistemas de enzimas auxiliares, agregadas en exceso para obtener cinéticas de primer orden, como en un ensayo acoplado clásico. El sistema fosfoglucona isomerasa/glucosa-6-P deshidrogenasa (mitad superior de la

figura) consume la fructosa-6-P producida por la Fbpasa, por la cual debe competir con la Pfk presente, generando por cada mol de fructosa-6-P consumida un mol de NADH, con el respectivo aumento de la absorbancia a 340 nm, A_{340} .

El sistema piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa (mitad inferior) consume el ADP producido por la Pfk, y por cada mol de ADP consumido genera un mol de NAD^+ a partir de NADH, con la consiguiente reducción de la A_{340} . Adicionalmente, este último sistema regenera el ATP consumido por la Pfk. Los sustratos ATP, NAD^+ y NADH, fosfoenolpiruvato y fructosa-1,6-bisP, deben proporcionarse inicialmente para que el sistema funcione.

Los ensayos se iniciaron agregando una mezcla de Pfk (Pfk-1, Pfk-2 o Pfk-2*) y Fbpasa purificadas a 1 ml de ensayo que contenía: a) las enzimas auxiliares y sus sustratos requeridos (fosfoenolpiruvato, NAD^+ y NADH), b) una concentración fija de fructosa-1,6-bisP (2 mM), y c) concentraciones variables de MgATP. En estas condiciones la fructosa-6-P disponible en cualquier momento dado será la producida por Fbpasa menos la consumida por Pfk y fosfoglucosa isomerasa en proporción a sus velocidades relativas. Como el consumo de fructosa-6-P por fosfoglucosa isomerasa resulta en reducción de NAD^+ a NADH, mientras que el de Pfk resulta en oxidación de NADH a NAD^+ , vía la producción de ADP, la A_{340} en cualquier momento dado será un reflejo del balance entre esas dos actividades. Como la actividad de Fbpasa es conocida (y puede determinarse independientemente midiendo fosfato inorgánico en alícuotas de la mezcla de ensayo) la magnitud del ciclo de sustratos puede calcularse directamente a partir de la pendiente del curso temporal de la A_{340} . La forma de calcular la magnitud del ciclo fútil a partir de las pendientes del curso temporal de A_{340} se describe en la sección sección 10 iv.

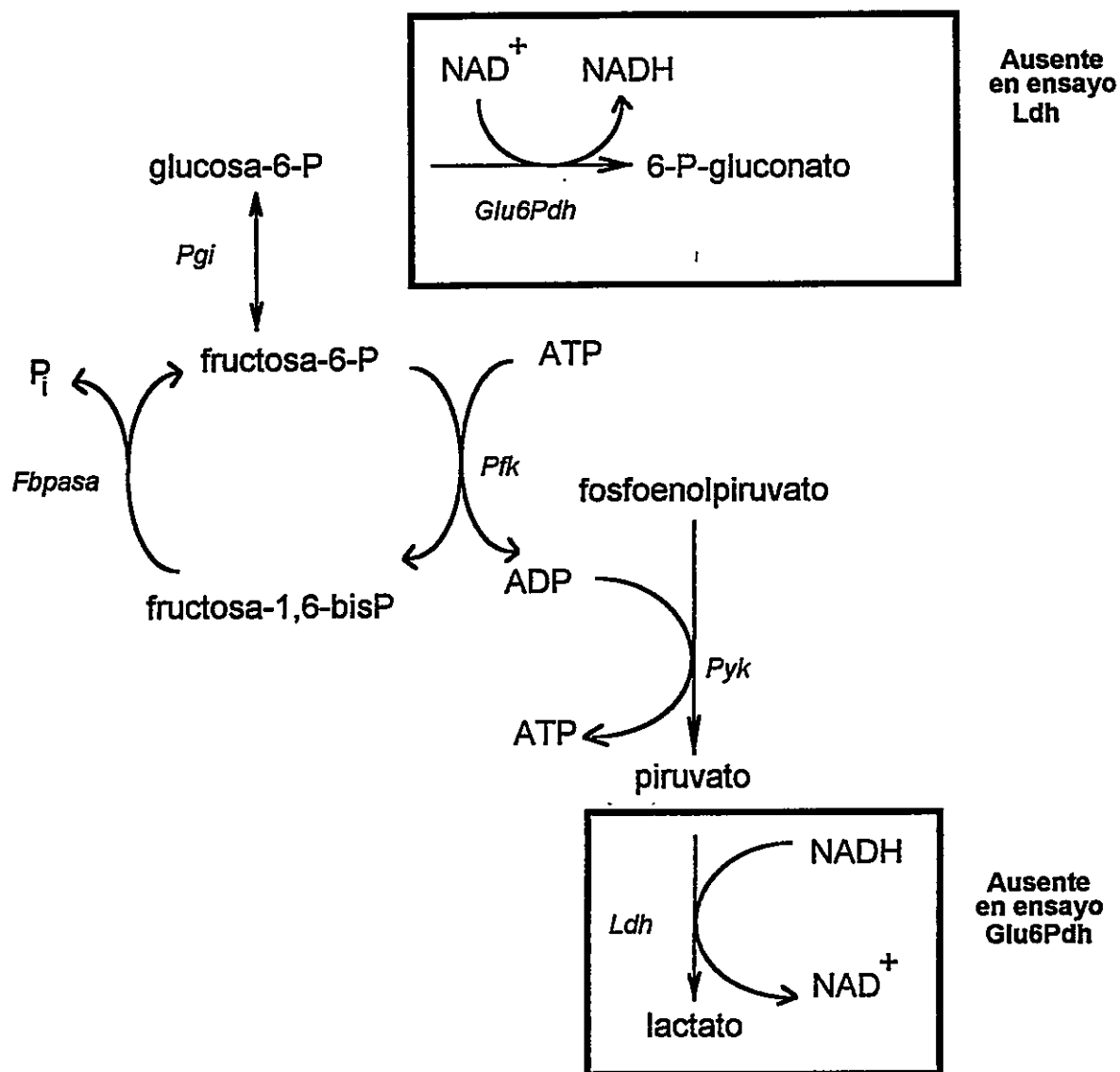


Figura 2 Esquema del modelo de ensayo *in vitro* del ciclo fútil entre Pfk y Fbpasa.

Las abreviaturas de enzimas corresponden a: *G6pdh*, glucosa-6-P deshidrogenasa; *Pgi*, fosfoglucoisomerasa; *Pfk*, fosfofructoquinasa; *Fbpasa*, fructosa-1,6-bisfosfatasa; *Pyk*, piruvato quinasa; *Ldh*, lactato deshidrogenasa.

2. Simulación numérica del modelo *in vitro*

Con el fin de dar un sustento teórico más sólido al modelo *in vitro*, se realizó una simulación numérica. Para esto se asociaron funciones arbitrarias de velocidad a cada una de las enzimas que participan en el ensayo. Estas funciones no se generaron sobre la base de un mecanismo cinético en particular. Su único sentido fue relacionar la variable velocidad con las variables de "concentración" y parámetros que pueden ser variados hasta que las curvas generadas por las funciones se ajusten aproximadamente a las curvas cinéticas experimentales de cada una de las enzimas. Esto se hizo así porque el objetivo de estas simulaciones es sólo mostrar que la conducta cinética determinada de las enzimas que participan en el modelo basta para explicar la conducta observada en el sistema acoplado completo. Un análisis cinético canónico está más allá del propósito de este punto particular de la tesis. Las funciones de velocidad obtenidas se usaron para generar un sistema no lineal de ecuaciones diferenciales, de acuerdo a las relaciones de producción y consumo que se dan en el modelo (Figura 2). El sistema se resolvió por el método de Runge-Kuta de cuarto orden (Press *et al.*, 1980), aplicado a través de un programa de computación diseñado por el autor. Como resultado, el programa entrega la curva de progreso de la concentración de todos los sustratos y productos que participan. La curva correspondiente a "NADH" se usó para comparar con las curvas de progreso de A_{340} obtenidas en cada ensayo.

3. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas para la purificación de las enzimas fueron DF903 ($\Delta pfkA$ $pfkB1$) para Pfk-2, DF905 ($\Delta pfkA$ $pfkB1B10$) para Pfk-2*, DF1000/pLC16-4 para Pfk-1 y DF656/pJS54 para Fbpasa. Además se usaron las cepas DF915 ($\Delta pfkA$ $\Delta pfkB$) y

DF902 ($\Delta pfkA pfkB$). Las características de estas cepas y su construcción han sido descritas por Daldal (1983), quien las cedió gentilmente para realizar este trabajo.

4. Purificación de las enzimas

i. Pfk-1

Las bacterias se crecieron aeróbicamente a 30°C en medio Luria-Bertani (Maniatis *et al.*, 1982) y se las cosechó por centrifugación durante 10 min a 13200 g cuando alcanzaron una A_{580} de 0,5. Las bacterias se resuspendieron 1:5 (peso:volumen) en amortiguador A: Tris-acetato 50 mM, pH 7,6, $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 3,5 mM y KCl 300 mM. Esta resuspensión fue sonicada en un sonicador (Heat Systems - Ultrasonics, Inc.) usando sonda grande por cuatro períodos de 45 s separados por períodos de 30 s, manteniendo la resuspensión en agua con hielo, y centrifugada a 40000 rpm (rotor Beckman Ti50) durante 1 h.

Este sobrenadante fue dializado contra un litro del amortiguador A durante 2 h dos veces. El líquido dializado se pasó por una columna de 100 ml de Azul de Cibacron Sepharose (1 parte de Reactive Blue-2 Sepharose con 2 de Sepharose 4B-200, Sigma). Se lavó la columna con 5 volúmenes de amortiguador A. Para eluir la enzima se usó el amortiguador A suplementado con 0,5 mM ATP (500 ml de amortiguador A en 100 tubos de 5 ml).

Se determinó la actividad fosfofructoquinásica en las fracciones y se juntaron aquellas con más actividad. A continuación se concentró la enzima hasta 20 ml en un aparato de filtración con membranas Amicon, lavando las membranas con amortiguador A sin ATP ni KCl, obteniéndose unos 30 ml finales. En seguida la enzima se calentó por 5 min a 65°C en presencia de fructosa-6-P 5 mM, ATP 0,3 mM y DTT 5 mM. Después se centrifugó la solución a 12000 rpm en rotor Sorvall SS-34

por 20 min. La enzima se guardó a -20°C . La actividad específica de la enzima purificada fue 100 U/mg.

ii. Pfk-2 y Pfk-2*

Para la purificación de Pfk-2 y Pfk-2* se usaron las cepas DF903 y DF905, que tienen niveles elevados de Pfk-2 y Pfk-2*, respectivamente, como única Pfk. Las bacterias se crecieron como ya se indicó y tras una centrifugación se resuspendieron 1:4 (peso:volumen) en amortiguador F: fosfato de potasio (KH_2PO_4) 20 mM, MgCl_2 5 mM, EDTA 1 mM, etanol 5%. Después de sonicar la suspensión (ver más arriba), se centrifugó por 1 hr en rotor Beckman Ti50 a 40000 rpm. El líquido sobrenadante se dializó contra un litro de amortiguador A por 2 h dos veces, y después se pasó por una columna de 100 ml de OH-Apatita (Biorad) equilibrada con 1 litro de amortiguador F hasta que la conductividad del eluido fue igual a la del amortiguador (1,65 mMho; conductímetro Radiometer), para después lavarla con 800 ml de amortiguador F. La enzima se eluyó con un gradiente de fosfato: 20 mM hasta 150 mM de amortiguador fosfato a pH 7,0 (400 ml de amortiguador fosfato 20 mM y 400 ml de amortiguador fosfato 150 mM). Se determinó actividad de fosfofructoquinasa en 100 tubos de 10 ml cada uno y se juntaron las fracciones con mayor actividad. La solución se concentró en un aparato de filtración con membranas Amicon hasta unos 20 ml, y se centrifugó a 10000 rpm en rotor Sorvall SS-34 por 10 min. Este líquido se dializó entonces contra el siguiente amortiguador B: Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, MgCl_2 5 mM, EDTA 1,0 mM, DTT 1,0 mM, KCl 50 mM, glicerol 20%, con tres cambios durante 2 h. Después el procedimiento fue idéntico al descrito para Pfk-1: columna Azul de Cibacron, elución con ATP, concentración en membrana Amicon, calentamiento a 65°C y centrifugación. En seguida este líquido sobrenadante se dializó durante 4 h contra un litro de amortiguador B cuatro veces, para posteriormente repetir el paso por la columna de

Cibacron Sepharose (Sigma Chem. Co. St. Louis, Missouri). Las fracciones colectadas se concentraron otra vez a unos 20 ml y se guardó la preparación a -20°C . La actividad específica de ambas enzimas purificadas fue de 110 U/mg.

iii. Fructosabisfosfatasa

Fbpasa de *E. coli* se purificó a partir de la cepa DF656/pJS54, que produce altos niveles de la enzima. Las bacterias se crecieron y recolectaron tal como se indicó en el párrafo sobre purificación de fosfofructoquinasas. Se resuspendieron 1:4 (peso:volumen) en la solución C: malonato de sodio, 10 mM; MgCl_2 5 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM; etanol 5% a pH 6,0. La resuspensión se sonicó tal como se indicó para Pfk-1.

Después de sonicar la suspensión, se centrifugó por 1 hr en rotor Beckman Ti50 a 40000 rpm. El líquido sobrenadante se dializó contra un litro de amortiguador C por 2 hrs dos veces, y se ajustó a pH 6,0 con solución A a pH 5,0. Luego, el líquido dializado se pasó por una columna de fosfocelulosa, previamente equilibrada con solución C. La enzima se eluyó con un gradiente de fructosa-1,6-bisP en solución C pero con malonato 50 mM (100 fracciones de 5 ml cada una). Se midió la actividad de Fbpasa en las fracciones, y se juntaron las fracciones con mayor actividad. Posteriormente se concentró la enzima hasta unos 2-3 ml, y se la dializó contra solución D: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; MgCl_2 5 mM; EDTA, 1 mM; DTT 1 mM. La actividad específica de la enzima purificada fue 30 U/mg.

5. Ensayos enzimáticos

La actividad de Pfk se determinó espectrofotométricamente acoplado la producción de fructosa-1,6-bisP a la oxidación de NADH usando aldolasa, triosafosfato isomerasa y glicerofosfato deshidrogenasa (Guixé y Babul, 1985). La

solución de ensayo consistió en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6, ATP 1 mM, NADH 0,2 mM, $MgCl_2$ 10 mM, NH_4Cl 2 mM, 40 μg de aldolasa, 3 μg de triosafosfato isomerasa, 30 μg de glicerofosfato deshidrogenasa y fructosa-6-P a concentraciones variables en un volumen de 1 ml. Todas las enzimas usadas fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri). En algunas determinaciones se calculó la cantidad de $MgCl_2$ necesaria para mantener una concentración de Mg^{+2} libre constante. Tanto en el modelo de ensayo como para determinar la actividad de Fbpasa se usó la siguiente mezcla de ensayo: Tris-HCl 100 mM, pH 7,6, $MgCl_2$ 5 mM (excepto en los casos indicados), $(NH_4)_2SO_4$ 3 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,4 mM, fosfoenolpiruvato 0,5 mM, NAD^+ 0,25 mM, fructosa-1,6-bisP 2 mM y NADH para obtener una A_{340} inicial de 0,4-0,5 (aproximadamente 0,06 mM), más concentraciones variables de MgATP. Para el sistema piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa la mezcla de ensayo contenía 20 μg de piruvato quinasa/ml y 10 μg de lactato deshidrogenasa/ml. Para el sistema fosfoglucosa isomerasa/glucosa-6-P deshidrogenasa la mezcla de ensayo contenía 2 μg de enzima por ml. La concentración de todos los sustratos empleados se determinó por ensayos enzimáticos de punto final. La actividad de la Fbpasa se determinó independientemente midiendo la producción de fosfato en alícuotas de la mezcla de ensayo tomadas a diferentes tiempos. Para esto se usó el método descrito por Babul y Guixé (1983). Se retiraron alícuotas de 0,2 ml y se detuvo la reacción agregando 0,04 ml de H_2SO_4 5N. En seguida se determinó fosfato inorgánico agregando el reactivo Fiske-Subbarow (0,04 ml de molibdato de amonio 2,5%, 0,004 ml de agente reductor (25 mg/ml)) y agua hasta un volumen final de 0,4 ml. Se determinó la absorbancia a 660 nm y se calculó el fosfato inorgánico por comparación con curvas estándares. Se define una U de enzima como la cantidad de enzima que transforma 1 μmol de sustrato/min en las condiciones del ensayo.

6. Curso temporal de concentración de intermediarios

Para determinar el curso temporal de la concentración intracelular de intermediarios metabólicos, primero se diluyó una alícuota de cultivo en medio Luria-Bertani en medio mínimo M63 (Maniatis *et al.*, 1982). fresco suplementado con la fuente de carbono correspondiente y se crecieron las células a 37°C. A partir de este cultivo, se diluyó una alícuota en el mismo medio con la misma fuente de carbono y se creció a 30°C hasta alcanzar una A_{580} de 0,5-0,7. Se centrifugó el cultivo, y las bacterias se lavaron y resuspendieron en medio M63 hasta una A_{580} final de aproximadamente 15. A tiempo cero se agregó glucosa o glicerol hasta una concentración final de 0,1%. La resuspensión se mantuvo a 30°C con agitación, y se tomaron muestras cada 5-10 min, las que se agregaron a un volumen de ácido perclórico (PCA), previamente enfriado en hielo, para una concentración final de PCA de 3,5%. Tras 5 min en hielo, los extractos fueron neutralizados con KHCO_3 y se eliminó el precipitado centrifugando por 30 min a 4°C a 10000xg. Se recuperaron los líquidos sobrenadantes y se mantuvieron por una noche a -20°C.

Fructosa-1,6-bisP se midió por ensayo acoplado usando aldolasa, triosa-P isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa y determinando espectrofotométricamente el cambio en concentración de NADH por el cambio de absorbancia a 340 nm. Glucosa-6-P se midió por ensayo acoplado usando fosfoglucoasa isomerasa y glucosa-6-P deshidrogenasa y determinando espectrofotométricamente el cambio de absorbancia a 340 nm. La concentración interna fue calculada a partir de la A_{580} del cultivo, como lo detallan Orozco de Silva y Fraenkel (1979).

7. Determinación de $^{14}\text{CO}_2$ producido por bacterias en resuspensión

Las bacterias en resuspensión se prepararon tal como se detalló en el acápite anterior, excepto que la densidad final de la resuspensión fue para una A_{580} final de 2,0. Se agregó a la resuspensión [$U\text{-}^{14}\text{C}$]glicerol (actividad específica = 1 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$; American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, Missouri) para una concentración final de 0,01% (0.01 g/100 ml). La resuspensión se mantuvo a 25°C y se burbujeó oxígeno a través de la resuspensión, mientras el CO_2 se atrapaba haciendo pasar los gases producidos por una alícuota de NaOH 0,3N con Tritón X-100. A cada tiempo preseleccionado se agregó mezcla de centelleo a la trampa de CO_2 y la radiactividad se determinó en un medidor de centelleo líquido Packard 1600 TR.

En otros experimentos la fuente de carbono fue glicerol al 0,01% y la fuente de radiactividad [$1\text{-}^{14}\text{C}$]glucosa o [$6\text{-}^{14}\text{C}$]glucosa (actividad específica = 55 mCi/mmol; American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, Missouri).

8. Separación cromatográfica de intermediarios marcados

Los intermediarios marcados radiactivamente presentes en los extractos perclóricos de bacterias en resuspensión fueron separados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna Mono Q de intercambio iónico, usando un aparato de HPLC (LKB, modelo 2150). La columna fue previamente equilibrada en amortiguador A: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Se inyectó a la columna una alícuota del material soluble en PCA, y la elución se realizó con una gradiente entre el amortiguador A y el B: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; NaCl 0,5M. La gradiente usada fue: de 0% de amortiguador B a 20% de amortiguador B (0-30 min); de 20% de amortiguador B a 100% de amortiguador B (30-60 min). El líquido eluído se pasó directamente a un medidor de centelleo líquido conectado en línea (Beckman 171 Radioisotope

Detector) el que a su vez transmitía los datos a un computador. El programa SpectraCalc (Galactic Industries Corp., Salem, NH) fue utilizado para analizar los cromatogramas y para determinar el área bajo cada pico de elución.

Los compuestos correspondientes a cada pico de elución fueron identificados usando dos criterios complementarios. Primero, se preparó un conjunto de estándares marcados radiactivamente, por medio de tratamientos enzimáticos apropiados de [U- ^{14}C]glucosa o de [^3H]-glucosa, y se determinaron sus tiempos de elución en las mismas condiciones ya indicadas. Sobre la base de estos tiempos de elución, se hizo una identificación tentativa de los picos de elución. Segundo, para confirmar o desestimar esas identificaciones, se diseñaron tratamientos enzimáticos de las muestras, y después se analizaron las muestras tratadas, intentando correlacionar el patrón de elución obtenido con el esperado de acuerdo a la identificación tentativa.

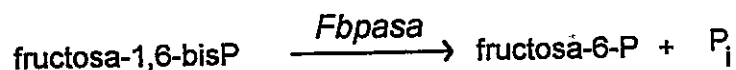
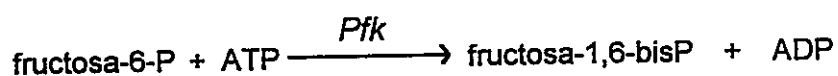
9. Estimación de tasas de ciclo por marcación reversa

i. Ensayos acoplados *in vitro*

Durante el desarrollo de esta tesis se diseñó un método nuevo para estimar tasas de ciclo fútil, que presenta ventajas con respecto a los métodos clásicos (Torres *et al.*, 1995). El método fue evaluado usando un sistema *in vitro* de ensayo acoplado, similar al presentado más arriba para determinar potencialidad de ciclo fútil de las distintas fosfofructoquinasas. A continuación se presenta brevemente el método y los resultados *in vitro*, que a su vez permitirán interpretar los resultados correspondientes *in vivo*.

El método se basa en el fenómeno del intercambio isotópico, propio de toda reacción química. En una reacción dada que está al equilibrio, aunque la velocidad neta de la reacción es cero, ésta resulta de la conversión simultánea, a idéntica

velocidad, de moléculas de sustrato en producto, y viceversa. Por lo tanto, si durante el equilibrio se agrega una traza de producto marcado radiactivamente, se puede estimar la velocidad de la reacción, en ambos sentidos, midiendo la velocidad de marcación del sustrato (Segel, 1975). Obviamente, lo mismo es válido para una reacción desplazada del equilibrio. En las situaciones donde hay posibilidades de que ocurra un ciclo fútil, las dos reacciones involucradas están generalmente muy desplazadas del equilibrio, por ejemplo:



Si la dirección neta del flujo de masa coincide con la dirección indicada para Pfk, por ejemplo durante metabolismo glicolítico, y se agrega una traza de fructosa-1,6-bisP marcada radiactivamente, el flujo de radiactividad a través de la reacción catalizada por Pfk será mínimo. Por lo tanto, la velocidad de marcación radiactiva de fructosa-6-P será función primordialmente de la velocidad de la reacción catalizada por la Fbpasa. A este tipo de marcación radiactiva lo denominaremos "marcación por flujo inverso de marca", i.e. cuando la marcación del compuesto en cuestión depende del flujo de radiactividad en el sentido opuesto al flujo neto de masa en el sistema. Como la magnitud del ciclo fútil en estas condiciones es función directa de la velocidad de la reacción catalizada por la Fbpasa, entonces se puede estimar el ciclo midiendo la marcación por flujo inverso de fructosa-6-P. El mismo argumento se aplica si el flujo neto de masa es gluconeogénico, i.e. de fructosa-1,6-bisP hacia fructosa-6-P, y se mide la marcación de fructosa-1,6-bisP a partir de fructosa-6-P radiactiva.

El modelo acoplado *in vitro* tiene por objeto medir simultánea e independientemente el ciclo fútil y la marcación por flujo inverso, en condiciones simuladas de flujo "glicolítico" y "gluconeogénico", y establecer la relación entre ambas variables. La Figura 3 A muestra un esquema del sistema de ensayo acoplado para la situación de flujo neto "gluconeogénico". El funcionamiento de este sistema ya ha sido descrito en términos de la relación entre la magnitud del ciclo fútil y el curso temporal de la concentración de NADH (ver sección 1). Las concentraciones en la mezcla de ensayo fueron: 100 mM Tris-HCl, pH 7,6; 5 mM MgCl₂; 2 mM NH₄Cl; 1 mM ditiotreitól; 0,5 mM EDTA; 1 mM ATP; 1 mM fosfoenolpiruvato; 2 mM fructosa-1,6-bisP; 0,25 mM NAD⁺ y NADH para obtener una A₃₄₀ de 0,7. Las actividades de las enzimas auxiliares fueron: 13 U de lactato deshidrogenasa (*Leuconostoc mesenteroides*); 3,6 U de fosfoglucosa isomerasa (de músculo de conejo); 5 U de glucosa-6-P deshidrogenasa (*Leuconostoc mesenteroides*); 4 U de piruvato quinasa (de músculo de conejo); 0,2 mU de Fbpasa (de músculo de conejo). La actividad de Pfk (de músculo de conejo) se determinó independientemente acoplando la producción de fructosa-1,6-bisP a la oxidación de NADH con aldolasa, triosafosfato isomerasa y α -glicerofosfato deshidrogenasa en presencia de fructosa-6-P 1 mM y ATP 1 mM. La actividad de Pfk agregada se expresa como unidades de actividad medidas en esas condiciones. La velocidad de la reacción catalizada por la Pfk en el ensayo acoplado se determina a partir de la pendiente del curso temporal correspondiente de la concentración de NADH. Los ensayos se realizaron en 1 ml, y el curso temporal de la concentración de NADH se determinó espectrofotométricamente a 340 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A con arreglo de diodos. Todas las enzimas utilizadas fueron de Sigma Chemical co. (St. Louis, Missouri).

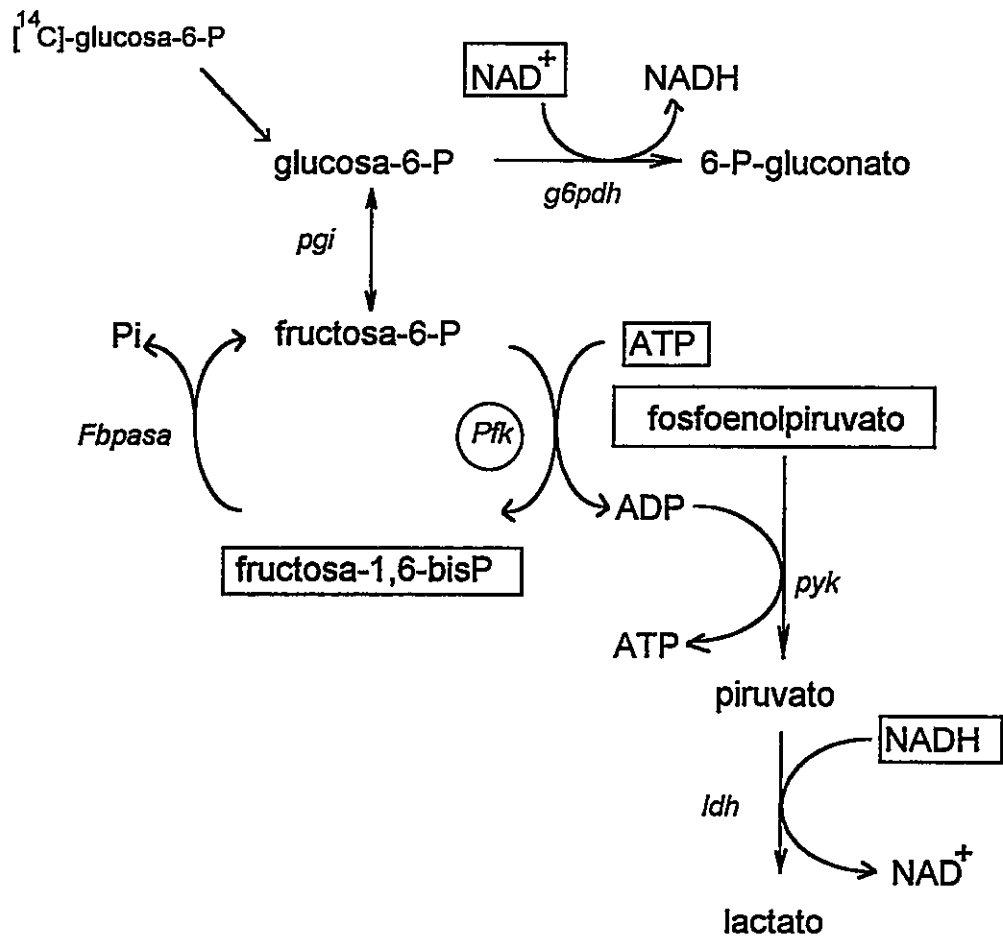
Figura 3 Esquemas de los sistemas de ensayo gluconeogénico (panel A) y glicolítico (panel B).

Los componentes enmarcados son aquellos cuya concentración al inicio del ensayo es distinta de cero.

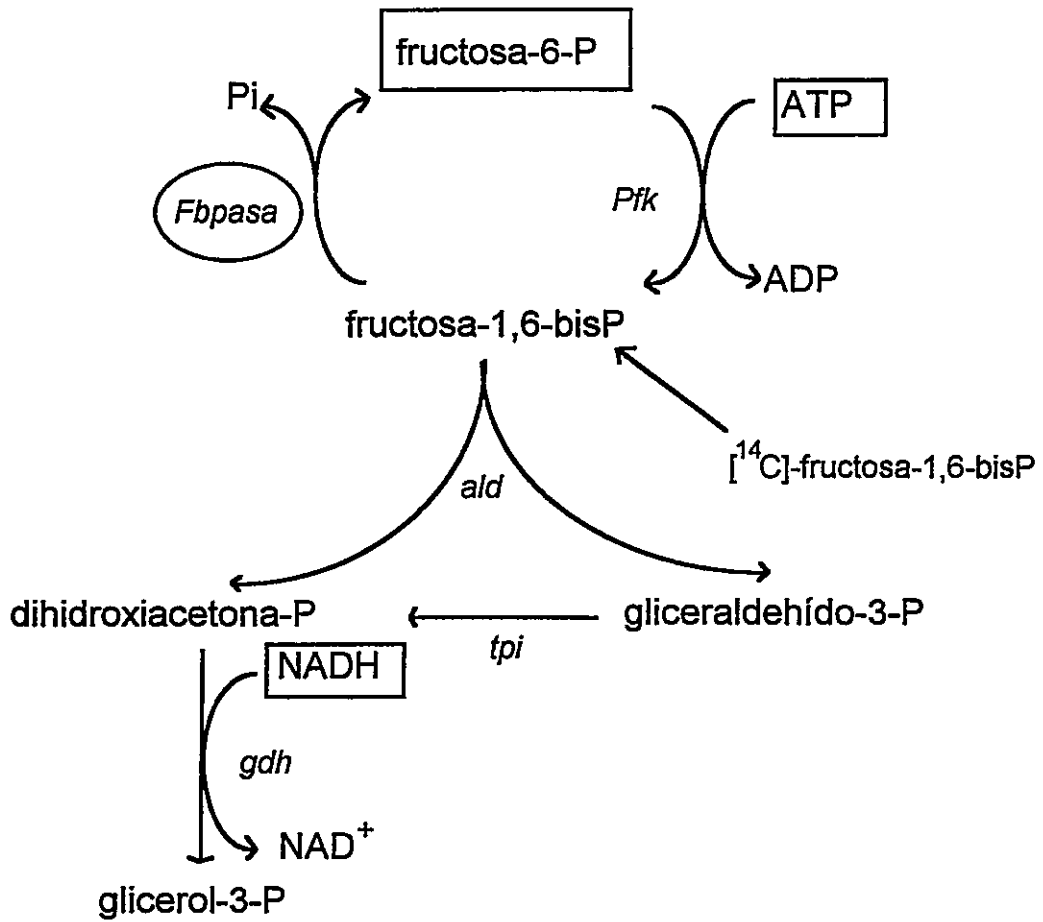
Panel A Ensayo de flujo gluconeogénico. El ensayo se inició con fructosa-1,6-bisP 2 mM. A los 3 min de iniciado el ensayo se agregó la [U-¹⁴C]-glucosa-6-P. En este ensayo la actividad de Pfk fue variable.

Panel B Ensayo de flujo glicolítico. El ensayo se inició con fructosa-6-P 1 mM. Un minuto después se agregó la [U-¹⁴C]-fructosa-1,6-bisP. En este ensayo la actividad de Fbpasa fue variable. Las enzimas fueron: *g6pdh*, glucosa-6-P deshidrogenasa; *pgi*, P-glucosa isomerasa; *pfk*, fosfofructoquinasa; *fbpase*, fructosa-1,6-bisfosfatasa; *pyk*, piruvato quinasa; *ldh*, lactato deshidrogenasa; *ald*, fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa; *tpi*, triosa-P isomerasa; *gdh*, glicero-P deshidrogenasa.

A. Ensayo gluconeogénico



B. Ensayo glicolítico



La Figura 3 B muestra un esquema del ensayo de flujo neto "glicolítico". En este caso, la fuente de carbonos es fructosa-6-P, de manera que el flujo neto de carbonos es en la dirección fructosa-6-P a triosafosfato. La fructosa-1,6-bisP producida es sustrato de la aldolasa, de la Fbpasa, o de ambas. La actividad de la aldolasa resultará en la oxidación de NADH a NAD⁺, vía la triosafosfato isomerasa y la α -glicerofosfato deshidrogenasa, con la consecuente disminución de la A₃₄₀. Una velocidad creciente de la reacción catalizada de la Fbpasa disminuirá la velocidad de la catalizada por aldolasa, al reducir el sustrato disponible para ésta. Por lo tanto, si se agregan cantidades variables de Fbpasa a un ensayo con una cantidad fija de Pfk, se puede calcular la velocidad de la reacción catalizada por la Fbpasa a partir de la pendiente del curso temporal de la A₃₄₀. Como la actividad de la Pfk es conocida, y constante, se puede calcular la magnitud del ciclo para cada cantidad de Fbpasa agregada.

