

# PROBLEMA BIOQUÍMICO

Elizabeth Lira Silva<sup>1</sup>, Ricardo Jasso Chávez<sup>1</sup> y Juan Pablo Pardo Vázquez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Correo: eli\_lira\_sil@hotmail.com

## Cinética enzimática. Enzimas alostéricas

### Análisis cinético de la PFK-1L de *Sparus aurata*, una enzima alostérica

#### Introducción

En la naturaleza existen enzimas y transportadores que participan en múltiples procesos y llevan a cabo diferentes reacciones químicas en una célula. Sin embargo, muchas de éstas enzimas no presentan una cinética clásica tipo Michaelis-Menten, donde la gráfica de velocidad inicial vs la concentración de sustrato en lugar de tener un comportamiento hiperbólico presenta un comportamiento sigmoidal. A este tipo de enzimas se les denomina enzimas alostéricas, las cuales poseen múltiples sitios de unión a diferentes ligandos denominados sitios de alostéricos (diferentes al sitio activo) estos ligandos pueden modificar sus propiedades cinéticas. En este tipo de enzimas se puede presentar un fenómeno denominado cooperatividad positiva, cuando la unión de un ligando facilita la unión de la siguiente molécula e incrementa la afinidad por los sitios vacantes. Si el ligando en cuestión es el sustrato se denomina efecto homotrópico pero si es una molécula diferente (un activador o un inhibidor) se denomina efecto heterotrópico.

Para el estudio de las enzimas alostéricas se han propuesto dos modelos: 1) el modelo de transición concertada de Monod-Wyman-Changeux (MWC), en el cual se asume que la enzima pre-existe en un estado de equilibrio donde hay una mezcla de oligómeros de alta y baja afinidad y en donde los ligandos desplazan el equilibrio a favor de un estado u otro. Durante la transición, estos cambios conformacionales ocurren de manera concertada y simétrica en todas las subunidades y 2) el modelo de interacción secuencial de Koshland-Némethy-Filmer (KNF), en donde se asumen cambios secuenciales en las afinidades de los sitios vacantes conforme estos son ocupados (Segel, 1975).

El análisis cinético de una enzima se puede realizar mediante el ajuste por regresión lineal

y no lineal. El análisis por regresión lineal es ampliamente utilizado en cinética enzimática, para lo cual existen diferentes métodos de linealización, pero el más utilizado como una herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima  $K_s$  y  $V_{max}$  a partir de la ecuación de Michaelis-Menten es el método de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos  $1/v$  vs  $1/[S]$ ). Sin embargo, el análisis cinético de las enzimas alostéricas no se puede realizar utilizando la ecuación clásica de Michaelis-Menten, debido a que el gráfico de dobles recíprocos para una enzima alostérica es una curva y no es posible determinar sus parámetros cinéticos  $K_s$  y  $V_{max}$  directamente., por lo que se utiliza la ecuación de Hill (la ecuación de velocidad para enzimas alostéricas, ver ecuación 1), la cual considera una enzima con "n" sitios de unión a sustrato. Sin embargo, el coeficiente de Hill (n) solo es una aproximación del número de sitios que pueden enlazar al sustrato por molécula de enzima si la cooperatividad es muy grande. A partir de la ecuación de Hill es posible realizar un gráfico de dobles recíprocos ( $1/v$  vs  $1/[S]^n$ ) modificado para calcular la  $K_s$  y  $V_{max}$

$$\frac{v}{V_{max}} = \frac{S^n}{K' + [S]^n} \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 1}$$

Donde:

n: número de sitios que pueden enlazar al sustrato (número de Hill)

$K'$  es una constante que incluye los factores de interacción entre enzima-sustrato (a, b, c ...z), los cuales modifican la afinidad de la enzima conforme se une el sustrato a cada uno de los sitios activos. La constante permite calcular la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima  $(K')^{1/n}$  y se relaciona de manera intrínseca con la constante de disociación  $K_s = K_s^n (a^{n-1}b^{n-2}c^{n-3}...z^1)$ .

Para calcular el número aproximado de sitios se debe realizar el ajuste no lineal a un gráfico de Hill o linealizar la ecuación de Hill para simplificarla.

