

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

APORTACIONES A LA TEORIA DEL CONTROL DE FLUJOS Y A LA
CINETICA DE RUTAS METABOLICAS

Tesis presentada ante la Facultad
de Ciencias Químicas de la Univer-
sidad de La Laguna para optar al
Grado de Doctor en Ciencias Quími-
cas por el Licenciado:

NESTOR V. TORRES DARIAS



La Laguna, Mayo 1985.

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el laboratorio - del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de La Laguna, bajo la dirección conjunta del Catedrático de Bioquímica de la Facultad de -- Biología de la Universidad de La Laguna, D. Enrique Meléndez Hevia, y del Profesor (Senior Lecturer) Henrik Kacser, del Departamento de Genética de la Universidad de -- Edimburgo (Reino Unido).

La realización del trabajo ha sido financiada por una Beca del Plan de Formación del Personal Investigador.

Parte de los resultados de esta Tesis ha sido presentados en el XI Congreso de la -- Sociedad Española de Bioquímica. Tenerife, Septiembre, 1984.

Enrique Meléndez Hevia, Catedrático de --
Bioquímica de la Facultad de Biología de la --
Universidad de La Laguna,

CERTIFICO:

Que D. Néstor V. Torres Darias ha
realizado bajo la dirección del Doctor Henrik-
Kacser de la Universidad de Edimburgo y la mía
propia el trabajo recogido en la Memoria:

"APORTACIONES A LA TEORIA DEL CONTROL DE FLUJOS
Y A LA CINETICA DE RUTAS METABOLICAS"

que se ha realizado en el Departamento de Bio-
química de la Universidad de La Laguna y consti-
tuye su Tesis para optar al Grado de Doctor en
Ciencias Químicas.

Y para que conste a los efectos-
legales, firmo el presente certificado en LaLa-
guna, a 13 de Mayo de 1.985:

Fdo.:



Enrique Meléndez Hevia.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincera gratitud, en primer lugar, a los profesores Enrique-Meléndez Hevia y Henrik Kacser, Directores de esta Memoria Doctoral.

Especialmente al profesor Meléndez Hevia le quiero agradecer el interés y la dedicación totales que mostró desde el primer momento; su labor de auténtico magisterio y el entusiasmo que ha sabido comunicarme a lo largo de las distintas fases del trabajo.

El profesor Kacser desde Edimburgo y a lo largo de dos años de estrecha colaboración ha hecho posible el desarrollo y la consolidación en nuestro Departamento de una línea de investigación nueva y de creciente interés entre diversos grupos de investigación que, en Europa principalmente, se dedican a la investigación de los principios que dirigen la regulación del metabolismo. A él también quiero manifestar de forma especial mi gratitud.

Quiero agradecer asimismo a los profesores Ignacio Nuñez de Castro, Francisco Montero Carnerero y Angel Martín Municio sus estímulos y apoyos, los cuales han contribuido valiosamente a hacer realidad la presente Memoria.

A Fátima Mateo Frugoni, con quién compartí muchas horas de arduo trabajo experimental debo manifestar también mi agradecimiento por su estrecha colaboración.

Gracias a Ricardo Rodríguez Pita por la realización de la parte gráfica de este trabajo.

Finalmente agradezco a todos los compañeros del Departamento de Bioquímica y al personal técnico colaborador la ayuda prestada.

O. NOMENCLATURA

En los desarrollos y discusiones que se presentan a lo largo del texto emplearemos la nomenclatura y abreviaturas que siguen, las cuales se ajustan a los criterios enunciados por Cleland (1963) y a la establecida por los principales autores de la Teoría del Control de Flujos.

0.1. Sustratos y productos del sistema.

- A, B, C, ... Sustratos de la ruta metabólica en el mismo orden en el que se incorporan a la ruta.
- a, b, c, ... Concentraciones respectivas de esos sustratos.
- X_1, X_2, X_3, \dots Productos intermedios de la ruta.
- x_1, x_2, x_3, \dots Concentraciones respectivas de esos productos.
- P, Q, R, ... Productos de la ruta metabólica en el mismo orden de salida.

0.2. Enzimas del sistema.

- E_A Primera enzima de la ruta, la cual incorpora el sustrato A al sistema.
- e_A Concentración de esa enzima.
- E_B, E_C, \dots Otras enzimas del sistema, cuando esta denominación es posible, las cuales incorporan los sustratos B y C respectivamente a la ruta.
- e_B, e_C, \dots Sus concentraciones respectivas.
- E_1, E_2, E_3, \dots Enzimas correlativas del sistema que actúan sobre X_1, X_2 y X_3, \dots respectivamente.
- E_i Enzima genérica del sistema.
- e_1, e_2, e_3, \dots Sus concentraciones respectivas.
- e_i Concentración de la enzima genérica E_i .
- $V_A, v_1, v_2, v_3, \dots$ Velocidades de las reacciones catalizadas por E_A, E_1, E_2 y E_3, \dots , respectivamente.
- V_i Velocidad de la reacción catalizada por la enzima genérica E_i .
- $V_A, V_1, V_2, V_3, \dots$ Velocidades máximas de las enzimas E_A, E_1, E_2 y E_3, \dots respectivamente.
- V_i Velocidad máxima de la enzima genérica E_i .
- K_A, K_1, K_2, \dots Constantes de Michaelis de las enzimas E_A, E_1, E_2, \dots para los sustratos A, X_1, X_2, \dots .

K_{eq} Constante de equilibrio (con un superíndice indica el paso o pasos a los que se refiere) y en el sentido en que está expresada. Ejemplo:

$$K_{eq}^{1-3} = \frac{x_3}{x_1} \text{ eq}$$

g_A, g_1, g_2, \dots Expresión de la actividad enzimática de las enzimas E_A, E_1, E_2, \dots respectivamente, usada en la formulación de los Coeficientes de control, cuyo valor es $\frac{V_{MX}}{K_M} \cdot K_{eq}$

g_i "Actividad enzimática" $\left(\frac{V_{MX}}{K_M} \right) \cdot K_{eq}$ de la enzima genérica E_i .

También:

F: Flujo del sistema de una ruta metabólica dada.

C: (con cualquier subíndice C_0, C_1, C_2, C_K) cualquier constante del sistema previamente descrita o en el momento.

0.3. Parámetros sistémicos y coeficientes.

El análisis del control de los sistemas metabólicos emplea dos tipos principales de Coeficientes; los Coeficientes globales y los Coeficientes locales. La nomenclatura establecida recientemente por los principales autores, que se sigue en el texto es la siguiente: (Burns, J.A. 1985).

<u>Coeficientes globales o sistémicos</u>	<u>Símbolo</u>	<u>Nombre</u>
$\frac{\partial V}{V} / \frac{\partial P}{P} = \frac{\partial V}{\partial P} \cdot \frac{P}{V}$	C_P^V	Coficiente de control

donde V es cualquier variable del sistema (flujo, concentración de intermediarios, energía libre, etc...) y P es cualquier variable independiente cuyo cambio provoca un cambio en V (concentración de la enzima, número de turnover, etc....).

Así tenemos:

$C_{E_i}^F$ Coeficiente de control del flujo para la enzima E_i .

C_A^F Coeficiente de control del Flujo para el sustrato A.

<u>Coeficientes locales</u>	<u>Símbolo</u>	<u>Nombre</u>
$\frac{\partial v}{v} / \frac{\partial S}{S} = \frac{\partial v}{\partial S} \cdot \frac{S}{v}$	ϵ_S^v	Coficiente de elasticidad

donde v es la velocidad de cualquier entidad aislada del sistema (enzima, permeasa, transportadores, etc...) y S es cualquier especie molecular (efector) que afecta a v directamente (sustrato, producto, inhibidores, etc.)

Así: ϵ_A^{vA} Coeficiente de elasticidad para la reacción catalizada por E_A para el sustrato A.

Hasta ahora diversos autores han empleado diferentes símbolos y nombres para referirse a los Coeficientes de control del flujo. Señalamos aquí los más frecuentemente utilizados en la casi totalidad de los trabajos publicados en este campo hasta el momento.

El coeficiente $C_{E_i}^F$ (coeficiente de control del flujo para la enzima E_i) se cita como $Z_{E_i}^{E_i}$ (Coeficiente de sensibilidad) y como C_{E_i} (Fuerza de control).

Al coeficiente C_S^F se le ha llamado Coeficiente de respuesta, R , K , coeficiente de controlabilidad, son el símbolo y nombre dados al actualmente citado como ϵ_S^V , aunque K se refería principalmente al efecto de activadores o inhibidores sobre la velocidad del paso de reacción individual. Se llamaba antes coeficiente de elasticidad ϵ_S^V al que se denomina ahora ϵ_S^V , pero S antes se refería sólo a sustratos o productos de una ruta metabólica. Finalmente los denominados elementos de la matriz de control (o sensibilidad del Sustrato) $S_{E_i}^{S_j}$ donde S_j representa la concentración de un intermediario dado, son simbolizados ahora como $C_{E_i}^{S_j}$.

0.4. Enzimas, sustratos y efectores usados en la experimentación.

<u>Enzimas</u>	<u>Nombre trivial</u>	<u>Nombre sistemático</u>
Aldolasa	Aldolasa	D-Fructosa-1,6-difosfato-D-gliceraldehído-3-fosfoliasa.E.C.4.1.2.13
CK	Creatinaquinasa	ATP:creatina N-fosfotransferasa.E.C.2.7.3.2.
Ffa	Fosforilasa-a	1,4- α -D-glucan:ortofosfato α glucosil transferasa.E.C. 2.4.1.1.
PFK	Fosfofructoquinasa	ATP:D-fructosa-6-fosfato 1 fosfotransferasa.E.C.2.7.1.11.
PGI	Fosfoglucosaisomerasa	D-Glucosa-6-fosfatocetoisomerasa.E.C.5.3.1.9.
PGluM	Fosfoglucomutasa	α -D-glucosa-1,6-difosfato: α -D-glucosa-1-fosfatofosfotransferasa.E.C.-2.7.5.1.
α -GDH	Glicerol-3-fosfatodeshidrogenasa	sn-glicerol-3-fosfato:NAD ⁺ -2-oxireductasa.E.C.1.1.1.8.
GK	Glucokinasa	ATP:D-glucosa-6-fosfotransferasa.E.C.2.7.1.2.
G6P-DH	Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa	D-glucosa-6-fosfato:NADP ⁺ -1-oxireductasa.E.C.1.1.1.49.
HK	Hexokinasa	ATP:D-hexosa-6-fosfotransferasa.E.C.2.7.1.1.
LDH	Lacticodeshidrogenasa	L-láctico:NAD ⁺ oxidoreductasa.E.C.1.1.1.27.

<u>Enzimas</u>	<u>Nombre trivial</u>	<u>Nombre sistemático</u>
TIM	Triosafosfatoisomerasa	D-gliceraldehído-3-fosfatocetoisomerasa.E.C.5.3.1.1.

Sustratos y efectores.

	<u>Nombre trivial</u>	<u>Nombre específico</u>
ATP	Adenosina-5'-trifosfato.	Adenosina-5'-trifosfato.
E4P	D-Eritrosa-4-fosfato	D-Eritrosa-4-fosfato.
F2,6P ₂	D-fructosa-2,6-fosfato	α -D-(+)-fructofuranosa-2,6-difosfato.
F6P	D-fructosa-6-fosfato	α -D-(+)fructofuranosa-6-fosfato.
GAP	D-gliceraldehído-3-fosfato.	D-gliceraldehído-3-fosfato.
G1P	D-glucosa-1-fosfato	α -D-(+)glucopiranososa-6-fosfato.
G1,6P ₂	D-glucosa-1,6-difosfato.	α -D-(+)glucopiranososa-1,6-difosfato.
G6P	D-glucosa-6-fosfato	α -D-(+)-glucopiranososa-6-fosfato.
NADH	β -Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido.	Difosfopiridina nucleótido reducido.
NADP ⁺	β -Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato	Trifosfopiridina nucleótido fosfato.
NADPH	β -Nicotinamida-adenina dinucleótido reducido - reducido fosfato.	Trifosfopiridina nucleotido fosfato
Pi	Ortofosfato	Ortofosfato
R5P	Ribosa-5-fosfato	D-Ribofuranosa-5-fosfato.
S7P	Sedoheptulosa-7-fosfato	Sedoheptulosa-7-fosfato.
X5P	Xilulosa-5-fosfato	Xilulosa- 5 -fosfato.

1.- INTRODUCCION

1.1.- Regulación del metabolismo: Situación actual.

Desde el establecimiento de las principales rutas metabólicas - (glicólisis, gluconeogénesis, ciclo tricarboxílico, etc.) el campo de investigación posiblemente más destacado sobre el metabolismo ha sido el estudio cinético de las distintas enzimas implicadas en las rutas metabólicas incluyéndose los fenómenos reguladores, particularmente aquellos que pudieran presentarse in vivo. El estudio cinético de cada enzima individual se ha hecho preferentemente con enzimas purificadas a fin de reducir el sistema experimental a su expresión más simple y así poder atribuir cada efecto a la enzima particular objeto de estudio. El objetivo era comprender el funcionamiento de la enzima cuando se estudiaba como una especie molecular homogénea. Los estudios cinéticos de enzimas individuales han conseguido así aportar un conjunto de valiosa información sobre el comportamiento de cada enzima con respecto a múltiples variables. Con todos estos resultados se han elaborado esquemas y modelos de regulación de cada ruta metabólica que en general son coherentes explicando la regulación de cada ruta metabólica y las interconexiones entre varias de ellas.

Los mapas metabólicos obtenidos al trabajar de esta manera, resumen de forma elegante y sencilla gran parte de los conocimientos que sobre las sucesivas transformaciones químicas y movimientos de solutos a través de membranas se dan en microorganismos y células animales y vegetales. Son el resultado del trabajo inteligente y eficaz de una generación de bioquímicos dedicados a desentrañar las bases moleculares y los principios reguladores de la actividad celular.

Esta integración de los diferentes efectos reguladores particulares en esquemas más generales tiene, sin embargo, importantes limitaciones. En primer lugar se trata de representaciones cualitativas de los flujos que tienen lugar en el interior de la célula en unas condiciones que, además, no se especifican. Por otra parte, constituyen una imagen congelada de la realidad, resumiendo información estática al no hacer referencia alguna a la dimensión temporal. Tampoco indican velocidades, ni flujos a través de las rutas, ni aluden a la distribución cuantitativa y variable en el tiempo de un flujo de entrada entre dos ramas de una bifurcación. Finalmente no muestran la compartimentalización cuantitativa de los solutos entre los distintos orgánulos subcelulares y no hacen referencia al mantenimiento de las concentraciones y gradientes a través de las membranas.

Una consecuencia de esta visión estática es el hecho de hacer recaer el control de la regulación de las rutas metabólicas en uno de los pasos de la misma, acuñándose para éstos, términos como "puntos de control" o "pasos limitantes" en el sentido excluyente con que normalmente se usan. Este vocabulario está basado frecuentemente en extrapolaciones cualitativas a la ruta metabólica completa de una información que ha sido obtenida generalmente del estudio de enzimas aislada. Ciertamente es muy importante el conocimiento cuantitativo de la cinética-

de las enzimas aisladas, pero la extrapolación de la enzima al sistema metabólico completo (y de la enzima a la célula viva) está formalmente injustificada en sistema no lineales y conduce al establecimiento de conceptos erróneos.

