

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS

MECANISMO CINETICO Y REGULACION  
DE FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE *Escherichia coli*  
UNA MUTANTE CON PROPIEDADES ALTERADAS

VICTORIA CRISTINA GUIXE LEGUIA

1985

Laboratorio de  
Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias.

MEMORANDUM FOR THE DIRECTOR  
OF THE BUREAU OF REVENUE  
WASHINGTON, D. C.

RE: [Illegible]

[Illegible]

[Illegible]

[Illegible]

[Illegible]

VERY TRULY YOURS,

[Illegible Signature]

MECANISMO CINETICO Y REGULACION  
DE FOSFOFRUCTOQUINASA-2 DE Escherichia coli

Una mutante con propiedades alteradas

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

VICTORIA CRISTINA GUIXE LEGUIA

Octubre, 1985

Director de Tesis: Dr. Jorge Babul C.

Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile

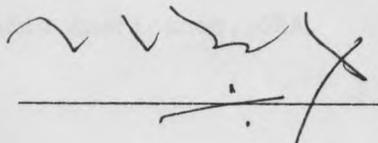
I N F O R M E   D E   A P R O B A C I O N  
T E S I S   D E   D O C T O R A D O

Se informa a la Comisión de Doctorado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

**Victoria Cristina Guixé Leguía**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 25 de Noviembre de 1985.

Director de Tesis  
Dr. Jorge Babul C.

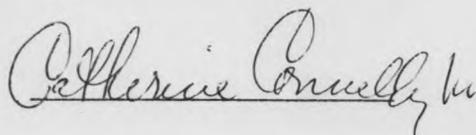


Comisión Informante de Tesis

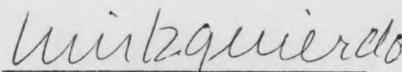
Dr. Sergio Bazaes V.



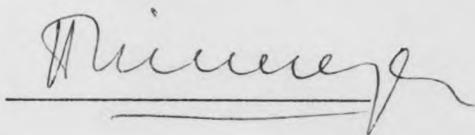
Dra. Catherine Connelly M.



Dr. Luis Izquierdo F.



Dr. Hermann Niemeyer F.



Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile bajo la dirección del Dr. Jorge Babul C. (Departamento de Química, Facultad de Ciencias) y fue financiada parcialmente por la Dirección de Investigación y Bibliotecas de la Universidad de Chile (Proyectos B-110, B-1368 y B-1998), por el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo PNUD-UNESCO (Proyecto CHI-81/001), por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Proyectos 0255 y 1134) y por la Organización de los Estados Americanos, OEA.

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las cuales me gustaría expresar mis agradecimientos, sin embargo, mencionaré sólo a algunas, a riesgo de olvidar a muchas.

A Jorge Babul por su valiosa enseñanza, dirección y constante apoyo durante la realización de esta tesis y, en especial, por su decisivo estímulo y generosa ayuda en las etapas finales de esta tarea.

A Tito Ureta y Hermann Niemeyer por su contribución en mi formación científica.

A Claudio Retamal y Gabriel Campos por su colaboración en algunos experimentos.

A Dan G. Fraenkel por la hospitalidad que me brindó en su laboratorio, motivando en parte mi interés por el tema. Además, por la donación de las cepas de E. coli empleadas en este estudio.

A Jorge Allende por las facilidades para el uso del rotor Sorvall AH-650, con el cual se realizaron los estudios de ultracentrifugación.

A Soledad Luzanto por mecanografiar gran parte de esta Tesis.

A todos los miembros del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias quienes, al brindarme su desinteresado apoyo y amistad, hicieron de mi estadía allí algo difícil de olvidar.

Victoria Guixé L.

A Jorge

A Francisca

A mis padres

## INDICE DE MATERIAS

	Pág.
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xxi
INTRODUCCION	1
Regulación enzimática	1
Fosfofructoquinasa	2
Fosfofructoquinasas de microorganismos	9
MATERIALES Y METODOS	15
Preparación de Pfk-2 y Pfk-2*	15
Fuente de obtención de las enzimas	15
Purificación de Pfk-2 y Pfk-2*	15
Determinación de la actividad enzimática	17
Material cromatográfico	19
Preparación de la Hidroxiapatita	19
Preparación del Azul de Cibacron-Sepharose	20
Centrifugación zonal en gradientes de sacarosa	20
Cálculo de las concentraciones de $MgATP^{-2}$ , $ATP^{-4}$ y $Mg^{+2}$	22
Determinación de la concentración de proteínas	23
Determinación de la concentración de los reactivos	23
Análisis estadístico de los resultados	24
Reactivos usados	25

RESULTADOS	27
MECANISMO CINETICO	27
Estudios cinéticos en velocidad inicial	27
Análisis de la velocidad inicial en presencia de los productos	35
Inhibición de Pfk-2 por los productos	38
Inhibición por fructosa-1,6-P <sub>2</sub>	38
Inhibición por ADP	42
Inhibición de Pfk-2* por los productos	45
Inhibición por ADP	45
Inhibición por fructosa-1,6-P <sub>2</sub>	45
Inhibición por análogos de los sustratos	47
Inhibición de Pfk-2 por ribosa-5-P	52
Inhibición de Pfk-2 por AMP-PNP	52
Inhibición de Pfk-2* por AMP-PNP	54
Inhibición de Pfk-2* por sorbitol-6-P	54
EFEECTO DE ATP SOBRE LA ACTIVIDAD	57
Efecto de MgATP <sup>-2</sup> y de la concentración de fructosa-6-P	
en la actividad de Pfk-2 y Pfk-2*	63
Efecto de ATP <sup>-4</sup> en la actividad de Pfk-2 y Pfk-2*	68
Efecto de nucleósido-mono y -difosfatos	73
Efecto de la concentración de H <sup>+</sup>	73
Efecto de nucleósido-trifosfatos en la actividad	
de Pfk-2 y Pfk-2*	75

	Pág.
EFECTO DE LIGANDOS SOBRE EL ESTADO DE AGREGACION DE LAS ENZIMAS	78
Efecto de $\text{MgATP}^{-2}$ en la sedimentación de Pfk-2 y Pfk-2*	80
Efecto de otros ligandos en el estado de agregación de Pfk-2 y Pfk-2*	86
Efecto de la concentración de $\text{H}^+$ en el estado de agregación de Pfk-2	88
DISCUSION	90
MECANISMO CINETICO	90
Estudios en velocidad inicial	90
Estudios de inhibición por los productos	91
Inhibición por análogos de los sustratos	92
Mecanismo cinético de fosfofructoquinasas de otras fuentes	97
EFECTO DE ATP SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS	100
ESTADOS DE AGREGACION	105
DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE Pfk-2 y Pfk-2*	113
REGULACION DE Pfk-2 y Pfk-2* <u>IN VIVO</u>	114
REFERENCIAS	117

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Fosfofructoquinasas de la cepa silvestre y de mutantes de <u>Escherichia coli</u> .	12
Tabla 2. Constantes cinéticas de Pfk-2 y Pfk-2*. Estudios de velocidad inicial.	34
Tabla 3. Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2 por los productos.	44
Tabla 4. Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2* por los productos.	48
Tabla 5. Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2 por análogos de los sustratos.	59
Tabla 6. Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2* por análogos de los sustratos.	60
Tabla 7. Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2 por $MgATP^{-2}$ a diferentes concentraciones de $Mg^{+2}$ libre.	69
Tabla 8. Efecto de la concentración de nucleósido-mono y -difosfatos sobre la actividad de Pfk-2.	74
Tabla 9. Complejos $Mg^{+2}$ -nucleótidos como sustratos e inhibidores de Pfk-2 y Pfk-2*.	79
Tabla 10. Coeficiente de sedimentación de Pfk-2 en presencia de ligandos.	84
Tabla 11. Coeficiente de sedimentación de Pfk-2* en presencia de ligandos.	85
Tabla 12. Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2 por ribosa-5-P.	94
Tabla 13. Constantes cinéticas para la inhibición de Pfk-2* por AMP-PNP.	95

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 donde fructosa-6-P es el sustrato variable, a distintas concentraciones fijas de ATP.	29
Figura 2. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2* donde fructosa-6-P es el sustrato variable a distintas concentraciones fijas de ATP.	30
Figura 3. Gráficas secundarias para Pfk-2 obtenidas de experimentos en velocidad inicial.	31
Figura 4. Gráficas secundarias para Pfk-2* obtenidas de experimentos en velocidad inicial.	32
Figura 5. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 donde las concentraciones de ATP y fructosa-6-P se variaron en una razón constante.	36
Figura 6. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2* donde las concentraciones de ATP y fructosa-6-P se variaron en una razón constante.	37
Figura 7. Gráficas de dobles recíprocos para las inhibiciones de Pfk-2 por los productos.	39
Figura 8. Gráficas de dobles recíprocos para las inhibiciones de Pfk-2* por los productos.	46
Figura 9. Gráficas de dobles recíprocos para la inhibición de punto muerto de Pfk-2 por ribosa-5-P.	53
Figura 10. Gráficas de dobles recíprocos para la inhibición de punto muerto de Pfk-2 por AMP-PNP.	55
Figura 11. Gráficas de dobles recíprocos para la inhibición de punto muerto de Pfk-2* por AMP-PNP.	56
Figura 12. Gráficas de dobles recíprocos para la inhibición de punto muerto de Pfk-2* por sorbitol-6-P.	58

- Figura 13. Actividad de Pfk-2 y Pfk-2\* en función de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  (rango micromolar) a diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{+2}$  libre. 64
- Figura 14. Efecto de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  (rango milimolar) sobre la actividad de Pfk-2 y Pfk-2\* a dos concentraciones de fructosa-6-P. 66
- Figura 15. Actividad de Pfk-2 en función de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  (rango milimolar) a diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{+2}$  libre. 67
- Figura 16. Efecto de la concentración de  $\text{ATP}^{-4}$  sobre la actividad de Pfk-2 y Pfk-2\*. 70
- Figura 17. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 y Pfk-2\* por  $\text{ATP}^{-4}$  usando  $\text{MgATP}^{-2}$  como sustrato variable. 72
- Figura 18. Efecto del pH del medio de reacción sobre la inhibición de Pfk-2 por ATP. 76
- Figura 19. Efecto del pH del medio de reacción sobre la inhibición del Pfk-2\* por ATP. 77
- Figura 20. Sedimentación zonal de Pfk-2 en gradiente de sacarosa en presencia y en ausencia de  $\text{MgATP}^{-2}$ . 81
- Figura 21. Sedimentación zonal de Pfk-2\* en gradiente de sacarosa en presencia y en ausencia de  $\text{MgATP}^{-2}$ . 82
- Figura 22. Efecto de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  en el coeficiente de sedimentación de Pfk-2. 87

## ABREVIATURAS

Fructosa-1,6-P <sub>2</sub>	Fructosa-1,6-bisfosfato
FDP	Fructosa-1,6-bisfosfato
Fructosa-6-P	Fructosa-6-fosfato
F6P	Fructosa-6-fosfato
Fructosa-2,6-P <sub>2</sub>	Fructosa-2,6-bisfosfato
Ribosa-5-P	Ribosa-5-fosfato
Sorbitol-6-P	Sorbitol-6-fosfato
AMP-PNP	Adenililimidodifosfato
DEAE-celulosa	Dietilaminoetil-celulosa
AMP-agarosa	Adenosina 5'-monofosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

## RESUMEN

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

Pfk-2 y Pfk-2\* se purificaron a partir de cepas con una eliminación completa del gen estructural de Pfk-1 (pfkA) y la mutación pfkB1. En el caso de pfk-2\*, las cepas contenían además la mutación pfkB10.

Estudios cinéticos preliminares de Pfk-2 y Pfk-2\* indicaron que ambas enzimas diferían en el tipo de inhibición por fructosa-1,6-P<sub>2</sub> cuando fructosa-6-P era el sustrato variable, lo que sugirió diferencias estructurales en el sitio activo de las mismas. Esta diferencia estructural se pudo establecer estudiando el mecanismo cinético de Pfk-2 y Pfk-2\*.

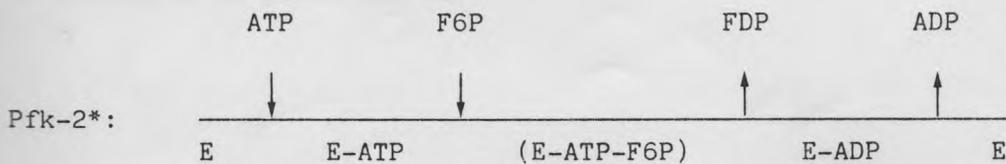
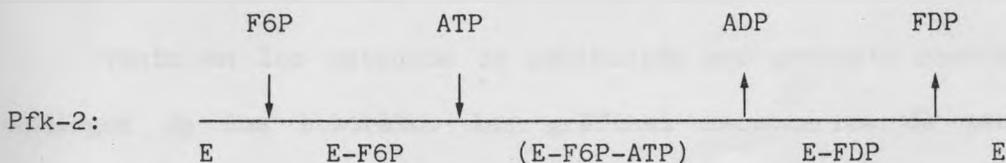
Para ambas enzimas las gráficas primarias de dobles recíprocos (1/v en función de 1/s) fueron lineales para ambos sustratos, ATP y fructosa-6-P. Además, las líneas se intersectaron en un punto a la izquierda de la ordenada, indicando una adición consecutiva de los sustratos a las enzimas y la formación de un complejo ternario previo a la liberación de los productos. Cuando se usó una razón constante de

concentración de ambos sustratos y se hizo la gráfica de dobles recíprocos con respecto a cualquiera de ellos, se obtuvo una parábola, lo que apoyó un mecanismo en secuencia.

Para conocer el orden de interacción de los sustratos con las enzimas se realizaron estudios de inhibición por producto. Para Pfk-2, fructosa-1,6-P<sub>2</sub> se comportó como un inhibidor competitivo con respecto a fructosa-6-P a dos concentraciones de ATP (0,1 y 0,4 mM); en cambio la inhibición de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a ATP fue de tipo no competitivo. La inhibición de ADP en relación a ATP o a fructosa-6-P fue de tipo no competitivo.

Para Pfk-2\* se obtuvo inhibición competitiva de ADP con respecto a ATP a dos concentraciones de fructosa-6-P (0,05 y 0,5 mM), e inhibición no competitiva de ADP con respecto a fructosa-6-P. El otro producto de la reacción, fructosa-1,6-P<sub>2</sub>, mostró inhibición no competitiva con respecto a ambos sustratos, ATP y fructosa-6-P.

Los resultados obtenidos de los estudios de inhibición por los productos permitieron postular los siguientes mecanismos en secuencia ordenada para Pfk-2 y Pfk-2\*:



Para Pfk-2, fructosa-6-P sería el primer sustrato en unirse a la enzima y fructosa-1,6-P<sub>2</sub> el último producto liberado. En el caso de Pfk-2\*, ATP sería el primer sustrato que interacciona con la enzima y el último producto liberado sería ADP.

Los mecanismos propuestos anteriormente se confirmaron mediante el uso de inhibidores de punto muerto. Para Pfk-2 se usó ribosa-5-P como análogo de fructosa-6-P y AMP-PNP como análogo de ATP. Se obtuvo inhibición competitiva de ribosa-5-P con respecto a fructosa-6-P e inhibición no competitiva cuando ATP fue el sustrato variable. Cuando se usó el inhibidor de punto muerto AMP-PNP, la inhibición fue de tipo competitivo con respecto a ATP y de tipo incompetitivo en relación a fructosa-6-P.

En el caso de Pfk-2\* los inhibidores de punto muerto usados fueron AMP-PNP y sorbitol-6-P. AMP-PNP presentó inhibición competitiva en relación a ATP e inhibición no competitiva en relación al otro sustrato, fructosa-6-P. Cuando se estudió el efecto inhibidor de sorbitol-6-P usando fructosa-6-P como sustrato variable, se obtuvo inhibición competitiva. La inhibición de sorbitol-6-P versus ATP fue incompetitiva.

Tanto en los estudios de inhibición por producto como en los por análogos de los sustratos las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones, obtenidas de gráficas de dobles recíprocos, en función de la concentración de inhibidor, fueron lineales, indicando la ausencia de complejos de punto muerto.

Para Pfk-2 y Pfk-2\* se obtuvo inhibición incompetitiva cuando se estudió la inhibición por el análogo del segundo sustrato en relación al primer sustrato que se adiciona a la enzima, confirmando así los mecanismos en secuencia ordenada propuestos anteriormente.

Una característica común a la mayoría de las fosfofructoquinasas estudiadas es su inhibición por ATP. Sin embargo, el análisis cinético de enzimas que catalizan reacciones donde participan nucleótidos es complicado, debido a la multiplicidad de especies que pueden unirse a la enzima ( $\text{MgATP}^{-2}$ ,  $\text{ATP}^{-4}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ). Para Pfk-2 y Pfk-2\* el sustrato fue  $\text{MgATP}^{-2}$ . Los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{\text{máx}}$ ) de ambas enzimas para este sustrato, no se modificaron significativamente al aumentar la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre.

Pfk-2 fue inhibida por  $\text{MgATP}^{-2}$  (orden milimolar) cuando el ensayo se realizó a bajas concentraciones de fructosa-6-P (0,1 mM). Esta inhibición fue revertida al aumentar la concentración de fructosa-6-P a 1 mM. También fue posible revertir parcialmente esta inhibición al aumentar la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre. La inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$  fue cooperativa, con un coeficiente de Hill de aproximadamente 1,5. Un aumento en la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre resultó en un aumento de la constante de inhibición aparente, sin cambio en el coeficiente de Hill.

Pfk-2\* no fue inhibida por  $\text{MgATP}^{-2}$  a ninguna de las concentraciones de fructosa-6-P empleadas (0,05; 0,1 y 1,0 mM).

Otra condición que afectó la inhibición de Pfk-2 por el complejo metal-nucleótido fue el pH del medio de reacción. Al contrario de lo

que ocurre con la enzima proveniente de mamíferos, la inhibición de Pfk-2 de E. coli fue más pronunciada a pH alcalino. Pfk-2\* no presentó inhibición por  $\text{MgATP}^{-2}$  en todo el intervalo de pH estudiado (5,5 a 9,0).

Activadores de la fosfofructoquinasa de mamíferos tales como cAMP, AMP o ADP no modificaron la inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$ .

La actividad de Pfk-2 y Pfk-2\* se ensayó usando distintos nucleósido-trifosfatos como sustratos. Tanto GTP, CTP, UTP e ITP actuaron como sustratos para ambas enzimas, pero los valores de las constantes de Michaelis resultaron aproximadamente 10 veces más altos que el correspondiente a ATP. Todos los complejos metal-nucleótidos usados provocaron una inhibición de Pfk-2 menor que la de  $\text{MgATP}^{-2}$ , indicando que la inhibición por este complejo es bastante específica. Pfk-2\* no presentó inhibición por ninguno de los complejos metal-nucleótido usados.

La otra especie iónica importante en el equilibrio entre ATP y  $\text{Mg}^{+2}$  es  $\text{ATP}^{-4}$ . Este compuesto actuó como inhibidor de Pfk-2 y Pfk-2\* a dos concentraciones de fructosa-6-P (0,10 y 1,0 mM). Al graficar el valor recíproco de la velocidad de la reacción catalizada por Pfk-2 y Pfk-2\* en función del valor recíproco de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$ , a distintas concentraciones de  $\text{ATP}^{-4}$  (0; 5 y 11  $\mu\text{M}$ ), se obtuvo una familia de líneas rectas que se intersectaron en la ordenada, indicando una inhibición competitiva. Las constantes de inhibición por  $\text{ATP}^{-4}$  para Pfk-2 y Pfk-2\*, obtenidas de los experimentos anteriores, fueron de 10 y 8  $\mu\text{M}$  respectivamente. Estos resultados sugieren que la inhibición de ambas enzimas por  $\text{ATP}^{-4}$  ocurre por unión de este compuesto al sitio activo y que la inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$  surge debido a la

presencia de un sitio alostérico para este nucleótido en la enzima, el que estaría alterado en Pfk-2\* a consecuencia de la mutación estructural pfkB10.

Un mecanismo regulador importante de la actividad de la fosfofructoquinasa ocurre a través de cambios en su estado de agregación, debido a la unión de sustratos y efectores. Al realizar experimentos de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa en presencia de  $\text{MgATP}^{-2}$  1 mM, Pfk-2 sedimentó como un tetrámero, en tanto que Pfk-2\* lo hizo como un dímero. En ausencia de ligandos, ambas enzimas sedimentaron como un dímero. Estos resultados sugieren que el estado de agregación de la enzima está relacionado con el sitio alostérico para  $\text{MgATP}^{-2}$  de Pfk-2.

Para relacionar más claramente el cambio en el estado de agregación de Pfk-2 y la regulación de su actividad, se estudió el efecto de la concentración de fructosa-6-P en la transición dímero-tetrámero, dado que este sustrato es capaz de revertir el efecto inhibitorio del nucleótido. A concentraciones bajas de ambos sustratos (0,10 mM) el estado de agregación de Pfk-2 y Pfk-2\* fue el correspondiente a un dímero. A concentraciones bajas de fructosa-6-P (0,10 mM) y a una concentración inhibitoria de  $\text{MgATP}^{-2}$  (4 mM), Pfk-2 sedimentó como un tetrámero. En cambio, a la misma concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  y a una concentración de fructosa-6-P de 1,0 mM, la enzima sedimentó como un dímero. Esto es, fructosa-6-P fue capaz de revertir el efecto de  $\text{MgATP}^{-2}$  tanto sobre la actividad de la enzima como sobre su estado de agregación. Pfk-2\* sedimentó como un dímero en ambas condiciones experi-

mentales. Por otra parte,  $\text{ATP}^{-4}$ , un potente inhibidor de la reacción catalizada por Pfk-2 y Pfk-2\*, no tuvo efecto sobre el estado de agregación de las enzimas.

En presencia de los productos de la reacción, ADP y fructosa-1,6- $\text{P}_2$ , ambas enzimas sedimentaron como un dímero. Sin embargo, cuando la sedimentación de soluciones de Pfk-2 se hizo en presencia de  $\text{MgATP}^{-2}$  1 mM y  $\text{MgADP}^{-1}$  1 mM, la enzima estuvo presente como un tetrámero, indicando que este producto es incapaz de impedir la tetramerización. Estos resultados se pueden correlacionar con los datos cinéticos, los cuales muestran que la inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$  no puede ser revertida por ADP.

El estado de agregación de Pfk-2 fue el correspondiente a un dímero, cuando esta enzima se sometió a ultracentrifugación en presencia de  $\text{MgATP}^{-2}$  1 mM y FDP 1 mM. Para Pfk-2, fructosa-1,6- $\text{P}_2$  es un inhibidor competitivo en relación a fructosa-6-P, de modo que es probable que la unión de ambos azúcares fosfato produzca un cambio conformacional similar en la enzima, el que provocaría concomitantemente la pérdida de la sensibilidad a la inhibición por  $\text{MgATP}^{-2}$  y la incapacidad de experimentar la conversión de dímero a tetrámero.

De los resultados anteriores se desprende que la regulación de Pfk-2 comprende, por una parte, la inhibición de la actividad por  $\text{MgATP}^{-2}$  y, por otra, efectos más complejos relacionados con el estado de agregación de la proteína.

Los datos presentados concuerdan en que la regulación de Pfk-2 se hace mediante cambios conformacionales en respuesta a la unión de

moléculas efectoras y que el proceso de tetramerización podría servir como indicador de tales cambios.

## ABSTRACT

The wild type strain of E. coli contains an allosteric phosphofructokinase which is the main isozyme (Pfk-1) and a minor isozyme, Pfk-2, originally thought to be nonallosteric. The pfkB1 mutation increases the amount of Pfk-2, restores growth on sugars to strains lacking Pfk-1 and does not affect the rate of gluconeogenic growth. The pfkB10 mutation produces an altered form of Pfk-2, called Pfk-2\*, which is more labile and has different kinetic properties. Strains with high levels of Pfk-2\* grow well on sugars but are markedly impaired in their growth on gluconeogenic compounds.

Pfk-2 and Pfk-2\* were purified from strains carrying both a deletion of the structural gen of Pfk-1 (pfkA) and the pfkB1 mutation. In the case of Pfk-2\*, the strains also contained the pfkB10 mutation.

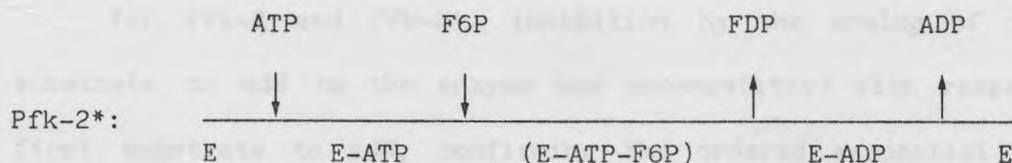
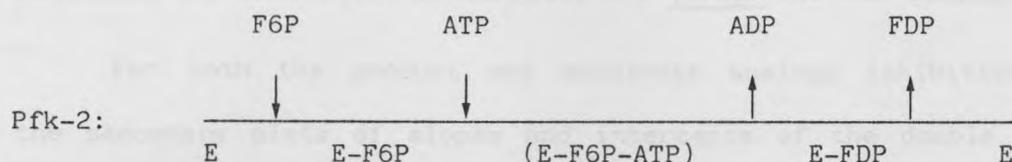
Preliminary kinetic studies showed that both enzymes have a different type of inhibition by fructose-1,6-P<sub>2</sub> when fructose-6-P was the variable substrate, fact which suggests structural differences in the active site of Pfk-2 and Pfk-2\*. This difference was established by studying the kinetic mechanism of the enzymes.

For both enzymes the double reciprocal plots ( $1/v$  versus  $1/s$ ) were linear for both substrates ATP and fructose-6-P. A family of lines intersecting above the abscissa was obtained, indicating a consecutive order of addition of the substrates to the enzymes and the formation of a central ternary complex previous to product release. When the concentration of both substrates was varied in a constant ratio, the reciprocal plots could be fitted to a parabola, fact which supports the sequential mechanisms.

In order to study the order of interaction of the substrates with the enzymes, product inhibition studies were carried out for Pfk-2 and Pfk-2\*. For Pfk-2, fructose-1,6-P<sub>2</sub> was a competitive inhibitor with respect to fructose-6-P at two ATP concentrations (0.1 and 0.4 mM). On the other hand, the fructose-1,6-P<sub>2</sub> inhibition was noncompetitive with respect to ATP. The other product, ADP, showed noncompetitive inhibition versus either ATP or fructose-6-P.

For Pfk-2\* the inhibition by ADP with respect to ATP, at two fructose-6-P concentrations (0.05 and 0.5 mM) was competitive. The other product inhibitions, ADP versus fructose-6-P, and fructose-1,6-P<sub>2</sub> versus either ATP or fructose-6-P, were noncompetitive.

From the results of product inhibition studies it is possible to postulate the following ordered sequential mechanisms for Pfk-2 and Pfk-2\*:



For Pfk-2, fructose-6-P would be the first substrate to add to the enzyme and fructose-1,6-P<sub>2</sub> the last product to be released. In the case of Pfk-2\*, ATP would be the first substrate that interacts with the enzyme and ADP the last product released.

The proposed kinetic mechanisms were confirmed by the use of dead-end inhibitors. For Pfk-2, ribose-5-P was used as an ATP analog. Ribose-5-P was found to be a competitive inhibitor against fructose-6-P and noncompetitive with respect to ATP. When the dead-end inhibitor AMP-PNP was used, the inhibition obtained was competitive with respect to ATP and incompetent against fructose-6-P.

In the case of Pfk-2\*, the dead-end inhibitors used were AMP-PNP and sorbitol-6-P. AMP-PNP presented a competitive inhibition in relation to ATP and noncompetitive in relation to the other substrate, fructose-6-P. When the inhibitory effect of sorbitol-6-P was studied using fructose-6-P as the variable substrate, competitive inhibition was obtained. The inhibition of sorbitol-6-P versus ATP was incompetent.

For both the product and substrate analogs inhibition studies, the secondary plots of slopes and intercepts of the double reciprocal plots in relation to the inhibitor concentration were linear, indicating the absence of dead-end complexes.

For Pfk-2 and Pfk-2\*, inhibition by the analog of the second substrate to add to the enzyme was uncompetitive with respect to the first substrate to add, confirming the ordered sequential mechanisms proposed above.

ATP inhibition is a common characteristic to almost all the phosphofructokinases studied. However, the kinetic analysis of enzymes that catalyzed reactions involving nucleotides can become very complicated because of the multiple ligand species that can bind to these enzymes ( $\text{MgATP}^{2-}$ ,  $\text{ATP}^{4-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). For Pfk-2 and Pfk-2\* the true substrate was  $\text{MgATP}^{2-}$ . The kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{\max}$ ) of both enzymes for this substrate were not significantly modified by an increase in the free  $\text{Mg}^{2+}$  concentration.

Pfk-2 was inhibited by  $\text{MgATP}^{2-}$  when the enzymatic assay was performed at low fructose-6-P concentrations (0.1 mM). This inhibition was relieved by an increase in the fructose-6-P concentration. This inhibition was also partially relieved by an increase in the free  $\text{Mg}^{2+}$  concentration. The inhibition of Pfk-2 by  $\text{MgATP}^{2-}$  is cooperative with a Hill coefficient of 1.5. An increase in the free  $\text{Mg}^{2+}$  concentration did not affect the Hill coefficient, but increased the apparent inhibition constant for  $\text{MgATP}^{2-}$ .

Pfk-2\* was not inhibited by  $\text{MgATP}^{2-}$  in the range of fructose-6-P concentrations employed (0.05, 0.1 and 1.0 mM).

Another condition that affects the Pfk-2 inhibition by the metal-nucleotide complex, was the pH of the assay mixture. Contrary to that which is observed with the mammalian enzyme, the inhibition of *E. coli* Pfk-2 was much greater at alkaline pH. Pfk-2\* was not inhibited by  $\text{MgATP}^{2-}$  in the pH range studied (5.5 to 9.0).

Activators of mammalian phosphofructokinases such as cAMP, AMP or

ADP did not modified the Pfk-2 inhibition by  $\text{MgATP}^{2-}$ .

The Pfk-2 and Pfk-2\* activity was assayed using different nucleosides triphosphate as substrates. GTP, CTP, UTP and ITP acted as substrates for both enzymes, but with Michaelis constants approximately ten times greater than the corresponding one for ATP. All the nucleotide-metal complexes tested were weaker inhibitors of Pfk-2 than  $\text{MgATP}^{2-}$ , indicating that the inhibition by this complex is highly specific. Pfk-2\* was not inhibited by any of the metal-nucleotide complexes tested.

The other important ionic species in the equilibrium between ATP and  $\text{Mg}^{2+}$  is  $\text{ATP}^{4-}$ . This compound acted as an inhibitor of Pfk-2 and Pfk-2\* at two fructose-6-P concentrations (0.1 and 1.0 mM). When the reciprocal values of the velocity of the Pfk-2 and Pfk-2\* reaction were plotted as a function of the reciprocal values of the  $\text{MgATP}^{2-}$  concentrations, at different  $\text{ATP}^{4-}$  concentrations (0; 5 and 11  $\mu\text{M}$ ), a family of lines intersecting in the ordinate was obtained, indicating a competitive inhibition. The inhibition constants for Pfk-2 and Pfk-2\* by  $\text{ATP}^{4-}$  were 8 and 10  $\mu\text{M}$  respectively. These results suggest that the inhibition of Pfk-2 and Pfk-2\* by  $\text{ATP}^{4-}$  occurs by binding of this compound at the active site of both enzymes, and that the Pfk-2 inhibition by  $\text{MgATP}^{2-}$  is due to the existence of an allosteric site for this nucleotide in the enzyme which would be altered in Pfk-2\* as a consequence of the structural mutation pfkB10.

An important regulatory mechanism of phosphofructokinase activity occurs through changes in its aggregation state by binding of substrates

and effectors. When sucrose gradient ultracentrifugation experiments were performed in the presence of 1 mM  $\text{MgATP}^{2-}$ , Pfk-2 sedimented as a tetramer, whereas Pfk-2\* sedimented as a dimer. In the absence of added ligands, both enzymes sedimented as dimers. These results suggest that the allosteric site for  $\text{MgATP}^{2-}$ , present in Pfk-2, is related to the aggregation state of the enzyme.

In order to correlate the aggregation state of Pfk-2 and the regulation of its activity, the dimer-tetramer transition was studied at various fructose-6-P concentrations, since this substrate is able to relieve the nucleotide inhibitory effect. At low concentrations of both substrates (0.10 mM) the aggregation state of Pfk-2 and Pfk-2\* was the one corresponding to a dimer. At a low fructose-6-P concentration (0.1 mM) and at an inhibitory concentration of  $\text{MgATP}^{2-}$  (4 mM), Pfk-2 sedimented as a tetramer. However, at the same  $\text{MgATP}^{2-}$  concentration but at a higher fructose-6-P concentration (1.0 mM), the enzyme sedimented as a dimer. Hence, fructose-6-P was able to counteract the  $\text{MgATP}^{2-}$  effect upon the activity of the enzyme as well as upon its aggregation state. Pfk-2\* sedimented as a dimer in both conditions. On the other hand,  $\text{ATP}^{4-}$ , a potent inhibitor of the reaction catalyzed by Pfk-2 and Pfk-2\*, had no effect upon the aggregation state of the enzymes.

In the presence of the products of the reaction, ADP and fructose-1,6- $\text{P}_2$ , both enzymes sedimented as dimers. However, when the sedimentation of Pfk-2 solutions were performed in the presence of 1 mM  $\text{MgATP}^{2-}$  and 1 mM ADP, the enzyme was present as a tetramer, indicating that this product is unable to prevent the tetramerization of the

enzyme. These results can be correlated with the kinetic data, which show that the  $\text{MgATP}^{2-}$  inhibition of Pfk-2 cannot be reverted by ADP. When Pfk-2 sedimented in the presence of 1 mM  $\text{MgATP}^{2-}$  and 1 mM fructose-1,6- $\text{P}_2$ , the enzyme was a dimer. For Pfk-2, fructose-1,6- $\text{P}_2$  is a competitive inhibitor in relation to fructose-6-P, so it is likely that the binding of both sugar phosphates brings about the same conformational change in the enzyme, which results in a loss of the  $\text{MgATP}^{2-}$  inhibitability and of its susceptibility to tetramerize.

From the above results it appears that the regulation of Pfk-2 involves on one hand, inhibition by  $\text{MgATP}^{2-}$ , and on the other, more complex effects related with the aggregation state of the protein.

The data presented in this work are consistent with the idea that regulation of Pfk-2 is mediated by structural changes in the enzyme in response to the binding of effector molecules and that the tetramerization process could be an indicator of these changes.

## INTRODUCCION

**Regulación enzimática**

La modulación de una vía metabólica se puede lograr mediante la modificación de la actividad de la enzima limitante de la velocidad de la vía, la que suele denominarse enzima reguladora. Esto puede realizarse a través de dos mecanismos: 1) modificación de la cantidad de moléculas de enzima y 2) modificación de su actividad catalítica.

