

SOLUCIÓN AL PROBLEMA BIOQUÍMICO

Estudio cinético de la cistationina β-sintasa de *Trypanosoma cruzi*

β-sintasa de *Trypanosoma cruzi*

SOLUCIÓN AL PROBLEMA BIOQUÍMICO ESTUDIO CINÉTICO DE LA CISTATIONINA β -SINTASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Análisis del gráfico de doble recíproco. El gráfico directo de los datos presentados en la tabla 1 muestra un comportamiento hiperbólico con respecto a ambos sustratos (Fig. 5 A y D). Con la finalidad de deducir el mecanismo cinético se realizaron los gráficos de doble recíproco para ambos sustratos (Fig. 5 B y E) (Tablas 2 y 3) y se puede observar que el patrón se acerca a líneas paralelas, esto se ve evidenciado por el hecho de que las pendientes del doble recíproco son prácticamente iguales (Fig. 5 C y F). El hecho de que el patrón gráfico de los dobles recíprocos se aproxime a una familia de líneas paralelas sugiere que el mecanismo cinético de la CBS es Ping-Pong (7).

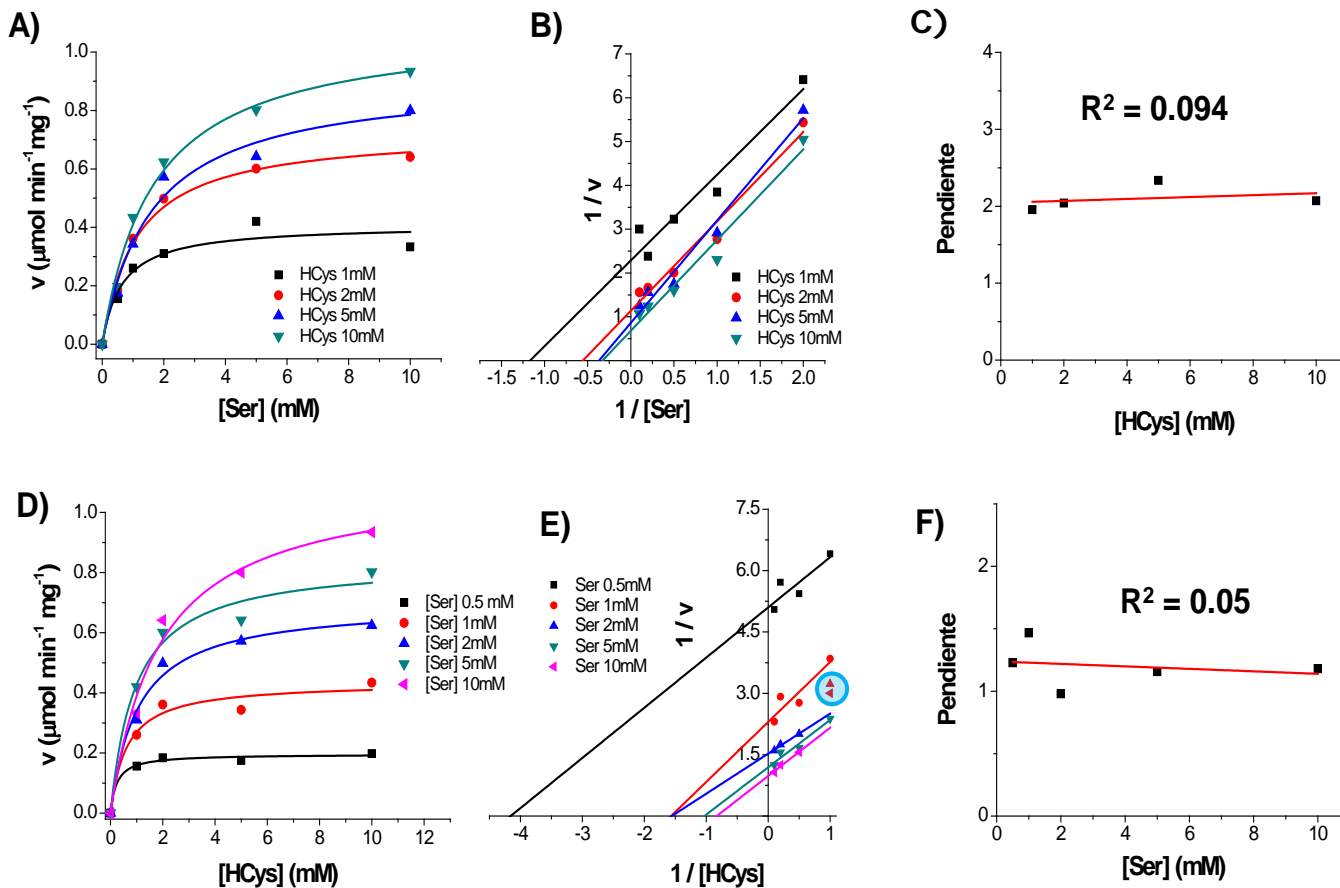


Figura 5. Comportamiento cinético de la CBS de *T. cruzi*. A) y D) La variación de ambos sustratos muestra una cinética de tipo hiperbólico, los ajustes a los datos experimentales se realizaron con el software Origin 8® y corresponden a un modelo de la ecuación de Michaelis-Menten ($v=V_m[S]/K_m+[S]$). B) y E) Ajustes lineales del gráfico de doble recíproco para ambos sustratos, los puntos encerrados en el círculo azul no fueron incluidos en el ajuste. C) y F) Regráfico de las pendientes obtenidas en el doble recíproco.

Tabla 2. Datos de doble recíproco usando 1/ [Ser] como variable independiente

[Ser] (mM)	1/[Ser]	1 / V			
		[HCys] 1 mM	[HCys] 2 mM	[HCys] 5 mM	[HCys] 10 mM