Sabemos que los sistemas biológicos están constituidos por muchos y variados componentes y que existen entre ellos complejas interacciones. Los procedimientos analíticos nos han permitido conocer gran parte de la estructura de tales sistemas. Sin embargo son limitados cuando se trata de comprender su funcionamiento y regulación. Esto es así porque en cualquier sistema biológico existe una determinada jerarquización, de tal manera que una función biológica dada no viene determinada únicamente por una estructura particular sino también por el contexto de una organización en el que dicha estructura se encuentra sumergida. Este hecho debe tenerse en cuenta a la hora de intentar su descripción total o parcial. La gran complejidad que muestran en su forma de actuar no puede, pues, desentrañarse estudiando sólo sus partes constituyentes sino que es preciso examinar también la respuesta del sistema completo. Únicamente por la combinación de estos dos enfoques alcanzaremos información suficiente para entender el funcionamiento de los sistemas vivos.

En relación con el segundo de los enfoques aludidos, en los últimos años se ha despertado un creciente interés por los mecanismos por medio de los cuales los flujos de las rutas metabólicas están sometidos a control en células intactas, órganos, tejidos u organismos. Con este fin se han desarrollado principalmente dos tipos de modelos, los modelos experimentales y los modelos matemáticos. Los modelos experimentales tienen su primer precedente en los trabajos de E. Büchner, en 1897 cuando descubre que la fermentación alcohólica pueden provocarla los extractos de levadura exentos de células. Básicamente Büchner operaba con una ruta metabólica completa que transformaba glucosa en etanol. Más recientemente ya hay que destacar los trabajos de Scopes (1971, 1973, 1974), que ha reconstituido el sistema glicolítico del músculo de conejo a partir de enzimas purificadas de la misma fuente y ha estudiado la influencia de diversas perturbaciones simulando distintos estados fisiológicos.

Entre los modelos matemáticos citamos en primer lugar el trabajo de Waley S.G. (1963) quien desarrolla un modelo teórico sencillo para una ruta metabólica de tres enzimas, generalizable a n , concluyendo que el flujo a través del sistema depende en general de todas las enzimas de la ruta. Higgins (1963, 1965) desarrolla una teoría sobre el control en las reacciones celulares e introduce el concepto de Coeficiente estequiométrico de reflexión. Poco después aparecen los trabajos de Savageau (1969; 1971, a, b; 1972) quien considera diversas formas de aproximación a sistemas biológicos, incluyendo la simulación con ordenador y establece el concepto de sensibilidad. Los trabajos de Savageau tienen el interés de que sus conclusiones son aplicables a todos los sistemas de regulación conocidos y constituyen la primera revisión en la que se plantea la extrapolación de los datos cinéticos de cada enzima individual para aplicarlos a una ruta metabólica compleja. Hay que citar que también los trabajos de Wright (1981) y de Easterby (1973

1981) que estudian y extienden el tratamiento al estado de transición. Varios autores han desarrollado el estudio del control de los flujos metabólicos por medio de la simulación con ordenadores (Garfinkel, 1965; 1966, 1971; Kohn, et al, 1979, 1983; Heinrich y Rapoport, 1974 a,b,c).

Finalmente otro modelo teórico es el aportado por Kacser y Burns (1973). En ese año dichos autores exponen la Teoría del control de flujos, la cual consiste básicamente en la definición de los distintos -- Coeficientes de control y elasticidad y en la descripción de las relaciones algebraicas que los relacionan. Al mismo tiempo estos autores (1973) desarrollan un modelo cinético de una ruta metabólica lineal -- con baja saturación para todas sus enzimas y le aplican su Teoría del control del Flujo.

Posteriormente esta teoría ha sido desarrollada por estos mismos autores (Kacser, 1982; Kacser et al 1979; Kacser y Burns 1979, 1981) y por Rapoport (Rapoport et al 1976; Heinrich y Rapoport, 1975). Todos estos trabajos han establecido un sólido cuerpo teórico para la investigación del Control de los flujos en células intactas. Responden a la necesidad de una teoría general y rigurosa que permita a un tiempo la realización de experimentos sobre la regulación metabólica que nos lleven a resultados cuantitativos y la interpretación precisa de los mismos. Este tratamiento ha dado ya resultados dignos de interés. -- Grøen et al (1982 b) han resuelto el problema de la regulación de la fosforilación oxidativa y el mismo equipo (Grøen et al, 1982, a) han puesto de manifiesto el escaso papel regulador de la fosfoenol piruvato carboxiquinasa en la gluconeogénesis replicando a los artículos de Rongstad (1979) y Akerboom (1979). Rapoport et al (1974, a,b,c) ha estudiado la regulación de la glicólisis en eritrocito y la influencia del pH sobre la misma. Fell (1984) ha determinado los Coeficientes de control del flujo por la enzima, de las enzimas glicolíticas de levadura, aportando nueva información sobre la regulación de este proceso. El equipo de Kacser (Flint et al, 1980, 1981; Kacser y Burns, 1981) ha aplicado esta teoría a sistemas in vivo estudiando la influencia de la actividad enzimática sobre el control de rutas metabólicas con lo que ha logrado explicar las bases bioquímicas de la dominancia genética y de los errores metabólicos congénitos y dado una explicación coherente a nivel molecular de la dominancia y de la influencia de la heterocigosis en el control del metabolismo.

Todos estos trabajos, realizados en los últimos años revelan la creciente sensibilidad de importantes grupos de investigación a este nuevo enfoque de la regulación del metabolismo y demuestran en nuestra opinión, que la enzimología clásica no debe permanecer al margen de estos planteamientos. La información que ha proporcionado y su metodología deben integrarse en esta corriente si quiere encontrar las respuestas a sus interrogantes, ya que es imposible comprender el todo limitándose a examinar las partes aisladas.

1.2.- Teoría del control de flujos.

La Teoría del control de flujos enunciada por Kacser y Burns en 1973 y por Heinrich y Rapoport (1974 a); y desarrollada por los primeros (1974, 1981) y por Rapoport (1976) se basan en el tratamiento desarrollado anteriormente por Higgins (1963), el cual analiza las respuestas de los sistemas enzimáticos en términos de los denominados "Coeficientes de reflexión".

La ecuación cinética (de velocidad) de una ruta metabólica es una función compleja que puede tener cientos de variables y parámetros. Para distinguir la velocidad de transformación de un paso determinado de la velocidad de transformación global llamaremos flujo a ésta última y mantendremos el término velocidad para hacer referencia a pasos concretos implicados en la ruta.

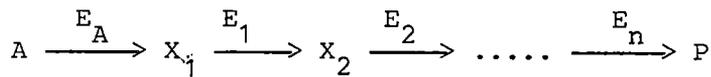
Los parámetros del sistema (mejor que constantes) son; el número total de enzimas que intervienen, el orden en que actúan (su estructura topológica), las constantes cinéticas de todas las enzimas (tales como concentración de cada una de ellas y constantes de equilibrio de cada paso). También son parámetros la disposición espacial de las enzimas, de no ser homogénea su distribución incluyendo la expresión de situaciones de compartimentalización.

Las variables son de dos clases. En la primera se incluyen aquellas que no exhiben cambios sensibles como consecuencia de la actividad del sistema y que aunque ejercen una influencia notable sobre su comportamiento se supone que se mantienen con valores fijos en unas condiciones fisiológicas determinadas. En muchos casos se pueden considerar incluidas aquí la temperatura y el pH así como otras variables según el sistema que se estudia. El segundo grupo incluye a aquellas variables cuyo cambio de valor tiene un significado fisiológico; concentraciones del sustrato o sustratos iniciales; de productos intermedios y de efectores principalmente.

Una ruta metabólica puede ofrecer distintas posibilidades de control en cada una de las enzimas que la componen. En este sentido, hay que distinguir dos aspectos, a saber: la posibilidad de que cada enzima pueda ser regulada por distintas variables, por un lado, y por otro el efecto que los cambios de actividad de una enzima provocan en el flujo de la ruta. Kacser y Burns han descrito diversos Coeficientes (de control y de elasticidad) que dan cuenta de estas características. El tratamiento de estos autores se refiere siempre a sistemas en estado estacionario y su principal interés está en que estos coeficientes se pueden determinar sin contar con una función explícita de la estructura cinética del sistema.

El método empleado por estos autores para abordar el problema del control metabólico es conceptual y metodológicamente diferente al utilizado hasta el momento presente. Se considera el sistema como un todo y nos preguntamos: ¿Qué operaciones sobre el sistema nos proporcionarían información sobre el papel que desempeñan sus partes?. Para responder a ello necesitamos hacer, no sólo medidas sobre el sistema intacto sino también disponer de un sólido esquema teórico que nos permita interpretar esas medidas.

Todo ello quedará bien ilustrado a partir del siguiente esquema de un sistema metabólico simple:



Consideremos el sistema ilustrado en el esquema precedente, consistente en una ruta metabólica sencilla la cual empieza en un sustrato, A, y termina en un producto, P, ambos externos al sistema, cuyas concentraciones permanecen constantes. Existen n enzimas en la cadena que catalizan reacciones monosustratos. Consideremos que estas enzimas permanecen constantes en cantidad y no están por lo tanto sometidas ni a inducción ni a proteólisis. Para un conjunto dado de valores de concentración del sustrato, y velocidad máximas (V_{MX}) y constantes de Michaelis (K_M) de las enzimas habrá un estado estacionario - cuando las concentraciones de todos los intermediarios X_i permanezcan constantes en el tiempo y la salida (output) dp/dt sea también constante. Esta salida del sistema es el flujo, F, a través de la ruta, siendo el mismo que atraviesa cada paso. El flujo es una función de todas las enzimas del sistema puesto que si reducimos la actividad de una cualquiera de ellas a cero el flujo se hace igualmente cero.

A. Coeficientes de control del flujo para la enzima: C_E^F

Sin embargo, el efecto que una variación en la enzima provoca sobre el flujo no es el mismo en todas ellas. Podemos estimar este efecto imponiendo un pequeño cambio en una de las enzimas y expresándolo como un cambio fraccional de/e , donde e es un parámetro relacionado con la actividad de una enzima determinada. Este cambio puede deberse a una variación en la concentración de la enzima, o en el número de turnover (K_2), o en cualquier otra constante cinética provocada por algún factor externo.

Se alcanzará entonces un nuevo estado estacionario con un flujo diferente y el cambio fraccional del mismo podrá ser expresado de la misma forma como dF/F . Una comparación de estas dos medidas representa la eficacia del cambio impuesto en la enzima, en el sentido de alterar el flujo. La relación $dF/F/de/e$ en el límite para $de/e \rightarrow 0$ es una constante para un sistema particular y se denomina Coeficiente de control del flujo para la enzima E; C_E^F .

$$\frac{dF/F}{de/e} = \frac{d \ln F}{d \ln e} = C_E^F \quad (1.1)$$

Puesto que $F = f(E_A, E_1, E_2, \dots, E_n)$ cualquier coeficiente es la derivada parcial de la función flujo respecto a una de las enzimas.

El valor cuantitativo de estos coeficientes describe cuán sensible es el flujo a cambios en los parámetros relacionados con la actividad de cada una de las enzimas. La expresión anterior puede ser ex

presada también como:

$$\frac{dF}{de} \cdot \frac{e}{F} = C_E^F \quad (1.2)$$

Expresado de esta forma C_E^F aparece como la pendiente de la curva del flujo frente al parámetro e multiplicada por el factor de escala e/F . Puesto que generalmente F y e estarán relacionados de forma no lineal el valor de la pendiente cambia con el valor de e (Figura 1.1).

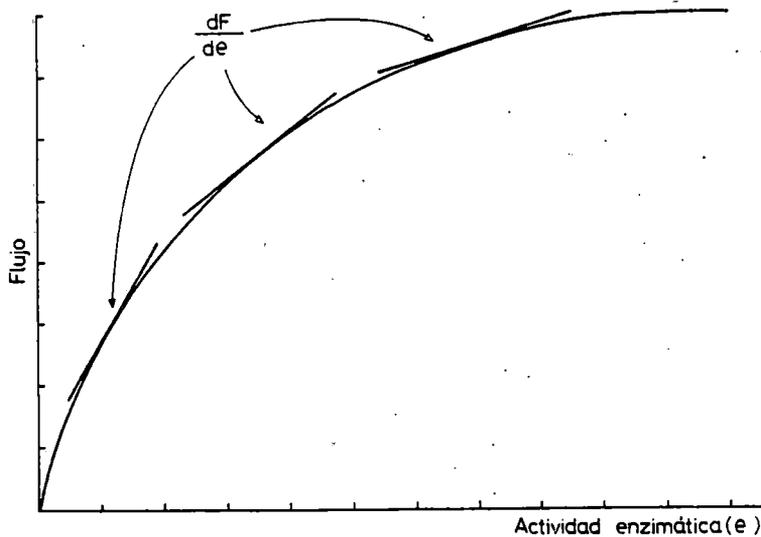


Fig. 1.1.- Relación Flujo-enzima.-

El flujo en una ruta responde a cambios en los parámetros de una enzima dada de forma no lineal. Cambios fraccionales iguales de la enzima en puntos diferentes producen efectos diferentes. Esta figura corresponde a un sistema en el que F y e tienen una relación hiperbólica.

Para el caso sencillo considerado aquí, el coeficiente puede tomar cualquier valor entre cero y la unidad, como se verá más adelante (pág. 11). Una enzima cuyo coeficiente C_E^F tenga un valor próximo a 1 es, evidentemente, más "importante" para el control del flujo que otra cuyo coeficiente sea por ejemplo 0.01. El valor particular de un coeficiente dado dependerá entre otras cosas de la relación de desequilibrio, de la concentración de enzima y del número de turnover que tenga, en relación con esos mismos parámetros de las demás enzimas de

la ruta, así como del grado de saturación y de la influencia de posibles efectores.

Los coeficientes $C_{E_i}^F$, son, por lo tanto, una medida cuantitativa de la responsabilidad de cada enzima para el control del flujo. No es posible según esto, establecer una clasificación simple de las enzimas en dos clases, controladoras y no controladoras, sino que el control se distribuye entre todas las enzimas. Descripciones de las mismas como "pacemaker" o "enzimas limitantes" del flujo son erróneas y se reemplazan por un continuo de valores entre cero y uno.

A.1.- La propiedad de la Suma.

Una importante propiedad de los Coeficientes de control del flujo para la enzima $C_{E_i}^F$ es la Propiedad de la suma. Dicha propiedad establece que la suma de todos los coeficientes $C_{E_i}^F$ de una ruta metabólica es igual a la unidad

$$\sum_{i=A, 1.2 \dots}^n C_{E_i}^F = 1 \quad (1.3)$$

Consideremos el caso general en el que todas las enzimas obedecen a cinéticas michaelianas o más complejas, incluyendo efectos de saturación, feedback o activación. La única suposición que haremos es que las expresiones de la velocidad de cualquier paso es una función de la forma

$$v = e f(a, x_1, x_2, \dots, i_1, i_2, \dots, \alpha_1, \alpha_2, \dots, k_1, k_2, \dots, K_{eq})$$

en la que aparecen implicados la concentración del sustrato a , de los intermediarios (x), cofactores (α) e inhibidores (i); las constantes de velocidad (k) y la constante de equilibrio (K_{eq}). Por otra parte, la velocidad es una función lineal de la concentración de la enzima, o del número de turnover. Esto junto con la suposición de que estamos en estado estacionario conduce inequívocamente a la Propiedad de la suma antes citada (ecuación 1.3).