La forma lineal de la ecuación de Hill (ecuación 1) se muestra a continuación:

$$\log \left( \frac{v}{V_{max} - v} \right) = n \log S - \log K' \dots \text{ecuación 2}$$

Donde la pendiente (n) es un índice del número de sitios (o subunidades).

Sin embargo, el gráfico de Hill presenta algunas desventajas ya que a velocidades específicas bajas se desvía de la linealidad, debido a que los complejos tienen menos de (n) moléculas de sustrato que contribuyen a la velocidad inicial, o porque la enzima tiene sitios reguladores no catalíticos que pueden ocuparse antes de que el sustrato se enlace al sitio catalítico, lo que causa un incremento en la pendiente del gráfico conforme disminuye la concentración del sustrato. Por lo que a muy bajas concentraciones la pendiente se aproxima al número de sitios que deberían estar ocupados antes de que cualquier reacción ocurra. Con altas concentraciones de sustrato, también es posible que ocurran desviaciones de la linealidad, debido a que es difícil detectar pequeños cambios en la velocidad conforme se incrementa la [S] o porque los sitios catalíticos poseen diferentes afinidades (Segel, 1975).

Para determinar la afinidad del sitio alostérico por un modulador se puede utilizar la ecuación de Búc para inhibidores (ecuación 3) o activadores alostéricos (ecuación 4), las cuales son la forma lineal del modelo de transición alostérica concertada propuesta por Monod, Wyman y Changeaux para enlazamiento exclusivo del sustrato y el activador a la forma R (relajada) y del inhibidor a la forma T (tensa) (Segel, 1975).

$$\frac{(V\alpha - v)^{1/n}}{v} = [I] \frac{L\alpha^{1/n}}{K_i} + (L\alpha)^{1/n} \dots \text{ecuación 3}$$

$$\frac{1}{b} = \frac{1}{(L\alpha)^{1/n}} = \frac{1}{K_S(L)^{1/n}} [S] + \frac{1}{L^{1/n}} \dots \text{ecuación 3a}$$

$$\left( \frac{v}{(V\alpha - v)} \right)^{1/n} = \frac{1}{(L\alpha)^{1/n}} + [A] \frac{1}{K_A L\alpha^{1/n}} \dots \dots \dots \text{ecuación 4}$$

$$b = \frac{1}{(L\alpha)^{1/4}} = \frac{1}{K_S(L)^{1/4}} [S] + \frac{1}{L^{1/4}} \dots \text{ecuación 4a}$$

Donde  $V\alpha$  es la velocidad de la enzima a una concentración fija de sustrato y a una concentración alta de activador,  $v$  es la actividad de la enzima a una concentración dada de sustrato, es igual a  $L/(1+S/K_S)^n$ .  $L$  es la constante de transición alostérica ( $L = [T_0]/[R_0]$ ) que representa la proporción del estado T (es decir la conformación con menor afinidad por el sustrato y activador y mayor afinidad por el inhibidor) y R (el estado conformacional con mayor afinidad por el sustrato y el activador y menor afinidad por el inhibidor). Las curvas de velocidad son más sigmoides conforme se incrementa  $L$ , lo que sugiere que el equilibrio favorece a  $R_0 \leftrightarrow T_0$  favorece a  $T_0$ . Sin embargo, la cooperatividad del sitio de unión de una enzima no sólo depende de " $L$ " sino también del coeficiente de enlazamiento no exclusivo ( $c = [K_R]/[K_T]$ ), que representa la proporción de las constantes de disociación del sustrato por el estado T y R. Cuando  $c=0$ , el conformero T no tiene afinidad por el sustrato (o por el activador). Se sabe que los inhibidores alostéricos se unen preferencialmente al estado T, por lo que " $L$ " aumenta y las curvas de velocidad son más sigmoides, mientras que los activadores alostéricos se unen preferencialmente al estado R, por lo que " $L$ " disminuye y las gráficas de velocidad son menos sigmoides.

