

RESPUESTA AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

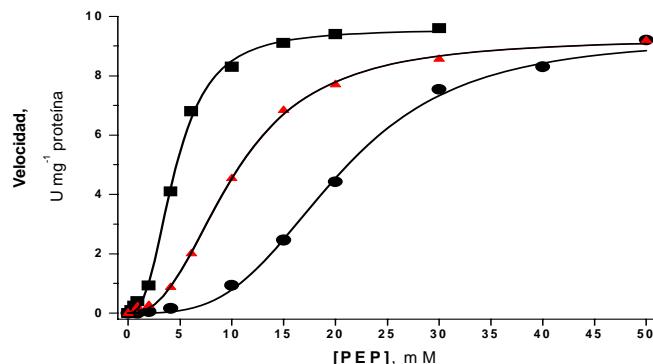


Figura 1. Cinética de saturación de la PEPC de hojas de maíz. La concentración de HCO_3^- fue saturante (10 mM), el Mg^{2+} total fue 5 mM, el pH del buffer fue 7.3 y el ensayo se realizó a 30°C. La concentración de malato presente en el ensayo fue 0 (cuadros), 1 (triángulos) y 5 mM (círculos).

La gráfica de [PEP] versus velocidad revela que la cinética de la PEPC es sigmoidal (Fig. 1). En enzimas cooperativas tipo K (la K_m puede variar con la concentración del sustrato o de moduladores alóstéricos, pero la V_m no se modifica), es posible calcular los parámetros V_m y K_m usando la ecuación de Lineweaver-Burk graficando $1/[PEP]$ versus $1/\text{velocidad}$ (Fig. 2), pero solo linearizando los puntos experimentales a las más altas concentraciones de sustrato, es decir, cuando la enzima se encuentra cerca de la saturación y la cooperatividad ha disminuido o desaparecido. En la presencia de concentraciones saturantes de un activador, la gráfica de dobles recíprocos es más confiable pues incluye una mayor cantidad de puntos experimentales en la línea recta. La PEPC se activa con hexosas monofosforiladas (glucosa-6-fosfato) y aminoácidos neutros (glicina) (1); sin embargo, datos con algún activador no se incorporaron para el experimento mostrado en la tabla 1.

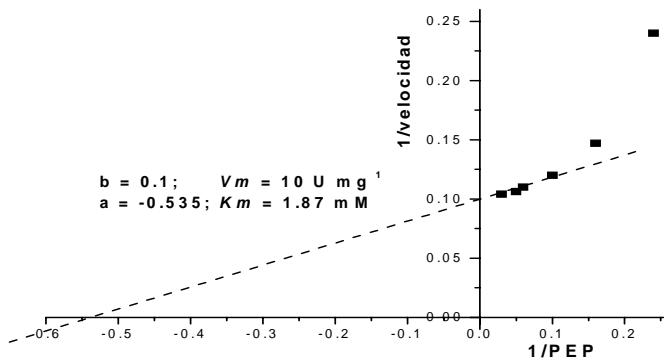


Figura 2. Gráfica de dobles recíprocos en la ausencia del inhibidor malato.

La pendiente en la zona de máxima cooperatividad, que es el punto de inflexión en la gráfica de [sustrato] versus velocidad (Fig. 1) o cuando la expresión en el eje Y de la figura 3 es igual a cero (línea paralela al eje X en la figura 3), permite calcular el coeficiente de Hill (n).

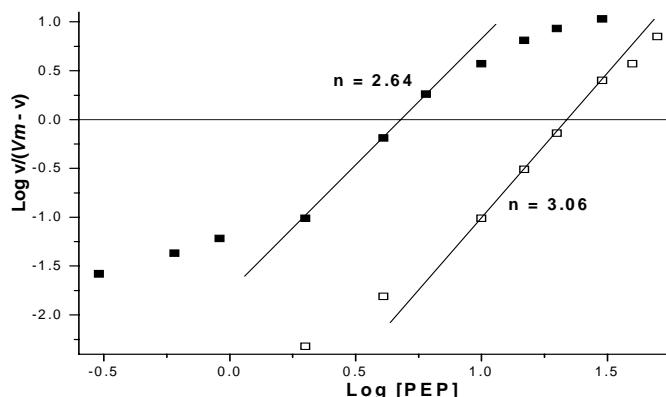


Figura 3. Gráfico logarítmico de Hill.

La ecuación de Horn-Bornig es:

$$\text{Log} [(a V_m/v) - a - 1] = \text{Log} L' + (1-n) \text{Log} (1 + a)$$

Esta ecuación requiere que previamente se hayan determinado los valores de V_m y K_m (usando la gráfica de dobles recíprocos), pues α se define como el cociente S/K_m . Entonces, a partir de la pendiente m de cada línea recta se calcula el coeficiente de Hill. En este caso, un valor de n de 3.02-3.89 indica que la PEPC es un tetrámero, en completa concordancia con los resultados de la gráfica logarítmica de Hill (Fig. 3).