Si tenemos a la ruta metabólica (Fig.1.1, pág.10) en estado estacionario y hacemos un cambio simultáneo en el parámetro e de todas las enzimas por el mismo factor α , de forma que no se altere la concentración de productos intermedios, el flujo habrá cambiado por el mismo factor y podremos escribir:

$$\frac{dF}{F} = \frac{de_1}{e_1} = \frac{de_2}{e_2} = \dots = \alpha$$

y también:

$$dF = \frac{\partial F}{\partial e_A} \cdot de_A + \frac{\partial F}{\partial e_1} \cdot de_1 + \dots$$

lo cual expresa que el cambio total en el flujo es la suma de las distintas contribuciones parciales.

Dividiendo por F la expresión anterior.

$$\frac{dF}{F} = \frac{\partial F}{\partial e_A} \cdot \frac{e_A}{F} \cdot \frac{de_A}{e_A} + \frac{\partial F}{\partial e_1} \cdot \frac{e_1}{F} \cdot \frac{de_1}{e_1} + \dots$$

Sustituyendo el valor de $C_{E_i}^F$ de la expresión (1.2) (pág. 10) y el factor de modificación α del sistema $\alpha = de/e$ resulta:

$$\alpha = C_{E_A}^F \cdot \alpha + C_{E_1}^F \cdot \alpha + \dots$$

con lo que se obtiene

$$\sum_{i=A, 1, 2, \dots}^n C_{E_i}^F = 1$$

Esta propiedad se demuestra igualmente para sistemas más complejos con enzimas que catalizan la extracción de productos intermedios de la ruta. En este caso dichas enzimas tendrán Coeficientes de control del flujo negativos. Fuera de estos casos, lo normal es que los coeficientes $C_{E_i}^F$ tengan valores entre 0 y 1.

Lo interesante de esta propiedad es que la determinación de un coeficiente $C_{E_i}^F$ nos da una información global sobre la regulación del sistema; es posible que en una ruta metabólica, la mayor parte de los coeficientes tengan valores muy bajos y que sólo hayan dos o tres valores significativos. En principio, es de esperar que las enzimas que estén en gran cantidad tengan coeficientes muy bajos, si no iguala cero; pero asimismo, también puede ser raro el caso de que un coeficiente tenga un valor 1 y todos los restantes cero, por lo que no tiene sentido hablar de un paso limitante en una ruta.

A.2.- Otros Coeficientes de control.

Lo mismo que se ha definido el Coeficiente de control del flujo para la enzima se pueden definir otros Coeficientes de control del flujo para otros efectores. Así, si un efector Q afecta a la actividad de una enzima, C_Q^F representa el Coeficiente de control del flujo para dicho efector.

$$C_Q^F = \frac{dF}{dq} \cdot \frac{q}{F}$$

Este coeficiente es el inicialmente denominado Coeficiente de Respuesta, R.

Existen además otra serie de coeficientes de control. $C_{E_i}^{X_j}$, que-

conforman la denominada matriz de elementos de control por Heinrich y Rapoport (1974). Dichos coeficientes se definen como:

$$\frac{dx_j}{x_j} / \frac{de_i}{e_i} \longrightarrow \frac{d \ln x_j}{d \ln e_i} = C_{E_i}^{X_j}$$

Estos coeficientes miden el efecto de las enzimas sobre otra variable sistémica : la concentración de los metabolitos. En una ruta metabólica las enzimas que preceden a un intermediario X_j tendrán coeficientes $C_{E_i}^{X_j}$ positivos (un incremento en la concentración de la enzima E_i , provoca un aumento de la concentración de X_j mientras que las posteriores en la secuencia tendrán valores negativos de este coeficiente. Los valores positivos y negativos de estos coeficientes se anulan mutuamente demostrándose fácilmente (Heinrich y Rapoport, 1975), que:

$$\sum_{i=A,1..i}^{J=1} C_{E_i}^{X_j} = 0$$

Esta Propiedad es general, y como es obvio, no está limitada a rutas metabólicas lineales.

B.- Coeficientes de elasticidad.

Otros coeficientes descritos por Kacser y Burns son los denominados Coeficientes de elasticidad. Estos se refieren a cada paso de reacción de una ruta metabólica y no al sistema completo, con respecto a un sustrato o efector determinado. En el sistema metabólico mostrado anteriormente el Coeficiente de elasticidad del paso de reacción catalizado por la enzima E para un sustrato de la misma X viene definido por

$$\mathcal{E}_X^v = \frac{dv}{dx} \cdot \frac{x}{v} \quad (1.4)$$

Para un efector Q de la misma enzima:

$$\mathcal{E}_Q^v = \frac{dv}{dq} \cdot \frac{q}{v} \quad (1.5)$$

Estos coeficientes describen el cambio infinitesimal en la velocidad v ("aislada" del sistema) como consecuencia de un cambio infinitesimal en la concentración del sustrato X o del efector Q. El valor de este coeficiente es, pues, una propiedad local y no una propiedad sistémica como lo son los coeficientes de control. El valor de \mathcal{E}_X^v o \mathcal{E}_Q^v depende de las concentraciones de todos los demás productos intermedios y efectores que puedan influir sobre v .

Un comentario aparte merece el coeficiente de elasticidad de una enzima para su sustrato, el cual lógicamente será un intermediario (o sustrato) de la ruta. En este caso, al ser la concentración de los

intermediarios en un estado estacionario dado una variable dependiente, el valor de la elasticidad para el sustrato de una enzima dependerá de todos los parámetros del sistema. Estas elasticidades son por lo tanto efectos antes que causas y es incorrecto preguntarse si un efecto - como es la concentración de un intermediario dado controla otro efecto (el flujo) cuando la realidad es que uno y otro son mutuamente interdependientes. El valor del Coeficiente de elasticidad depende del valor de v y del grado de saturación, siendo mayor cuanto menos saturada esté la enzima y cero cuando está totalmente saturada (Fig.1.2)

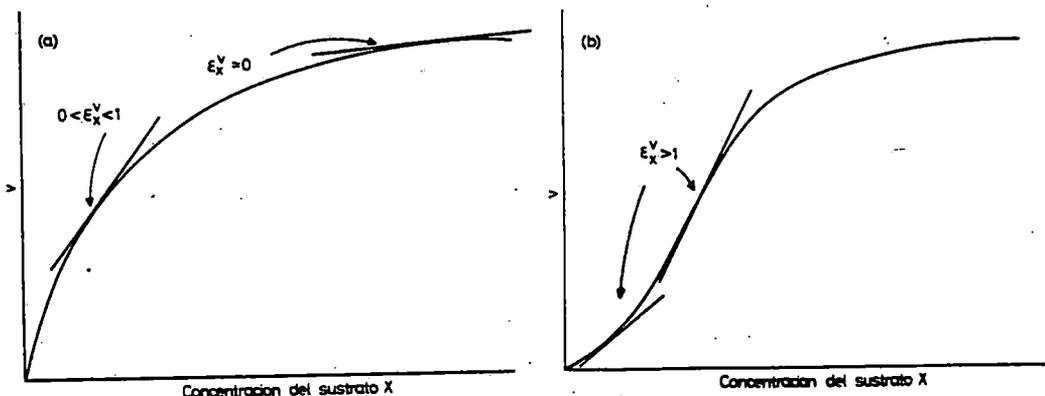


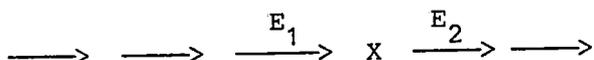
Fig. 1.2.- Variación del Coeficiente de elasticidad ϵ_X^v de una enzima con la concentración del sustrato X .

a) Cuando la enzima tiene cinética hiperbólica el Coeficiente de elasticidad oscila entre 0 (enzima totalmente saturada) y 1 (enzima a baja saturación).

b) Si la enzima tiene una cinética como la mostrada, el Coeficiente ϵ_X^v podrá tomar valores superiores a la unidad.

B.1.- La Propiedad Conectiva.

De acuerdo con las definiciones del Coeficiente de control del flujo para la enzima C_E^F y del Coeficiente de elasticidad ϵ_X^v , se puede deducir una relación cuantitativa entre ambos para las enzimas de una ruta y su intermediario común. En la ruta metabólica:



podemos hacer cambios en los parámetros de las enzimas E_1 y E_2 , uno positivo y otro negativo de forma que se anulen mutuamente sus efectos. El flujo de la ruta no se habrá alterado pero el valor de x habrá cambiado

siendo $dx/x \neq 0$.

Puesto que para cada enzima se cumple:

$$\frac{dv}{v} = \frac{de}{e}$$

$$\text{tendremos para } E_1: \frac{de_1}{e_1} + \varepsilon_X^{v_1} \cdot \frac{dx}{x} = 0 \quad (1.6)$$

$$\text{para } E_2: \frac{de_2}{e_2} + \varepsilon_X^{v_2} \cdot \frac{dx}{x} = 0 \quad (1.7)$$

como la modificación del sistema no ha variado el flujo, podemos escribir:

$$\frac{dF}{F} = 0 = C_{E_1}^F \cdot \frac{de_1}{e_1} + C_{E_2}^F \cdot \frac{de_2}{e_2} \quad (1.8)$$

Sustituyendo (1.6) y (1.7) en (1.8)

$$\frac{dF}{F} = 0 = C_{E_1}^F \varepsilon_X^{v_1} \cdot \frac{dx}{x} + C_{E_2}^F \cdot \varepsilon_X^{v_2} \cdot \frac{dx}{x}$$

$$\text{y } \left(C_{E_1}^F \cdot \varepsilon_X^{v_1} + C_{E_2}^F \cdot \varepsilon_X^{v_2} \right) \cdot \frac{dx}{x} = 0$$

como en las condiciones impuestas $\frac{dx}{x} \neq 0$

$$C_{E_1}^F \cdot \varepsilon_X^{v_1} + C_{E_2}^F \cdot \varepsilon_X^{v_2} = 0$$

La generalización de la propiedad correctiva establece que:

$$\sum C_E^F \cdot \varepsilon_X^v = 0 \quad (1.9)$$

para todas aquellas enzimas que se unan con X como sustrato, producto o efector. Esta es la segunda propiedad en importancia de los sistemas enzimáticos y aplicable también a rutas ramificadas. Es de gran utilidad práctica ya que puede usarse para determinar unos coeficientes a partir de otros conocidos. Revela las bases teóricas que conectan las medidas hechas sobre partes del sistema con su papel en el control del sistema.

Como ya se ha dicho más arriba, el valor del Coeficiente de elas

tividad para el sustrato de una enzima depende de su grado de saturación. Si se desarrolla una ruta metabólica en estado estacionario con una determinada concentración de sustrato inicial A, no saturante y se perturba el sistema aumentando la concentración de A, se obtendrá un nuevo estado estacionario con mayor flujo que antes y con mayor concentración de productos intermedios X_1 . Por consiguiente, los coeficientes de elasticidad de cada enzima para sus ligandos habrán variado y también lo habrán hecho sus coeficientes de control para la enzima.

C.- La distribución de la respuesta.

La respuesta neta de un sistema a una perturbación depende del Coeficiente de control C_E^F y del Coeficiente de elasticidad ϵ_Q^V . Demostraremos que la relación viene dada por la expresión siguiente:

$$C_Q^F = C_E^F \cdot \epsilon_Q^V \quad (1.10)$$

Supongamos que hacemos un cambio diferencial en q , el cual afecta al parámetro e de una enzima dada E , y simultáneamente provocamos un cambio opuesto en el valor de ese parámetro e , de tal forma que se anulen ambos efectos.

En estas circunstancias ni la concentración de los intermediarios ni el flujo habrán cambiado, haciéndolo únicamente la concentración de Q y el valor de e . Estas operaciones pueden ser contempladas a la luz de la teoría de dos maneras. Primero consideraremos la situación local de la enzima. El hecho de que la suma de los efectos de Q y e sobre la velocidad es nulo, puede expresarse de la siguiente forma:

$$\frac{dv}{v} = \epsilon_Q^V \cdot \frac{dq}{q} + \frac{de}{e} = 0 \quad (1.11)$$

Por otra parte, considerando el fenómeno desde el punto de vista sistémico, podemos escribir el mismo hecho de esta otra forma:

$$\frac{dF}{F} = C_Q^F \cdot \frac{dq}{q} + C_E^F \cdot \frac{de}{e} = 0 \quad (1.12)$$

Dividiendo ambas expresiones por de/e , obtenemos finalmente:

$$C_Q^F = C_E^F \cdot \epsilon_Q^V \quad (1.10)$$

Esta situación muestra que estudios realizados in vitro, pueden llevar a errores de predicción sobre los efectos en la situación in vivo si no se conocen los C_E^F . El Coeficiente de control del flujo para la enzima C_E^F es una propiedad sistémica independiente de si un efecto actúa sobre una enzima o no y de la intensidad de dicha interacción. Las elasticidades son propiedades locales de la enzima en un medio e independientes de qué cambios se puedan producir en el resto del sistema.

1.3.- Epilogo.

La regulación del metabolismo, como hemos intentando mostrar al principio de esta Introducción, requiere un enfoque global y cuantitativo. La Teoría del Control de Flujos resumida aquí nos proporciona un esquema teórico para la interpretación de los datos experimentales así como protocolos para la determinación de los mismos. Una consecuencia de la aplicación de esta teoría es que términos como enzimas "pacemaker" (o similares) tienen ahora poco significado (excepto en circunstancias extremas) y deben ser reemplazados por un valor, el Coeficiente de control del flujo para la enzima C_E^F . El empleo de estos métodos y del tratamiento teórico anterior permitirá la cuantificación del control de las rutas metabólicas haciéndolo menos esotérico y más accesible a los bioquímicos en general.

En la Biología actual y especialmente en la Bioquímica existe -- una gran corriente de interés y admiración por los éxitos alcanzados en la determinación de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos y de nucleótidos de los ácidos nucleicos. Sin embargo estos hechos, antes de cuestionar afianzan nuestra convicción de que el conocimiento de los aspectos energéticos y cinéticos de las rutas metabólicas es de importancia fundamental. Cuando se haya introducido el último aminoácido y el último nucleótido de la secuencia en la memoria de la computadora estaremos entonces mucho más informados que ahora. Dispondremos de una inmensa librería al lado del mapa metabólico, pero los datos, solos o junto a los mapas, no nos dirán cómo funciona la célula viva.