La actividad nominal de la Fbpasa se determinó independientemente acoplando la producción de fructosa-6-P a la reducción de NAD⁺, vía la fosfoglucosa isomerasa y la glucosa-6-P deshidrogenasa, en la presencia de fructosa-1,6-bisP 1 mM. La cantidad de Fbpasa agregada se expresa como unidades de actividad medidas en esas condiciones. La velocidad de la reacción catalizada por la Fbpasa en el ensayo acoplado se determina a partir del correspondiente curso temporal del NADH. Las concentraciones de sales y sustratos fueron idénticas al ensayo gluconeogénico, con la excepción de que se agregó suficiente NADH para una A₃₄₀ de 0,7. Las actividades de las enzimas auxiliares fueron: 0,5 U de aldolasa, 13 U de triosafosfato isomerasa y 1,3 U de α -glicerofosfato deshidrogenasa.

ii. Experimentos de marcación por flujo inverso

En el ensayo gluconeogénico, la traza de marca radiactiva fue [U-¹⁴C]-glucosa-6-P, la que, como se muestra en la Figura 3 A sólo puede llegar a fructosa-1,6-bisP ya sea a través de actividad de la Fbpasa, que debería ser despreciable en esta situación, o a través de actividad de la Pfk, la que en este caso se varía para obtener diferentes tasas de ciclo fútil. En el ensayo glicolítico, la traza de marca radiactiva fue [U-¹⁴C]-fructosa-1,6-bisP, la que, como se muestra en la Figura 3 B sólo puede llegar a fructosa-6-P ya sea a través de actividad de la Pfk, que debería ser despreciable en esta situación, o a través de actividad de la Fbpasa, la que se varía para obtener diferentes tasas de ciclo fútil. La marcación radiactiva de fructosa-1,6-bisP y de fructosa-6-P en los ensayos gluconeogénico y glicolítico, respectivamente, se determinó por cromatografía de intercambio iónico (ver más adelante).

Una vez que se determinaron cinéticamente las diferentes tasas de ciclo en el espectrofotómetro usando ensayos de 1 ml, se prepararon ensayos a menor escala para los experimentos de marcación, con el fin de usar más eficientemente la marca radiactiva. Así, se agregaron aproximadamente 100.000 cpm de la traza radiactiva correspondiente a mezclas de ensayo de 50 µl a los 3 min (ensayo gluconeogénico) y 1 min (glicolítico) después de haber iniciado la reacción.

Un min después (en ambos casos) se agregó ácido perclórico a una concentración final de 3,5%. Posteriormente cada extracto se neutralizó con un equivalente de KHCO₃ y se sedimentó la fracción insoluble por centrifugación en una centrifuga Eppendorf (10 min). La fracción soluble se analizó por cromatografía de intercambio iónico, usando un equipo de HPLC (ver más arriba).

La [U-¹⁴C]-glucosa-6-P usada en el ensayo gluconeogénico se preparó a partir de [U-¹⁴C]-glucosa (Amersham; la actividad específica fue de 304 mCi/mmol) por tratamiento con hexoquinasa (de levadura; SIGMA, St. Louis, Missouri) durante 2 h en Tris-HCl 1 mM, pH 7,6, ATP 1 mM y MgCl₂ 2,6 mM, a 30°C. Se confirmó la eficiencia del tratamiento analizando los productos marcados de la reacción por cromatografía en una columna de intercambio iónico Carbowac PA1 (DIONEX). Virtualmente un 100% de la [U-¹⁴C]-glucosa se transformó en [U-¹⁴C]-glucosa-6-P y una pequeña cantidad de [U-¹⁴C]-fructosa-6-P. Para el ensayo glicolítico, se usó [U-¹⁴C]-fructosa-1,6-P disponible comercialmente (Amersham; la actividad específica fue 330 mCi/mmol).

iii. Análisis cromatográfico de los compuestos marcados

Los extractos perclóricos fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en una columna de intercambio iónico Carbowac PA1 (DIONEX). La columna se equilibró en: NaOH 50 mM (solución A). Se inyectó una alícuota del extracto y se eluyó con un gradiente la solución A y acetato de sodio 1 M en NaOH 100 mM (solución B). El gradiente usado fue 0% de solución B (0-10 min), seguido de entre 10% y 15% de solución B (10-20 min), entre 15% y 20% de solución B (20-21 min), entre 20% y 50% (21-51 min) y finalmente 50% de B entre 51 y 65 min. El eluido se pasó directamente a un contador de centelleo líquido en línea Beckman, el que enviaba los datos a un computador para su análisis.

Los picos de elución correspondientes a glucosa-6-P, fructosa-6-P, fructosa-1,6-bisP y glicerol-3-P se identificaron analizando cromatográficamente, bajo las mismas condiciones indicadas, los siguientes compuestos disponibles comercialmente: [U-¹⁴C]-glucosa-6-P, [U-¹⁴C]-fructosa-6-P, [U-¹⁴C]-fructosa-1,6-bisP

y [U-¹⁴C]-glicerol-3-P (Amersham). Para identificar [U-¹⁴C]-6-P-gluconato, se estableció el tiempo de elución de este compuesto preparado a partir de [U-¹⁴C]-glucosa-6-P tratada con glucosa-6-P deshidrogenasa. Lo mismo para dihidroxiacetona-P y gliceraldehído-3-P, que fueron preparados a partir de [U-¹⁴C]-fructosa-1,6-bisP con aldolasa. Las áreas bajo cada pico de elución se midieron usando un programa de computación *ad hoc*.

iv. Cálculo del porcentaje de ciclo fútil

Para este ensayo, mediremos la magnitud del ciclo fútil como la razón entre las velocidades de las reacciones catalizadas por fosfofructoquinasa y fructosabisfosfatasa, expresada como porcentaje.

Ensayo de flujo neto gluconeogénico. Para este ensayo, se puede demostrar que:

$$V_{Fbpasa} = V_{Pfk} + V_{Pgi}$$

$$\Delta NADH = V_{Pgi} - V_{Pfk}$$

en donde V_{Fbpasa} , V_{Pfk} y V_{Pgi} son las actividades efectivas de Fbpasa, Pfk y fosfoglucosa isomerasa, respectivamente, en el ensayo acoplado, y $\Delta NADH$ es la pendiente del curso temporal de la concentración de NADH, obtenida del curso temporal de la A_{340} . Como se conoce V_{Fbpasa} (se mide la actividad en ausencia de Pfk), el porcentaje de ciclo fútil, T_c , puede calcularse como:

$$T_c = 100 \frac{V_{Pfk}}{V_{Fbpasa}} = 50 \left(1 - \frac{\Delta NADH}{V_{Fbpasa}} \right)$$

Nótese que si $\Delta NADH$ es igual a $V_{Fbpassa}$ pero con signo negativo, T_c es 100%, mientras que si son iguales en valor y signo, T_c es 0%.

Ensayo de flujo neto glicolítico.

En este caso, el porcentaje de ciclo fútil es la razón de la velocidad de la reacción catalizada por la Fbpassa a la de catalizada por la Pfk. Para este ensayo, se puede demostrar que:

$$V_{Fbpassa} = \frac{\Delta NADH}{2} + V_{Pfk}$$

Si se conoce V_{Pfk} , entonces se puede calcular el porcentaje de ciclo fútil como:

$$T_c = 100 \frac{V_{Fbpassa}}{V_{Pfk}} = 100 \left(1 + \frac{\Delta NADH}{2V_{Pfk}} \right)$$

Nótese que si $\Delta NADH$ es igual a $-2V_{Pfk}$, T_c es 0%. Si $\Delta NADH$ es cero, entonces T_c es 100%. La única premisa usada en estos cálculos es que la actividad tanto de Pfk como Fbpassa es la misma independientemente de la actividad de la otra enzima en cada ensayo. Esto es razonable, ya que las actividades involucradas son tan bajas que su efecto sobre la concentración de sustrato (fructosa-1,6-bisP en el ensayo gluconeogénico y fructosa-6-P en el glicolítico) es despreciable. Sin embargo, para el ensayo gluconeogénico confirmamos esta premisa, midiendo las tasas de producción de fosfato inorgánico de cantidades fijas de Fbpassa a tasas de ciclo fútil variable. Confirmamos que la actividad de la Fbpassa fue la misma independientemente de la actividad de Pfk agregada. El fosfato inorgánico producido se midió por el método descrito por Babul y Guixé (Babul y Guixé, 1983). Para el ensayo glicolítico, no hay manera de medir independientemente la actividad de Pfk sin perturbar drásticamente las condiciones del ensayo.

10. Marcación por flujo inverso *in vivo*

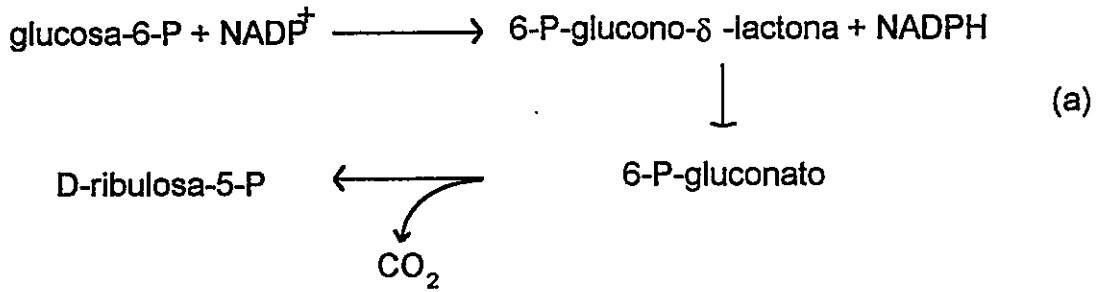
Para estos experimentos se usaron las mismas condiciones descritas en la sección 2.6, sólo que 10 min después de proporcionar el glicerol, se agregaron 2 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucosa (la actividad específica fue de 304 mCi/mmol). A tiempos variables después de esto, se extrajeron muestras con ácido perclórico, de forma idéntica a la descrita en la sección 2.6. Se midió la radiactividad en la fracción soluble en PCA y se cargó la misma cantidad de cuentas por min a la columna de análisis cromatográfico (ver sección 2. 8).

11. Un modelo para la producción de CO_2 en gluconeogénesis

i. Producción de CO_2 a partir de glicerol como fuente de masa y marca radiactiva

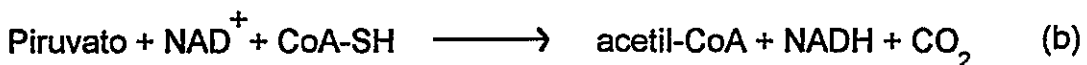
En esta sección se presenta un modelo matemático que busca establecer una relación entre las velocidades de flujo de carbonos en distintas ramas de la glicólisis y la gluconeogénesis y las tasas de producción de CO_2 . Este modelo tiene por objeto formalizar la relación entre ciclo fútil y tasas diferentes de producción de CO_2 y niveles de marcación de CO_2 a partir tanto de glicerol marcado, como de glucosa marcada en distintos carbonos.

En la Figura 4 se presenta un esquema simplificado de la glicólisis y gluconeogénesis y los puntos en que se libera CO_2 . Estos son fundamentalmente tres, que hemos reunido en dos grupos: i) rama oxidativa de ingreso al ciclo de las pentosas; ii) conversión de piruvato a acetil-CoA y ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Junto a cada CO_2 se indican los carbonos de glucosa que pueden liberarse como CO_2 en cada vía. En la rama oxidativa de ingreso al ciclo de las pentosas la liberación de CO_2 se produce en la serie de reacciones que transforman glucosa-6-P en D-ribulosa-5-P:



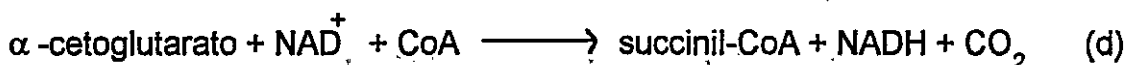
En la última reacción, catalizada por la 6-P-gluconato deshidrogenasa, se libera como CO_2 el carbono 1 de 6-P-gluconato, proveniente del carbono 1 de glucosa-6-P. En el esquema de la Figura 4 se indica que tanto el carbono 1 como el 6 de glucosa pueden liberarse como CO_2 en la rama oxidativa del ciclo de las pentosas. Esto considera la posibilidad de que ingresen por esta vía moléculas de glucosa-6-P que provienen de reciclaje desde el nivel de la reacción catalizada por la triosa-P isomerasa, donde los carbonos 1 y 6 provenientes de glucosa se isomerizan.

Otro punto en el que se libera CO_2 es la reacción siguiente:



En esta reacción el carbono del grupo carboxilo de piruvato es liberado como CO_2 . El origen glicolítico de este carbono es el carbono 1 de gliceraldehído-3-P, que a su vez proviene de los carbonos 3 y 4 de glucosa.

Por último, en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, se libera CO_2 en las siguientes reacciones:



El origen glicolítico de estos carbonos se encuentra en los carbonos 1, 2, 5 y 6

de la glucosa. En síntesis, en estas últimas tres reacciones se pueden liberar como CO_2 los seis carbonos de la glucosa. Si consideramos el origen de los carbonos liberados como CO_2 en término de los carbonos de glicerol, sólo el carbono 3 de éste puede liberarse como CO_2 a nivel de la rama oxidativa del ciclo de pentosas, mientras que, similarmente a los carbonos de gliceraldehído-3-P, los tres carbonos de glicerol pueden convertirse en CO_2 a nivel de las reacciones b, c y d.

En lo que sigue, denominaremos J_H al flujo de hexosas a través de la última reacción de la serie (1), i.e. aquella en la que se produce CO_2 . Similarmente, J_G representará el flujo de piruvato hacia el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Cada molécula de piruvato de ese flujo producirá tres moléculas de CO_2 . Por $J_{\text{CO}_2}^i$ designaremos la tasa de producción de CO_2 a partir del carbono i de glucosa o glicerol, según se indique. Por último, definiremos J_m como el flujo de entrada de la fuente de masa, glicerol, al sistema. Considerando el destino potencialmente diferencial de los carbonos de glicerol respecto a CO_2 , es fácil ver que:

$$J_{\text{CO}_2}^1 = J_m \cdot g$$

$$J_{\text{CO}_2}^2 = J_m \cdot g$$

$$J_{\text{CO}_2}^3 = J_m \cdot g + J_m \cdot \frac{(1-g)}{2}$$

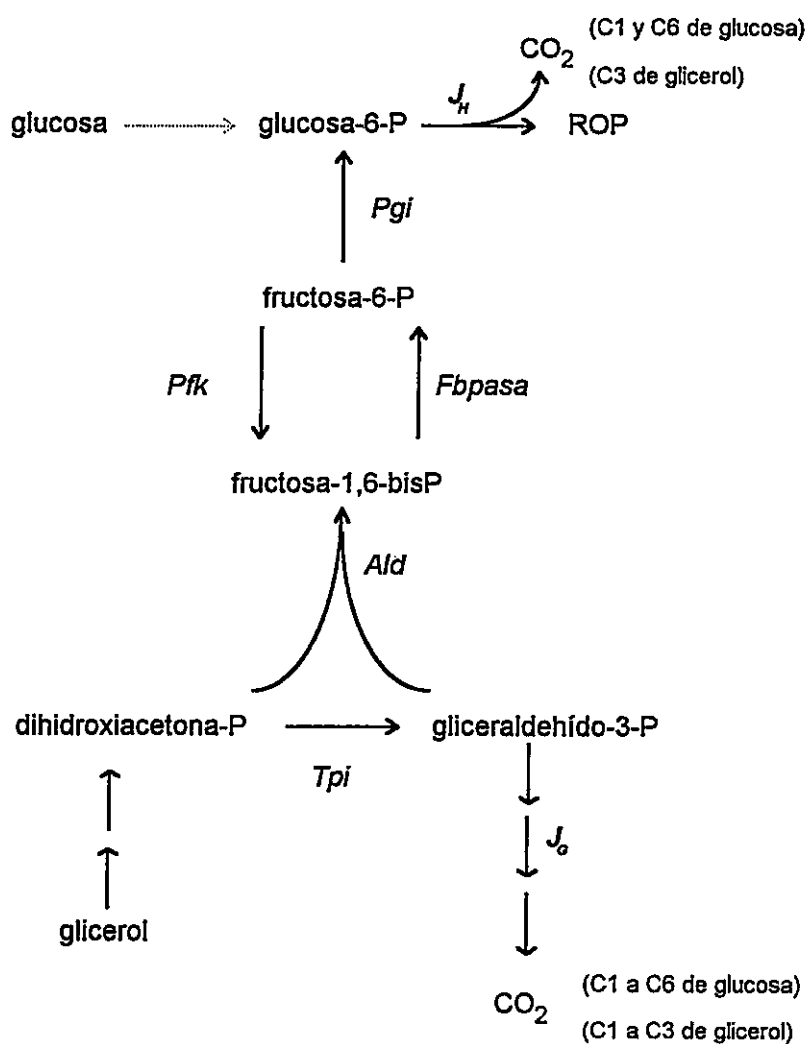


Figura 4 Puntos de producción de CO_2 en relación a reacciones de Pfk y Fbpasa.

Entre paréntesis se indican los carbonos de glucosa y glicerol que pueden liberarse como CO_2 en los puntos correspondientes. Las abreviaciones de enzimas siguen la norma de la figura anterior. Las direcciones de las flechas corresponden a una situación en que glicerol es la fuente de carbono.

donde g es la fracción de triosas derivadas de glicerol que se convierten en acetil-CoA e ingresan al ciclo de Krebs. En la última igualdad se introduce una división por 2 para dar cuenta del hecho de que se necesitan 2 moléculas de glicerol por cada una de hexosa formada a partir de ellas. Recordemos que cada una de estas hexosas producirá sólo una molécula de CO_2 . Si sumamos las tres ecuaciones, obtenemos una expresión para la producción de CO_2 a partir de glicerol como función del flujo de ingreso de glicerol al sistema y de la fracción de ese flujo destinada al ciclo de Krebs:

$$J_{\text{CO}_2}^{1-3} = J_m \cdot \frac{5g+1}{2} \quad \text{ecuación (i)}$$

En lo que sigue, mostraremos cursos temporales simulados de producción de CO_2 para situaciones transitorias (fuente de masa finita) en las que se varía g . Para esto, generamos primero una familia de funciones polinomiales que producen curvas del tipo presentado en la Figura 5 A, i.e. funciones arbitrarias cuya conducta es similar a la observada en situaciones transitorias: parten de un nivel basal, aumentan hasta un máximo (generalmente denominado estado semi-estacionario) para después disminuir de vuelta al nivel basal. Estas funciones no tienen un sentido físico o metabólico real, sino se usan meramente para simular el comportamiento de las variables g y J_m en el tiempo. Mientras que se usa una misma función para J_m en el tiempo (línea continua en Figura 5-A), la función que rige el curso temporal de g se hace variable en cuanto al máximo valor de g , desde 10% a 90% del flujo total de ingreso de la fuente de carbono. Los valores de estas curvas se usan en la ecuación (i) para obtener el curso temporal de la velocidad de producción de CO_2 . Al integrar este curso temporal, se obtienen las curvas de producción de CO_2 de la Figura 5 B. Este modelo predice que a medida que se aumenta la fracción del flujo de carbonos

destinada al ciclo de Krebs aumenta la velocidad de producción de CO_2 , lo que redonda en niveles finales más altos de CO_2 totales producido por el sistema. En la sección de Resultados, así como en la Discusión, compararemos estas curvas simuladas con datos experimentales y presentaremos argumentos que relacionan la variación de g con el aumento del ciclo fútil entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP por aumento de la actividad de la Pfk.

ii. Producción de CO_2 marcado a partir de glicerol como fuente de masa y [U- ^{14}C]glucosa como fuente de marca radiactiva

Con el fin de pesquisar la contribución relativa de distintas vías a la producción de CO_2 durante gluconeogénesis, se determinó el curso temporal de la producción de $^{14}\text{CO}_2$ en las cepas con distintas fosfofructoquinasas, en condiciones en que la fuente de carbono era glicerol y la fuente de radiactividad era [1- ^{14}C]glucosa o [6- ^{14}C]glucosa. A continuación se desarrolla un modelo matemático lineal, similar al de la sección anterior, que genera predicciones sobre la producción de CO_2 marcado radiactivamente en las condiciones descritas, nuevamente como función de la fracción del flujo de carbonos destinado al ciclo de Krebs versus el destinado al ciclo de pentosas a través de su rama oxidativa.

Partiremos con las siguientes expresiones:

$$J^1 = J_H^1 + J_G^1 \quad \text{ecuación (ii-a)}$$

$$J^6 = J_H^6 + J_G^6 \quad \text{ecuación (ii-b)}$$

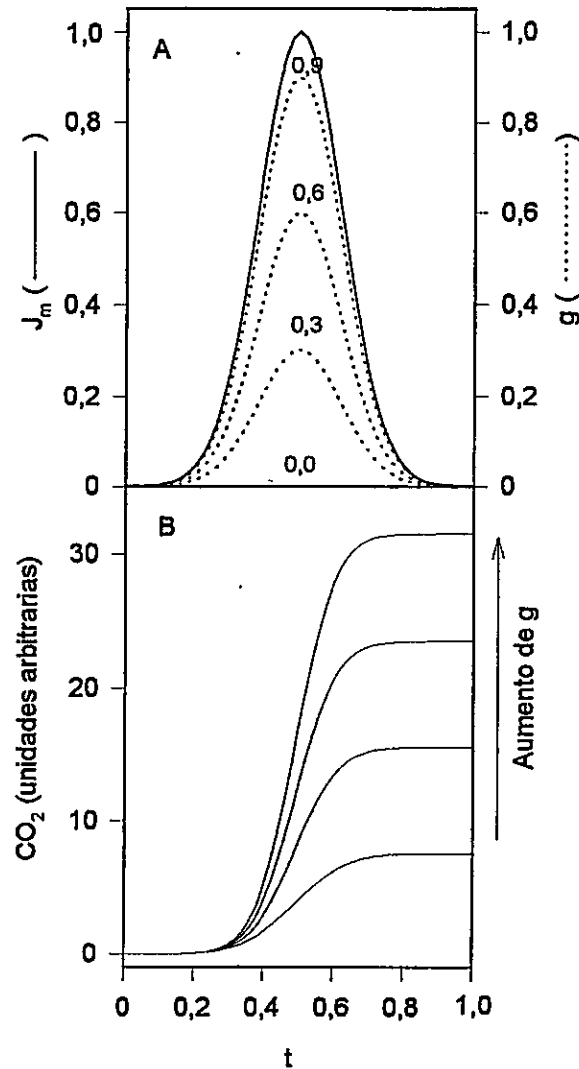


Figura 5 Simulación matemática de producción de CO_2 en el tiempo para niveles variables de g máximo.

Panel A Curso temporal de J_m (línea continua) y g (líneas punteadas). Los niveles máximos de g se indican sobre cada curva. Las curvas se obtuvieron con funciones polinomiales arbitrarias. Panel B Curso temporal de producción de CO_2 para las curvas con g máximo variable. La flecha a la derecha del gráfico indica la dirección en que aumenta g .

donde J^i es el flujo de marca radiactiva a CO_2 cuando la fuente de marca radiactiva es glucosa marcada en el carbono i ; J_H^i es la fracción del flujo total de radiactividad a CO_2 que llega a éste vía la rama oxidativa del ciclo de las pentosas; J_G^i es la fracción del flujo total de radiactividad a CO_2 que llega a éste vía las reacciones (2), (3) y (4) indicadas en la sección anterior. Con respecto a estos últimos flujos, consideremos el nivel al que puede ocurrir la isomerización de los carbonos provenientes de C-1 y C-6 de glucosa, en la Figura 6.

Las flechas blancas indican la dirección neta del flujo de masa cuando la fuente de masa es glicerol. Las negras indican la dirección del flujo de marca radiactiva cuando la fuente de ésta es glucosa marcada en C-1 (panel a) y C-6 (panel B). Como los carbonos C-1 y C-6 de fructosa-1,6-bisP van a dihidroxiacetona-P y gliceraldehído-3-P, respectivamente, la circulación de la marca radiactiva está invertida en un caso respecto del otro. Cuando la marca proviene de glucosa marcada en el carbono 1 (panel A) se puede establecer la siguiente relación entre los flujos indicados en la Figura 6:

$$J_{fbp-dha}^1 = J_{dha-g3p}^1 > J_{g3p-fbp}^1 \quad \text{ecuación (iii-a)}$$

La igualdad indica que el flujo de marca radiactiva desde fructosa-1,6-bisP a dihidroxiacetona-P será igual que el flujo desde ésta última a gliceraldehído-3-P. Como la fuente de carbono es glicerol, la pérdida de marca radiactiva por flujo de ésta desde dihidroxiacetona-P a glicerol-3-P debería ser despreciable. La desigualdad indica que el flujo de radiactividad desde gliceraldehído-3-P a fructosa-1,6-bisP es sólo una fracción del flujo que llega al primero desde dihidroxiacetona-P.

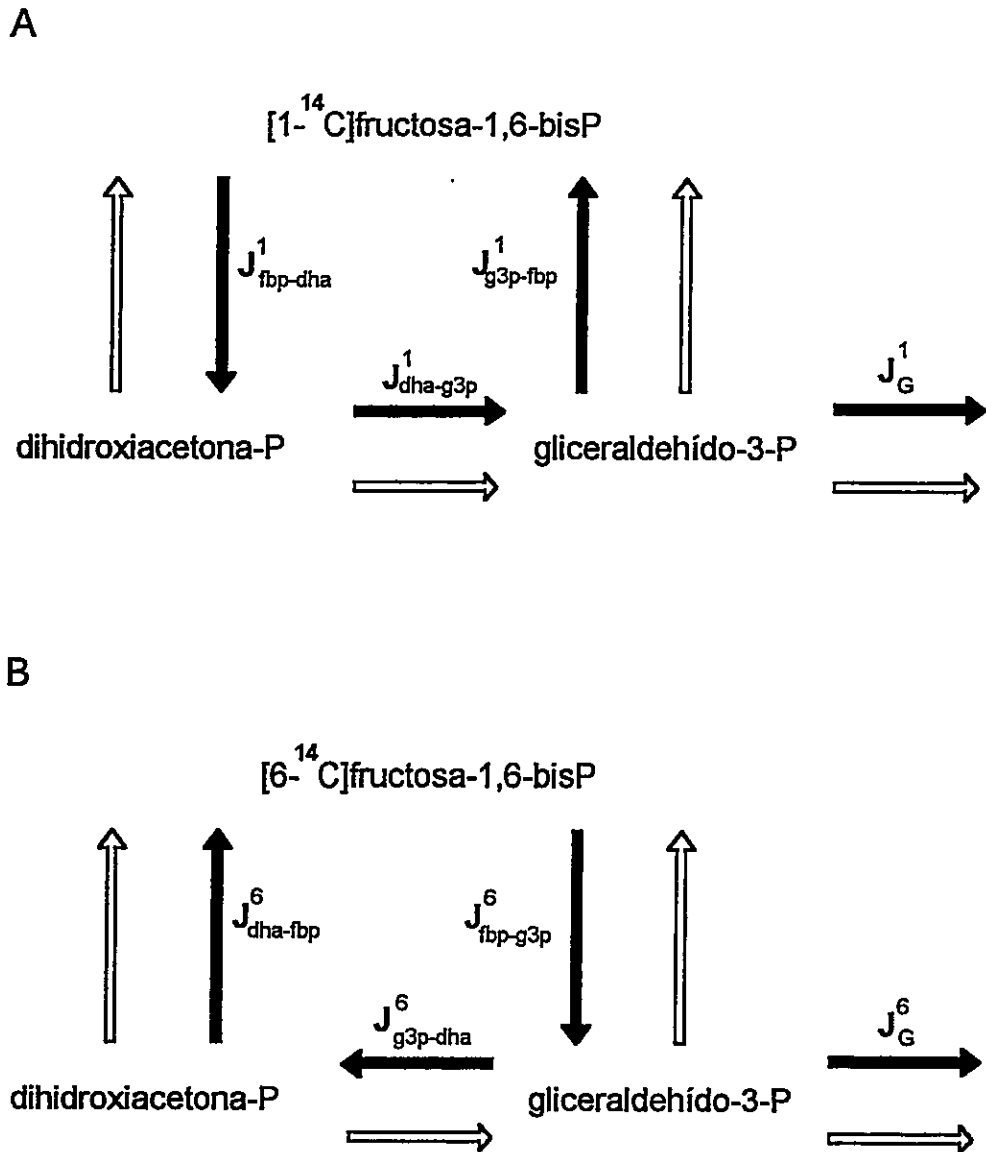


Figura 6 Flujo de masa y radiactividad en torno a la reacción catalizada por triosa-P isomerasa.

Panel A, dirección de los flujos de masa (flechas blancas) y radiactividad (flechas negras) cuando la fuente de masa es glicerol y la de radiactividad $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa. Panel B, dirección de los flujos de masa (flechas blancas) y radiactividad (flechas negras) cuando la fuente de masa es glicerol y la de radiactividad $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa.

Si la fuente de marca radiactiva es glucosa marcada en el carbono 6, con un razonamiento similar se llega a:

$$J_{fbp-g3p}^6 > J_{g3p-dha}^6 = J_{dha-fbp}^6 \quad \text{ecuación (iii-b)}$$

Además, como hemos supuesto que el flujo de radiactividad de dihidroxiacetona-P a glicerol-3-P es despreciable:

$$J_{fbp-dha}^1 = J_{fbp-g3p}^6 \quad \text{ecuación (iv)}$$

Entonces:

$$J_{g3p-fbp}^1 = a \cdot J_{fbp-dha}^1 \quad \text{ecuación (v-a)}$$

$$J_{g3p-dha}^6 = b \cdot J_{fbp-g3p}^6 \quad \text{ecuación (v-b)}$$

donde

$$0 < a < 1 \text{ y } 0 < b < 1$$

En toda reacción, el flujo de marca radiactiva será mayor cuando coincide con el flujo neto de masa de la reacción que cuando se opone al mismo. Como el flujo neto de masa en nuestro sistema es gluconeogénico, como lo indican las flechas blancas en la figura 6:

$$a > b$$

Por lo tanto:

$$J_G^1 = J_{fbp-dha}^1 \cdot (1 - a) \quad \text{ecuación (vi-a)}$$

$$J_G^6 = J_{fbp-g3p}^6 \cdot (1-b) \quad \text{ecuación (vi-b)}$$

Volviendo a las ecuaciones (ii-a) y (ii-b) y usando las expresiones (iv), (vi-a) y (vi-b):

$$J^1 = J_R^1 + J_{fbp-dha}^1 \cdot (1-a) \quad \text{ecuación (vii-a)}$$

$$J^6 = J_R^6 + J_{fbp-dha}^6 \cdot (1-b) \quad \text{ecuación (vii-b)}$$

¿Qué sucede si el flujo gluconeogénico de masa disminuye y el glicolítico aumenta en la misma proporción? Si el flujo glicolítico aumenta por un factor dado, el flujo de marca de [$1-^{14}\text{C}$]fructosa-1,6-bisP a dihidroxiacetona-P aumentará en la misma proporción, mientras que el flujo de marca de gliceraldehído-3-P a fructosa-1,6-bisP disminuirá en la misma proporción. Se puede mostrar que si el flujo glicolítico aumenta en un factor igual a c , las nuevas tasas de flujo de marca radiactiva a CO_2 serán:

$$J^{1*} = J_R^1 \cdot (1-c) + J_{fbp-dha}^1 \cdot (1+c) \cdot (1-a) \quad \text{ecuación (viii-a)}$$

$$J^{6*} = J_R^6 \cdot (1-c) + J_{fbp-dha}^6 \cdot (1+c) \cdot (1-b) \quad \text{ecuación (viii-b)}$$

donde $0 < c < 1$.

A partir de estas expresiones, podemos generar una expresión que relacione la producción diferencial de CO_2 marcado radiactivamente a partir de glucosa marcada en los carbonos 1 o 6, durante gluconeogénesis ($\Delta\text{CO}_2(1-6)$) con c , la fracción en que se incrementa el flujo de masa glicolítico a expensas del gluconeogénico:

$$\Delta CO_2(1-6) = J_m \cdot [(J_R^1 - J_R^6) \cdot (1-c) - J_{fbp-dha}^1 \cdot (1+c) \cdot (a-b)] \quad \text{ecuación (viii-c)}$$

En esta ecuación hemos introducido el factor J_m , que representa el flujo de entrada de la fuente de masa (glicerol) al sistema, y de cuya conducta en el tiempo dependerán todos los flujos del sistema. Esto se hace para poder generar cursos temporales simulados de la variable $\Delta CO_2(1-6)$. Para generar estos cursos temporales simulados, se procede de manera idéntica a la indicada en la sección anterior, usando funciones polinomiales arbitrarias que simulan cursos temporales transitorios de J_m y c . Ya hemos discutido la forma general del curso temporal de J_m . En cuanto al curso temporal de c , también usaremos funciones que aumentan, desde un nivel basal hasta un máximo para volver al nivel basal. Posteriormente discutiremos el fundamento de esta conducta.

En la Figura 7 A se muestra el curso temporal generado para las variables J_m (línea continua) y c (líneas punteadas), en donde el c máximo varió entre 0,0 y 0,9. En la Figura 7 B en tanto, se muestran los cursos temporales de la variable $\Delta CO_2(1-6)$ (ver ecuación viii-c) para los distintas curvas de c del panel A. La simulación indica que a medida que se aumenta el valor de c máximo, el valor final de $\Delta CO_2(1-6)$ disminuye, siendo negativo para los casos en que el c máximo es 0,6 y 0,9. En las figura 7 C se grafica el curso temporal simulado de J^{1*} (línea continua; ver ecuación viii-a) y J^{6*} (línea punteada; ver ecuación viii-b) para dos niveles extremos de c máximo: 0,0 (panel C) y 0,9 (panel D). Resulta evidente de estas figuras lo observado en el panel B: a medida que se aumenta el c máximo, aumenta J^{6*} y disminuye J^{1*} , lo que redundo en valores negativos de $\Delta CO_2(1-6)$.

En la simulación de la Figura 7, el curso temporal de J_m coincide con los distintos cursos temporales de c en cuanto a su posición a lo largo del eje tiempo. Si

se varía esto, la forma de los cursos temporales del $\Delta CO_2(1-6)$ se modifica, como se aprecia en la figura 8. En los paneles A y C, el curso temporal de la variable c se adelanta y retrasa, respectivamente, con respecto al de J_m . En los paneles B y D, en tanto, se grafican los cursos temporales del $\Delta CO_2(1-6)$ resultantes. Por ahora nos limitaremos a notar que el desplazamiento relativo del curso temporal de la variable c genera formas diferentes de los cursos temporales de $\Delta CO_2(1-6)$, afectando tanto el punto en el tiempo en el cual éstas se desvían de cero, así como el valor mínimo alcanzado y el valor final. Estos resultados se discutirán en el contexto de los resultados experimentales correspondientes (sección III. 8.)

Figura 7 Simulación matemática de producción de CO_2 radiactivo a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa y $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa durante gluconeogénesis: efecto de niveles variables de c máximo.