La concentración celular de enzima se modula mediante el control de la velocidad de síntesis, de la velocidad de degradación o de ambos a la vez (Schimke y Doyle, 1970). La actividad catalítica puede a su vez regularse de varias maneras. Entre éstas están la modificación covalente catalizada por otras enzimas (Holzer y Duntze, 1971; Statdman y Chock, 1978) y la interacción alostérica con activadores o inhibidores (Monod y col. 1963 y 1965; Koshland, 1970; Statdman, 1970). Como resultado de estas interacciones pueden ocurrir cambios conformacionales que alteren la interacción entre cadenas polipeptídicas, cambios en el estado de agregación de la enzima, o una combinación de ellos (Hammes, 1982a). A nivel fisiológico, es probable que el problema sea más complejo y que mecanismos reguladores tales como cambios conformacionales y reacciones de polimerización-despolimerización, ocurran simultáneamente.

Se ha estudiado el mecanismo de regulación de la actividad de una gran variedad de enzimas consideradas claves en la regulación metabólica. Sin embargo sólo en algunos casos se ha comprobado que los

mecanismos reguladores observados in vitro corresponden a los que probablemente operan en la regulación in vivo. A este respecto, el uso de mutantes de E. coli ha resultado ser una metódica útil en el estudio de aspectos fisiológicos del metabolismo de los hidratos de carbono (Fraenkel y Vinopal, 1973; Fraenkel, 1981). Al utilizar mutantes es posible averiguar el papel fisiológico de enzimas reguladoras, estudiar la función de las isoenzimas en el metabolismo y poner a prueba la función que normalmente se le reconoce a una vía metabólica.

Dada la complejidad estructural de las enzimas reguladoras, el conocimiento acerca de su relación entre estructura y función, dista mucho de ser completo. Tal es el caso de fosfofructoquinasa, una enzima considerada crucial para la regulación de la glicólisis, cuya actividad está regulada por una variedad de efectores, así como por cambios en su estado de agregación (Hammes, 1982a; Bloxham y Lardy, 1973).

### Fosfofructoquinasa

La fosfofructoquinasa cataliza la fosforilación de fructosa-6-P para formar fructosa-1,6-P<sub>2</sub> en presencia de ATP y Mg<sup>+2</sup>



Uyeda (1979) se ha referido a los antecedentes históricos más importantes de esta enzima. La reacción fue descubierta en 1935 por Dische en glóbulos rojos y en 1936 por el grupo de Ostern en músculo. Negelein en 1936 y Cori en 1941 le atribuyeron un rol regulador a la

enzima, al observar que la administración de epinefrina a músculo de rana causaba una acumulación de hexosa-monofosfato con un aumento muy pequeño de ácido láctico. Por otra parte, en 1943 Engelhardt y Sakov encontraron que la enzima era muy sensible a la acción de agentes oxidantes, efecto que explicaba el rol de ésta en la regulación de la glicólisis durante el cambio de condiciones anaeróbicas a aeróbicas. Posteriormente Aisenberg y col. (1957) postularon a un intermediario de la fosforilación oxidativa como el responsable de la inhibición de la enzima y de la pequeña acumulación de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> observada cuando la glucosa se metaboliza aeróbicamente.

En 1956 Lardy y Parks observaron que el ATP inhibía fuertemente a la fosfofructoquinasa de músculo y sugirieron que esta inhibición podría tener un rol regulador importante en el metabolismo de los hidratos de carbono. Desde ese tiempo a la fecha son numerosos los estudios que han mostrado la complejidad de los mecanismos reguladores de la enzima aislada de diversas fuentes.

El número de efectores que influye en la actividad de una determinada fosfofructoquinasa, así como el grado de inhibición que presenta frente a algunos de ellos, varía según la fuente de obtención de la enzima. Por ejemplo, sólo unos pocos metabolitos afectan la actividad de fosfofructoquinasas bacterianas, en tanto que la de organismos superiores está regulada por una variedad de ellos.

Las características cinéticas más importantes en la regulación de la mayoría de las fosfofructoquinasas son las siguientes (Bloxham y Lardy, 1973):

- 1) Inhibición por altas concentraciones de ATP. Generalmente el ATP disminuye la afinidad por el segundo sustrato fructosa-6-P.
- 2) Inhibición por citrato en presencia de una concentración inhibidora de ATP.
- 3) Reversión de la inhibición causada por ATP por: Pi, AMP, cAMP, fructosa-6-P y fructosa-1,5-P<sub>2</sub>.
- 4) Cooperatividad en la unión de fructosa-6-P. Efectores negativos disminuyen la afinidad de la enzima por fructosa-6-P, en tanto que efectores positivos la aumentan.

La susceptibilidad de la fosfofructoquinasa a la inhibición por ATP difiere significativamente según la fuente de obtención de la enzima. Las fosfofructoquinasas de hígado, músculo y cerebro son inhibidas por ATP. La enzima proveniente de hígado es inhibida más fuertemente por este compuesto, en tanto que la de cerebro presenta la inhibición menor (Johnson y col., 1976; Tsai y Kemp, 1974).

La enzima de C. pasteurianum (Uyeda y Kurooka, 1970), Arthrobacter crystallopoietes (Ferdinandus y Clark, 1969), Dictyostelym discoideum (Kono y Uyeda, 1974; Baumann y Wright, 1968), Flavobacterium thermophilum (Yoshida y col., 1971; Yoshida, 1972), Lactobacillus casei y Lactobacillus plantarum (Doelle, 1972) no son inhibidas por ATP. Además, las últimas cinco presentan curvas de velocidad hiperbólicas con respecto a fructosa-6-P.

El efecto inhibitorio de ATP disminuye al aumentar la concentración de fructosa-6-P. Asimismo, para la enzima de músculo (Uyeda y Racker, 1965), cerebro (Lowry y Passonneau, 1966), diafragma (Ui,

1966), corazón (Mansour y Ahlfors, 1968) e hígado (Kemp, 1971) esta inhibición disminuye al aumentar el pH del medio de reacción. Sin embargo, la enzima de levadura es más sensible a la inhibición por ATP a pH 8.0 que a pH 6.0 (Lindell y Stellwagen, 1968).

El otro efector importante en la regulación de la fosfofructoquinasa es citrato, el cual satisface el concepto original de efector alostérico, en el sentido que no comparte semejanza estructural con algún sustrato o producto de la reacción. La acción inhibidora del citrato fue descubierta inicialmente por Garland y col. (1963) en fosfofructoquinasa de corazón. La inhibición fue considerada altamente específica ya que otros intermediarios del ciclo de Krebs no producían inhibición. Esto contrasta con lo encontrado para la fosfofructoquinasa de cerebro (Passonneau y Lowry, 1963) donde citrato, malato, cis-aconitato, isocitrato, succinato y  $\alpha$ -cetoglutarato, son todos inhibidores con valores de  $K_i$  de magnitud milimolar. Dependiendo de la fuente de obtención de la enzima, la acción de citrato muestra una compleja relación con respecto a la concentración de ATP. Para la enzima de corazón, Pogson y Randle (1966) mostraron que la acción inhibidora del citrato era la misma a concentraciones inhibitorias o no inhibitorias de ATP. Sin embargo, Passonneau y Lowry (1963) mostraron que el citrato inhibía a la enzima de cerebro de rata sólo en presencia de concentraciones inhibitorias de ATP. Recientemente, Ogawa y Atkinson (1985) han mostrado que la unión de GTP y de ATP al sitio catalítico de fosfofructoquinasa de músculo de conejo potencia la unión de citrato.

Otros inhibidores de la fosfofructoquinasa son: P-creatina (Uyeda

y Racker, 1965; Kemp, 1971; Krzanowski y Matshinsky, 1969), 3-P-glicerato (Kemp, 1971; Krzanowski y Matshinsky, 1969; Kelly y Turner, 1968), 2-P-glicerato (Kemp, 1971; Krzanowski y Matshinsky, 1969), 2,3-difosfoglicerato (Kemp, 1971; Tarui y col, 1972; Krzanowski y Matshinsky, 1969) y fosfoenolpiruvato (Uyeda y Racker, 1965; Kemp, 1971; Thomas y col., 1972; Krzanowski y Matshinsky, 1969; Kelly y Turner, 1968). La inhibición de la enzima por estos intermediarios es más pronunciada a valores de pH menores que 7,0 y en presencia de concentraciones inhibitorias de ATP (Kemp, 1971; Colombo y col., 1975).

AMP, cAMP, ADP, Pi, fructosa-6-P y fructosa-1,6-P<sub>2</sub> actúan como efectores positivos de la fosfofructoquinasa de mamíferos, contrarrestando la inhibición de ésta por ATP y citrato (Bloxham y Lardy, 1973).

Recientemente se ha descrito al fructosa-2,6-P<sub>2</sub> como el activador más potente de la fosfofructoquinasa. Este compuesto es capaz de revertir la inhibición por ATP a concentraciones submicromolares y de aumentar la afinidad de la enzima por fructosa-6-P (Van Schaftingen y Hers, 1981; Uyeda y col., 1981). Su efecto es claramente cooperativo y sinérgico con cAMP (Van Schaftingen y Hers, 1981). Sin embargo, dada la interacción de este metabolito con otros efectores, la susceptibilidad de la enzima al fructosa-2,6-P<sub>2</sub> depende de la composición del medio de incubación. Se ha estimado que en presencia de concentraciones fisiológicas de ATP, fructosa-6-P, AMP, P<sub>i</sub> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, la K<sub>a</sub> para fructosa-2,6-P<sub>2</sub> es de magnitud micromolar (Hers y Van Schaftingen, 1982). Considerando que en el hígado la concentración de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> y fructosa-2,6-P<sub>2</sub> es muy similar y que usualmente cambian en paralelo,

parecería que el fructosa-1,6-P<sub>2</sub> no es un estimulador fisiológico de la fosfofructoquinasa, al menos en el hígado, siendo en este tejido fructosa-2,6-P<sub>2</sub> el efector más importante (Hers y Hue, 1983). Sin embargo en el músculo la situación no es tan clara (Hue y col., 1982; Hue, 1982) y es así como se han sugerido mecanismos adicionales para la regulación de la actividad fosfofructoquinásica. Uno de ellos sería a través de su interacción con calmodulina.

Mediante experimentos de inactivación y reactivación, Mayr (1984a) ha demostrado que la unión de calmodulina a fosfofructoquinasa de músculo promueve la disociación de la enzima de tetrámeros a dímeros. Además, esta unión provoca un cambio conformacional lento en los dímeros, con una pérdida concomitante de la actividad catalítica. Para la reactivación de la enzima no es suficiente la remoción de la calmodulina, sino que se requiere de cambios en la concentración de efectores, (MgATP<sup>-2</sup>, fructosa-1,6-P<sub>2</sub>) y de la asociación calmodulina-fosfofructoquinasa.

A través de un detallado estudio de la interacción de calmodulina con fosfofructoquinasa y de su relación con diferentes efectores, Mayr (1984b) ha propuesto que esta interacción ocurre bajo una variedad de condiciones fisiológicas y que calmodulina podría ser un potente efector de la inactivación y reactivación de la enzima.

Otro mecanismo regulador importante de la actividad de fosfofructoquinasa es a través de reacciones de polimerización-despolimerización. Tal es el caso de la enzima de músculo, la que puede existir en varias formas poliméricas interconvertibles (Aaronson y Frieden, 1972; Pavelich

y Hammes, 1973; Parmeggiani y col., 1966; Leonard y Walker, 1972). A concentraciones fisiológicas de enzima y a valores de pH alrededor de 7,0, ésta existe como un tetrámero. Sin embargo, a valores de pH más bajos (6,0 a 7,0) la enzima se encuentra en un equilibrio entre dímero y tetrámero (Pavelich y Hammes, 1973). También existe una relación entre el estado de agregación y la actividad específica (Lad y col., 1973; Leonard y Walker, 1972; Aaronson y Frieden, 1972). El dímero y el monómero poseen actividad enzimática baja o nula, en tanto que el tetrámero y agregados mayores poseen la misma actividad específica.

Resultados de Lad y col. (1973) y de Hesterberg y Lee (1982) indican que los activadores de la fosfofructoquinasa estabilizan la forma tetramérica mientras que el citrato, un inhibidor de la enzima, estabiliza agregados menores.

Por otra parte, el fructosa-2,6-P<sub>2</sub>, un potente activador de la fosfofructoquinasa, promueve la agregación de la enzima de hígado de rata y disminuye la disociación de los agregados de alto peso molecular a concentraciones relativamente bajas de enzima (Reinhart, 1983).

Es conveniente destacar que la fosfofructoquinasa cataliza una de las reacciones irreversibles del metabolismo de la glucosa y que en la célula existe una enzima diferente, la fructosa-bisfosfatasa, que cataliza la reacción de conversión de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> en fructosa-6-P. Debido a esto, la acción simultánea de ambas enzimas crearía un ciclo de sustratos cuyo resultado sería la hidrólisis de ATP. Así, la actividad de ambas enzimas debe ser regulada de modo de impedir este ciclo. Generalmente, los efectores descritos anteriormente para la fosfofructo-

quinasa tienen efectos opuestos en la fructosa-bisfosfatasa, vale decir, aquellos que inhiben a la fosfofructoquinasa activan a la fructosa-bisfosfatasa y vice-versa (para revisiones ver Hue, 1981; Tejwani, 1983).

### Fosfofructoquinasas de microorganismos

Las fosfofructoquinasas bacterianas presentan algunas características marcadamente diferentes de aquellas provenientes de organismos eucarióticos. Algunas de ellas son inhibidas por fosfoenolpiruvato en vez de ATP, generalmente son activadas por ADP en vez de AMP y sus subunidades son mucho más pequeñas.

Por ejemplo, la enzima proveniente de C. pasteurianum es un tetrámero de  $M_r$  144.000, compuesto de subunidades idénticas. Esta enzima presenta una función de saturación sigmoidea con respecto a fructosa-6-P y es activada por ADP (Uyeda y Kurooka, 1970). La enzima de F. termophilum también es activada por ADP, pero presenta una curva de saturación hiperbólica con respecto a fructosa-6-P, la que se transforma en sigmoidea a concentraciones inhibitorias de fosfoenolpiruvato (Yoshida y col., 1971; Yoshida, 1972).

En la cepa silvestre de E. coli existen dos fosfofructoquinasas (Fraenkel y col., 1973): Pfk-1 es la isoenzima principal (aproximadamente el 90% de la actividad fosfofructoquinásica total), es codificada por el gen pfkA (Thomson, 1977) y está compuesta de cuatro subunidades iguales ( $M_r$  34.000) (Blangy, Buc y Monod, 1968; Thornburgh y col., 1978; Kotlarz y Buc, 1977; Babul, 1978). Las propiedades de la enzima han sido descritas de acuerdo al modelo de Monod-Wyman-Changeux, el

cual supone una transición concertada entre 2 estados,  $T_4$  y  $R_4$ , los cuales difieren en su afinidad por el sustrato y por los activadores e inhibidores (Blangy y col., 1968). Pfk-1 presenta una cinética altamente cooperativa con respecto a fructosa-6-P ( $n = 3,8$ ) e hiperbólica con respecto al otro sustrato, ATP, cuando el cociente entre el nucleótido y el metal es igual a 1:10. En contraste con lo observado para las fosfofructoquinasas de mamíferos, otros nucleósido-trifosfatos son malos sustratos de la reacción catalizada por Pfk-1 de E. coli. La constante de Michaelis para GTP es dos órdenes de magnitud mayor que la de ATP, en tanto que la de otros nucleótidos es aún mayor. Pfk-1 es activada por ADP, el cual modifica la cooperatividad de la enzima frente a fructosa-6-P. El coeficiente de Hill disminuye desde 3,8 a 1,1 cuando la concentración de ADP aumenta desde 0 a 2 mM. Otros nucleósido-difosfatos también activan la enzima, siendo los más eficientes los purínicos.

Fosfoenolpiruvato actúa como un potente inhibidor de Pfk-1 de E. coli. Los iones  $Mg^{+2}$  son incapaces de revertir la inhibición, lo que indica que este ligando no actúa por acomplejamiento de algún cofactor esencial. Al igual que ADP, PEP disminuye la cooperatividad de Pfk-1 por fructosa 6-P ( $n = 1$ ). Sin embargo, en este caso, la afinidad de la enzima por el sustrato disminuye.

Pfk-2 es la isoenzima minoritaria de E. coli (10% de la actividad fosfofructoquinásica total), es codificada por el gen pfkB (Daldal y Fraenkel, 1981; Daldal, 1983) y está compuesta por subunidades de aproximadamente  $M_r$  36.000 de acuerdo a su movilidad electroforética (Babul, 1978) y de  $M_r$  33.000 según la secuencia de aminoácidos deducida

de la secuencia del gen pfkB (Daldal, 1984). Su estado de agregación (tetrámero o dímero) depende de la concentración de efectores (Kotlarz y Buc, 1977; Kotlarz y Buc, 1981).

La enzima presenta una función de saturación hiperbólica con respecto a ambos sustratos, fructosa-6-P y ATP, y no es activada por ADP o inhibida por fosfoenolpiruvato. A diferencia de Pfk-1, Pfk-2 es parcialmente inhibida por fructosa-1,6-P<sub>2</sub> y puede usar tagatosa-6-P como sustrato (Babul, 1978).

La cantidad de Pfk-2 varía muy poco en distintas condiciones de crecimiento (Kotlarz y col, 1975), pero sus niveles aumentan alrededor de 30 veces a causa de la mutación pfkB1 (Babul, 1978) (Tabla 1). Esta mutación está ubicada en el promotor del gen pfkB y aumenta su transcripción (Daldal, 1983). La función que esta isoenzima desempeña en la célula no se conoce bien. Las mutantes carentes de Pfk-1 crecen bien en azúcares y en sustratos gluconeogénicos si los niveles de Pfk-2 son elevados (Robinson y Fraenkel, 1978). Una mutación cercana, pfkB10, afecta la estabilidad de la enzima y probablemente su estructura. Así, es posible disponer de una cepa con ambas mutaciones, pfkB1 pfkB10 (Tabla 1), que posee altos niveles de una fosfofructoquinasa tipo 2 alterada, la que denominamos Pfk-2\*. Cepas carentes de Pfk-1 y con altos niveles de Pfk-2\* crecen bien en azúcares, pero lentamente en sustratos gluconeogénicos (Daldal y col., 1982).

En nuestro laboratorio se han purificado y caracterizado Pfk-2 y Pfk-2\* en un intento por correlacionar las características cinéticas de ellas, con la diferencia en crecimiento que presentan las cepas que las

Tabla 1

## FOSFOFRUCTOQUINASAS DE LA CEPA SILVESTRE

Y DE MUTANTES DE *Escherichia coli*.

Crecimiento en glucosa y en glicerol.

CEPAS (genotipo relevante)	ENZIMAS	TIEMPOS DE DUPLICACION <sup>a</sup>	
		GLUCOSA	GLICEROL
			min
<u>pfkA</u> <sup>+</sup> <u>pfkB</u> <sup>+</sup> , silvestre	90% Pfk-1 + 10% Pfk-2	58	80
<u>pfkA</u> <sup>-</sup> <u>pfkB</u> <sup>+</sup>	Pfk-2, niveles bajos	250	110
<u>pfkA</u> <sup>-</sup> <u>pfkB1</u>	Pfk-2, niveles altos	80	95
<u>pfkA</u> <sup>-</sup> <u>pfkB1</u> <u>pfkB10</u>	Pfk-2*, niveles altos	60	350

<sup>a</sup>Datos tomados de Daldal y col. (1982).

contienen. Estos estudios contribuyen a determinar el efecto de la mutación estructural pfkB10 en las propiedades cinéticas y reguladoras de Pfk-2 y en las alteraciones fisiológicas provocadas por esta mutación. El estudio de la diferencia estructural entre ambas enzimas forma parte de otro proyecto en realización.

La caracterización cinética preliminar de Pfk-2 y Pfk-2\* mostró que ambas enzimas difieren en algunas de sus propiedades. Entre ellas están: la estabilidad en extractos crudos y purificados, la movilidad cromatográfica en diversos sistemas (DEAE-celulosa, Azul de Cibacron-Sepharose, AMP-Agarose) y en la susceptibilidad a la inhibición por fructosa-1,6-P<sub>2</sub>. Aún más, para Pfk-2 la inhibición por fructosa-1,6-P<sub>2</sub>, cuando se usa fructosa-6-P como sustrato variable, es de tipo competitivo, en tanto que para Pfk-2\* esta inhibición es no competitiva (Daldal y col, 1982), lo que sugiere que las enzimas poseen diferencias estructurales en el sitio activo.

En esta Tesis se presenta un estudio de ambas enzimas que incluye:

a) Dilucidación del mecanismo cinético de la reacción catalizada por Pfk-2 y Pfk-2\* mediante estudios cinéticos en velocidad inicial, de inhibición por los productos y de inhibición de punto muerto, para establecer si la mutación estructural afecta el sitio activo de Pfk-2.

b) Caracterización cinética de Pfk-2 y Pfk-2\* en relación a las distintas especies iónicas de ATP que pueden unirse a la enzima, ya que la reacción ocurre en presencia de nucleótido y metal (MgATP<sup>-2</sup>, ATP<sup>-4</sup>, Mg<sup>+2</sup>). Es posible que la mutación estructural

afecte la unión del nucleótido a Pfk-2 y que se modifiquen sus propiedades reguladoras.

c) Determinación de la velocidad de sedimentación de Pfk-2 y Pfk-2\* en presencia y ausencia de ligandos tales como sustratos, productos e inhibidores, para establecer si la actividad de ambas enzimas se correlaciona con cambios en su estado de agregación.

## MATERIALES Y METODOS

## Preparación de PFK-2 y PFK-2\*

## Fuente de obtención de las enzimas

a) Cepas bacterianas. Las cepas usadas fueron DF903 ( $\Delta$ pfkA pfkB<sup>+</sup>) para Pfk-2 y DF905 ( $\Delta$ pfkA pfkB1 pfkB10) para Pfk-2\*. Las cepas son isogénicas derivadas de la cepa K12 prototrófica Hfr de E. coli llamada también K10. El alelo pfkA está eliminado y por lo tanto estas cepas no poseen fosfofructoquinasa-1. Los alelos para las mutantes pfkB son: pfkB1 (altos niveles de Pfk-2) y pfkB1 pfkB10 (altos niveles de Pfk-2\*). El origen y construcción de las cepas usadas en este trabajo se describe en detalle en Daldal y col. (1982) y Daldal y Fraenkel (1981).

b) Crecimiento de las cepas. Las células empleadas en la purificación de las enzimas se crecieron aeróbicamente, hasta fase estacionaria, en un medio salino que contenía 10 g/litro de Bactotripton, 4 g/litro de extracto de levadura, 4 g/litro de glucosa y 50 mg/litro de uracilo, medio salino 63 (Babul, 1978).

## Purificación de Pfk-2 y Pfk-2\*

El procedimiento usado fue fundamentalmente el descrito por Babul (1978) y Daldal y col. (1982), el cual se modificó reemplazando la etapa final de cromatografía en AMP-Agarose por una etapa de calentamiento a 65° C en presencia de fructosa-6-P y DTT (Kotlarz y Buc, 1981; Retamal y Babul, experimentos no publicados). Aproximadamente 20 g de

células (peso húmedo) se suspendieron en 80 ml de amortiguador fosfato de potasio 20 mM, pH 7,0, que contenía EDTA 1 mM,  $MgCl_2$  5 mM, DTT 1 mM y glicerol 5% (amortiguador A). En la purificación de Pfk-2\* el glicerol se reemplazaba por etanol 5%. Alícuotas de 50 ml de la suspensión de células, se rompieron en un sonicador Sonifier Modelo W 185 (Heat Systems-Ultrasonics, INC.) durante 4 min (posición 8, "probe" grande) a aproximadamente 4° C, con una interrupción de un minuto después de cada minuto de sonicación. Esta suspensión se centrifugó en un centrífuga Beckman modelo L5-50B, durante 90 min a 143.000 g. El líquido sobrenadante se aplicó a una columna de hidroxilapatita (2,7 x 20 cm) equilibrada con amortiguador A. La muestra retenida en la columna se lavaba con un volumen de amortiguador A aproximadamente igual a 8 veces el volumen de la columna (800 ml). La actividad fosfofructoquinásica se eluyó con 800 ml de fosfato de potasio en un gradiente lineal de concentración desde 20 a 150 mM, en amortiguador A.

Las fracciones con actividad fosfofructoquinásica se concentraron por ultrafiltración hasta aproximadamente 15 ml, mediante el uso de una membrana Amicon PM10. La enzima concentrada se dializó contra 3 x 700 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM,  $MgCl_2$  5 mM, EDTA 1mM, DTT 1mM y glicerol 5%, pH 7,6 (amortiguador B), durante 4 h. En la purificación de Pfk-2\* se reemplazó, en el amortiguador B, el glicerol 5% por etanol 5% (v/v).

La enzima dializada se aplicó a una columna de Azul de Cibacron-Sepharose (2,7 x 20 cm) equilibrada con amortiguador B. Después de lavar la columna con un volumen de amortiguador igual a 5 veces el volumen de

la columna, la actividad fosfofructoquinásica se eluyó con ATP (600 ml) en un gradiente lineal de concentración entre 0 y 3 mM. En la purificación de Pfk-2\* se utilizó un gradiente de concentración entre 0 y 2 mM de ATP.

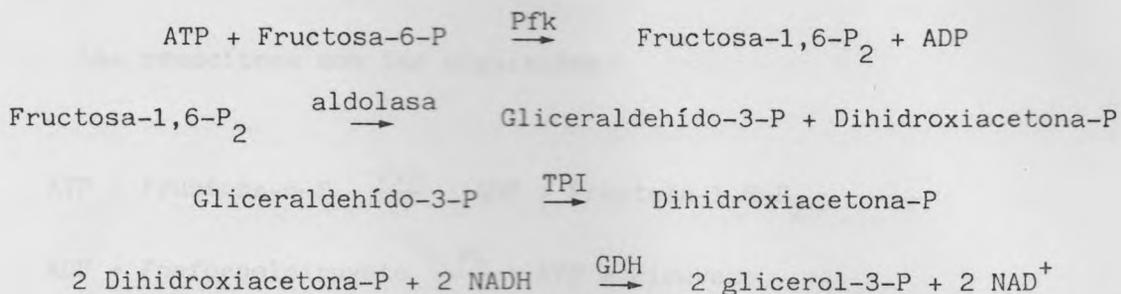
La enzima obtenida de la etapa anterior se concentró por ultrafiltración hasta un volumen de 6-10 ml. Alícuotas de 2 ml se calentaron por 1 min a 65° C en presencia de fructosa-6-P 5 mM y DTT 5 mM. Después de este tratamiento, las alícuotas se juntaron y se centrifugaron a 15.000 rpm por 20 min (rotor SS-34, centrífuga Sorvall RC-2B). La actividad específica de ambas enzimas fue aproximadamente 110 U/mg proteína (actividad específica correspondiente a la enzima pura). La preparación enzimática se guardaba en glicerol 50% a -20° C, condiciones en las cuales la actividad enzimática era estable por varios meses.

#### Determinación de la actividad enzimática.

La actividad de la fosfofructoquinasa se determinaba por medio de dos métodos espectrofotométricos:

##### 1. Ensayo espectrofotométrico para determinar fructosa-1,6-P<sub>2</sub>.

En este ensayo la reacción de la fosfofructoquinasa es acoplada a la oxidación de NADH usando aldolasa, triosafosfato isomerasa (TPI) y  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa (GDH) como sistema auxiliar (Racker, 1947), según el esquema de reacciones que se indica a continuación:



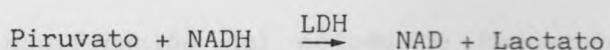
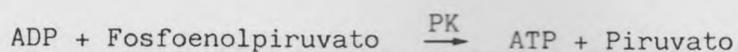
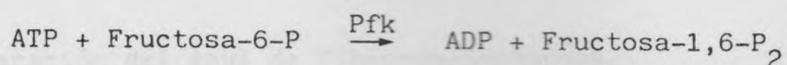
La cuantificación del producto formado por la reacción fosfofructoquinásica se hacía midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH y calculando el número de micromoles de este compuesto que desaparecían. Para esto se utilizó un coeficiente de extinción de  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Kornberg y Pricer, 1951).

La determinación de la actividad enzimática se hacía con una mezcla de reacción que contenía: amortiguador Tris-HCl 100 mM, NADH 0,2 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 mM, fructosa-6-P 1 mM, ATP 1 mM, pH 8,2 y una mezcla de 40  $\mu\text{g}$  de aldolasa, 3  $\mu\text{g}$  de triosafosfato isomerasa y 30  $\mu\text{g}$  de  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa, en un volumen final de 0,5 ml (ensayo estándar). En los experimentos cinéticos descritos más adelante, las concentraciones de fructosa-6-P, ATP y  $\text{MgCl}_2$  se variaron según se indica. La reacción se iniciaba con la adición de la enzima.

## 2. Ensayo espectrofotométrico para determinar ADP.

En este ensayo la producción de ADP formado por la reacción fosfofructoquinásica se seguía a través de la oxidación de NADH en presencia de piruvato-quinasa (PK) y de deshidrogenasa láctica (LDH) como enzimas acoplantes y de fosfoenolpiruvato (Kornberg y Pricer, 1951). Al igual que en el ensayo anterior la cuantificación del producto formado se hacía midiendo espectrofotométricamente el cambio de absorbancia a 340 nm.

Las reacciones son las siguientes:



La mezcla de reacción, sin la enzima, se preincubaba por 3 min para convertir el ADP contaminante en ATP. La mezcla de reacción, en un volumen final de 0,5 ml, contenía: amortiguador Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 10 mM, DTT 1 mM, NH<sub>4</sub>Cl 2 mM, NADH 0,2 mM, fosfoenolpiruvato 0,2 mM, pH 8,2, 20 µg de piruvato-quinasa y 10 µg de deshidrogenasa láctica. La concentración de fructosa-6-P y ATP era variable, según los propósitos del ensayo. La reacción se iniciaba con la adición de la enzima.

En ambos ensayos, la determinación de la actividad enzimática se hacía en un espectrofotómetro Gilford 2400 provisto de aditamentos que permitían trabajar a una temperatura constante de 30° C.

Una unidad de enzima corresponde a la cantidad capaz de fosforilar 1 µmol de sustrato en 1 minuto en las condiciones del ensayo.

#### Material cromatográfico

##### Preparación de la Hidroxilapatita

La preparación de este material se realizó mezclando hidroxilapatita Biogel HTP y celulosa Whatman CF1 en partes iguales (g/g). La mezcla

*Sedimentar*

se suspendía en agua, se dejaba ~~decantar~~ para remover el material fino y luego se suspendía en el amortiguador apropiado.

#### Preparación del Azul de Cibacron-Sepharose.

La preparación de este material cromatográfico se hizo mediante una modificación del método de Rindernecht y col. (1967): 200 ml de Sepharose 4B-200, suspendidos en un volumen final de 500 ml de agua destilada, se mantuvieron con agitación constante a 50° C. A esta suspensión se le agregaron 5 g de Azul de Cibacron F3GA. Durante los próximos 45 minutos se agregaron 100 g totales de sulfato de sodio en varias porciones. Concluido este tiempo, se agregaron 5 g de fosfato trisódico a la mezcla de reacción en pequeñas porciones, continuando con la agitación a 50°C por 75 minutos más. El gel se lavó con agua y con etanol al 5 % hasta que el líquido de lavado fuera incoloro. Después de usado, el material se regeneraba por lavados sucesivos con KCl 2 M, KCl 2 M/urea 6 M, agua destilada y amortiguador.

#### Centrifugación zonal en gradientes de sacarosa

Los gradientes de sacarosa (5 - 20%) se hicieron esencialmente de acuerdo a lo descrito por Martin y Ames (1961). Estos se generaron mediante un aparato Buchler Instruments, el cual consistía de 2 cámaras conectadas en el fondo por una llave de paso. De una de las cámaras salía una manguera, a la que se adosó un capilar que llegaba hasta el fondo del tubo donde se preparaba el gradiente. Esta cámara contaba además con un sistema de agitación regulable, de modo de obtener una buena mezcla con mínima perturbación del menisco.

Las soluciones de sacarosa se preparaban en amortiguador Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,  $MgCl_2$  5 mM, pH 7,6 (amortiguador C) a menos que se indique otra cosa. Además, cuando el caso lo requería, los gradientes se suplementaban con la concentración de ligando indicada en la figura respectiva. Se colocaban 2,3 ml de sacarosa al 5 % en la cámara con agitación y en la otra cámara se colocaba igual volumen de una solución al 20 %; la llave de paso se abría y el extremo del capilar del tubo de salida se colocaba en el fondo de un tubo de centrífuga (Beckman ultraclear TM).

En los experimentos preliminares la producción del gradiente fue verificada agregando Azul de metileno a la solución de sacarosa al 20%, obteniéndose una relación lineal entre absorbancia a 670 nm y el número de fracciones (28 en total). Los gradientes se guardaban a 4° C por aproximadamente 16-18 h antes de usarse.

Las soluciones de Pfk-2 (0,33 mg/ml) y Pfk-2\* (0,12 mg/ml) se dializaban contra el amortiguador C por aproximadamente 3 h. Las soluciones de Pfk-2 o Pfk-2\* dializadas (35  $\mu$ l) se suplementaban con la concentración de efector(es) correspondiente y con un estándar de peso molecular conocido de modo de tener un volumen final de 50  $\mu$ l, las que se colocaban encima del gradiente.

Las muestras se centrifugaban a 40.000 rpm en un rotor Sorvall AH-650 a 4°C por 22 h. Terminado este tiempo, el fondo del tubo se pinchaba con una aguja y se colectaban fracciones de 170  $\mu$ l, a las cuales se les determinaba actividad enzimática. La actividad total recuperada en las fracciones variaba entre 75 y 115% de la actividad

recuperada en las fracciones variaba entre 75 y 115% de la actividad aplicada en cada experimento. En cada gradiente se incluía un marcador de peso molecular, hemoglobina (64.000) o deshidrogenasa láctica (140.000), cuyos pesos moleculares corresponden aproximadamente al dímero y el tetramero de Pfk-2 y Pfk-2\* de E. coli. El coeficiente de sedimentación (S) de las fosfofructoquinasas se calculó de acuerdo a Martin y Ames (1961) por comparación de las distancias recorridas por los estándares de S conocido (hemoglobina, 4,5 S; deshidrogenasa láctica, 7,3 S) con las distancias recorridas por las enzimas.

La actividad de la deshidrogenasa láctica se midió siguiendo el cambio de absorbancia a 340 nm producido por la oxidación del NADH. La mezcla de reacción contenía: amortiguador fosfato 0,1 M, NADH 0,4 mM y piruvato 10 mM, pH 7,0, en un volumen final de 0,5 ml. La hemoglobina se detectó por absorbancia a 406 nm.

#### Cálculo de las concentraciones de $MgATP^{-2}$ , $ATP^{-4}$ y $Mg^{+2}$

Para caracterizar cinéticamente la inhibición de Pfk-2 y Pfk-2\* por ATP, fue necesario calcular, en cada experimento, la concentración de  $MgATP^{-2}$ ,  $ATP^{-4}$  y  $Mg^{+2}$  libre, ya que debido al equilibrio existente entre  $ATP^{-4}$  y  $Mg^{+2}$ , los cambios en la concentración de una especie producen cambios en la concentración de las otras.