2.- PLAN DE TRABAJO

La Teoría del Control de Flujos, desarrollada por Kacser y Burns considera, tal como se ha expuesto, el estudio del control de una ruta metabólica considerada en su conjunto, con objeto de determinar los -- efectos reguladores de cada enzima sobre el flujo total. Aunque los - estudios sobre regulación metabólica deban hacerse in vivo para obtener conclusiones fisiológicas, los sistemas in vitro pueden, no obstante, - ser usados para explorar ciertos aspectos de la Teoría del Control de - Flujos. De acuerdo con los razonamientos expuesto hasta aquí y con los resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio se estableció - el siguiente plan de trabajo, dividido en tres Partes:

PARTE I :

- A) Desarrollo teórico del modelo matemático que para un sis-
tema metabólico lineal han presentado Kacser y Burns ex-
tendiéndolo a situaciones de saturación significativas de
todas las enzimas.
- B) Diseño de un método para la determinación experimental-
de los Coeficientes de control del flujo para la enzima-
en sistemas experimentales in vitro.
- C) Puesta a punto de un sistema experimental in vitro que-
permita examinar la aplicabilidad al mismo del modelo -
teórico y del método de determinación de los Coeficien-
tes de control citados.

PARTE II :

- A) Aplicación del método para la determinación de los Coe-
ficientes de control del Flujo para la enzima a siste--
mas metabólicos de estructura topológica no lineal (rutas
convergentes en un punto) in vitro.

PARTE III :

- A) Profundización en la analogía entre la cinética de las-
enzimas aisladas y la cinética de rutas metabólicas me-
diante un desarrollo teórico que permita definir el pa-
rámetro análogo a la constante de Michaelis para una ru-
ta metabólica para un sustrato dado ϕ_A , y estudiar la -
relación de éste con otros parámetros particulares y glo-
bales del sistema.
- B) Enunciar una nueva definición de enzima auxiliar a la -
luz de la Teoría del control de Flujos.

3.- PARTE I.- Estudio del Control de flujos en un Sistema experimental in vitro. Coeficiente de control de flujo para la enzima.

3.1.- TEORIA

3.1.1. Saturación enzimática de un sistema metabólico en estado estacionario.

En un sistema metabólico en estado estacionario como el considerado anteriormente (Introducción, pág. 9), la ecuación de velocidad de cada paso ($X_i \rightleftharpoons X_{i+1}$) viene dada (Alberty, 1959) por:

$$v_i = \frac{\frac{V_i}{K_i} \left(x_i - \frac{x_{i+1}}{K_{eq}^i} \right)}{1 + \frac{x_i}{K_i} + \frac{x_{i+1}}{K_{i+1}}} \quad (3.1)$$

donde V_i , K_i y K_{i+1} son las V_{max} y las constantes de Michaelis, para sustrato y producto respectivamente, y K_{eq}^i es la constante de equilibrio. Para el caso en que la enzima E_i no tenga una saturación apreciable por sustrato y productos ($x_i/K_i = 0$ y $x_{i+1}/K_{i+1} = 0$) la ecuación (3.1) adopta la forma:

$$v_i = \frac{V_i}{K_i} \left(x_i - \frac{x_{i+1}}{K_{eq}^i} \right) \quad (3.2)$$

Haciendo uso de esta ecuación para cada uno de los pasos de la ruta metabólica, junto con el hecho de que en un sistema en estado estacionario, todas las velocidades v_i deben ser iguales al flujo a través del sistema, Kacser y Burns (1973, 1981) obtuvieron una serie de ecuaciones diferenciadas lineales en x_i , cuya solución da una expresión explícita para el flujo (Ecuaciones (A.5) y (A.6) en el Apéndice A.)

Consideraremos ahora un sistema en el cual la primera enzima E_A tiene una saturación significativa por su sustrato estando el resto de las enzimas a baja saturación por sus sustrato y/o productos. Entonces la ecuación de velocidad para el primer paso es:

$$v_A = \frac{\frac{V_A}{K_A} \left(a - \frac{p}{K_{eq}^A} \right)}{C_A}$$

donde

$$C_A = 1 + \frac{a}{K_A} + \frac{x_1}{K_1}$$

es una constante a partir del momento en el que se alcanza el estado estacionario. Las ecuaciones de velocidad para los otros pasos serán de la forma:

$$v_i = \frac{V_i}{K_i} \left(x_i - \frac{x_{i+1}}{K_{eq\ i}} \right)$$

Operando con el conjunto de ecuaciones diferenciales de forma análoga a como se hizo anteriormente (véase apéndice A) se obtiene la siguiente expresión para el flujo, equivalente a la ecuación (A.4) (pág 108).

$$F = \frac{a - \frac{p}{K_{eq\ A,n}}}{\frac{K_A C_A}{V_A} + \frac{K_1}{V_1 K_{eq\ A}} + \dots + \frac{K_n}{V_n K_{eq\ A,n-1}}} \quad (3.3)$$

Esta ecuación tiene un carácter algo más general que la (A.4) ya que describe tanto las situaciones de baja saturación (C_A próximo a 1) como aquellas otras en las que hay una saturación significativa, $C_A > 1$. Para cualquier valor de a , sin embargo, la magnitud del primer término queda fijada.

Si consideramos únicamente la actividad de la primera enzima g_A (con saturación significativa) como variante podemos agrupar todo lo que es constante en el denominador de (3.3) en C_K . (Los parámetros g_i se definen en el apéndice A).

$$C_K = \frac{1}{g_1} + \frac{1}{g_2} + \dots + \frac{1}{g_n}$$

La ecuación (3.3) puede ser escrita entonces:

$$F = \frac{C_0}{\frac{C_A + C_K}{g_A}} \quad (3.4)$$

donde

$$C_0 = a - \frac{p}{K_{eq}}$$

(3.4) podrá expresarse también como

$$F = \frac{C_1 \cdot g_A}{C_2^* + g_A} \quad (3.5)$$

donde $C_1 = C_O/C_K$ y $C_2^* = C_A/C_K$

La expresión del parámetro C_1 en este sistema es la misma que la descrita por Kacser y Burns para un sistema sin saturación apreciable. Su significado físico es por lo tanto el mismo. C_2^* por su parte tiene una expresión diferente a la que le dan Kacser y Burns, pero su significado físico sigue siendo el mismo.

Si en lugar de la primera consideramos como variable la actividad de una cualquiera de las demás del sistema, el mismo tratamiento nos da una expresión análoga.

$$F = \frac{C_1 \cdot g_i}{C_2 + g_i} \quad (3.6)$$

con la única diferencia de que ahora:

$$C_K = \frac{C_A}{g_A} + \frac{1}{g_1} + \dots + \frac{1}{g_{i-1}} + \frac{1}{g_{i+1}} + \dots + \frac{1}{g_n}$$

$$y \quad C_2 = 1/C_K$$

Este tratamiento se podrá, pues, generalizar al caso en el que todas las enzimas tengan una saturación significativa por sus sustratos y/o productos. Sus ecuaciones de velocidad serán de la forma:

$$v_i = \frac{\frac{V_i}{K_i} \left(x_i - \frac{x_{i+1}}{K_{eq}^i} \right)}{C_i} \quad ; \quad C_i = 1 + \frac{x_i}{K_i} + \frac{x_{i+1}}{K_{i+1}}$$

En la expresión (3.3) aparece un término del tipo C_i para cada una de ellas

$$F = \frac{a - \frac{p}{K_{eq}^{A,n}}}{\frac{K_A C_A}{V_A} + \frac{K_1 C_1}{V_1 K_{eq}^A} + \frac{K_2 C_2}{V_2 K_{eq}^{A,1}} + \dots + \frac{K_n C_n}{V_n K_{eq}^{A,n-1}}}$$

Las expresiones de F deducidas a partir de aquí tienen la misma forma que las obtenidas anteriormente (3.5) y (3.6) lo mismo que las formulaciones de C_1 y C_2 (véase apéndice A)

$$F = \frac{C'_1 g_i}{C'_2 g_i} \quad (3.7)$$

donde

$$C'_1 = C_o / C_{K'} \quad C'_2 = \frac{C_i}{C_{K'}}$$

$$C_{K'} = \frac{C_A}{g_A} + \frac{C_1}{g_1} + \dots + \frac{C_{i-1}}{g_{i-1}} + \frac{C_{i+1}}{g_{i+1}} + \dots + \frac{C_n}{g_n}$$

$$C_o = a - \frac{p}{K_{eq, A, n}}$$

En general, pues, en un sistema enzimático lineal con sus enzimas saturadas significativamente según el valor indicado por los parámetros C_i ; el flujo, expresado en función de la actividad enzimática de una de ellas (permaneciendo el resto constante) queda descrito por la ecuación (3.7); ecuación que tiene la misma forma que la descrita por Kacser y Burns para un sistema sin saturación significativa. La diferencia estriba en que la nueva formulación tiene un carácter más general, siendo la situación descrita por Kacser y Burns un caso particular de la misma: $C_i = 1$.

3.1.2.- Determinación de los Coeficientes del control del flujo para la enzima.

Los coeficientes de control del flujo definidos por la expresión:

$$C_{E_i}^F = \frac{dF}{dg_i} \cdot \frac{g_i}{F}$$

pueden ser determinados a partir de los datos experimentales de flujos frente a valores de g_i de la siguiente manera:

Al hacer la derivada parcial de la ecuación (3.7) con respecto a g_i obtenemos (para el desarrollo que sigue véase el apéndice B):

$$\frac{\partial F}{\partial g_i} = \frac{C'_1 \cdot C'_2}{(C'_2 + g_i)^2}$$

Sustituyendo esta expresión en la definición de $C_{E_i}^F$ tenemos:

$$C_{E_i}^F = \frac{C_1' C_2'}{(C_2' + g)^2} \frac{g_i}{F} \quad (3.8)$$

(3.7). Por otra parte, podemos obtener el valor de C_2' de la ecuación-

$$C_2' = \frac{g_i (C_1' - F)}{F}$$

el cual podemos sustituir en la ecuación (3.8) lo que nos da:

$$C_{E_i}^F = \frac{C_1' - F}{C_1'} \quad (3.9)$$

C_1' es un parámetro del sistema cuyo significado físico es el flujo máximo que atraviesa la cadena enzimática cuando la actividad de E_i tiende a infinito; es decir, representa el flujo que recorre el sistema después de la adición de suficiente cantidad de enzima E_i de tal manera que adiciones posteriores de E_i no altera el valor del flujo; o, dicho de otra manera,

$$C_1' = \lim_{g_i \rightarrow \infty} F$$

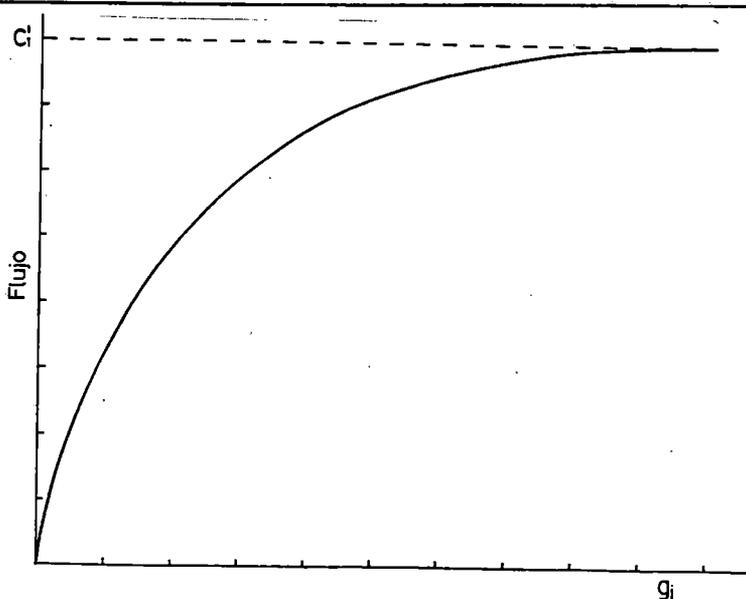


Fig. 3.1.- Flujo de una ruta metabólica frente a los valores del parámetro g_i .

La representación del flujo de una ruta metabólica frente a los valores del parámetro g_i de una enzima individual muestra una relación hiperbólica de acuerdo con la ecuación (3.7). C_1' es un parámetro del sistema que describe el flujo máximo -- conseguido después de una adición grande de E_i al sistema (incremento del valor de g_i inicial).

Este valor se puede determinar en un sistema in vitro obtenido a partir de un extracto de tejido, añadiendo suficiente cantidad de enzima. Efectivamente, si el sistema se titula con varias cantidades de una enzima particular E_1 , debe obtenerse experimentalmente una curva - como la mostrada en la figura 3.1, de acuerdo con la teoría.

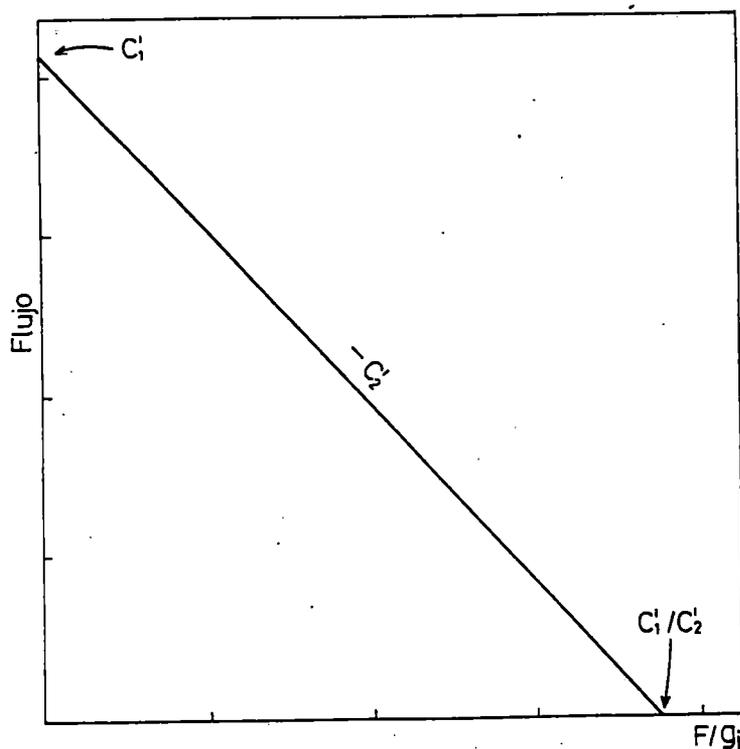


Fig. 3.2.- Representación de F frente a F/g_1 .

Los valores de flujos y F/g_1 tienen una relación lineal, la cual corresponde a la representación gráfica de la ecuación (3.10). Los datos para esta representación pueden obtenerse en un sistema in vitro por titulación con cada una de las enzimas E_1 . Los parámetros C_1 y C_2 se calculan directamente de estas gráficas, permitiendo determinar los Coeficientes de control del flujo para la enzima.

Ahora podemos escribir la siguiente ecuación obtenida a partir de (3.7).

$$F = - C'_2 \frac{F}{g_i} + C'_1 \quad (3.10)$$

Esta ecuación es la de una recta, que se obtiene de la representación de F frente a F/g_i (Fig.3.2), donde el valor de C'_1 puede calcularse de la intersección con la ordenada. Llegados aquí, es conveniente destacar el relativo carácter teórico del valor de C'_1 obtenido por extrapolación de la serie de datos experimentales de titulación con la enzima.

Debe tenerse en cuenta que los diferentes valores de g_i se refieren a la actividad enzimática total de la enzima E_i presente en el sistema; dicha actividad comprende la del extracto más la añadida en el proceso de titulación. Esto hace necesario el ensayo previo de la actividad enzimática en el extracto. Además, el sistema podrá titularse con una enzima proveniente de cualquier fuente biológica, siempre que se representen los valores de g_i en la gráfica. Puesto que la K_{eq} es una constante específica de la reacción, puede reemplazarse g_i por V_{max}/K_m .