Panel A, curso temporal de J_m (línea continua) y c (serie de curvas punteadas). De mayor a menor los c máximos fueron: 0,9; 0,6; 0,3 y 0,0. Panel B, curso temporal del $\Delta\text{CO}_2[1-6]$ para los distintos niveles de c máximo del panel A. La flecha indica el aumento de c máximo. Para generar estas curvas se usó la ecuación (viii-c) con los siguientes parámetros: $J^1_R=1$; $J^6_R=0,05$; $a=0,5$; $b=0,05$ y $J_{\text{fbp-dha}}=1$. Panel C, curso temporal de J_1 (línea continua) y J_6 (línea punteada) para un c máximo de 0,0 (la diferencia entre estas curvas, J_1-J_6 , da la curva indicada con un "0,0" en el panel B. Panel D, curso temporal de J_1 (línea continua) y J_6 (línea punteada) para un c máximo de 0,9 (la diferencia entre estas curvas, J_1-J_6 , da la curva indicada con un "0,9" en el panel B.

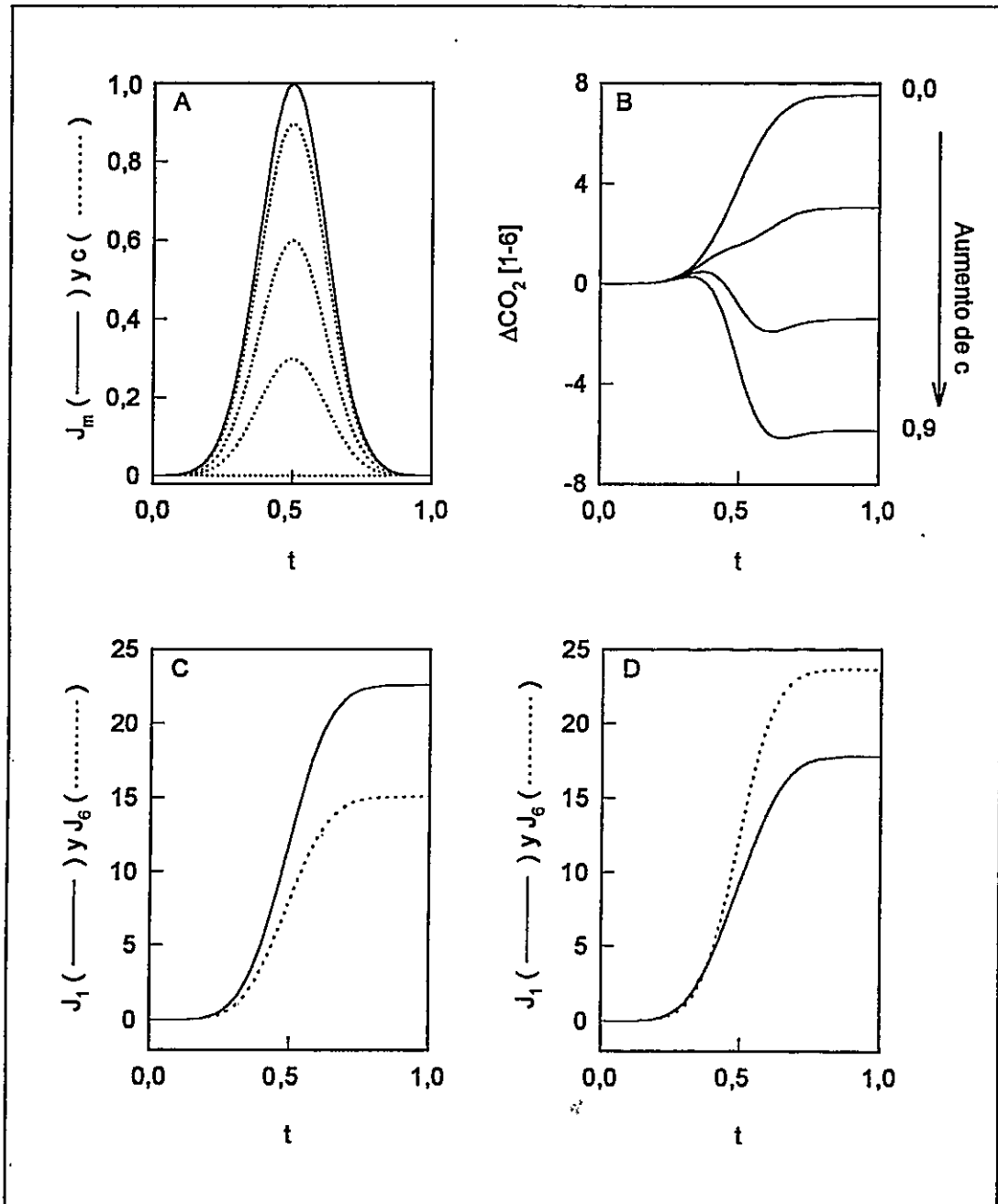


Figura 7

Figura 8 Simulación matemática de producción de CO_2 radiactivo a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa y $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa durante gluconeogénesis: efecto de posición relativa de curvas que rigen c y J_m .

Panel A, curso temporal de J_m (línea continua) y c (serie de curvas punteadas). De mayor a menor los c máximos fueron: 0,9; 0,6; 0,3 y 0,0. El máximo de las curvas de c fue a $t=0,4$ y el de J_m a $t=0,5$. Panel B, curso temporal del $\Delta\text{CO}_2[1-6]$ para los distintos niveles de c máximo del panel A. La flecha indica el aumento de c máximo. Para generar estas curvas se usó la ecuación (viii-c) con los siguientes parámetros: $J^1_R=1$; $J^6_R=0,05$; $a=0,5$; $b=0,05$ y $J_{fbp-dha}=1$. Panel C, curso temporal de J_m (línea continua) y c (serie de curvas punteadas). De mayor a menor los c máximos fueron: 0,9; 0,6; 0,3 y 0,0. El máximo de las curvas de c fue a $t=0,6$ y el de J_m a $t=0,5$. Panel D, curso temporal del $\Delta\text{CO}_2[1-6]$ para los distintos niveles de c máximo del panel C. La flecha indica el aumento de c máximo. Para generar estas curvas se usó la ecuación (viii-c) con los siguientes parámetros: $J^1_R=1$; $J^6_R=0,05$; $a=0,5$; $b=0,05$ y $J_{fbp-dha}=1$.

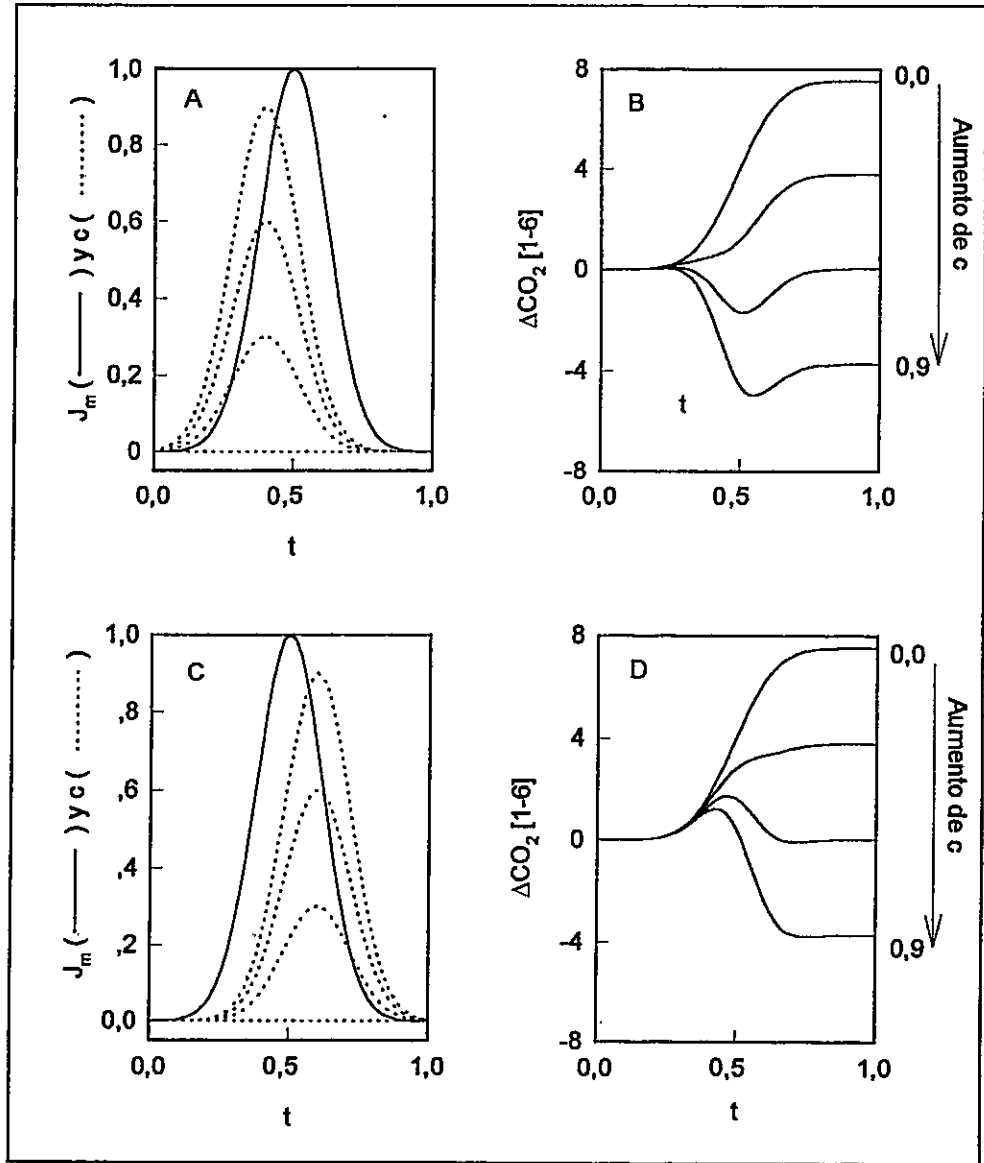


Figura 8

III. RESULTADOS

1. MODELO DE ENSAYO *IN VITRO*

i. Propiedades cinéticas relevantes de las fosfofructoquinasas purificadas

Se caracterizaron cinéticamente las tres Pfk purificadas. En primer lugar, en la Figura 9 se muestra la velocidad inicial con respecto a la concentración de fructosa-6-P para Pfk-1 en presencia y ausencia de GDP (activador) y fosfoenolpiruvato (inhibidor). Nuestra preparación de esta enzima exhibe la dependencia hiperbólico/sigmoidea ya descrita (Babul, 1978; Blangy, et al., 1968). Esta enzima exhibe *in vitro* una clara sensibilidad a fosfoenolpiruvato y GDP, particularmente a concentraciones bajas de fructosa-6-P, que son las que predominan en situaciones gluconeogénicas en *E. coli* (Daldal, et al., 1982).

En la Figura 10 (A y B) se muestra la velocidad inicial contra la concentración de MgATP, a dos concentraciones de fructosa-6-P (0,1 mM y 1,0 mM), para Pfk-2* (panel A) y Pfk-2 (panel B). Esta caracterización también se ajusta a la hecha previamente por quienes aislaron y caracterizaron estas enzimas (Babul, 1978; Guixé y Babul, 1985).

Como se observa, Pfk-2* no es inhibida a concentraciones altas de MgATP a una concentración de fructosa-6-P (0,1 mM) a la cual Pfk-2 (panel B) es fuertemente inhibida. A una concentración mayor de fructosa-6-P, ninguna de estas dos fosfofructoquinasas es inhibida significativamente. Esta conducta regulatoria diferente es la base sobre la cual hemos elaborado nuestra hipótesis

del ciclo fútil como base del fenotipo de crecimiento lento en fuentes de carbono gluconeogénicas de Pfk-2*.

Concluimos que las tres fosfofructoquinasas purificadas para el presente trabajo exhiben las características cinéticas que ya se habían descrito, y que por lo tanto son apropiadas para el estudio planteado.

ii. El modelo de simulación numérica del modelo *in vitro*

Como ya lo señalamos en Materiales y Métodos, se elaboró un modelo teórico de simulación numérica del modelo de ensayo *in vitro*. El propósito de esto fue constatar que las propiedades cinéticas y regulatorias de las tres fosfofructoquinasas son suficientes para explicar su conducta en el modelo de ensayo *in vitro*. El modelo de simulación se construyó a partir de un conjunto de funciones arbitrarias de velocidad, las que se asociaron en relaciones de producción y consumo en base al esquema del modelo *in vitro* de la Figura 2. Los valores de los parámetros de estas funciones se buscaron por aproximación hasta alcanzar un grado razonable de ajuste con las curvas cinéticas experimentales de cada enzima.

En la Figura 11 se muestra el grado de ajuste de las curvas generadas por estas funciones para los correspondientes datos experimentales. En el caso de Pfk-1, sólo se obtuvo una ecuación ajustada a los datos de velocidad en presencia de fosfoenolpiruvato (2 mM), ya que el diseño del modelo *in vitro* requiere *a fortiori* realizar el ensayo en presencia de este compuesto, y por ende ésa es la única situación que resulta atingente simular.

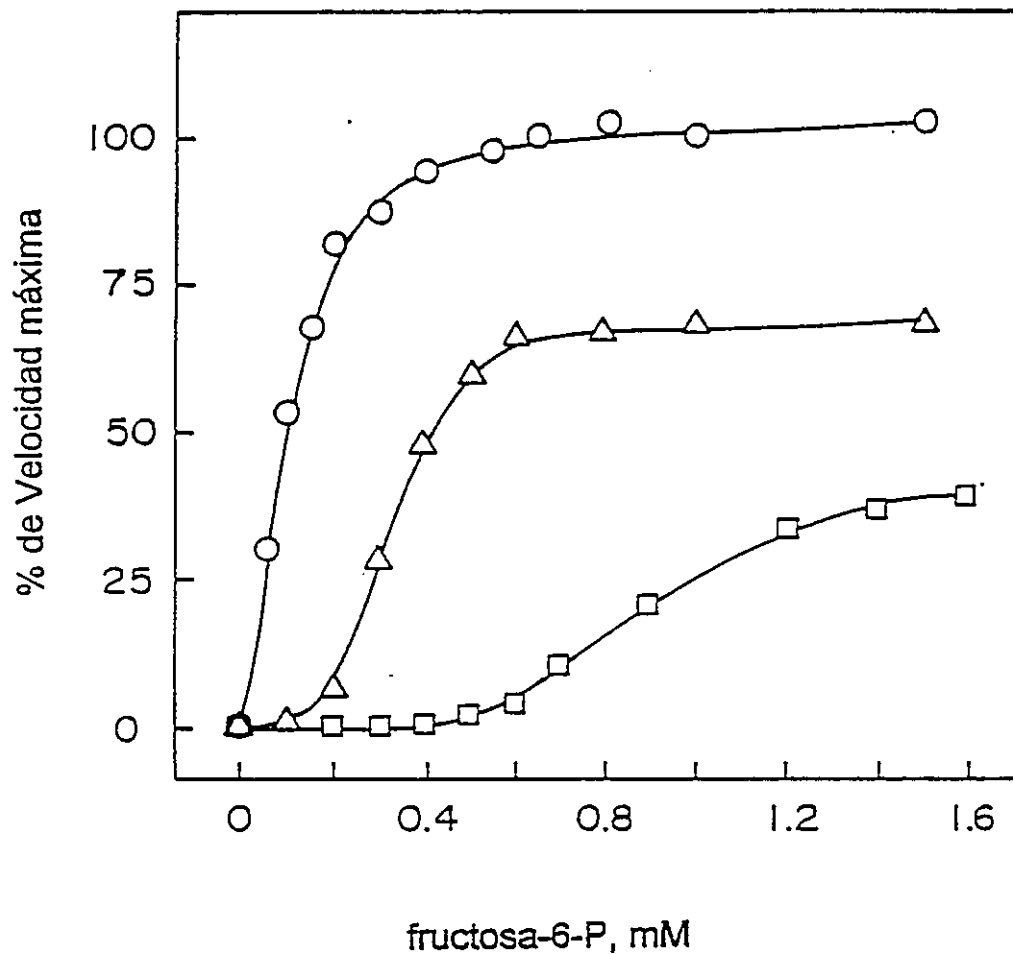


Figura 9 Efecto de la concentración de fructosa-6-P y acción de efectores sobre la actividad de Pfk-1.

Velocidad inicial (como % de la V_{max}) de Pfk-1 versus la concentración de fructosa-6-P en ausencia de efectores (Δ), en presencia de 2 mM GDP, activador (O) y de 2 mM fosfoenolpiruvato, inhibidor (\square). La concentración de MgATP fue constante (1 mM). Se tomó como 100% la actividad en presencia de 1 mM fructosa-6-P y 2 mM GDP.

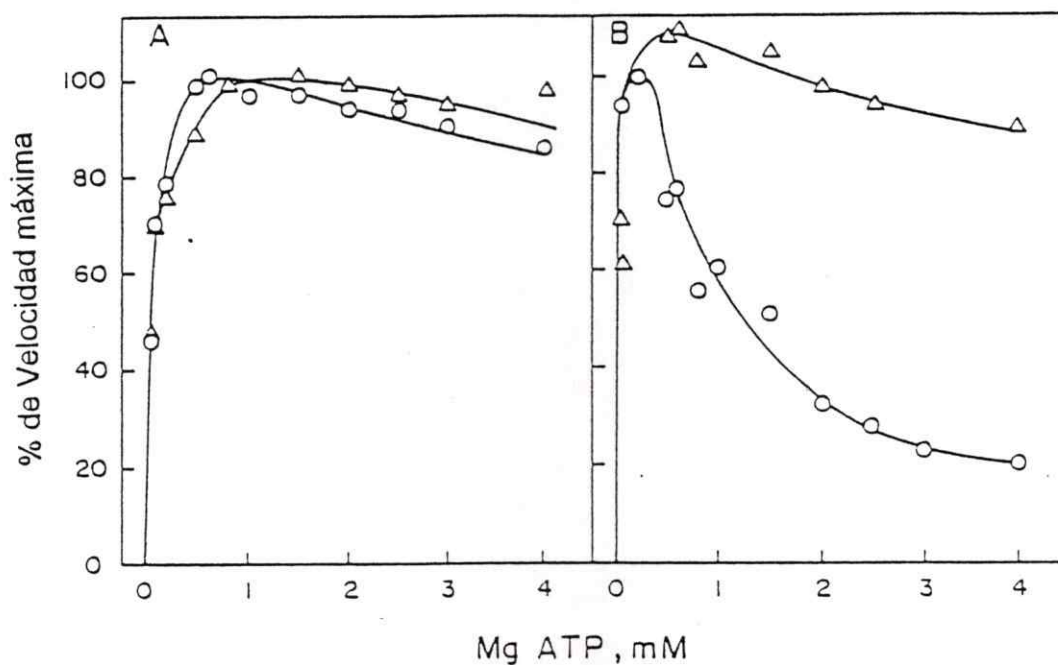


Figura 10 Actividad de Pfk-2 y Pfk-2* como función de la concentración de MgATP a dos concentraciones de fructosa-6-P.

Panel A: Pfk-2*; panel B: Pfk-2. La velocidad se expresa como porcentaje de la velocidad máxima observada en presencia de fructosa-6-P 0,1 mM en cada caso. La actividad se ensayó en presencia de fructosa-6-P 0,1 mM (O) y 1,0 mM (Δ), con un exceso constante de Mg^{2+} de 1,0 mM.

Como se aprecia en la Figura 11, la curva generada por la respectiva ecuación se ajusta bastante bien a los datos. Para los propósitos de esta sección, ese ajuste no requiere una calificación más precisa. Lo mismo puede decirse de los ajustes respectivos para los datos de actividad de Pfk-2 y Pfk-2*. Más adelante discutiremos qué grado de impacto pueden tener las desviaciones de estos ajustes sobre los resultados de las simulaciones.

iii. Curvas de progreso de NADH en el modelo *in vitro*

En la Figura 12 (A y B) se muestra un conjunto representativo de curvas de progreso para el modelo de ensayo acoplado (ver Figura 2 para esquema del modelo). Las pendientes respectivas de las curvas y los flujos deducidos a partir de ellas, así como el porcentaje de ciclo fútil calculada, se muestran en la Tabla 1. En el experimento de la Figura 12-A la concentración de MgATP es 0.2 mM, y en esas condiciones el par Pfk-1/Fbpasa da una curva de progreso de A_{340} con una pendiente aproximadamente igual a la actividad de Fbpasa presente en el ensayo: 0,048 μ moles/min ml versus 0,05 μ moles/min ml (Tabla 1). En otras palabras, la velocidad de la reacción catalizada por Pfk-1 es apenas un 2% de la catalizada por la Fbpasa, y por lo tanto el 98% de la actividad de esta última se traduce en actividad de Pgi y G6pdh, i.e. en reducción de NAD^+ a NADH.

Si comparamos este resultado con la curva de progreso predicha por el modelo de simulación (Figura 13-A) y con el flujo y porcentaje de ciclo obtenidos a partir de ella (Tabla 2), vemos que el modelo genera la curva correspondiente con una velocidad de la reacción catalizada por la Pfk que es el 0,1% de la catalizada por la Fbpasa.

Figura 11 Ajuste de las funciones de velocidad usadas en la simulación numérica del modelo *in vitro*.

En cada gráfico los símbolos corresponden a datos experimentales y las curvas a la ecuación utilizada. Los gráficos para Pfk-2 y Pfk-2* se presentan a dos concentraciones de fructosa-6-P, tal como se indica. Para Pfk-1 sólo se presentan los datos y curva correspondientes al ensayo en presencia de fosfoenolpiruvato 2 mM, condición en que opera el modelo de ensayo *in vitro*.

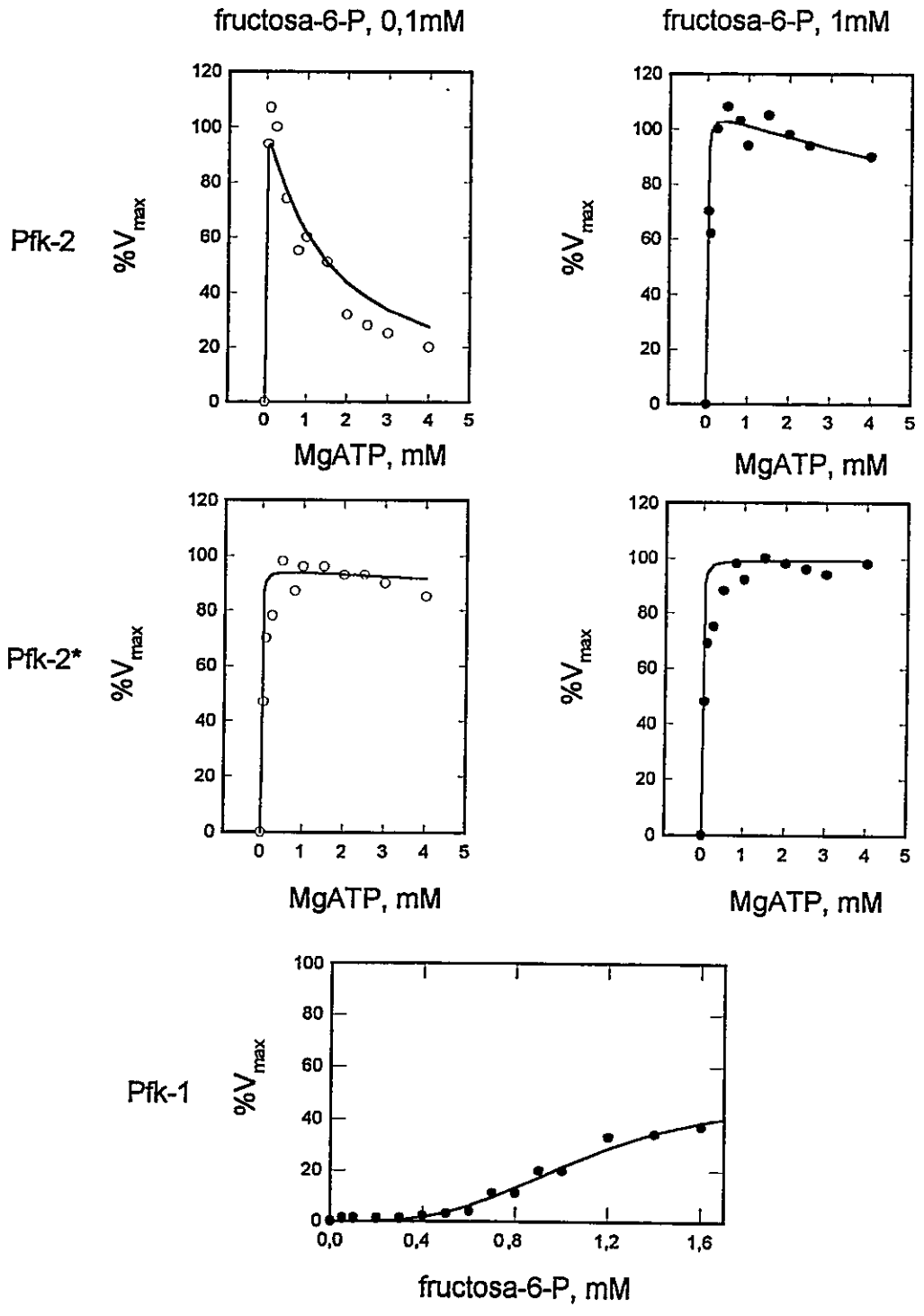


Figura 11

De acuerdo a la simulación, la concentración de fructosa-6-P que se alcanza es del orden de 0,001 mM, lo que indicaría, de acuerdo a la Figura 11-A, que Pfk-1 está muy inhibida (tanto en el ensayo como en la simulación se usó una concentración inhibitoria de fosfoenolpiruvato). El que la razón de velocidades predicha por el modelo sea significativamente inferior a la observada (0,1% versus 2%) puede deberse a inexactitudes en los parámetros cinéticos usados en la simulación, ya que éstos fueron obtenidos por ajuste, sin haberse determinado su valor en las condiciones exactas del ensayo *in vitro*. Es posible entonces que fructosa-6-P alcance en el ensayo *in vitro* una concentración más alta, lo que redundaría en mayor velocidad de la reacción catalizada por la Pfk-1.

Esta conducta de Pfk-1 es esperable dado que el ensayo se realiza con una concentración inicial de fosfoenolpiruvato que es claramente inhibitoria (2 mM; ver Figura 8) mientras que la concentración del activador, ADP, debe ser despreciable, debido tanto a la baja actividad de Pfk, que lo genera, como a la presencia de la piruvatoquinasa, que consume inmediatamente el que se produce.

En el caso en que la concentración de MgATP es 3 mM, Figura 12-B, la curva de Pfk-1 es idéntica a la anterior, pues estando la enzima inhibida, el aumento de este sustrato no produce efectos. Como se indica en la Tabla 1, el porcentaje de ciclo fútil también es cero en este caso. Lo mismo se aplica a los resultados correspondientes de la simulación (Figura 13-B y Tabla 2).

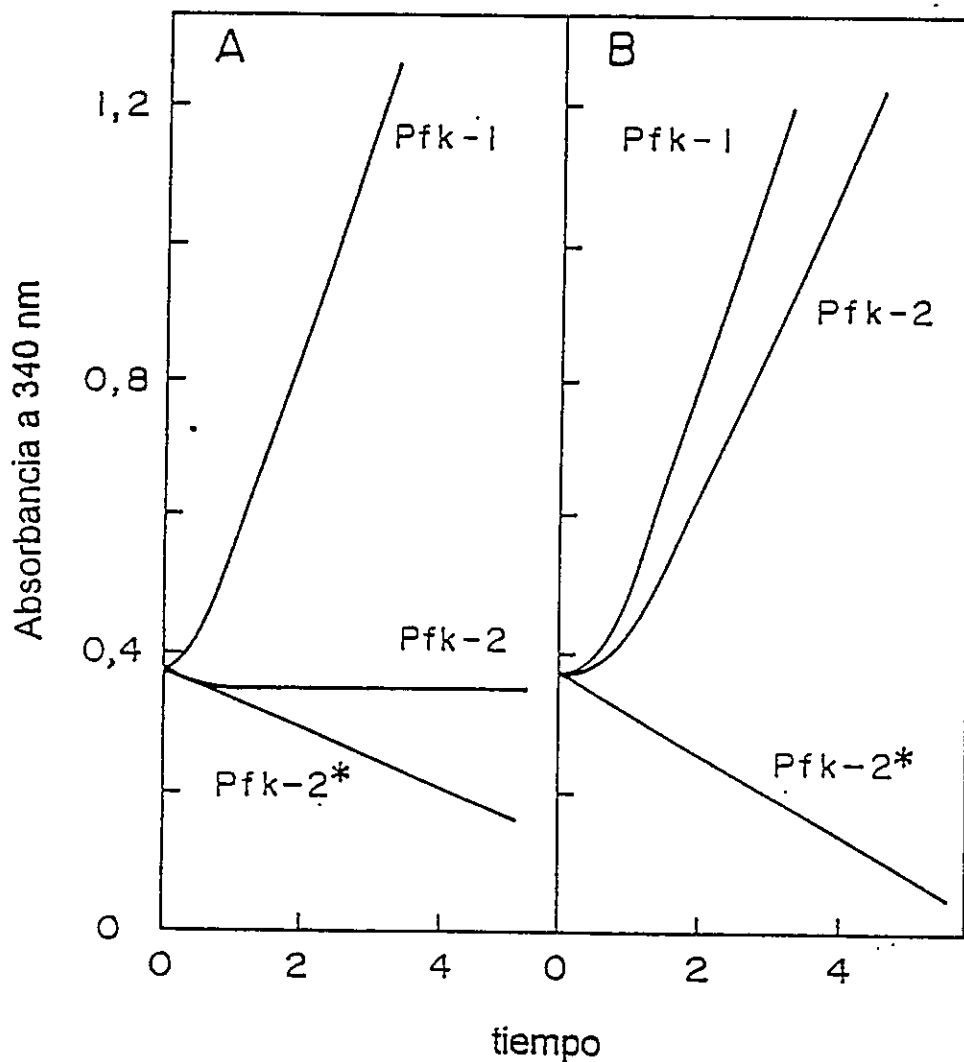


Figura 12 Curvas de progreso de serie de ensayos representativos del modelo *in vitro*.

Se siguió el curso temporal de la A_{340} para ensayos con las siguientes combinaciones: Pfk-1/Fbpasa; Pfk-2/Fbpasa y Pfk-2*/Fbpasa. La concentración inicial de fructosa-1,6-bisP fue 2 mM en todos los casos.

Panel A: MgATP 0,2 mM; panel B: MgATP 3,0 mM

Tabla 1 Valores calculados de actividad de Pfk y Fbpasa y tasas de ciclo fútil para datos experimentales

	Δ NADH (μ moles/ml min)		JPfk (μ moles/ml min)		JFbpasa (μ moles/ml min)		% ciclo fútil	
	MgATP, mM		MgATP, mM		MgATP, mM		MgATP, mM	
	0,2	3	0,2	3	0,2	3	0,2	3
Pfk-1	0,048	0,048	0,001	0,001	0,05	0,05	2	2
Pfk-2	0,000	0,032	0,025	0,009	0,05	0,05	50	18
Pfk-2*	-0,006	-0,009	0,028	0,029	0,05	0,05	56	60

Tabla 2 Valores calculados de actividad de Pfk y Fbpasa y tasas de ciclo fútil para datos de simulación numérica

	Δ NADH (μ moles/ml min)		JPfk (μ moles/ml min)		JFbpasa (μ moles/ml min)		% ciclo fútil	
	MgATP, mM		MgATP, mM		MgATP, mM		MgATP, mM	
	0,2	3	0,2	3	0,2	3	0,2	3
Pfk-1	0,049	0,049	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	0,05	0,05	0,1	0,1
Pfk-2	-0,003	0,041	0,026	0,004	0,05	0,05	53	9,3
Pfk-2*	-0,030	-0,022	0,040	0,036	0,05	0,05	80	72

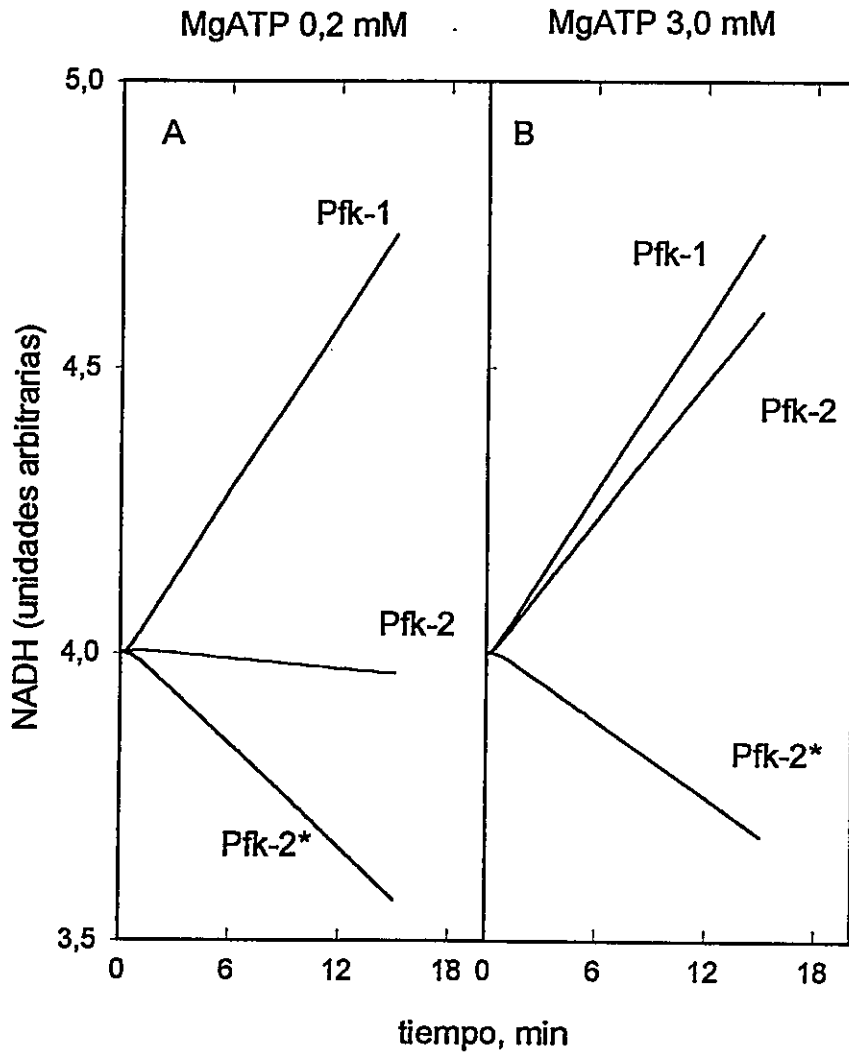


Figura 13 Curvas de progreso de concentración de NADH simuladas de acuerdo al modelo.

El modelo de simulación numérica se aplicó a las condiciones del ensayo ilustrado en la Figura 12.

Panel A: MgATP 0,2 mM; panel B: MgATP 3 mM.

