

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE CONTROL DE
FLUJO EN UN TRAMO ACOTADO DE LA RUTA GLUCOLITICA

* Sola, M. M.; Oliver, J.; Salto, R.; Gutiérrez, M. y Vargas, A. M.

RESUMEN

La Teoría de Control de Flujo ha demostrado ser útil en el estudio de la regulación del metabolismo. Han sido descritos varios métodos para la determinación de los coeficientes de control de flujo en diferentes rutas metabólicas. En este trabajo describimos un método experimental para la determinación de estos coeficientes en las primeras etapas de las glucolisis en corteza renal de rata, su modificación en presencia de AMP y la posible aplicación al estudio de la importancia metabólica del ciclo de sustrato establecido entre fructosa 6-fosfato y fructosa 1,6-bisfosfato.

SUMMARY

The Flux Control Theory has been applied successfully to the study of the regulation of metabolism. There have been described several methods for the determination of the flux control coefficients in different metabolic pathways. In this work, we describe an experimental method for the determination of these coefficients in the earlier glycolytic steps in rat-kidney cortex, their change caused by AMP and the possible application to the study of the metabolic importance of the substrate cycle established between fructose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate.

INTRODUCCION

La regulación de las rutas metabólicas se ha entendido tradicionalmente que era debida a la acción de una o varias etapas de la ruta que eran consideradas como etapas limitantes. En los años setenta se formuló la Teoría de Control de Flujo (1,2), que fue extensamente desarrollada con posterioridad, demostrándose su importancia en diferentes estudios de regulación del metabolismo (3-6). Esta teoría explica la regulación como un proceso en el que están implicados todos los enzimas de la ruta metabólica global, participando cada uno de ellos en un porcentaje variable denominado coeficiente de control de flujo. En definitiva, cuantifica la participación de cada una de las etapas en el control de la ruta global, cuestionando para la mayoría de los sistemas metabólicos la existencia de sólo unas pocas etapas limitantes. Estos coeficientes vienen definidos por la expresión:

$$C_{ei}^j = \delta J / \delta e_i * e_i / J$$

e indican el cambio fraccional en el flujo (J) inducido por un cambio infinitesimal en la actividad de cualquier enzima (e_i) de la ruta metabólica.

Hasta el momento se han desarrollado diferentes metodologías para la determinación de los coeficientes de control de flujo. La mayoría de ellas basadas en producir una modificación en las actividades de los enzimas individuales, por empleo de inhibidores, o en su concentración, por métodos genéticos o por adición directa de los mismos al sistema, para después correlacionar los cambios en las actividades enzimáticas con las modificaciones producidas en el flujo.

En determinados modelos (3,7), el flujo se puede representar por una función hiperbólica de la actividad de cualquiera de los enzimas implicados:

$$J = \frac{Q_1 * e_i}{Q_2 + e_i}$$

siendo Q_1 y Q_2 funciones de los parámetros cinéticos de todos los demás enzimas de la ruta, pudiendo deducirse que los coeficientes de control de flujo de cada etapa están relacionados con estas constantes según las expresiones:

$$C_{ei}^j = \frac{Q_1 - J}{Q_1} \quad \text{y} \quad C_{ei}^j = \frac{Q_2}{Q_2 + e_i}$$

reagrupando ecuaciones se obtiene la de una recta en forma implícita que puede ser utilizada para el cálculo de Q_1 y posterior determinación del coeficiente de control (8-10):

$$\frac{1}{J} = \frac{Q_2}{Q_1} * \frac{1}{e_i} + \frac{1}{Q_1}$$

La suma de los coeficientes de control de todas estas etapas de una ruta metabólica es igual a la unidad, ya que cada coeficiente representa el tanto por uno de participación en el control. Es posible, entonces, que en aquellas rutas con muchas etapas, como es el caso de la glucolisis, la exacta determinación de los coeficientes de control de las etapas con escasa participación sea muy difícil, por este motivo se ha desarrollado el método de acotamiento y titulación (8,11) con el que se han determinado los coeficientes de control de las tres primeras etapas glucolíticas.