Es importante destacar que en este proceso de titulación con enzima, se está suponiendo que el grado de saturación de las enzimas C_i permanece constante. Esto constituye una limitación del modelo (aunque no del procedimiento) puesto que en general al variar g_i varían los niveles de los intermediarios y por lo tanto los valores de C_i en cada estado estacionario. No obstante en la medida en que estas variaciones sean menores de un estado estacionario a otro, mejor será la aproximación del modelo a la situación real.

Los Coeficientes de control del Flujo pueden por lo tanto ser calculados haciendo uso de la ecuación (3.9) empleando el valor de F antes de la adición de cualquier enzima (flujo basal del sistema) y de C'_1 , una vez verificada la relación hiperbólica entre el flujo y la actividad enzimática.

C'_2 es otro interesante parámetro del sistema que se puede obtener a partir de la pendiente (o de la intersección con el eje de abscisas) en la Fig. 3.2. Su significado físico es el valor de g_i que da un flujo semimáximo en el sistema. De las ecuaciones (1.1) y (3.7) se obtiene la siguiente expresión que permite también el cálculo de los Coeficientes de control del flujo haciendo uso de los valores de C'_2 y g_i .

$$C_{E_i}^F = \frac{C'_2}{C'_2 + g_i} \quad (3.11)$$

De hecho con cualquiera de las ecuaciones (3.7) ó (3.11) pueden

calcularse los Coeficientes de control del flujo, puesto que son equivalentes entre sí.

Finalmente es de gran importancia destacar dos aspectos de este procedimiento de determinación de los Coeficientes de control del flujo. El primero se refiere a la predicción que nuestro modelo generalizado desarrollado en el apartado anterior nos permite hacer sobre la evolución del valor del Coeficiente de control del flujo de la enzima- E_i , cuando se aumenta la concentración del sustrato de la ruta. Como ya sabemos:

$$C_{E_i}^F = \frac{C'_{1_i} - F}{C'_{1_i}}$$

donde:

$$C'_1 = C_o / C'_K$$

siendo:

$$C_o = a - \frac{p}{K_{eq}^{A,n}} ; C'_K = \frac{C_A}{g_A} + \dots + \frac{C_{i-1}}{g_{i-1}} + \frac{C_{i+1}}{g_{i+1}} + \dots + \frac{C_n}{g_n}$$

y F es el flujo basal.

Al hacer mayor a , concentración del sustrato de la ruta, C_o aumenta; pero también lo hará C'_K , puesto que aumentan los niveles de los intermediarios. El nuevo valor de C'_1 podrá ser mayor, igual o menor que el original según sea la magnitud de los incrementos de C_o y C'_K F por su parte aumenta a medida que aumenta a .

De todo esto se deduce que el nuevo valor del coeficiente $C_{E_i}^F$ podrá ser mayor, igual o menor que el anterior, reflejándose así la importancia relativa de las interacciones del sustrato e intermediarios de la ruta con las enzimas que la componen.

El segundo aspecto, y sin duda el más trascendental se refiere a la generalidad del procedimiento para determinar $C_{E_i}^F$. Hasta aquí, para llegar a la expresión:

$$C_{E_i}^F = \frac{C'_{1_i} - F}{C'_{1_i}}$$

nos hemos basado en un modelo enzimático lineal, con las enzimas actuando con un cierto grado de saturación C_i . Ahora bien, es evidente que cualquiera que sea la estructura del sistema enzimático, si la variación del flujo que lo atraviesa guarda una relación hiperbólica del tipo de la ecuación (3.7), con la actividad de una enzima dada g_i del mismo, la deducción de la expresión $C_{E_i}^F$ seguirá siendo válida y aplicable. Por lo tanto, aún cuando la estructura no sea lineal y no

se cuente con una expresión explícita del flujo (como por ejemplo la función explícita del flujo dada en (3.3)), bastará con comprobar experimentalmente que la relación entre F y g_i obedece a una ecuación del tipo:

$$F = \frac{C'_1 g_i}{C'_2 + g_i}$$

para estar en condiciones de determinar el Coeficiente de control del flujo para la enzima. De este carácter general haremos uso más adelante, permitiéndonos llegar a interesantes conclusiones sobre la regulación de sistemas metabólicos complejos.

3.2. SISTEMA EXPERIMENTAL

El sistema experimental que hemos usado en esta investigación, consiste en un extracto soluble de hígado de rata, con glucosa, ATP y NADH como sustratos. Dicho extracto convierte glucosa en glicerolfosfato por medio de la ruta glicolítica, registrándose el flujo como descenso de la concentración de NADH por la reacción de la glicerolfosfatodeshidrogenasa.

Las razones que nos llevaron a elegir este sistema experimental fueron de varios tipos. Por un lado, experimentos previos en nuestro Departamento sobre glicólisis in vitro (Meléndez, et al 1984) mostraron la existencia de un importante flujo hacia glicerolfosfato en los extractos de hígado de rata, recayendo la mayor parte del control de dicho flujo sobre la glucoquinasa y la fosfofructoquinasa. Así pues, la producción de glicerolfosfato en extractos de hígado de rata se mostró en principio, como un sistema útil para el estudio de la distribución del control del flujo. Por otro lado, la evidente flexibilidad metabólica que muestra el hígado, responsable del metabolismo central del organismo, y capaz de adaptar su funcionamiento y regulación a muy variadas situaciones fisiológicas, tales como la digestión, ayuno, diabetes o regeneración nos señalaban a este órgano como el idóneo para investigar en él las posibles diferencias en la distribución de los Coeficientes de control del flujo para la enzima, de una a otra de esas situaciones metabólicas, lo cual está en la línea de otros objetivos de investigación de nuestro Departamento.

Además, el sistema muestra, por su naturaleza y composición, ser lo suficientemente complejo como para permitir examinar la teoría y su aplicabilidad en situaciones distintas de las triviales, sin que por otra parte la complejidad del mismo nos impida realizar este objetivo. Finalmente, lo frecuentemente que sistemas de esta clase se presentan en la investigación bioquímica y la accesibilidad de los mismos, concedía una mayor potencialidad a las conclusiones generales a las que nos pudiera conducir el trabajo que nos ocupa.

A partir de aquí fue preciso dejar bien establecido dos aspectos fundamentales de nuestro sistema experimental. A saber: La delimitación de la ruta metabólica y la adecuación del sistema experimental-

al modelo teórico que fue desarrollado previamente en el apartado 3.1.1.

3.2.1.- Delimitación de la ruta metabólica.

Nuestro modelo teórico requiere una ruta metabólica lineal. Para conseguir esto, en nuestro extracto se añadieron las enzimas aldolasa, triosafosfoisomerasa y glicerolfosfatodeshidrogenasa en grandes cantidades con lo cual se consiguieron dos cosas. Por una parte, al añadir un exceso de estas enzimas, sus Coeficientes de control del flujo se hicieron virtualmente cero. Las otras enzimas, presentes únicamente en las concentraciones del extracto de hígado, glucoquinasa, fosfoglucoisomerasa y fosfofructoquinasa, deberán pues, dar cuenta del control total de la ruta metabólica y por lo tanto, sus Coeficientes de control del flujo deberán sumar la unidad. Por otra parte, la aceleración de estos tres últimos pasos permite obtener una ruta lineal que va desde glucosa a glicerol-3-fosfato evitando el drenaje de gliceraldehído-3-fosfato hacia L-lactato o hacia el ciclo de las pentosas, lo cual generaría Coeficientes de control del flujo negativos.

El sistema así definido, contiene además de las enzimas fosforilantes glucoquinasa y fosfofructoquinasa, las correspondientes desfosforilantes glucosa-6-fosfatasa y fructosa-1,6-bifosfatasa, las cuales están implicadas directamente en la ruta metabólica en estudio. Dichas enzimas afectan al flujo que atraviesa el sistema en cada momento e influyen por lo tanto en el valor de los parámetros C_1' , C_2' , flujo inicial y otros. Esta influencia quedará reflejada en el valor que tome el Coeficiente de control del flujo en cada caso.

3.2.2.- Adecuación del sistema experimental al modelo teórico.

La verificación de dicha adecuación requiere examinar los siguientes aspectos:

- A.- Establecimiento del estado estacionario.
- B.- Cinética de las enzimas individuales en el sistema.

A.- Establecimiento del estado estacionario.-

La concentración de glucosa empleada en todos los experimentos fue de 5 mM y el flujo que se obtiene en cada caso no da cuenta de un descenso significativo en esa concentración durante el tiempo del ensayo. La caída en la concentración de NADH, que indica el flujo de la ruta fue constante en todos los experimentos aunque obviamente con valores diferentes para experimentos diferentes.

Interesa además que el estado estacionario sea suficientemente duradero en cada experimento. De hecho, el sistema tal como se ha descrito hasta aquí muestra un tiempo de transición excesivamente grande. Este dilatado tiempo de transición se debe posiblemente a la síntesis-

de fructosa-2,6-bifosfato, potente activador de la fosfofructoquinasa, en nuestro sistema in vitro; síntesis que ha sido demostrado que se produce en condiciones similares a las de nuestro sistema (Hers y Van Schaftingen, 1982). Fue preciso reducir el tiempo de transición añadiendo dicho efector a la mezcla de incubación. Se obtuvieron entonces estados estacionarios más largos y con el mismo valor de flujo que el obtenido sin añadir este último efector después del tiempo de transición.

Con la concentración de glucosa usada, 5 mM, el porcentaje de saturación de la glucoquinasa es de un 33%. La concentración de ATP se tamponó con creatinafosfato y creatinaquinasa. Este procedimiento, además de lograr una concentración constante de ATP frente al consumo de dicho metabolito durante el tiempo en el que el sistema actuaba, anulaba cualquier influencia que sobre el flujo del sistema pudieran tener las ATPasas presentes en el extracto.

El glicerol-3-fosfato producido se valoró comprobándose la no significativa acumulación del mismo, manteniéndose su concentración por debajo del valor 0.1 mM. La concentración de glucógeno en los ensayos era del orden de 3.4 mM (expresada en unidades de glicosilo). La transformación del glucógeno en glucosa-6-fosfato tendrá posiblemente influencia en el establecimiento de cada estado estacionario particular y formará parte de este modo del "medium" o ambiente molecular en el que el sistema desarrolla su actividad. Tenemos, pues, valores constantes de flujo en cada experimento junto con concentraciones constantes también de sustratos y productos finales. Estos dos hechos nos garantizan suficientemente el establecimiento de estados estacionarios en nuestros experimentos.

B.- Cinética de las enzimas individuales.

Al mantener constantes las concentraciones de los sustratos de la ruta se consigue, además, que la cinética de las enzimas que catalizan la transformación de dos sustratos (como es el caso de la glucoquinasa y de la fosfofructoquinasa) se simplifiquen a cinéticas monosustratos: Glucosa y F6P.

La cinética de Michaelis-Menten de las tres enzimas entre quienes se distribuye el control del flujo del sistema se comprobó en las mismas condiciones en las que el sistema se desarrolla. Sus actividades fueron determinadas de la misma forma, así como los valores de sus constantes de Michaelis, siendo en todos los casos semejantes a los descritos en la literatura en condiciones similares. Por otra parte, las actividades enzimáticas se valoraron al principio y al final de los experimentos de titulación, comprobándose que las enzimas no sufrían pérdidas significativas en su actividad durante el tiempo que duraban los ensayos. Esto significa, por lo tanto, que los procesos proteolíticos son irrelevantes en nuestras condiciones. Al aplicar el método experimental es preciso ensayar las enzimas comerciales empleadas en los experimentos de titulación en las mismas condiciones en las que se encuentra el sistema; así como verificar su cinética de Michaelis-Menten en esas mismas condiciones. Esto se hace con objeto de calcular y

situar correctamente en las gráficas los datos de actividad. En nuestro caso, los resultados de esos ensayos fueron los mismos que los indicados por el fabricante y sus K_M fueron las mismas que las descritas en la literatura.

En resumen, el conjunto de estas consideraciones y el rango de los valores de concentración de sustratos y productos, así como el de los niveles de actividad enzimática y K_M sitúan, en principio, a nuestro sistema experimental dentro del modelo teórico descrito anteriormente (apartado 3.1.1) haciendo posible el estudio de la aplicabilidad de dicha teoría al mismo.

3.3.- MATERIALES Y METODOS

3.3.1.- Material biológico.

Ratas hembras (Ratas norwegicus), de raza Wistar, albinas, suministradas por Pan Lab, Barcelona (España). Se mantuvieron en jaulas de plástico transparente, con iluminación homogénea, en grupos de tres a cuatro por jaula. Fueron criadas sometidas a períodos de luz desde las 9 a 21 horas y alimentadas con una dieta estándar de laboratorio (65% de carbohidratos, 11% grasas, 24% proteínas), con libre acceso a agua y comida. Se les mantuvo en una habitación cuya temperatura se ajustó a 20-22°C. Se emplearon animales que tenían entre 80 y 100 días, con un peso entre 180 y 220 gramos.

3.3.2.- Métodos.

3.3.2.1.- Obtención y preparación de las muestras.

Los hígados se obtuvieron de las ratas una vez anestesiadas con éter etílico. Les fué extraído rápidamente, siendo lavados a continuación en cloruro sódico 0.85% frío (0-4°C). Se secaron en papel de filtro pesándose después en un granatario. Una vez pesados fueron homogeneizados en la relación 1/3 (p/v), en tampón Hepes 50 mM, pH 7.4, que contenía además 10 mM de ortofosfato sódico, 100 mM de cloruro potásico y 10 mM de cloruro de magnesio. El tampón contenía también 1 g/ml de inhibidor de tripsina, de sulfato de estreptomycin y de penicilina sódica. La homogeneización se llevó a cabo en un Potter-Elvehjem con émbolo de teflón, no superándose las 3000 r.p.m. del homogeneizador y manteniendo el potter, mientras duró la homogeneización (menos de 1 min.) en un baño de hielo. Los homogeneizados se centrifugaron dos veces a 27.000 g durante 20 y 10 minutos respectivamente en tubos de polietileno. La centrifugación se realizó a 0-4°C. Los sobrenadantes fueron usados inmediatamente en los experimentos cinéticos.

Paralelamente se realizaron las mismas operaciones con un homogeneizado idéntico, preparado en tampón 0.1 M de ortofosfato en lugar de hepes, con objeto de destinarlo a las valoraciones de proteínas ya que ha sido probado (Cooper, T.G, 1977) que el hepes no puede ser usado

cuando se quieren valorar las proteínas por el método de Lowry ya que producen blancos extraordinariamente altos que dificultan las medidas de absorbancia.

3.3.2.2.- Determinación de las concentraciones de ATP y producto final en el estado estacionario.