Las concentraciones de cada especie se calcularon de acuerdo a la siguiente relación:

$$K_{as} = (MgATP) / (Mg) (ATP) = (MA) / (M) (A)$$

$$= (MA) / (M_{tot} - MA) (A_{tot} - MA)$$

usando una  $K_{as}$  de  $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (Taquikhan y Martell, 1962). MA representa  $\text{MgATP}^{-2}$ ; M,  $\text{Mg}^{+2}$  libre y A,  $\text{ATP}^{-4}$ . La formación de  $\text{HATP}^{-3}$  y  $\text{MgHATP}^{-1}$  fue despreciada ya que sobre pH 8,0 la concentración de estas formas es virtualmente cero (Storer y Cornish-Bowden, 1976). La formación del complejo Mg-fructosa-6-P se consideró despreciable dada la baja constante de estabilidad de este complejo.

#### Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976), usando seroalbúmina bovina como estándar.

#### Determinación de la concentración de los reactivos

La concentración de ATP se determinó espectrofotométricamente siguiendo la reducción de  $\text{NADP}^+$  en presencia de glucosa, hexoquinasa y glucosa-6-P deshidrogenasa. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 80 mM, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM,  $\text{NADP}^+$  0,5 mM, glucosa 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  12 mM, pH 8,0, 0,2 unidades de glucosa-6-P deshidrogenasa y 0,004 unidades de hexoquinasa, en un volumen final de 0,5 ml. La concentración de ATP también se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción de  $15.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 259 nm a pH 7,0

La concentración de ADP se midió espectrofotométricamente usando piruvatoquinasa y deshidrogenasa láctica como enzimas auxiliares, en un sistema similar al descrito anteriormente para la determinación de la actividad fosfofructoquinásica. La concentración de fructosa-6-P y fructosa-1,6- $\text{P}_2$  se determinó espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de NADH en un sistema similar al descrito anteriormente para la

formación de fructosa-1,6-P<sub>2</sub>. En la determinación de fructosa-6-P se usó fosfofructoquinasa comercial de músculo de conejo.

La concentración de cloruro de magnesio se determinó por titulación de los cloruros con nitrato de plata, usando cromato de potasio al 10% como indicador.

### **Análisis estadístico de los resultados**

Los datos obtenidos de experimentos en velocidad inicial se graficaron usando la transformación lineal de Lineweaver y Burk (1934). Las constantes cinéticas se calcularon a partir de las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones obtenidas de las gráficas anteriores. Las curvas se ajustaron a los valores experimentales por medio del método de regresión lineal. Las constantes de inhibición, en los experimentos de inhibición por producto o por análogos de los sustratos, se obtuvieron graficando las pendientes e intersecciones, obtenidas de gráficas de dobles recíprocos, en función de la concentración del inhibidor. Nuevamente, en este caso las curvas fueron ajustadas usando el método de regresión lineal. El tipo de inhibición obtenido fue confirmado usando las transformaciones lineales de Dixon (1953) y Cornish-Bowden (1974).

Para distinguir entre inhibición competitiva y no competitiva, se aplicó el Test de Student a los valores experimentales de las intersecciones de las rectas obtenidas con el eje de la ordenada ( $1/v$ ) en gráficas de dobles recíprocos, según lo descrito por Plapp (1970). La nomenclatura usada es la propuesta por Cleland (1970). Según esta

nomenclatura en el caso de una reacción con dos sustratos y dos productos, A y B representan la concentración del primero y segundo sustrato que se une a la enzima, respectivamente. P y Q representan la concentración del primero y último producto que se libera de la enzima.  $K_a$ ,  $K_b$ ,  $K_p$  y  $K_q$ , representan las constantes de Michaelis para A, B, P, y Q respectivamente.  $K_{ia}$  y  $K_{ib}$  representan constantes de inhibición o disociación.

### Reactivos usados

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. EE. UU.) se obtuvieron los siguientes productos: ATP, ADP, AMP, cAMP, AMP-PNP, CTP, GTP, ITP, UTP, NADH, NADPH, DTT, Tris, fosfoenolpiruvato, glucosa, sorbitol-6-P, ribosa-5-P, glicerol, piruvatoquinasa (músculo de conejo), deshidrogenasa láctica (músculo de conejo), hexoquinasa (levadura, fracción 1), glucosa-6-P deshidrogenasa (levadura, tipo VII), fosfofructoquinasa (músculo de conejo) y Sepharose 4-B-200. KCl,  $MgCl_2$ ,  $NH_4Cl$  y EDTA se obtuvieron de Merck AG (Darmstadt, Alemania Federal). Aldolasa (músculo de conejo), alfa-glicerofosfato deshidrogenasa (músculo de conejo), triosafosfato isomerasa (músculo de conejo), fructosa-6-P y fructosa-1,6-P<sub>2</sub> provenían de Boehringer Mannheim GmbH (Alemania Federal). La hemoglobina se obtuvo de Miles Laboratories Inc., Ill. EE. UU. La hidroxilapatita Bio-gel HTP se obtuvo de BioRad (Richmond, CA. EE. UU.); la celulosa CF1 provenía de Whatman Biochemicals (EE. UU.); Coomassie Brilliant Blue G-250 Serva, fue adquirido por medio de Accurate Chemical & Scientific

Corp. (Hicksville, NY. EE. UU.); Cibacron Blue F3GA fue un producto de Ciba-Geigy (Greensboro, NC. EE. UU.)

## RESULTADOS

## MECANISMO CINETICO

Estudios cinéticos preliminares indicaron que Pfk-2 y Pfk-2\* presentan distinto tipo de inhibición por el producto fructosa-1,6-P<sub>2</sub> cuando se usa fructosa-6-P como sustrato variable (Daldal y col., 1982). Estos resultados sugirieron que ambas enzimas diferían estructuralmente a nivel del sitio activo. Para establecer más claramente esta diferencia, se estudió el orden de interacción de los sustratos y productos con ambas enzimas.

## Estudios cinéticos en velocidad inicial.

Al estudiar la influencia de la concentración de fructosa-6-P (10 a 200  $\mu$ M) sobre la velocidad inicial de Pfk-2 y Pfk-2\*, a una concentración de ATP de 1 mM, se observó que ambas enzimas poseían una función de saturación hiperbólica (resultados no se muestran). Al graficar los resultados de acuerdo a la ecuación de Hill el valor de  $\underline{h}$  obtenido fue aproximadamente igual a 1. Resultados similares ( $\underline{h} = 1$ ) se obtuvieron cuando se estudió la influencia de la concentración de ATP (10 a 200  $\mu$ M) sobre la velocidad de reacción de ambas enzimas a una concentración de fructosa-6-P de 1 mM.

Con estos antecedentes, fue posible entonces aplicar los protocolos habituales usados para la determinación del mecanismo cinético de enzimas que presentan funciones de saturación hiperbólicas.

Para conocer el orden de interacción de los sustratos con Pfk-2 y Pfk-2\*, se estudió el efecto de la variación de la concentración de fructosa-6-P a diferentes concentraciones fijas de ATP, sobre la velocidad de reacción de ambas enzimas. Al graficar el recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración de fructosa-6-P, se obtuvieron líneas rectas que se intersectaron sobre el eje horizontal, como se muestra en las Figuras 1 y 2. Cuando ATP fue el sustrato variable se obtuvieron gráficas del mismo tipo. Tanto para Pfk-2 como para Pfk-2\* las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones en función del recíproco de la concentración de los sustratos fueron lineales (Figuras 3 y 4).

Estos resultados están de acuerdo con un mecanismo en secuencia para ambas enzimas, en el que ambos sustratos se unen a las enzimas antes de la liberación del primer producto y permiten descartar un mecanismo ping-pong.

Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de velocidad inicial para un mecanismo en secuencia al azar en equilibrio rápido u ordenado en régimen estacionario,

$$v = \frac{V A B}{K_{ia} K_b + K_a B + K_b A + A B}$$

donde A representa la concentración de fructosa-6-P para Pfk-2 y ATP para Pfk-2\* y B la concentración de ATP para Pfk-2 y fructosa-6-P para Pfk-2\*;  $K_a$  y  $K_b$  son las constantes respectivas de Michaelis para A y B y  $K_{ia}$  es la constante de disociación del complejo EA, llamada también constante de inhibición para A (Cleland, 1963a).

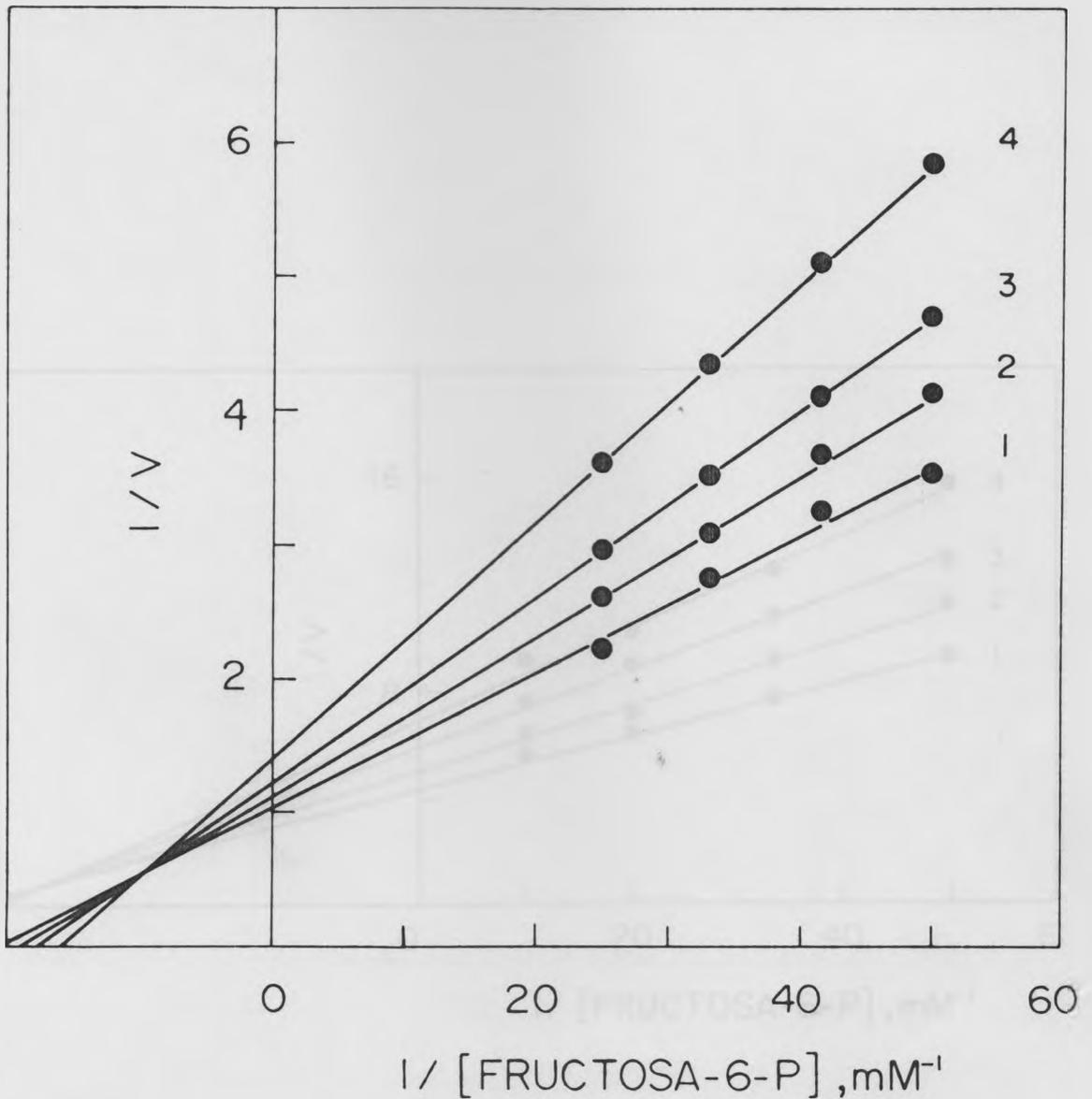


Figura 1. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 donde fructosa-6-P es el sustrato variable, a distintas concentraciones fijas de ATP. Las concentraciones de ATP son: 1, 0,02 mM; 2, 0,03 mM; 3, 0,04 mM; 4, 0,06 mM. La actividad enzimática se midió por la formación de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> según se describe un Materiales y Métodos y se expresa como cambio de  $A_{340}/\text{min ml}/50$ .

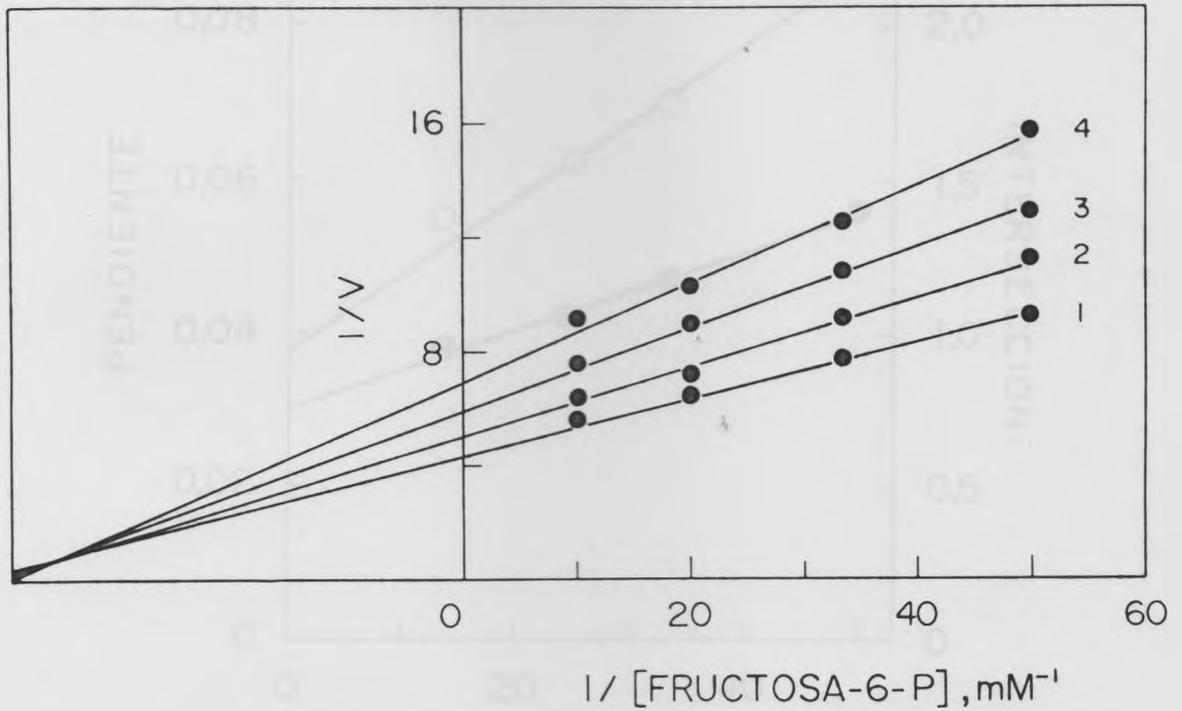


Figura 2. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2\* donde fructosa-6-P es el sustrato variable a distintas concentraciones fijas de ATP. Las concentraciones de ATP son: 1, 0,04 mM; 2, 0,06 mM; 3, 0,10 mM; 4, 0,20 mM. Las otras condiciones son como las descritas en la Figura 1.

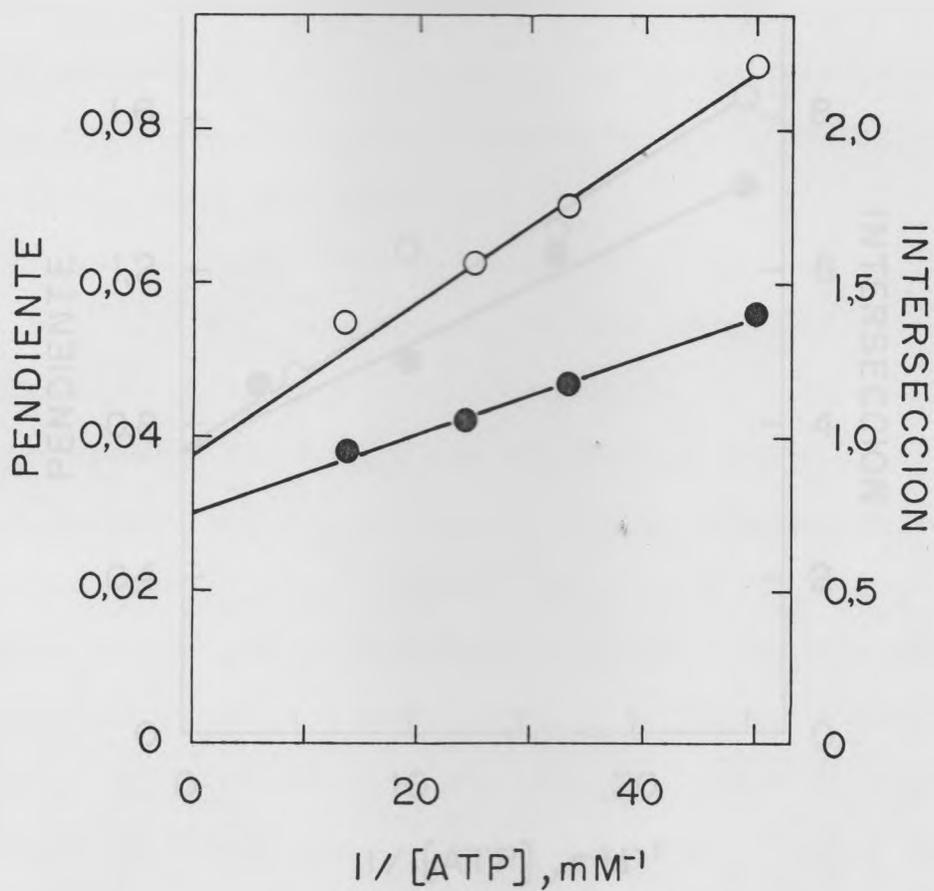


Figura 3. Gráficas secundarias para Pfk-2 obtenidas de los experimentos en velocidad inicial. Los valores de las pendientes (●) e intersecciones (○) se obtuvieron de la Fig. 1.

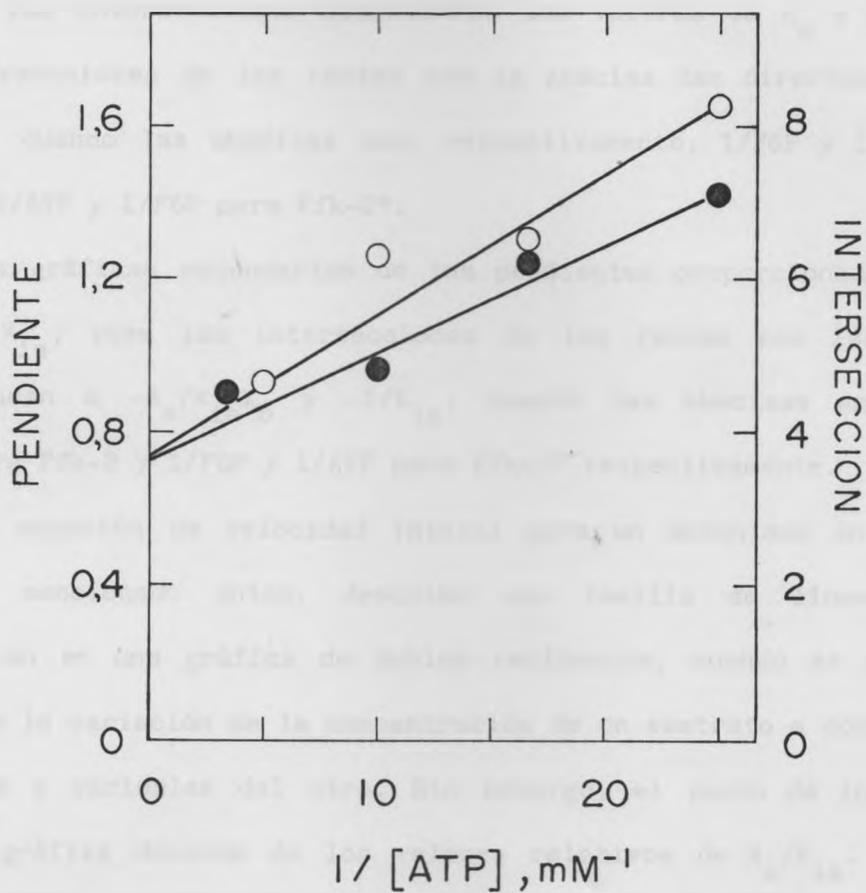


Figura 4. Gráficas secundarias para Pfk-2\* de experimentos en velocidad inicial. Los valores de las pendientes (●) e intersecciones (○) se obtuvieron de la Fig. 2.

Las constantes cinéticas (ver página 34) se obtuvieron a partir de las gráficas secundarias de los valores de las pendientes o de las intersecciones en función de los valores recíprocos de las concentraciones de los sustratos fijos (Tabla 2). Las gráficas secundarias de las intersecciones suministran los valores de  $K_a$  y  $K_b$ , ya que las intersecciones de las rectas con la abscisa dan directamente  $-1/K_a$  y  $-1/K_b$ , cuando las abscisas son, respectivamente,  $1/F6P$  y  $1/ATP$ , para Pfk-2 y  $1/ATP$  y  $1/F6P$  para Pfk-2\*.

Las gráficas secundarias de las pendientes proporcionan los valores de  $K_{ia}$ , pues las intersecciones de las rectas con las abscisas corresponden a  $-K_a/K_{ia}K_b$  y  $-1/K_{ia}$ , cuando las abscisas son  $1/ATP$  y  $1/F6P$  para Pfk-2 y  $1/F6P$  y  $1/ATP$  para Pfk-2\* respectivamente.

La ecuación de velocidad inicial para un mecanismo en secuencia ordenada mencionado antes, describe una familia de líneas que se intersectan en una gráfica de dobles recíprocos, cuando se estudia el efecto de la variación de la concentración de un sustrato a concentraciones fijas y variables del otro. Sin embargo, el punto de intersección en esta gráfica depende de los valores relativos de  $K_a/K_{ia}$ . Si  $K_{ia}$  es muy pequeña comparada con  $K_a$ , la pendiente de la línea recta en la gráfica de dobles recíprocos se hace insensible a cambios en la concentración del cosustrato y la familia de rectas aparece como paralela, aunque el mecanismo sea en secuencia.

Aún cuando en nuestro caso, la familia de rectas obtenidas en gráficas de dobles recíprocos se intersectaban, la adición en secuencia de ambos sustratos, tanto para Pfk-2 como Pfk-2\*, fue confirmada al estudiar la velocidad de reacción de ambas enzimas en función del

Tabla 2

## CONSTANTES CINÉTICAS DE Pfk-2 Y Pfk-2\*

## Estudios de Velocidad Inicial

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

inverso de la concentración de cualesquiera de los dos sustratos, variando fructosa-6-P y ATP en una razón constante (Gulbinsky y Cleland, 1968; Garcés y Cleland, 1969; Tsopanakis y Herries, 1975).

Para un mecanismo en secuencia se debería obtener una parábola según la siguiente ecuación:

$$1/v = x K_{ia} K_b 1/A^2 + (K_a + x K_b) 1/A + 1/V$$

Para un mecanismo ping-pong se debería obtener una línea recta de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$1/v = (K_a + x K_b) 1/A + 1/V$$

Para ambas ecuaciones  $x = A/B$

En el caso de Pfk-2 y Pfk-2\* se obtuvo una relación parabólica entre el recíproco de la velocidad y el recíproco de la concentración de ATP, cuando ATP y fructosa-6-P se variaron en una razón de 1:1 (Figuras 5 y 6)

#### **Análisis de la velocidad inicial en presencia de los productos**

Los experimentos de inhibición son una de las herramientas más útiles en los estudios cinéticos y es poco frecuente que se pueda deducir un mecanismo cinético sin recurrir a ellos. Los inhibidores más importantes son los productos de la reacción, ya que un estudio de

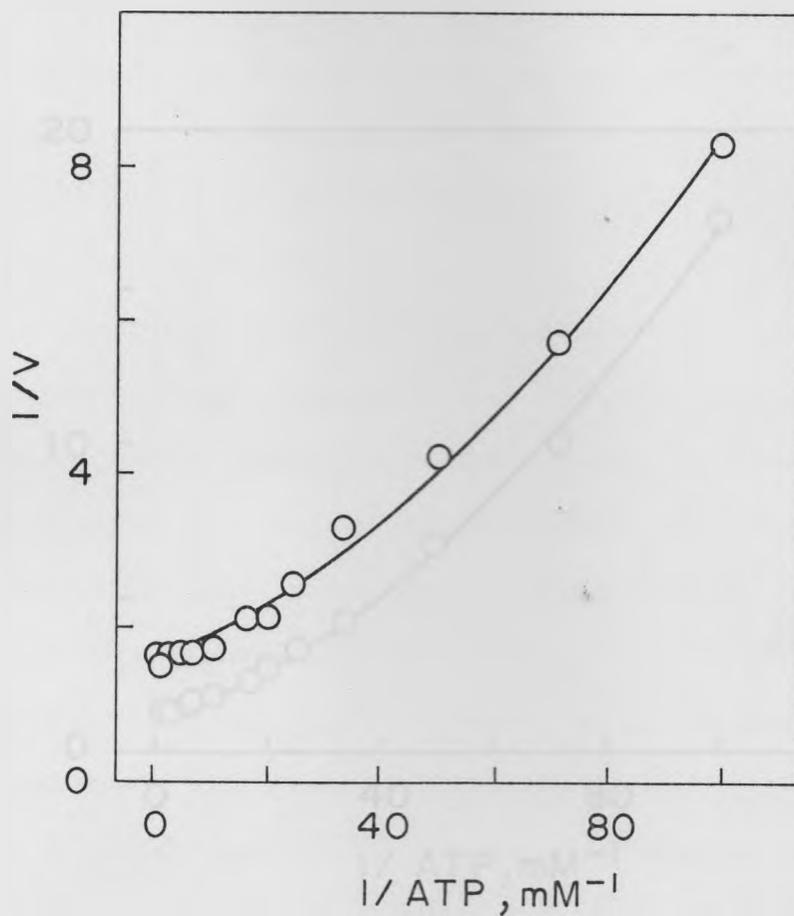


Figura 5. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2 donde las concentraciones de ATP y fructosa-6-P se variaron en una razón constante. La razón entre la concentración de ATP y fructosa-6-P fue 1,0. El intervalo de concentración de ATP usado fue 0,010 - 2,0 mM. La actividad enzimática se expresa como cambio de  $A_{340}/\text{min}/20 \mu\text{l}$ .

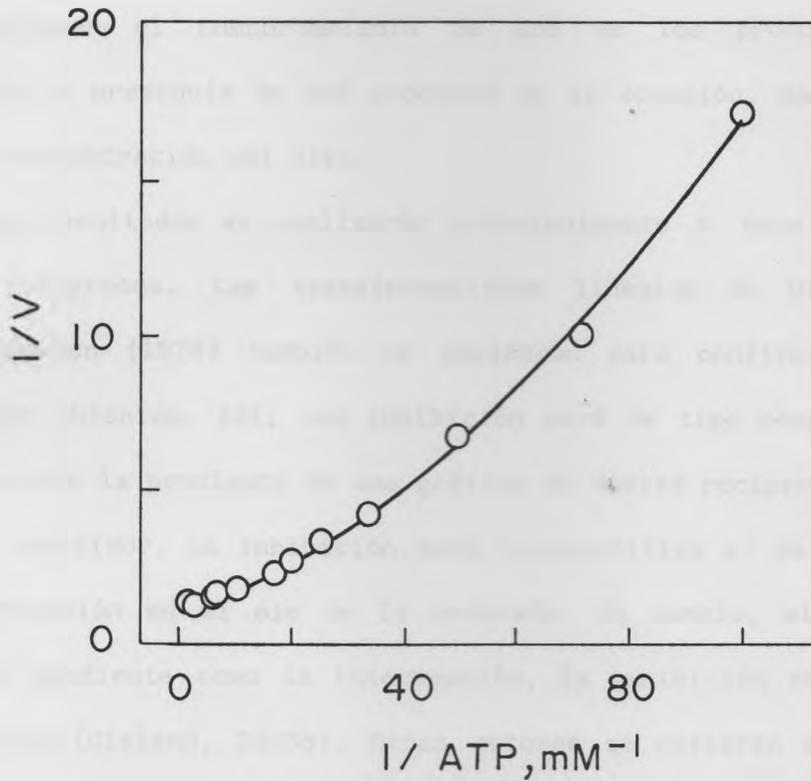


Figura 6. Gráfica de dobles recíprocos para Pfk-2\* donde las concentraciones de ATP y fructosa-6-P se variaron en una razón constante. La razón entre la concentración de ATP y fructosa-6-P fue 1,0. El intervalo de concentración de ATP usado fue 0,010 - 2,0 mM. La actividad enzimática se expresa como cambio de  $A_{340}/\text{min}/25 \mu\text{l}$ .

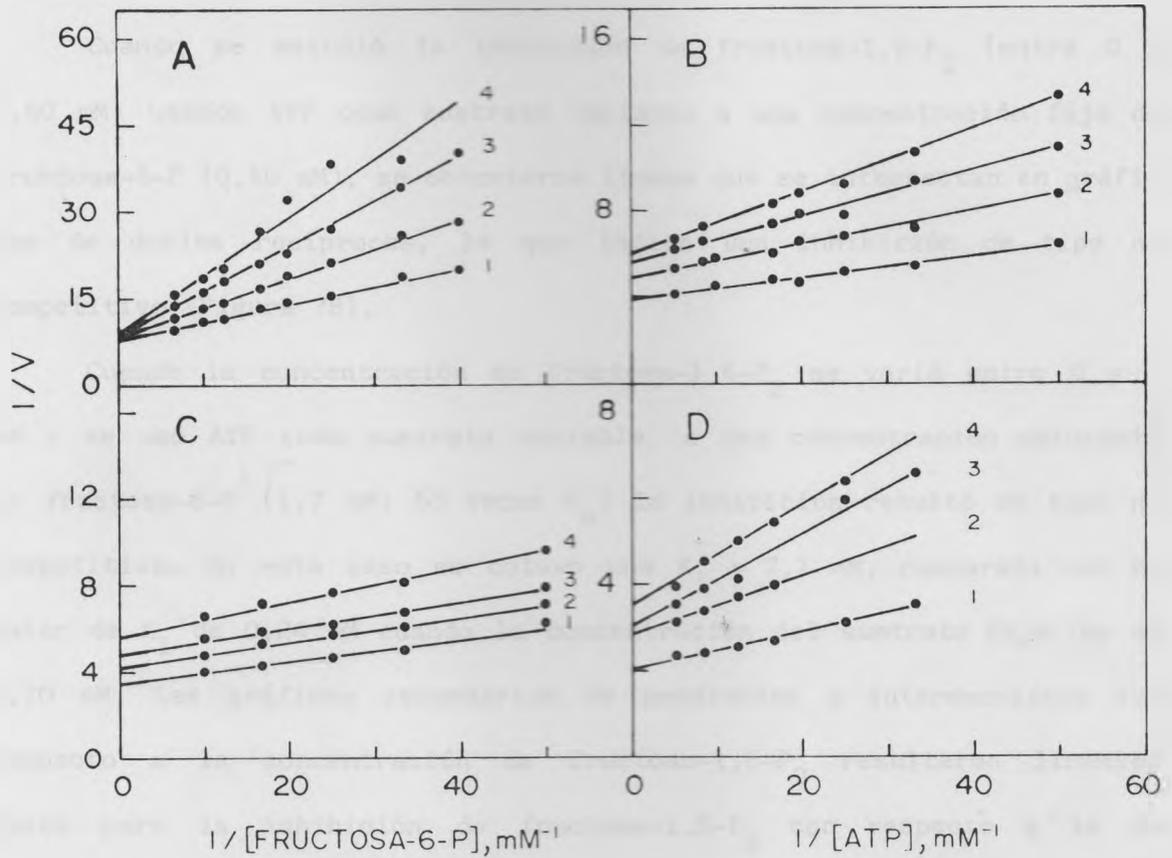
inhibición por producto ayuda a determinar la forma de la ecuación de velocidad. El denominador de la ecuación, que describe la velocidad como función de la concentración de reactantes, poseerá no sólo aquellos términos presentes en la ecuación de velocidad inicial, sino también otros que incluyen las concentraciones de ambos sustratos y productos. Para analizar el comportamiento de uno de los productos solo se considera la presencia de ese producto en la ecuación, haciendo igual a cero la concentración del otro.

Los resultados se analizarán principalmente a base de gráficas de dobles recíprocos. Las transformaciones lineales de Dixon (1953) y Cornish-Bowden (1974) también se emplearon para confirmar el tipo de inhibición obtenido. Así, una inhibición será de tipo competitivo si se modifica sólo la pendiente en una gráfica de dobles recíprocos en presencia del inhibidor. La inhibición será incompetitiva si se modifica sólo la intersección en el eje de la ordenada. En cambio, si se modifican tanto la pendiente como la intersección, la inhibición será de tipo no competitivo (Cleland, 1963b). Otros autores se refieren a este tipo de inhibición como de tipo mixto y limitan el término no competitivo o no competitivo puro para aquellos casos en que las líneas de las gráficas de dobles recíprocos se cruzan en el eje horizontal.

### **Inhibición de Pfk-2 por los productos**

#### **Inhibición por fructosa-1,6-P<sub>2</sub>**

La Figura 7A muestra los resultados de la inhibición producida por fructosa-1,6-P<sub>2</sub> (entre 0 y 0,80 mM) al usar fructosa-6-P como



**Figura 7. Gráficas de dobles recíprocos para las inhibiciones de Pfk-2 por los productos.** A: inhibición por fructosa-1,6-P<sub>2</sub> usando fructosa-6-P como sustrato variable a una concentración fija de ATP de 0,10 mM. Las concentraciones de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> son: 1, 0 mM; 2, 0,2 mM; 3, 0,4 mM; 4, 0,8 mM. B: inhibición por fructosa-1,6-P<sub>2</sub> usando ATP como sustrato variable a una concentración de fructosa-6-P de 0,10 mM. Las concentraciones de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> son: 1, 0 mM; 2, 0,2 mM; 3, 0,4 mM; 4, 0,6 mM. C: inhibición por ADP cuando se usa fructosa-6-P como sustrato variable a una concentración de ATP de 0,1 mM. Las concentraciones de ADP son: 1, 0 mM; 2, 0,5 mM; 3, 1,0 mM; 4, 2,0 mM. D: inhibición por ADP cuando se usa ATP como sustrato variable a una concentración de fructosa-6-P de 0,05 mM. Las concentraciones de ADP son: 1, 0 mm; 2, 1,0 mM; 3, 1,4 mM; 4, 1,9 mM. En A y B la actividad enzimática se determinó a través de la formación de ADP, usando piruvatoquinasa y deshidrogenasa láctica como enzimas auxiliares tal como se describe en Materiales y Métodos.

sustrato variable a una concentración fija de ATP (0,10 mM). Las líneas de las gráficas de dobles recíprocos se intersectan en un punto en la ordenada lo que indica una inhibición de tipo competitivo.