En la misma Figura 12-A observamos que la pendiente de la curva de progreso de NADH para el ensayo con Pfk-2 es cercana a cero, aunque levemente negativa, cuando la concentración de MgATP es 0,2 mM. Es decir, a concentraciones bajas de MgATP no hay consumo ni producción netas de NADH, o en otras palabras se está consumiendo tanto NADH como el que se está produciendo, lo que indica que la actividad de la porción Pgi/G6pdh es idéntica a la de la porción Pyk/Ldh, i.e. una cantidad similar de moléculas de fructosa-6-P están siendo consumidas por Pfk-2 como por Pgi. Esto se refleja en el porcentaje de ciclo fútil calculado para esta curva (Tabla 1) que es del 50%. En la Figura 12-B y Tabla 1 se aprecia que al subir la concentración de MgATP a 3 mM, la curva de progreso se hace claramente positiva, con una pendiente que indica que la actividad de Pfk-2 es apenas un 18% de la actividad de Fbpasa, i.e. un 82% de la fructosa-6-P producida sigue el camino de la fosfoglucosa isomerasa. Esto es lo esperable dada la sensibilidad de Pfk-2 a inhibición por MgATP a bajas concentraciones de fructosa-6-P. Por lo tanto, el aumento de MgATP de 0,2 mM a 3 mM resulta en una reducción del porcentaje de ciclo fútil en más de un 60%.

En la Figura 13 y Tabla 2, la simulación numérica respectiva para MgATP 0,2 mM indica que la actividad de Pfk-2 predicha en el modelo alcanza a un 53% de la actividad de Fbpasa, cifra similar a la obtenida en el ensayo. Al subir la concentración de MgATP a 3 mM, ésta se reduce a un 9,3%, valor más bajo que el 18% observado experimentalmente.

Asimismo, vemos en la Figura 12-A que la curva correspondiente a Pfk-2* tiene una pendiente negativa, correspondiente al consumo neto de 6×10^{-3} μ moles/ml minuto de NADH. Como se muestra en la Tabla 1, esto indica un porcentaje de ciclo fútil de 56%. Es decir, a concentraciones bajas de MgATP, Pfk-2 y Pfk-2* producen un

porcentaje de ciclo fútil de similar magnitud. La diferencia entre ambas enzimas se aprecia al subir la concentración de MgATP a 3 mM, ya que en estas condiciones Pfk-2* no sólo no disminuye su actividad, sino la aumenta levemente, de 56% a 60% (Figura 12-B y Tabla 1), lo que posiblemente resulta del hecho que MgATP es también sustrato de la enzima. En síntesis, a concentraciones altas de MgATP, Pfk-2* produce un porcentaje de ciclo fútil de aproximadamente tres veces la producida por Pfk-2.

Con respecto a la simulación numérica, vemos que si bien cualitativamente las curvas de progreso de NADH correspondientes a Pfk-2* tienen un comportamiento similar a las experimentales (Figura 13), las pendientes predichas por la simulación indican tasas de ciclo fútil claramente mayores que las observadas, 80% y 72% para MgATP 0,2 mM y 3 mM, respectivamente (Tabla 2). Dado que el interés de esta comparación es meramente cualitativo, no nos detendremos más en estas diferencias, las que posiblemente se originan en las diferencias entre los parámetros obtenidos por ajuste y los parámetros cinéticos efectivos en las condiciones de ensayo.

En resumen, los resultados presentados indican que, al menos en estas condiciones, el modelo predice que las propiedades regulatorias diferentes de las tres fosfofructoquinasas pueden resultar en diferentes tasas de ciclo fútil en condiciones de flujo neto gluconeogénico.

Para confirmar que las curvas de progreso observadas resultan efectivamente de la operación simultánea de las ramas productora y consumidora de NADH, se realizaron experimentos de "desacoplamiento". Estos consistieron en realizar tres ensayos para cada par Pfk/Fbpasa. En el ensayo que llamaremos *Ldh* se omitió la enzima glucosa-6-P deshidrogenasa, desacoplando así la actividad de la fosfoglucosa isomerasa de la reducción de NAD⁺ a NADH, lo que permite observar exclusivamente la actividad de la rama que consume NADH. En el ensayo denominado *G6pdh*, no se incluyó la

enzima lactato deshidrogenasa, desacoplando así la actividad de la piruvato quinasa de la oxidación de NADH, lo que permite visualizar exclusivamente la actividad de la rama reductora de NAD⁺. El tercer ensayo corresponde al sistema acoplado completo, tal como se describió para la Figura 12. En la Figura 2, el esquema del modelo, se indican las enzimas que no se incluyeron en cada tipo de ensayo.

En la Figura 14 se muestran las curvas de progreso de A₃₄₀ de los tres tipos de ensayo para Pfk-1 (panel A), Pfk-2 (panel B) y Pfk-2* (panel C) en presencia de MgATP 3 mM. En el panel A, para Pfk-1, se aprecia que la curva 1, ensayo *Ldh*, tiene una pendiente cercana a cero, i.e. cuando se elimina la glucosa-6-P deshidrogenasa (sistema que reduce NAD⁺ a NADH) no hay cambio en la concentración de NADH. En otras palabras, la rama que oxida NADH a NAD⁺ está inactiva porque Pfk-1 está inactiva. En cambio la curva 2, ensayo *G6pdh*, es de pendiente positiva y casi idéntica a la pendiente de la curva del ensayo completo (curva 3), lo que indica que esta última resulta únicamente de la operación del sistema que reduce NAD⁺ a NADH. Este experimento confirma que en estas condiciones Pfk-1 está inactiva y no hay ciclo fútil significativo.

En los paneles B y C, Pfk-2 y Pfk-2* respectivamente, se aprecia que la curva del ensayo completo, curva 3, tiene en realidad dos componentes. Un componente es de pendiente negativa, ensayo *Ldh*, curva 1, y corresponde al flujo a través de Pfk, y el otro, ensayo *G6pdh*, curva 2, es de pendiente positiva y corresponde al flujo a través de Pgi. Si se suman las diferencias, punto a punto, de cada curva con el nivel basal, se obtiene la curva punteada. Si ambos tipos de desacoplamientos no hubieran introducido diferencia en la concentración de sustratos de Pfk en relación al experimento completo, la curva discontinua debería coincidir con la curva 3. En ambos

casos, Pfk-2 y Pfk-2*, esto no ocurre, ya que las curvas generadas por el modelo tienen pendientes menores que las curvas experimentales.

Si se observa con cuidado la curva 1 en ambos casos, se verá que la pendiente inicial es menos negativa que la pendiente final. Este aumento progresivo de la actividad de ambas fosfofructoquinas sugiere que lo que está ocurriendo es que al no haber en estos ensayos glucosa-6-P deshidrogenasa, la glucosa-6-P producida por fosfoglucosa isomerasa se acumula, y eventualmente la reacción inversa resulta en acumulación de fructosa-6-P, la que en algún punto alcanza concentraciones suficientemente altas como para aumentar la actividad de Pfk por sobre la que tiene esta enzima en el ensayo completo, en el cual no hay acumulación del sustrato.

Esta desviación no se observa en la simulación numérica de los experimentos de desacoplamiento (Figura 15), en los cuales la curva correspondiente a la suma punto a punto de las curvas 1 y 2 coincide con la curva 3 en todos los casos. Esto se explicaría porque en el modelo de simulación la función que rige la velocidad de la enzima correspondiente a fosfoglucosa isomerasa no contiene un componente de velocidad inversa, de manera que la acumulación de glucosa-6-P no redunde en acumulación de fructosa-6-P. ¿Qué ocurre, entonces, si se introduce tal componente en la función correspondiente? La Figura 16 muestra el resultado de una simulación del mismo experimento de desacoplamiento con una función de velocidad para Pgi con un componente de velocidad inversa, i.e. desde glucosa-6-P a fructosa-6-P.

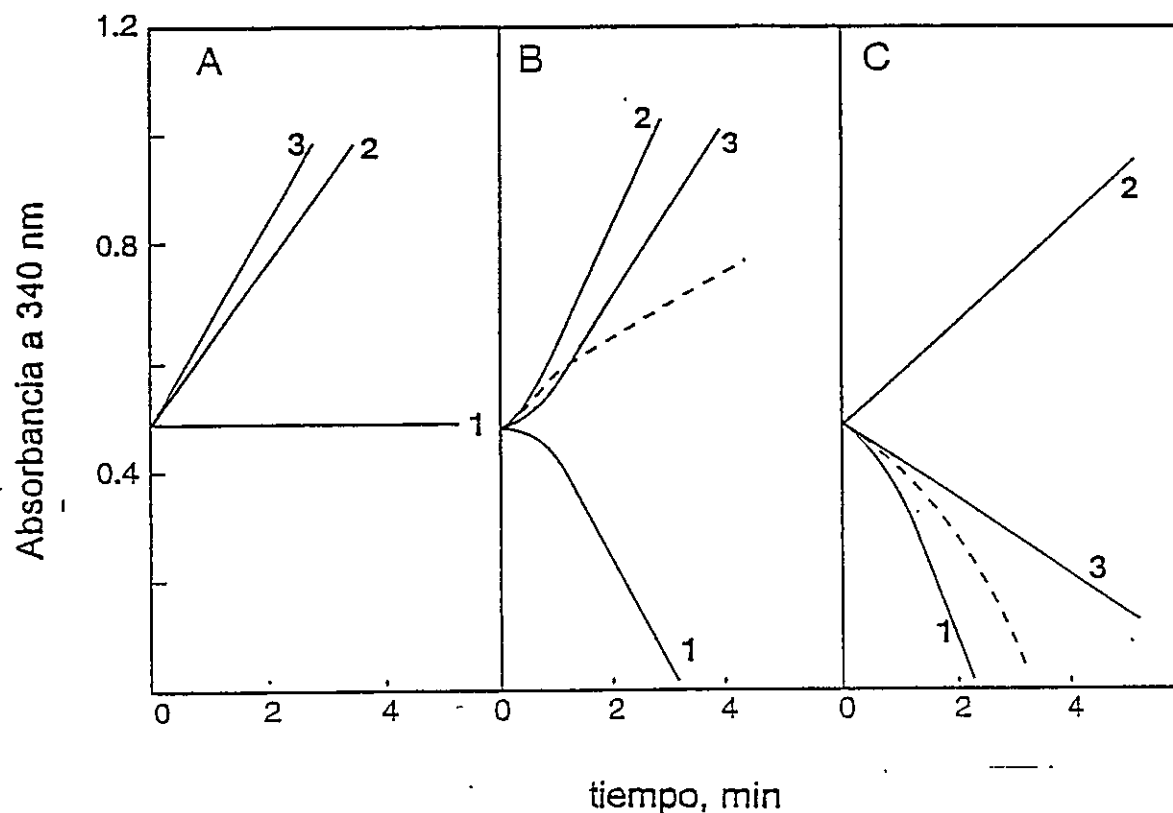


Figura 14 Curvas de progreso de la A_{340} para ensayos de desacoplamiento y para ensayo completo.

Curvas de progreso del ensayo de desacoplamiento. Curva 1 corresponde al ensayo en que se omitió la G6pdh, y con ello la posible reducción de NAD^+ a NADH. Curva 2 corresponde al ensayo en que se omitió la Ldh, y con ello la posible oxidación de NADH a NAD^+ . Curva 3 corresponde al ensayo completo. Panel A, Pfk-1 y Fbpasa. Panel B, Pfk-2 y FBpasa. Panel C, Pfk-2* y Fbpasa. La curva punteada se obtuvo sumando punto a puntos las curvas 1 y 2 de cada panel.

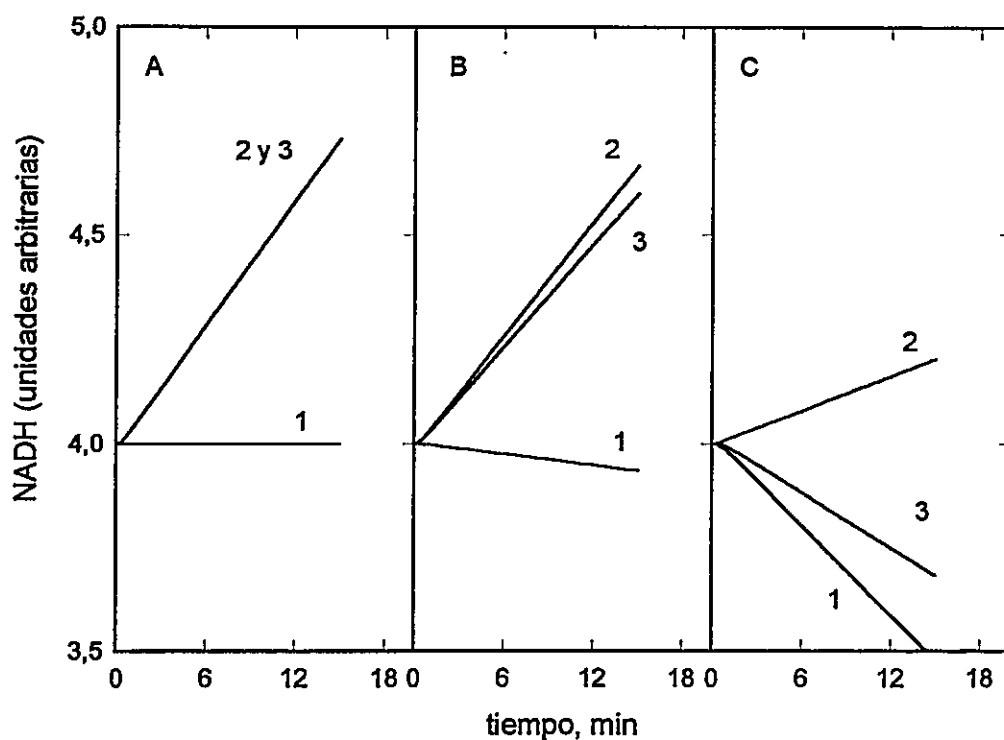


Figura 15 Simulación de ensayo de desacoplamiento con función de velocidad para Pgi sin un componente de velocidad inversa

Simulación numérica del ensayo de desacoplamiento cuyo resultado experimental se presenta en la Figura 14. Panel A: Pfk-1; panel B: Pfk-2; panel C: Pfk-2*. Curva 1, ensayo Ldh; curva 2, ensayo G6pdh; curva 3, ensayo completo. En esta simulación la función de velocidad para Pgi no contenía un componente de velocidad inversa.

Tanto para Pfk-2 como para Pfk-2*, se observa el mismo tipo de desviación entre la curva esperada (discontinua) y la observada (curva 3) que se observó experimentalmente (comparar con Figura 14).

Resumiendo, el experimento de desacoplamiento confirma la interpretación que hemos planteado respecto a las curvas de progreso de NADH del modelo de ensayo *in vitro*. Las desviaciones de lo esperado, al ser contrastadas con las predicciones de las simulaciones numéricas del modelo, no hacen sino confirmar que las tres enzimas se comportarían en el sistema de acuerdo a sus propiedades cinéticas y regulatorias determinadas *in vitro*.

iv. El porcentaje de ciclo y la relación de actividades Pfk/Pgi

Debería resultar evidente que el porcentaje de ciclo fútil no sólo va a depender de la actividad absoluta de Pfk sino esencialmente de la competencia entre ésta y fosfoglucosa isomerasa por el sustrato común, fructosa-6-P. Esta es función tanto de la afinidad de ambas enzimas por el sustrato como de la V_{max} de cada enzima en las condiciones pertinentes. Para ilustrar este efecto se hizo una serie de experimentos en los que se modificó la razón de actividades Pfk a fosfoglucosa isomerasa, manteniendo todas las otras condiciones constantes, y se determinó (ver Materiales y Métodos) el porcentaje de ciclo fútil para cada razón. Los resultados se presentan en la Figura 17, donde se grafica el porcentaje de ciclo fútil contra la razón de actividades Pfk a fosfoglucosa isomerasa para las tres Pfk.

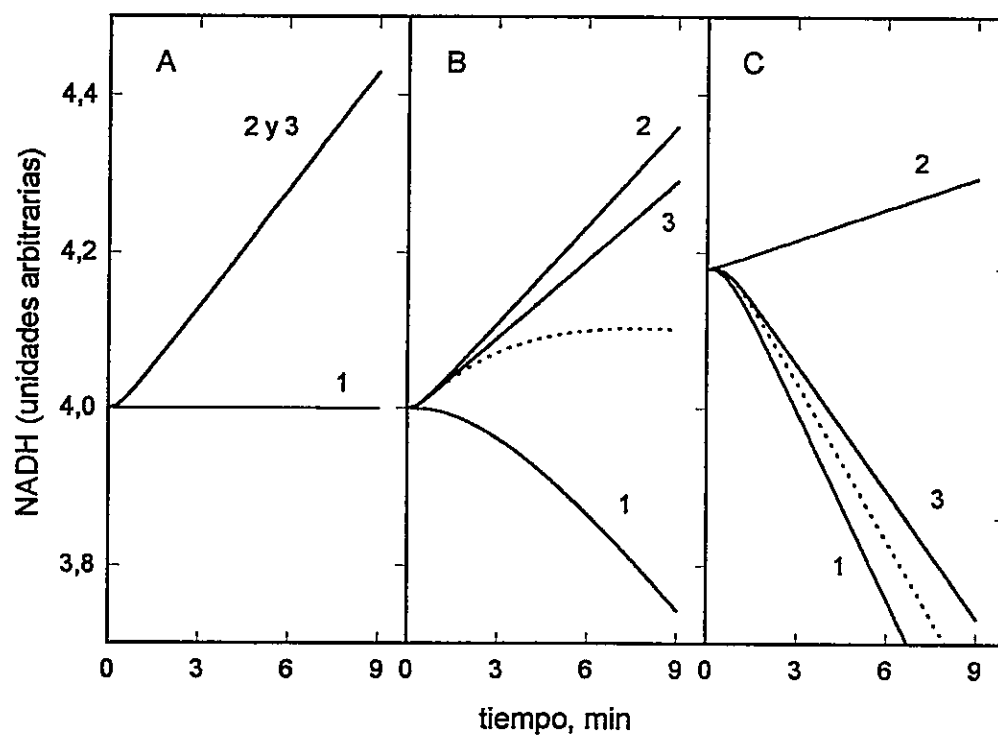


Figura 16 Simulación de ensayo de desacoplamiento con función de velocidad para Pgi con un componente de velocidad inversa

Simulación numérica del ensayo de desacoplamiento cuyo resultado experimental se presenta en la Figura 14. Panel A: Pfk-1; panel B: Pfk-2; panel C: Pfk-2*. Curva 1, ensayo Ldh; curva 2, ensayo G6pdh; curva 3: ensayo completo. En esta simulación la función de velocidad para Pgi contenía un componente de velocidad inversa.

Las diferentes razones de actividad se obtuvieron variando la cantidad de Pfk agregada mientras se mantenía constante la cantidad de fosfoglucoasa isomerasa. Mientras que para la dupla Pfk-1/Fbpasa el porcentaje de ciclo fue cero para todas las razones Pfk/Pgi determinadas, las duplas Pfk-2/Fbpasa y Pfk-2*/Fbpasa exhibieron grados importantes de ciclo fútil en un intervalo de razones Pfk a Pgi. En todos los casos Pfk-2* produjo tasas de ciclo mayores que Pfk-2, y esta diferencia disminuye al aumentar la razón Pfk a fosfoglucoasa isomerasa, como es de esperar del mecanismo cinético ofrecido como explicación para este comportamiento. En el caso de Pfk-2*, el porcentaje de ciclo alcanza cerca del 80% para razones Pfk/Pgi del orden de 0,3.

v. El porcentaje de ciclo y la concentración de MgATP

Otra variable que se esperaba que juegue un rol importante en la regulación del potencial ciclo Pfk/Fbpasa es la concentración de MgATP, tanto por su importante rol metabólico como por ser un inhibidor de Pfk-2. Con el fin de explorar el efecto de MgATP sobre el ciclo fútil en el modelo *in vitro* se hicieron dos experimentos, ilustrados en la Figura 18 (A y B), en que se varió la concentración de ATP para dos razones diferentes de Pfk/Fbpasa y se determinó el porcentaje de ciclo fútil. En ambos casos la dupla Pfk-2*/Fbpasa generó las tasas de ciclo más altas, excepto a concentraciones bajas de ATP. Sin embargo la dupla Pfk-2/Fbpasa exhibió tasas importantes de ciclo fútil, incluso a concentraciones altas de MgATP, en el caso en que la razón de actividad Pfk/Fbpasa fue de 4,0 (panel A). Al disminuir esa razón a 1,5 (panel B), se ve claramente el efecto inhibitorio de MgATP sobre Pfk-2. En el caso de la Figura 18-A la actividad de Pfk es tanto mayor que la de Fbpasa, que incluso si Pfk-2 se hubiera inhibido a un 20% de su actividad máxima, con 4 mM MgATP, la

actividad remanente sería suficiente para reciclar una fracción substancial de la fructosa-6-P.

2. MÉTODO DE MEDICIÓN DEL CICLO FÚTIL POR MARCACIÓN POR FLUJO INVERSO

i. Ensayo de flujo neto gluconeogénico

a. Porcentaje de ciclo fútil como función de la actividad de Pfk

La Figura 19 A muestra una serie de registros de curso temporal de la absorbancia a 340 nm (A_{340}) para cantidades variables de Pfk, en el ensayo gluconeogénico. La actividad de Fbpasa fue la misma en todos los casos. El atraso que se observa en las curvas se debe a la actividad muy baja de Fbpasa presente (7 mU/ml), lo que causa que se tome un tiempo para que la fructosa-6-P se acumule a niveles suficientemente altos como para generar una velocidad significativa de la reacción catalizada por fosfogluco isomerasa, Pfk, o de ambas. Al aumentarse la actividad de Pfk disminuye la pendiente del curso temporal de la A_{340} , como era de esperar. En un punto la pendiente se hace prácticamente cero, es decir, las tasas de consumo y producción de NADH son iguales. Si se aumenta más la actividad de Pfk agregada, la pendiente se hace negativa, i.e. más fructosa-6-P está siendo reciclada a fructosa-1,6-bisP que la que está siendo transformada a glucosa-6-P. La Figura 19 B muestra la relación entre la Pfk agregada y el porcentaje de ciclo fútil (expresado como $V_{Pfk} \cdot 100 / V_{Fbpasa}$). El porcentaje de ciclo fútil se calculó a partir de las pendientes de los cursos temporales de la A_{340} en el período en que la traza radiactiva de ^{14}C estuvo presente en el ensayo. El porcentaje de ciclo fútil aumenta rápidamente con la actividad de Pfk para después acercarse hiperbólicamente a un máximo de aproximadamente 100% a alrededor de 2,5 a 3,0 U/ml de Pfk agregada.

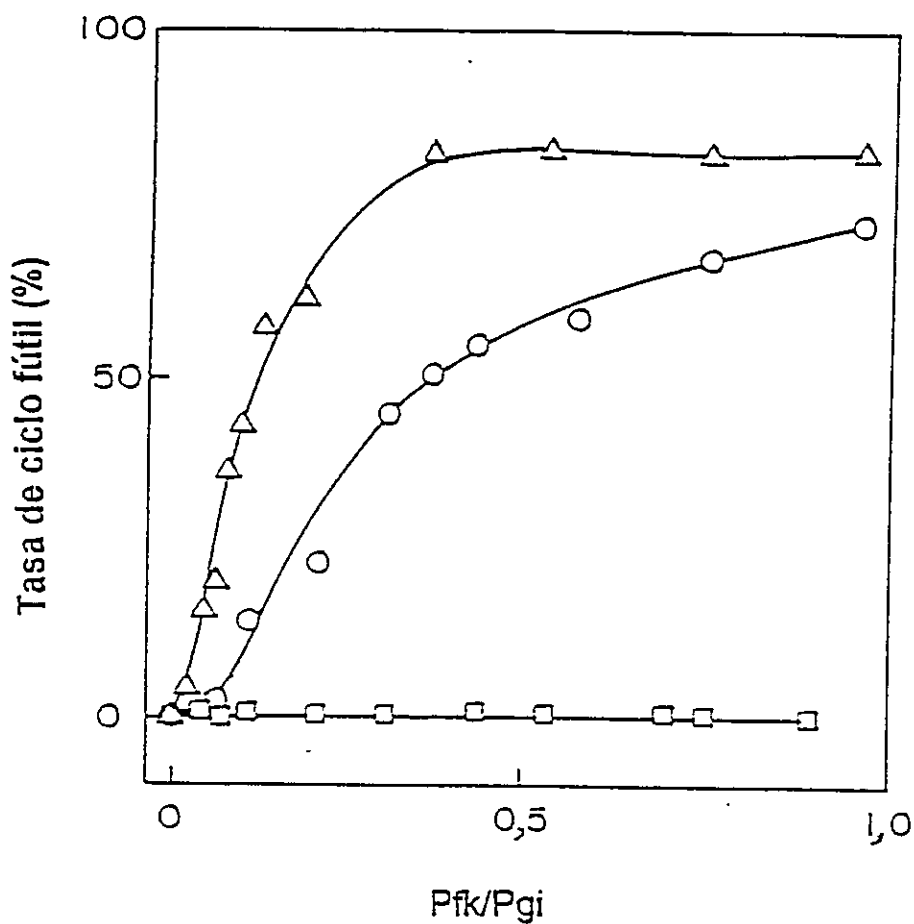


Figura 17 Porcentaje de ciclo fútil como función de la razón de actividades Pfk/Pgi.

Se varió la actividad agregada de Pfk manteniendo constante la actividad de Pgi y se determinó el porcentaje de ciclo como se indica en Materiales y Métodos. La concentración de MgATP fue 3 mM en todos los casos. Las diferentes combinaciones fueron: Pfk-1/Fbpasa (\square); Pfk-2/Fbpasa (\circ) y Pfk-2*/Fbpasa (Δ).

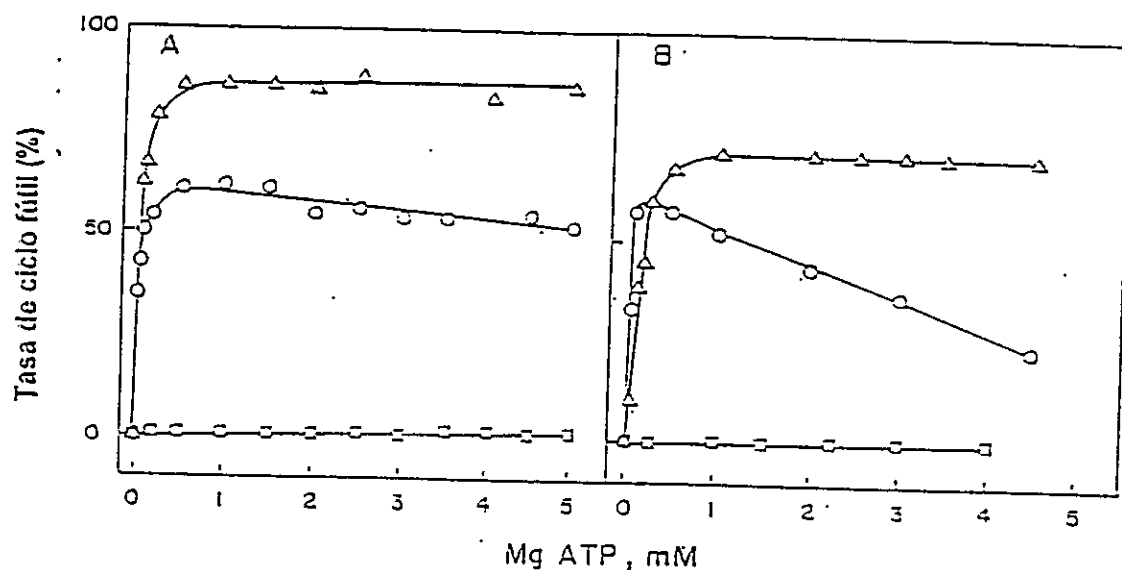


Figura 18 Porcentaje de ciclo fútil como función de la concentración de MgATP.

Se varió la concentración de MgATP, siempre con un exceso constante de Mg^{+2} de 1 mM, y se mantuvo constante la actividad de Pfk y Pgi. Se determinó el porcentaje de ciclo como ya se indicó. Las combinaciones fueron: Pfk-1/Fbpasa (□); Pfk-2/Fbpasa (○) y Pfk-2*/Fbpasa (Δ).

Panel A, la razón de actividades Pfk/Fbpasa fue 4,0; panel B, la razón de actividades Pfk/Fbpasa fue 1,5.

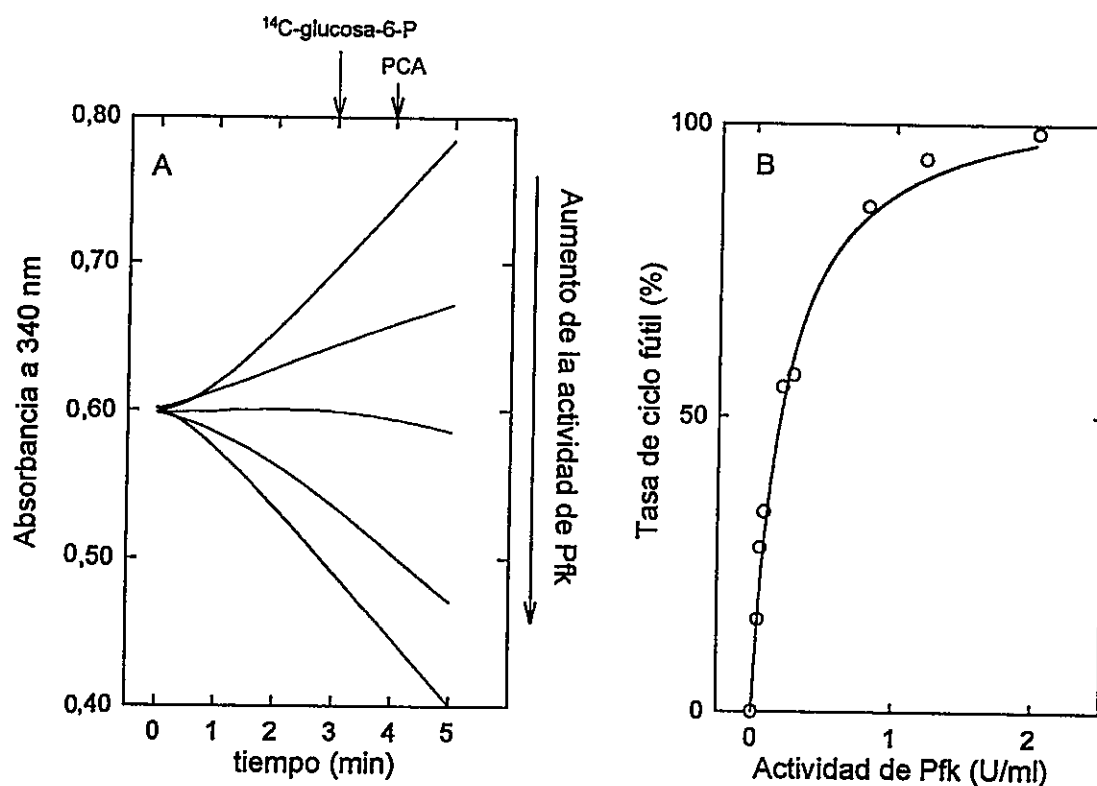


Figura 19 Relación entre la actividad de Pfk agregada y ciclo fútil en el ensayo gluconeogénico.

Panel A, curso temporal de A_{340} en ensayo gluconeogénico para cantidades variables de Pfk agregada. La flecha al costado derecho del panel A indica la dirección en que aumenta la actividad de la Pfk agregada. Se indican los tiempos a los cuales se agregó la marca radiactiva y se tomó la muestra para la extracción perclórica. Panel B, porcentaje de ciclo fútil como función de la actividad de Pfk agregada.

b. Marcación por flujo inverso de fructosa-1,6-bisP como función del porcentaje de ciclo fútil

Las flechas de la Figura 19 A indican los tiempos a los cuales se agregó la traza de [U-¹⁴C]glucosa-6-P y se tomó la muestra para la extracción perclórica (ver sección II-11). La Figura 20 muestra los patrones de elución de HPLC de los extractos perclóricos de dos ensayos con diferentes tasas de ciclo fútil. En el panel A, el porcentaje de ciclo fue 27% (0,05 U de Pfk/ml). En este caso, la mayoría de la radiactividad de ¹⁴C se encontró asociada a 6-P-gluconato (71%), y sólo un 11% se encontró como fructosa-1,6-bisP. En el panel B, el porcentaje de ciclo fútil fue 99% (2,4 U de Pfk/ml) y en este caso hasta un 52% de la radiactividad se encontró como fructosa-1,6-bisP. Nótese que dada la baja actividad de Fbpasa en el ensayo para los tiempos elegidos, se puede considerar que la concentración de fructosa-1,6-bisP es constante (ca. 2 mM). Por lo tanto, al comparar la cantidad de radiactividad en fructosa-1,6-bisP entre ensayos, también se están comparando las actividades específicas. Esto no es así, sin embargo, si se compara la radiactividad en glucosa-6-P y 6-P-gluconato. Si bien las actividades de Pfk y Fbpasa tienen poco efecto sobre la concentración de fructosa-1,6-bisP, pueden tener un efecto considerable sobre las muy bajas concentraciones esperables de glucosa-6-P y 6-P-gluconato.

La Figura 21 presenta la fracción de radiactividad asociada a fructosa-1,6-bisP como función del porcentaje de ciclo fútil durante el período en que la traza radiactiva estuvo presente en el ensayo, i.e. entre 3 y 4 min. después de iniciado el ensayo. Claramente, hay una relación lineal entre estas variables hasta un porcentaje de ciclo fútil de aproximadamente 100%.

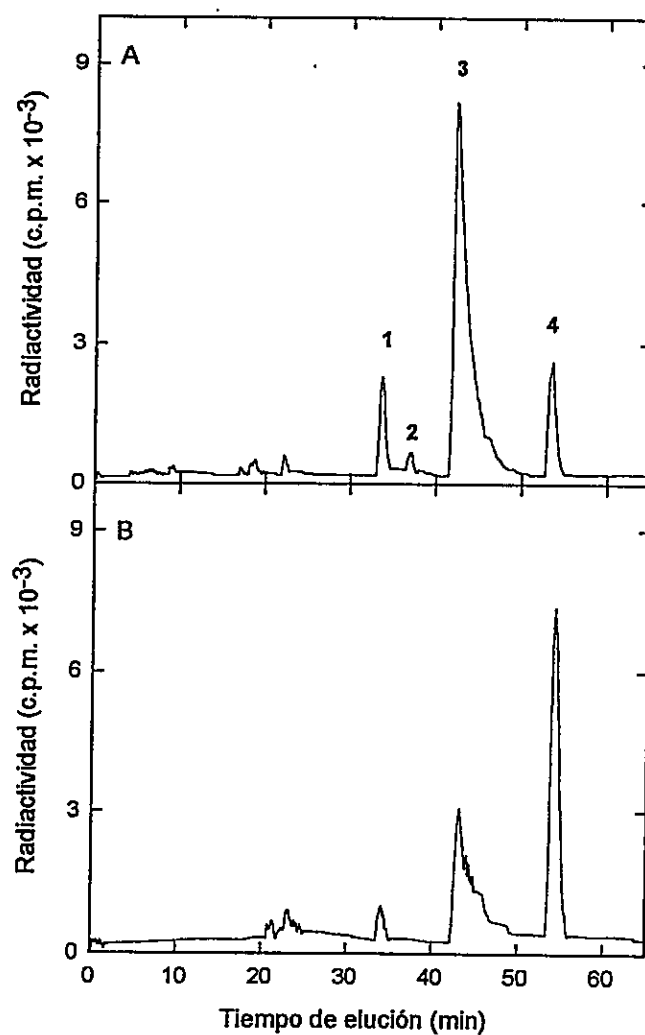


Figura 20 Separación por HPLC de moléculas marcadas radiactivamente tras marcación por flujo inverso en ensayo gluconeogénico.