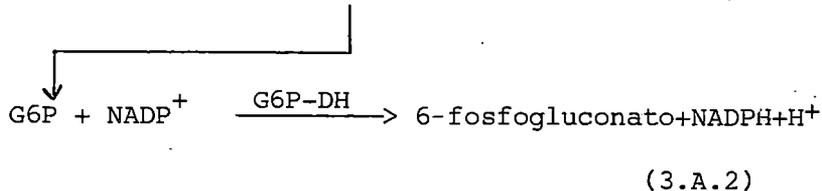
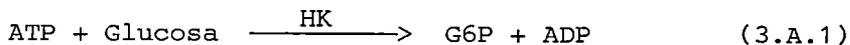
Si una sustancia participa como sustrato en una reacción catalizada enzimáticamente podrá ser determinada cuantitativamente utilizando las enzimas como reactivos específicos y las propiedades fisicoquímicas del sustrato o productos de la reacción para su cuantificación.

Si la transformación del sustrato es completa, el análisis enzimático es sencillo y la concentración puede ser fácilmente calculada con ayuda de las constantes fisicoquímicas conocidas del producto (por ejemplo, los coeficientes de extinción en el caso de sustancias que absorben luz).

A. Determinación de ATP.

A.1. Principio.

Basándonos en lo anteriormente expuesto es posible determinar la concentración de ATP según el siguiente esquema:



La hexoquinasa fosforila a la glucosa con ATP en presencia de Mg^{2+} formando G6P, la cual es deshidrogenada por la G6P-DH con NADP^+ para rendir 6-fosfogluconolactona y NADPH. Este último se determina espectrofotométricamente siguiendo en cambio de absorbancia a 340 nm.

A.2. Reactivos.

I. Acido perclórico HClO_4 , 6N.

II. Carbonato potásico K_2CO_3 . 5 M.

III. Tampón trietanolamina 50 mM pH 7.6 conteniendo también cloruro de magnesio MgCl_2 0.5 mM. Para la preparación del tampón se empleó agua bidestilada y desionizada recién obtenida.

IV. Disolución de NADP^+ , 25 mM.

- V. Disolución de G6P-DH, 25 U/ml.
- VI. Disolución de glucosa, 1.03 M.
- VII. Disolución de HK, 103 U/ml.

Todos los reactivos, salvo los dos primeros, se prepararon en el tampón III. I y II, se prepararon con agua bidestilada y desionizada.

A.3.- Procedimiento.

El procedimiento seguido es una modificación del descrito por - Lamprecht y Trantscholt en Methods of Enzymatic Analysis (1974).

A.3.1.- Recogida y tratamiento de las muestras.

Los ensayos se iniciaban tal como se ha descrito en el apartado de titulación con enzimas (3.3.2.4) tomándose las muestras a 2,4 y 6 minutos a partir del momento en el que el flujo alcanzaba un valor constante. Las muestras eran de 1 ml y se detenía la reacción inmediatamente por desnaturalización de las proteínas con 100 μ l de perclórico(I). Se centrifugaba a 3000 g durante 10 minutos en una centrifuga de mesa y se separaba el sobrenadante del precipitado formado. A continuación se ajustaba el pH a 3.5 (papel indicador) con la disolución del carbonato potásico (II). Se mantuvo entonces la mezcla en un baño de hielo durante 15 min aproximadamente separando en este momento el sobrenadante del nuevo precipitado. Este sobrenadante es el empleado en las determinaciones.

A.3.2.- Ensayos.

En los ensayos se emplearon cubetas de 1 cm de paso de luz, midiendo el cambio de absorbancia a 340 nm. El volumen final fue de 2.06 ml. Las absorbancias se midieron frente a un blanco que contenía el - tampón (III). Las medidas se realizaron a 25°C y por triplicado.

Inicialmente se disponían en la cubeta, 1.5 ml del tampón (III) 0.3 ml de la muestra y 80 μ l de la disolución de NADP⁺ (IV). Se mezclaba y se dejaba estar hasta conseguir un valor de absorbancia constante. A continuación se añadían 40 μ l de la disolución de G6P-DH(V), se mezclaba y se dejaba transcurrir la reacción(3.A.2) hasta que no se observaban variaciones significativas en los valores de la absorbancia: A_0 .

Se añadían a continuación 100 μ l de glucosa (VII) y 40 μ l de -- Hexoquinasa(VII). Procediendo de igual manera que antes se registró - la definitiva absorbancia final A_1 : $\Delta A_{ATP} = A_1 - A_0$.

Las concentraciones en la mezcla de reacción vienen dadas en la siguiente tabla, referidas al volumen final de 1.2 ml :

Trietanolamina	50 mM
MgCl ₂	5 mM
NADP ⁺	1 mM
G6P - DH	0.5 unidades/ml
Glucosa	50 mM
HK	2 unidades/ml

A.4.- Cálculos

Para la determinación de las concentraciones de ATP en la muestra hacemos uso de la ecuación (3.13), obtenida a partir de la ecuación de Lambert-Beer de la siguiente forma:

Según la ecuación de Lambert-Beer la concentración viene dada - por:

$$C = \frac{A}{\epsilon \times l.} \quad (3.12)$$

A: absorbancia.

ϵ : coeficiente de extinción molar del NADPH.

l: paso de luz

$$\text{Según (3.12) : } C_{\text{inicial}} - C_{\text{final}} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{\epsilon \times l.}$$

Si la conversión es completa $C_{\text{final}} = 0$.

$$C = \frac{\Delta A}{\epsilon \times l.} \quad \mu\text{mol/ml (en la cubeta)}$$

Para obtener el valor de la concentración en la muestra es preciso tener en cuenta la relación volumen del ensayo: volumen de la muestra (V:v). Por lo tanto:

$$C = \frac{\Delta A \times V}{\epsilon \times l \times v} \quad \mu\text{mol/ml (en la muestra)}$$

Finalmente es preciso corregir esa concentración por el factor de dilución correspondiente al proceso de preparación de las muestras. Este factor fue de 1.12 en todos los casos.

$$C = \frac{\Delta A \times V}{\epsilon \times l \times v} \times 1.12 \quad \mu\text{mol/ml (en la reacción)}$$

La expresión empleada para el cálculo de la concentración de ATP

según esto fue:

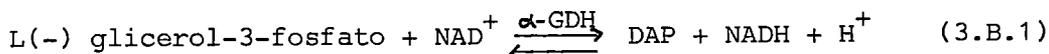
$$C = \Delta A \times 1.23 \mu\text{mol/ml} \quad (3.13)$$

B.- Determinación del L-(-)glicerol-3-fosfato y L-(+)-lactato.

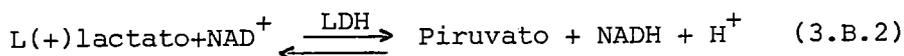
Por el procedimiento de "punto final" se llega a la situación de equilibrio. Si la conversión es incompleta debido a una constante de equilibrio desfavorable, la determinación de metabolitos aún es posible con ayuda de técnicas experimentales especiales. Las más importantes son el aumento de la concentración del sustrato, la variación del pH y el empleo de agentes "atrapantes". En los métodos empleados para valorar el G3P y el lactato, hacemos uso de estas tres posibilidades.

B.1.- Principio.

Para el caso del G3P el método se basa en la oxidación del glicerol-3-fosfato por el NAD^+ en la reacción catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (α -GDH) para formar dihidroxiacetonafofosfato -- (DAP) y NADH, midiendo la formación del NADH espectrofotométricamente a 340 mm.



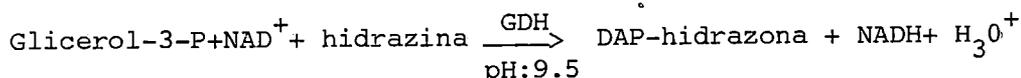
El equilibrio de esta reacción está desplazado hacia la izquierda ($K_{\text{eq}} = 5.8 \cdot 10^{-12}$ M a 25°C). La misma situación se presenta en la reacción (3.B.2), utilizada para valorar el L-lactato.



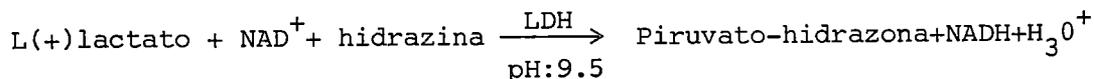
en la que el NAD^+ oxida al lactato en la reacción catalizada por la -- lácticodeshidrogenasa (LDH) para formar piruvato y NADH. Aquí la constante de equilibrio es $K_{\text{eq}} = 2.9 \cdot 10^{-2}$ M a 25°C.

No obstante, tanto el G3P como el lactato son totalmente transformados si los productos de la reacción se eliminan del medio.

En efecto, en el medio alcalino en el que llevaremos a cabo la reacción, los protones son eliminados y DAP y piruvato "atrapados" por la hidrazina presente en el medio para formar las correspondientes hidrazonas. La reacción para la determinación espectrofotométrica del G3P será entonces:



y para la del lactato:



Se emplearon concentraciones elevadas de NAD^+ y de las enzimas-auxiliares α -GDH y LDH con objeto de hacer más cuantitativa la transformación en cada caso.

B.2.- Reactivos.

- I. Acido perclórico HClO_4 6N
- II. Carbonato potásico K_2CO_3 5M
- III. Tampón hidrazina/glicina (0.4 M/1M) pH: 9.5 conteniendo además $\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.5 mM. Este reactivo se preparó con agua bidestilada y desionizada de reciente preparación.
- IV. Disolución de NAD^+ , 55 mM.
- V. Disolución de α -GDH 88 unidades/ml.
- VI. Disolución de LDH 264 unidades/ml.

Los reactivos IV, V y VI se prepararon en el tampón III. I y II en agua bidestilada y desionizada.

B.3.- Procedimiento.

Se siguió un procedimiento que es una modificación de los descritos por Gerhard Michal y Gunter Lang (G3P) e Ingeborg Gutman y Wilhelm Wahtefeld (Lactato) en *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, 1974).

B.3.1.- Recogida y tratamiento de las muestras.

Se procedió de forma análoga a la descrita en A.3.1. Las muestras, de 1 ml, se tomaron a los 2, 4 y 6 minutos a partir del momento en el que se observó un valor constante del flujo, deteniendo la reacción por desnaturalización con 100 μl de perclórico I. Se centrifugó durante 10 minutos a 3000 g separándose a continuación el sobrenadante del precipitado protéico. Este sobrenadante se empleó en los ensayos.

B.3.2.- Ensayos.

Se usaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. El volumen final fue de 1,1 ml. Las absorbancias se leyeron frente a un blanco que contenía agua. Las medidas se hicieron por triplicado, todas a 25°C.

Inicialmente se pipeteaban 0.5 ml del tampón III y el mismo volumen de la muestra junto con 50 μl de la disolución de NAD^+ . Se mezcló y se midió entonces la absorbancia al cabo de 5 minutos: A_0 . A continuación se añadieron 50 μl de la disolución de la enzima (α -GDH o LDH según sea el caso), dejándola estar, después de agitar, durante 15-20 minutos. La absorbancia final A_1 se empleó para los cálculos:

$$\Delta A = A_1 - A_0$$

Las concentraciones en la mezcla de reacción fueron las siguientes:

Hidrazina	0.22 M
Glicina	0.55 M
EDTA	3 mM
NAD ⁺	2.5 mM
α-GDH	4 unidades/ml

LDH	12 unidades/ml

B.4. Cálculos.

La expresión empleada para el cálculo de las concentraciones en la reacción es la misma que se usó en A.4.

$$C = \frac{\Delta A \times V}{\epsilon \times l \times v} \quad \mu\text{mol/ml (en la muestra)}$$

La concentración en la muestra es preciso corregirla por el factor de dilución asociado al proceso de preparación de la muestra (B.3.1) que fue de 1.1. Por lo tanto:

$$C = \Delta A \times 0.389 \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \quad (\text{en la reacción})$$

3.3.2.3. Determinación de actividades enzimáticas.

Teniendo en cuenta los objetivos de la investigación que se lleva a cabo y la naturaleza y composición del extracto utilizado en nuestros experimentos, se han seguido dos criterios a la hora de llevar a cabo tanto las determinaciones de las actividades enzimáticas, como las determinaciones de las constantes aparentes de Michaelis, K_m (3.3.2.3)

1. Respetar el medium o ambiente molecular de reacción en el -- que se realizan los experimentos de titulación, de manera -- que los valores de actividades enzimáticas particulares (y K_m) se determinan en las mismas condiciones en las que el sistema transforma glucosa en glicerol-3-fosfato. Por esto las -- condiciones de pH, temperatura, tampón y concentraciones de iones y cofactores fueron, siempre que fue posible, las mismas que aquellos.
2. Las actividades enzimáticas medidas, de glucosa-ATP-fosfotransferasas y fosfofructoquinasa son las actividades netas de -- los correspondientes pasos de fosforilación de la glucosa y de la fructosa-6-fosfato. Esto es así, puesto que el extracto contiene glucosa-6-fosfatasa y fructosa bifosfatasa, cuyas

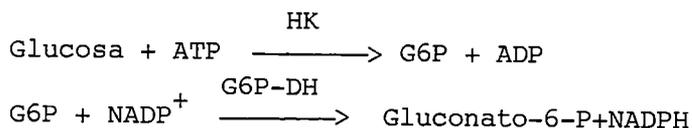
actividades reales se restan a las correspondientes glucosa ATP fosfotransferasas y fosfofructoquinasa respectivamente.

A. Fosforilación de la glucosa.

A.1. Determinación de la actividad glucosa-ATP-fosfotransferasa contenida en el extracto.

A.1.1.- Principio.

Existe un cierto número de métodos para el ensayo de las actividades de las hexoquinasas en tejidos animales (Pilkis, S.J., 1975; Walker, D.G. y Parry, H.J., 1966). El más adecuado en extractos crudos se basa en la medida de la formación de la glucosa-6-fosfato en presencia de un exceso de glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa que reduce el NADP^+ . La formación de NADPH se sigue espectrofotométricamente a 340 nm.



El método seguido para la obtención del extracto nos proporciona un sobrenadante que al contener fracción microsomal, contiene glucosa-6-fosfatasa. Por lo tanto con dicho método estamos midiendo la actividad neta de fosforilación de la glucosa (velocidad de la reacción directa menos velocidad de la reacción inversa) presente en nuestro extracto.

A.1.2.- Reactivos.

I. Tampón Hepes 50 mM, pH 7.4 conteniendo además:

KCl 100 mM
MgCl₂ 10 mM

Pi (suma de iones mono y divalentes) 10 mM
Este reactivo se preparó con agua bidestilada y desionizada recién obtenida.

- II. Disolución de ATP 100 mM
- III. Disolución de Glucosa 2 M
- IV. Disolución de NADP^+ 20 mM
- V. Disolución de G6P-DH 20 unidades/ml

Todos los reactivos se prepararon en el tampón Hepes (I) y se mantuvieron mientras duraron los experimentos en un baño de agua a 35°C.

A.1.3.- Procedimiento.

A 1.5 ml del tampón Hepes (I) se añadieron 100 μl del sobrenadante y el mismo volumen de los reactivos IV y V. Después de que toda la G6P presente en el extracto fuera oxidada, se disparó la reacción aña-

diendo 100 μ l de los reactivos II y III. Las medidas se realizaron por triplicado a 35°C en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Las -- concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción (2 ml volumen final) y en el blanco del espectrofotómetro, fueron las siguientes:

<u>REACTIVOS</u>	<u>ENSAYO</u>	<u>BLANCO</u>
Hepes	50 mM	50 mM
KCl	100 mM	100 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
Pi	10 mM	10 mM
Glucosa	100 mM	100 mM
ATP	5 mM	--
NADP ⁺	1 mM	1 mM
G6P - DH	1 unidad/ml	1 unidad/ml

A.1.4.- Unidad de actividad enzimática.