En este trabajo hemos utilizado el mismo principio de acotamiento para determinar los coeficientes de control de los enzimas fosfoglucoasa isomerasa, fosfofructoquinasa y fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa. Basándonos en el teorema de la conectividad de la teoría, que establece que la proporción entre los coeficientes se mantiene, será posible determinar exactamente, por este procedimiento, todos los coeficientes de control de la glucolisis en futuros trabajos.

MATERIAL Y METODOS

Se han utilizado ratas Wistar adultas que se mantuvieron con libre acceso al agua y a una dieta estándar. Los enzimas auxiliares eran de la marca Boehringer y todos los demás reactivos empleados eran de marca Sigma o Merck con la máxima pureza.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, extrayéndose rápidamente los riñones, que una vez demedulados, se homogeneizaron en la proporción 1 g de tejido/3 ml del siguiente medio: Hepes 50mM, Fosfato sódico 10mM, KCl 100mM, MgCl₂ 10mM, PMSF 1mM, pH 7,4. El homogenizado se centrifugaba a 100.000 g durante 30 minutos, a 4°C. Los sobrenadantes eran utilizados inmediatamente para los estudios cinéticos previa determinación del contenido de proteínas (12).

Descripción del sistema acotado. -El tramo acotado está reflejado en el esquema 1. El acotamiento se garantiza con la adición al medio de ensayo de glucosa 6-fosfato 1mM, como sustrato, y de grandes cantidades de los enzimas triosasfosfato isomerasa y glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, como enzimas auxiliares. El flujo a través de nuestro sistema acotado fue determinado midiendo espectrofotométricamente a 340 nm la desaparición por oxidación del NADH acoplada a la reducción del gliceraldehído 3-P producido. El medio de ensayo en cubeta era como el descrito para la homogeneización, adicionado, en un volumen final de 1 ml, de: 0,28mM NADH, 1mMATP, 2,5mM fosfocreatina, 5U triosasfosfato isomerasa, 3U glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, 5U creatín quinasa y, cuando se especifica, AMP 10M. Los ensayos

Esquema 1

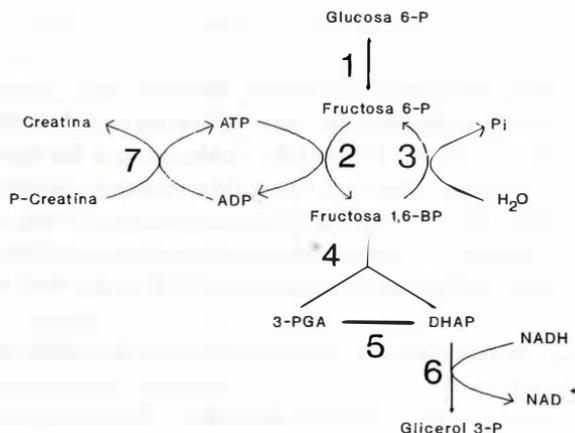


Diagrama explicativo del sistema de ensayo para la determinación de flujo glucolítico. El tramo acotado comprende desde glucosa 6-fosfato hasta gliceraldehído 3-fosfato (3-PGA). La concentración de ATP (1mM) se mantenía constante, a lo largo de la determinación, incorporando al medio de ensayo un sistema tamponante constituido por fosfocreatina y creatín quinasa. Los enzimas que aparecen entre paréntesis fueron utilizados como enzimas auxiliares: 1. fosfoglucosa isomerasa, 2. fosfofructoquinasa, 3. fructosa 1,6-bisfosfatasa, 4. fructosa 1,6 bifosfato aldolasa, (5). triosasfosfato isomerasa, (6). glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, (7). creatín quinasa.

se realizaron a 35°C. La reacción se iniciaba con la adición del volumen de extracto de tejido correspondiente a 1,5 mg de proteína y el valor de variación de DO se toma cuando el sistema alcanzaba el estado estacionario. Para la titulación se realizaban determinaciones independientes de velocidad con cantidades crecientes, entre 2,5 y 1000mU, de los enzimas comerciales fosfoglucosa isomerasa, fosfofructoquinasa o fructosa 1,6-bifosfato aldolasa. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Determinación de las actividades enzimáticas. Las determinaciones de las actividades fosfoglucoisomerasa, fosfofructoquinasa, fructosa 1,6-bifosfato aldolasa se realizaron con el mismo sistema utilizado para la determinación del flujo, modificando oportunamente el sustrato añadido y la adición de enzimas auxiliares. Se determinaron los parámetros cinéticos V_{max} y $k_{0.5}$ en todas las condiciones, tanto para estos enzimas en el extracto de corteza renal como para los de origen comercial.