La fuente de radiactividad fue [U-¹⁴C]-glucosa-6-P. Se indican los tiempos de elución de: glucosa-6-P (1), fructosa-6-P (2), 6-P-gluconato (3) y fructosa-1,6-bisP (4).

Panel A, patrón de elución de componentes del ensayo solubles en PCA para la situación en que el porcentaje de ciclo fútil fue 27%.

Panel B, patrón de elución de componentes del ensayo solubles en PCA para la situación en que el porcentaje de ciclo fútil fue 99%.

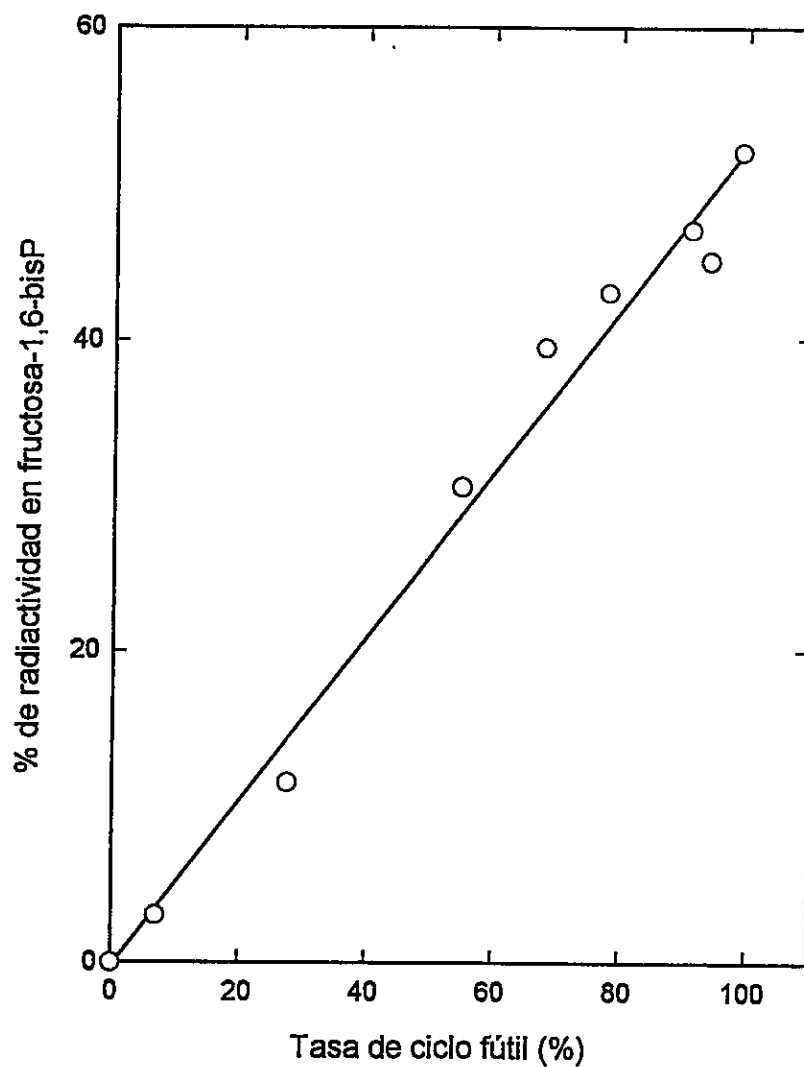


Figura 21 Relación entre marcación por flujo inverso de fructosa-1,6-bisP y porcentaje de ciclo fútil para ensayo gluconeogénico.

La fuente de radiactividad fue $[U-^{14}C]$ -glucosa-6-P. Se grafica el porcentaje de marca radiactiva asociada a fructosa-1,6-bisP como función del porcentaje de ciclo fútil.

ii. Ensayo glicolítico neto

a. Porcentaje de ciclo como función de la actividad de la Fbpasa

En el ensayo glicolítico neto, la actividad de Pfk se mantuvo constante (0,04 U/ml) y se varió la actividad de Fbpasa agregada. El flujo neto de carbonos en este caso es desde fructosa-6-P a triosas, i.e. en el sentido inverso al del ensayo gluconeogénico. En este ensayo no hay sistema acoplado para reducir el NAD^+ , y por lo tanto las pendientes de los cursos temporales de la A_{340} serán o cero o menores que cero, dependiendo de la actividad de la Pfk y, como ésta es constante, su variación dependerá en definitiva de la actividad de la Fbpasa.

La Figura 22 A muestra una serie de registros del curso temporal de la A_{340} para cantidades crecientes de actividad de Fbpasa agregada al ensayo. En ausencia de Fbpasa, se obtiene un curso temporal de la A_{340} con una pendiente de -0.42 unidades de A_{340} por min (aproximadamente 34 nmoles de NADH, o fructosa-6-P, consumidos por min). Cantidades crecientes de Fbpasa agregada reducen el valor absoluto de la pendiente. Por ejemplo, con 0,2 U/ml de Fbpasa la pendiente es de -0,012 unidades de A_{340} por min (2 nmol de NADH consumido por min). A partir de esta reducción de la pendiente puede calcularse el porcentaje de ciclo fútil, tal como se indica en Materiales y Métodos. En la Figura 22 B se grafica el porcentaje de ciclo fútil como función de la actividad nominal de Fbpasa agregada. Similarmente a lo observado en el ensayo gluconeogénico, el porcentaje de ciclo aumenta rápidamente con la actividad agregada de Fbpasa hasta acercarse hiperbólicamente a un máximo de 100%, el máximo posible ya que la velocidad de la reacción catalizada por la Fbpasa está limitada por la velocidad con que se produce su sustrato, fructosa-1,6-bisP.

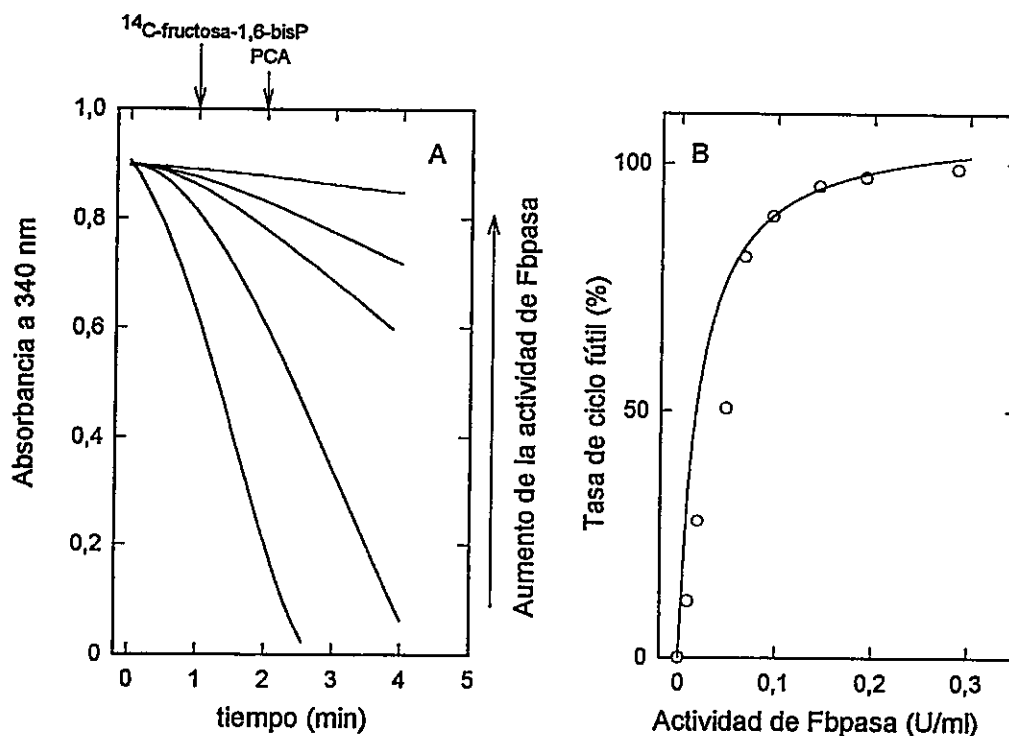


Figura 22 Relación entre actividad agregada de Fbpasa y ciclo fútil en ensayo glicolítico.

Panel A, curso temporal de A_{340} en ensayo glicolítico para cantidades variables de Fbpasa agregada. La flecha al costado derecho del panel A indica la dirección en que aumenta la cantidad de Fbpasa agregada. Se indican los tiempos a los que se agregó la marca y se realizó la extracción perclórica.

Panel B, porcentaje de ciclo fútil como función de la actividad de Fbpasa agregada.

b. Marcación por flujo reverso de fructosa-6-P como función del porcentaje de ciclo fútil

La Figura 23 muestra los patrones de elución de HPLC de los extractos perclóricos de dos ensayos con diferentes porcentajes de ciclo. En el panel A, el porcentaje de ciclo fue 0% (sin Fbpasa agregada). La radiactividad de ^{14}C se encontró en este caso asociada a triosas-P (las formas desfosforiladas de dihidroxiacetona-P y gliceraldehído-3-P eluyen juntas en estas condiciones), glicerol-3-P, fructosa-1,6-bisP y dos picos de elución menores, los que no fueron identificados, y que probablemente son producto de actividades contaminantes presentes en las preparaciones enzimáticas. No se encontró ningún pico de elución correspondiente a fructosa-6-P. Por otra parte, cuando el porcentaje de ciclo fue de 99%, panel B, cerca de un 60% de la radiactividad se encontró como fructosa-6-P, con el 40% restante distribuido entre los demás compuestos. Claramente, la actividad de Fbpasa ha tenido como resultado un grado muy importante de marcación de esta hexosa fosfato. La Figura 24 muestra la fracción de radiactividad que se encontró como fructosa-6-P como función del porcentaje de ciclo fútil. También en este caso, la relación es lineal, con un máximo de cerca del 60% de la radiactividad como fructosa-6-P. Incrementos mayores de la actividad de la Fbpasa no resultan en mayor marcación de fructosa-6-P.

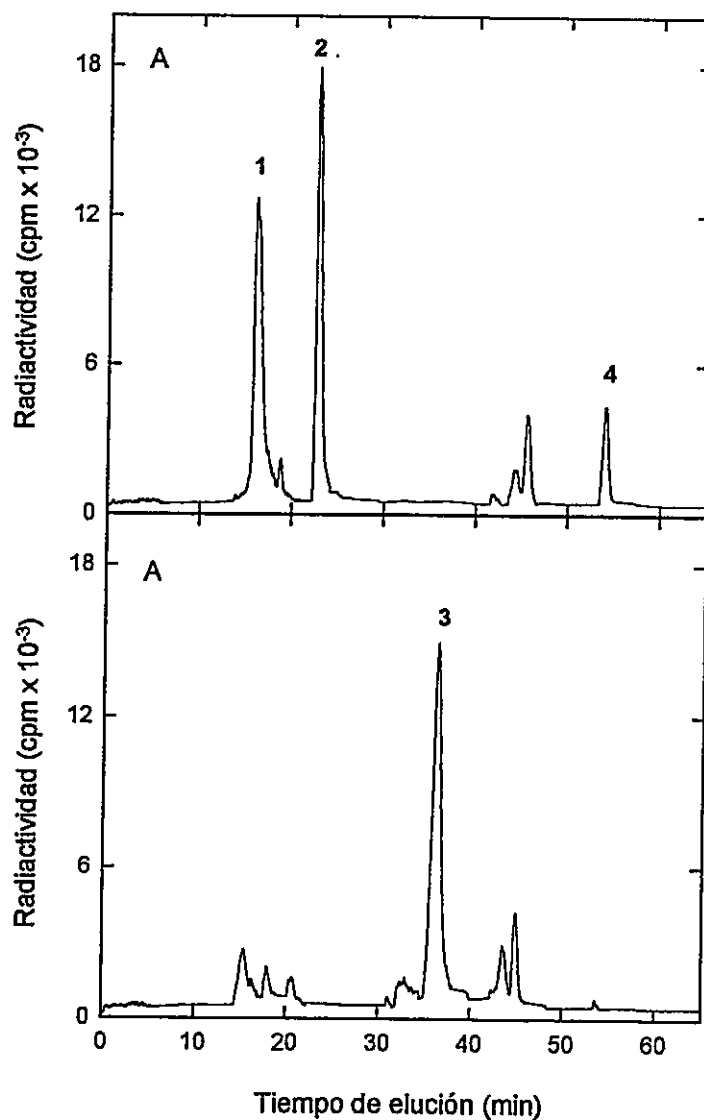


Figura 23 Separación por HPLC de moléculas marcadas radiactivamente tras marcación for flujo inverso en ensayo glicolítico.

La fuente de radiactividad fue [U-¹⁴C]-fructosa-1,6-bisP. Se indican los tiempos de elución de: forma desfosforilada de triosas-P (1), glicerol-3-P (2), fructosa-6-P (3), y fructosa-1,6-bisP (4). Panel A, patrón de elución de componentes del ensayo solubles en PCA para situación en que el porcentaje de ciclo fútil fue 0%. Panel B, patrón de elución de componentes del ensayo solubles en PCA para situación en que el porcentaje de ciclo fútil fue 99%.

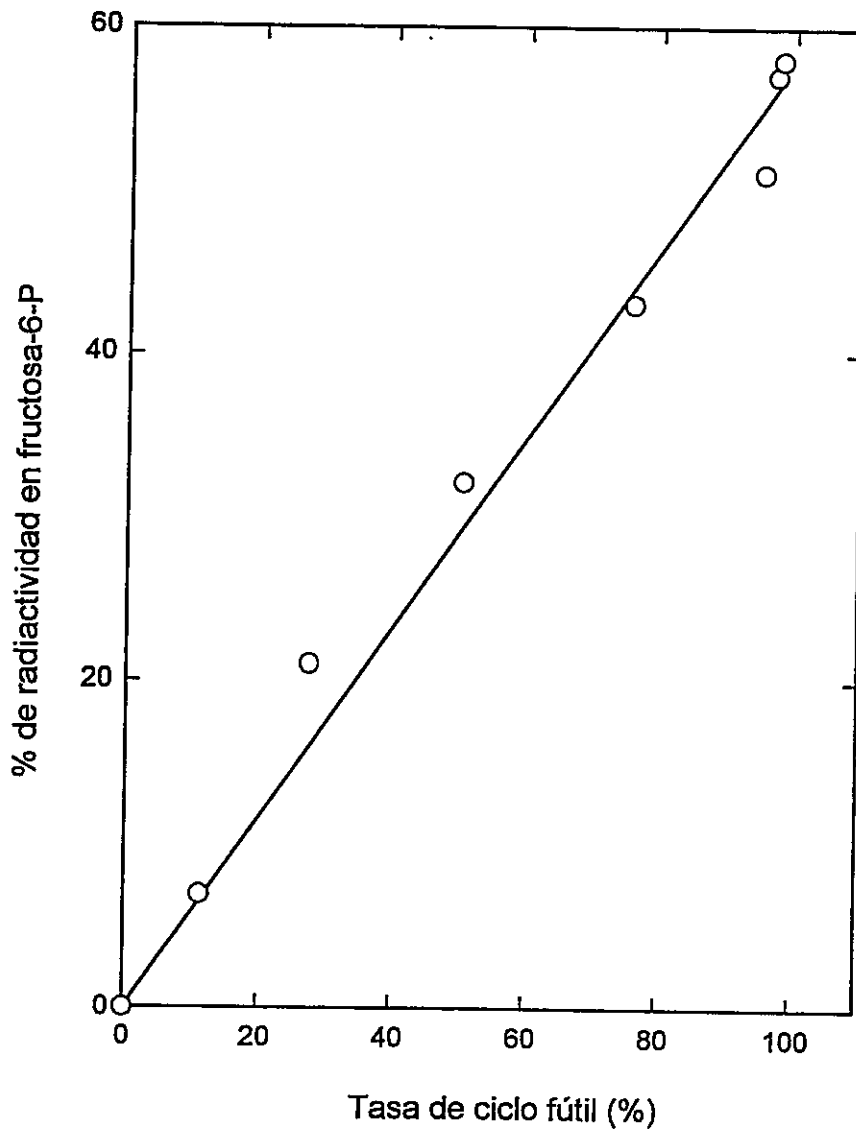


Figura 24 Relación entre marcación por flujo inverso de fructosa-6-P y porcentaje de ciclo fútil para ensayo glicolítico.

La fuente de radiactividad fue $[U-^{14}C]$ -fructosa-1,6-bisP. Se grafica el porcentaje de marca radiactiva asociada a fructosa-6-P como función del porcentaje de ciclo fútil.

3. TASA DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE *E. coli* CON DISTINTAS FOSFOFRUCTOQUINASAS

En la Tabla 3 se presentan los tiempos de duplicación de una serie de cepas de *E. coli*, con genotipos diferentes en términos de Pfk, crecidas en medio mínimo suplementado con una fuente de carbono glicolítica (glucosa) o gluconeogénica (glicerol), ambas a una concentración de 0,01%. También se indican las actividades de Pfk en extractos crudos (ver Materiales y Métodos). Estos valores representan la actividad fosfofructoquinásica total en cada extracto.

Sobre el nivel de actividad de Pfk. Como vemos, la cepa que denominaremos "silvestre", DF910, que tiene ambos genes en su forma silvestre, tiene 0,20 unidades de Pfk por mg de proteína. Esta actividad sube a 0,65 U/mg cuando el gen silvestre de Pfk-1 (*pfkA*⁺) está acompañado de la mutación B1 del gen *pfkB*. Esta es la mutación que afecta la región reguladora de *pfkB*, produciendo altos niveles de Pfk-2 silvestre. Como comparación, en la cepa DF902, que carece del gen *pfkA* y tiene la versión silvestre del gen *pfkB*, la actividad fosfofructoquinásica es apenas 0,016 U/mg de proteína. De aquí que se suele llamar a Pfk-2 la Pfk minoritaria o "menor". La cepa DF920, en cambio, carece del gen *pfkB* y tiene por lo tanto niveles silvestres de sólo Pfk-1. Las cepas DF903 y DF905 carecen del gen *pfkA* (no tienen Pfk-1) y tienen versiones del gen *pfkB* que producen altos niveles de Pfk-2 y Pfk-2*, respectivamente, i.e. ambas tienen la mutación reguladora B1, pero sólo una (DF905) tiene la mutación en el gen estructural B10, que produce la Pfk-2 mutada, o Pfk-2*. Nótese que los niveles de actividad en estas últimas son muy similares. Por último, la cepa DF915 carece de ambos genes para Pfk.

Tabla 3 Tasa de crecimiento de cepas de *E. coli* con distintas fosofructoquinasas en una fuente de carbono glicolítica (glucosa) y en una gluconeogénica (glicerol)

Cepa	Genotipo Relevante	Actividad de Fosofructoquinasa (U/mg de proteína)	Tiempo de duplicación en glucosa (min)	Tiempo de duplicación en glicerol (min)
DF920	<i>pfkA+</i> <i>pfkB-</i>	0,20	75	95
DF903	<i>pfkA-</i> <i>pfkB1</i>	0,37	80	95
DF905	<i>pfkA-</i> <i>pfkB1B10</i>	0,37	65	380
DF915	<i>pfkA-</i> <i>pfkB-</i>	0,00	-	90
DF910	<i>pfkA+</i> <i>pfkB+</i>	0,20	58	80
DF911	<i>pfkA+</i> <i>pfkB1</i>	0,65	63	90
DF912	<i>pfkA+</i> <i>pfkB1B10</i>	0,60	63	350
DF902	<i>pfkA-</i> <i>pfkB+</i>	0,016	260	110

Se indica el genotipo en términos de los genes *pfkA* (*Pfk-1*) y *pfkB* (*Pfk-2*), la actividad de *Pfk* en extractos crudos y los tiempos de duplicación, medidos en medio mínimo M63 suplementado con B1-tiamina y la fuente de carbono indicada a una concentración de 0,01%.

Crecimiento en glucosa. Si se observa la columna correspondiente al tiempo de duplicación con glucosa como única fuente de carbono, se ve que, con dos excepciones, todas las cepas crecen a tasas muy similares, con tiempos de duplicación que van entre los 58 y los 80 min. Las excepciones corresponden a DF915, la cepa que carece de Pfk, la que obviamente no puede efectuar glicólisis, y a DF902, la que debido a los muy bajos niveles de actividad de Pfk que posee, crece con un tiempo de duplicación 2,5 veces mayor que las otras cepas. También se observan tiempos de duplicación de 60-70 min si se usan otros compuestos glicolíticos como fuentes de carbono, e.g. manitol o gluconato (Daldal, et al., 1982).

Crecimiento en glicerol. Con glicerol como fuente única de carbono, en cambio, observamos una diferencia muy interesante. Todas las cepas que no tienen Pfk-2* crecen a tasas similares, con tiempos de duplicación entre 90 y 110 min (incluida la que carece de Pfk). Las dos cepas que tienen Pfk-2*, sin embargo, crecen 3 a 4 veces más lento, con tiempos de duplicación de 350 y 380 min. Este efecto también se observa si la fuente de carbono es glicerol-3-P (Daldal, et al., 1982). El hecho de que el efecto de crecimiento lento en gluconeogénesis se observe tanto en una cepa que tiene Pfk-2* como única Pfk (DF905) como en una en la cual también está presente Pfk-1, indica que fenotípicamente la mutación es dominante. En otras palabras, su efecto debe resultar del exceso de función o, dado que se trata de una enzima, de mayor actividad de la misma en comparación con la versión silvestre en una condición dada. Esta es una observación crucial en la formulación de la hipótesis de esta tesis.

4. NIVELES INTRACELULARES DE FRUCTOSA-1,6-BISFOSFATO CON GLICEROL O GLUCOSA COMO FUENTE DE CARBONO

Se midieron los niveles intracelulares de fructosa-1,6-bisP en células resuspendidas de cepas de *E. coli* con distintas fosofructoquinas, suplementadas con glicerol como única fuente de carbono. Los resultados se presentan en la Figura 25.

En el panel B se grafica el curso temporal del glicerol remanente en el medio. Como se aprecia, las tres cepas consumen la fuente de carbono a tasas muy similares. A los 25 min ya no queda prácticamente glicerol en el medio. Es evidente de este resultado que el fenotipo de crecimiento lento en glicerol no guarda relación alguna con la tasa a la cual esta fuente de carbono ingresa al metabolismo.

En el panel A se muestra el curso temporal de la concentración de fructosa-1,6-bisP tras proporcionar a la resuspensión celular, al tiempo inicial, 0,1% de glicerol. La medición se realizó en cuatro cepas: DF920 (sólo Pfk-1), DF903 (sólo Pfk-2, altos niveles), DF905 (sólo Pfk-2*, altos niveles) y DF902 (sólo Pfk-2, bajos niveles). En la Tabla 4 se muestran los promedios de las concentraciones máximas observadas en cada cepa. Tanto la cepa con sólo Pfk-1 como la con bajos niveles de Pfk-2 exhibieron cursos temporales similares, con un aumento gradual hasta alcanza un estado semi-estacionario con máximos de alrededor de 5 mM (ver Tabla 4). La cepa con altos niveles de Pfk-2 exhibió un curso temporal con una pendiente inicial mayor, y un estado semi-estacionario más breve y más alto, siendo la concentración máxima promedio de 6,6 mM (Tabla 4). Por último, en la cepa con Pfk-2* la concentración de fructosa-1,6-bisP aumentó aún más rápidamente, para alcanzar un *plateau* transitorio cerca de 5 min tras el inicio del experimento, seguido de un rápido aumento hasta cerca de 9 mM. En esta cepa no se alcanzó un estado semi-estacionario antes que la fuente de carbono se agotara.

En la Figura 26 A se muestra el curso temporal de la concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP en las cepas DF920 (sólo Pfk-1), DF903 (sólo Pfk-2, altos niveles) y DF905 (sólo Pfk-2*, altos niveles) en presencia de glucosa como única fuente de carbono. Primero, notemos que el metabolismo de glucosa es mucho más rápido que el de glicerol. Esto resulta aparente tanto del curso temporal de la concentración de fructosa-1,6-bisP (panel A) como del consumo de la fuente de carbono (panel B), ya que ambos procesos demoran aproximadamente la mitad del tiempo que en el caso de glicerol (Figura 25). Con respecto a fructosa-1,6-bisP, vemos que la cepa con Pfk-2* alcanza el estado semi-estacionario más bajo de las tres cepas, con un máximo de 4,3 mM. La cepa con Pfk-2 alcanza un nivel levemente superior, con un máximo de 5,1 mM. La cepa con Pfk-1, en cambio, alcanza un máximo de 8,3 mM, con un curso temporal sin un estado semi-estacionario aparente. En términos generales, puede decirse que los cursos temporales de la concentración de fructosa-1,6-bisP aparecen invertidos en este caso con respecto a cuando la fuente de carbono fue glicerol (comparar con Figura 25). Por el momento esto no pasa de ser una descripción formal de los datos, ya que no tenemos una explicación para la diferencia entre la cepa con Pfk-1 y las otras dos cuando glucosa es la fuente de carbono. Al menos en términos de la tasa de crecimiento no hay diferencias substanciales (ver Tabla 3).

Por último, en el panel B se presenta el curso temporal de la concentración de glucosa en el medio. Nuevamente, no hay diferencias significativas entre las cepas en cuanto a la tasa de consumo de la fuente de carbono.

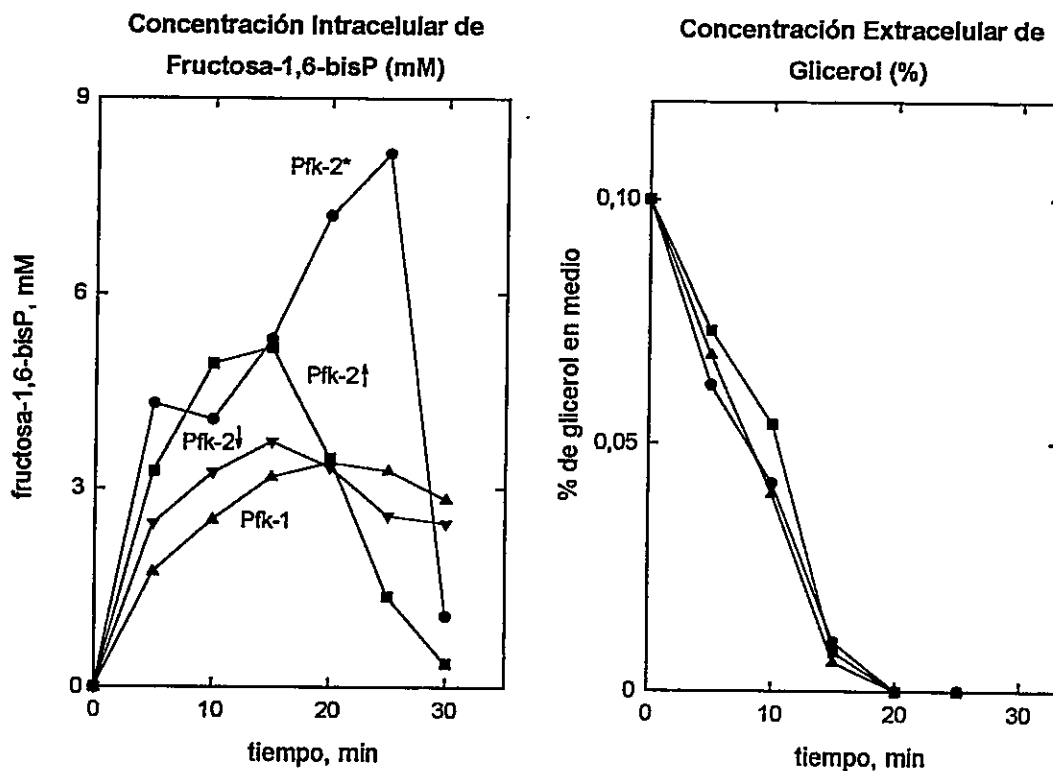


Figura 25 Curso temporal de concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP y glicerol en el medio para cepas con diferentes fosfofructoquinasas.

Panel A, curso temporal de concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP en resuspensiones de células con glicerol como única fuente de carbono. Panel B, glicerol remanente en el medio (%) como función del tiempo para las mismas cepas del panel A.

Los tipos de fosfofructoquinasas de las cepas son: Pfk-1 (Δ); altos niveles de Pfk-2 (\square); altos niveles de Pfk-2* (\circ); y bajos niveles de Pfk-2 (∇).

Tabla 4 Concentración intracelular máxima de fructosa-1,6-bisP en resuspensiones celulares de cepas con distintas fosfofructoquinasas con glicerol como fuente de carbono

Pfk en cepa	Concentración intracelular máxima de fructosa-1,6-bisP (mM)		
	Promedio	Error estándar	n
Pfk-2*	9,0	0,54	4
Pfk-2 (nivel bajo)	5,3	0,22	5
Pfk-2 (nivel alto)	6,6	0,36	5
Pfk-1	5,1	0,23	5

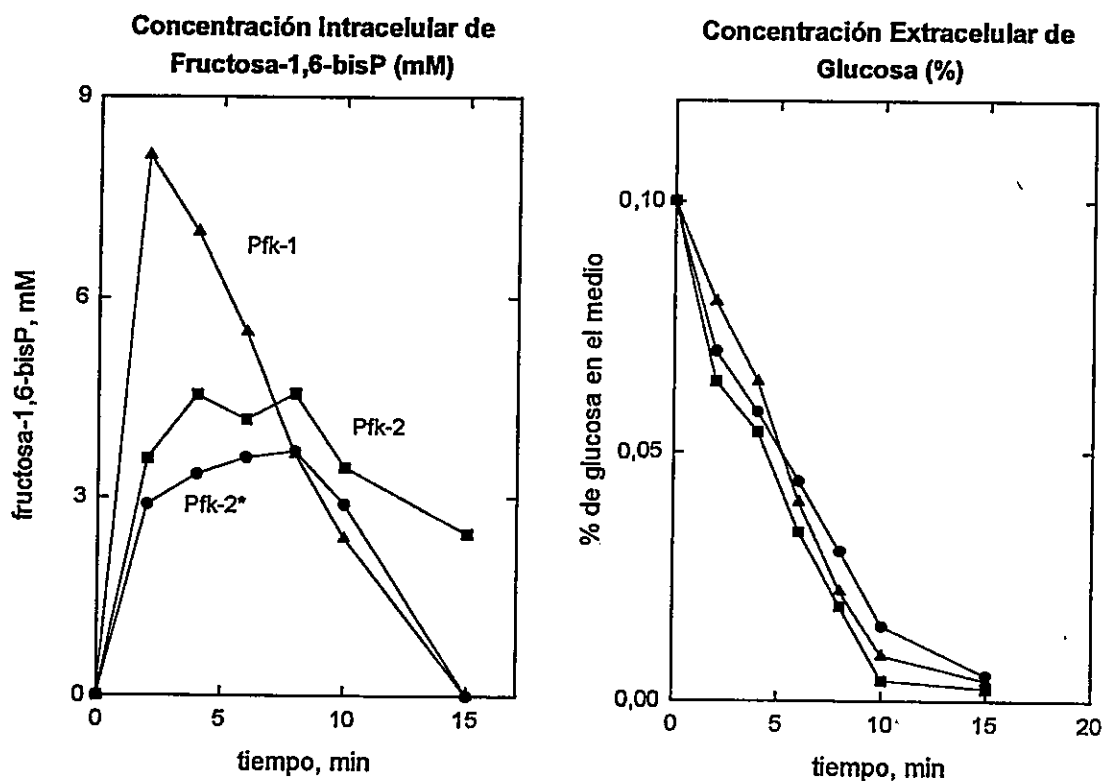


Figura 26 Curso temporal de concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP y glucosa en medio en cepas con diferentes fosfofructoquinasas.

Panel A, curso temporal de concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP en resuspensiones de células con glucosa como única fuente de carbono. Cada punto representa la concentración intracelular (mM) medida menos la concentración basal, i.e. la medida a tiempo cero, o antes de agregar la fuente de carbono a la resuspensión. Panel B, glucosa remanente en el medio (%) como función del tiempo para las mismas cepas del panel A.

Los tipos de fosfofructoquinasas de las cepas son: Pfk-1 (Δ); altos niveles de Pfk-2 (\square); altos niveles de Pfk-2* (O).

5. MARCACIÓN POR FLUJO INVERSO DE FRUCTOSA-1,6-BISP A PARTIR DE [14C-U]GLUCOSA DURANTE GLUCONEOGÉNESIS *in vivo*

Como indicamos en la sección correspondiente de Materiales y Métodos, como parte de esta tesis se ha desarrollado un método para estimar tasas de ciclo fútil por medio de lo que hemos denominado "marcación por flujo inverso". En esa misma sección se muestra, en un modelo de ensayo *in vitro*, que la marcación por flujo inverso de fructosa-1,6-bisP a partir de [U-14C]glucosa-6-P durante flujo neto de masa en el sentido gluconeogénico, es función de la magnitud del ciclo fútil generado por una actividad agregada creciente de Pfk. En esta sección se describen los resultados de aplicar este método *in vivo* a cepas con distintas fosfofructoquinasas en condiciones gluconeogénicas, con glicerol como única fuente de carbono.

En síntesis, a una serie de resuspensiones de células de las distintas cepas se les dió glicerol a tiempo cero, y a los 10 min se les proporcionó una traza de [U-14C]glucosa, y a tiempos variables se agregó PCA y se obtuvo una fracción soluble en PCA. Esta fracción se analizó por HPLC, se identificaron algunos de los compuestos marcados radiactivamente y así separados, y se evaluó el porcentaje de marca radiactiva asociada a fructosa-1,6-bisP.