La unidad de actividad enzimática neta de las glucosas ATP fosfofototransferasas, presentes en el medio de reacción, se definen como -- la cantidad de enzimas que catalizan la transformación de 1 μ mol de -- glucosa en G6P en las condiciones de ensayo ya descritas, basado en un Coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340 nm de $6.22 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Horecker y Kornberg, 1948).

A.2. Determinación de la actividad de la hexoquinasa comercial.

A.2.1. Método y reactivos.

Estas determinaciones se realizaron por el mismo método y con los mismos reactivos que se describen en el apartado A.1., con la única salvedad de que la concentración de glucosa empleada fue de 5 mM en lugar de 100 mM.

A.2. Unidad de actividad enzimática.

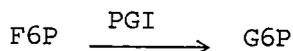
La unidad de actividad enzimática de la Hexoquinasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μ mol -- de glucosa en G6P, en las condiciones de ensayo ya descritas, basado -- en un coeficiente de extinción para al NADPH a 340 nm de $6.22 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Horecker y Kornberg, 1948).

B.- Fosfoglucosaisomerasas.

B.1. Determinación de la actividad de la fosfoglucosaisomerasa contenida en el extracto.

B.1.1. Principio.

La actividad enzimática de la PGI se midió (Noltman, E.A., 1966) en el sentido:



siguiendo la producción de glucosa-6-fosfato por el cambio de absorbancia que se produce a 340 nm debido a la producción de NADPH por la reacción acoplada de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa.



B.1.2. Reactivos.

I. Tampón Hepes 50 mM, pH 7.4 conteniendo además:

KCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Pi	10 mM

Este reactivo se preparó con agua bidestilada y desionizada recién obtenida.

- II. Disolución de fructosa-6-fosfato 100 mM
 III. Disolución de NADP⁺ 20 mM
 IV. Disolución de α-GDH 20 unidades/ml

Los reactivos se prepararon con el tampón hepes(I) y se mantuvieron, mientras duraron los experimentos, en un baño de agua a 35°C. Se obtuvieron a partir de productos suministrados por Sigma Chemical, Co. (3.3.3.2). Son disponibles lo suficientemente libres de impurezas como para garantizar la exactitud de las medidas. Dichas impurezas se refieren principalmente a la contaminación de la F6P por G6P (menos del 1%) y de la G6P-DH por la PGI (sin contaminar).

B.1.3.- Procedimiento.

Se añadieron a 1.6 ml del tampón hepes(I) 100 μl del sobrenadante y el mismo volumen de los reactivos III y IV. Después de que toda la G6P presente en el extracto fuera oxidada, se disparó la reacción - añadiendo 100 μl del sustrato F6P(II). En el volumen final de 2 ml las concentraciones de los reactivos, en la mezcla de reacción y en el blanco fueron:

<u>REACTIVOS</u>	<u>ENSAYO</u>	<u>BLANCO</u>
Hepes	50 mM	50 mM
KCl	100 mM	100 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
Pi	10 mM	10 mM
F6P	5 mM	--
NADP ⁺	1 mM	1 mM
G6P - DH	1 unidad/ml	1 unidad/ml

Es preciso añadir suficiente G6P-DH para garantizar un nivel estacionario bajo de G6P, de manera que la velocidad de la isomerasa sea igual a la actividad de la G6P-DH (Kahama et al, 1960). Las medidas se realizaron por triplicado a 35°C en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

B.1.4. Unidad de actividad enzimática.

La unidad de actividad enzimática de la fosfoglucoisomerasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μ mol de F6P en G6P por minuto en las condiciones de ensayo previamente descritas, basado en un coeficiente de extinción molar para el NADPH de $6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Horecker y Kornberg, 1948).

B.2. Determinación de la actividad de la PGI comercial.

B.2.1. Método y reactivos.

Se llevaron a cabo estas determinaciones siguiendo el mismo método y empleando los mismos reactivos que en el apartado B.1.

B.2.2. Unidad de actividad enzimática.

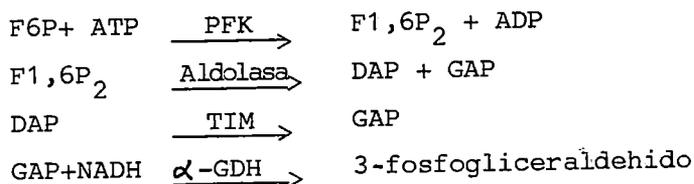
Coincide la definición de unidad de actividad enzimática de -- PGI comercial con la dada en B.1.4.

C. Fosforilación de la fructosa-6-fosfato.

C.1. Determinación de la actividad neta de PFK contenida en el extracto.

C.1.1. Principio.

Son varios los métodos que pueden emplearse para ensayar la -- fosfofructoquinasa. El método elegido (Castaño, J.G. et al, 1979) se basa en la medida de la velocidad de descenso de la absorción a 340 nm por oxidación del NADH, en un sistema acoplado que contiene fructosa-6-fosfato, ATP, aldolasa, triosafosfatoisomerasa y α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.



Al contener el sobrenadante fructosa-1,6-bifosfatasa la actividad que medimos es la actividad neta (actividad de la fosfofructoquinasa menos actividad de la fructosa-1,6-bifosfatasa) fosfofructoquinásica presente en el medio de reacción.

C.1.2. Reactivos.

I. Tampón Hepes 50 mM, pH 7.4, conteniendo además:

KCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Pi	10 mM

El tampón se preparó en agua bidestilada y desionizada - recién obtenida.

II.	Disolución de ATP	30 mM
III.	Disolución de NADH	3.6 mM
IV.	Disolución de fructosa-6-fosfato	100 mM
V.	Disolución de glucosa-6-fosfato	300 mM
VI.	Disolución conteniendo Aldolasa	20 unidades/ml
	TIM	100 unidades/ml
	α-GDH	60 unidades/ml
	PGI	40 unidades/ml

Todos los reactivos se prepararon en el tampón hepes(I) y se mantuvieron, mientras duraron los experimentos, en un baño de agua a 35°C.

C.1.3. Procedimiento.

A 1.4 ml del tampón hepes (I) se añadieron 100 μl del sobrenadante y 100 μl de cada uno de los otros reactivos excepto fructosa-6-fosfato(IV). La reacción se dejó transcurrir durante 1 minuto o hasta que el ruido de fondo fue despreciable, disparándose entonces con 100 μl de fructosa-6-fosfato (IV). El sulfato de amonio en el ensayo se proveyó con la disolución de las enzimas auxiliares. La adición de fosfoglucosaisomerasa y de glucosa-6-fosfato, ésta última en una concentración tres veces superior a la de fructosa-6-fosfato, se llevó a cabo con el fin de tener en el medio de reacción la concentración deseada de fructosa-6-fosfato. Las concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción y en el blanco, ambos de 2 ml de volumen total, fueron:

<u>REACTIVOS</u>	<u>ENSAYO</u>	<u>BLANCO</u>
Hepes	50 mM	50 mM
KCl	100 mM	100 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
Pi	10 mM	10 mM
ATP	1.5 mM	--
NADH	0.18 mM	--
F6P	5 mM	--
G6P	15 mM	15 mM
Aldolasa	1 unidad/ml	1 unidad/ml
TIM	5 unidades/ml	5 unidades/ml
α-GDH	3 unidades/ml	3 unidades/ml
PGI	40 unidades/ml	40 unidades/ml

Las medidas se realizaron por triplicado a 35°C en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

C.1.4. Unidad de actividad enzimática.

La unidad de actividad enzimática neta de la fosfofructoquinasa para la fosforilación de la fructosa-6-fosfato se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μmol de F6P en F-1,6P₂ por minuto en las condiciones descritas anteriormente, basado en un coeficiente de extinción molar para el NADH a 340 nm de $6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

C.2. Determinación de la actividad de la PFK comercial.

C.2.1. Método y reactivos.

Coinciden con los descritos en el apartado C.1, excepto en la necesidad de incluir en el medio de reacción una concentración tres veces superior de G6P a la de F6P deseada junto con dos unidades por ml de PGI.

C.2.2. Unidad de actividad enzimática.

La unidad de actividad enzimática de la PFK comercial se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 μmol de F6P en F-1,6P₂ por minuto, en las condiciones de reacción descritas anteriormente, basado en un coeficiente de extinción para el NADH a 340 nm de $6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

D. Cálculos.

En todos los casos, la actividad enzimática se expresa como μmol de producto producidos por minuto y por mg de proteína en la cubeta de reacción. Dicha actividad viene dada por:

$$\text{Actividad específica en cubeta} = \frac{\Delta A \times V}{\Delta t \times \epsilon \times p \times l} \quad \text{U.I./mg}$$

- donde :
- ΔA = Incremento de absorbancia medido.
 - V = Volumen final de reacción.
 - Δt = Incremento de tiempo.
 - ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADH o NADPH
 - p = miligramos de proteínas totales en cubeta.
 - l = paso de luz de la cubeta.

En nuestros ensayos $V = 2 \text{ ml}$, $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $l = 1 \text{ cm.}$, - por lo que:

$$\text{Act. específica en cubeta} = \frac{0.32}{\Delta t \times p} \cdot \Delta A \quad \text{U.I./mg}$$

3.3.2.4. Valoraciones de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó según el método de Lowry et al (1951).

A. Reactivos.

Disolución A: Na_2CO_3 al 2 por 100 (p/v) en NaOH 0.1 N.

Disolución B: $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5 por 100 (p/v) en tartrato sódico-potásico al 1 por 100 (p/v).

Disolución C: Reactivo de Folin-Ciocalteu, diluido 1:3 en agua.

Las tres disoluciones se prepararon en agua bidestilada y desionizada.

B. Procedimiento.

Del extracto, preparado en tampón fosfato 0.1 M tal como se describe en 3.3.2.1 y diluido 300 veces en agua bidestilada, se toma un volumen conocido; comprendido entre 0.1 y 0.5 ml completándose con agua hasta 1 ml. Se añaden 5 ml de la disolución A y 0.1 ml de la disolución B. Se agita y se deja reposar 30 minutos, al cabo de los cuales se adicionan 0.5 ml de solución C recientemente preparada. Se agita y se deja estar. Después de 15 minutos se mide la absorción de la mezcla de reacción a 500 nm frente a un blanco en el que el volumen de muestra ha sido sustituido por la disolución del tampón fosfato 0.1 M. El valor obtenido se lleva a una recta patrón construida a partir de albúmina bovina para concentraciones desde 0.15 a 0.8 mg/ml.

Las medidas de absorción se realizaron en un Spectronic S20. Las cubetas utilizadas eran de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

3.3.2.5. Determinación de las constantes aparentes de Michaelis (K_M).

Se determinaron las K_M de las enzimas contenidas en el extracto de hígado utilizado, así como las de las enzimas comerciales empleadas en los experimentos de titulación, excepto en el caso de la PGI. Para esta enzima, al no disponerse de un método práctico de valoración en el sentido $\text{G6P} \rightarrow \text{F6P}$, se utilizaron valores de K_M disponibles en la bibliografía. No obstante, como se verá más adelante en los experimentos de titulación, se observó que el flujo de la ruta no se veía afectado por el aumento de la actividad de la PGI presente. Este hecho minimiza en gran medida la importancia e interés de sus datos cinéticos en el proceso de determinación de los Coeficientes de control del flujo para la enzima tal como se mostrara en 3.3.2.4.

Al determinar las constantes de Michaelis se siguió el mismo criterio que en las valoraciones enzimáticas (3.3.2.2): fueron determi-

nadas en el mismo "ambiente molecular" en el cual se efectuaron los experimentos de titulación.

Las velocidades iniciales se midieron por los mismos métodos y en las mismas condiciones que se emplearon en las valoraciones enzimáticas(3.3.2.3)(pág.36).

Las constantes de Michaelis se obtuvieron a partir de la representación de Eadie-Hofstee, (1959). Las medidas se hicieron por triplicado y los puntos obtenidos experimentalmente se ajustaron por mínimos cuadrados.

A. Hexoquinasas.

A.1. Del extracto.

Para el cálculo de las constantes de Michaelis de las glucosas-ATP-fosfotransferasas para la glucosa contenida en el extracto se emplearon las siguientes concentraciones

Concentración fija de ATP: 1 mM
 Concentración variable de glucosa: valores de 1 mM a 100 mM.
 Se emplearon 40 μ l del extracto de hígado.

A.2. De la comercial.

Para la hexoquinasa comercial(de levadura) las concentraciones fueron:

Concentración fija de ATP: 1 mM.
 Concentración variable de glucosa: valores de 0.1 mM a 5 mM.

B. Fosfofructoquinasas.

B.1. Del extracto.

Para el cálculo de la constante de Michaelis de la fosfofructoquinasa para la F6P las concentraciones fueron:

Concentración fija de ATP: 1 mM.
 Concentración variable de F6P: valores de 0.05 mM a 5 mM.
 Se emplearon 40 μ l del extracto de hígado.

B.2. De la comercial.

Para la misma determinación en la enzima comercial(levadura) se usaron las siguientes concentraciones:

Concentración fija de ATP: 1 mM
 Concentración variable de F6P: valores de 0.1 mM a 1 mM.

3.3.2.6. Titulaciones con enzimas.

A. Reactivos.

- I. Tampón Hepes 50 mM de la misma composición que el utilizado para las determinaciones enzimáticas, y descrito anteriormente(3.3.2.3) (pág. 36).
- II. Disolución de glucosa 0.1 M.
- III. Disolución de ATP 20 mM
- IV. Disolución de NADH 5.6 mM
- V. Disolución de Creatina fosfato 50 mM
- VI. Disolución de F-2.6P₂ 0.3 mM
- VII. Disolución de enzimas² conteniendo:

Aldolasa	20 unidades/ml
TIM	100 unidades/ml
α-GDH	60 unidades/ml
- VIII. También se prepararon disoluciones de hexoquinasa, fosfoglucosaisomerasa y fosfofructoquinasa a distintas concentraciones de acuerdo con cada experimento de titulación.

Todas las disoluciones se prepararon en el tampón hepes(I) y se mantuvieron en un baño de agua a 35°C mientras duraron los experimentos.

B. Procedimientos.

Una vez valoradas las actividades enzimáticas presentes en el extracto se iniciaban los experimentos de titulación propiamente dichos. Estos se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.- Los valores de flujos se obtuvieron del registro continuo del descenso de absorbancia en 340 nm originado por la caída de la concentración de NADH. La actividad enzimática correspondiente a cada valor de flujo correspondía a la suma de la actividad basal detectada en el extracto más la añadida en cada experimentos, ambas corregidas por sus correspondientes constantes de Michaelis.