Cuando se estudió la inhibición de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> (entre 0 y 0,60 mM) usando ATP como sustrato variable a una concentración fija de fructosa-6-P (0,10 mM), se obtuvieron líneas que se intersectan en gráficas de dobles recíprocos, lo que indica una inhibición de tipo no competitivo (Figura 7B).

Cuando la concentración de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> se varió entre 0 y 1 mM y se usó ATP como sustrato variable, a una concentración saturante de fructosa-6-P (1,7 mM; 53 veces K<sub>m</sub>) la inhibición resultó de tipo no competitivo. En este caso se obtuvo una K<sub>i</sub> = 7,1 mM, comparada con el valor de K<sub>i</sub> de 0,24 mM cuando la concentración del sustrato fijo fue de 0,10 mM. Las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones con respecto a la concentración de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> resultaron lineales tanto para la inhibición de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a la de fructosa-6-P como para la de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a la de ATP. De estas gráficas se calcularon las constantes de inhibición.

Para un mecanismo en secuencia ordenada la ecuación que describe la velocidad de la reacción en una gráfica de dobles recíprocos, cuando Q está presente y se varía A a diferentes concentraciones fijas de B, es la siguiente:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V} \left( 1 + \frac{K_{ia} K_b}{K_a B} \right) \left( 1 + \frac{Q}{K_{iq}} \right) + \frac{1}{A} + \frac{1}{V} \left( 1 + \frac{K_b}{B} \right)$$

Por otro lado, cuando en presencia de Q se varía la concentración

de B a diferentes concentraciones fijas de A, se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_b}{V} \left( 1 + \frac{K_{ia}}{A} \right) \left( 1 + \frac{Q}{K_{iq} \left( 1 + A/K_{ia} \right)} \right) \frac{1}{B} +$$

$$\frac{1}{V} \left( 1 + \frac{K_a}{A} \right) \left( 1 + \frac{Q}{K_{iq} \left( 1 + A/K_a \right)} \right)$$

De las ecuaciones anteriores es posible deducir el tipo de inhibición por producto. Así, cuando el sustrato variable es A, el producto Q afecta sólo la pendiente de las rectas obtenidas, indicando una inhibición de tipo competitivo. Por otro lado, cuando el sustrato variado es B, el producto Q afecta tanto la pendiente como la intersección de las rectas, mostrando una inhibición de tipo no competitivo.

En un mecanismo en secuencia ordenada, la gráfica secundaria de pendientes en función de la concentración de Q, cuando A es el sustrato variable, muestra una línea recta de la cual se obtiene la constante de inhibición aparente  $K_{is} = K_{iq}$  para todas las concentraciones de B. Al hacer el mismo análisis cuando B es el sustrato variable, se obtiene que  $K_{is} = K_{iq} \left( 1 + A/K_{ia} \right)$

Al graficar las intersecciones de las rectas con la abscisa, obtenidas de las gráficas de dobles recíprocos para la inhibición de Q con respecto a B, en función de la concentración de Q, se obtiene una constante de inhibición aparente  $K_{ii}$  dada por  $K_{ii} = K_{iq} \left( 1 + A/K_a \right)$ .

Las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones con respec-

to a la concentración de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> resultaron lineales tanto para la inhibición de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a fructosa-6-P como para la de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a la de ATP. De estas gráficas se calcularon las constantes de inhibición.

#### Inhibición por ADP

Cuando se estudió el efecto inhibitorio de ADP, el otro producto de la reacción, con respecto a la concentración de fructosa-6-P, se obtuvo una inhibición de tipo no competitivo (Figura 7C). El mismo tipo de inhibición se obtuvo al estudiar el efecto de la concentración de ADP sobre la velocidad de la reacción, al variar ATP entre 0,03 y 0,20 mM, a una concentración fija de fructosa-6-P de 0,05 mM (Figura 7D).

Cuando el experimento se realizó a una concentración saturante de fructosa-6-P de 1,0 mM, la inhibición también fue no competitiva (no se muestra).

Para un mecanismo en secuencia ordenada la ecuación de dobles recíprocos para la inhibición de P cuando se varía A es:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_a}{V} \left( 1 + \frac{K_{ia} K_b}{K_a B} \right) \left( 1 + \frac{P}{\frac{K_p K_{iq}}{K_q} \left( 1 + \frac{K_a B}{K_{ia} K_b} \right)} \right) \frac{1}{A} +$$

$$\frac{1}{V} \left( 1 + \frac{K_b}{B} \right) \left( 1 + \frac{P}{\frac{1 + K_b/B}{1/K_{ip} + K_q K_b / K_p K_{iq}} B} \right)$$

De la ecuación puede verse que P actúa como un inhibidor no competitivo con respecto a A, a una concentración de B no saturante. De

las gráficas secundarias de pendientes en función de la concentración de P se obtiene una  $K_{is} = K_{iq} K_p / K_q (1 + K_a B / K_{ia} K_b)$  de la intersección de la recta con el eje de la abscisa. Por otra parte, de las gráficas secundarias de intersecciones versus la concentración del producto inhibitor, se obtiene una

$$K_{ii} = \frac{K_{ip} (1 + K_b/B)}{(1 + K_q K_b K_{ip} / K_{iq} K_b)}$$

Cuando B es el sustrato variable la ecuación es:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_b}{V} \left( 1 + \frac{K_{ia}}{A} \right) \left( 1 + \frac{P}{(K_p K_{iq} / K_q)} \right) \frac{1}{B} +$$

$$\frac{1}{V} \left( 1 + \frac{K_a}{A} \right) \left( 1 + \frac{P}{K_{ip} (1 + K_a/A)} \right)$$

en este caso, P se comporta como un inhibidor no competitivo con respecto a B para todas las concentraciones de A. La constante de inhibición obtenida de las gráficas secundarias de pendientes versus la concentración de P es  $K_p K_{iq} / K_{iq}$ . Por otra parte, de la gráfica secundaria de intersecciones versus la concentración de producto se obtendrá una  $K_{ii} = K_{ip} (1 + K_a/A)$ .

Las constantes de inhibición obtenidas de los experimentos de inhibición por los productos se incluyen en la Tabla 3.

Tabla 3

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

INHIBIDOR	SUSTRATO VARIABLE	INHIBICIÓN <sup>a</sup>	$K_{is}$ mM	$K_{ii}$
FDP	F6P	C	0,24	-
FDP	ATP	NC	0,27	1,2
ADP	ATP	NC	1,0	2,8
ADP	F6P	NC	3,6	3,2

<sup>a</sup>C, competitiva; NC, no competitiva.

## Inhibición de Pfk-2\* por los productos

### Inhibición por ADP

Para averiguar el efecto inhibitorio de ADP con respecto a ATP, su concentración se varió entre 0 y 2 mM, mientras que la de ATP se varió entre 0,03 y 0,20 mM. La concentración de fructosa-6-P se mantuvo fija en 0,05 mM (2,2 veces  $K_m$ ). En una gráfica del recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración de ATP, a diferentes concentraciones del inhibidor, se obtuvieron líneas rectas que se intersectaron en un punto en el eje de la ordenada, indicando una inhibición competitiva (Figura 8A). El mismo tipo de inhibición se obtuvo cuando la concentración del sustrato fijo, fructosa-6-P, fue de 1 mM (no se muestra).

La inhibición de ADP versus fructosa-6-P resultó de tipo no competitivo (Figura 8B). En este caso la concentración de fructosa-6-P se varió entre 0,02 y 0,10 mM, a distintas concentraciones del inhibidor (0 - 1,5 mM) y a una concentración fija de ATP de 0,08 mM. Aunque la inhibición de ADP versus fructosa-6-P aparece como incompetitiva en gráficas de dobles recíprocos, el carácter no competitivo de ella fue confirmado mediante las transformaciones lineales de Dixon (1953) y Cornish-Bowden (1974) (no se muestran).

### Inhibición por fructosa-1,6-P<sub>2</sub>

En la Figura 8D se muestran los resultados de la inhibición producida por fructosa-1,6-P<sub>2</sub>, al usar fructosa-6-P como sustrato variable. En esta gráfica las rectas se intersectan a la izquierda del eje

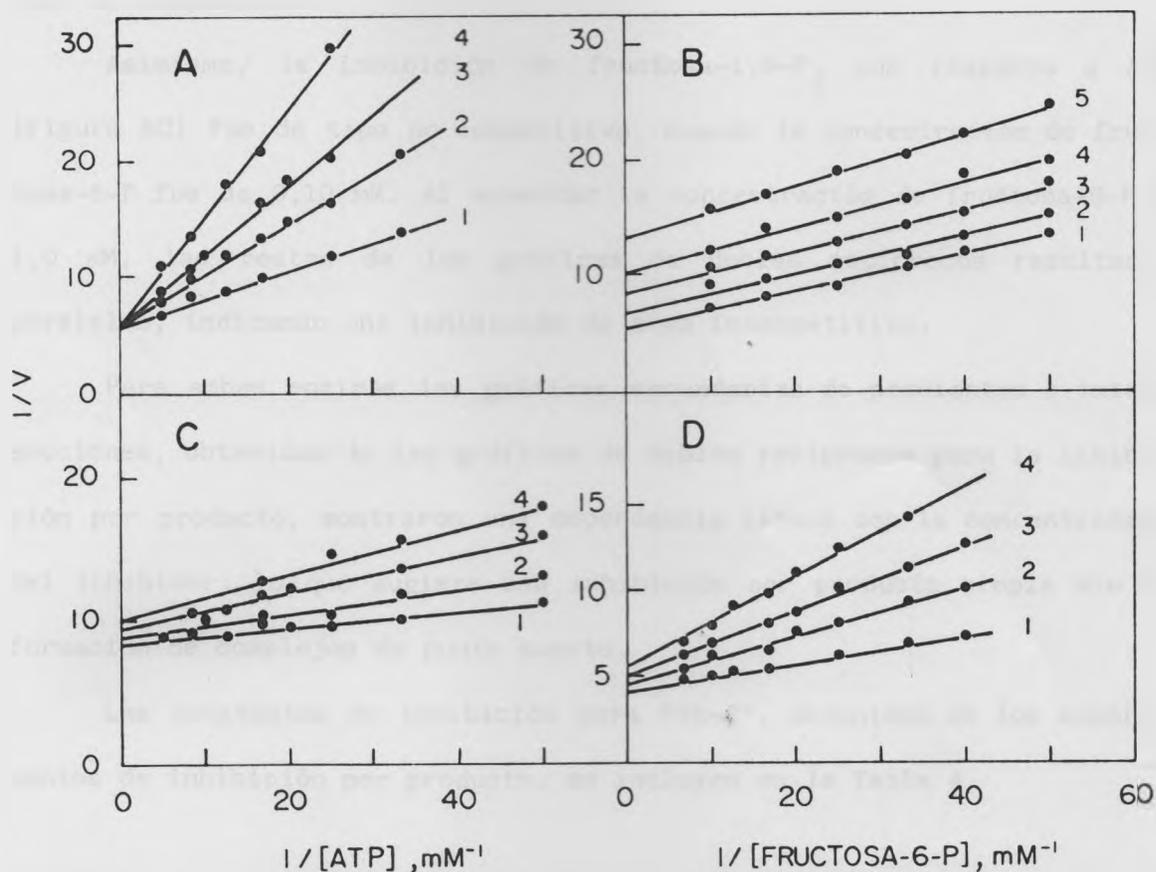


Figura 8. Gráficas de dobles recíprocos para las inhibiciones de Pfk-2\* por los productos. A: inhibición por ADP usando ATP como sustrato variable a una concentración fija de fructosa-6-P de 0,05 mM. Las concentraciones de ADP son: 1, 0 mM; 2, 0,5 mM; 3, 1,0 mM; 4, 2,0 mM. B: inhibición por ADP usando fructosa-6-P como sustrato variable a una concentración fija de ATP de 0,08 mM. Las concentraciones de ADP son: 1, 0 mM; 2, 0,2 mM; 3, 0,5 mM; 4, 1,0 mM; 5, 1,5 mM. C: inhibición por fructosa-1,6-P<sub>2</sub> cuando se usa ATP como sustrato variable a una concentración de fructosa-6-P de 0,10 mM. Las concentraciones de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> son: 1, 0 mM; 2, 0,2 mM; 3, 0,4 mM; 4, 0,8 mM. D: inhibición por fructosa-1,6-P<sub>2</sub> cuando se usa fructosa-6-P como sustrato variable a una concentración de ATP de 0,10 mM. Las concentraciones de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> son: 1, 0 mM; 2, 0,2 mM; 3, 0,4 mM; 4, 0,6 mM. En C y D la actividad enzimática se midió a través de la formación de ADP usando piruvatoquinasa y deshidrogenasa láctica como enzimas auxiliares, tal como se describe en Materiales y Métodos.

de la ordenada y por encima de la abscisa, indicando una inhibición de tipo no competitivo.

Asimismo, la inhibición de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a ATP (Figura 8C) fue de tipo no competitivo, cuando la concentración de fructosa-6-P fue de 0,10 mM. Al aumentar la concentración de fructosa-6-P a 1,0 mM, las rectas de las gráficas de dobles recíprocos resultaron paralelas, indicando una inhibición de tipo incompetitivo.

Para ambas enzimas las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones, obtenidas de las gráficas de dobles recíprocos para la inhibición por producto, mostraron una dependencia lineal con la concentración del inhibidor, lo que sugiere una inhibición por producto simple sin la formación de complejos de punto muerto.

Las constantes de inhibición para Pfk-2\*, obtenidas de los experimentos de inhibición por producto, se incluyen en la Tabla 4.

#### **Inhibición por análogos de los sustratos**

Los estudios en velocidad inicial descritos anteriormente sugieren un mecanismo en secuencia ordenada Bi-Bi, tanto para Pfk-2 como para Pfk-2\*. Por otra parte, los estudios de inhibición por producto para Pfk-2 muestran una sola inhibición de tipo competitivo, la de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> versus fructosa-6-P, lo que sugiere un mecanismo en secuencia con un orden estricto de adición de los sustratos a la enzima en el que fructosa-6-P sería el primer sustrato. En cambio, para Pfk-2\* los resultados obtenidos tanto de experimentos en velocidad inicial como de inhibición por producto, están de acuerdo con un mecanismo en secuencia

Tabla 4

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

INHIBIDOR	SUSTRATO VARIABLE	INHIBICIÓN <sup>a</sup>	$K_{is}$ mM	$K_{ii}$
FDP	F6P	NC	0,22	2,2
FDP	ATP	NC	0,44	3,8
ADP	ATP	C	0,72	-
ADP	F6P	NC	4,1	1,1

<sup>a</sup>C, competitiva; NC, no competitiva.

ordenada Bi-Bi en el cual ATP sería el primer sustrato que se une a la enzima y ADP el último producto que se libera.

Los estudios de inhibición por análogos de sustratos han sido muy útiles para confirmar un determinado mecanismo cinético (Cleland, 1970), de modo que los resultados anteriores se apoyaron con estudios de este tipo.

Un inhibidor se caracteriza por disminuir la velocidad de la reacción, pues al unirse a la enzima disminuye el número de especies productivas presentes mientras ocurre la reacción. Un inhibidor de punto muerto es aquel que sin ser sustrato o producto de la reacción, es capaz de formar complejos reversibles con una o más formas de enzima. Estos complejos se denominan complejos abortivos, ya que no participan en la reacción y sólo pueden disociarse en  $E' + I$ , donde  $E'$  representa cualquier forma de enzima e  $I$  representa al inhibidor.

Para un mecanismo en secuencia ordenada se obtiene inhibición competitiva con respecto al sustrato variable, cuando el inhibidor es capaz de combinarse sólo con la enzima libre, es decir, con la misma especie que se combina con el sustrato. En presencia del inhibidor la ecuación de velocidad tiene la siguiente forma:

$$v = \frac{V A B}{K_{ia} K_b (1 + I/K_i) + K_b A + K_a B (1 + I/K_i) + A B}$$

donde  $K_i = E I/EI$

Cuando  $A$  es el sustrato variable,  $B$  es mantenido constante y  $K_i$  es la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor, la ecua-

ción de velocidad es:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K_b/B}{V} + \frac{(1 + I/K_i)(K_{ia}K_b + K_a B)}{V E A}$$

Una gráfica de  $1/v$  en función de  $1/A$ , a distintas concentraciones fijas de  $I$ , mostrará una serie de líneas rectas que convergen en un punto en la ordenada, pues sólo el término de la pendiente contiene  $I$ . Al hacer una gráfica de las pendientes en función de la concentración del inhibidor, se obtendrá una línea recta cuyo valor en la intersección con la abscisa  $I$  será  $K_i$ .

Si  $I$  se combina con la enzima libre, como en el caso anterior, pero ahora  $B$  es el sustrato variable, se obtiene la siguiente ecuación de velocidad:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K_a}{V} \frac{(1 + I/K_i)/A}{V} + \frac{(1 + K_i)(K_{ia}K_b) + K_b A}{V A} \frac{1}{B}$$

En este caso, tanto el valor de la pendiente como el de la intersección está afectado por la presencia del inhibidor, de modo que en una gráfica de dobles recíprocos se obtendrán líneas que se intersecan.

Las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones versus la concentración del inhibidor darán una línea recta de cuya intersección con la abscisa se obtienen los valores de  $K_{is}$  y  $K_{ii}$ , respectivamente:

$$K_{is} = K_i (1 + A/K_{ia}) \quad \text{y} \quad K_{ii} = K_i (1 + A/K_a)$$

Si el inhibidor se une a la forma de enzima EA, como lo hace B en un mecanismo en secuencia ordenada, y no a la enzima libre, la ecuación de velocidad, cuando B es el sustrato que se varía será:

$$\frac{1}{v} = \frac{(1 + K_a/A)}{V} + \frac{K_{ia} K_b + K_b A (1 + I/K_i)}{V A} \frac{1}{B}$$

En esta ecuación solo el término de la pendiente contiene I, por lo tanto la inhibición será de tipo competitivo (varía solo la pendiente). El valor de  $K_{is}$  obtenido de la gráfica de pendientes en función de la concentración del inhibidor será  $K_i (1 + K_{ia} / A)$ .

Si continuamos analizando el caso anterior, en que el inhibidor se une solo a EA, pero ahora A es el sustrato variable, se tiene la siguiente ecuación de velocidad:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K_b (1 + I/K_i)/B}{V} + \frac{K_{ia} K_b + K_a B}{V B} \frac{1}{A}$$

Aquí solo el término de la intersección está afectado por la concentración del inhibidor, de modo que la gráfica del recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración de A mostrará una serie de líneas paralelas, indicando una inhibición incompetitiva. La gráfica de intersecciones versus la concentración de I dará una línea recta que intersectará a la abscisa en  $I = K_{ii} = K_i (1 + B / K_b)$ .

Para un mecanismo en secuencia al azar en equilibrio rápido la inhibición de un inhibidor competitivo, respecto a cualesquiera de los sustratos, será de tipo no competitivo respecto al otro sustrato.

De este modo, a través del análisis de inhibidores de punto

muerto se puede obtener información para inferir el orden de interacción de los sustratos con la enzima, esto es, para diferenciar entre un mecanismo en secuencia ordenada y uno en secuencia al azar en equilibrio rápido.

#### Inhibición de Pfk-2 por ribosa-5-P

Se estudió el efecto inhibitorio de ribosa-5-P usando fructosa-6-P como sustrato variable, a una concentración fija de ATP de 0,10 mM. Al graficar el recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración de fructosa-6-P, a diferentes concentraciones fijas del inhibidor (0; 5,0 y 10,0 mM) se obtuvo una serie de líneas rectas que se intersectaron en el eje de la ordenada, indicando una inhibición de tipo competitivo (Figura 9A). Cuando ATP fue el sustrato variable, a una concentración de fructosa-6-P de 0,05 mM y a varias concentraciones fijas de ribosa-5-P (0; 5,0 y 10,0 mM), la inhibición resultó de tipo no competitivo (Figura 9B). Las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones versus la concentración de inhibidor resultaron lineales, lo que descarta la interacción de ribosa-5-P en el sitio de unión del ATP.

Estos resultados son compatibles con un mecanismo en secuencia ordenada en el que fructosa-6-P es el primer sustrato que se une a la enzima, o con uno en secuencia al azar en equilibrio rápido. Sin embargo, este último mecanismo no está apoyado por los estudios de inhibición por producto, presentados anteriormente.

#### Inhibición de Pfk-2 por AMP-PNP

AMP-PNP es un análogo de ATP en el cual un grupo NH reemplaza al

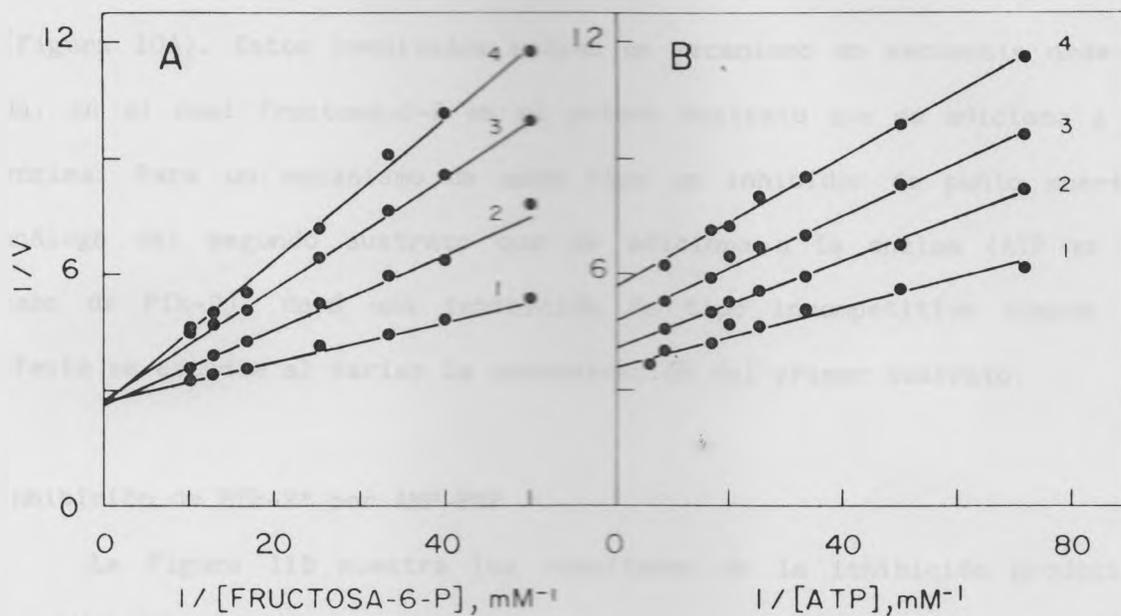


Figura 9. Gráficas de dobles recíprocos para la inhibición de punto muerto de Pfk-2 por ribosa-5-P. A: inhibición por ribosa-5-P usando fructosa-6-P como sustrato variable a una concentración de ATP de 0,10 mM. Las concentraciones de ribosa-5-P son: 1, 0 mM; 2, 5,0 mM; 3, 10 mM; 4, 15 mM. B: inhibición por ribosa-5-P usando ATP como sustrato variable a una concentración de fructosa-6-P de 0,05 mM. Las concentraciones de ribosa-5-P son las mismas que en A.

puente de oxígeno existente entre el fosfato B y el fosfato  $\gamma$  del ATP (Yount y col. 1971a). Este compuesto resultó ser un inhibidor competitivo de ATP (Figura 10B).

Al estudiar el efecto inhibitorio de AMP-PNP usando fructosa-6-P como sustrato variable, se obtuvieron rectas paralelas en gráficas de dobles recíprocos, lo que indica una inhibición de tipo incompetitivo (Figura 10A). Estos resultados apoyan un mecanismo en secuencia ordenada, en el cual fructosa-6-P es el primer sustrato que se adiciona a la enzima. Para un mecanismo de este tipo un inhibidor de punto muerto, análogo del segundo sustrato que se adiciona a la enzima (ATP en el caso de Pfk-2), dará una inhibición de tipo incompetitivo cuando su efecto se estudie al variar la concentración del primer sustrato.

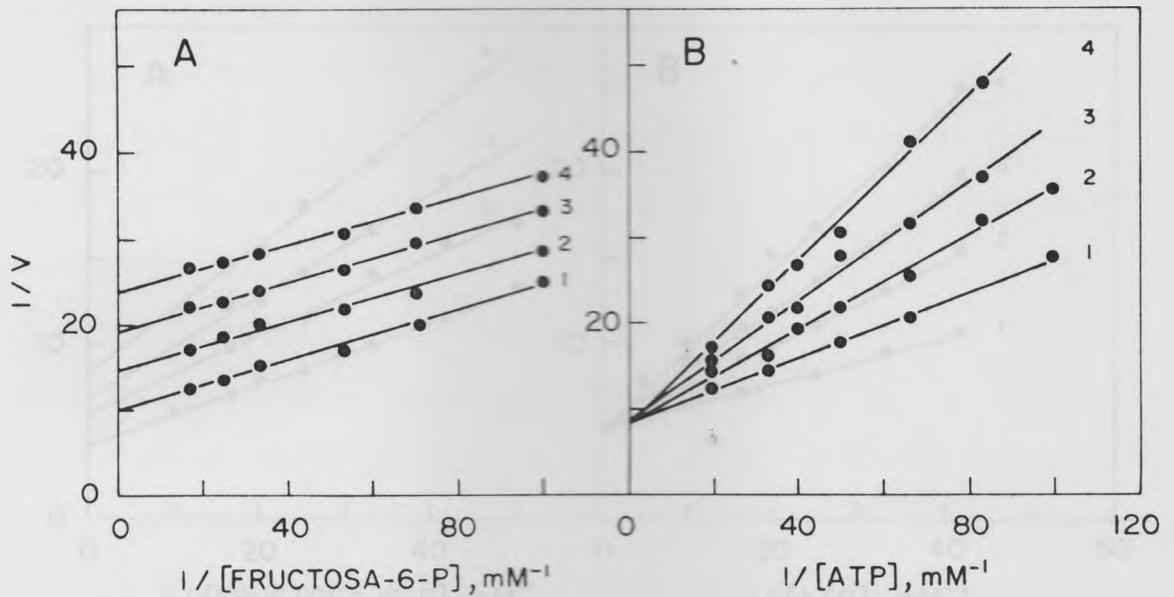
#### Inhibición de Pfk-2\* por AMP-PNP

La Figura 11B muestra los resultados de la inhibición producida por AMP-PNP, al usar ATP como sustrato variable a una concentración fija de fructosa-6-P de 0,10 mM. Las rectas de las gráficas de dobles recíprocos se intersectan en la ordenada, indicando una inhibición competitiva.

La inhibición de AMP-PNP con respecto a fructosa-6-P fue de tipo no competitivo (Figura 11A). En esta ocasión la concentración de fructosa-6-P se varió entre 0,02 y 0,10 mM a concentraciones de inhibidor iguales a 0; 0,4; 0,6 y 0,8 mM.

#### Inhibición de Pfk-2\* por sorbitol-6-P

Para Pfk-2\* ribosa-5-P resultó ser un inhibidor no competitivo



**Figura 10.** Gráficas de dobles recíprocos para la inhibición de punto muerto de Pfk-2 por AMP-PNP. A: inhibición por AMP-PNP cuando se usa fructosa-6-P como sustrato variable a una concentración fija de ATP de 0,05 mM. Las concentraciones de AMP-PNP son: 1, 0 mM; 2, 0,2 mM; 3, 0,4 mM; 4, 0,6 mM. B: inhibición por AMP-PNP cuando se usa ATP como sustrato variable a una concentración fija de fructosa-6-P de 0,10 mM. Las concentraciones de AMP-PNP son 1, 0 mM; 2, 0,2 mM; 3, 0,3 mM; 4, 0,4 mM.

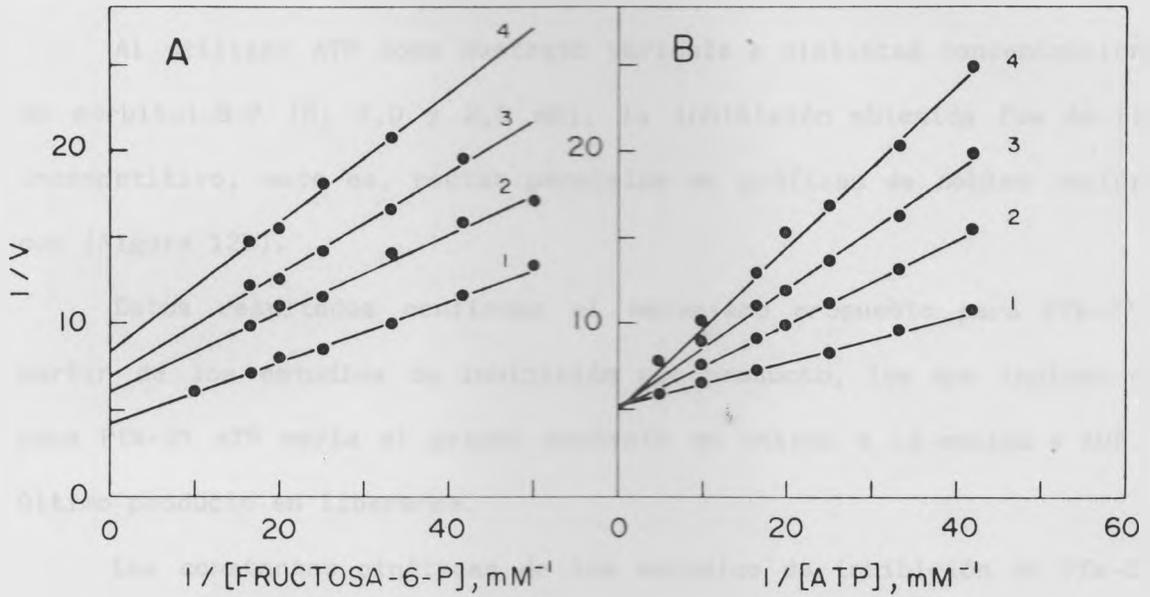


Figura 11. Gráficas de dobles recíprocos para la inhibición de punto muerto de Pfk-2\* por AMP-PNP. A: inhibición por AMP-PNP cuando se usa fructosa-6-P como sustrato variable a una concentración de ATP de 0,10 mM. Las concentraciones de AMP-PNP son: 1, 0 mM; 2, 0,4 mM; 3, 0,6 mM; 4, 0,8 mM. B: inhibición por AMP-PNP cuando se usa ATP como sustrato variable a una concentración de fructosa-6-P de 0,10 mM. Las concentraciones de AMP-PNP son: 1, 0 mM; 2, 0,2 mM; 3, 0,4 mM; 4, 0,6 mM.

con respecto a fructosa-6-P, de modo que no se pudo usar como análogo de este sustrato (no se muestra). En cambio, sorbitol-6-P se comportó como un inhibidor competitivo (Figura 12A). La concentración de fructosa-6-P se varió entre 0,02 mM y 0,10 mM, a distintas concentraciones fijas de sorbitol-6-P (0; 1,0 y 2,0 mM). La concentración de ATP se mantuvo constante en 0,10 mM.

Al utilizar ATP como sustrato variable a distintas concentraciones de sorbitol-6-P (0; 1,0 y 2,0 mM), la inhibición obtenida fue de tipo incompetitivo, esto es, rectas paralelas en gráficas de dobles recíprocos (Figura 12B).

Estos resultados confirman el mecanismo propuesto para Pfk-2\* a partir de los estudios de inhibición por producto, los que indican que para Pfk-2\* ATP sería el primer sustrato en unirse a la enzima y ADP el último producto en liberarse.

Las constantes cinéticas de los estudios de inhibición de Pfk-2 y Pfk-2\* obtenidas con análogos de los sustratos se resumen en la Tabla 5 y en la Tabla 6, respectivamente.

#### EFECTO DE ATP SOBRE LA ACTIVIDAD

El análisis cinético de enzimas que catalizan reacciones donde participan nucleótidos se complica debido a la multiplicidad de especies que pueden unirse a la enzima. Usualmente la reacción ocurre en presencia de iones  $Mg^{+2}$ , los que se unen al sitio catalítico de las enzimas como complejos metal-nucleótido. Además, el metal puede unirse

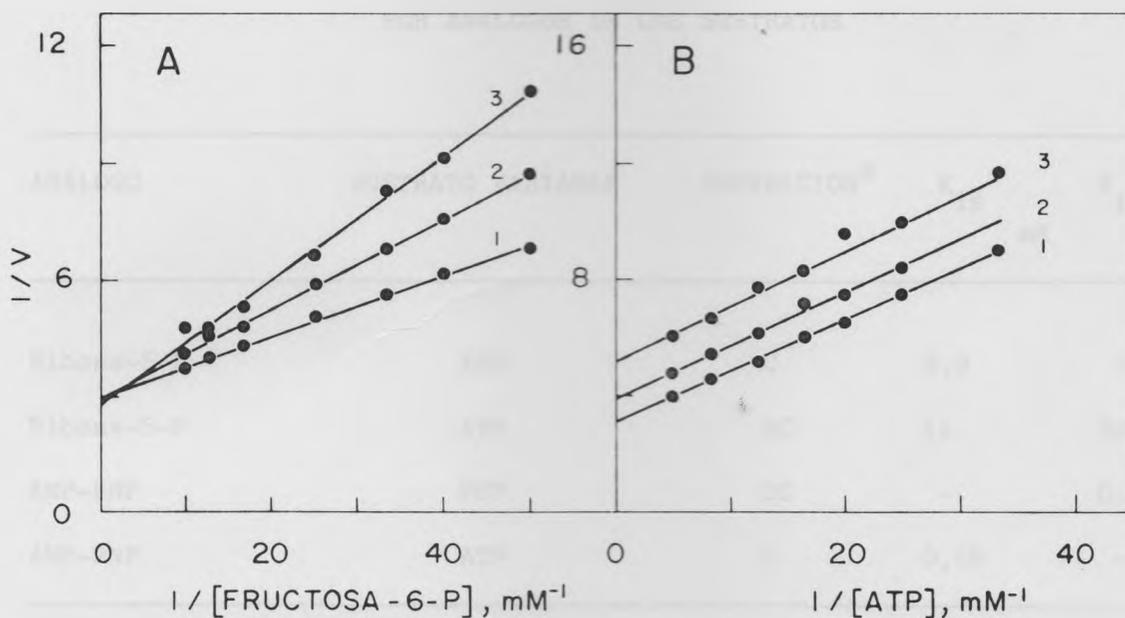


Figura 12. Gráficas de dobles recíprocos para la inhibición de punto muerto de Pfk-2\* por sorbitol-6-P. A: inhibición por sorbitol-6-P al usar fructosa-6-P como sustrato variable a una concentración de ATP de 0,10 mM. Las concentraciones de sorbitol-6-P son: 1, 0 mM; 2, 1,0 mM; 3, 2,0 mM. B: inhibición por sorbitol-6-P al usar ATP como sustrato variable a una concentración de fructosa-6-P de 0,10 mM. Las concentraciones de sorbitol-6-P son las mismas que en A.