0.5	2	6.41	5.43	5.71	5.05
1	1	3.85	2.77	2.92	2.30
2	0.5	3.23	2.01	1.75	1.60
5	0.2	2.38	1.66	1.56	1.25
10	0.1	3.00	1.56	1.25	1.07
Regresiones lineales del doble recíproco					
	Pendiente	1.96	2.04	2.34	2.07
	Ordenada	2.29	1.14	0.86	0.68
	Abscisa	-1.17	-0.56	-0.37	-0.33

Tabla 3. Datos de doble recíproco usando 1/ [HCys] como variable independiente

HCys (mM)	1 / [HCys]	1 / V				
		Ser 0.5 mM	Ser 1 mM	Ser 2 mM	Ser 5 mM	Ser 10 mM
1	1	6.41	3.85	3.23*	2.38	3.00*
2	0.5	5.43	2.77	2.01	1.66	1.56
5	0.2	5.71	2.92	1.75	1.56	1.25
10	0.1	5.05	2.30	1.60	1.25	1.07
Regresiones lineales del doble recíproco						
	Pendiente	1.23	1.47	0.98	1.16	1.18
	Ordenada	5.10	2.30	1.53	1.19	0.98
	Abscisa	-4.16	-1.57	-1.56	-1.03	-0.83

*Valores eliminados para la regresión lineal

El mecanismo Ping-Pong es un sistema ordenado donde se requiere la entrada de un primer sustrato (A) seguido de la salida de un producto (P), en esta primera reacción la enzima (E) queda modificada (F); luego, un segundo sustrato (B) interactúa con la forma modificada de la enzima y sale un segundo producto (Q) (Fig. 6A) (Segel 1993). La ecuación cinética del mecanismo Ping-Pong es la siguiente:

$$v = \frac{V_m [A][B]}{K_{m_A}[B] + K_{m_B}[A] + [A][B]} \dots (1)$$

En su forma de doble recíproco la Ec. (1) se transforma en:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{m_A}[B] + K_{m_B}[A] + [A][B]}{V_m [A][B]} ; \frac{1}{v} = \frac{K_{m_A}}{V_m [A]} + \frac{K_{m_B}}{V_m [B]} + \frac{1}{V_m} \dots (2)$$

Dependiendo de si usamos 1/[A] o 1/[B] como variable independiente podemos obtener dos ecuaciones que tienen un comportamiento lineal cuya pendiente no cambia en función de la concentración del otro sustrato (Fig. 6B).