L' es igual a $L (1 + [I]/K_i)^n$. Entonces, linearizando la expresión del valor de la ordenada b tenemos la siguiente ecuación:

$$\text{Log} L' = \text{Log} L + n \text{Log} (1 + [I]/K_i)$$

Los valores de b de las 3 líneas rectas de la figura 4 son 1.532, 2.345 y 3.619 para malato cero, 1 y 5 mM. Los correspondientes valores de L' son 34, 222 y 4164. Resolviendo la expresión de L' para estimar el valor de K_i (en donde el valor de L se calcula directamente del valor de la ordenada al origen en la curva sin inhibidor) se tienen valores de 1.16-2.05 mM para malato.

Como la gráfica de Horn-Bornig (Fig. 4) no se ajusta perfectamente a todos los puntos experimentales en las 3

concentraciones del inhibidor, es posible que la PEPC no sea una enzima cooperativa de enlazamiento exclusivo (la forma R solo une sustrato y la forma T solo une inhibidor) sino que presente algún grado significativo de enlazamiento no-exclusivo (tanto la forma R como la forma T pueden unir al inhibidor, aunque tal vez con diferente afinidad). La ecuación general de Monod de enlazamiento no-exclusivo es la siguiente:

$$\frac{v}{Vm} = \frac{L'c\alpha(1 + c\alpha)^{n-1} + \alpha(1 + \alpha)^{n-1}}{L'(1 + c\alpha)^n + (1 + \alpha)^n}$$

Donde:

$$\alpha = \frac{S}{Ks_R} \quad L' = L \frac{(1 + e\gamma)^n}{(1 + \gamma)^n}$$

$$\gamma = \frac{[I]}{Ki} \quad e = \frac{Ki_R}{Ki_T}$$

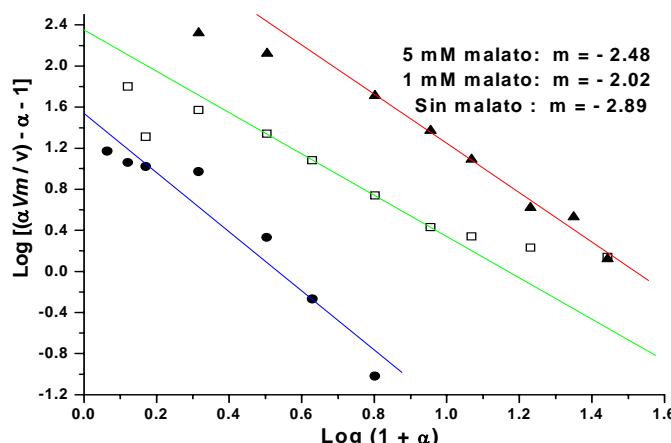


Figura 4. Gráfica de Horn-Bornig.

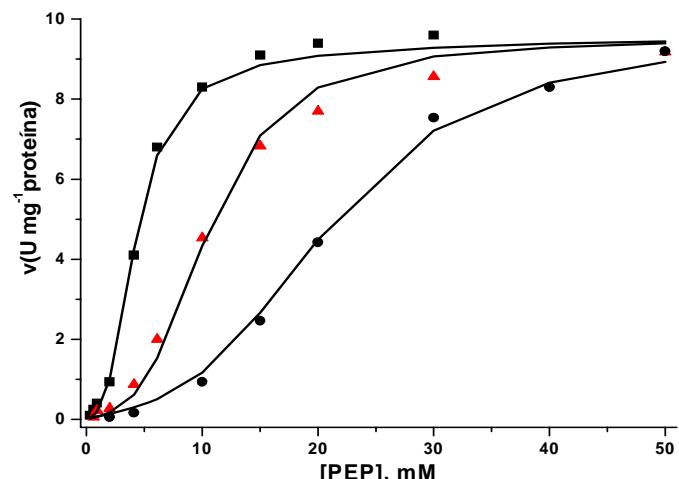


Figura 5. Regresión no lineal por ecuación de Monod de enlazamiento no-exclusivo.

El ajuste global de los datos experimentales de las 3 condiciones a la ecuación de Monod de enlazamiento no exclusivo (Fig. 5) revela efectivamente que la PEPC de hojas de maíz puede unir al sustrato y al inhibidor en sus 2 formas R y T, con valores de c (Km_R/Km_T) = 0.008 y e = 0.59. La regresión no lineal también proporciona los valores de los otros parámetros de la ecuación:

Vm	9.67 U mg⁻¹
Coeficiente de Hill (n)	4
Km_R	1.22 mM
Ki_R	0.17 mM
Constante de transición alostérica (L)	262

Con los valores de c y Km_R se puede calcular un valor de 152.5 mM para Km_T , lo cual significa que la forma R de la PEPC tiene 125 veces mayor afinidad por el sustrato PEP que la forma T. Asimismo, con los valores de e y Ki_R se calcula el valor de Ki_T de 0.27 mM, lo cual significa que las 2 formas de la enzima tienen afinidad similar por el inhibidor malato.