Tabla 5

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

ANALOGO	SUSTRATO VARIABLE	INHIBICION <sup>a</sup>	$K_{is}$ mM	$K_{ii}$
Ribosa-5-P	F6P	C	5,3	-
Ribosa-5-P	ATP	NC	11	22
AMP-PNP	F6P	IC	-	0,43
AMP-PNP	ATP	C	0,25	-

<sup>a</sup>C, competitiva; NC, no competitiva; IC, incompetitiva.

Tabla 6

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

ANALOGO	SUSTRATO VARIABLE	INHIBICION <sup>a</sup>	$K_{is}$ mM	$K_{ii}$
Sorbitol-6-P	F6P	C	1,9	-
Sorbitol-6-P	ATP	IC	-	3,1
AMP-PNP	F6P	NC	0,65	0,85
AMP-PNP	ATP	C	0,24	-

<sup>a</sup>C, competitiva; NC, no competitiva; IC, incompetitiva.

a las enzimas en un sitio específico, ya sea este activador o inhibidor.

Por otra parte, la mayoría de las fosfofructoquinasas estudiadas son inhibidas por ATP, en cuyo caso la especie inhibidora puede ser el nucleótido libre, el complejo metal-nucleótido o ambas. Por lo tanto, los estudios usuales de velocidad inicial, donde se varía un ligando a distintas concentraciones fijas de los otros, se complican ya que  $Mg^{+2}$  libre,  $ATP^{-4}$  y  $MgATP^{-2}$  no pueden variarse independientemente debido al equilibrio existente entre el complejo metal-nucleótido y el metal libre y  $ATP^{-4}$ . En estos análisis las concentraciones de las especies libres y acomplejadas deben calcularse cada vez que la concentración de cualesquiera de ellas se varía.

Al variar la concentración de ATP a distintas concentraciones fijas de  $Mg^{+2}$ , se observó que para cada concentración de  $MgCl_2$ , la actividad de Pfk-2 alcanzó un máximo y luego disminuyó. De estos resultados se desprende que la velocidad de Pfk-2 depende de las concentraciones relativas de ATP y  $MgCl_2$ .

Una posibilidad es que el verdadero sustrato sea el complejo  $MgATP^{-2}$ , el cual se une directamente a la enzima, en una sola etapa. Si esto es así, la ecuación de velocidad para la reacción en función de  $Mg^{+2}$  libre o  $ATP^{-4}$ , es simétrica, de modo que las velocidades iniciales determinadas a concentraciones de ATP iguales a a, b o c en presencia de una concentración fija de  $MgCl_2 = \underline{d}$ , serán idénticas a las velocidades iniciales determinadas cuando  $MgCl_2$  es igual a a, b o c en presencia de una concentración fija de ATP igual a d. La ecuación es la siguiente:

$$\frac{v}{V} = \frac{S}{K_0 K_{SA} / A + S} \quad \circ \quad \frac{v}{V} = \frac{A}{K_0 K_{SA} / S + A}$$

donde  $K_0$  es la constante de disociación de  $\text{MgATP}^{-2}$ ,  $K_{SA}$  la constante de Michaelis para el complejo metal-nucleótido, y A y S las concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{ATP}^{-4}$  respectivamente.

Si las gráficas de dobles recíprocos son lineales en el rango de concentración usado, entonces la  $K_S$  aparente a  $\text{MgCl}_2 = \underline{d}$  será igual a la  $K_A$  aparente a  $\text{ATP} = \underline{d}$ .

Sin embargo, si  $\text{MgATP}^{-2}$  y  $\text{ATP}^{-4}$  se unen a la enzima, entonces la ecuación de velocidad será:

$$\frac{v}{V} = \frac{S}{K_0 K_{SA} / A + S (1 + K_0 K_{SA} / A K_S)} \quad \circ \quad \frac{v}{V} = \frac{A}{K_0 K_{SA} / K_S (1 + K_S / S) + A}$$

En este caso, la ecuación no es simétrica con respecto a  $\text{ATP}^{-4}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  libre, de modo que la velocidad inicial determinada a  $\text{ATP} = \underline{a}$  y  $\text{ATP} = \underline{b}$  no será igual a la velocidad inicial obtenida a  $\text{MgCl}_2 = \underline{a}$  y  $\text{MgCl}_2 = \underline{b}$ .

La ecuación de velocidad en términos de  $\text{MgATP}^{-2}$  (SA) y de  $\text{ATP}^{-4}$  (S), las dos especies que se unen a la enzima, es:

$$\frac{v}{V} = \frac{SA}{K_{SA} (1 + S / K_S) + SA}$$

De esta manera  $\text{ATP}^{-4}$  actúa como un inhibidor competitivo con respecto a  $\text{MgATP}^{-2}$ . En este caso la  $K_m$  para  $\text{MgATP}^{-2}$  ( $K_{SA}$ ) puede determinarse usando una concentración de  $\text{MgCl}_2$  en exceso por sobre la de

ATP<sup>-4</sup>, de modo que virtualmente todo el ATP<sup>-4</sup> esté acomplejado. Bajo estas condiciones la ecuación de velocidad se reduce a la de Michaelis:

$$\frac{v}{V} = \frac{S_t}{K_{SA} + S_t}$$

donde  $S_t$  representa la concentración total de sustrato (ATP).

### Efecto de MgATP<sup>-2</sup> y de la concentración de fructosa-6-P en la actividad de Pfk-2 y Pfk-2\*.

La actividad de Pfk-2 y Pfk-2\* se midió con respecto a la concentración de MgATP<sup>-2</sup> (rango micromolar), a diferentes concentraciones fijas de Mg<sup>+2</sup>. La Figura 13 muestra los datos obtenidos de este experimento, graficados en forma de dobles recíprocos. Se puede observar que a las distintas concentraciones fijas de Mg<sup>+2</sup> la velocidad de la reacción de ambas enzimas aumenta al aumentar la concentración de MgATP<sup>-2</sup>. Cabe destacar que, en las condiciones del experimento, al aumentar la concentración de MgATP<sup>-2</sup> a cada concentración "fija" de Mg<sup>+2</sup>, la concentración de ATP<sup>-4</sup> fue despreciable y que la variación de la concentración de Mg<sup>+2</sup> fue muy pequeña. Los parámetros cinéticos de ambas enzimas ( $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ ) sólo experimentaron cambios pequeños al aumentar la concentración de Mg<sup>+2</sup> libre.

El efecto inhibitorio de ATP sobre la fosfofructoquinasa se observó por primera vez para la enzima obtenida de músculo de conejo. De ahí en adelante se ha demostrado que la actividad de la enzima aislada de diversas fuentes es regulada por este metabolito. Asimismo, en la mayoría de los casos estudiados, la acción inhibitoria de ATP

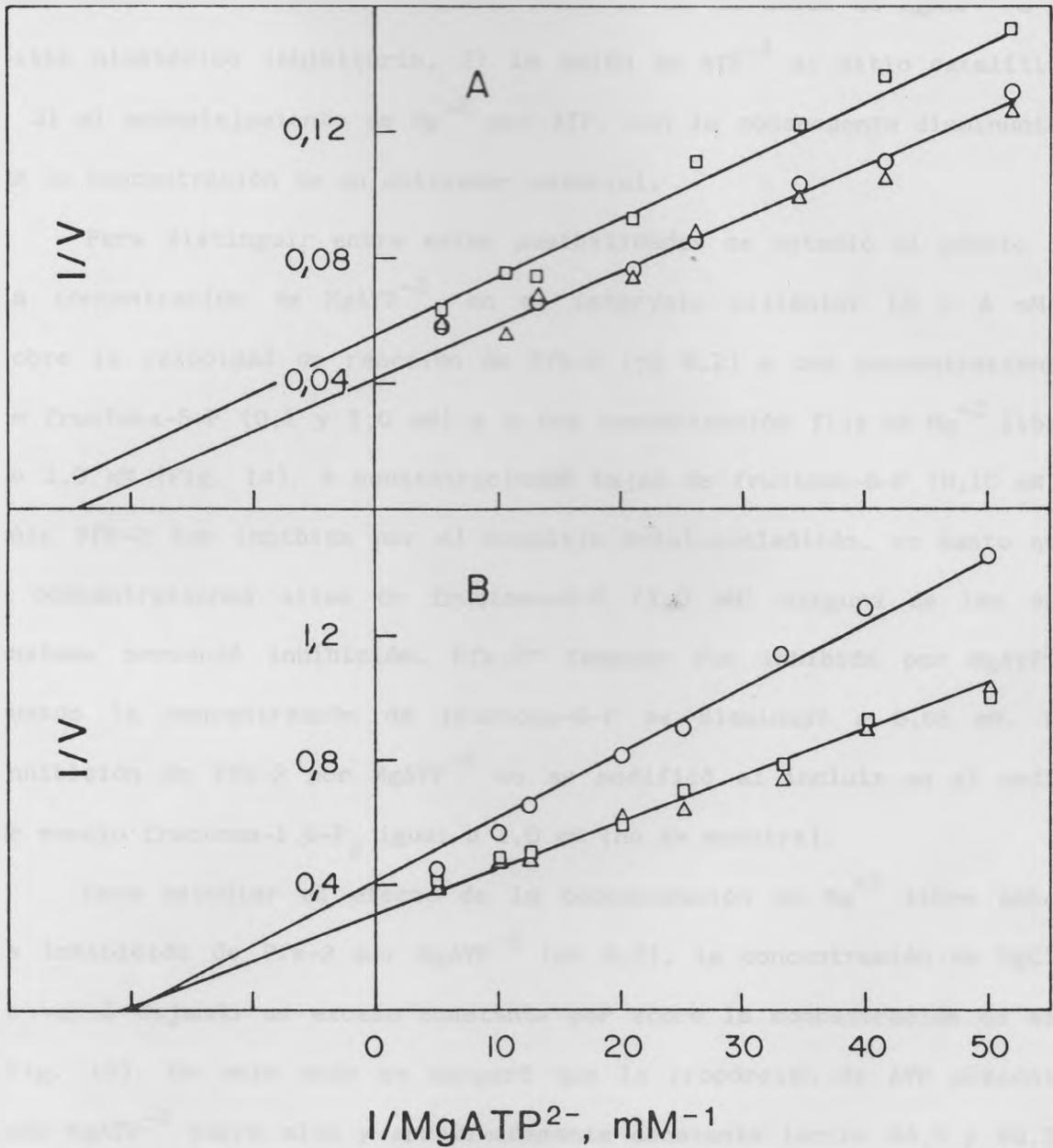


Figura 13. Actividad de Pfk-2 y Pfk-2\* en función de la concentración de  $MgATP^{2-}$  (intervalo micromolar) a diferentes concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre. A, Pfk-2; B, Pfk-2\*. La actividad de ambas enzimas se determinó en presencia de una concentración de fructosa-6-P de 1,0 mM. Las concentraciones de  $Mg^{+2}$  libre son: 1,0 mM (○), 10 mM (△) y 30 mM (□).

puede ser disminuída por un aumento en la concentración de fructosa-6-P.

La inhibición de la actividad de Pfk-2 por exceso de ATP, mencionada anteriormente, se puede deber a: 1) la unión de  $\text{MgATP}^{-2}$  a un sitio alostérico inhibitorio, 2) la unión de  $\text{ATP}^{-4}$  al sitio catalítico y 3) al acomplejamiento de  $\text{Mg}^{+2}$  por ATP, con la consecuente disminución de la concentración de un activador esencial.

Para distinguir entre estas posibilidades se estudió el efecto de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$ , en el intervalo milimolar (0 - 4 mM), sobre la velocidad de reacción de Pfk-2 (pH 8,2) a dos concentraciones de fructosa-6-P (0,1 y 1,0 mM) y a una concentración fija de  $\text{Mg}^{+2}$  libre de 1,0 mM (Fig. 14). A concentraciones bajas de fructosa-6-P (0,10 mM), sólo Pfk-2 fue inhibida por el complejo metal-nucleótido, en tanto que a concentraciones altas de fructosa-6-P (1,0 mM) ninguna de las dos enzimas presentó inhibición. Pfk-2\* tampoco fue inhibida por  $\text{MgATP}^{-2}$  cuando la concentración de fructosa-6-P se disminuyó a 0,05 mM. La inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$  no se modificó al incluir en el medio de ensayo fructosa-1,6-P<sub>2</sub> igual a 1,0 mM (no se muestra).

Para estudiar el efecto de la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre sobre la inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$  (pH 8,2), la concentración de  $\text{MgCl}_2$  se varió dejando un exceso constante por sobre la concentración de ATP (Fig. 15). De este modo se aseguró que la proporción de ATP presente como  $\text{MgATP}^{-2}$  fuera alta y aproximadamente constante (entre 94,5 y 95,3% cuando ATP se varió entre 0 y 4 mM, con un exceso de  $\text{MgCl}_2$  de 1 mM). Asimismo, la concentración de otras especies iónicas se hizo despreciable, en contraste con lo que se obtiene cuando ATP y  $\text{MgCl}_2$  se varían en una razón constante. Por ejemplo, si la concentración total de ATP se

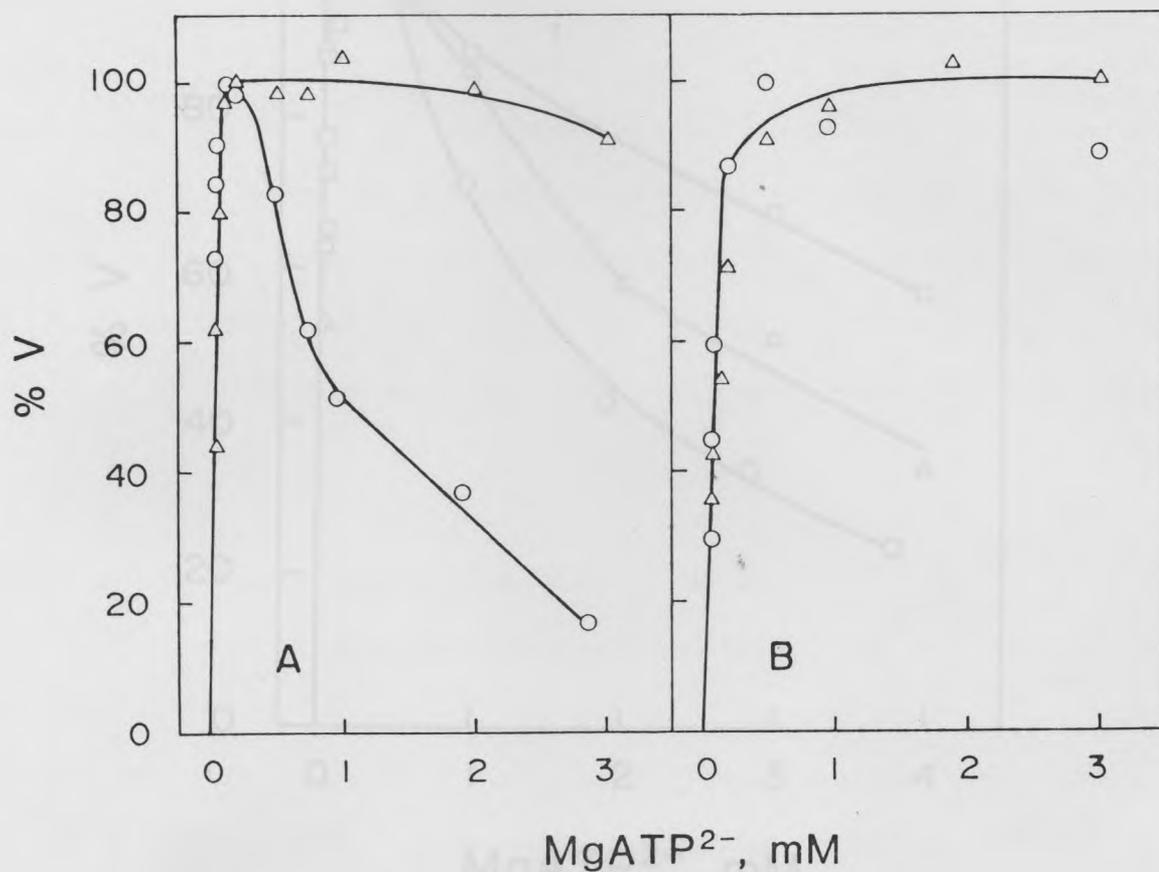


Figura 14. Efecto de la concentración de  $\text{MgATP}^{2-}$  (intervalo milimolar) sobre la actividad de Pfk-2 y Pfk-2\* a dos concentraciones de fructosa-6-P. A, Pfk-2; B, Pfk-2\*. La actividad de ambas enzimas se determinó en presencia de una concentración de fructosa-6-P de 0,10 mM (○) y 1,0 mM (△), con un exceso constante de  $\text{Mg}^{+2}$  de 1 mM.

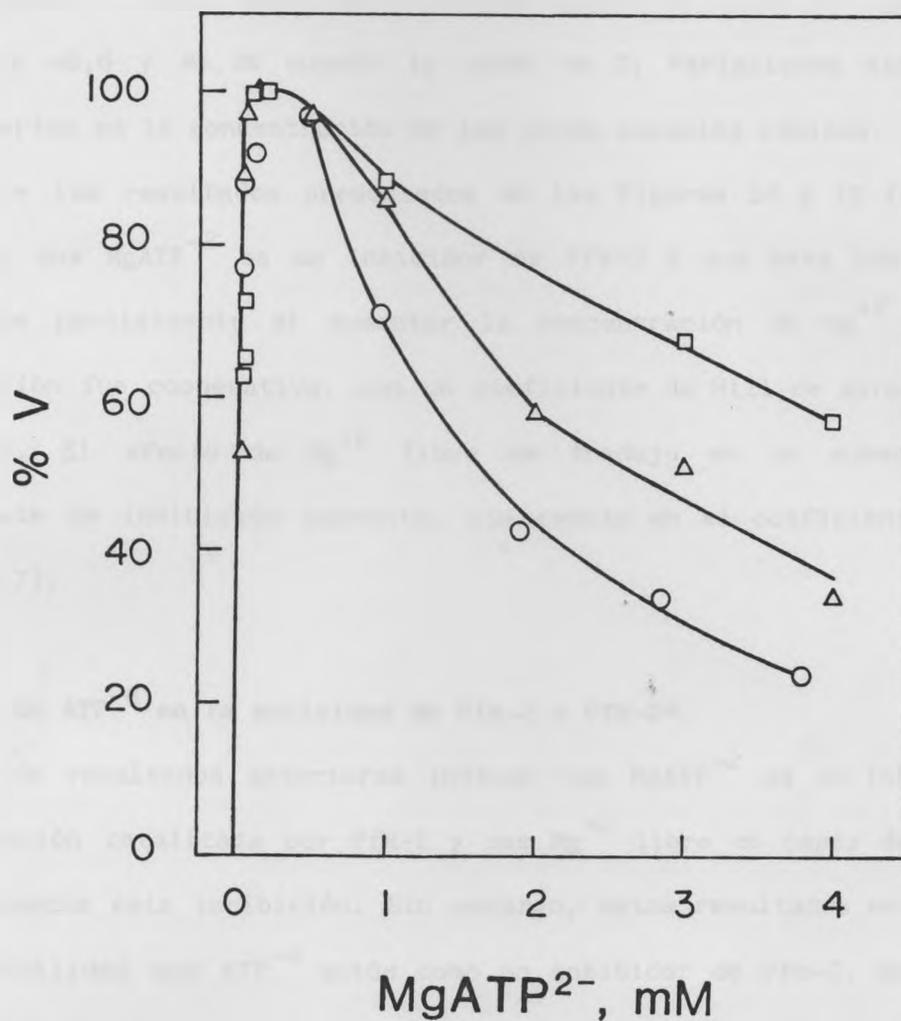


Figura 15. Actividad de Pfk-2 en función de la concentración de  $\text{MgATP}^{2-}$  (intervalo milimolar) a diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{+2}$  libre. La actividad enzimática se determinó en presencia de una concentración de fructosa-6-P de 0,1 mM. Las concentraciones de  $\text{Mg}^{+2}$  libre son: 1,0 mM (○), 10 mM (△) y 30 mM (□).

varía desde 0,10 a 10,0 mM, la proporción de este nucleótido, presente como  $\text{MgATP}^{-2}$ , varía entre 28,9 y 85,3% cuando la razón es igual a uno, y entre 46,6 y 85,3% cuando la razón es 2. Variaciones similares se observarían en la concentración de las otras especies iónicas.

De los resultados presentados en las Figuras 14 y 15 fue posible inferir que  $\text{MgATP}^{-2}$  es un inhibidor de Pfk-2 y que esta inhibición se revierte parcialmente al aumentar la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre. La inhibición fue cooperativa, con un coeficiente de Hill de aproximadamente 1,5. El efecto de  $\text{Mg}^{+2}$  libre se tradujo en un aumento de la constante de inhibición aparente, sin cambio en el coeficiente de Hill (Tabla 7).

#### Efecto de $\text{ATP}^{-4}$ en la actividad de Pfk-2 y Pfk-2\*.

Los resultados anteriores indican que  $\text{MgATP}^{-2}$  es un inhibidor de la reacción catalizada por Pfk-2 y que  $\text{Mg}^{+2}$  libre es capaz de revertir parcialmente esta inhibición. Sin embargo, estos resultados no descartan la posibilidad que  $\text{ATP}^{-4}$  actúe como un inhibidor de Pfk-2, de Pfk-2\* o de ambas enzimas. Para estudiar esto, se midió la actividad de Pfk-2 y Pfk-2\* en función de la concentración de ATP por sobre una concentración constante de  $\text{Mg}^{+2}$  (0,6 mM), a dos concentraciones de fructosa-6-P (0,10 y 1,0 mM). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16, donde se observa que ambas enzimas fueron inhibidas por  $\text{ATP}^{-4}$  y que tanto en el caso de Pfk-2 como en el de Pfk-2\* esta inhibición no fue revertida por un aumento en la concentración de fructosa-6-P. Estos resultados sugieren que la inhibición de ambas enzimas por  $\text{ATP}^{-4}$  ocurriría por unión de éste al sitio catalítico. Para confirmar esto, se ensayó la

Tabla 7

CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA INHIBICIÓN DE Pfk-2 POR  $\text{MgATP}^{-2}$   
A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE  $\text{Mg}^{+2}$  LIBRE<sup>a</sup>

$\text{Mg}^{+2}$ libre, mM	$\underline{h}$	$K_i$ , mM
1	1,5	1,5
10	1,5	2,3
30	1,3	4,4

<sup>a</sup> La concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  se varió en el rango milimolar (0 - 4 mM). Los valores de  $K_i$  y de  $\underline{h}$  se obtuvieron de las gráficas de Hill de los experimentos de inhibición por  $\text{MgATP}^{-2}$  de la Figura 15.

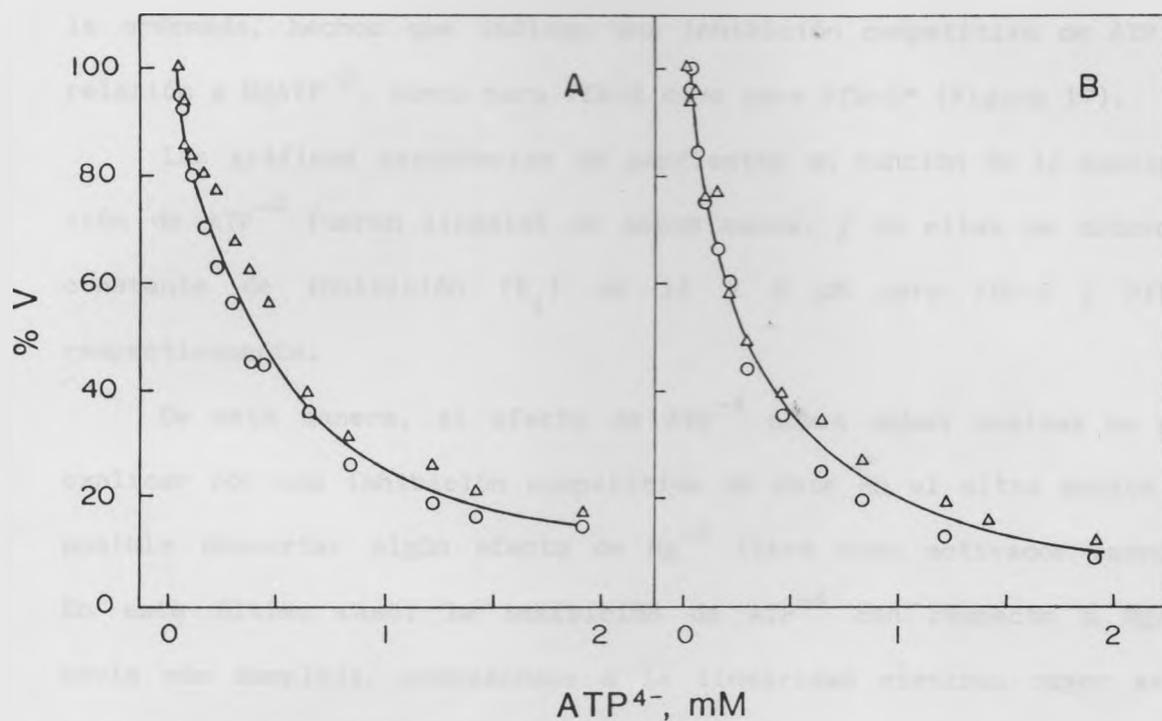


Figura 16. Efecto de la concentración de ATP<sup>-4</sup> sobre la actividad de Pfk-2 y Pfk-2\*. A, Pfk-2; B, Pfk-2\*. La actividad de ambas enzimas se determinó en presencia de una concentración de fructosa-6-P de 0,1 mM (○) y 1,0 mM (△). La concentración de MgCl<sub>2</sub> se mantuvo constante en 0,6 mM.

velocidad de la reacción de Pfk-2 y Pfk-2\* en función de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  (0 a 0,20 mM) a varias concentraciones fijas de  $\text{ATP}^{-4}$  y a una concentración fija de fructosa-6-P (0,5 mM). Al graficar el recíproco de la velocidad en función del recíproco de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  a distintas concentraciones de  $\text{ATP}^{-4}$  se obtuvo, para ambas enzimas, una serie de líneas rectas que se intersectaron en un punto en la ordenada, hechos que indican una inhibición competitiva de  $\text{ATP}^{-4}$  en relación a  $\text{MgATP}^{-2}$ , tanto para Pfk-2 como para Pfk-2\* (Figura 17).

Las gráficas secundarias de pendientes en función de la concentración de  $\text{ATP}^{-4}$  fueron lineales en ambos casos, y de ellas se obtuvo una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 10 y 8  $\mu\text{M}$  para Pfk-2 y Pfk-2\*, respectivamente.

De esta manera, el efecto de  $\text{ATP}^{-4}$  sobre ambas enzimas se puede explicar por una inhibición competitiva de éste en el sitio activo y es posible descartar algún efecto de  $\text{Mg}^{+2}$  libre como activador esencial. En este último caso, la inhibición de  $\text{ATP}^{-4}$  con respecto a  $\text{MgATP}^{-2}$  sería más compleja, acercándose a la linealidad mientras mayor sea la contribución del componente competitivo.

La inhibición por ATP de las fosfofructoquinasas aisladas de diversas fuentes se modifica al variar el pH del medio de reacción, la concentración de sustratos (fructosa-6-P), productos (fructosa-1,6- $\text{P}_2$ ) u otros metabolitos (AMP, cAMP, ADP, Pi). A continuación se presenta el estudio de la inhibición de Pfk-2 y Pfk-2\* por  $\text{MgATP}^{-2}$  en diversas condiciones.

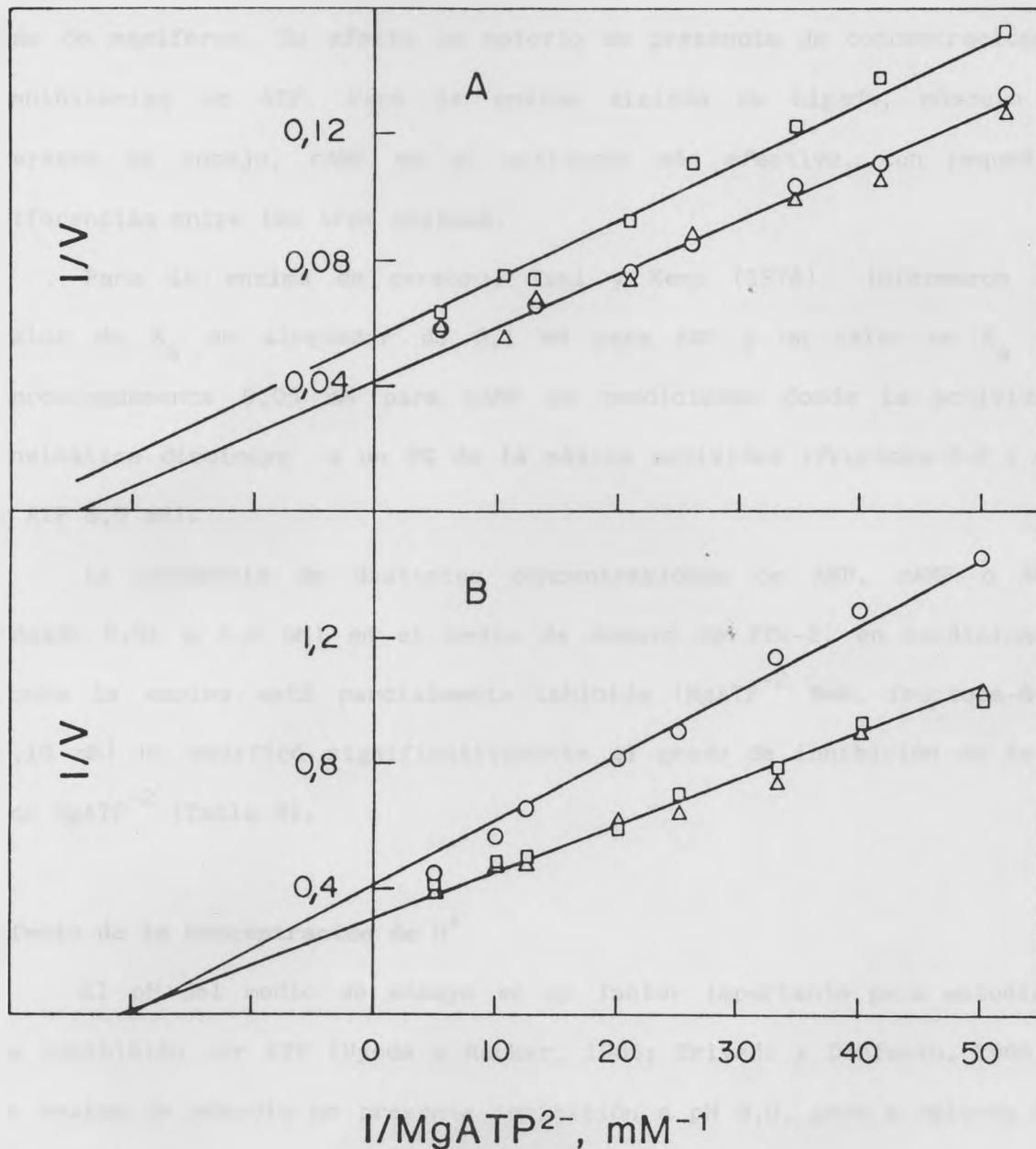


Figura 17. Gráfica de dobles recíprocos para la inhibición de Pfk-2 y Pfk-2\* por ATP<sup>-4</sup> usando MgATP<sup>-2</sup> como sustrato variable. A, Pfk-2; B, Pfk-2\*. La actividad de ambas enzimas se determinó en presencia de una concentración de fructosa-6-P de 0,50 mM. Las concentraciones de ATP<sup>-4</sup> son: 0 μM, □ ; 5,0 μM, △ ; y 11 μM, ○ .

### Efecto de nucleósido-mono y -difosfatos

AMP, ADP y cAMP son potentes activadores de las fosfofructoquinasas de mamíferos. Su efecto es notorio en presencia de concentraciones inhibitorias de ATP. Para la enzima aislada de hígado, músculo o cerebro de conejo, cAMP es el activador más efectivo, con pequeñas diferencias entre las tres enzimas.

Para la enzima de cerebro, Tsai y Kemp (1974) informaron un valor de  $K_a$  de alrededor de 0,1 mM para AMP y un valor de  $K_a$  de aproximadamente 0,05 mM para cAMP en condiciones donde la actividad enzimática disminuye a un 5% de la máxima actividad (fructosa-6-P 1 mM y ATP 8,5 mM).

La presencia de distintas concentraciones de AMP, cAMP o ADP (desde 0,01 a 5,0 mM) en el medio de ensayo de Pfk-2, en condiciones donde la enzima está parcialmente inhibida ( $MgATP^{-2}$  6mM, fructosa-6-P 0,10 mM) no modificó significativamente el grado de inhibición de ésta por  $MgATP^{-2}$  (Tabla 8).

### Efecto de la concentración de $H^+$

El pH del medio de ensayo es un factor importante para estudiar la inhibición por ATP (Uyeda y Racker, 1965; Trivedi y Danforth, 1966). La enzima de músculo no presenta inhibición a pH 9,0, pero a valores de pH bajo 7,0 la inhibición aumenta considerablemente. A pH 7,0, la inhibición es mucho mayor en imidazolio que en fosfato. La enzima obtenida de cerebro (Lowry y Passonneau, 1966), corazón (Karadsheh y col., 1977), diafragma (Ui, 1966) e hígado (Kemp, 1971) muestra propiedades similares. Sin embargo, la fosfofructoquinasa de levadura, muestra

Tabla 8

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE NUCLEOSIDO-MONO Y -DIFOSFATOS  
SOBRE LA ACTIVIDAD DE Pfk-2

CONCENTRACION DE NUCLEOSIDO (mM)	ACTIVIDAD <sup>a</sup> (U/ml)		
	AMP	ADP	cAMP
0	0,132	0,132	0,132
0,01	0,134	0,160	0,164
0,05	0,132	0,146	0,160
0,1	0,138	0,154	0,142
0,3	0,142	0,160	0,140
0,5	0,144	0,140	0,140
1,0	0,146	0,156	0,142
3,0	0,142	0,150	0,126
5,0	0,148	0,160	0,124

<sup>a</sup> La actividad se midió en presencia de ATP 6 mM, fructosa-6-P 0,1 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

el fenómeno contrario, esto es, es más sensible a la inhibición por ATP a pH alcalino (Lindell y Stellwagen, 1968).

La actividad de Pfk-2 y Pfk-2\* se midió en función de la concentración de  $MgATP^{-2}$  en un rango de pH desde 5,5 a 9,0. Para Pfk-2 la inhibición por  $MgATP^{-2}$  fue más pronunciada a pH alcalino y fue parcialmente revertida al disminuir el pH del medio de reacción (Figura 18). Por otra parte, Pfk-2\* no presentó inhibición por  $MgATP^{-2}$  en el rango de pH estudiado (Figura 19).