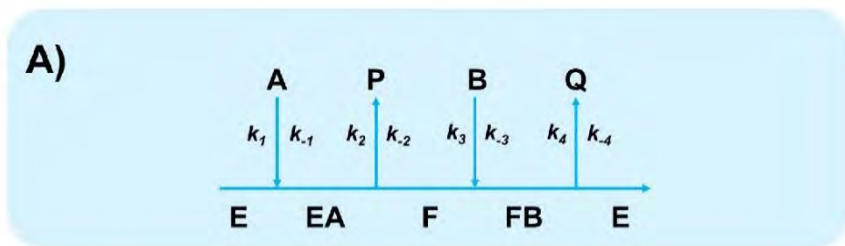
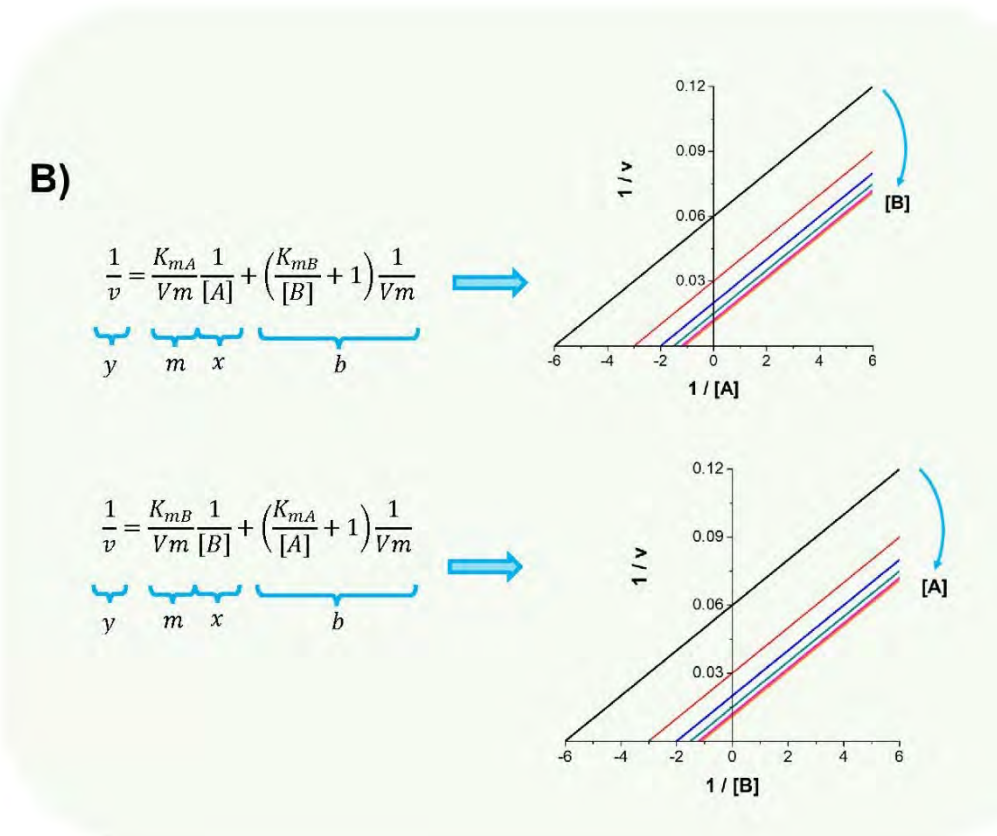


Figura 6. Mecanismo cinético de tipo Ping-Pong. **A)** Diagrama cinético del mecanismo Ping-Pong. Sustratos: A y B; productos: P y Q; formas de la enzima: E y F. **B)** Patrones gráficos del doble recíproco en una enzima con mecanismo Ping-Pong. Los gráficos fueron obtenidos a partir de la simulación de la ecuación (2) con los datos $V_m = 100$, $K_{mA} = K_{mB} = 1$; se utilizó el software Origin® 8.



Análisis de las ordenadas y las abscisas. Si se fija uno de los sustratos como variable independiente en la ecuación 2, se pueden analizar las ordenadas y las abscisas para obtener los parámetros cinéticos de la siguiente manera:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{mA}}{V_m} \frac{1}{[A]} + \left(\frac{K_{mB}}{[B]} + 1 \right) \frac{1}{V_m} \dots (3)$$

Las ordenadas (b) se definen como:

$$b = \left(\frac{K_{mB}}{[B]} + 1 \right) \frac{1}{V_m}; \quad b = \frac{K_{mB}}{V_m} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_m} \dots (4)$$

La ecuación 4 se puede visualizar como una nueva línea recta de cuya ordenada se puede calcular $1/V_m$ y de cuya abscisa se puede estimar $-1/K_{mB}$ (Fig. 7^a).