Debido a la complejidad que representa determinar las constantes cinéticas para enzimas alostéricas, es muy frecuente utilizar el gráfico de Hill para establecer si la enzima en cuestión es cooperativa. Sin embargo, éste no permite obtener la constante de transición alostérica. Para estimar " $L$ " y el número aproximado de sitios activos (n) de manera independiente uno del otro se puede utilizar la ecuación de Horn Börnig (ecuación 6), que es la forma lineal de la ecuación de enlazamiento exclusivo ( $c=0$ ) (ecuación 5).

$$\frac{v}{V_m} = \frac{\alpha (1+\alpha)^{n-1}}{L' + (1+\alpha)^n} \dots \dots \dots \text{ecuación 5}$$

$$\log \left( \frac{\alpha V_m}{v} - \alpha - 1 \right) = (1-n) \log (1+\alpha) + \log L' \dots \dots \dots \text{ecuación 6}$$

Donde para un inhibidor es:

$$L' = L(1 + \beta)^n \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 7}$$

$$\log L' = \log L + n \log(1 + \beta) \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 8}$$

Mientras que  $L'$  para un activador es:

$$L' = \frac{L}{(1 + \gamma)^n} \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 9}$$

$$\log L' = \log L - n \log(1 + \gamma) \quad \dots \dots \dots \text{ecuación 10}$$

Este tipo de gráfico produce líneas rectas, que permiten la determinación de  $n$  y  $L'$  (o  $L$ ) por métodos de mínimos cuadrados, las pendientes de las líneas rectas son siempre números enteros y permanecen constantes con el cambio de " $L$ ". Sin embargo, su uso se limita a enzimas alostéricas con enlazamiento exclusivo ( $c = 0$ ), por lo que se pueden presentar errores sistemáticos debido a la posibilidad de que  $c > 0$ . Para utilizar esta ecuación, es necesario determinar previamente los valores de  $V_{max}$  y  $K_S$ , ya que  $\alpha$  se define como el cociente  $S/K_S$ . También es necesario que existan moduladores alostéricos que permitan cambiar la cinética de sigmoide a hiperbólica (Comportamiento de Michaelis - Menten,  $L = 0$ ).

Otra forma de analizar el análisis cinético de una enzima alostérico, es realizar el ajuste no lineal a partir de la ecuación de enlazamiento exclusivo (ecuación 5) utilizando el programa Origin 5.0 (figura 6). Este tipo de análisis por regresión no lineal ajusta los datos experimentales a una ecuación dada, lo que permite determinar los valores de los parámetros que minimizan la suma de los cuadrados de las distancias de los puntos de la curva, con el objetivo de minimizar el residual de la suma de cuadrados. Con esto es posible determinar simultáneamente todos los parámetros cinéticos y con ello se tiene una menor restricción en la elección de las variables controladas comparado con los métodos por ajuste lineal donde los datos se limitan a un intervalo lineal. Las desviaciones estándar disminuyen y aumenta la precisión al estimar los parámetros cinéticos debido a que no es necesario realizar transformaciones lineales.

En este trabajo se hace una revisión de los diferentes métodos y ecuaciones para analizar

la cinética de la PFK-1L de *Sparus aurata* (una enzima alostérica) en presencia de moduladores alostéricos.

## Planteamiento del problema

La 6-fosfofructo-cinasa 1 (PFK-1) juega un papel importante en el control del flujo glucolítico tanto en mamíferos como en algunos parásitos (Sharma, 2011). Esta enzima cataliza la formación de fructosa-1,6-bisfosfato (Fru-1,6BP) a partir de fructosa-6-fosfato (Fru-6P) y Mg-ATP (Mediavilla, 2008). Además de los sitios catalíticos para Fru-6P y ATP, la PFK-1 de mamífero tiene sitios de unión alostéricos: sitios de activación para Fru-2,6BP, AMP, ADP,  $P_i$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$  y sitios de inhibición para ATP y citrato.

La PFK-1 es una enzima tetramérica. En vertebrados existen tres loci que codifican para la expresión de subunidades de tipo P, M y L. Sin embargo, los tres tipos de subunidades se combinan para formar homo y heterotetrámeros de la PFK-1 con diferentes propiedades catalíticas y control alostérico (Moreno-Sánchez et al., 2012). Se ha descrito que hay isoformas específicas presentes en diferentes tejidos dependiendo de la expresión de cada subunidad. La subunidad M es la única presente en músculo esquelético de adultos, la subunidad P se encuentra en altos niveles en cerebro, mientras que en hígado se encuentra principalmente la subunidad L (PFK-1L), cuya expresión se regula por el estado nutricional y hormonal (Mediavilla, 2008).