En la Figura 27 se presentan los patrones de elución en HPLC de cuatro cepas (panel superior a inferior): DF920 (sólo Pfk-1); DF915 (sin Pfk); DF903 (sólo Pfk-2, altos niveles) y DF905 (sólo Pfk-2*, altos niveles). Las cuatro muestras correspondientes fueron obtenidas extrayendo con PCA 30 seg después de agregar la traza de [U-14C]glucosa (i.e. 10,5 min después de iniciar la incubación con glicerol; ver Figura 25). El análisis cromatográfico resuelve una serie de compuestos marcados. Dada la brevedad del tiempo de exposición a la marca es razonable

suponer que todas estas especies son hidratos de carbono de entre dos a seis carbonos. De hecho las condiciones en que se realiza el análisis cromatográfico han sido diseñadas para separar carbohidratos pequeños (Preller *et al.*, 1992). Como el objetivo de estos experimentos era evaluar la marcación por flujo inverso de fructosa-1,6-bisP, sólo se identificaron los picos de elución correspondientes a glucosa-6-P (16 min) y fructosa-1,6-bisP (43 min), y no se intentó identificar otras especies. Con respecto a fructosa-1,6-bisP, la cepa sin Pfk (segundo panel desde arriba) tuvo una marcación de 15% de la marca total. Considerando que el flujo inverso a través de la Fbpasa debe ser prácticamente nulo en estas condiciones, es razonable suponer que este nivel de marcación corresponde a carbonos de la glucosa que llegan a fructosa-1,6-bisP vía gliceraldehído-3-P formado a partir de compuestos del ciclo de pentosas. En las cepas con Pfk-1 y Pfk-2 (primer y tercer paneles) la marcación fue de 20% y 24%, respectivamente. Por último, en la cepa con Pfk-2*, un 39% de la marca radiactiva se encontró asociada a fructosa-1,6-bisP. La Figura 28 muestra los patrones de elución cuando la extracción se hace 1 min después de agregar la marca, i.e. 30 seg después de la situación de la Figura 27. En los cuatro casos, el porcentaje de marca en fructosa-1,6-bisP ha disminuído, pero la marcación sigue siendo mayor en la cepa con Pfk-2* (31% contra 19% de la cepa con Pfk-2 y 8% de las cepas con Pfk-1 y sin Pfk).

En la Figura 29 A se muestra el porcentaje de marca asociada a fructosa-1,6-bisP como función del tiempo transcurrido entre la adición del trazador radiactivo y la extracción perclórica. En buenas cuentas, esto corresponde al curso temporal de la marcación por flujo inverso de fructosa-1,6-bisP entre 0 y 15 min. Las curvas obtenidas indican una marcación transitoria con un curso inicial rápido hasta alcanzar un máximo, y una caída posterior más lenta hacia niveles basales. Aparentemente,

en la cepa con Pfk-2* la marcación de este compuesto es más rápida y alcanza niveles de aproximadamente el doble de los observados en las otras cepas. Aceptando la premisa de que la marcación observada en la cepa sin Pfk corresponde a flujo de radiactividad por alguna vía alternativa a la glicólisis misma (e.g. ciclo de pentosas) y suponiendo por el momento que este flujo es igual en todas las cepas, se puede restar el curso temporal de la cepa sin Pfk del de las otras cepas para obtener sólo la marcación por flujo inverso. Esta se muestra en la Figura 29 B. Sobre la base del método de marcación por flujo inversos entonces, este resultado indicaría que en términos de la magnitud del ciclo fútil que producen en condiciones gluconeogénicas, las tres fosfofructoquinasas pueden clasificarse de la siguiente manera:

Pfk-2* > Pfk-2 > Pfk-1

Figura 27 Patrón de elución de HPLC de extractos perclóricos de cepas con distintas fosfofructoquinasas incubadas con glicerol como fuente de carbono y [¹⁴C-U]glucosa como fuente de marca.

A resuspensiones de células de cada cepa se les proporcionó glicerol como única fuente de carbono y 10 min después una traza de [U-¹⁴C]glucosa. A los 30 seg se hizo la extracción con ácido perclórico. La fracción soluble en PCA fue analizada por HPLC. Las leyendas en el rincón superior izquierdo indican la fosfofructoquinasa de cada cepa. Los números 1 y 2 indican las posiciones en que eluyen fructosa-1,6-bisP y glucosa-6-P respectivamente. Los porcentajes de marca en fructosa-1,6-bisP fueron: 20% (Pfk-1); 15% (sin Pfk); 24% (Pfk-2, altos niveles) y 39% (Pfk-2*).

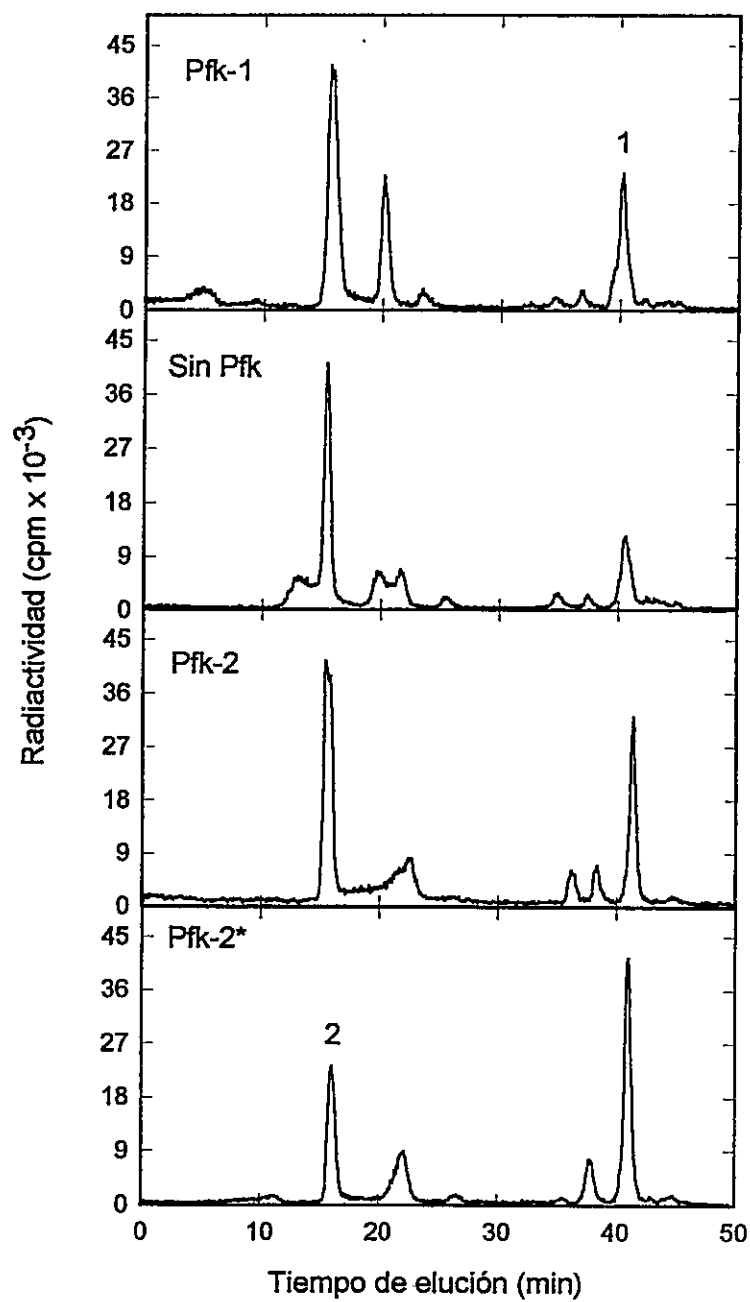


Figura 27

Figura 28 Patrón de elución de HPLC de extractos perclóricos de cepas con distintas fosfofructoquinasas incubadas con glicerol como fuente de carbono y [U-¹⁴C]glucosa como fuente de marca.

Las condiciones son las mismas de la Figura 27, pero la extracción perclórica se realizó 1 min después de agregar el trazador radiactivo.

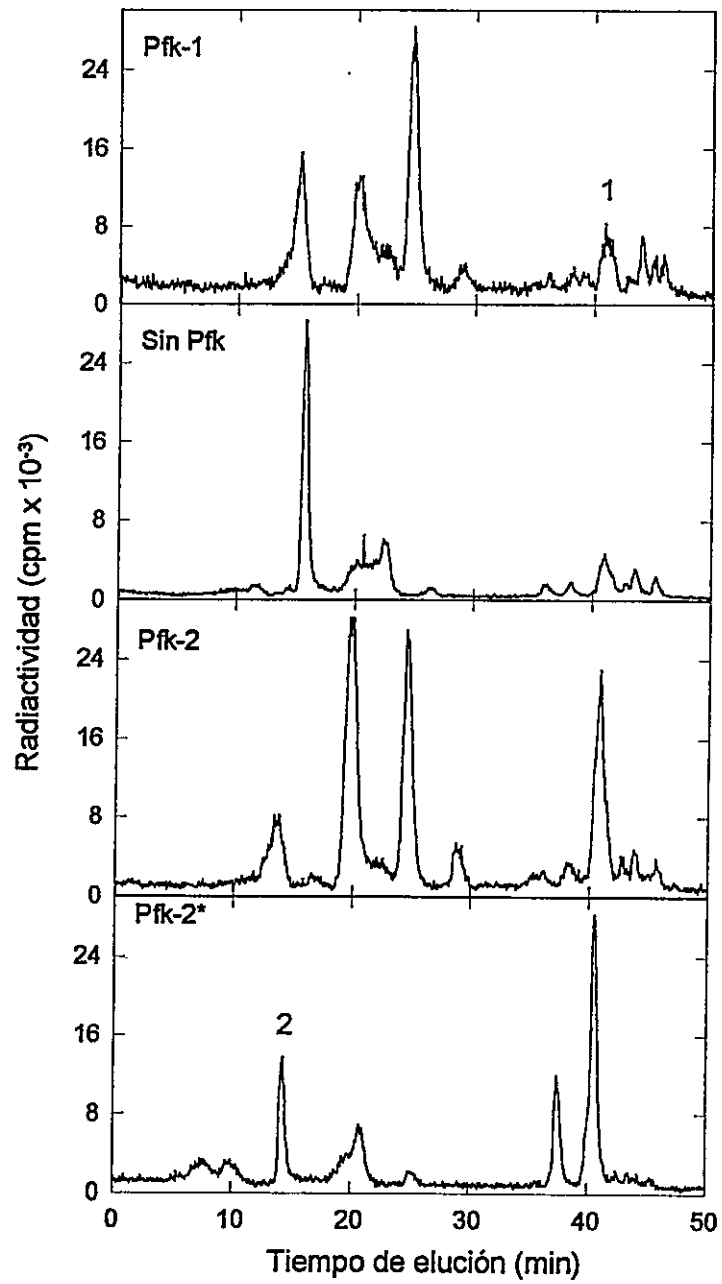


Figura 28

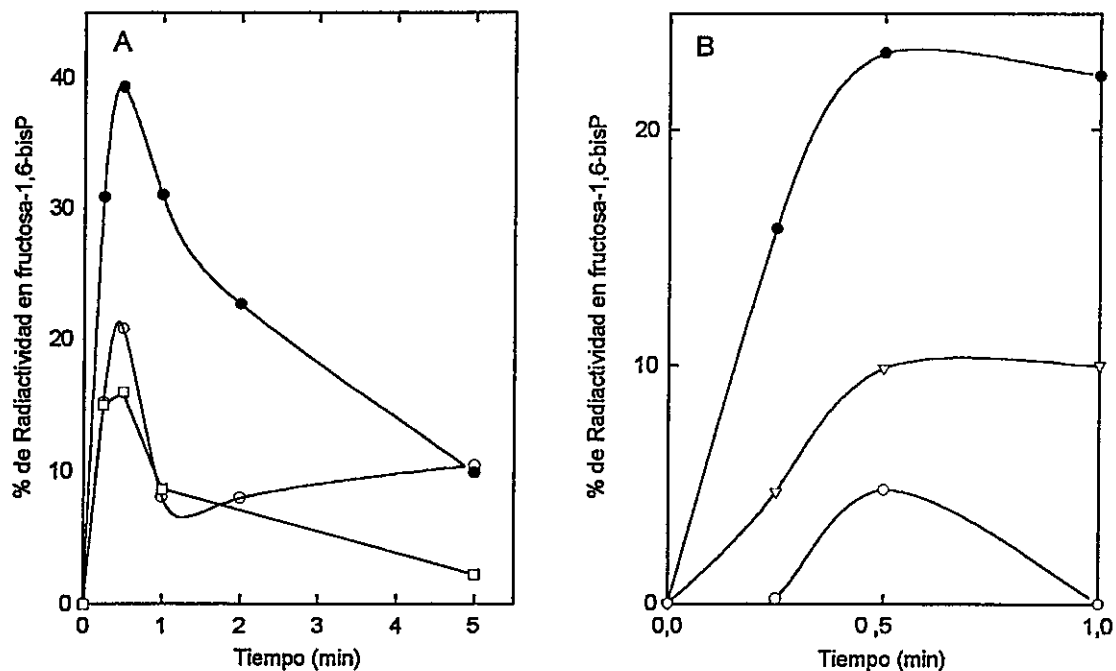


Figura 29 Curso temporal de marcación radiactiva de fructosa-1,6-bisP a partir de $[U-^{14}C]$ glucosa durante gluconeogénesis.

Panel A, se grafica el % de la marca total que se encuentra asociado a fructosa-1,6-bisP en función del tiempo transcurrido entre la adición del trazador y la extracción perclórica. Los símbolos corresponden a las siguientes cepas: DF905 (sólo Pfk-2*; ●), DF920 (sólo Pfk-1; ○) y DF915 (sin Pfk; □). Panel B, mismos datos que en A, pero se ha restado a cada curva el % encontrado en la cepa sin Pfk, para el período 0-0,5 min. Los símbolos corresponden a las siguientes cepas: DF905 (sólo Pfk-2*; ●), DF920 (sólo Pfk-1; ○) y DF903 (sólo Pfk-2; ▽).

6. PRODUCCIÓN DE CO₂ POR CEPAS CON DIFERENTES FOSFOFRUCTO-QUINASAS A PARTIR DE [U-¹⁴C]GLICEROL

Se midió la producción de ¹⁴CO₂ a partir de [U-¹⁴C]glicerol en resuspensiones celulares de cepas con diferentes fosfofructoquinasas. En este caso el glicerol es tanto la fuente de carbono, como la fuente de marca radiactiva. Los resultados se presentan en la Figura 30 A, como el curso temporal de producción de ¹⁴CO₂ para las distintas cepas. Como es de esperar, el CO₂ producido aumenta en el tiempo hasta un máximo, que se alcanza después que la fuente de carbono se ha agotado. Claramente, la cepa con Pfk-2* produce ¹⁴CO₂ a una tasa mayor que las otras cepas. y como resultado, la cepa con Pfk-2* termina produciendo cerca de un 30% más de ¹⁴CO₂ que las otras cepas.

Con el fin de determinar cómo se inscribe esta mayor producción de CO₂ en la distribución de los carbonos de glicerol en distintas fracciones, una vez terminado el experimento de medición de CO₂, se agregó PCA a las resuspensiones, separando así una fracción soluble en PCA (moléculas pequeñas) de una insoluble en PCA (macromoléculas). Además, se precipitó el glicógeno de la fracción PCA-soluble, y se determinó la radiactividad total en cada una de las tres fracciones. De esta manera se elaboró el gráfico de barras de la Figura 30 B, que muestra la distribución (en %) de la radiactividad total en las fracciones siguientes: CO₂ liberado, material insoluble en PCA (mayoritariamente macromoléculas), material soluble en PCA (moléculas menores) y glicógeno.

Figura 30 Producción de CO₂ a partir de [U-¹⁴C]glicerol y distribución final de la radiactividad en diversas fracciones.

Panel A, curso temporal de producción de ¹⁴CO₂ de resuspensiones de bacterias de diferentes cepas con [U-¹⁴C]glicerol como única fuente de carbono. Las fosfofructoquinasas de cada cepa fueron: Pfk-1 (O), Pfk-2 (Δ) y Pfk-2* (□). Panel B, distribución porcentual de marca radiactiva proveniente de [U-¹⁴C]glicerol en las fracciones indicadas 3 h después de agregar [U-¹⁴C]glicerol a las resuspensiones celulares de las cepas con distintas fosfofructoquinasas: Pfk-1 (barras negras); Pfk-2 (barras grises); Pfk-2* (barras blancas).

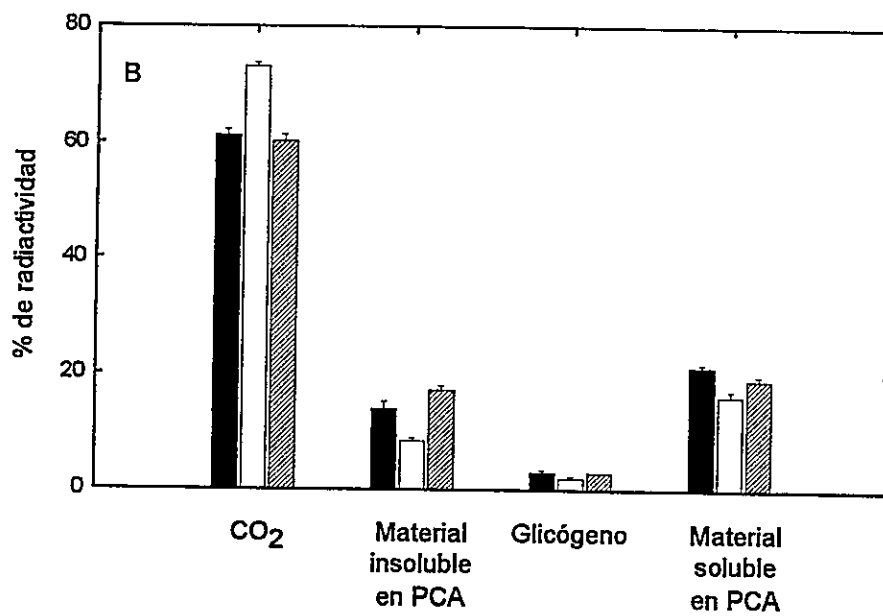
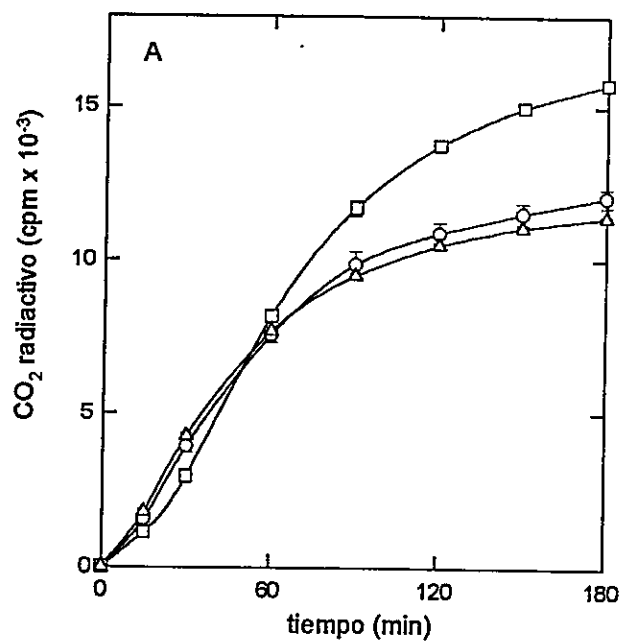


Tabla 5 Distribución de la radiactividad de [U-¹⁴C]glicerol en varias fracciones de cepas de *E. coli* con distintas fosfofructoquinasas

Se prepararon resuspensiones celulares de las diferentes cepas como se indica en el texto. Se incubaron con [U-¹⁴C]glicerol como única fuente de carbono durante 3 h. El CO₂ producido fue capturado durante todo el período de incubación. Al final, se extrajeron las células con PCA y se obtuvieron las fracciones soluble en PCA e insoluble en PCA. Se precipitó el glicógeno presente en la primera. Se determinó la radiactividad total en cada fracción. Entre paréntesis se indica el error estándar.

Cepa	Pfk en cepa	CO ₂	% de radiactividad en la fracción		
			glicógeno	material soluble en PCA	material insoluble en PCA
DF920	Pfk-1	61,2 (1,10)	3,0 (0,40)	21,2 (0,50)	14,0 (1,30)
DF903	Pfk-2	60,2 (1,20)	3,0 (0,05)	19,0 (0,70)	17,2 (0,80)
DF905	Pfk-2*	73,0 (0,70)	2,0 (0,40)	16,2 (1,00))	8,5 (0,50)

Se encontró que, en estas condiciones, una gran mayoría de los carbonos de glicerol se encuentran en CO_2 (60-70%), y el resto está distribuido similarmente entre macromoléculas (16-21%) y moléculas pequeñas solubles en PCA (8-17%). En las tres cepas la incorporación de marca a glicógeno fue mínima (2-3%). De estos resultados también se desprende que mientras la cepa con Pfk-2* incorpora un 73% de la radiactividad a CO_2 , comparado con aproximadamente 60% en las otras cepas, la incorporación a macromoléculas es de 8,5%, comparado con 14% (Pfk-1) y 17% (Pfk-2), y el porcentaje en moléculas solubles es de 16%, comparado con 19% (Pfk-2) y 21% (Pfk-1). En otras palabras, la situación podría describirse diciendo que en la cepa con Pfk-2* la mayor incorporación de radiactividad a CO_2 se hace expensas de lo incorporado a macromoléculas (principalmente) y moléculas solubles (secundariamente). Los resultados se presentan en forma numérica en la Tabla 5.

7. PRODUCCIÓN DE $^{14}\text{CO}_2$ POR CEPAS CON DISTINTAS FOSFOFRUCTO-QUINASAS AL USAR GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO Y $[1-^{14}\text{C}]$ GLUCOSA O $[6-^{14}\text{C}]$ GLUCOSA COMO FUENTE DE RADIATIVIDAD

Con el fin de pesquisar la contribución relativa de distintas vías a la producción de CO_2 durante gluconeogénesis, se determinó el curso temporal de la producción de $^{14}\text{CO}_2$ en las distintas cepas, en condiciones en que la fuente de carbono era glicerol y la fuente de radiactividad era $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa o $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa. En la sección correspondiente de Materiales y Métodos, se propuso un modelo matemático que genera predicciones sobre la producción de CO_2 en estas condiciones como función de la distribución fraccional del flujo de carbonos de glicerol en los sentidos glicolítico y gluconeogénico. En esta sección presentamos los resultados de este enfoque experimental en resuspensiones celulares en reposo.

En la Figura 31 se presentan los cursos temporales de producción de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa (○) y $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa (□) para las cepas DF903 (sólo Pfk-2), DF905 (sólo Pfk-2*) y DF920 (sólo Pfk-1). Además en cada panel se ha trazado la curva resultante de restar punto a punto el curso temporal con $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa del con $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa ($\Delta^{14}\text{CO}_2[1-6]$; línea punteada). En la Figura 32 se presentan los mismos datos de la Figura 31 pero agrupados por tipo de trazador, en vez de por tipo de Pfk, con las diferencias $\Delta^{14}\text{CO}_2[1-6]$ agrupadas en el panel de la derecha. En lo que sigue haremos referencias a ambas figuras. Observemos primero que para ambos tipos de trazadores, la cepa con Pfk-2* produce niveles más altos de $^{14}\text{CO}_2$ que las otras cepas, un resultado coherente con el presentado en la Figura 30, donde la fuente de ^{14}C era glicerol. De hecho, si se suman punto a punto los cursos temporales de producción de $^{14}\text{CO}_2$ con $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa y con $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa, se obtienen las curvas del panel inferior de la Figura 31, resultando cursos temporales cuya posición relativa es muy similar al obtenido con glicerol como fuente de masa y marca radiactiva (comparar con Figura 30). Sin embargo, hay diferencias interesantes cuando se consideran los distintos trazadores en las distintas cepas. Mientras las cepas con Pfk-1 o Pfk-2 tienen cursos temporales de producción de $^{14}\text{CO}_2$ más altos con $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa que con $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa (comparar Figuras 32 A y B), en la cepa con Pfk-2* estos son muy similares, siendo incluso inversa la relación en la mayor parte del período de medición.

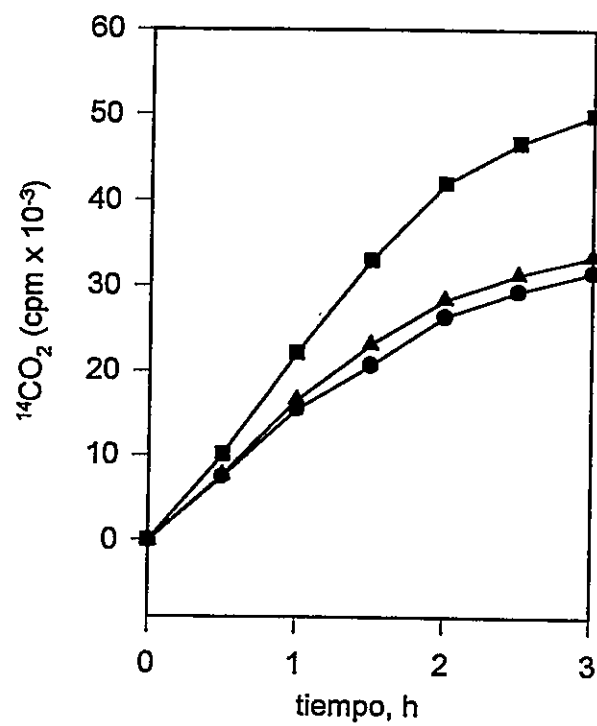
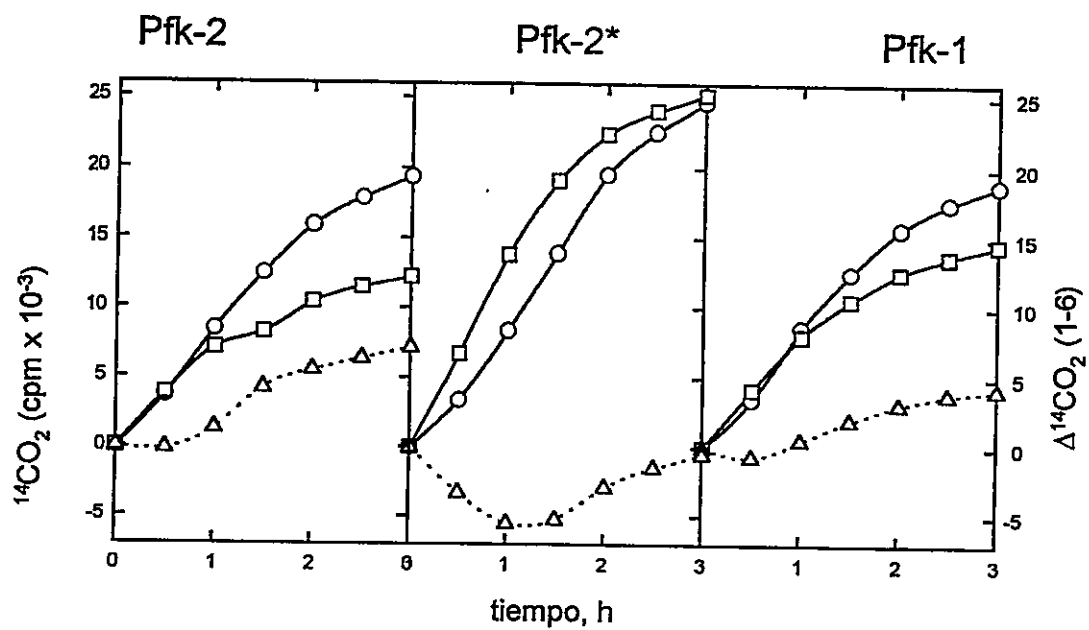
Esto se ve claramente al comparar los cursos temporales de lo que hemos llamado $\Delta^{14}\text{CO}_2[1-6]$ (línea punteada en Figura 31 y panel C en Figura 32), el que es negativo, con un mínimo de cerca de -6.000, para la cepa con Pfk-2*, mientras que para las otras es positivo con excepción del segundo punto. Esto también se puede apreciar en la Figura 31 donde se aprecia que la curva obtenida con $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa es

más alta que la con [6-¹⁴C]glucosa para las cepas con Pfk-1 y Pfk-2, mientras que la situación se invierte para la cepa con Pfk-2* .

Estos resultados son coherentes, en el contexto del modelo planteado en Materiales y Métodos, con una situación en la cual en la cepa con Pfk-2* la fracción de flujo de carbonos destinada a glicólisis, y eventualmente a ciclo de Krebs, se encuentra aumentada a expensas del flujo gluconeogénico, parte del cual resulta en producción de CO₂ a nivel de la rama oxidativa del ciclo de las pentosas.

Figura 31 Curso temporal de producción de ¹⁴CO₂ con glicerol como fuente de masa y [1-¹⁴C]glucosa o [6-¹⁴C]glucosa como fuente de marca radiactiva.

Se determinó el ¹⁴CO₂ producido en el tiempo para cepas cuya única fosfofructoquinasa es la indicada sobre cada panel. La fuente de masa fue glicerol y la fuente de radiactividad fue [1-¹⁴C]glucosa (○) o [6-¹⁴C]glucosa (□). En cada caso se ha trazado la curva correspondiente a la diferencia entre ¹⁴CO₂ marcado de [1-¹⁴C]glucosa menos el marcado de [6-¹⁴C]glucosa, lo que hemos denominado Δ CO₂[1-6] (Δ). En el panel inferior se grafica la suma de las curvas correspondientes al ¹⁴CO₂ producido con [1-¹⁴C]glucosa y [6-¹⁴C]glucosa para las cepas con distintas Pfk: Pfk-1 (triángulo); Pfk-2 (círculo); Pfk-2* (cuadrado).



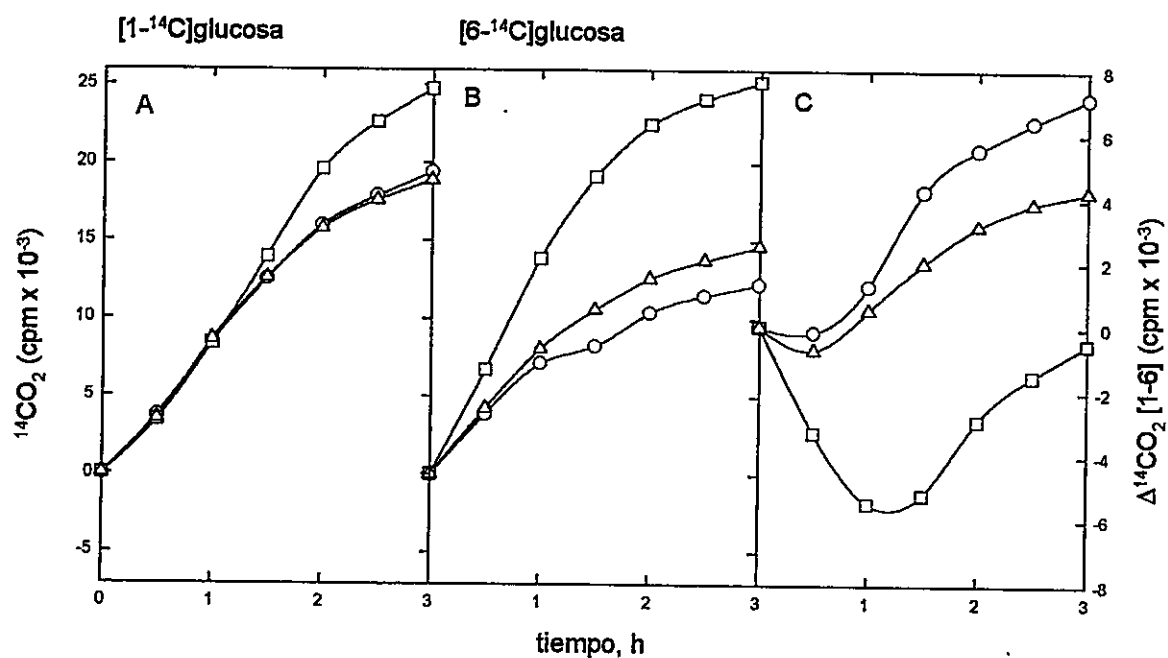


Figura 32 Curso temporal de producción de $^{14}\text{CO}_2$ con glicerol como fuente de masa y [1- ^{14}C]glucosa o [6- ^{14}C]glucosa como fuente de marca radiactiva.

Los mismos datos de la Figura 31 se presentan agrupados de otra manera. La fosfofructoquinasa de la cepa correspondiente fue: Pfk-1 (Δ); Pfk-2 (\circ) y Pfk-2* (\square).

IV DISCUSIÓN

En una primera parte de la Discusión, se analizarán las diversas secciones de los Resultados separadamente, para en una segunda parte discutir los aspectos más generales de la tesis.

1. Modelo de ensayo *in vitro*

Resumen

En esta sección hemos presentado un modelo de ensayo *in vitro* que permite estudiar en condiciones controladas el efecto de las propiedades cinéticas de las distintas fosfofructoquinasas y de otras variables sobre la ocurrencia y la magnitud de un ciclo fútil entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP. Usando las fosfofructoquinasas y fructosa-1,6-bisfosfatasa purificadas de *E. coli*, hemos mostrado que para una amplia variedad de condiciones, Pfk-2* es la fosfofructoquinasa con más alto potencial de generar grados importantes de ciclo fútil. Hemos fundamentado nuestra interpretación de la conducta del modelo de ensayo usando una simulación numérica, la que a partir de no más que las propiedades cinéticas de las fosfofructoquinasas, genera comportamientos muy similares a los observados experimentalmente.

En primer lugar, es importante hacer hincapié en que el modelo de ensayo *in vitro* no fue diseñado con la intención de simular condiciones *in vivo*. El contexto en el cual se debe entender el modelo es el mismo en el cual se entienden los estudios de cinética enzimática, en los que a menudo se usan enzimas adicionales para poder medir la velocidad de un proceso. El modelo no es en definitiva más que eso: un ensayo cinético un poco más complejo en el que se usa la competencia entre un proceso que produce NADH y otro que lo consume para medir el nivel de ciclo fútil, determinado por la actividad de una u

otra fosfofructoquinasa. Sin duda, el modelo tiene limitaciones, implícitas en su mismo diseño, que reducen el intervalo de condiciones que resultaría deseable explorar. Es el caso de todo estudio *in vitro*. Sin embargo, creemos que a pesar de estos inconvenientes, el modelo ilumina de manera enriquecedora el estudio de un ciclo fútil. Al menos, hasta donde sabe el autor, es primera vez que se genera y demuestra un ciclo fútil *in vitro*.