Por otro lado, las abscisas en valor absoluto ($|Abs|$) de la ecuación 3 se definen como:

$$|Abs| = \frac{K_{mB}}{K_{mA}} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{K_{mA}} \dots (5)$$

La ecuación 4 se puede visualizar como una nueva línea recta de cuya ordenada se puede calcular $1/K_{mA}$ (Fig. 7B).

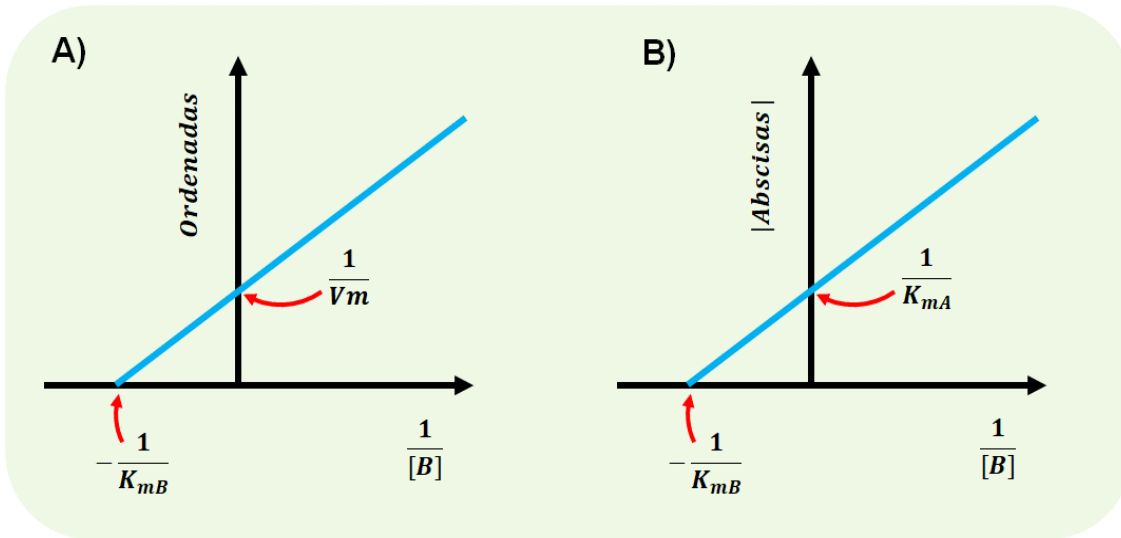


Figura 7. Estimación de los parámetros cinéticos utilizando el regráfico de las ordenadas (A) y el valor absoluto de las abscisas (B) obtenidas a partir de los gráficos de doble recíproco (Fig. 6).

Usando las ecuaciones de las rectas obtenidas en la figura 5B (Valores en la tabla 2) podemos construir los regráficos de las pendientes y las abscisas en valor absoluto para el cálculo de los parámetros cinéticos (Fig. 8)

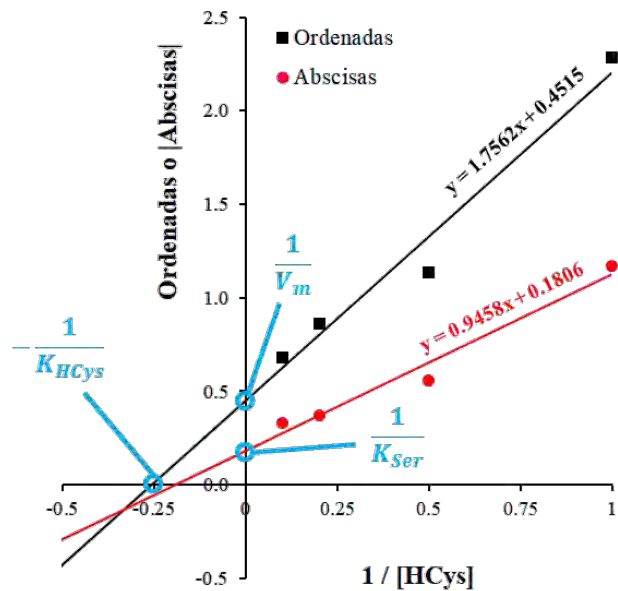
A)