Los peces carnívoros tienen baja capacidad para metabolizar carbohidratos y por lo tanto mantienen la hiperglucemia por más tiempo que los mamíferos. Es por esto que se ha descrito que su metabolismo puede mimetizar el perfil metabólico de diabetes tipo 2 en humanos (Mediavilla, 2008). Se ha demostrado que en peces carnívoros como *Sparus aurata*, se puede modificar la actividad de la PFK-1L y otras enzimas que participan en la glicólisis y la gluconeogénesis para tolerar la sustitución parcial de proteína por carbohidratos en su dieta, lo que produce un incremento en los niveles hepáticos de fru-2,6BP, el cual además de ser un potente activador alostérico de la PFK-1, es también un inhibidor de la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Mediavilla, 2008).

La caracterización cinética de la PFK-1 purificada se ha realizado en varios sistemas de mamíferos, parásitos, plantas y bacterias (Marín-Hernández, 2006; Sharma, 2011). Sin embargo, los antecedentes sugieren que la regulación del metabolismo

Tabla I

Efecto del ATP sobre la actividad de la PFK-1L a varias concentraciones de Fru-6P a pH 7.0.

Actividad PFK-1L (mU/ml)			
ATP (mM)			
Fru-6P (mM)	0.5	1	2.5
0.00	0	0	0
0.03	1.5	1.5	1.5
0.04	74	--	--
0.04	129	--	--
0.06	142	--	--
0.08	164	--	10
0.08	224	--	--
0.13	--	82	30
0.14	256.5	136	38
0.16	274	--	49
0.18	289.5	174	59
0.20	299	--	76
0.26	301	184	103
0.48	310.5	232	187
0.58	312	--	205
0.66	313	276	210
1.00	303	281	228

Tabla II

Efecto de la Fru-2,6BP sobre la actividad de la PFK-1L a varias concentraciones de Fru-6P a pH 7.0 y 2.5 mM ATP.

Actividad PFK-1L (mU/ml)		
Fru-2,6BP ( $\mu$ M)		
Fru-6P (mM)	0	5
0	0	0
0.05	1.2	73
0.07	16	122
0.11	23	143
0.13	37	152
0.15	47	162
0.19	52	182
0.24	89	202
0.49	165	219
0.6	176	225
0.65	183	228
1	184	230

de carbohidratos en peces carnívoros puede ser diferente a lo descrito en mamíferos. Por lo que el análisis cinético de la PFK-1L de *Sparus aurata* podría arrojar información significativa sobre los mecanismos involucrados en el control de la vía glicolítica en estos organismos (Mediavilla, 2008). Además, se debe destacar que las enzimas alostéricas son importantes en términos de economía celular y control metabólico, mientras que los sitios alostéricos pueden ofrecer ventajas para diseñar y dirigir los fármacos manera selectiva y con ello ofrecer una alternativa terapéutica. En este caso en particular contra la diabetes tipo II.

La actividad de la PFK-1L se determinó mediante un ensayo enzimático acoplado a la oxidación de NADH, el cual se midió espectrofotométricamente a 340 nm. La mezcla de reacción contenía: 100 mM Tris-HCl, 5 mM  $MgCl_2$ , 50 mM KCl, 0.15 mM NADH, 4 mM sulfato de amonio, 12 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM Fru-6-P, 0.675 U  $mL^{-1}$  aldolasa, 5 U  $mL^{-1}$  triosa fosfato isomerasa, 2 U  $mL^{-1}$  glicerol 3-deshidrogenasa y 0.02 mg proteína de la enzima parcialmente purificada. Se utilizaron diferentes sustratos y efectores como se indica para cada ensayo. 1 U = 1  $\mu$ mol de Fru-1,6-BP/min (o el consumo de 2  $\mu$ mol of NADH /min). Los ensayos cinéticos se realizaron a pH 7.0 utilizando Fru-6P como sustrato y algunos efectores como se indica en las leyendas.

La Tabla I muestra los valores de actividad de la PFK-1L variando ambos sustratos, Fru-6P y ATP. La Tabla II muestra los valores de la actividad de la PFK-1 y el efecto activador de la Fru-2,6BP; es importante mencionar que el medio de ensayo contenía a los activadores  $NH_4^+$  y  $K^+$ .

Con los datos proporcionados determinar los parámetros cinéticos de la PFK-1L de *Sparus aurata*: KS, Vmax, coeficiente de Hill (n), constante de transición alostérica (L) y constante de inhibición (Ki) o de activación (KA).