Cálculos. Los parámetros cinéticos de los enzimas del extracto y de los comerciales se calcularon por regresión lineal de los resultados experimentales de actividad. Los valores de flujo con las diferentes adiciones fueron normalizados con

respecto al valor de flujo basal que se consideró como 1. A las actividades basales de los enzimas, divididas por sus respectivos valores de $K_{0,5}$, se sumaban las de los enzimas comerciales adicionados, divididos también por sus $K_{0,5}$, para obtener los resultados del parámetro e_i para cada condición y enzima. La intersección con el eje de ordenadas de la línea obtenida representando $1/\text{flujo normalizado } (J_i)$ frente a $1/e_i$ nos daba la inversa del valor de Q_i para cada caso. Usando estos valores, los coeficientes de control de flujo para cada enzima en una determinada condición se calcularon mediante las ecuaciones anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla I están expresados los parámetros cinéticos de los enzimas de corteza renal de rata implicados en la ruta acotada, así como los de la fructosa 1,6-bisfosfatasa, enzima gluconeogénica, que forma parte de nuestro sistema al catalizar el paso opuesto al de la fosfofructoquinasa, desde fructosa 1,6-bisfosfato hasta fructosa 6-fosfato, y que puede, por tanto, participar negativamente en el control de la glucólisis en determinadas situaciones fisiológicas. El AMP se muestra como un efector positivo de la fosfofructoquinasa, lo que se refleja por una disminución en la

TABLA I

Parámetros cinéticos de los enzimas de corteza renal estudiados como controladores del flujo glucolítico

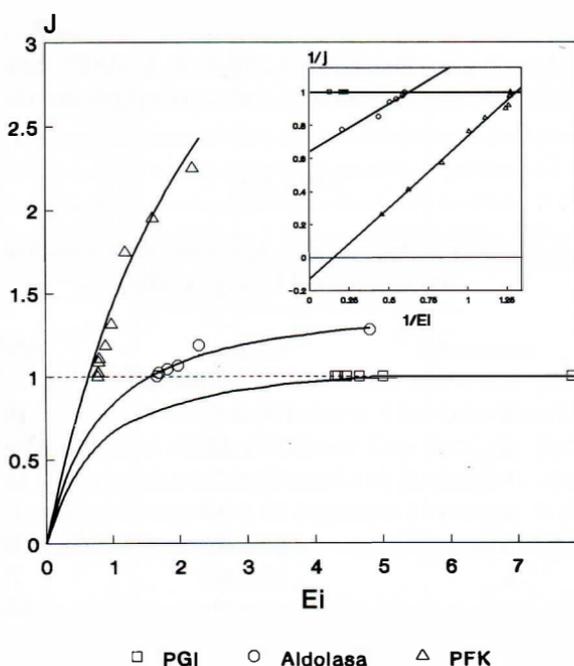
Enzima	Parámetro	Control	AMP (10 M)
PFK	Vmax	103 ± 5,1	108 ± 6,0
	$K_{0,5}$	197 ± 14,1	160 ± 12,3
PBPasa	Vmax	121 ± 7,1	113 ± 8,0
	$k_{0,5}$	10 ± 0,6	13 ± 0,9
Aldolasa	Vmax	86 ± 5,1	80 ± 5,7
	$k_{0,5}$	78 ± 6,7	70 ± 6,8
PGI	Vmax	400 ± 30,7	470 ± 31,0
	$k_{0,5}$	140 ± 12,7	140 ± 13,2

Los valores de Vmax se expresan en $\text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{p}$. Los resultados de $K_{0,5}$ aparecen como concentración M de los respectivos sustratos. Las determinaciones de las actividades se realizaron en las mismas condiciones que las medidas de flujo. Todos los valores están expresados como la media ± SEM de tres experimentos.