#### Efecto de nucleósido-trifosfatos en la actividad de Pfk-2 y Pfk-2\*

La fosfofructoquinasa aislada de diversas fuentes (Escherichia coli, levadura, músculo) puede usar una amplia variedad de nucleósidos trifosfato como sustratos en la reacción catalítica (Sols y Salas, 1966; Uyeda y Racker, 1965; Blangy y col., 1968). La enzima de músculo puede usar también 2-amino-9- $\beta$ -D-ribofuranosilpurina-5'-trifosfato (Bloxham y Lardy, 1973), 6-mercapto-9- $\beta$ -D-ribofuranosilpurina-5'-trifosfato (Bloxham y Lardy, 1973) y 1,N<sup>6</sup>-eteno-ATP (Secrist y col., 1972). Sin embargo, no todas las enzimas muestran esta amplia especificidad de nucleótidos. Denis y Coultate (1967) mostraron que la fosfofructoquinasa aislada de brotes de brucas usa preferentemente nucleósidos trifosfato purínicos (ATP, GTP, ITP), en tanto que los nucleósidos trifosfato pirimidínicos son pobres dadores de fosfato. Por otra parte, los requerimientos estructurales para la inhibición por exceso del sustrato nucleotídico parecen más restringidos que los necesarios para la actividad catalítica. La enzima de músculo es inhibida por ATP, CTP y UTP, pero no presenta inhibición por ITP; aunque este último actúa como

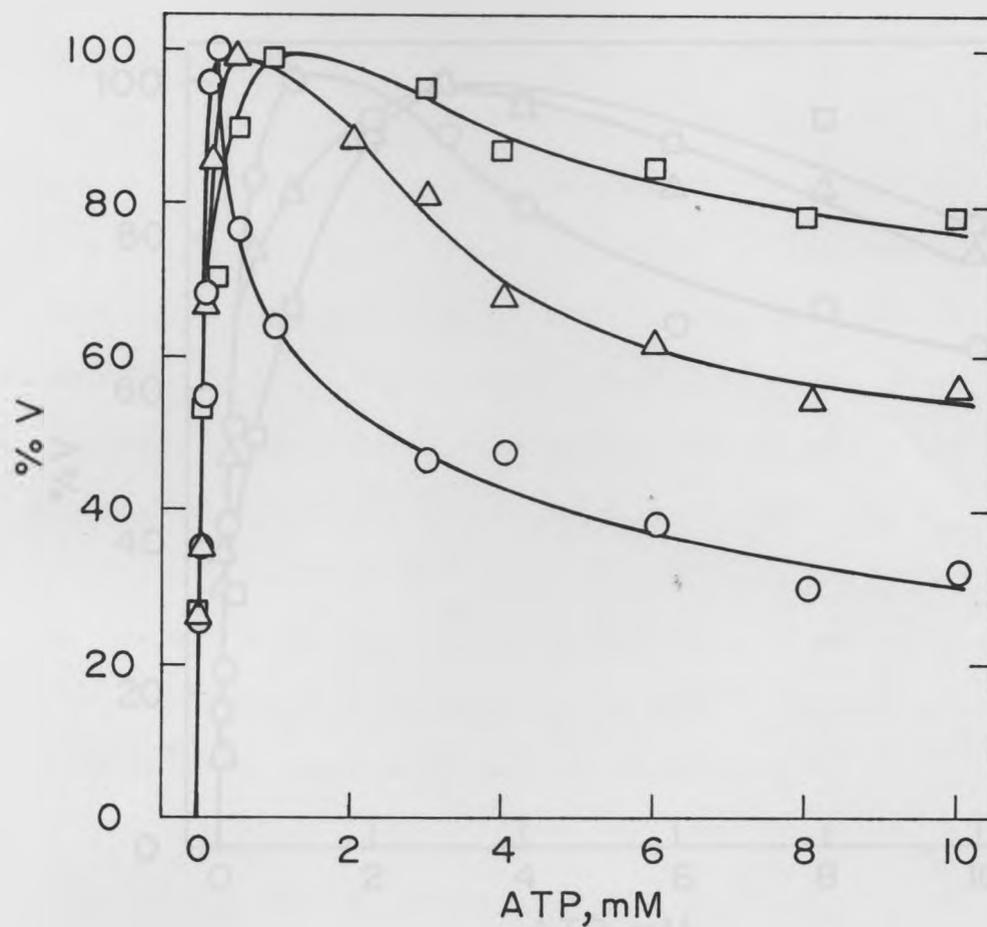


Figura 18. Efecto del pH del medio de reacción sobre la inhibición de Pfk-2 por ATP. La actividad enzimática se determinó en presencia de una concentración de fructosa-6-P de 0,1 mM. La concentración de  $MgCl_2$  se varió en una proporción de 4:1 con respecto a la concentración<sup>2</sup> del nucleótido. Los pH son:  $\square$ , 5,5;  $\triangle$ , 6,5;  $\circ$ , 9,0.

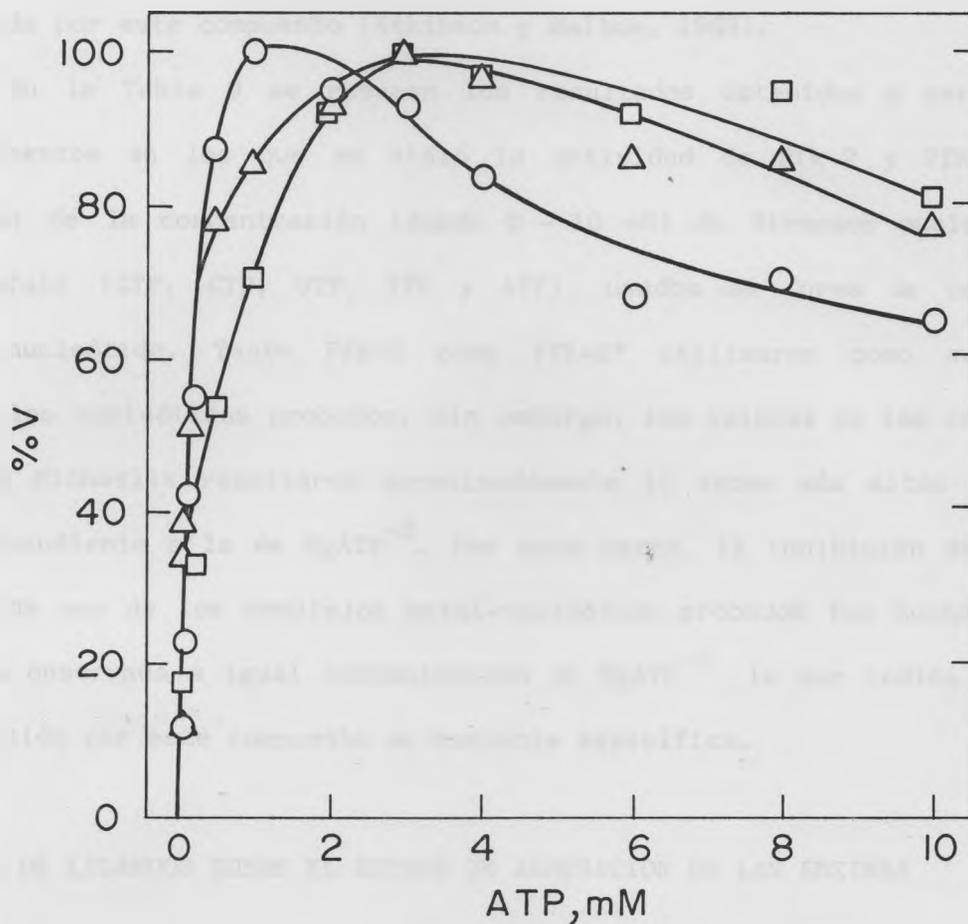


Figura 19. Efecto del pH del medio de reacción sobre la inhibición del Pfk-2\* por ATP. La actividad enzimática se determinó en presencia de una concentración de fructosa-6-P de 0,1 mM. La concentración de  $MgCl_2$  se varió en una proporción de 4:1 con respecto a la concentración del nucleótido. Los pH son:  $\square$ , 5,5;  $\triangle$ , 6,5;  $\circ$ , 9,0.

sustrato (Uyeda y Racker, 1965). La enzima de levadura parece aún más específica ya que sólo ATP es capaz de inhibir su actividad (Viñuela y col., 1963; Ramaiah y col., 1964; Lindell y Stellwagen, 1968). Pfk-1 de E. coli es capaz de usar ITP como sustrato, pero su actividad no es inhibida por este compuesto (Atkinson y Walton, 1965).

En la Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos a partir de experimentos en los que se midió la actividad de Pfk-2 y Pfk-2\* en función de la concentración (desde 0 - 10 mM) de diversos nucleósidos trifosfato (GTP, CTP, UTP, ITP y ATP), usados en forma de complejo metal-nucleótido. Tanto Pfk-2 como Pfk-2\* utilizaron como sustrato todos los nucleótidos probados, sin embargo, los valores de las constantes de Michaelis resultaron aproximadamente 10 veces más altos que el correspondiente a la de  $MgATP^{-2}$ . Por otra parte, la inhibición de Pfk-2 por cada uno de los complejos metal-nucleótido probados fue mucho menor que la observada a igual concentración de  $MgATP^{-2}$ , lo que indica que la inhibición por este compuesto es bastante específica.

#### EFEECTO DE LIGANDOS SOBRE EL ESTADO DE AGREGACION DE LAS ENZIMAS

Además de los efectos regulatorios de las fosfofructoquinasas de mamíferos provocados por ATP, se ha demostrado que una gran variedad de ligandos puede afectar la actividad enzimática de la fosfofructoquinasa de músculo de conejo. Estos ligandos incluyen sustratos y productos de la reacción,  $H^+$ , cationes divalentes y metabolitos tales como citrato, 2,3-difosfoglicerato y creatinafosfato.

Tabla 9

COMPLEJOS  $Mg^{+2}$ -NUCLEOTIDOS COMO SUSTRATOS E INHIBIDORES  
DE Pfk-2 Y Pfk-2\*

NUCLEOTIDO	$K_m$ , mM <sup>a</sup>		% de INHIBICION <sup>b</sup>	
	Pfk-2	Pfk-2*	Pfk-2	Pfk-2*
ATP	0,06	0,16	72	25
CTP	0,90	2,0	30	1,5 <sup>c</sup>
ITP	0,30	1,0	45	23
GTP	0,35	1,5	24	30
UTP	0,78	2,3	13	17

<sup>a</sup>  $K_m$  aparente; la concentración de fructosa-6-P es 0,10 mM.

<sup>b</sup> Velocidad a  $MgXTP^{-2}$  10 mM referido al máximo valor de velocidad obtenido para cada nucleótido.

<sup>c</sup> 6 mM CTP.

El mecanismo por el cual estos ligandos ejercen sus efectos alostéricos ha sido extensamente estudiado. Lad y col. (1973) estudiaron la influencia de sustratos y efectores alostéricos en el estado de agregación de la enzima. Sus resultados indican que los activadores de la enzima, estabilizan la forma tetramérica, mientras que citrato, un inhibidor de la enzima, estabiliza agregados más pequeños, probablemente monómeros y dímeros.

#### **Efecto de $MgATP^{-2}$ en la sedimentación de Pfk-2 y Pfk-2\***

En las Figuras 20 y 21 se muestra la sedimentación de Pfk-2 y Pfk-2\*, respectivamente, en gradientes de sacarosa en ausencia de ligandos después de experimentos de ultracentrifugación zonal. Ambas enzimas sedimentan en una posición que corresponde a la de un dímero, de acuerdo a los estándares usados.

El agregado de  $MgATP^{-2}$  (1 mM) al gradiente de sacarosa resulta en un desplazamiento en la posición del pico de Pfk-2 hacia la región de pesos moleculares más altos. En estas condiciones el peso molecular de Pfk-2 es el correspondiente a un tetrámero (Figura 20), mientras que Pfk-2\* sedimenta como un dímero en presencia del complejo metal-nucleótido (Figura 21).

Según se observó en los estudios del efecto de ATP sobre la actividad de Pfk-2, la inhibición de la enzima por  $MgATP^{-2}$  pudo ser revertida por un aumento en la concentración de fructosa-6-P. Entonces, si los cambios en estructura cuaternaria de Pfk-2, observados en presencia de  $MgATP^{-2}$ , están relacionados con la regulación de la actividad por este nucleótido, es probable que la transición dímero-te-

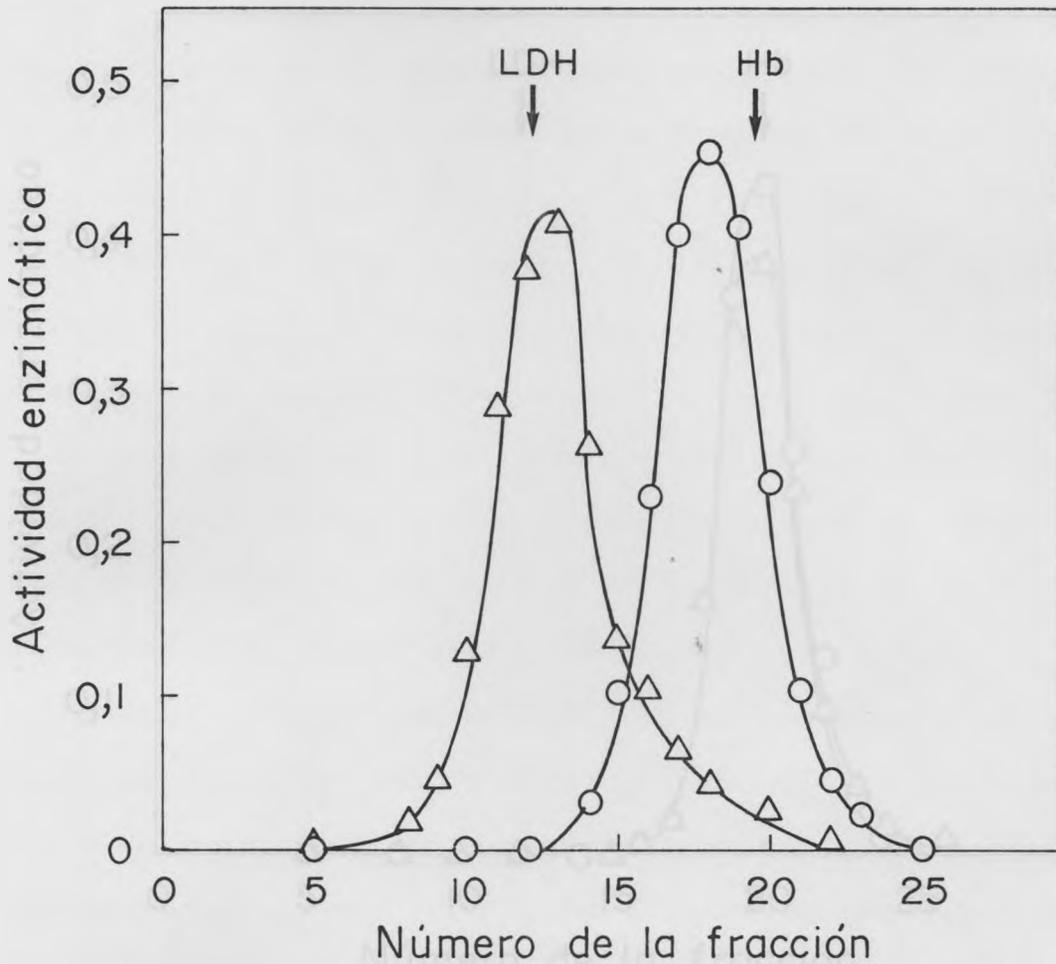


Figura 20. Sedimentación zonal de Pfk-2 en gradiente de sacarosa en presencia y en ausencia de  $\text{MgATP}^{-2}$ . La concentración de sacarosa (5-20%) aumenta de izquierda a derecha. Las flechas indican la posición del pico de sedimentación de hemoglobina, Hb, ( $M_r = 64.000$ ;  $S = 4,5$ ) y de deshidrogenasa láctica LDH, ( $M_r = 140.000$ ;  $S = 7,3$ ). La actividad fosfofructoquinásica se determinó a través de la formación de fructosa-1,6- $\text{P}_2$  en presencia de fructosa-6-P 1,0 mM y ATP 1,0 mM. La actividad enzimática se expresa como cambio de  $A_{340}$ /min ml. (O), en ausencia de  $\text{MgATP}^{-2}$ ; ( $\Delta$ ) en presencia de  $\text{MgATP}^{-2}$  1 mM. La concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre fue aproximadamente 4 mM. Otros detalles se describen en Materiales y Métodos.

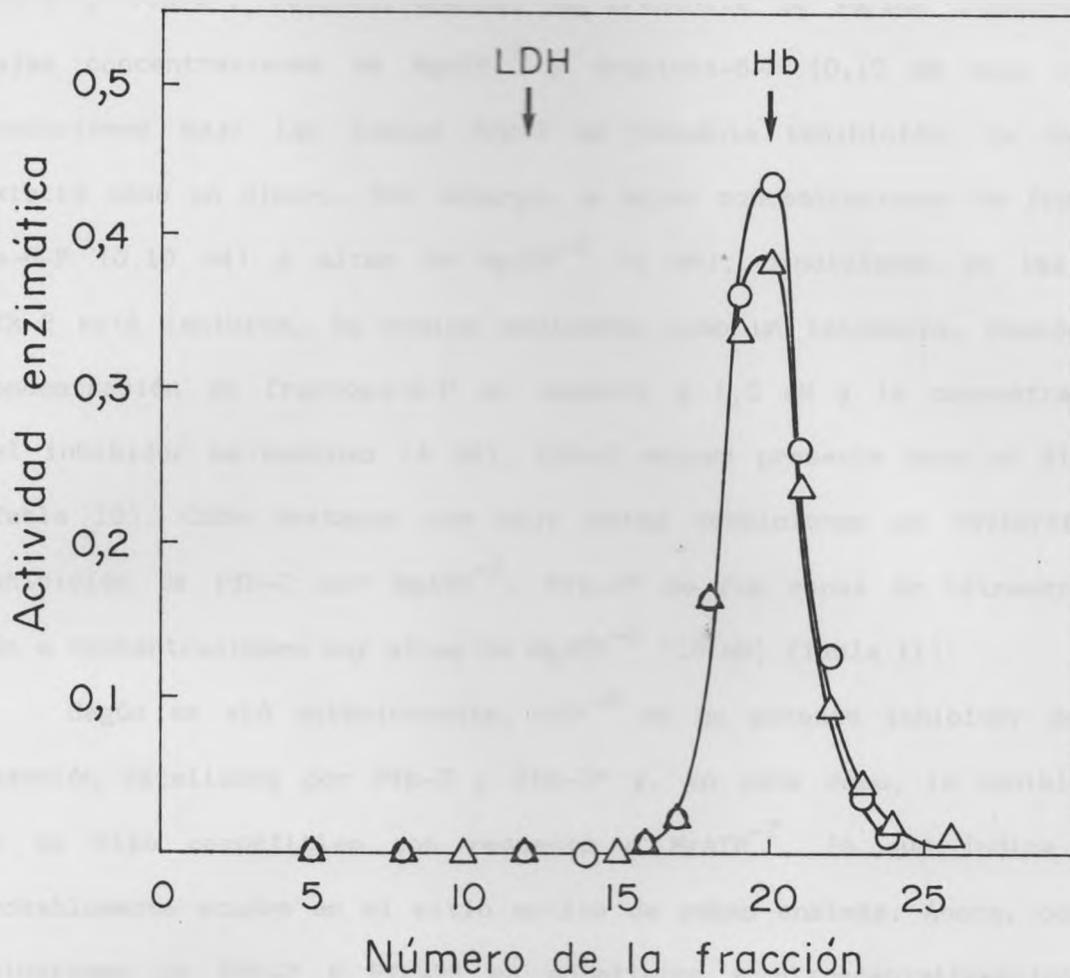


Figura 21. Sedimentación zonal de Pfk-2\* en gradiente de sacarosa en presencia y en ausencia de  $MgATP^{-2}$ . Detalles como en la Figura 20. (○), en ausencia de  $MgATP^{-2}$ ; (△) en presencia de  $MgATP^{-2}$  1 mM.

trámero, también se vea afectada por la concentración de fructosa-6-P. En las Tablas 10 y 11 se presentan los coeficientes de sedimentación de Pfk-2 y Pfk-2\*, respectivamente, en presencia de varios ligandos. A bajas concentraciones de  $\text{MgATP}^{-2}$  y fructosa-6-P (0,10 mM cada uno), condiciones bajo las cuales Pfk-2 no presenta inhibición, la enzima existió como un dímero. Sin embargo, a bajas concentraciones de fructosa-6-P (0,10 mM) y altas de  $\text{MgATP}^{-2}$  (4 mM), condiciones en las que Pfk-2 está inhibida, la enzima sedimentó como un tetrámero. Cuando la concentración de fructosa-6-P se aumentó a 1,0 mM y la concentración del inhibidor se mantuvo (4 mM), Pfk-2 estuvo presente como un dímero (Tabla 10). Cabe destacar que bajo estas condiciones se revierte la inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$ . Pfk-2\* no fue capaz de tetramerizar aún a concentraciones muy altas de  $\text{MgATP}^{-2}$  (18 mM) (Tabla 11).

Según se vió anteriormente,  $\text{ATP}^{-4}$  es un potente inhibidor de la reacción catalizada por Pfk-2 y Pfk-2\* y, en este caso, la inhibición es de tipo competitivo con respecto a  $\text{MgATP}^{-2}$ , lo que indica que probablemente ocurre en el sitio activo de ambas enzimas. Ahora, cuando soluciones de Pfk-2 y Pfk-2\* se sometieron a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa en presencia de  $\text{ATP}^{-4}$  1 mM, ambas enzimas sedimentaron como un dímero, apoyando la sugerencia anterior acerca del sitio de acción del  $\text{ATP}^{-4}$  (Tablas 10 y 11).

Se estudió el efecto de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  sobre el estado de agregación de Pfk-2 en un rango desde 0,04 - 1,0 mM. A las concentraciones más bajas empleadas (0,04 y 0,06 mM), Pfk-2 sedimentó como dímero, mientras que a las concentraciones mayores (0,4 hasta 1,0 mM) su posición de sedimentación fue la correspondiente a un tetrámero.

Tabla 10

COEFICIENTE DE SEDIMENTACION DE Pfk-2 EN PRESENCIA DE LIGANDOS <sup>a</sup>

LIGANDOS <sup>b</sup>	S
ninguno	4,9
MgATP <sup>-2</sup> 1 mM	7,0
ATP <sup>-4</sup> 1 mM	5,0
MgATP <sup>-2</sup> 4 mM; fructosa-6-P 1 mM	5,1
MgATP <sup>-2</sup> 4 mM; fructosa-6-P 0,1 mM	7,0
MgATP <sup>-2</sup> 0,1 mM; fructosa-6-P 0,1 mM	4,9
MgADP <sup>-1</sup> 1 mM	4,8
MgATP <sup>-2</sup> 1 mM; MgADP <sup>-1</sup> 1 mM	7,2
fructosa-1,6-P <sub>2</sub> 1 mM	4,7
MgATP <sup>-2</sup> 1 mM; fructosa-1,6-P <sub>2</sub> 1 mM	5,1

<sup>a</sup> Los valores aproximados de S para un dímero de 70.000 Da y un tetramero de 140.000 Da son 4,7 y 7,3 respectivamente.

<sup>b</sup> En cada caso la concentración de Mg<sup>+2</sup> libre fue aproximadamente 4 mM.

Tabla 11

COEFICIENTE DE SEDIMENTACION DE Pfk-2\* EN PRESENCIA DE LIGANDOS <sup>a</sup>

LIGANDOS <sup>b</sup>	S
ninguno	4,6
MgATP <sup>-2</sup> 1 mM	4,6
ATP <sup>-4</sup> 1 mM	4,6
MgATP <sup>-2</sup> 4 mM; fructosa-6-P 1 mM	4,8
MgATP <sup>-2</sup> 4 mM; fructosa-6-P 0,1 mM	4,8
MgATP <sup>-2</sup> 18 mM; fructosa-6-P 0,1 mM	5,2
MgATP <sup>-2</sup> 18 mM	5,7
MgADP <sup>-1</sup> 1 mM	5,1
fructosa-1,6-P <sub>2</sub> 1 mM	5,3
fructosa-6-P 1 mM <sup>c</sup>	4,5

<sup>a</sup> Los valores aproximados de S para un dímero de 70.000 Da y un tetrámero de 140.000 Da son 4,7 y 7,3 respectivamente.

<sup>b</sup> En cada caso la concentración de Mg<sup>+2</sup> libre fue aproximadamente 4 mM.

<sup>c</sup> En ausencia de Mg<sup>+2</sup>.

A las concentraciones intermedias de  $\text{MgATP}^{-2}$  (0,08-0,2 mM) Pfk-2 presentó un pico de sedimentación asimétrico y más ancho, y su posición en el gradiente se desplazaba desde la región del dímero hacia la del tetramero. En la Figura 22 se muestra la variación del coeficiente de sedimentación de Pfk-2 en función de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$ .

#### Efecto de otros ligandos en el estado de agregación de Pfk-2 y Pfk-2\*

En el caso de la enzima de músculo de conejo (Lad y col., 1973), activadores tales como fructosa-1,6- $\text{P}_2$  estabilizan la especie tetramérica. ADP, un activador de la enzima, también favorece la formación del tetramero, cuando la concentración de proteína es menor que 300  $\mu\text{g/ml}$ . A concentraciones mayores, no se observa efecto significativo de ADP (Hesterberg y Lee, 1982).

Se estudió el efecto de los productos de la reacción, fructosa-1,6- $\text{P}_2$  y  $\text{MgADP}^{-1}$  en el estado de agregación de Pfk-2 y Pfk-2\*. En presencia de  $\text{MgADP}^{-1}$ , ambas enzimas sedimentaron como un dímero (Tablas 10 y 11). Sin embargo, cuando se incluyó  $\text{MgADP}^{-1}$  y  $\text{MgATP}^{-2}$  en el gradiente de sacarosa (1 mM de ambos), la sedimentación de Pfk-2 fue la correspondiente a un tetramero indicando que el nucleósido-difosfato es incapaz de convertir el tetramero de Pfk-2, producido por  $\text{MgATP}^{-2}$ , en dímero. El hecho que la inhibición de Pfk-2 por el complejo metal-nucleótido no pudo ser revertida por  $\text{MgADP}^{-1}$  también hace pensar que existe una relación entre el estado de agregación de Pfk-2 y su susceptibilidad a ser inhibida por  $\text{MgATP}^{-2}$ .

El otro producto de la reacción, fructosa-1,6- $\text{P}_2$ , fue incapaz de promover la tetramerización de Pfk-2 o Pfk-2\* a una concentración igual a 1 mM (Tabla 10 y 11).

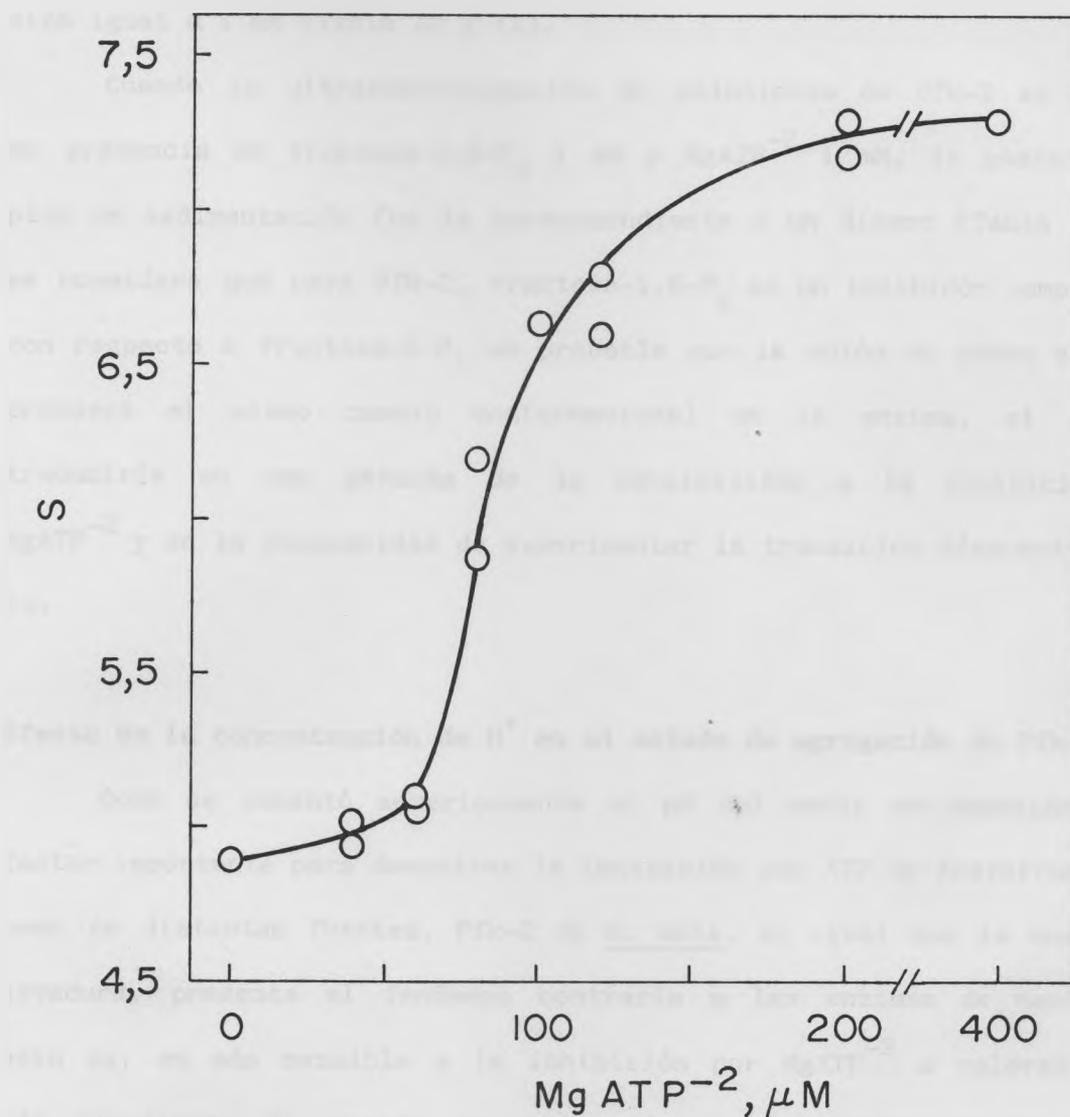


Figura 22. Efecto de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  sobre el estado de agregación de Pfk-2. En la ordenada se grafica la posición (N° de la fracción) del pico de sedimentación de Pfk-2 a cada concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$ . S indica el coeficiente de sedimentación, calculado según se indica en Materiales y Métodos.

ción igual a 1 mM (Tabla 10 y 11).

Cuando la ultracentrifugación de soluciones de Pfk-2 se realizó en presencia de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> 1 mM y MgATP<sup>-2</sup> 1 mM, la posición del pico de sedimentación fue la correspondiente a un dímero (Tabla 10). Si se considera que para Pfk-2, fructosa-1,6-P<sub>2</sub> es un inhibidor competitivo con respecto a fructosa-6-P, es probable que la unión de ambos azúcares produzca el mismo cambio conformacional en la enzima, el que se traduciría en una pérdida de la sensibilidad a la inhibición por MgATP<sup>-2</sup> y en la incapacidad de experimentar la transición dímero-tetrámero.

#### Efecto de la concentración de H<sup>+</sup> en el estado de agregación de Pfk-2

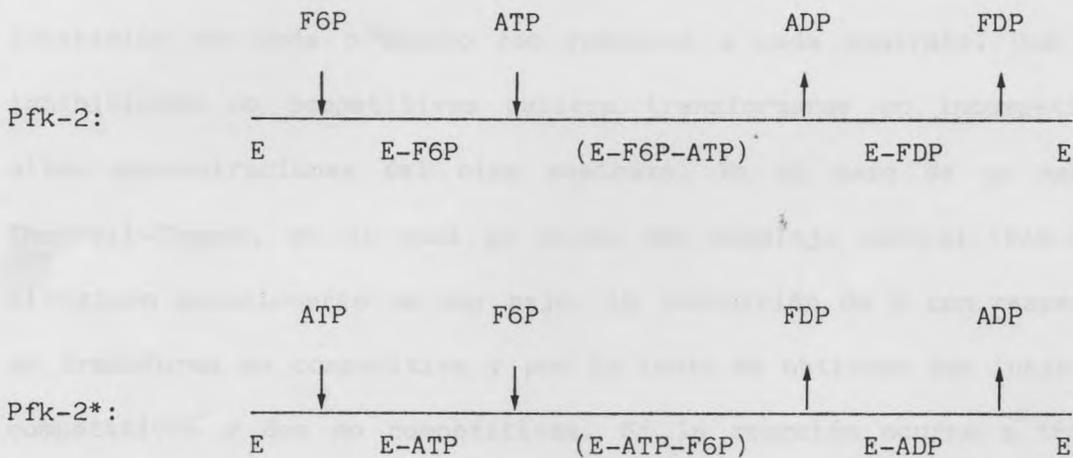
Como se comentó anteriormente el pH del medio de reacción es un factor importante para demostrar la inhibición por ATP de fosfofructoquinasa de distintas fuentes. Pfk-2 de E. coli, al igual que la enzima de levadura, presenta el fenómeno contrario a las enzimas de mamíferos, esto es, es más sensible a la inhibición por MgATP<sup>-2</sup> a valores de pH más alcalinos. El estado de agregación de la enzima de músculo de conejo está influenciado por varios factores, entre ellos la concentración de proteína y el pH de la solución. A bajas concentraciones de H<sup>+</sup> se favorece la asociación de subunidades para formar agregados mayores, tales como el tetrámero. A pH 8,0 y a una concentración de proteína de aproximadamente 0,2 mg/ml, la enzima de músculo de conejo existe como un tetrámero activo. Contrariamente, concentraciones altas de H<sup>+</sup> favorecen la formación de dímeros (y probablemente monómeros) de menor actividad específica (Pavelich y Hammes, 1973).

Se estudió la sedimentación de Pfk-2 a diferentes valores de pH, 5,5 y 9,0. Tanto a pH 5,5 como a pH 9,0, Pfk-2 sedimentó como un dímero ( $S = 5,2$ ), indicando que la concentración de  $H^+$  no tiene efecto en el estado de agregación de Pfk-2.

## DISCUSION

## MECANISMO CINETICO

Los resultados obtenidos de experimentos en velocidad inicial, de inhibición por producto y de inhibición por análogos de sustratos, demuestran que Pfk-2 y Pfk-2\* tienen mecanismos cinéticos diferentes. Estos mecanismos se presentan en los siguientes esquemas:



## Estudios en velocidad inicial

Cuando se estudió la velocidad de reacción de Pfk-2 y Pfk-2\* en función de la concentración de un sustrato, a concentraciones fijas del otro, se obtuvieron rectas que se intersectan en gráficas de dobles recíprocos, indicando una adición en secuencia de ambos sustratos a las enzimas. Además, tanto para Pfk-2 como para Pfk-2\*, la familia de rectas se intersecta por sobre el eje de la abscisa, indicando un valor de  $K_{ia}$  mayor que  $K_a$  (0,09 y 0,032 mM respectivamente, para Pfk-2 y 0,04 y 0,038 mM respectivamente para Pfk-2\*).