La interpretación de los resultados del modelo en términos de que las diferentes fosfofructoquinasas producen diferentes tasas de ciclo fútil ha sido fundamentada de dos maneras. Primero, los resultados de los experimentos denominados de "desacoplamiento", en los que se visualizan independientemente la actividad de las ramas productora y consumidora de NADH, son coherentes con esa interpretación. En los casos en que los resultados se desvían de lo esperado a primera vista, se puede mostrar que también las desviaciones son esperables, dadas las condiciones ligeramente diferentes que se generan al eliminar una enzima del sistema de ensayo completo. Segundo, las simulaciones numéricas del ensayo acoplado producen curvas simuladas de progreso cualitativamente muy similares a las obtenidas experimentalmente. En el modelo, estas curvas son producidas por un sistema de ecuaciones no lineales que reflejan las relaciones de producción y consumo implícitas en el diseño del ensayo. A su vez las velocidades de esos procesos están regidas por ecuaciones cinéticas generadas por ajuste a las curvas cinéticas reales de las distintas fosfofructoquinasas. Si sólo sobre la base de las diferentes conductas cinéticas, expresadas en las ecuaciones, la simulación genera un comportamiento similar al del sistema experimental, entonces la

interpretación de los resultados experimentales en términos de las diferencias cinéticas es, al menos, suficiente.

En términos de las distintas fosfofructoquinasas, los resultados del modelo son intuitivamente satisfactorios. A partir de sus propiedades reguladoras uno habría predicho, en términos cualitativos y generales, el orden decreciente encontrado en cuanto a potencial para generar ciclo fútil: Pfk-2* > Pfk-2 > Pfk-1.

Claramente, Pfk-1 posee un mecanismo regulatorio que, al menos *in vitro*, resulta el más sofisticado. Dependiendo del balance entre el inhibidor (fosfoenolpiruvato) y el activador (cualquier difosfonucleósido) puede pasar de estar totalmente inactiva a un 200% de su actividad máxima en ausencia de efectores (Babul, 1978). En las condiciones del ensayo, i.e. en presencia de fosfoenolpiruvato 2 mM y concentraciones muy bajas de ADP, era esperable que Pfk-1 se comportara de la manera observada. Este es quizás el punto más débil del modelo: la imposibilidad de obtener ciclo fútil con Pfk-1, debido al requerimiento de fosfoenolpiruvato como "iniciador" y a la presencia de piruvato quinasa, que consumiría inmediatamente cualquier difosfonucleósido, produciendo NAD^+ a expensas del NADH inicial. Pero, volviendo a lo comentado previamente, no se trata de imitar las condiciones *in vivo*. Por lo tanto, podemos considerar que los datos con Pfk-1 representan una especie de control del modelo, i.e. no se observa desviación de lo esperado cuando la enzima está inactiva.

Por su parte Pfk-2 aparece, en términos regulatorios, como una enzima menos regulable que Pfk-1. Su velocidad sólo puede reducirse a cerca de un 20% de la velocidad máxima a concentraciones bastante altas de MgATP (ca. 4 mM) y a concentraciones bajas del otro sustrato (Figura 11). Consecuente con esto, Pfk-2 aparece con un potencial importante para generar ciclo fútil. Dependiendo de la

concentración de MgATP y de su nivel de actividad máxima relativo al de fosfoglucosa isomerasa, Pfk-2 puede generar tasas de ciclo de hasta 70%, lo que implica que 7 de cada 10 moléculas de fructosa-6-P producidas por la fructosa-1,6-bisfosfatasa son convertidas de vuelta en fructosa-1,6-bisP. O, puesto de otro modo, que por cada 3 moléculas de fructosa-6-P consumidas por la fosfoglucosa isomerasa, se gastan 7 moléculas de ATP, comparado con ninguna si la fosfofructoquinasa está inactiva. Proyectado a una situación metabólica, esto podría tener un efecto bastante significativo tanto sobre la demanda de los mecanismos de reposición de ATP como sobre el flujo de carbonos destinados a funciones anabólicas. El que cepas con altos niveles Pfk-2, como única fosfofructoquinasa, crezcan a tasas similares a las de cepas silvestres o con Pfk-1 como única fosfofructoquinasa, sugiere que *in vivo* las condiciones son tales que Pfk-2 está relativamente inhibida o que las células son capaces de tolerar niveles importantes de ciclo fútil. Diversas mediciones en *E. coli* indican que los niveles intracelulares de ATP son del orden de 3-4 mM, para una variedad de condiciones metabólicas, lo que sugeriría que Pfk-2 estaría bastante inhibida, pero no tenemos datos para confirmar que ése sea el caso en nuestras condiciones experimentales. Por último, resulta interesante especular que este potencial relativamente importante de Pfk-2 para generar ciclo fútil constituya la base de su reducción evolutiva a enzima minoritaria, no representando más del 5-10% de la actividad total en cepas silvestres. La validez de tal interpretación dependería, sin embargo, de la relación evolutiva entre Pfk-2 y Pfk-1, la cual no está clara hasta este momento. También desconocemos si Pfk-2 tiene alguna función en el metabolismo de *E. coli*. En un estudio bastante amplio de posibles sustratos alternativos, no se encontró alguno por el que la enzima tuviera una afinidad del orden de la que tiene por fructosa-6-P (Babul, 1978).

Finalmente, Pfk-2*, que carece tanto de la inhibición alostérica de Pfk-1 como de la inhibición menos efectiva de Pfk-2 por niveles altos de Mg ATP a concentraciones bajas de fructosa-6-P, aparece como una enzima con gran potencial para generar ciclo fútil. En la gran mayoría de las condiciones estudiadas, Pfk-2* produjo niveles de ciclo fútil bastante importantes. En términos de sus diferencias con Pfk-2, éstas fueron máximas a niveles relativamente altos de concentración de MgATP y a razones de velocidades máximas de Pfk a fosfoglucosa isomerasa más bien bajas (Figuras 17 y 18). Por ejemplo, para una razón de actividades máximas de Pfk a fosfoglucosa isomerasa de 0,1, con MgATP 3 mM, Pfk-2* genera un porcentaje de ciclo fútil de aproximadamente 60%, comparado con 10% para Pfk-2. Esto indica que si bien ambas fosfofructoquinasas tienen un potencial importante para generar ciclo fútil, hay condiciones en que Pfk-2* supera de manera importante a Pfk-2 en ese respecto.

El modelo ilustra además un aspecto que es particularmente atinente a la regulación de la distribución de los flujos metabólicos. Como se muestra en la Figura 17, para Pfk-2 y Pfk-2* las tasas de ciclo disminuyen al disminuir la razón de actividades Pfk a fosfoglucosa isomerasa. Esto resulta del hecho que Pfk y fosfoglucosa isomerasa compiten por el sustrato común, fructosa-6-P, lo que implica que la magnitud del ciclo fútil también es determinada por la disponibilidad de sustrato. En otras palabras, si la enzima (o enzimas) que compiten con Pfk por fructosa-6-P están presentes a niveles suficientemente altos, o tienen una afinidad muy alta por el sustrato en comparación con Pfk, el que Pfk esté o no inhibida puede resultar irrelevante. A esto se refiere Atkinson cuando plantea que la regulación de las redes metabólicas ocurre en las ramificaciones, donde se inicia una vía diferente y

donde compiten dos o más enzimas por un sustrato común (Cornish-Bowden y Cárdenas, 1990).

Concluimos entonces, que existe una base cinética para el postulado de que en condiciones de flujo gluconeogénico Pfk-2* tiene el potencial más alto para generar ciclo fútil, seguido por Pfk-2.

2. Niveles intracelulares de fructosa-1,6-bisP y glucosa-6-P

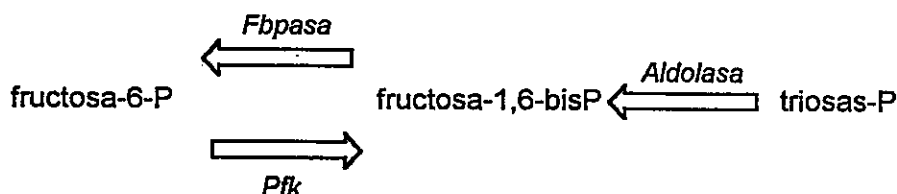
Resumen

Se determinó el curso temporal de la concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP en resuspensiones de bacterias de cepas con distintas fosfofructoquinasas, tras proporcionarles glicerol o glucosa como única fuente de carbono. En glicerol, se encontró que en la cepa con Pfk-2* los niveles de fructosa-1,6-bisP aumentan hasta un máximo de 8 mM, para volver al nivel basal cuando se agota el glicerol, sin alcanzar un estado semi-estacionario. Las cepas con Pfk-2 o Pfk-1 alcanzan estados semi-estacionarios a 4 mM y 3 mM, respectivamente. En glucosa, en la cepa con Pfk-1 el nivel de fructosa-1,6-bisP aumenta muy rápidamente hasta un máximo de cerca de 8 mM para volver al nivel basal, sin alcanzar un estado semi-estacionario. Las cepas con Pfk-2 o Pfk-2* alcanzaron estados semi-estacionarios de 4 mM y 3 mM, respectivamente. No se encontraron diferencias en la velocidad de consumo de glicerol o glucosa entre las cepas.

Antes de analizar los resultados mismos, debemos mencionar otra innovación metodológica que se hizo durante el presente trabajo. Hasta ahora, la medición de niveles intracelulares de metabolitos en *E. coli* y levadura involucraba un proceso de concentración de las células previo a la extracción misma. Esto típicamente involucraba centrifugar los cultivos, y extraer el sedimento en un volumen mínimo, o pasar el cultivo a través de un filtro adecuado, el que después se congela rápidamente y se macera en la solución de extracción (Lowry *et al.*, 1971). El problema de ambos métodos es que las células se someten a condiciones muy diferentes a las de un cultivo homogéneo por períodos de tiempo significativos. En ambos casos, la concentración de las células debe crear condiciones muy diferentes

entre aquellas células que están acumulándose en el fondo del tubo (o en el filtro) y aquellas que aún están viajando en el medio líquido. No es de extrañar, entonces, que estos métodos generen datos no repetibles, en particular para algunos metabolitos (observaciones del autor). Para superar este problema, se diseñó un método de extracción directa, i.e. en que el agente extractor (ácido perclórico) se agrega directamente al cultivo completo, células y medio. Como esto involucra un factor de dilución bastante grande, se usaron resuspensiones celulares concentradas, lo que permite medir, por los métodos enzimáticos clásicos y espectrometría, las concentraciones intracelulares de algunos metabolitos. Este método ha producido resultados muy repetibles en una variedad de condiciones (Babul *et al.*, 1993).

Con respecto a fructosa-1,6-bisP, hemos mostrado que durante gluconeogénesis a partir de glicerol, este metabolito alcanza niveles intracelulares mucho más altos en una cepa con Pfk-2* que en cepas con Pfk-1 o Pfk-2 (Figura 25). Mientras en estas dos últimas el metabolito alcanza estados semi-estacionarios más o menos breves, en la cepa con Pfk-2* el nivel intracelular aumenta (con un breve *plateau* que discutiremos más adelante) hasta un máximo de 8 mM antes de caer abruptamente al nivel basal cuando se agota la fuente de carbono. ¿De qué manera esta conducta es coherente con un porcentaje de ciclo fútil? En el siguiente esquema se muestran las vías de entrada y salida de esqueletos carbonados a fructosa-1,6-bisP, cuando la fuente de masa es gluconeogénica:



De aquí resulta evidente que la concentración de fructosa-1,6-bisP en cualquier momento, será función de las velocidades de la reacción catalizada por Fbpasa, que

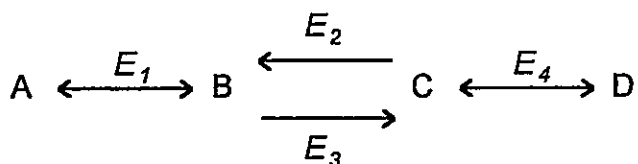
contribuirá al egreso, y por Pfk y aldolasa, que contribuirán al ingreso de masa al metabolito:

$$[\text{fructosa-1,6-bisP}] = V_{ald} - V_{fbpasa} + V_{pfk}$$

Es evidente de esta ecuación que, de mantenerse constante el término $(V_{ald} - V_{fbpasa})$, el aumento de la velocidad de la Pfk redundará en una concentración más alta de fructosa-1,6-bisP. De hecho, hay buenas razones para suponer que las velocidades de las reacciones catalizadas por aldolasa y Fbpasa no se modificarán significativamente como resultado de una mayor actividad de la Pfk. Las consecuencias más directas de una mayor actividad de la Pfk serían el aumento indicado de la concentración de fructosa-1,6-bisP y, dependiendo de otros factores que no analizaremos aquí, quizás la reducción de la concentración de fructosa-6-P. En lo que respecta a la Fbpasa, estos cambios podrían resultar en inhibición de la enzima, ya que a la concentración de 3-4 mM de fructosa-1,6-bisP observada en cepas que suponemos no tienen ciclo fútil significativo, esta enzima estaría claramente saturada (el $S_{0,5}$ medido *in vitro* es 50 μM). En otras palabras, un aumento al doble o triple de la concentración de fructosa-1,6-bisP tendría un efecto despreciable sobre la velocidad de la reacción. En cuanto a aldolasa, si bien la mayor concentración de fructosa-1,6-bisP puede disminuir la velocidad de la reacción, al desplazar la razón producto a sustratos, es esperable que este efecto sea menor, debido a que la fuente de carbono es glicerol, i.e. la presión sobre la reacción catalizada por la aldolasa para proceder en el sentido triosas-P a fructosa-1,6-bisP es sostenida por el flujo de entrada de la fuente de carbono.

Ilustraremos mejor este argumento con un modelo, muy simple, breve e intuitivo. Considérese la siguiente red de reacciones de cuatro metabolitos (A-D)

ligados por dos reacciones con constantes de equilibrio igual a 1,0 (catalizadas por E_1 y E_4) y dos con constantes de equilibrio de un valor de 1000 (catalizadas por E_2 y E_3)¹:



Partiendo de una condición inicial en que D actúa como fuente de masa constante y A como resumidero del sistema, mientras B y C tienen un valor de cero, se puede determinar por aproximación sucesiva o simulación numérica, el estado estacionario de este sistema para cantidad variables de E_3 , i.e. la enzima que generaría ciclo fútil entre B y C, y cantidades fijas de las otras 3 enzimas. En este caso hemos usado un programa disponible que calcula estados estacionarios por iteración (METAMODL). En la Figura 33 A se muestra la relación obtenida entre la razón de actividades de E_3 a E_2 y la concentración al estado estacionario de C normalizada (i.e. la concentración en el estado estacionario dividida por el valor correspondiente cuando la velocidad de E_3 es cero). Si en el esquema previo, se

¹Se usó la ecuación tipo:

$$V_i = \frac{V_f \cdot \frac{[S]}{K_s} - V_r \cdot \frac{[P]}{K_p}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[P]}{K_p}}$$

en la cual V_F y V_R son las velocidades en uno y otro sentido, y K_S y K_P son las constantes de afinidad por sustrato y producto, respectivamente. Para enzimas que catalizan reacciones con constantes de equilibrio muy alejadas del valor unitario, a K_P se le dió un valor de 1000 veces el valor de K_S . Para enzimas que catalizan reacciones con constantes de equilibrio cercanas al valor unitario todos los parámetros cinéticos tuvieron un valor igual a la unidad.

reemplaza B y C por fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP, respectivamente, y D por las triosas-P, se aprecia cómo el incremento de la velocidad de la Pfk (E_3) conduciría, cuando el flujo es gluconeogénico, a un incremento hiperbólico de la concentración de fructosa-1,6-bisP (C en el modelo). En la Figura 33 B se muestran las velocidades al estado estacionario de las cuatro enzimas del modelo como función de la razón de actividades E_3/E_2 . Aquí se aprecia que la velocidad de E_2 ("Fbpasa") aumenta muy poco con el aumento de la velocidad de E_3 ("Pfk"), mientras que las velocidades de E_1 y E_4 disminuyen (se hacen más positivas, i.e. el flujo en el sentido D a A disminuye). No se debe olvidar que estas son velocidades en el estado estacionario: la suma de las velocidades de E_2 , E_3 y E_4 , i.e. la diferencial de cambio de C en el tiempo, es cero. En la situación experimental, en cambio, se trata de un estado transitorio, con algunas cepas alcanzando lo que hemos denominado estado semi-estacionario. Es fácil extrapolar de este análisis a una situación transitoria. En este caso, el curso temporal de la concentración de C subirá con una pendiente mayor y alcanzará un máximo más alto a valores mayores de E_3 , i.e. similar a la situación observada para fructosa-1,6-bisP².

Un rasgo interesante de la curva de curso temporal de la concentración de fructosa-1,6-bisP en la cepa con Pfk-2*, es que sistemáticamente observamos una tendencia a aplanarse, alrededor de los 10 min, como si fuera a establecerse en un estado semi-estacionario similar al que alcanzan las otras cepas. Sin embargo, esta

² **Una nota sobre el modelo.** Las únicas premisas involucradas en este modelo son las referidas a las magnitudes relativas de las constantes de equilibrio de las reacciones involucradas. Con respecto a las catalizadas por Pfk y Fbpasa (E_2 y E_3), es claro que ambas son tienen constantes de equilibrio dos órdenes de magnitud mayores que las demás reacciones de la glicólisis [Lowry, 1971 #66]. Las catalizadas por fosfoglucoasa isomerasa (E_1) y aldolasa (E_4) tienen constantes de equilibrio cercanas al valor unitario [Benevolensky, 1994 #107]. Por su parte, los parámetros cinéticos arbitrarios usados no afectan cualitativamente sino sólo cuantitativamente los resultados.

tendencia a un aparente estado estacionario, de alrededor de 5 mM, es muy breve (cerca de 5 min) y la concentración vuelve a aumentar para alcanzar un máximo de 8 mM antes de caer, muy abruptamente, al nivel basal. Esto sugiere que se requiere la acumulación de algún metabolito para que se gatille el ciclo fútil. Un candidato muy atractivo es fructosa-6-P, pero sobre la base de los datos presentados no podemos sino ofrecer esto como una especulación ilustrada.

Concluimos entonces que al aumentar la magnitud del ciclo entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP aumenta la concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP, cuando el flujo neto de masa es gluconeogénico. Exclusivamente sobre la base de esta relación, las distintas fosfofructoquinasas se podrían ordenar de la siguiente manera en términos de la magnitud del ciclo fútil que estarían produciendo, en las condiciones del experimento:

Pfk-2* > Pfk-2 > Pfk-1

Con respecto a la concentración intracelular de fructosa-1,6-bisP cuando la única fuente de carbono es glucosa, se obtuvo un resultado inesperado para la cepa con Pfk-1, y para el cual no contamos con una explicación satisfactoria. En efecto, en esta cepa la fructosa-1,6-bisP alcanza muy rápidamente un máximo de cerca de 8 mM para descender al nivel basal sin alcanzar un aparente estado semi-estacionario. Las cepas con Pfk-2 y Pfk-2*, en cambio, alcanzaron estados semi-estacionarios de 4 mM y 3mM, respectivamente. Como ya se indicó, las tres cepas crecen a tasas muy similares en glucosa (ver Tabla 3), lo que indica que la mayor acumulación de fructosa-1,6-bisP no se asocia siempre a un crecimiento más lento, y que tal asociación depende de la dirección del flujo de carbonos.

Especulando sobre la posible causa de estos mayores niveles de fructosa-1,6-bisP en la cepa con Pfk-1, se podría pensar que es el resultado de las

concentraciones intracelulares de ADP y fosfoenolpiruvato, los dos efectores de esta fosfofructoquinasa. Por ejemplo, es posible que en las condiciones iniciales (el aumento es relativamente rápido) Pfk-1 tenga una actividad mucho más alta que Pfk-2 y Pfk-2*, lo que podría redundar en una rápida y transitoria acumulación de fructosa-1,6-bisP. No podemos descartar, sin embargo, que el mecanismo causal de este fenómeno sea otro.

En conclusión, estos datos permiten mostrar que: i) los niveles mayores de fructosa-1,6-bisP observados en la cepa con Pfk-2* en gluconeogénesis no son característicos de la cepa *per se*, independientemente de la fuente de carbono; ii) que niveles altos de fructosa-1,6-bisP no están necesariamente asociados a crecimiento lento.

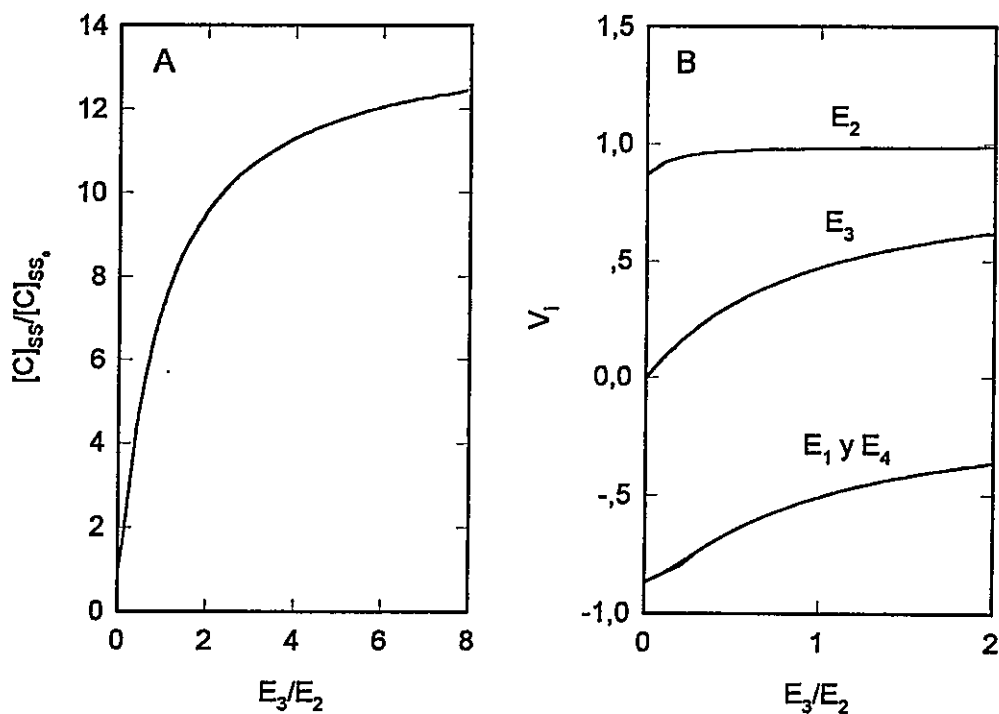


Figura 33 Modelo para efecto de ciclo sobre concentración de fructosa-1,6-bisP.

Panel A, concentración normalizada de C en el estado estacionario como función de la razón de actividades de E_3 a E_2 . La concentración normalizada corresponde a la concentración al estado estacionario de C dividida por su concentración cuando la razón E_3 a E_2 es cero. Panel B, velocidad de E_1 , E_2 , E_3 y E_4 al estado estacionario (V_i) como función de la razón de actividades de E_3 a E_2 .

3. Método de medición del ciclo fútil por marcación por flujo inverso

Resumen

Se diseñó un nuevo método para medir porcentaje de ciclo fútil, basado en la medición de la marcación radiactiva de un compuesto cuando la marca radiactiva proviene de una dirección opuesta a la del flujo neto de masa. Se aplicó el método a una situación *in vitro* en la que se puede medir el porcentaje de ciclo fútil y la marcación por flujo inverso independientemente, para el par de reacciones catalizadas por Pfk y Fbpasa. Se mostró, tanto para una situación de flujo glicolítico como para una de flujo gluconeogénico, una relación directa entre el porcentaje de ciclo fútil y la marcación por flujo inverso de fructosa-1,6-bisP y fructosa-6-P, respectivamente.

Uno de los problemas que se enfrentó en el presente trabajo fue cómo medir, al menos en términos comparativos, la magnitud del ciclo fútil. Se han usado varios métodos para enfocar este problema en el pasado. La pérdida de ^3H de $[5\text{-}^3\text{H}, \text{U-}^{14}\text{C}]$ -glucosa-6-P se ha usado para demostrar la ocurrencia de ciclo fútil entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP en el músculo del vuelo del abejorro (Leite *et al.*, 1988), células hepáticas (Clark, *et al.*, 1974) y músculo esquelético (Challiss, *et al.*, 1984). También la razón $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ en las hexosas monofosfato tras metabolismo de $[2\text{-}^3\text{H}, 2\text{-}^{14}\text{C}]$ -glucosa-6-P se ha usado para medir un ciclo fútil entre glucosa y glucosa-6-P en músculo y cuerpo graso de polilla (Surholt y Newsholme, 1983). Sin embargo, la interpretación de las mediciones de destritiación es problemática (Clark, *et al.*, 1974), y su aplicabilidad a organismos con tasas metabólicas muy altas, e.g. bacterias, no ha sido demostrada. Otro enfoque ha sido medir la reubicación de marca de ^{14}C asociada a posiciones particulares de un compuesto. Un caso de este enfoque es el uso de la interconversión entre los carbonos 1 y 6 de hexosas monofosfato y hexosas bifosfato para demostrar la existencia de un ciclo fútil entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP en hepatocitos de ratas (Katz y Rognstad, 1976) y en *Tetrahymena* (Borowitz *et al.*, 1977). Si bien en este método la interpretación es más directa, las técnicas involucradas ofrecen dificultades considerables. En otros casos, usando el mismo

enfoque, no se encontraron evidencias de ciclo fútil en cepas mutantes de levadura y *E. coli* en situaciones en que era esperable que tal ciclo ocurriera (Buñuelos y Fraenkel, 1982; Chambost y Fraenkel, 1980). Sin embargo, las premisas no demostradas que se requieren para interpretar estos resultados negativos hacen cuestionable cualquier interpretación. Más recientemente, se ha medido la interconversión de carbonos en levadura usando espectroscopía de resonancia magnético nuclear con ^{13}C , pero no se encontró evidencia de ciclo fútil para fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP, mientras que los datos para fosfoenolpiruvato y piruvato no pudieron ser interpretados como evidencia de ciclo por una aparente falta de equilibrio de la marca en el oxaloacetato (Navas *et al.*, 1993). Finalmente, se ha intentado usar la incorporación de $^{32}\text{P}_i$ a la posición 1 de fructosa-1,6-bisP como medida de ciclo fútil gluconeogénico entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP en las mismas cepas utilizadas en esta tesis (Daldal y Fraenkel, 1983). Los autores no encontraron evidencia de ciclo fútil en ninguna cepa y, dado el profundo desconocimiento que tenemos acerca del destino de grupos fosfatos proporcionados exógenamente, así como acerca de la tasa de recambio del ATP, habría sido sorprendente que ello hubiera ocurrido.

En esta tesis hemos presentado un método, nuevo y comparativamente sencillo, para determinar la ocurrencia de grados diferentes de ciclo fútil. Hemos fundamentado el método con mediciones en un sistema *in vitro* con enzimas comerciales y condiciones controladas. En este sistema *in vitro*, hemos demostrado, tanto para una situación de flujo neto glicolítico como para una de flujo neto gluconeogénico, que hay una clara relación lineal entre el nivel de ciclo fútil y la marcación de un compuesto a partir de una fuente de marca ubicada en un punto distal al origen de la masa. En otras palabras, hemos creado una situación en la cual

la marcación del compuesto en cuestión depende de la velocidad de la reacción que define la ocurrencia de ciclo fútil. En realidad, la simpleza del método lleva a preguntarse por qué razón no fue concebido o usado previamente. Una razón posible es que el método permite fundamentalmente hacer mediciones relativas del ciclo fútil, i.e. es útil sólo en la medida en que se tienen condiciones con diferente potencialidad de ciclo fútil, o alternativamente, controles adecuados. A menudo este no es el caso, particularmente cuando se trata de estudios metabólicos en tejidos, donde además la multiplicidad de tipos celulares complica la interpretación de los resultados.

En la sección siguiente discutiremos los resultados obtenidos al aplicar este método a la situación *in vivo* en cepas con distintas fosfofructoquinasas.

4. Marcación glicolítica de fructosa-1,6-bisP durante gluconeogénesis

Resumen

Se aplicó el método de marcación por flujo inverso para estimar tasas de ciclo fútil durante gluconeogénesis en cepas con distintas fosfofructoquinasas. Se encontró que en la cepa con Pfk-2* la marcación de fructosa-1,6-bisP a partir de glucosa radiactiva, cuando el flujo de masa es gluconeogénico, es más rápida y alcanza niveles máximos mayores que en cepas con Pfk-1 o Pfk-2. En la cepa con Pfk-1 la marcación fue apenas superior a la encontrada en una cepa sin Pfk.

En esta sección discutiremos los resultados obtenidos al aplicar el método de marcación por flujo inverso, discutido en la sección previa, a la situación *in vivo* de cepas con distintas fosfofructoquinasas.

El curso temporal de marcación de fructosa-1,6-bisP a partir de [U-¹⁴C]glucosa, durante gluconeogénesis, presenta un rápido aumento, alcanzando en

todos los casos un máximo dentro del lapso de un minuto tras proporcionar el trazador, con una disminución posterior más lenta hacia niveles basales. Este tipo de cinética es esperable, pues si bien la marcación del compuesto en cuestión va a depender fundamentalmente de la velocidad con que la marca radiactiva llega a él, la desaparición de la marca depende también del grado de dilución de las moléculas marcadas en el compuesto frío. Como los niveles de fructosa-1,6-bisP son del orden milimolar, la radiactividad específica que alcanza la fructosa-1,6-bisP es bastante baja (aproximadamente 10^{-6} mCi/mmol comparada con 304 mCi/mmol de la [U- ^{14}C]glucosa usada).

Un aspecto sorprendente de los resultados es que incluso en una cepa que carece de fosfofructoquinasa, hasta cerca de un 18% de la radiactividad se acumula por algún momento en fructosa-1,6-bisP. Esto indicaría que hay actividad del ciclo de pentosas, i.e. que carbonos de glucosa pueden alcanzar fructosa-1,6-bisP vía triosas-P que se han generado por actividad de la transquetolasa. Sin embargo no es posible establecer, en las condiciones del experimento, si los carbonos de glucosa ingresan a esta vía por la rama oxidativa o por la rama no oxidativa de ingreso al ciclo.

Resulta claro que en la cepa con Pfk-2* la marcación de fructosa-1,6-bisP es más rápida y alcanza un nivel máximo mayor que en la cepa con Pfk-2, en la que a su vez es más rápida y mayor que en la con Pfk-1. Si se considera el lapso entre 0 y 30 seg después de agregado el trazador, la relación aproximada de las pendientes de la curva temporal de marcación es 4:2:1 (Pfk-2*:Pfk-2:Pfk-1). Si se supone que la salida de marca radiactiva desde fructosa-1,6-bisP es muy lenta en relación a su ingreso, lo que es razonable dado lo expuesto en el párrafo previo, entonces esta razón entre las pendientes refleja la razón entre las actividades de las fosfofructoquinasas en ese lapso.

El análisis anterior supone que la radiactividad específica de fructosa-6-P es la misma en las distintas cepas, lo que no hemos demostrado. Sin embargo, hay razones para estimar que esta variable tiene valores muy similares. Por una parte, uno esperaría que mayores tasas de ciclo conduzcan a menores concentraciones de fructosa-6-P en estado estacionario. Como ya hemos indicado, no fue posible pesquisar esta predicción debido a que las concentraciones de este metabolito son menores que los límites de replicabilidad del método usado para medirlas. De ser así, esto tendería a aumentar la radiactividad específica de fructosa-6-P en cepas con mayores tasas de ciclo fútil. Por otra parte, como hemos discutido en otras secciones de esta tesis, un mayor porcentaje de ciclo tendería a reducir el flujo de fructosa-6-P a glucosa-6-P, y por ende a reducir el flujo inverso de marca de glucosa-6-P a fructosa-6-P. Esto tendería a reducir la actividad específica de fructosa-6-P. Como ambos efectos dependen de una misma variable, la actividad de Pfk, los efectos tenderían a compensarse. En todo caso, un análisis de los cromatogramas correspondientes (ver Figuras 27 y 28) sugiere que éste es el caso, ya que el nivel de marcación de glucosa-6-P es siempre menor en la cepa con Pfk-2*.

Teniendo en cuenta las observaciones del párrafo anterior, los resultados de este enfoque vuelven a ser coherentes con lo encontrado tanto en el modelo *in vitro* como en la medición de niveles intracelulares de fructosa-1,6-bisP, i.e. que en una cepa con Pfk-2* el ciclo fútil sería mayor que en una con Pfk-2, y en ésta mayor que en una con Pfk-1.

5. Producción de CO₂ por diferentes cepas a partir de [U-¹⁴C]glicerol

Resumen

Se midió la producción de ¹⁴CO₂ a partir de [U-¹⁴C]glicerol en cepas con diferentes fosfofructoquinasas, y se encontró

que la cepa con Pfk-2* produce niveles finales más altos de CO₂ que cepas con Pfk-1 o Pfk-2. Determinaciones de la distribución final de marca radiactiva en distintas fracciones, indicaron que junto con destinar más carbonos de glicerol a CO₂, la cepa con Pfk-2* destina menos carbonos a material insoluble en PCA (moléculas grandes) y a material soluble en PCA (moléculas pequeñas).

Hemos mostrado en esta sección del trabajo que una cepa con Pfk-2* destina una proporción significativamente mayor (cerca de un 30%) de los carbonos provenientes de glicerol a CO₂ que las cepas con Pfk-1 o Pfk-2.

Una mayor proporción de carbonos destinados a CO₂ implica una mayor tasa total de respiración. Típicamente, se considera que ésta es una de las respuestas predecibles de un sistema metabólico sometido a un ciclo fútil. De hecho, una mayor tasa de respiración ha sido usada como evidencia de la ocurrencia de un ciclo fútil (Chao y Liao, 1994; Navas, et al., 1993; Patnaik *et al.*, 1992). El razonamiento es atractivo. Un ciclo fútil involucra un gasto extra , y fútil, de ATP. Esta demanda extraordinaria sobre el ATP disponible debe ser compensada, y los mecanismos regulatorios del metabolismo se encargan de aumentar el flujo de carbonos hacia la respiración, con la consecuente producción de ATP. La premisa detrás de este argumento es que el ATP es limitante, es decir que su disponibilidad determina la velocidad de los procesos anabólicos y de síntesis macromolecular, y por lo tanto la mantención de sus niveles es un principio rector de los mecanismos que regulan el metabolismo. Baste señalar que esta premisa, tan prevalente en la literatura sobre metabolismo, nunca ha sido demostrada. De hecho, existen poderosas razones para pensar que el ATP no es limitante para los procesos de crecimiento celular (Marr, 1991). Es por esta razón que en esta tesis este resultado no se considera una evidencia *per se* de la ocurrencia de ciclo fútil, sino más bien una consecuencia posible del mismo.