$K_{0.5}$ para la fructosa 6-fosfato, y como un inhibidor de la fructosa 1,6-bisfosfatasa, debido a que produce una ligera disminución en la V_{max} y aumenta la $K_{0.5}$ de la fructosa 1,6-bisfosfato. Estos efectos del AMP han sido descritos para los mismos enzimas de otros orígenes (13, 14). El flujo glucolítico determinado en nuestras condiciones experimentales, en ausencia de AMP, es de $16,9 \pm 0,85$ nmoles por minuto y miligramo de proteína, mientras que la adición al sistema de ensayo de AMP lo incrementa hasta $18,3 \pm 0,7$ nmoles por minuto y miligramo de proteína. Este incremento debe ser explicado por las modificaciones determinadas en los parámetros cinéticos de los enzimas implicados.

Para cuantificar la contribución de cada enzima a la regulación de la ruta, en las distintas condiciones ensayadas, calculamos sus coeficientes de control de flujo. En la Figura 1 están recogidos los resultados experimentales del flujo glucolítico en función de la actividad de cada uno de los enzimas de la ruta acotada, titulados por

Figura 1

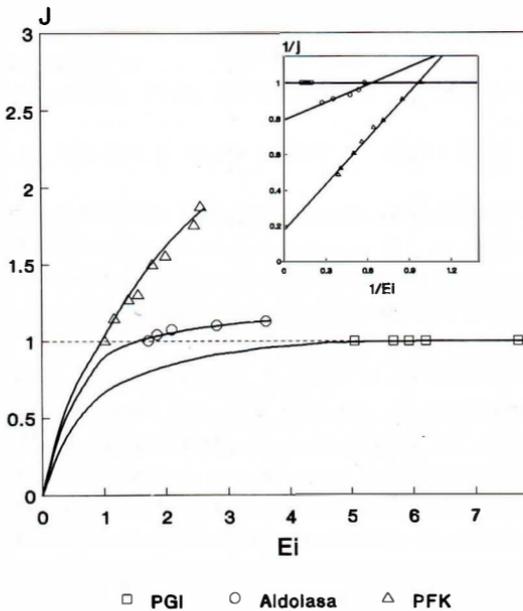


Representación del flujo glucolítico en función de las actividades de los enzimas del sistema acotado en condiciones controles. J = Flujo normalizado, e_i = Actividad enzimática normalizada

En el insertado se muestra la representación de dobles recíprocos de los resultados experimentales, el punto de corte con el eje de ordenadas corresponde a la inversa de Q_1 .

adición de enzimas comerciales, en condiciones controles. La Figura 2 recoge los resultados obtenidos cuando el medio de ensayo era adicionado con AMP 10 M. Como puede observarse en ambas figuras, en nuestro sistema experimental existe una relación hiperbólica del flujo en función de todas las actividades enzimáticas implicadas, por lo que pueden aplicarse las ecuaciones previamente descritas.

Figura 2



Representación del flujo glucolítico en función de las actividades de los enzimas del sistema acotado en presencia de AMP 10 M. Ver figura 1.

Tanto de las representaciones hiperbólicas como de sus correspondientes transformaciones lineales (insertados Figuras 1 y 2) se obtienen los valores de Q_1 para cada enzima y condición experimental, que permiten calcular los coeficientes de control de flujo (Tabla II).

Comprobamos que el coeficiente de control de flujo de la fosfoglucoasa isomerasa es igual a cero en ambas condiciones experimentales, indicando que no tiene ningún papel regulador y que cataliza una reacción de equilibrio a alta velocidad. En nuestro sistema, el control está repartido entre la fosfofructoquinasa y la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa, aunque es la fosfofructoquinasa la que soporta el mayor peso en el control de la ruta, como cabía esperar de un enzima alostérico, altamente regulado, que cataliza una reacción irreversible.