1/HCys	Ordenadas	Abscisas
1	2.29	1.17
0.5	1.14	0.56
0.2	0.86	0.37
0.1	0.68	0.33

Parámetros cinéticos	
$1/V_m = 0.45$	V_m (mmolmin ⁻¹ mg ⁻¹) = 2.21
$1/K_{HCys} = 0.26$	K_{HCys} (mM) = 3.89
$1/K_{Ser} = 0.18$	K_{Ser} (mM) = 5.54

Figura 8. Obtención de los parámetros cinéticos de CBS. A) Tabla de datos para construir el regráfico y estimar el valor de los parámetros cinéticos de CBS. B) Regráfico de las ordenadas y el valor absoluto de las abscisas contra el inverso de la concentración de HCys.

B)



Cálculo de k_{cat} . De acuerdo con los datos de la figura 8, podemos calcular el valor de V_m específica:

$$\frac{1}{v_m} = 0.45; V_m = \frac{1}{0.4} = 2.21 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min mg}} \dots (6)$$

Utilizando la V_m específica, la masa molecular de la enzima, su estado de oligomerización, y su pureza, podemos estimar el valor de k_{cat}

$$k_{cat} = \frac{V_m \times PM_{oligómero}}{Pureza/100} = \frac{\left(2.21 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min mg}}\right) \left(155000 \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \times \frac{1 \text{mmol}}{1000 \mu\text{mol}}\right) \left(\frac{1 \text{min}}{60 \text{s}}\right)}{90/100} = 5.1 \text{s}^{-1}$$

Lo que quiere decir que la cistationina β -sintasa puede realizar 5 ciclos catalíticos cada segundo.

Conclusión

En este trabajo se presentan los datos cinéticos de la cistationina β -sintasa con la finalidad de ilustrar cómo se pueden calcular las constantes y deducir el mecanismo cinético. Es importante hacer notar que los datos proporcionados son experimentales, por lo que muchas veces los ajustes no son perfectos; sin embargo, es fundamental que el estudiante desarrolle su criterio al momento de interpretar los datos experimentales. Otra cuestión a resaltar es que el mecanismo cinético siempre es congruente con el mecanismo catalítico. Los datos sugieren que la cistationina β -sintasa es una enzima que tiene un mecanismo cinético de tipo Ping-Pong por lo que la forma intermedia de la enzima que se forma después de la entrada del primer sustrato (Fig. 6A) correspondería a la formación del aminoacrilato (Fig. 4).

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez con el apoyo de CONACYT del Fondo de Ciencia de Frontera, Paradigmas y Controversias con el proyecto número 320870 y con el Proyecto de Ciencia Básica número 282663.

Referencias

- González-Chávez Z, Vázquez C, Mejía-Tlachi M, Márquez-Dueñas C, Manning-Cela R, Encalada R, Rodríguez-Enríquez S, Michels PAM, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. Gamma-glutamylcysteine synthetase and tryparedoxin 1 exert high control on the antioxidant system in *Trypanosoma cruzi* contributing to drug resistance and infectivity. *Redox Biol.* 2019; 26:101231.
- Vázquez C, Mejía-Tlachi M, González-Chávez Z, Silva A, Rodríguez-Zavala JS, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* 2017; 591 (23): 3881-3894.
- Canepa GE, Bouvier LA, Miranda MR, Uttaro AD, Pereira CA. Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 292(1):27-32.
- Nozaki T, Shigeta Y, Saito-Nakano Y, Imada M, Kruger WD. Characterization of trans-sulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. *J Biol Chem.* 2001; 276 (9): 6516-23.
- Marciano D, Santana M, Nowicki C (2012). Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H(2)S production in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2012; 185(2):114-20.
- Banerjee R, Evande R, Kabil O, Ojha S, Taoka S. Reaction mechanism and regulation of cystathionine beta-synthase. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1647 (1-2): 30-35.
- Segel IH. Chapter nine: Steady-state Kinetics of Multireactant enzymes. Section I. Ping Pong BiBi system. En: *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Wiley Classics Library Edition. New York: John Wiley and Sons; 1993. P. 606-612.