Para ambas enzimas se confirmó la formación de un complejo ternario previo a la liberación de los productos, al obtener una parábola en una gráfica del recíproco de la velocidad con respecto al recíproco de la concentración de sustrato, al variar la concentración de ATP y fructosa-6-P en una razón constante.

### Estudios de inhibición por los productos

Para un mecanismo Bi-Bi en secuencia ordenada se espera obtener una inhibición competitiva y tres no competitivas al estudiar la inhibición de cada producto con respecto a cada sustrato. Una de las inhibiciones no competitivas debiera transformarse en incompetitiva a altas concentraciones del otro sustrato. En el caso de un mecanismo Theorell-Chance, en el cual el nivel del complejo central (EAB-EPQ) en el régimen estacionario es muy bajo, la inhibición de P con respecto a B se transforma en competitiva y por lo tanto se obtienen dos inhibiciones competitivas y dos no competitivas. Si la reacción ocurre a través de un mecanismo al azar en equilibrio rápido, todas las inhibiciones por producto, deben ser de tipo competitivo (Cleland, 1970).

Para Pfk-2 se obtuvo sola una inhibición competitiva, la de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a fructosa-6-P, y tres inhibiciones no competitivas, las de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a ATP y las de ADP con respecto a ambos sustratos.

Para Pfk-2\* la única inhibición competitiva obtenida fue la de ADP con respecto a ATP, en tanto que la de ADP con respecto a fructosa-6-P y las de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a ATP y fructosa-6-P

fueron de tipo no competitivo. El valor de la  $K_i$  obtenido de la inhibición competitiva de ambas enzimas fue similar al realizar el experimento a dos concentraciones del sustrato fijo. Estos resultados apoyan un mecanismo en secuencia ordenada para ambas enzimas. Para Pfk-2 fructosa-6-P sería el primer sustrato que se une a la enzima y fructosa-1,6-P<sub>2</sub> el último producto que se libera, en tanto que para Pfk-2\* el primer sustrato que interactúa con la enzima sería ATP y ADP el último producto que se libera.

Sin embargo, la formación de complejos de punto muerto en un mecanismo al azar en equilibrio rápido, modifica los tipos de inhibición esperados. Por ejemplo, si se forma un complejo de punto muerto EBQ, Q actuaría como un inhibidor competitivo con respecto a A a todas las concentraciones de B, mientras que con respecto a B la inhibición sería de tipo no competitivo (Segel, 1975b). La inhibición no competitiva de ADP con respecto a ATP en el caso de Pfk-2 y de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> con respecto a fructosa-6-P, en el caso de Pfk-2\*, no se esperan en un mecanismo al azar en equilibrio rápido, aún con la formación de los complejos de punto muerto EAP y EBQ. Para ambas enzimas las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones, obtenidas de las gráficas de dobles recíprocos, en función de la concentración de inhibidor resultaron lineales, indicando la ausencia de estos complejos.

### **Inhibición por análogos de los sustratos**

Una de las aplicaciones más útiles de los estudios de inhibición con análogos de sustratos, es la de verificar el orden de adición de los sustratos a la enzima, en especial en los casos donde los estudios

de inhibición por producto no son concluyentes al respecto.

Para un mecanismo Bi-Bi en secuencia ordenada se espera que el análogo del segundo sustrato que se adiciona a la enzima presente una inhibición de tipo incompetitivo con respecto al primer sustrato. Por el contrario, en un mecanismo al azar en equilibrio rápido se espera obtener inhibición competitiva cuando el inhibidor es análogo del sustrato variable, e inhibición no competitiva cuando el inhibidor no es análogo del sustrato variado.

Para Pfk-2, ribosa 5-P, un análogo de fructosa-6-P, mostró una inhibición no competitiva con respecto a ATP, en tanto que la inhibición de AMP-PNP (un análogo de ATP) fue incompetitiva cuando fructosa-6-P fue el sustrato variable. Estos resultados confirman el mecanismo cinético de Pfk-2 propuesto anteriormente.

Thompson y Bachelard (1976) han examinado la relación existente entre el valor de la  $K_i$  aparente para inhibidores de punto muerto, obtenido a partir de diversas representaciones gráficas, y el valor de la  $K_i$  verdadera. Este último puede obtenerse sólo si se conoce con certeza el mecanismo cinético de la reacción y se escoge la representación gráfica apropiada. En el caso de un mecanismo en secuencia ordenada, es posible obtener el valor de la  $K_i$  verdadera, a partir de gráficas secundarias de pendientes, sólo si el inhibidor es competitivo con respecto al primer sustrato que se adiciona a la enzima.

En las Tablas 12 y 13 se muestran los valores de las constantes de inhibición para los análogos de sustratos de Pfk-2 y Pfk-2\*, respectivamente, obtenidos a partir de las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones. Si de los experimentos de inhibición de

Tabla 12

CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA INHIBICIÓN DE Pfk-2 POR RIBOSA-5-P

INHIBIDOR	SUSTRATO VARIABLE	$K_{is}$	$K_i (K_{is})^a$	$K_{ii}$	$K_i (K_{ii})^b$
		mM			
Ribosa-5-P	F6P	5,3	5,3	-	-
Ribosa-5-P	ATP	11,0	7,1	22	8,6
AMP-PNP	F6P	-	-	0,43	0,07
AMP-PNP	ATP	0,25	0,13	-	-

<sup>a</sup> Para la inhibición de ribosa-5-P con respecto a F6P,  $K_{is} = K_i$ . El valor de  $K_i$  para la inhibición de ribosa-5-P en relación a ATP fue calculado a partir de  $K_{is} = K_i (1 + A/K_{ia})$ . Para la inhibición de AMP-PNP con respecto a ATP se obtuvo de la relación  $K_{is} = K_i (1 + K_{ia}/A)$ .

<sup>b</sup> El valor de  $K_i$  para la inhibición de ribosa-5-P con respecto a ATP se calculó de  $K_{ii} = K_i (1 + A/K_a)$ , mientras que para la inhibición de AMP-PNP en relación a F6P se calculó de  $K_{ii} = K_i (1 + B/K_b)$ .

Tabla 13

## CONSTANTES CINÉTICAS PARA LA INHIBICIÓN DE Pfk-2\* POR AMP-PNP

INHIBIDOR	SUSTRATO VARIABLE	$K_{is}$	$K_i (K_{is})^a$	$K_{ii}$	$K_i (K_{ii})^b$
		mM			
AMP-PNP	ATP	0,24	0,24	-	-
AMP-PNP	F6P	0,65	0,19	0,85	0,23
Sorbitol-6-P	F6P	1,9	1,36	-	-
Sorbitol-6-P	ATP	-	-	3,1	0,98

<sup>a</sup> Para la inhibición de AMP-PNP con respecto a ATP,  $K_{is} = K_i$ . El valor de  $K_i$  para la inhibición de AMP-PNP en relación a F6P fue calculado a partir de  $K_{is} = K_i (1 + A/K_{ia})$ . Para la inhibición de sorbitol-6-P con respecto a F6P se obtuvo de la relación  $K_{is} = K_i (1 + K_{ia}/A)$ .

<sup>b</sup> El valor de  $K_i$  para la inhibición de AMP-PNP con respecto a F6P se calculó de  $K_{ii} = K_i (1 + A/K_a)$ , mientras que para la inhibición de sorbitol-6-P en relación a ATP se calculó de  $K_{ii} = K_i (1 + B/K_b)$ .

Pfk-2 por ribosa-5-P con respecto a ATP, y de Pfk-2\* por AMP-PNP con respecto a fructosa-6-P, se calcula el valor de  $K_i$  a partir de  $K_{is}$  y de  $K_i$  a partir de  $K_{ii}$ , tomando en cuenta los valores de  $K_{ia}$  y  $K_a$  de la Tabla 1, se observa que para ambas enzimas estos valores son muy similares (7,1 y 8,6 mM para Pfk-2 y 0,19 y 0,23 mM para Pfk-2\*, respectivamente). La diferencia entre estos valores se puede atribuir a la acumulación de los errores experimentales en la determinación de  $K_{is}$ ,  $K_{ii}$ ,  $K_{ia}$  y  $K_a$ . Una diferencia significativa entre el valor de  $K_i$  obtenido de  $K_{is}$  y el de  $K_i$  obtenido de  $K_{ii}$  sería compatible con un mecanismo al azar en el que  $K_i$  de  $K_{is}$  fuera la constante de disociación del complejo enzima-inhibidor y  $K_i$  de  $K_{ii}$  la constante de disociación del inhibidor del complejo ternario E-S-I.

Se ha sugerido que AMP-PNP se asemeja a ATP en su interacción con el sitio activo de meromiosina pesada, ya que la  $K_i$  para este análogo es casi idéntica a la  $K_m$  para ATP, lo que refleja la gran similitud entre ambos compuestos (Yount y col., 1971b). Para Pfk-2 y Pfk-2\* los valores de la  $K_i$  verdadera para la inhibición de AMP-PNP con respecto a ATP son de 0,13 mM (Tabla 12) y 0,24 mM (Tabla 13) respectivamente. Estos valores son aproximadamente entre 5 y 10 veces mayores que los respectivos valores de  $K_m$  para ATP. Considerando la gran similitud que existe entre AMP-PNP y ATP (Larsen y col., 1969) la diferencia entre los valores de  $K_i$  para el análogo y la  $K_m$  para ATP de Pfk-2 y Pfk-2\* sugiere que el sitio de unión para nucleótidos de ambas enzimas, es altamente específico. Esto está apoyado por los resultados de la Tabla 8, los cuales muestran que los valores de las  $K_m$  de Pfk-2 y Pfk-2\* para otros nucleótidos, son al menos un orden de magnitud mayores que el

correspondiente a ATP. Por otro lado, estudios de la interacción de AMP-PNP con fosfofructoquinasa de músculo muestran que este compuesto se une a la enzima a un sitio de alta afinidad ( $K_d = 1 \mu\text{M}$ ) y a uno de baja afinidad ( $K_d = 100 \mu\text{M}$ ), los que corresponderían al sitio catalítico y al regulatorio, respectivamente (Wolfman y col., 1978).

Para Pfk-2\*, sorbitol-6-P fue un inhibidor competitivo con respecto a fructosa-6-P. Para este inhibidor las gráficas secundarias de pendientes e intersecciones resultaron lineales lo que indica la ausencia de complejos de punto muerto. Por otra parte, la inhibición de sorbitol-6-P con respecto a ATP es incompetitiva, hecho que confirma que este es el primer sustrato que se adiciona a la enzima.

Para Pfk-2, ribosa-5-P mostró una inhibición competitiva con respecto a fructosa-6-P, en tanto que para Pfk-2\* esta inhibición fue no competitiva. En el caso de Pfk-2\*, la inhibición no competitiva de ribosa-5-P con respecto a fructosa-6-P podría surgir por unión de la ribosa-5-P al sitio del ATP en la enzima libre, o por unión tanto a la enzima libre (E) como al complejo enzima-ATP. En este último caso debería obtenerse gráficas secundarias de pendientes no lineales. Sin embargo, para ambas enzimas estas gráficas fueron lineales.

### **Mecanismo cinético de fosfofructoquinasas de otras fuentes**

El mecanismo cinético de la fosfofructoquinasa de diversas fuentes ha sido motivo de intensa investigación, pero los resultados aún son contradictorios (Bloxham y Lardy, 1973; Uyeda, 1979). En la mayoría de los casos la enzima presenta una cinética de saturación sigmoideal con respecto a fructosa-6-P e inhibición por ATP (Sols y col., 1981). Para

eliminar los problemas derivados de la cinética no Michaeliana y de la inhibición por ATP, se han usado diversos enfoques. Entre estos están el estudio del mecanismo cinético de fosfofructoquinasas no alostéricas (Baumann y Wright, 1968; Simon y Hofer, 1978), el cambio del pH de la mezcla de reacción (Kee y Griffin, 1972; Hanson y col, 1973), el uso de ITP en vez de ATP como sustrato (Uyeda, 1970) y el estudio de la reacción reversa (Lorenson y Mansour, 1968).

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

Se han propuesto varios mecanismos para las distintas fosfofructoquinasas estudiadas y aún mecanismos contradictorios para la enzima de la misma fuente (Kee y Griffin, 1972; Hanson y col., 1973). Para la enzima proveniente de músculo de conejo (Uyeda, 1970), levadura (Viñuela y col., 1963), Dictyostelium discoideum (Baumann y Wright, 1968), músculo esquelético humano y eritrocito humano (Layzer y col., 1969), hígado de ternera (Lou y Kinoshita, 1967) y Flavobacterium thermophilum (Yoshida, 1972), se han descrito líneas paralelas en gráficas de dobles recíprocos obtenidas a partir de estudios en velocidad inicial. El estudio de la reacción reversa catalizada por la enzima de corazón de oveja, muestra resultados similares (Lorenson y Mansour, 1968). Sin embargo, este tipo de resultado no es una prueba concluyente de que el mecanismo cinético sea de tipo Ping-Pong. Es así como la detección de convergencia en las gráficas de los estudios en velocidad inicial, está

limitada tanto por el error experimental en la determinación de las constantes cinéticas, como por la magnitud del término que representa una constante en el denominador de la ecuación de velocidad. Cuando el término  $K_{ia}$  presente en el denominador es mucho más pequeño que  $K_a$  las rectas en las gráficas de dobles recíprocos aparecen como paralelas, aún para un mecanismo en secuencia.

Bar-Tana y Cleland (1974a) realizaron estudios en velocidad inicial con fosfofructoquinasa de músculo de conejo, usando una serie de nucleótidos como sustratos. Para la reacción directa, la mayoría de las gráficas de dobles recíprocos presentan líneas paralelas, excepto aquellas en que se usó ITP o CTP como sustrato, indicando que para estos últimos el cociente entre la constante de inhibición ( $K_{ia}$ ) y la constante de Michaelis ( $K_a$ ) es más favorable. Previamente, Uyeda (1970) había sugerido un mecanismo de tipo Ping-Pong para esta enzima, basado en experimentos de inhibición por producto e intercambio isotópico. Sin embargo, el mismo autor (1972) al estudiar la actividad fructosa-1-P quinasa de la fosfofructoquinasa de músculo de conejo, informó resultados compatibles con un mecanismo en secuencia ordenada.

Por otra parte, Hanson y col. (1973) sugirieron un mecanismo al azar, basándose principalmente en los estudios por análogos de los sustratos en los cuales arabinosa 5-P, un análogo de fructosa-6-P, fue un inhibidor no competitivo con respecto a ATP para la reacción directa y no competitivo con respecto a ADP en la reacción reversa. En cambio, Bar-Tana y Cleland (1974b) mediante experimentos de inhibición por producto y de inhibición de punto muerto por 1-desoxi-D-fructosa-6-P y por el complejo CrATP, establecieron que el mecanismo cinético de la

fosfofructoquinasa de músculo de conejo era al azar, con la formación de un complejo de punto muerto E-MgADP-F6P. Un mecanismo similar, pero con la formación de dos complejos de punto muerto (E-ATP-FDP y E-ADP-F6P) fue propuesto por Kee y Griffin (1972) usando como método de ensayo la titulación de los  $H^+$  producidos en la reacción fosfofructoquinásica. Aún más, para la enzima de corazón de buey, Hulme y Tipton (1971) postularon un mecanismo Theorell-Chance, basándose en los resultados obtenidos de experimentos de intercambio isotópico. Para la enzima de hígado de rata, Brand y Söling (1974) informaron un mecanismo en secuencia ordenada, en el cual fructosa-6-P es el primer sustrato que se une a la enzima y fructosa-1,6-P<sub>2</sub> es el último producto que se libera. Este es también el mecanismo propuesto para la fosfofructoquinasa no alostérica de Lactobacillus plantarum (Simon y Hofer, 1978), el que concuerda con el propuesto en esta Tesis para Pfk-2 de E. coli. Kotlarz y Buc (1981), basándose en estudios de sitios de unión mediante experimentos de diálisis de equilibrio, sugirieron el mismo mecanismo cinético para esta enzima. Estos investigadores encontraron que ATP no se une a la enzima en ausencia de fructosa-6-P. Por otra parte, el mecanismo cinético de Pfk-2\* es igual al descrito por Blangy (1971) para Pfk-1 de E. coli quien no detectó intercambio isotópico significativo entre ningún par de sustratos.

#### EFEECTO DE ATP SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS

Al igual que para muchas de las fosfofructoquinasas estudiadas (Bloxham y Lardy, 1973; Ewings y Doelle, 1980), el sustrato verdadero de Pfk-2 y Pfk-2\* es  $MgATP^{-2}$ ; esto es, la actividad de ambas enzimas

aumenta al aumentar la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$ , en condiciones donde la concentración de  $\text{ATP}^{-4}$  es despreciable. El valor de la  $K_m$  aparente para este sustrato es similar, para ambas enzimas, al informado anteriormente usando un exceso constante de  $\text{Mg}^{+2}$  (10 mM) (Campos y col., 1984). Por otra parte, la presencia de un exceso de  $\text{Mg}^{+2}$  no modificó significativamente la curva de saturación de Pfk-2 y Pfk-2\* por  $\text{MgATP}^{-2}$ . Solo Pfk-2 es inhibida por  $\text{MgATP}^{-2}$  a concentraciones sobre 1 mM, en ausencia de  $\text{ATP}^{-4}$ . Esta inhibición es cooperativa y el valor de  $K_i$  aumenta al aumentar la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre.

Por otra parte,  $\text{ATP}^{-4}$  es un potente inhibidor competitivo, con respecto a  $\text{MgATP}^{-2}$ , de Pfk-2 y Pfk-2\*. Los valores de  $K_i$  para estas inhibiciones son de 10 y 8  $\mu\text{M}$  respectivamente, los que son aproximadamente dos a tres órdenes de magnitud menores que el valor de  $K_i$  para la inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$ . Además, la inhibición de ambas enzimas por  $\text{ATP}^{-4}$  no es revertida por un aumento en la concentración de fructosa-6-P, a diferencia de lo que ocurre con la inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$ .

Estos resultados sugieren la presencia de un sitio alostérico para  $\text{MgATP}^{-2}$  en Pfk-2 responsable de la inhibición de esta enzima, el que estaría alterado en Pfk-2\* como consecuencia de la mutación estructural pfkB10. Este sitio parece ser específico para  $\text{MgATP}^{-2}$ , ya que otros complejos  $\text{Mg}^{+2}$ -nucléotido producen una inhibición menor a concentraciones similares a las de  $\text{MgATP}^{-2}$ . La  $K_i$  para el complejo  $\text{MgATP}^{-2}$  en este sitio, determinada a la concentración menor de  $\text{Mg}^{+2}$  libre (1 mM), es diez veces mayor que el valor de la  $K_m$  para  $\text{MgATP}^{-2}$  de Pfk-2. Con estos

antecedentes es posible diferenciar fácilmente el sitio catalítico del sitio alostérico de Pfk-2 (Guixé y Babul, 1985).

La inhibición por ATP es una característica común a casi todas las fosfofructoquinasas estudiadas (Bloxham y Lardy, 1973). Sin embargo, solo en muy pocos casos se ha realizado un estudio cinético detallado para obtener información acerca de la especie(s) inhibitoria(s). Lowry y Passoneau (1966) encontraron que la enzima de cerebro de oveja es mucho más inhibida por  $\text{ATP}^{-4}$  que por  $\text{MgATP}^{-2}$ . Este resultado concuerda con lo obtenido por Otto y col. (1974), quienes aplicando el modelo de Monod-Wyman-Changeux informaron que la enzima de eritrocito de rata es inhibida por  $\text{ATP}^{-4}$ , efector que se une al estado T, con una  $K_d$  de 10  $\mu\text{M}$ . Esta inhibición puede ser revertida por  $\text{Mg}^{+2}$  el cual inhibe la actividad enzimática a altas concentraciones. Aparentemente, la inhibición por  $\text{ATP}^{-4}$  de esta enzima, tendría un rol regulador importante ya que en eritrocitos la concentración de ATP no acomplejado es aproximadamente 180  $\mu\text{M}$  (Gerber y col., 1973), lo que implica que en condiciones fisiológicas la enzima estaría casi totalmente inhibida. La fosfofructoquinasa de eritrocito humano, (Etiemble y col. 1981) también es más inhibida por  $\text{ATP}^{-4}$  que por  $\text{MgATP}^{-2}$ , en tanto que la inhibición por este último disminuye al aumentar la concentración de  $\text{Mg}^{+2}$  libre, en condiciones donde la concentración de  $\text{ATP}^{-4}$  es despreciable.

La fosfofructoquinasa de músculo posee tres sitios de unión para nucleótidos: el sitio activo, un sitio inhibitorio y un sitio activador (Pettigrew y Frieden, 1979). A partir de estudios cinéticos (Uyeda y Racker, 1965) y de cambios conformacionales basados en la reactividad de grupos tioles (Kemp, 1969) se ha demostrado que el sitio catalítico

de esta enzima, es capaz de aceptar diversos nucleósido-trifosfatos, además de ATP, como sustratos, mientras que el sitio inhibitorio es más bien específico para  $\text{MgATP}^{-2}$ . Los resultados presentados en esta Tesis apoyan una conclusión similar para Pfk-2.

Resultados de los trabajos de varios investigadores (Pettigrew y Frieden, 1979; Kemp, 1969; Kemp y Krebs, 1967; Wolfman y col., 1978), sugieren que el complejo  $\text{MgATP}^{-2}$  se une fuertemente a los sitios catalítico e inhibitorio de la fosfofructoquinasa de músculo, pero débilmente al sitio activador. Sin embargo, no está claro si  $\text{MgATP}^{-2}$  se une al sitio inhibitorio más fuertemente que  $\text{ATP}^{-4}$ . Aunque  $\text{ATP}^{-4}$  parece inhibir a la enzima más fuertemente que  $\text{MgATP}^{-2}$ , no se ha demostrado que esta inhibición es alostérica, en vez de por competencia con el sustrato nucleotídico en el sitio activo, como en el caso de Pfk-2 (esta Tesis).

Estudios conformacionales basados en reactividad de grupos tioles indican que el complejo  $\text{MgATP}^{-2}$  (Mathias y Kemp, 1972; Kemp, 1969) se une al sitio inhibitorio de la enzima de músculo más fuertemente que  $\text{ATP}^{-4}$ . La afinidad de la enzima por  $\text{ATP}^{-4}$ , en este sitio, es aproximadamente 100 veces menor que la por  $\text{MgATP}^{-2}$ . Sin embargo, Pettigrew y Frieden (1979) basados en estudios de fluorescencia, encontraron que el sitio inhibitorio de esta enzima es relativamente específico para  $\text{ATP}^{-4}$  o  $\text{MgATP}^{-2}$  y que la unión de  $\text{ATP}^{-4}$  es alrededor de 10 veces más fuerte que la de  $\text{MgATP}^{-2}$ . Por otra parte, la inhibición alostérica por ATP de la fosfofructoquinasa de levadura depende de la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  y no de la concentración de  $\text{ATP}^{-4}$ . Esta enzima utiliza además el complejo metal-nucleótido como sustrato y requiere de  $\text{Mg}^{+2}$  libre para

la catálisis (Mavis y Stellwagen, 1970).

AMP, ADP y cAMP son potentes activadores de las fosfofructoquinasas de mamíferos y su efecto es notorio en presencia de concentraciones inhibitorias de ATP. Para las enzimas de hígado, músculo y cerebro de conejo, cAMP es el activador más efectivo. Tsai y Kemp (1974), al estudiar la enzima de cerebro en condiciones inhibitorias (fructosa-6-P 1 mM y ATP 8,5 mM), informaron un valor de  $K_a$  de alrededor de 0,1 mM para AMP y uno de 0,05 mM para cAMP. El hecho que AMP, cAMP y ADP, estudiados en un rango amplio de concentraciones (comparado con las concentraciones efectivas informadas para las enzimas de mamíferos), no son capaces de revertir la inhibición de Pfk-2 de E. coli por  $MgATP^{-2}$ , sugiere que probablemente esta enzima carece del sitio activador para nucleótidos presente en otras fosfofructoquinasas.

El pH de medio de ensayo y la naturaleza del amortiguador usado son factores importantes para demostrar la inhibición por ATP (Uyeda y Racker, 1965; Trivedi y Danforth, 1966). Para la enzima de músculo no se observa inhibición a pH 9,0 pero bajo pH 7,0 la inhibición aumenta considerablemente. Además, esta inhibición es mucho mayor en imidazolio que en fosfato. La fosfofructoquinasa de corazón también es menos inhibida a pH alcalino (Mansour, 1963). En cambio, Pfk-2 de E. coli, al igual que la fosfofructoquinasa de levadura (Lindell y Stellwagen, 1968), muestra el fenómeno contrario, esto es, la enzima es más sensible a la inhibición por  $MgATP^{-2}$  a valores de pH alcalinos. Sin embargo, a valores de pH menores que 7,0, la concentración de otras especies iónicas de ATP ( $MgHATP^{-1}$ ,  $HATP^{-3}$ ) aumenta significativamente. A pH 5,5 la concentración de  $MgHATP^{-1}$  y  $HATP^{-3}$  es aproximadamente la

mitad de la de  $\text{MgATP}^{-2}$  (Storer y Cornish-Bowden, 1976). Por lo tanto, una explicación posible para los resultados obtenidos al variar el pH del medio de reacción de Pfk-2, es que el sitio alostérico para  $\text{MgATP}^{-2}$ , responsable de la inhibición de la enzima por este compuesto, sea altamente específico para una especie iónica particular ( $\text{MgATP}^{-2}$ ).

#### ESTADOS DE AGREGACION

El estudio del efecto de ligandos en el estado de agregación de Pfk-2 y Pfk-2\* muestra que solo Pfk-2 es capaz de tetramerizar en presencia del inhibidor  $\text{MgATP}^{-2}$ . Un aumento en la concentración de fructosa-6-P (1 mM) impide este proceso y a la vez revierte la inhibición de la enzima por el complejo metal-nucleótido.

$\text{ATP}^{-4}$ , un fuerte inhibidor competitivo de Pfk-2 y Pfk-2\* no provoca la tetramerización de ninguna de ellas, indicando que probablemente este compuesto se une sólo al sitio activo de ambas enzimas.

Al estudiar el rango de concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  necesario para promover la tetramerización de Pfk-2, se encuentra que a concentraciones bajas del complejo (0,04 y 0,06 mM), la enzima sedimenta como un dímero, en tanto que a concentraciones de 0,4 mM y mayores, el pico de sedimentación es el correspondiente a un tetrámero. Sin embargo, a concentraciones intermedias de  $\text{MgATP}^{-2}$  el pico de sedimentación de Pfk-2 es asimétrico y más ancho y su posición en el gradiente se desplaza hacia la región de pesos moleculares mayores.

La presencia de solo un pico de sedimentación en este tipo de experimentos puede explicarse basándose en la teoría de Gilbert

(Frieden, 1971), quien postula que un sistema monómero-dímero resultará en solo un pico de sedimentación, a menos que la velocidad de equilibrio entre las dos especies sea lenta comparada con la velocidad de sedimentación. El coeficiente de sedimentación de este pico será entonces un promedio ponderado de los coeficientes de sedimentación del dímero y del monómero. También es posible que no exista homogeneidad, con respecto al número de picos observados en un sistema de equilibrio rápido entre las especies, si se establece un gradiente de concentración de una molécula pequeña durante el experimento, cuya unión influya en la reacción de asociación-disociación. Este gradiente podría establecerse, por ejemplo, si la unión de esta molécula pequeña es relativamente fuerte y si su concentración no es mucho mayor que la concentración de proteína.

En nuestro caso, la unión de  $\text{MgATP}^{-2}$  a Pfk-2 parece no ser muy fuerte ( $K_i$  en el rango milimolar) y además la concentración de proteína es mucho menor que la concentración de ligando, de modo que la explicación más probable para nuestros resultados es que existe una velocidad de equilibrio rápida entre las dos especies (dímero-tetrámero) comparada con la velocidad de sedimentación. Sin embargo, la concentración de  $\text{MgATP}^{-2}$  necesaria para promover la tetramerización de Pfk-2 (mayor que 0,06 mM) es menor que la constante de inhibición aparente para este complejo ( $K_i = 1,5$  mM). Esto podría deberse en parte, a la presencia de fructosa-6-P en el medio de ensayo, el cual favorece la especie dimérica.

Ninguno de los productos de la reacción ( $\text{ADP}$ , fructosa-1,6- $\text{P}_2$ ) es

capaz de promover la tetramerización de Pfk-2. Sin embargo, el agregado de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> 1 mM a soluciones de Pfk-2 con MgATP<sup>-2</sup> 1 mM, promueve la disociación de tetrámero a dímero. Por otra parte, el efecto de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> sobre la inhibición de Pfk-2 por MgATP<sup>-2</sup> aún no es muy claro. A concentraciones de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> de 1 mM, la inhibición de Pfk-2 por el complejo metal-nucleótido es ligeramente menor que en ausencia del producto. A una concentración de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> de 4 mM, Pfk-2 no presenta inhibición por MgATP<sup>-2</sup>, pero en estas condiciones la inhibición causada por el azúcar bisfosfato es muy pronunciada (Guixé y Babul, experimentos no publicados).

Kotlarz y Buc (1981) han informado algunos resultados diferentes a los presentados en esta Tesis con respecto al efecto de metabolitos en el estado de agregación de Pfk-2 de E. coli. Estos autores también encontraron que el coeficiente de sedimentación de la enzima cambia desde 4,4 S (dímero) a 7,4 S (tetrámero) en presencia de MgATP<sup>-2</sup>. Sin embargo, al estudiar el efecto de la concentración de MgATP<sup>-2</sup> en el estado de agregación de Pfk-2 observan dos picos discretos de actividad, correspondientes al dímero y al tetrámero. Esto indica una velocidad de equilibrio lenta entre las dos especies, comparada con la velocidad de sedimentación. Otra diferencia importante está relacionada con el efecto de metabolitos en el estado de agregación de Pfk-2. Kotlarz y Buc encuentran que diversos análogos de ATP (dATP, ITP, UTP, GTP y ADP) son capaces de promover la tetramerización de Pfk-2.

La fosfofructoquinasa de músculo puede existir en varias formas poliméricas interconvertibles. Lad y col. (1973) encontraron una correlación cuantitativa entre la actividad específica de la fosfofructoquinasa

de músculo de conejo y su estado de agregación. Activadores de la enzima, tales como fructosa-6-P y fructosa-1,6-P<sub>2</sub>, estabilizan la forma tetramérica mientras que citrato estabiliza agregados menores. La forma tetramérica y agregados mayores tendrían la mayor actividad específica, en tanto que los agregados más pequeños tendrían una actividad enzimática baja. La idea que la unión de ligandos específicos sea directamente responsable de la estabilización de un estado de agregación particular, se apoya en el hecho que la reducción de la concentración de fructosa-6-P por bajo el valor de su  $K_m$ , trae como consecuencia la disociación e inactivación de la enzima. Además, la inactivación y despolimerización causada por citrato puede ser revertida por fructosa-6-P. Por otro lado,  $MgATP^{-2}$ , un inhibidor de la enzima, no causa su despolimerización, lo que sugiere que su mecanismo de inhibición difiere del de citrato. Aún en condiciones donde la concentración de  $Mg^{2+}$  es 10 veces menor que la de ATP, se obtiene esencialmente la forma tetramérica, indicando que esta especie no es estabilizada por  $Mg^{+2}$  libre.

Bock y Frieden (1976a; 1976b) han propuesto que la activación o inactivación de la enzima depende de la protonación o desprotonación de ciertos grupos ionizables en el tetrámero. Los ligandos ejercerían su efecto regulatorio uniéndose preferentemente a la forma protonada (inactiva) o a la forma desprotonada (activa) de la enzima, cambiando así el pK aparente de un grupo ionizable importante de la proteína. Los autores proponen que ATP se uniría a la forma inactiva T, mientras que fructosa-6-P se uniría a la forma activa R. Citrato ejercería su efecto inhibitorio a través de cambios en la afinidad de la enzima por fructosa-6-P. Aún más, en el modelo propuesto se supone que el fenómeno

de asociación de las subunidades de fosfofructoquinasa no tendría relación con la regulación de la actividad enzimática debido a que la constante de velocidad que gobierna el proceso es aparentemente baja (Frieden y col., 1976).

Hesterberg y Lee (1982) realizaron un análisis cuantitativo del efecto de ligandos en el equilibrio de las distintas formas de fosfofructoquinasa, en un intento por determinar si los cambios en la distribución de masa de esta enzima se correlacionaban con los observados en la actividad enzimática, suponiendo que el tetrámero es la forma activa más pequeña y que los oligómeros menores son inactivos. Estos autores proponen el siguiente modelo general de asociación:  $M - M_2 - M_4 - M_{16}$ . Distintos ligandos modifican las diversas constantes de equilibrio, pero no las especies presentes. ATP, fructosa-6-P y ADP favorecen la constante de equilibrio correspondiente a la formación del tetrámero, en tanto que citrato favorece la formación de dímeros. Los resultados presentados por estos autores sugieren que el estado polimérico de fosfofructoquinasa y, por lo tanto, su actividad, están regulados a través del equilibrio asociación-disociación. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que los ligandos estudiados tengan también un efecto cinético sobre la enzima. A una conclusión similar llegaron Hill y Hammes (1975) quienes demostraron que las interacciones homotrópicas entre fructosa-6-P pueden dar origen a cooperatividad positiva, negativa o ausencia de cooperatividad, dependiendo del pH, del estado de agregación de la enzima y de los efectores presentes.

Por otra parte, Luther y col. (1983) aportaron las pruebas necesarias para establecer la existencia de una forma tetrámerica

inactiva de fosfofructoquinasa (13,5 S). Anteriormente, Hesterberg y Lee (1980) demostraron que la forma activa de fosfofructoquinasa sedimentaba como una partícula de 12,4 S. Estudios posteriores de los mismos autores (1981) mostraron que esta forma correspondía al tetrámero. Hasta ese momento, la existencia de una forma tetrámerica inactiva de la enzima había sido inferida solo a partir de simulaciones computacionales de los datos de sedimentación (Hesterberg y Lee, 1981, 1982). Todos los metabolitos estudiados interactúan con la forma inactiva de fosfofructoquinasa e inducen su asociación o disociación de manera cualitativamente similar a la observada en la enzima nativa. Sin embargo, concentraciones saturantes de sustrato no provocan la formación del tetrámero de 12,4 S observado en el caso de la enzima nativa, lo que sugiere que aunque los sustratos promueven la asociación de las subunidades inactivas, no inducen la conversión del tetrámero inactivo de 13,5 S al activo de 12,4 S (Luther y col., 1983). Todos estos resultados indican que la regulación de la actividad de fosfofructoquinasa estaría dada, al menos en parte, por cambios en su estructura cuaternaria. Lad y col. (1973) han sugerido que bajo condiciones fisiológicas la regulación de esta enzima, a través de reacciones de polimerización-despolimerización, sería bastante rápida, con una vida media de un minuto o menos.