TABLA II

Efecto del AMP sobre los valores Q_1 y coeficientes de control de flujo

	Control		AMP (10 M)	
	Q_1	C_{ei}^j	Q_1	C_{ei}^j
PGI	1,00	0,00 \pm 0,01	1,00	0,00 \pm 0,00
PFK	-7,69	1,13 \pm 0,10	5,55	0,82 \pm 0,04
Aldolasa	1,54	0,35 \pm 0,04	1,26	0,21 \pm 0,03
SUMA		1,48		1,03

Los coeficientes de control han sido calculados a partir de los valores de Q_1 obtenidos de los resultados de las Figuras 1 y 2. El procedimiento matemático, así como las condiciones de ensayo en la determinación de la velocidad de flujo, se describen en Métodos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de tres experimentos.

Como puede observarse en la Tabla II, los coeficientes de control de flujo no son parámetros constantes de una ruta sino que dependen de las condiciones metabólicas concretas. En nuestro caso, la presencia de AMP que es un fuerte activador de la fosfofructoquinasa, como hemos comentado anteriormente, produce un desplazamiento del control hacia la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa. Pero, todavía mucho más importante es el hecho de que la suma de los coeficientes de control de flujo en nuestro sistema acotado, en condiciones controles, supere ampliamente la unidad. Esto es explicable únicamente admitiendo que existe un enzima que participa en el control de la ruta con un coeficiente negativo. En nuestro sistema, la única posibilidad es que sea la fructosa 1,6-bisfosfatasa, lo que significa que hay reciclado entre la fructosa 6-fosfato y la fructosa 1,6-bisfosfato, en condiciones controles. Sin embargo, la presencia de AMP, no sólo disminuye el coeficiente de control de la fosfofructoquinasa y aumenta el de la fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa, sino que hace que la suma de coeficientes sea igual a la unidad, indicando, en estas condiciones, la inhibición de la fructosa 1,6-bisfosfatasa y, por lo tanto, la pérdida de su capacidad de control negativo de la glucólisis. La activación de la ruta glucolítica por este efector trae apareada la inhibición de la ruta gluconeogénica y del reciclado entre las hexosas fosfato, ampliamente documentado (16). El método experimental descrito en este trabajo puede ser útil en el estudio de la importancia fisiológica del ciclo de sustrato establecido entre las hexosas fosfato.

BIBLIOGRAFIA

- (1) KACSER H. and BURNS J.A. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27:65-104 (1973).
- (2) HEINRICH R. and RAPOPORT T.A. *Eur. J. Biochem.* 42:89-95 (1974).
- (3) KACSER H. and BURNS J.A. *Genetics* 97:639-666 (1981).
- (4) HEINRICH R. and RAPOPORT T.A. *Biochem. Soc. Trans.* 11:31-35 (1983).
- (5) KACSER H. *Biochem. Soc. Trans.* 11:35-40 (1983).
- (6) FELL D.A. and SAURO H.M. *Eur. J. Biochem.* 148:551-561 (1985).
- (7) WALEY S.G. *Biochem. J.* 91:514-567 (1964).
- (8) TORRES N.V., MATEO F., MELENDEZ-HEVIA E. and KACSER K. *Biochem. J.* 234:169-174 (1986).
- (9) MELENDEZ-HEVIA E., RIOL-CIMAS J.M. and TORRES N.V. *An. Quim.* 83:224-244 (1987).
- (10) TORRES N.V., MATEO F. and MELENDEZ-HEVIA E. *FEBS Lett.* 233:83-86 (1988).
- (11) TORRES N.V., MATEO F., RIOL-CIMAS J.M. and MELENDEZ-HEVIA E. *Mol. Cell. Biochem.* 93:21-26 (1990).
- (12) BRADFORD M. *Anal. Biochem.* 72:248-254 (1976).
- (13) BLOXHAM D.P. and LARDY H.A. *En: The Enzymes*, (P. Boyer ed), 3rd edn. Academic Press, New York. (1973) pp. 239-278.
- (14) NISSLER K., OTTO A., SCHELLENBERGER W. and HOFMANN E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111:294-300 (1983).
- (15) LIU F. and FROMM H.J. *Arch. Biochem. Biophys.* 260:609-615 (1988).
- (16) KATZ R. and RONGSTAD R. *Curr. Top. Cell. Regul.* 10:237-289 (1976).