Como hemos mostrado en el desarrollo matemático de la sección II. 12. i., es posible esperar una mayor producción de CO_2 a partir de tasas más altas de ciclo fútil meramente como consecuencia del efecto de "shunting" que puede tener un ciclo fútil sobre el flujo de carbonos de origen gluconeogénico. El modelo formaliza una idea muy intuitiva: si como resultado del ciclo fútil a nivel de Pfk/Fb pasa, el flujo neto de carbonos en la dirección gluconeogénica a partir de fructosa-6-P disminuye, el consecuente aumento del flujo glicolítico de carbonos redundará en mayor producción de CO_2 . Esto es así por la simple razón que los tres carbonos de las triosas pueden convertirse en CO_2 a nivel de la reacción piruvato a acetil-CoA y en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, mientras que de cada dos moléculas de triosas convertidas en hexosas un máximo de dos (de seis) pueden liberarse como CO_2 a nivel de la rama oxidativa del ciclo de pentosas. Hemos mostrado que el modelo genera curvas de producción de CO_2 en el tiempo similares a las observadas experimentalmente.

No se pretende en esta tesis mostrar que el ATP no es limitante ni que una mayor producción de CO_2 no responda a una regulación compensatoria para recuperar los niveles de ese metabolito. Más bien, queremos mostrar que hay otras formas de explicar el mismo fenómeno, y que tales formas generan predicciones coherentes con la hipótesis planteada.

En términos del balance final de radiactividad proveniente de ^{14}C -glicerol, o en realidad de los carbonos de ese origen gluconeogénico, hemos encontrado que los mayores niveles de CO_2 producido se logran a expensas principalmente de carbonos que la célula destina a moléculas mayores, insolubles en PCA, i.e. a productos del anabolismo, y en segundo lugar a moléculas pequeñas, posiblemente productos excretados como lactato o acetato. Este resultado es bastante trivial, si se considera

lo grueso del fraccionamiento realizado y los destinos posibles de los carbonos que la célula usa. Sin embargo, es interesante hacer notar que cuando la célula destina una mayor proporción de carbonos a respiración, lo hace a expensas de otros destinos posibles, por ejemplo el de producir moléculas precursoras, cuya disponibilidad puede ser tanto o más limitante como la de ATP para los procesos de síntesis macromolecular y, eventualmente, el crecimiento.

6. Producción de CO₂ con glicerol como fuente de carbono y [1-¹⁴C]glucosa o [6-¹⁴C]glucosa como fuente de radiactividad

Resumen

Se midió la producción de ¹⁴CO₂ en resuspensiones de cepas con distintas fosfofructoquinasas a las que se les proporcionó glicerol como fuente principal de carbonos y una traza de [1-¹⁴C]glucosa o [6-¹⁴C]glucosa como fuente única de marca radiactiva. Se encontró que en las cepas con Pfk-1 o Pfk-2 la producción de ¹⁴CO₂ a partir de [1-¹⁴C]glucosa fue mayor que a partir de [6-¹⁴C]glucosa. En la cepa con Pfk-2*, en cambio, la situación fue la inversa por casi todo el período de medición. Se presentó un modelo matemático que permite relacionar este resultado con la hipótesis de trabajo.

En realidad, los experimentos de producción de ¹⁴CO₂ a partir de glucosa marcada en el carbono 1 o en el 6, siendo la fuente de masa glicerol, surgieron de una predicción inesperada de un modelo de simulación numérica que se usó para explorar las consecuencias de un ciclo fútil. En ese modelo, que simula la operación de una red de reacciones similar a la glicólisis-gluconeogénesis, se pesquisaron una serie de posibles situaciones experimentales, buscando predicciones que fuera factible verificar experimentalmente. Una de esas predicciones fue que un sistema con mayor ciclo fútil a nivel de las reacciones correspondientes a la interconversión de fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP, produciría mayores niveles de CO₂. Este

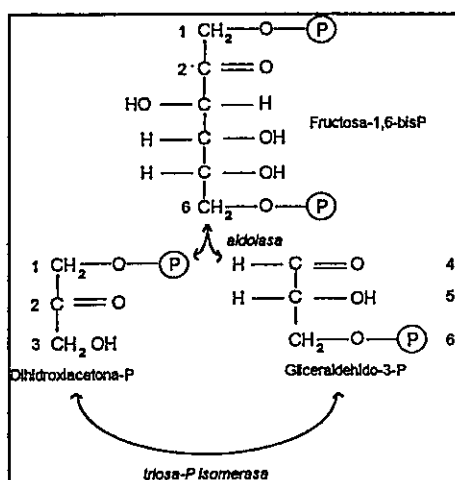
resultado, como ya vimos en la sección anterior, coincide con lo encontrado para la cepa con Pfk-2*, i.e. se verifica coherencia entre la hipótesis y la observación.

Buscando explorar más detalladamente el mecanismo de este efecto, se simularon una serie de experimentos en que la fuente de carbono era glicerol y la de marca radiactiva era glucosa marcada en distintas posiciones. La predicción más interesante resultó ser que a mayor ciclo fútil en la interconversión de fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP, el $^{14}\text{CO}_2$ producido a partir de $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa aumentaba en relación al producido a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa, hasta que por sobre un umbral dado el primero era mayor que el segundo. Esta predicción resultaba curiosa, casi improbable, en vista de que generalmente la diferencia $^{14}\text{CO}_2$ producido a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ glucosa menos el producido de $[6-^{14}\text{C}]$ glucosa (el aquí denominado $\Delta\text{CO}_2[1-6]$) es cero o positiva. Esto se basa en que, durante glicólisis, la vía oxidativa de ingreso al ciclo de las pentosas puede producir CO_2 exclusivamente a partir del carbono 1 de glucosa, y no existe una vía conocida que produzca CO_2 exclusivamente a partir del carbono 6 (Larrabee, 1989).

Lo extraño de la predicción se desvanece, sin embargo, al considerar que en este caso la marcación de CO_2 se hace en condiciones gluconeogénicas, i.e. el sentido del flujo está invertido con respecto a la glicólisis. En estas condiciones, el $\Delta\text{CO}_2[1-6]$ no constituye una medida del flujo a través de la vía oxidativa de ingreso al ciclo de las pentosas.

Al examinar cuáles son las características del flujo en esas condiciones, así como las consecuencias del ciclo fútil sobre el mismo, en el contexto del modelo, se llega al mecanismo que hemos formalizado en la sección II. 11. i y II. 11. ii. La base del efecto reside en la el destino diferencial de los carbonos 1 y 6 de fructosa-1,6-bisP (provenientes de los respectivos carbonos de glucosa) en las triosas que son los

productos de la reacción de ruptura de esa hexosa, catalizada por la fructosa-1,6-bisP aldolasa:



En otras palabras, el carbono 6 de glucosa termina en la molécula de gliceraldehído-3-P y de allí pasa directo a las reacciones subsiguientes de la glicólisis, mientras que el carbono 1 pasa primero por la molécula de dihidroxiacetona-P antes de convertirse en el tercer carbono de gliceraldehído-3-P. Como detallamos en el modelo, durante gluconeogénesis esto tiene como consecuencia que la pérdida del carbono 6 desde gliceraldehído-3-P (en términos del flujo a glicólisis subsiguiente) a dihidroxiacetona es menor que la pérdida del carbono 1 desde gliceraldehído-3-P hacia fructosa-1,6-bisP, simplemente porque el primer flujo de pérdida va en contra y el segundo a favor del flujo de masa predominante, i.e. gluconeogénico.

Por último, hemos visto que si el efecto de un mayor ciclo fútil es aumentar el flujo glicolítico a expensas del gluconeogénico, este efecto se amplifica, resultando en que el $\Delta\text{CO}_2[1-6]$ disminuye, hasta eventualmente hacerse negativo. A continuación discutimos brevemente por qué hay buenas razones para pensar que un mayor ciclo tiene como efecto disminuir el flujo gluconeogénico.

Ya hemos discutido por qué es razonable esperar que un mayor ciclo fútil resultante de mayor actividad de Pfk durante gluconeogénesis reduzca la fructosa-6-

P disponible para reacciones gluconeogénicas subsiguientes. Esta reducción de la fructosa-6-P termina reflejándose en el incremento de la concentración de fructosa-1,6-bisP, que hemos mostrado ocurre *in vivo* en la cepa con Pfk-2*. Como la reacción catalizada por la fructosa-1,6-bisP aldolasa está relativamente cercana al equilibrio en condiciones fisiológicas (Babul, et al., 1993), este aumento de la concentración de fructosa-1,6-bisP debe a su vez resultar en un desplazamiento de la reacción de ruptura de la fructosa-1,6-bisP, aumentando su velocidad en el sentido inverso, en este caso glicolítico. Por ende, es razonable esperar que el ciclo fútil tendría ambos efectos: aumentar el flujo glicolítico y disminuir el gluconeogénico.

Hemos mostrado que la cepa con Pfk-2* tiene un curso temporal del $\Delta\text{CO}_2[1-6]$ que pasa por un máximo negativo para después remontar a un valor próximo a cero, mientras que las cepas con Pfk-1 y Pfk-2 tienen valores cercanos a cero al principio para después remontar a valores positivos (Figuras 31 y 32). Es claro que podrían imaginarse mecanismos diferentes que el aquí propuesto para generar este efecto. De hecho, no contamos con un dato crucial para demostrar nuestro punto, la medida de cuánto CO_2 se está liberando exclusivamente en la vía oxidativa de ingreso al ciclo de las pentosas, y por el momento no resulta fácil concebir cómo realizar esa medición. Por lo tanto, esta evidencia se ofrece dentro del contexto de las otras presentadas en la tesis, todas las cuales son coherentes con la ocurrencia de tasas de ciclo fútil más altas en la cepa con Pfk-2* durante gluconeogénesis, por mayor actividad de la Pfk-2* en esas condiciones.

7. Discusión General

i. Propiedades de las enzimas *in vitro* y roles *in vivo*

Uno de los temas más controvertidos y menos resueltos que nos ha dejado la Enzimología es el que se refiere al rol *in vivo* de las propiedades cinéticas y reguladoras de las enzimas *in vitro*. Un vistazo al sobredimensionado volumen "Enzyme Kinetics" de Segel (Segel, 1975) indica que éste claramente no fue un tema que interesara a los enzimólogos. Como señala Atkinson: "...little, if any, contact between the parameters and equation of that type of enzyme kinetics and the study of metabolism and its control is yet apparent." (Atkinson, 1977). En general, la literatura en este sentido se ha limitado a comentar cuán "adecuadas" son las magnitudes de las constantes de afinidad y actividades máximas de las enzimas *vis a vis* las concentraciones fisiológicas de los sustratos y productos, en términos de un control "eficiente" del metabolismo (ver el mismo Atkinson). Si bien esto no deja de ser una observación necesaria, resulta claramente insuficiente para explicar biológicamente la multiplicidad de conductas cinéticas descritas *in vitro*. Y la verdad es que por muy intelectualmente satisfactorio que resulte, por ejemplo, la existencia de enzimas alostéricas, cuya actividad puede ser afinada *in vitro* por modificaciones relativamente leves de la concentración de efectores, nadie ha demostrado que tales propiedades jueguen un rol efectivo en el metabolismo.

Existe, sin embargo, una cantidad de estudios en bacterias y levadura, en los cuales se ha caracterizado el crecimiento y metabolismo en células en las que hay variaciones en la cantidad de una enzima, desde completa deficiencia a diferentes grados de exceso (Benevolensky *et al.*, 1994; Fraenkel, 1968; Fraenkel, 1986; Fraenkel y Vinopal, 1973; Hillman y Fraenkel, 1975; Josephson y Fraenkel, 1974; Kupor y Fraenkel, 1972; Zablotty y Fraenkel, 1967). En general, al eliminar una

actividad totalmente, se observan las consecuencias esperables a partir de la red conocida de reacciones del metabolismo de carbono. Si no hay vías alternativas, las bacterias no crecen en sustratos cuyo metabolismo pasa por la enzima eliminada. Si las hay, pueden crecer, aunque a veces más lentamente. Por ejemplo, la eliminación de fosfoglucoisomerasa en *E. coli* no afecta el crecimiento en glucosa, porque hay flujo a través del ciclo de las pentosas, aunque la tasa de crecimiento es menor (Vinopal *et al.*, 1975). En levadura, en cambio, mutantes de esta enzima no crecen en glucosa (Clifton *et al.*, 1978). Similarmente, mutantes de *E. coli* que carecen de fructosa-1,6-bisfosfatasa no pueden crecer en sustratos gluconeogénicos, como glicerol o acetato (Fraenkel y Vinopal, 1973), mutantes que carecen de fructosa-1,6-bisP aldolasa son incapaces de crecer en azúcares (Böck y Neidhardt, 1966) y mutantes sin triosa-P isomerasa requieren glicerol o ribosas para crecer en sustratos gluconeogénicos (Fraenkel y Vinopal, 1973).

Los casos en que se ha aumentado la cantidad de una enzima en particular, vía el gen clonado en un plasmidio, son más escasos y, en general, no han contribuido a entender cómo funciona el control de las vías metabólicas. Por ejemplo, incrementos de hasta 50 veces en la cantidad de fructosa-1,6-bisP aldolasa tuvieron escaso efecto sobre el flujo de glucosa y sobre el grado de equilibrio de las dos mitades de fructosa-1,6-bisP en resuspensiones de *E. coli* (Babul, *et al.*, 1993). En levaduras, células con niveles elevados de fosfoglucoisomerasa no difieren de células con niveles silvestres (Benevolensky, *et al.*, 1994). Por otra parte, cepas de *E. coli* con niveles incrementados de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa o la fosfoenolpiruvato sintetasa crecen más rápido en succinato o piruvato, respectivamente, que cepas con niveles silvestres, sugiriendo que estas enzimas son limitantes en esas condiciones (Chao *et al.*, 1993). También se ha intentado crear un

ciclo fútil, sobreexpresando simultáneamente la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la fosfoenolpiruvato carboxilasa en *E. coli*, y aunque no se demostró la ocurrencia del ciclo esperado, se redujo el rendimiento del crecimiento y aumentó el consumo de oxígeno y glucosa (Chao y Liao, 1994).

Más escasos aún son los estudios en que se explore el efecto metabólico de enzimas con propiedades alteradas. A pesar de que se han obtenido una serie de formas mutadas de Pfk-1 de *E. coli*, entre ellas una sobre la que fosfoenolpiruvato actúa como activador en vez de inhibidor (Berger y Evans, 1990; Hellinga y Evans, 1987; Lau y Fersht, 1987; Lau *et al.*, 1987), nunca se ha descrito algún efecto metabólico de estas variantes. También existe una variante de la fructosa-1,6-bisfosfatasa de *E. coli* que es insensible a inhibición por AMP, pero cepas con esta enzima no difieren en su crecimiento en una variedad de fuentes de carbono de la cepa silvestre (Sedivy *et al.*, 1986). En síntesis, hasta el momento no existe ningún estudio que demuestre un nexo operativo entre propiedades reguladoras de una enzima del metabolismo de carbono y el metabolismo o crecimiento celular.

En esta tesis creemos haber hecho una contribución interesante en este contexto. Partiendo de la observación de un fenotipo de crecimiento, hemos correlacionado esa observación con, por una parte, las diferentes propiedades regulatorias de una enzima mutante del metabolismo de carbonos y, por otra, con una serie de características metabólicas *in vivo* de la cepa que tiene esa mutante. Hemos establecido así un nexo, el ciclo fútil, entre propiedades cinéticas *in vitro* y características metabólicas *in vivo*. Falta aún, y este es el eslabón más interesante en términos biológicos, establecer la conexión entre esas consecuencias metabólicas y el fenotipo de crecimiento. Es decir, ¿qué proceso crítico se ve afectado por las

consecuencias del ciclo fútil? En lo que sigue, consideraremos brevemente este aspecto.

ii. Metabolismo y crecimiento en bacterias

Hace ya un siglo que se planteó el problema de cómo se regula el crecimiento bacteriano y hasta ahora no hay una respuesta satisfactoria (Andersen y von Meyenburg, 1980; Duclaux, 1898-1901; Marr, 1991). Monod demostró hace más de 50 años que la tasa y rendimiento del crecimiento de bacterias depende de la fuente de carbono (Monod, 1942). Sin embargo, jamás se ha logrado predecir cuáles serán la tasa y rendimiento del crecimiento de una bacteria en una fuente dada de carbono. Este desconocimiento resulta particularmente frustrante en vista del conocimiento bastante completo que se tiene de las vías metabólicas fundamentales.

El metabolismo de carbono produce tres tipos de factores que participan en el crecimiento: precursores; moléculas que desempeñan el rol de acopladores (ATP, GTP...etc), categoría que también se denomina, erróneamente, como "combustible"; y agentes reductores (NADPH y NADH). De la interacción entre estos tipos de moléculas en las reacciones anabólicas resulta lo que conocemos como crecimiento. Desde el descubrimiento de Bauchop y Elsdén (Bauchop y Elsdén, 1960) de que bacterias lácticas tenían un rendimiento constante de 10,5 g de células por mol de ATP, se ha pensado que es el rendimiento de ATP el que controla el rendimiento del crecimiento y, por ende, la tasa de crecimiento. Otra manera de expresar lo mismo es decir que el crecimiento está limitado por la respiración (Andersen y von Meyenburg, 1980). La idea sería que en la bacteria todo los sistemas de respiración y fosforilación oxidativa estarían desarrollados a un máximo, dado por la proporción máxima de

membrana celular destinada a alojar las enzimas de esos sistemas (ibid). El metabolismo, entonces se ajustaría a este límite, haciendo uso óptimo del ATP. Sin embargo, Hempfling y Mainzer (Hempfling y Mainzer, 1975) midieron la tasa de respiración para mantención, y encontraron que ésta variaba con la fuente de carbono hasta 25 veces. La respiración para mantención refleja los requerimientos energéticos para funciones no asociadas a crecimiento. Como bien señala Marr (Marr, 1991), es difícil entender que, siendo el ATP limitante, se encuentre este rango de variación en los requerimientos para funciones no asociadas al crecimiento, o en el rendimiento del ATP. Adicionalmente, otros autores han encontrado que el ATP requerido para biosíntesis, que puede calcularse a partir de las vías metabólicas conocidas, es mucho menor que el que se produce o, en otras palabras, pareciera que las células no son tan eficientes en el uso del ATP (Gunsalus y Shuster, 1961; Stouthammer, 1979).

La contribución teórica más interesante y reciente en este contexto es la de Marr (Marr, 1991), quien hace un iluminador reanálisis de evidencias previas, para proponer que la tasa de crecimiento de bacterias estaría determinada por el flujo de metabolitos precursores y de los monómeros de ellos derivados y no por el flujo de ATP. Su propuesta está a la espera de una demostración experimental.

En esta tesis hemos encontrado varias evidencias que apuntan a que uno de los efectos del ciclo fútil es desviar el flujo neto de moléculas desde una dirección gluconeogénica hacia una glicolítica. Al mismo tiempo, debe haber un consumo mayor de moléculas de ATP asociado al mayor ciclo fútil. En otras palabras, con la evidencia presentada no es posible responder cuál es el factor limitante para el crecimiento de la cepa con Pfk-2* en glicerol. Puede ser el flujo de uno o más precursores hacia una vía anabólica crítica o la disponibilidad de ATP para

biosíntesis. En el primer caso, las vías que podrían estar involucradas son aquellas que requieren moléculas de cuatro, cinco y seis carbonos. En particular, el ciclo de las pentosas podría estar severamente afectado, ya que requiere hexosas, en la forma de glucosa-6-P y fructosa-6-P, para la síntesis de ribosas y sus derivados, entre ellos los elementos estructurales del material genético. De hecho, fructosa-6-P representa un punto en el metabolismo de carbonos en el que se cruzan los destinos glicolítico (vía la Pfk), gluconeogénico (vía la fosfoglucosa isomerasa) y el ciclo de las pentosas (vía la transquetolasa). En el análisis de Atkinson (Atkinson, 1977), que suscribimos, es en los puntos de ramificación en los que se ejerce el control de los flujos metabólicos. En este contexto, la actividad de la Pfk durante gluconeogénesis generaría una demanda sobre la fructosa-6-P que resultaría crítica para las otras vías que están compitiendo por este metabolito.

Nuestro grupo de investigación está abocado actualmente a explorar el nexo que falta entre ciclo fútil y crecimiento, i.e. los efectos del ciclo fútil sobre el ATP disponible y sobre los flujos anabólicos requeridos para la biosíntesis y el crecimiento.

V. CONCLUSIONES

1. En un sistema de ensayo acoplado *in vitro*, que simula condiciones de flujo gluconeogénico, Pfk-2* presenta un potencial mayor para generar tasas importante de ciclo fútil entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP, con Fbpasa, que Pfk-1 y Pfk-2. Esta diferencia resulta de que Pfk-2* no es inhibida por MgATP.
2. En condiciones gluconeogénicas, una resuspensión celular de una cepa con Pfk-2* genera concentraciones intracelulares significativamente más altas que cepas con Pfk-1 y Pfk-2. Esto no ocurre cuando la fuente de carbono es glicolítica.
3. En condiciones gluconeogénicas, la velocidad y nivel máximo de marcación radiactiva de fructosa-1,6-bisP a partir de [U-¹⁴C]glucosa son mayores en una cepa con Pfk-2* que en cepas con Pfk-1 o Pfk-2.
4. Usando glicerol radiactivo como fuente de carbono, una cepa con Pfk-2* produce niveles significativamente más altos de CO₂ radiactivo que cepas con Pfk-1 o Pfk-2. El aumento de carbonos destinados a CO₂ en la cepa con Pfk-2* se hace a expensas de una disminución en los carbonos destinados a material macromolecular e intermediarios menores.

5. Durante gluconeogénesis, una cepa con Pfk-2* produce más CO₂ radiactivo a partir de [6-¹⁴C]glucosa que de [1-¹⁴C]glucosa, situación inversa a la observada para cepas con Pfk-1 o Pfk-2.

6. Todas las evidencias experimentales indicadas apoyan la hipótesis de que el fenotipo de crecimiento lento en fuentes de carbono gluconeogénicas propio de cepas con Pfk-2* sería consecuencia de la existencia en estas cepas de tasas importantes de ciclo fútil entre fructosa-6-P y fructosa-1,6-bisP durante gluconeogénesis. Esto sería consecuencia de que Pfk-2* no es inhibida por MgATP u otro efector.

VI. REFERENCIAS

Andersen, K. B. y K. von Meyenburg. 1980. *Are growth rates of Escherichia coli in batch cultures limited by respiration?* Journal of Bacteriology **144**: 114-123.

Atkinson, D.E.. (1977) *Cellular Energy Metabolism and its Regulation*. Academic Press (New York)

Babul, J. 1978. *Phosphofructokinases from Escherichia coli. Purification and characterization of the nonallosteric enzyme*. The Journal of Biological Chemistry **253**: 4350-4355.

Babul, J. y V. Guixé. 1983. *Fructose Bisphosphatase from Escherichia coli. Purification and Characterization*. Archives of Biochemistry and Biophysics **225**: 944-949.

Babul, J., Clifton, D., Kretschmer, M. y D.G. Fraenkel. 1993. *Glucose Metabolism in Escherichia coli and the Effect of Increased Amount of Aldolase*. Biochemistry **32**: 4685-4692.

Bauchop, T. y S.R. Elsdén. 1960. *The growth of microorganisms in relation to their energy supply*. Journal of General Microbiology **23**: 146-155.

Benevolensky, S.V., Clifton, D. y D.G. Fraenkel. 1994. *The effect of increased phosphoglucose isomerase on glucose metabolism in Saccharomyces cerevisiae.* The Journal of Biological Chemistry **269**: 4878-4882.

Berger, S.A. y P.R. Evans. 1990. *Active-site mutants altering the cooperativity of E. coli phosphofructokinase.* Nature **343**: 575-576.

Blangy, D., Buc, H. y J. Monod. 1968. *Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from Escherichia coli.* Journal of Molecular Biology **31**: 13-35.

Böck, A. y F.C. Neidhardt. 1966. *Properties of a mutant of Escherichia coli with a temperature-sensitive fructose-1,6-diphosphphate aldolase.* Journal of Bacteriology **92**: 470-476.

Bork, P., Sander, C. y A. Valencia. 1993. *Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: The hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases.* Protein Science **2**: 31-40.

Borowitz, M.J., Stein, R.B. y J.J. Blum. 1977. *Quantitative analysis of the change of metabolic fluxes along the pentose phosphate and glycolytic pathways in Tetrahymena in response to carbohydrates.* The Journal of Biological Chemistry **252**: 1589-1605.

Buñuelos, M. y D.G. Fraenkel. 1982. *Saccharomyces carlsbergensis fdp mutant and futile cycling of fructose 6-phosphate*. Molecular and Cellular Biology 2: 921-929.

Challiss, R.A.J., Arch, J.R.S. y E.A. Newsholme. 1984. *The rate of substrate cycling between fructose-6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate in skeletal muscle*. Biochemical Journal 221: 153-161.

Chambost, J.P. y D.G. Fraenkel. 1980. *The use of 6-labeled glucose to assess futile cycling in Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 255: 2867-2869.

Chao, Y.-P. y J.C. Liao. 1994. *Metabolic responses to substrate futile cycling in Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 269: 5122-5126.

Chao, Y.-P., Patnaik, R., Roof, W.D., Young, R.F. y J.C. Liao. 1993. *Control of gluconeogenic growth by pps and pck in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 175: 6939-6944.

Clark, M.G., Bloxham, D.P., Holland, P.C. y H.A. Lardy. 1973. *Estimation of the fructose diphosphatase-phosphofructokinase substrate cycle in the flight muscle of Bombus affinis*. Biochemical Journal 134: 589-597.

Clark, M.G., Bloxham, D.P., Holland, P.C. y H.A. Lardy. 1974. *Estimation of the fructose 1,6-diphosphatase-phosphofructokinase substrate cycle and its*

relationship to gluconeogenesis in rat liver in vivo. The Journal of Biological Chemistry **249**: 279-290.

Clark, M.G., Kneer, N.M., Bosch, A.L. y H.A. Lardy. 1974. *The fructose 1,6-Diphosphatase-Phosphofructokinase substrate cycle.* The Journal of Biological Chemistry **249**: 5695-5703.

Clifton, D., Weinstock, S.B. y D.G. Fraenkel. 1978. *Glycolysis mutants of Saccharomyces cerevesiae.* Genetics **88**: 1-11.

Cornish-Bowden, A. y M.L. Cárdenas (Editores) . 1990. *Control of Metabolic Processes.* Plenum Press (New York & London).

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.* Journal of Molecular Biology **168**: 285-305.

Daldal, F. 1984. *Nucleotide sequence of gene pfkB encoding the minor phosphofructokinase of Escherichia coli K-12.* Gene **28**: 337-342.

Daldal, F. y D.G. Fraenkel. 1981. *Tn 10 insertions in the pfkB region of Escherichia coli.* Journal of Bacteriology **147**: 935-943.

Daldal, F. y D.G. Fraenkel. 1983. *Assessment of a futile cycle involving reconversion of fructose 6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate during gluconeogenic growth of Escherichia coli.* Journal of Bacteriology **153**: 390-394.

Daldal, F., Babul, J., Guixé, V. y D.G. Fraenkel. 1982. *An alteration in phosphofructokinase 2 of Escherichia coli which impairs gluconeogenic growth and improves growth on sugars.* European Journal of Biochemistry **126**: 373-379.

Duclaux, E. (1898-1901) *Traité de Microbiologie.* Masson (Paris)

Evans, P.R., Farrants, G.W., y P.J. Hudson. 1981. *Phosphofructokinase: structure and control.* Philosophical Transactions of the Royal Society London **B 293**: 53-62.

Fraenkel, D.G.. 1968. *The accumulation of glucose 6-phosphate from glucose and its effect in an escherichia coli mutant lacking phosphoglucose isomerase and glucose 6-phosphate dehydrogenase.* The Journal of Biological Chemistry **243**: 6451-6457.

Fraenkel, D.G. 1986. *Mutants in glucose metabolism.* Annual Review of Biochemistry **55**: 317-337.

Fraenkel, D.G. y R.T. Vinopal. 1973. *Carbohydrate metabolism in bacteria.* Annual Review of Microbiology **27**: 69-100.

Fraenkel, D.G., Kotlarz, D. y H. Buc. 1973. *Two fructose 6-phosphate kinase activities in Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry **248**: 4865-4866.

Guixé, V. y J. Babul. 1985. *Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry **260**: 11001-11005.

Guixé, V. y J. Babul. 1988. *Influence of ligands on the aggregation of the normal and mutant forms of phosphofructokinase 2 of Escherichia coli*. Archives of Biochemistry and Biophysics **264**: 519-524.

Gunsalus, I.C. y C.W. Shuster. (1961) *Energy yielding metabolism in bacteria*. Academic Press, Inc. (New York)

Hellinga, H.W. y P.R. Evans. 1987. *Mutations in the active site of Escherichia coli phosphofructokinase*. Nature **327**: 437-439.

Hempfling, W.P. y S.E. Mainzer. 1975. *Effect of varying the carbon source on yield and maintenance characteristics of Escherichia coli in continuous culture*. Journal of Bacteriology **123**: 1076-1087.

Hillman, J.D. y D.G. Fraenkel. 1975. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mutants of Escherichia coli*. Journal of Bacteriology **122**: 1175-1179.

Josephson, B.L. y D.G. Fraenkel. 1974. *Sugar metabolism in transketolase mutants of Escherichia coli*. Journal of Bacteriology **118**: 1082-1089.

Katz, J. y R. Rognstad. 1976. *Futile cycles in the metabolism of glucose*. Current Topics in Cellular Regulation 10: 237-289.

Kupor, S.R. y D.G. Fraenkel. 1972. *Glucose metabolism in 6-phosphogluconolactonase mutants of Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 247: 1904-1910.

Larrabee, M.G.. 1989. *The pentose cycle (hexose monophosphate shunt)*. The Journal of Biological Chemistry 264: 15875-15879.

Lau, F.T.-K. y A.R. Fersht. 1987. *Conversion of allosteric inhibition to activation in phosphofructokinase by protein engineering*. Nature 326: 811-812.

Lau, F.T.-K., Fersht, A.R., Hellinga, H.W. y P.R. Evans. 1987. *Site-directed mutagenesis in the effector site of Escherichia coli phosphofructokinase*. Biochemistry 26: 4143-4148.

Leite, A., Neto, J.A., Leyton, J.F., Crivellaro, O. y H.A. El-Dorry. 1988. *Phosphofructokinase from bumblebee flight muscle*. The Journal of Biological Chemistry 263: 17527-17533.

Lowry, O.H., Carter, J., Ward, J.B. y L. Glaser. 1971. *The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry 246: 6511-6521.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. y J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (New York).

A.G. Marr. 1991. *Growth rate of Escherichia coli*. Microbiological Review **55**: 316-333.

Monod, J. (1942) *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*. Hermann et Cie (Paris)

Morrissey, A.T.E. y D.G. Fraenkel. 1968. *Selection of fructose-6-phosphate kinase mutants in Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications **32**: 467-473.

Navas, M.A., Cerdán, S. y J.M. Gancedo. 1993. *Futile cycles in Saccharomyces cerevisiae strains expressing the gluconeogenic enzymes during growth on glucose*. Proceedings of the National Academy of Science USA **90**: 1290-1294.

Newsholme, E.A., Challiss, R.A.J. y B. Crabtree. 1984. *Substrate cycles: their role in improving sensitivity in metabolic control*. TIBS **June**: 277-280.

Orchard, L.M.D. y H.L. Jornsberg. 1990. *Sequence similarities between the gene specifying 1-phosphofructokinase (fruK), genes specifying other kinases in Escherichia coli K12, and lacC of Staphylococcus aureus*. Proceedings of the Royal Society London B **242**: 87-90.

Orozco de Silva, A. y D.G. Fraenkel. 1979. *The 6-phosphogluconate dehydrogenase reaction in Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry **254**: 10237-10242.

Patnaik, R., Roof, W.D., Young, R.F. y J.C. Liao. 1992. *Stimulation of glucose catabolism in Escherichia coli by a potential futile cycle*. Journal of Bacteriology **174**: 7527-7532.

Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Pilkis, J. y T. Claus. 1981. *Inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase by fructose 2,6-bisphosphate*. The Journal of Biological Chemistry **256**: 3619-3622.

Poorman, R.A., Randolph, A., Kemp, R.G. y R.L. Heinrikson. 1984. *Evolution of phosphofructokinase-gene duplication and creation of new effector sites*. Nature **309**: 467-469.

Preller, A., Guixé, V., Torres, J.C., Hofer, H.W. y T. Ureta. 1992. *The separation and identification of picomole amounts of intermediates of glucose metabolism by high performance liquid chromatography on pellicular resins*. Biological Research **25**: 73-78.

Press, W.H., Flannery, B.P., Teukolsky, S.A. y W.T. Vetterling. 1980. *Numerical Recipes. The Art of Scientific Computing*. Cambridge University Press, New York .

Schirmer, T. y P. Evans. 1990. *Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase*. Nature **343**: 140-145.

Sedivy, J.M., Babul, J. y D.G. Fraenkel. 1986. *AMP-insensitive fructose biphosphatase in Escherichia coli and its consequences*. Proceedings of the National Academy of Science USA **83**: 1656-1659.

Segel, I.H.. (1975) *Enzyme Kinetics*. John Wiley & Sons (New York)

Shirakihara, Y. y P.R. Evans. 1988. *Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from Escherichia coli with its reaction products*. Journal of Molecular Biology **204**: 973-994.

Stouthammer, A.H. 1979. *A search for correlation between theoretical and experimental growth yields*. International Review of Biochemistry **21**: 1-47.

Surholt , B. y E.A. Newsholme. 1983. *The rate of substrate cycling between glucose and glucose-6-phosphate in muscle and fat-body of the hawk moth (Acherontia atropos) at rest and during flight*. Biochemical Journal **210**: 49-54.

Tejwani, G.A.. 1978. *The role of phosphofructokinase in the Pasteur effect*. TIBS **3**: 30-33.

Torres, J.C. y J. Babul. 1991. *A in vitro model showing different rates of substrate cycle for phosphofructokinases of Escherichia coli with different kinetic properties.* European Journal of Biochemistry **200**: 471-476.

Torres, J.C., Guixé, V. y J. Babul. 1995. *A new method to assess rates of futile cycles in glycolytic and gluconeogenic metabolism.* Archives of Biochemistry and Biophysics (en prensa).

Vinopal, R.T., Clifton, D. y D.G. Fraenkel. 1975. *pfkA locus of Escherichia coli.* Journal of Bacteriology **122**: 1162-1171.

Vinopal, R.T., Hillman, J.D., Schulman, H., Reznikoff, W.S. y D.G. Fraenkel. 1975. *New phosphoglucose isomerase mutants of Escherichia coli.* Journal of Bacteriology **122**: 1172-1174.

Zablotny, R. y D.G. Fraenkel. 1967. *Glucose and gluconate metabolism in a mutant of Escherichia coli lacking gluconate-6-phosphate dehydrase.* Journal of Bacteriology **93**: 1579-1581.