Por otra parte, la fosfofructoquinasa de músculo de conejo intercruzada con dimetilsuberimidato no presenta interacciones homotrópicas entre los sitios de unión para fructosa-6-P, a diferencia de la enzima nativa, pero es capaz de ser activada por efectores alostéricos tales como AMP o cAMP (Lad y Hammes, 1974). Además, la enzima intercruzada es inhibida por  $MgATP^{-2}$  y citrato, aunque el mecanismo de inhibición por

estos compuestos es diferente. Por una parte,  $MgATP^{-2}$  estabiliza la forma tetramérica de la enzima en tanto que citrato ejerce su efecto inhibitor despolimerizándo la enzima en dímeros inactivos, disminuyendo la  $V_{max}$  de la reacción (Lad y Hammes, 1974), disminuyendo la unión de fructosa-6-P a la enzima, o estos dos últimos a la vez (Hill y Hammes, 1975).

Todos estos resultados sugieren que la regulación de la actividad de la fosfofructoquinasa de músculo es muy compleja e involucra mecanismos tales como interacciones homotrópicas, heterotrópicas y reacciones de polimerización-despolimerización.

Reinhart y Lardy (1980a), estudiaron la actividad de fosfofructoquinasa de hígado en condiciones cercanas a las fisiológicas y concluyeron que ésta corresponde a un pequeño porcentaje de la actividad total disponible, el cuál es insuficiente para permitir su funcionamiento a los niveles fisiológicos de fructosa-6-P. Estos autores proponen que en la célula existiría una mezcla de tetrameros y agregados mayores de la enzima, en la cual estos últimos predominan. Estos agregados poseerían mayor afinidad por fructosa-6-P de modo que la enzima sería activa a las concentraciones bajas de este metabolito existente en la célula. Este es el mecanismo por el cual se daría cuenta de la actividad fosfofructoquinásica observada in vivo (Reinhart y Lardy, 1980b; 1980c). Hofer (1971) propuso un modelo similar para la fosfofructoquinasa de músculo de conejo, en el cual las formas agregadas de la enzima poseen propiedades cinéticas alteradas, esto es, aumento en la afinidad por fructosa-6-P y disminución de la inhibición por ATP.

En el caso de Pfk-2 de E. coli, la regulación de la actividad enzimática (inhibición por  $MgATP^{-2}$ ) conlleva un cambio en el estado de

agregación con la formación de agregados mayores. Una situación similar se observa para hexoquinasa de cerebro, la cual dimeriza en presencia del inhibidor glucosa-6-P (Chakrabarti y Kenkare, 1974; Easterby, 1975).

La formación del tetrámero de Pfk-2 de E. coli en respuesta a  $\text{MgATP}^{-2}$  podría surgir por dos mecanismos: 1) unión de  $\text{MgATP}^{-2}$  a una especie minoritaria preexistente (tetrámero), desplazando así el equilibrio en su favor y 2) inducción de un cambio conformacional en la enzima por  $\text{MgATP}^{-2}$  que la hace susceptible a la tetramerización. Los estudios presentados anteriormente no nos permiten distinguir entre estas posibilidades. Sin embargo, el hecho que en ningún sistema (gradiente de sacarosa, electroforesis en geles de poliacrilamida) se haya observado la especie tetrámerica, hacen más plausible la segunda alternativa.

La dimerización de hexoquinasa de cerebro producida por glucosa-6-P correspondería al mecanismo propuesto en el punto uno, ya que en ausencia de ligandos el 9% de la proteína se encuentra como dímero y el 91% restante como monómero (Easterby, 1975).

La actividad específica de la forma tetramérica de Pfk-2 de E. coli es difícil establecer. Los experimentos de ultracentrifugación zonal en gradiente de sacarosa, en presencia de  $\text{MgATP}^{-2}$  1 mM, dan como resultado la presencia de un solo pico de sedimentación correspondiente al tetrámero. En experimentos cinéticos, a concentraciones similares de  $\text{MgATP}^{-2}$ , Pfk-2 aún mantiene aproximadamente un 50% de su actividad, lo que permitiría suponer que la especie tetramérica no es totalmente inactiva. Sin embargo, esta correlación entre experimentos de sedimenta-

ción y experimentos cinéticos no es estrictamente válida, debido principalmente a las distintas concentraciones de proteína usadas en cada caso y a la presencia de fructosa-6-P en los experimentos cinéticos, el cual afecta el equilibrio dímero-tetrámero.

#### DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE Pfk-2 Y Pfk-2\*

Los estudios presentados en esta tesis sugieren que Pfk-2 y Pfk-2\* difieren estructuralmente. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio muestra que ambas enzimas poseen movilidades electroforéticas similares, lo que indica que sus subunidades no presentan grandes diferencias en masa molecular (Retamal y Babul, comunicación personal).

Diversas pruebas experimentales contribuyeron a establecer la naturaleza de las diferencias estructurales entre Pfk-2 y Pfk-2\*. Una de ellas fue el estudio del mecanismo cinético, el cual indicó que ambas enzimas poseen un mecanismo en secuencia ordenada con un orden diferente de adición de sustratos y salida de productos. Otra de las pruebas proviene de los estudios cinéticos de la inhibición de Pfk-2 por  $\text{MgATP}^{-2}$  y de los cambios en su estado de agregación en respuesta a este ligando. A partir de estos resultados es posible sugerir la presencia de un sitio alostérico inhibitorio para  $\text{MgATP}^{-2}$  en Pfk-2, el cual estaría alterado en Pfk-2\* como consecuencia de la mutación estructural pfkB10. Este sitio estaría además relacionado con la formación de una especie tetramérica de la enzima, la cual sería menos activa.

REGULACION DE Pfk-2 Y Pfk-2\* IN VIVO

Pfk-2 de E. coli fue inicialmente descrita como una enzima "no-alostérica" (Fraenkel y col., 1973; Babul, 1978), sin embargo los resultados expuestos anteriormente indican que posee mecanismos reguladores. Asimismo, estos resultados permiten explicar que cepas de E. coli que contienen solamente Pfk-1 o Pfk-2 en cantidades comparables tengan velocidades de crecimiento similares en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Robinson y Fraenkel, 1978).

Por otra parte, cepas de E. coli carentes de Pfk-1 y con altos niveles de Pfk-2 crecen bien en azúcares y en compuestos gluconeogénicos, en tanto que cepas isogénicas con altos niveles de Pfk-2\* crecen lentamente en estos últimos metabolitos. En condiciones de crecimiento gluconeogénicas, el crecimiento deficiente de las cepas que contienen Pfk-2\* está asociado a niveles altos de fructosa-1,6-P<sub>2</sub> y niveles muy bajos de hexosa -monofosfatos. Por el contrario, en estas mismas condiciones, el nivel de hexosas monofosfato presentes en cepas que contienen Pfk-2 es normal (Daldal y col., 1982). El hecho que una alteración (producto de una mutación) en Pfk-2 cause una alteración del crecimiento en azúcares y en compuestos gluconeogénicos de las cepas que la poseen, es una indicación del significado de su función in vivo.

Aún cuando los resultados del estudio de las características cinéticas de ambas enzimas no permite explicar la diferencia de crecimiento entre las cepas que contienen Pfk-2 y Pfk-2\*, es posible, a partir de ellos, proponer algunos mecanismos por los cuales esta alteración fisiológica se llevaría a cabo. Uno de ellos está relacionado

con la menor inhibición de Pfk-2\*, comparada con Pfk-2, por fructosa-1,6-P<sub>2</sub> y MgATP<sup>-2</sup>, aún cuando la susceptibilidad de Pfk-2 a la inhibición por este último metabolito es mucho más acentuada que la de fructosa-1,6-P<sub>2</sub>. Durante el crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas la ausencia de inhibición de Pfk-2\* podría causar una conversión excesiva de fructosa-6-P a fructosa-1,6-P<sub>2</sub> y por lo tanto una deficiencia de fructosa-6-P o ATP, generando un ciclo fútil. Cabe hacer notar sin embargo, que bajo estas condiciones el ciclo fútil detectado fue marginal (Daldal y Fraenkel, 1983).

Otra explicación posible es que Pfk-2 o Pfk-2\* tuvieran algún rol en la reacción catalizada por la fructosa-bisfosfatasa. Aunque Pfk-1 y Pfk-2 son capaces de realizar muy lentamente la reacción reversa, ellas no pueden sustituir fisiológicamente a la fructosa-bisfosfatasa. Aun más, cepas silvestres para fructosa-bisfosfatasa (fdp<sup>+</sup>) contienen niveles similares de esta enzima independientemente de si ellas contienen Pfk-1, Pfk-2 o Pfk-2\*, o ninguna fosfofructoquinasa. Por otra parte, también es posible que exista algún tipo de interacción no genética entre fosfofructoquinasa y fructosa-bisfosfatasa, de modo que esta asociación física afecte la actividad de ambas enzimas. Una asociación de este tipo ha sido descrita por Uyeda y Luby (1974) para fosfofructoquinasa de músculo de conejo. Estos autores encuentran que la fructosa-bisfosfatasa es capaz de aumentar la inhibición de fosfofructoquinasa por ATP, citrato y 3-P-glicerato. Resultados similares han sido informados por Pontremoli y col. (1979) y por MacGregor y col. (1980) para fructosa-1,6-bisfosfatasa y fructosa-1,6-bisfosfatasa aldolasa de hígado de conejo. También Ovadi y Keleti (1978) y Ovadi y col. (1978) han

proporcionado pruebas cinéticas y fisicoquímicas para la interacción entre aldolasa y gliceraldehído-3-P deshidrogenasa de músculo de conejo. Ahora que la fructosa-bisfosfatasa de E. coli ha sido purificada (Babul y Guixé, 1984), será posible estudiar la interacción de esta enzima con Pfk-2 y Pfk-2\* y las consecuencias de esta interacción.

Aún cuando es posible establecer algunas correlaciones entre las características cinéticas de las enzimas y la alteración en el crecimiento de las cepas que las contienen, aún quedan muchos aspectos por resolver, en especial en cuanto a la magnitud y naturaleza del cambio estructural producido en Pfk-2 por la mutación pfkB10, el que se traduce específicamente en un cambio en el mecanismo cinético de la reacción catalizada por la enzima y en la ausencia de un sitio alostérico inhibitorio para  $MgATP^{-2}$  en Pfk-2\*.

## REFERENCIAS

- Aaronson, R.P. y Frieden, C. (1972). Rabbit muscle phosphofructokinase: studies on the polymerization. The behavior of the enzyme at pH 8, pH 6, and intermediate pH values. *J. Biol. Chem.* 247, 7502-7509.
- Aisenberg, A.C., Reinafarje, B. y Potter, V.R. (1957). Studies on the Pasteur effect. I. General observations. *J. Biol. Chem.* 224, 1099-1113.
- Aisenberg, A.C. y Potter, V.R. (1957). Studies on the Pasteur effect. II. Specific mechanisms. *J. Biol. Chem.* 224, 1115-1127.
- Atkinson, D.E. y Walton, G.M. (1965). Kinetics of regulatory enzymes. Escherichia coli phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 240, 757-763.
- Babul, J. (1978). Phosphofructokinases from Escherichia coli. Purification and characterization of the non allosteric isozyme. *J. Biol. Chem.* 253, 4350-4355.
- Babul, J. y Guixé V. (1983). Fructose bisphosphatase from Escherichia coli. Purification and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 944-949.
- Bar-Tana, J. y Cleland, W.W. (1974a). Rabbit muscle phosphofructokinase. I Anomeric specificity; initial velocity kinetics. *J. Biol. Chem.* 249, 1263-1270.
- Bar-Tana, J. y Cleland, W.W. (1974b). Rabbit muscle phosphofructokinase. II. Product and dead end inhibition. *J. Biol. Chem.* 249, 1271-1276.
- Baumann, P. y Wright, B.E. (1968). The Phosphofructokinase of Dictyostelium discoideum. *Biochemistry* 7, 3653-3661.
- Blangy, D. (1971). Propriétés allostériques de la phosphofructokinase d'E. coli. Etude de la fixation des ligands par dialyse à l' équilibre. *Biochimie* 53, 135-144.

- Blangy, D., Buc, H. y Monod, J. (1968). Kinetics of the allosteric interactions of phosphofructokinase from Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 31, 13-35.
- Bloxham, D.P. y Lardy, H.A. (1973). Phosphofructokinase. En **The Enzymes**. (Boyer, P.D., ed.) 3a Ed., Vol. 8, pp. 239-278. Academic Press, New York.
- Bock, P.E. y Frieden, C. (1976a). Phosphofructokinase. I. Mechanism of the pH-dependent inactivation and reactivation of the rabbit muscle enzyme. *J. Biol. Chem.* 251, 5630-5636.
- Bock, P.E. y Frieden, C. (1976b). Phosphofructokinase. II. Role of ligands in pH dependent changes of the rabbit muscle enzyme. *J. Biol. Chem.* 251, 5637-5643.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brand, I.A. y Söling, H-D. (1974). Rat liver phosphofructokinase. Purification and characterization of its reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* 249, 7824-7831.
- Campos, G., Guixé, V. y Babul, J. (1984). Kinetic mechanism of phosphofructokinase-2 from Escherichia coli. A mutant enzyme with a different mechanism. *J. Biol. Chem.* 259, 6147-6152.
- Chakrabarti, U. y Kenkare, V.W. (1974). Dimerization of brain hexokinase induced by its regulator glucose 6-phosphate. *J. Biol. Chem.* 249, 5984-5988.
- Cleland, W.W. (1963a). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta.* 67, 104-137.
- Cleland, W.W. (1963b). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. Inhibition: Nomenclature and theory. *Biochim. Biophys. Acta.* 67, 173-187.

- Cleland, W.W. (1970). Steady state kinetics. En **The Enzymes** (Boyer, P.D., ed.) Vol. II. Third Edition. Academic Press, New York, pp 1-65.
- Colombo, G., Tate, P.W., Girotti, W. y Kemp, R.G. (1975). Interaction of inhibitors with muscle phosphofructokinase. **J. Biol. Chem.** 250, 9404-9412.
- Cori, G.T. y Cori, C.F. (1936a). The formation of hexosephosphate esters in frog muscle. **J. Biol. Chem.** 116, 119-128.
- Cori, G.T. y Cori, C.F. (1936b). An unusual case of esterification in muscle. **J. Biol. Chem.** 116, 129-133.
- Cornish-Bowden, A. (1974). A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non competitive inhibitors. **Biochem J.** 137, 143-144.
- Daldal, F. (1983). Molecular cloning of the gene for phosphofructokinase-2 of Escherichia coli and the nature of a mutation, pfkB1, causing a high level of the enzyme. **J. Mol. Biol.** 168, 285-305.
- Daldal, F. (1984). Nucleotide sequence of gene pfkB encoding the minor phosphofructokinase of Escherichia coli K-12. **Gene**, 28, 337-342.
- Daldal, F. y Fraenkel, D.G. (1981). Tn10 insertions in the pfkB region of Escherichia coli. **J. Bacteriol.** 147, 935-943.
- Daldal, F. y Fraenkel, D.G. (1983). Assesment of a futile cycle involving reconversion of fructose 6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate during gluconeogenic growth of Escherichia coli. **J. Bacteriol.** 153, 390-394.
- Daldal, F., Babul, J., Guixé, V. y Fraenkel, D.G. (1982). An alteration in phosphofructokinase-2 of Escherichia coli which impairs gluconeogenic growth on sugars. **Eur. J. Biochem.** 126, 373-379.
- Dennis, D.T. y Coultate, T. P. (1967). The regulatory properties of a plant phosphofructokinase during leaf development. **Biochim. Biophys. Acta** 146, 129-137.

- Dixon, M. (1953). The determinations of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.* 55, 170-171.
- Doelle, H.W. (1972). Kinetic characteristic of phosphofructokinase from Lactobacillus casei var. Rhamnosus ATCC 7469 and Lactobacillus plantarum ATCC 14917. *Biochim. Biophys. Acta* 258, 404-410.
- Easterby, J.S. (1975). Heart hexokinase: quaternary structure changes accompanying the binding of regulatory molecules. *Eur. J. Biochem.* 58, 231-235.
- Etiemble, J., Simeon, J., Picat, Ch. y Boivin, P. (1981). Influence of free  $Mg^{2+}$  on the kinetics of human erythrocyte phosphofructokinase. *Biochimie*, 63, 61-65.
- Ewings, K.N. y Doelle, H.W. (1980). Further kinetic characterization of the non-allosteric phosphofructokinase from Escherichia coli K-12. *Biochim. Biophys. Acta* 615, 103-112.
- Ferdinandus, J. y Clark, J.B. (1969). The phosphofructokinase of Arthobacter crystallopoietes. *Biochem. J.* 113, 735-736.
- Fraenkel, D.G. (1981). The biochemical genetics of glycolysis in microbes. En Hollander, A. (ed.) *Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals. Basic Life Sciences*, Vol. 18, 201-215.
- Fraenkel, D.G. y Vinopal, R.T. (1973). Carbohydrate metabolism in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 27, 69-100.
- Fraenkel, D.G., Kotlarz, D. y Buc, H. (1973). Two fructose 6-phosphate kinase activities in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 248, 4865-4866.
- Frieden, C. (1971). Protein-Protein interaction and enzymatic activity. *Annu. Rev. Biochem.* 40, 653-696.
- Frieden, C., Gilbert, H.R. y Bock, P.E. (1976). Phosphofructokinase. III. Correlation of the regulatory kinetic and molecular properties of the rabbit muscle enzyme. *J. Biol. Chem.* 251, 5644-5647.

- Garcés, E. y Cleland, W.W. (1969). Kinetic studies of yeast nucleoside diphosphate kinase. *Biochemistry*, 8, 633-640.
- Garland, P.B., Randle, P.J. y Newsholme, E.A. (1963). Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation. *Nature*, 200, 169-170.
- Gerber, G., Berger, H., Jänig, G-R. y Rapoport, S.M. (1973). Interaction of haemoglobin with ions. Quantitative description of the state of magnesium, adenosine 5'-triphosphate, 2,3-bis-phosphoglycerate, and human haemoglobin under simulated intracellular conditions. *Eur. J. Biochem.* 38, 563-571.
- Guixé, V. y Babul, J. (1985). Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme altered in the allosteric site for  $\text{MgATP}^{-2}$ . *J. Biol. Chem.* 260, 11001-11005.
- Gulbinsky, J.S. y Cleland, W.W. (1968). Kinetic studies of *Escherichia coli* galactokinase. *Biochemistry*, 7, 566-575.
- Hammes, G.G. (1982a). Enzyme catalysis and regulation. Academic Press, New York, pp. 152-186.
- Hammes, G.G. (1982b). Enzyme catalysis and regulation. Academic Press, New York, pp. 200-207.
- Hanson, R.L., Rudolph, F.B. y Lardy, H.A. (1973). Rabbit muscle phosphofructokinase. The kinetic mechanism of action and the equilibrium constant. *J. Biol. Chem.* 248, 7852-7859.
- Hers, H.G. y Hue, L. (1983). Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 617-653.
- Hers, H.G. y Van Schaftingen, E. (1982). Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* 206, 1-12.
- Hesterberg, L.K. y Lee, J.C. (1980). Sedimentation study of a catalytically active form of rabbit muscle phosphofructokinase at pH 8.55. *Biochemistry*, 19, 2030-2039.

- Hesterberg, L.K. y Lee, J.C. (1981). Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase at pH 7.0: Stoichiometry. *Biochemistry* 20, 2974-2980.
- Hesterberg, L.K. y Lee, J.C. (1982). Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: effects of ligands. *Biochemistry*, 21, 216-222.
- Hesterberg, L.K., Lee, J.C. y Erickson, H.P. (1981). Structural properties of an active form of rabbit muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 256, 9724-9730.
- Hill, D.E. y Hammes, G.G. (1975). An equilibrium binding study of the interaction of fructose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate with rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochemistry*, 14, 203-213.
- Hofer, H.W. (1971). Influence of enzyme concentration on the kinetic behaviour of rabbit muscle phosphofructokinase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352, 997-1004.
- Holzer, H. y Duntze, W. (1971). Metabolic regulation by chemical modification of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 40, 345-374.
- Hue, L. (1981). The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in the liver. *Adv. Enzymol.* 52, 247-331.
- Hue, L. (1982). Role of fructose 2,6-bisphosphate in the stimulation of glycolysis by anoxia in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 206, 359-365.
- Hue, L., Blackmore, P.F., Shikama, H., Robinson-Steiner, A. y Exton, J.H. (1982). Regulation of fructose-2,6-bisphosphate content in rat hepatocytes, perfused hearts, and perfused hindlimbs. *J. Biol. Chem.* 257, 4308-4313.
- Hulme, E.C. y Tipton, K.F. (1971). The isotope-exchange reactions of ox heart phosphofructokinase. *Biochem. J.* 122, 181-187.
- Johnson, C.S., Vogtman, L. y Deal, W.C. (1976). Viscometric comparison of the asymmetry properties of phosphofructokinases from pig kidney and rabbit muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 391-395.

- Karadsheh, N.F., Uyeda, K. y Oliver, R.M. (1977). Studies on structure of human erythrocyte phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 252, 3515-3524.
- Kee, A. y Griffin, C. (1972). Kinetic studies of rabbit muscle phosphofructokinase. *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 361-368.
- Kelly, G.J. y Turner, J.F. (1970). The regulation of pea-seed phosphofructokinase by 6-phosphogluconate, 3-phosphoglycerate, 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate. *Biochim. Biophys. Acta* 208, 360-367.
- Kemp, R.G. (1969). Allosteric properties of muscle phosphofructokinase. I. Binding of magnesium adenosine triphosphate to the inhibitory site. *Biochemistry* 8, 3162-3168.
- Kemp, R.G. (1971). Rabbit liver phosphofructokinase. Comparison of some properties with those of muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 246, 245-252.
- Kemp, R.G. y Krebs, E.G. (1967). Binding of metabolites by phosphofructokinase. *Biochemistry* 6, 423-434.
- Kono, N. y Uyeda, K. (1974). Chicken liver phosphofructokinase. III. Kinetics and allosteric properties. *J. Biol. Chem.* 249, 1490-1496.
- Kotlarz, D. y Buc, H. (1977). Two *Escherichia coli* fructose-6-phosphate kinases. Preparative purification, oligomeric structure and immunological studies. *Biochim. Biophys. Acta* 484, 35-48.
- Kotlarz, D. y Buc, H. (1981). Regulatory properties of phosphofructokinase 2 from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 117, 569-574.
- Kotlarz, D., Garreau, H. y Buc, H. (1975). Regulation of the amount and of the activity of phosphofructokinases and pyruvate kinases in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 381, 257-268.
- Kornberg, A. y Price, W.E. (1951). Enzymatic phosphorylation of adenosine and 2,6-diaminopurine riboside. *J. Biol. Chem.* 193, 481-495.

- Koshland, D.E. (1970). The molecular basis for enzyme regulation. En **The Enzymes** (P.D. Boyer, ed.) Vol. I, Third edition. Academic Press, New York, pp 341-396.
- Krzanowski, J. y Matshinsky, F. M. (1969). Regulation of phosphofructokinase by phosphocreatine and phosphorylated glycolitic intermediates. **Biochim. Biophys. Res. Commun.** 34, 816-823.
- Lad, P.M. y Hammes, G.G. (1974). Physical and chemical properties of rabbit muscle phosphofructokinase cross-linked with dimethyl suberimidate. **Biochemistry**, 13, 4530-4537.
- Lad, P.M., Hill, D.E. y Hammes, G.G. (1973). Influence of allosteric ligands on the activity and aggregation of rabbit muscle phosphofructokinase. **Biochemistry**, 12, 4303-4309.
- Larsen, M., Willet, R. y Yount, R.G. (1969). Imidodiphosphate and pyriphosphate: Possible biological significance of similar structures. **Science** (Wash. D.C.) 166, 1510-1511.
- Layzer, R.B., Rowland, L.P. y Bank, W.J. (1969). Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 244, 3823-3831.
- Leonard, K.R. y Walker, I.O. (1972). The self-association of rabbit-muscle phosphofructokinase. **Eur. J. Biochem.** 26, 442-448.
- Lindell, T.J. y Stellwagen, E. (1968). Purification and properties of phosphofructokinase from yeast. **J. Biol. Chem.** 243, 907-912.
- Lineweaver, H. y Burk, D. (1934). The determination of enzyme-dissociation constants. **J. Amer. Chem. Soc.** 56, 658-666.
- Lorenson, M.Y. y Mansour, T.E. (1968). Studies on heart phosphofructokinase. Reversibility of the reaction. **J. Biol. Chem.** 243, 4677-4682.
- Lou, M.F. y Kinoshita, J.H. (1967). Control of lens glycolysis. **Biochim. Biophys. Acta.** 141, 547-559.

- Lowry, O.H. y Passonneau, J.V. (1966). Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 241, 2268-2279.
- Luther, M.A., Gilbert, H.F. y Lee, J.C. (1983). Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: Role of subunit interaction in regulation of enzymatic activity. *Biochemistry*, 22, 5494-5500.
- MacGregor, J.S., Singh, V.N., Davoust, S., Melloni, E., Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1980). Evidence for formation of a rabbit liver aldolase-rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3889-3892.
- Mansour, T.E. (1963). Studies on heart phosphofructokinase: purification, inhibition, and activation. *J. Biol. Chem.* 238, 2285-2292.
- Mansour, T.E. y Ahlfors, C.E. (1968). Studies on heart phosphofructokinase. Some kinetic and physical properties of the crystalline enzyme. *J. Biol. Chem.* 243, 2523-2533.
- Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.
- Mathias, M.M. y Kemp, R.G. (1972). Allosteric properties of muscle phosphofructokinase. III. Thiol reactivity as an indicator of conformational state. *Biochemistry*, 11, 578-584.
- Mavis, R.D. y Stellwagen, E. (1970). The role of cations in yeast phosphofructokinase catalysis. *J. Biol. Chem.* 245, 674-680.
- Mayr, G.W. (1984a). Interaction of calmodulin with muscle phosphofructokinase. Changes of the aggregation state, conformation and catalytic activity of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 143, 513-520.
- Mayr, G.W. (1984b). Interaction of calmodulin with muscle phosphofructokinase. Interplay with metabolic effectors of the enzyme under physiological conditions. *Eur. J. Biochem.* 143, 521-529.
- Monod, J., Changeaux, J.P. y Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6, 306-329.

- Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J.P. (1965). On the nature of allosteric interactions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12, 88-118.
- Ogawa, Y. y Atkinson, D.E. (1985). Interactions between citrate and nucleoside triphosphates in binding to phosphofructokinase. *Biochemistry*, 24, 954-958.
- Otto, M., Heinrich, R., Kühn, B. y Jacobash, G. (1974). A mathematical model for the influence of fructose 6-phosphate, ATP, potassium, ammonium and magnesium on the phosphofructokinase from rat erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 49, 169-178.
- Ovadi, J. y Keleti, T. (1978). Kinetic evidence for interaction between aldolase and D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 85, 157-161.
- Ovadi, J., Salermo, C., Keleti, T. y Fasella, P. (1978). Physico-chemical evidence for the interaction between aldolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 90, 499-503.
- Parmeggiani, A., Luft, J.H., Love, D.S. y Krebs, E.G. (1966). Crystallization and properties of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 241, 4625-4637.
- Passonneau, J.V. y Lowry, O.H. (1963). P-fructokinase and the control of the citric acid cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 13, 372-379.
- Pavelich, M.J. y Hammes, G.G. (1973). Aggregation of rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochemistry*, 12, 1408-1414.
- Pettigrew, D.W. y Frieden, C. (1979). Binding of regulatory ligands to rabbit muscle phosphofructokinase. A model for nucleotide binding as function of temperature and pH. *J. Biol. Chem.* 254, 1887-1895.
- Plapp, B.V. (1970). Enhancement of the activity of horse liver alcohol dehydrogenase by modification of amino groups at the active site. *J. Biol. Chem.* 245, 1727-1735.
- Pogson, C.I. y Randle, P.J. (1966). The control of rat-heart phosphofructokinase by citrate and other regulators. *Biochem. J.* 100, 683-693.

- Pontremoli, S., Melloni, E., Salamino, F., Sparatore, B., Michetti, M., Singh, V.N. y Horecker, B.L. (1979). Evidence for an interaction between fructose 1,6-bisphosphate and fructose 1,6-bisphosphate aldolase. *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 356-363.
- Racker, E. (1947). Spectrophotometric measurement of hexokinase and phosphofructokinase activity. *J. Biol. Chem.* 167, 843-854.
- Ramaiah, A., Hathaway, A. y Atkinson, D.E. (1964). Adenylate as a metabolic regulator. Effect on yeast phosphofructokinase kinetics. *J. Biol. Chem.* 239, 3619-3622.
- Reinhart, G.D. (1983). Influence of fructose-2,6-bisphosphate on the aggregation properties of rat liver phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 258, 10827-10830.
- Reinhart, G.D. y Lardy, H.A. (1980a). Rat-liver phosphofructokinase: kinetic activity under near-physiological conditions. *Biochemistry*, 19, 1477-1484.
- Reinhart, G.D. y Lardy, H.A. (1980b). Rat liver phosphofructokinase: Use of fluorescence polarization to study aggregation at low protein concentration. *Biochemistry*, 19, 1484-1490.
- Reinhart, G.D. y Lardy, H.A. (1980c). Rat liver phosphofructokinase: kinetic and physiological ramifications of the aggregation behavior. *Biochemistry*, 19, 1491-1495.
- Rinderknecht, H., Wilding, P. y Haverbeck, B.J. (1967). A new method for the determination of  $\alpha$ -Amylase. *Experientia*, 23, 805.
- Robinson, J.P. y Fraenkel, D.G. (1978). Allosteric and non-allosteric *E. coli* phosphofructokinases: effects on growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 858-863.
- Schimke R.T. y Doyle, D. (1970). Control of enzyme levels in animal tissues. *Annu. Rev. Biochem.* 39, 929-976.
- Segel, I.H. (1975). Enzyme kinetics. John Wiley & Sons. New York. pp 274-320.

- Secrist, J. A., Barrio, J.R. y Leonard, N.J. (1972). A fluorescent modification of adenosine triphosphate with activity in enzyme systems: 1, N<sup>6</sup>-ethenoadenosine triphosphate. *Science*, 175, 646-647.
- Simon, W.A. y Hofer, H.W. (1978). Reaction mechanism of non-allosteric phosphofructokinase. *Eur. J. Biochem.* 88, 175-181.
- Sols, A., Castaño, J.G., Aragón, J.J., Domenech, c., Lazo, P.A. y Nieto, A. (1981). Multimodulation of phosphofructokinases in metabolic regulation. En *Metabolic Interconversion of Enzymes*. (Holzer, H., ed.) pp. 111-123. Springer Verlag, New York.
- Sols, A. y Salas, M.L. (1966). Phosphofructokinase. III. Yeast. *Methods in Enzymology*. Vol. IX, pp 436-445.
- Stadtman, E.R. (1970). Mechanisms of enzyme regulation in metabolism. En *The Enzymes* (P.D. Boyer, ed.) Vol I, Third edition. Academic Press, New York. pp 397-459.
- Stadtman, E.R. y Chock, P.B. (1978). Interconvertible enzyme cascades in metabolic regulation. *Curr. Top. Cell. Regul.* 13, 53-95.
- Storer, A.C. y Cornish-Bowden, A. (1976). Concentration of MgATP<sup>2-</sup> and other ions in solution. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochem. J.* 159, 1-5.
- Taqui Kahn, M.M. y Martell, A.E. (1962). Metal chelates of adenosine triphosphate. *J. Phys. Chem.* 66, 10-15.
- Tarui, S., Kono, N. y Uyeda, K. (1972). Purification and properties of rabbit erythrocyte phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 247, 1138-1145.
- Tejwani, G. (1983). Regulation of fructose-bisphosphatase activity. *Ad. Enzymol.* 54, 121-193.
- Thomas, A.D., Doelle, H.W., Westwood, A. W. y Gordon, G.L. (1972). Effect of oxygen on several enzymes involved in the aerobic and anaerobic utilization of glucose in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112, 1099-1105.

- Thomson, J.A. (1977). E. coli phosphofructokinase synthesized in vitro from a colE1 hybrid plasmid. *Gene*, 1, 347-356.
- Thompson, M.F. y Bachelard, H.S. (1976). Determination of true  $K_i$  values in enzyme dead-end inhibition kinetic studies. *Anal. Biochem.* 71, 507-518.
- Thornburgh, B.N., Liu Wu, L. y Griffin, C.C. (1978). Phosphofructokinase from Escherichia coli: Further evidence for identical subunits. *Can. J. Biochem.* 56, 836-838.
- Trivedi, B. y Danforth, N.H. (1966). Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 241, 4110-4114.
- Tsai, M.Y. y Kemp, R.G. (1974). Rabbit brain phosphofructokinase. Comparison of regulatory properties with those of other phosphofructokinase isozymes. *J. Biol. Chem.* 249, 6590-6596.
- Tsopanakis, A.D. y Herries, D.G. (1975). Kinetic discrimination between two types of enzyme mechanism. Application to lactose synthetase. *Eur. J. Biochem.* 53, 193-196.
- Ui, M. (1966). A role of phosphofructokinase in pH dependent regulation of glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 124, 310-322.
- Uyeda, K. (1970). Studies on the reaction mechanism of skeletal muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 245, 2268-2275.
- Uyeda, K. (1972). Studies on the fructose 1-phosphate kinase activity of rabbit muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 247, 1692-1698.
- Uyeda, K. (1979). Phosphofructokinase. *Adv. Enzymol.* 48, 193-244.
- Uyeda, K. y Kurooka, S. (1970). Crystallization and properties of phosphofructokinase from Clostridium pasteurianum. *J. Biol. Chem.* 245, 3315-3324.
- Uyeda, K. y Luby, L.J. (1974). Studies on the effect of fructose diphosphatasa on phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 249, 4562-4570.

- Uyeda, K. y Racker, E. (1965). Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 240, 4682-4688.
- Uyeda, K., Furuya, E. y Luby, L.J. (1981). The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases. *J. Biol. Chem.* 256, 8394-8399.
- Van Schaftingen, E. y Hers, H.G. (1981). Formation of fructose 2,6-bisphosphate from fructose 1,6-bisphosphate by intramolecular cyclisation followed by alkaline hydrolysis. *Eur. J. Biochem.* 117, 319-323.
- Viñuela, E., Salas, M.L. y Sols, A. (1963). End-product inhibition of phosphofructokinase by ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 140-145.
- Wolfman, N.M., Thompson, W.R. y Hammes, G.G. (1978). Study of the interaction of adenylyl imidodiphosphate with rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochemistry*, 17, 1813-1817.
- Yoshida, M. (1972). Allosteric nature of thermostable phosphofructokinase from an extreme thermophilic bacterium. *Biochemistry*, 11, 1087-1093.
- Yoshida, M., Oshima, T. y Imahori, K. (1971). The thermostable allosteric enzyme: phosphofructokinase from an extreme thermophile. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 36-39.
- Yount, R.G., Babcock, D., Ballantyne, Wm. y Ojala, D. (1971a). Adenylyl imidodiphosphate, and adenosine triphosphate analog containing a P-N-P linkage. *Biochemistry* 10, 2484-2489.
- Yount, R.G., Ojala, D. y Babcock, D. (1971b). Interaction of P-N-P and P-C-P analogs of adenosine triphosphate with heavy meromyosin, myosin, and actomyosin. *Biochemistry* 10, 2490-2495.