Las reacciones se iniciaban por adición de 100 μl del extracto de hígado a la mezcla de reacción, que contenía 100 μl de cada uno de los reactivos, así como el volumen adecuado del tampón I(entre 1.3 y 1.4 ml) para que junto con el volumen de la enzima con la que se titulaba en cada caso se alcanzara un volumen final de 2 ml. Una vez iniciada la reacción se midió el flujo, después de transcurrido el tiempo de transición(2-3 minutos), cuando la absorbancia estaba entre 0.8 y 0.3 unidades. En esta zona, el descenso de NADH es lineal y corresponde al intervalo de tiempo en el que se realizaron las determinaciones de los niveles del producto final y sustratos(2, 4 y 6 minutos). Por otra parte se midió el flujo basal, es decir, el flujo que rinde el sistema en estado estacionario, sin adición previa de ninguna de las enzimas empleadas en las titulaciones.

Las medidas se realizaron, por triplicado, a 35°C y tuvieron una duración media de 12 minutos. Las concentraciones constantes en la --

mezcla de reacción y en el blanco del espectrofotómetro fueron las siguientes:

<u>REACTIVOS</u>	<u>ENSAYO</u>	<u>BLANCO</u>
Hepes	50 mM	50 mM
KCl	100 mM	100 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
Pi	10 mM	10 mM
ATP	1 mM	--
NADH	0.28 mM	--
Glucosa	5 mM	--
CP	2.5 mM	--
CK	1 unidad/ml	1 unidad/ml
Aldolasa	1.3 unidades/ml	1.3 unidades/ml
TIM	6.6 unidades/ml	6.6 unidades/ml
α-GDH	4 unidades/ml	4 unidades/ml

C. Cálculos.

El flujo en los experimentos de titulación se expresa como μ moles de producto producidos por minuto y por miligramo de proteína. Estos valores se obtienen de la gráfica correspondiente de acuerdo con la siguiente expresión:

$$F = \frac{\Delta A \cdot V}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot p \cdot l} \quad \mu\text{mol/min mg prot.}$$

donde:

ΔA = incremento de absorbancia medida.

V = volumen total de reacción.

Δt = incremento de tiempo.

ϵ = Coeficiente de extinción molar del NADH.

p = miligramos de proteína totales en cubeta.

l = paso de luz de la cubeta.

En estos experimentos $V = 2$ ml, $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $l = 1$ cm y $p = 3$ mg de proteína por término medio. Según esto:

$$F = 0.107 \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad \mu\text{mol/min mg prot.}$$

Estos valores de F así obtenidos se normalizaban posteriormente respecto del flujo basal.

$$F \text{ normalizado} = \frac{F}{F_{\text{basal}}}$$

3.3.2.7. Cálculo de los Coeficientes de control del flujo para la enzima.

Los Coeficientes de control del flujo para la enzima se determinaron en cada caso haciendo uso de la ecuación:

$$C_{E_i}^F = \frac{C_{1i}' - F}{C_{1i}'}$$

que aplicada a los valores normalizados de flujos y C_1' es :

$$C_{E_i}^F = \frac{C_{1(n)}' - 1}{C_{1(n)}'}$$

El flujo basal se normalizaba haciéndolo igual a 1 en cada serie de experimentos. $C_{1(n)}'$ se determina a partir de los datos normalizados de flujos y actividades enzimáticas corregidas mediante la ecuación:

$$F = -C_2' \frac{F}{g_i} + C_1' \quad (3.10)$$

obtenida a partir de la definición de Coeficiente de control del flujo para la enzima:

$$C_{E_i}^F = \frac{dF}{dg_i} \cdot \frac{g_i}{F}$$

y de la expresión:

$$F = \frac{C_1' g_i}{C_2' + g_i}$$

tal como se ha descrito en 3.12 (pág. 22). g_i es, en general:

$$g_i = \frac{V_i}{K_i} \cdot K_{eq}^{A, i-1}$$

donde V_i es la actividad de la enzima E_i , K_i su constante de Michaelis y $K_{eq}^{A, i-1}$ la constante de equilibrio de la serie de reacciones anteriores a la catalizada por E_i .

Ahora bien, en los experimentos de titulación, puesto que la K_{eq} es una constante específica de cada reacción será la misma en cada

serie y podremos valernos de este hecho para simplificar los cálculos, haciéndola 1. Por otra parte, tanto la actividad de la enzima presente en el extracto como la añadida en cada ensayo de titulación vendrán corregidas por sus respectivos valores de constantes aparentes de Michaelis. El valor de g_i para cada experimento se obtiene entonces de la siguiente expresión:

$$g_i = \frac{V_b}{K_b} + \frac{V_c}{K_c}$$

donde:

V_b = actividad basal de la enzima del extracto.

K_b = constante de Michaelis aparente de la misma.

V_c = actividad de la enzima comercial añadida.

K_c = constante de Michaelis aparente de la enzima comercial.

Los correspondientes valores de F y F/g_i se llevan a la ecuación (3.10). La serie de puntos experimentales así obtenidos se ajustan a una recta por mínimos cuadrados, obteniendo el valor de C_1^i y de éste, el correspondiente Coeficiente de control del flujo para la enzima:

$$C_{GK}^F = \frac{C_1^i(GK) - 1}{C_1^i(GK)}$$

$$C_{PGI}^F = \frac{C_1^i(PGI) - 1}{C_1^i(PGI)} ; \quad C_{PFK}^F = \frac{C_1^i(PFK) - 1}{C_1^i(PFK)}$$

3.3.3. Productos.

3.3.3.1. Para la obtención y preparación de muestras.

Eter etílico, cloruro sódico, cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) y ortofosfatos mono y disódicos; de PANREAC, Barcelona (España). Inhibidor de tripsina de huevo de pollo, hepes (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etanosulfónico), sulfato de estreptomycin y penicilina de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (U.S.A.).

3.3.3.2. Para las valoraciones de ATP y producto final.

Se emplearon cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) $NADP^+$, glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa, hexoquinasa de levadura y láctico deshidrogenasa de músculo de conejo, de Sigma Chemical; ácido perclórico, glicina, $EDTA Na_2 \cdot 2H_2O$ e hidróxido de hidrazina, hidróxido sódico y carbonato potásico de PANREAC, Barcelona (España); hidrocloreto de trietanolamina de Sigma Chemical, Co., St. Louis, Missouri (U.S.A.).

3.3.3.3. Para la determinación de las actividades enzimáticas.

(+)-glucosa monohidratada, de MERCK, Darmstadt(R.F.Alemania). ATP, NADH, NADP⁺, fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato,; aldolasa, triosafosfoisomerasa y L-glicerolfosfatodeshidrogenasa(de músculo de conejo las tres últimas), así como glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa de levadura; todos de Sigma Chemical, Co., St. Louis, Missouri(USA)..

3.3.3.4. Para las valoraciones de proteínas.

Hidróxido sódico, carbonato sódico, sulfato de cobre(CuSO₄ - 5H₂O), tartrato sódico potásico tetrahidratado de PANREAC, Barcelona, (España). Reactivo del fenol Folin-Ciocalteus de MERCK, Darmstadt(R. F. Alemania) y Albúmina bovina de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (U.S.A.).

3.3.3.5. Para las titulaciones con enzimas.

Además de la (+)-glucosa monohidratada ATP, NADH, aldolasa, triosafosfoisomerasa y L-glicerolfosfatodeshidrogenasa que ya se han citado arriba se emplearon; fructosa 2,6 bifosfato, creatinafosfato; - creatinaquinasa y fosfofructoquinasa de músculo de conejo. Fosfoglucoisomerasa y hexoquinasa de levadura, todos ellos de Sigma Chemical, Co., St. Louis, Missouri, (U.S.A.).

3.3.4. Instrumentación.

1. Potter- Elvejeim con émbolo de teflón. 15 ml. Rockville - Centre, N.Y. (U.S.A.)
2. Homogeneizador TRI-R mod. K-41. Rockville Centre, N.Y. (USA)
3. Centrifuga SORVALL. RC-5B. Norwalk. Connecticut. (U.S.A.).
4. Rotor SORVALL SS-34. Norwalk. Connecticut (U.S.A.).
5. Espectrofotómetro de doble haz Hitachi 100-60, con la caja de cubetas provista de una doble camisa que permite -- termostatizarla mediante un circuito cerrado de agua procedente de termocirculador. Hitachi Ltd., Tokyo (Japan).
6. Registro gráfico Hitachi 561. Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan.
7. Cubetas de cuarzo T.S.L. (Thermal Syndicate Ltd.). Wallsend Northumberland (England).
8. Termocirculador Churchill. Churchill Instruments, Co. Ltd. Middx (England).
9. Spectromic S-20. Banchs & Lomb (Belgium).
10. Centrifuga de mesa Hettich. Mod. Universal II. Tuttingen - (Germany).
11. pH-metro CRISON. Mod. digilab 517. Barcelona (España).
12. Balanzas eléctricas Mettler H54AR y Mettler PC440. Mettler Instruments. Zurich (Switzerland).

3.4. Resultados y discusión.

3.4.1. Resultados previos.

3.4.1.1. Linealidad de la ruta.

La adición de triosafosfatoisomerasa, aldolasa y glicerol-3 - fosfatodeshidrogenasa en exceso, consigue que, además de anular sus -- Coeficientes de control del Flujo prácticamente, la totalidad de la glu cosa transformada lo es en glicerol-3-fosfato, evitándose el drenaje -- de intermediarios hacia lactato o hacia el ciclo de las pentosas.

La ausencia de desviaciones de la ruta hacia lactato se verificó valorando la cantidad de este producto formado durante el tiempo -- que duraban los experimentos. Los resultados se muestran en la tabla- 3.1.

<u>Tiempo de incubación con flujo constante</u>		
<u>2 min.</u>	<u>4 min.</u>	<u>6 min.</u>
0.25 ± 0.01	0.3 ± 0.015	0.3 ± 0.012

TABLA 3.1.- Concentraciones de L(+)-lactato(mM) presen- tes en la mezcla de reacción durante el tiempo que duraban -- los experimentos cinéticos. Las medidas se realizaron en una mezcla de reacción que contenía únicamente las enzimas del ex tracto más las auxiliares (Aldolasa, TIM y α -GDH). Los valo res son medias \pm S.D. de tres experimentos separados.

El examen de la tabla 3.1. muestra que el lactato permaneció- prácticamente constante. Estos resultados nos permitieron concluir -- que no se producía drenaje de intermediarios en esa dirección.

La valoración del lactato estaba ciertamente justificada des- pués de haber hecho una estimación del valor de la K_{eq} aparente del -- proceso gliceraldehído-3-fosfato \longrightarrow lactato a lo largo de la secuen- cia glicolítica. Esta estimación hecha sobre la base de datos biblio- gráficos para condiciones análogas a las que se dan en nuestro sistema (Williamson et al, 1967; Newsholme y Start 1973) rinden una K_{eq} del or den de $10^{10} M^{-1}$. A la vista de este elevado valor es lógico pensar -- que podría ser importante la transformación de GAP en lactato, y por -- ello necesaria la comprobación. Los resultados experimentales prueban que no se produce lactato lo que puede explicarse por un lado, debido -- al exceso de las enzimas auxiliares añadidas que aceleran la producción de G3P quedando muy baja la concentración de gliceraldehído-3-fosfato, y por otro lado, por las bajas concentraciones de ADP y NAD^+ en nuestro sistema.

El mismo análisis de la K_{eq} para el caso de la ruta de las -- pentosas nos lleva a desechar la necesi- dad de valorar la formación de -- pentosas fosfatos en nuestros experimentos. La K_{eq} aparente de las --

reacciones catalizadas por la transcetolasa $S7P + GAP \longrightarrow X5P + R5P$ y $F6P + GAP \longrightarrow X5P + E4P$, que son las que nos podrían afectar son 0.82 y 0.1 respectivamente (Kaufman, et al, 1969; Racker, 1962) y para la --transglucosilasa en la reacción $S7P + GAP \longrightarrow F6P + E4P$ es 1.05 (Bassham y Krause, 1969; Venkatarman y Racker, 1961). Si tenemos en cuenta estos valores junto con el hecho de que la concentración de GAP ha de ser necesariamente pequeña es fácil concluir que la concentración de las pentosas fosfato en equilibrio con GAP y F6P habrán de ser aproximadamente del mismo orden y por lo tanto despreciable el posible escape de intermediarios en ese sentido.

Finalmente y por el mismo tipo de argumentos, al ser la K_{eq} -- aparente de la transformación de G6P en Glucógeno, en la que están implicadas la fosfoglucomutasa y la fosforilasa-a de 0.17 (Mahler y Cordes 1969; Newsholme y Start, 1973), ésta tampoco es significativa, obviando igualmente la necesidad de llevar a cabo nuevas valoraciones.

Concluimos por lo tanto en la linealidad de la ruta que estudiamos. Cumplido este requisito es preciso examinar la aplicabilidad a nuestro sistema experimental del modelo teórico que se va a usar.

3.4.1.2. Adecuación del sistema experimental.

El estudio de la adecuación del sistema experimental al modelo teórico propuesto requiere, tal como se mostró en 3.2.2, comprobar los siguientes aspectos:

- A. Establecimiento del estado estacionario.
- B. Cinética michaeliana de las enzimas del sistema.

A. Establecimiento del estado estacionario.

Un sistema metabólico está en estado estacionario cuando alcanza un valor constante del flujo manteniendo simultáneamente un valor constante de las concentraciones de los sustratos y productos intermedios y finales.

A fin de verificar que nuestro sistema se encontraba en estado estacionario se midieron las concentraciones de ATP y G3P a diferentes tiempos, siempre a partir del momento en el que se registraba un valor constante del flujo en el espectrofotómetro.

<u>Tiempo de incubación con flujo constante</u>		
<u>2 min.</u>	<u>4 min.</u>	<u>6 min.</u>
1 ± 0.05	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.06

TABLA 3.2.- Concentraciones de ATP (mM) a diferentes tiempos a partir del establecimiento de un flujo constante. La mezcla de reacción no contenía otras enzimas que las del extracto más las auxiliares. Los valores son medias ± S.D. de tres experimentos separados.

reacciones catalizadas por la transacetolasa $S7P + GAP \longrightarrow X5P + R5P$ y $F6P + GAP \longrightarrow X5P + E4P$, que son las que nos podrían afectar son 0.82 y 0.1 respectivamente (Kaufman, et al, 1969; Racker, 1962) y para la transglucosilasa en la reacción $S7P + GAP \longrightarrow F6P + E4P$ es 1.05 (Bascham y Krause, 1969; Venkatarman y Racker, 1961). Si tenemos en cuenta estos valores junto con el hecho de que la concentración de GAP ha de ser necesariamente pequeña es fácil concluir que la concentración de las pentosas fosfato en equilibrio con GAP y F6P habrán de ser aproximadamente del mismo orden y por lo tanto despreciable el posible escape de intermediarios en ese sentido.

Finalmente y por el mismo tipo de argumentos, al ser la K_{eq} aparente de la transformación de G6P en Glucógeno, en la que están implicadas la fosfoglucomutasa y la fosforilasa-a de 0.17 (Mahler y Cordes 1969; Newsholme y Start, 1973), ésta tampoco es significativa, obviando igualmente la necesidad de llevar a cabo nuevas valoraciones.

Concluimos por lo tanto en la linealidad de la ruta que estudiamos. Cumplido este requisito es preciso examinar la aplicabilidad a nuestro sistema experimental del modelo teórico que se va a usar.

3.4.1.2. Adecuación del sistema experimental.

El estudio de la adecuación del sistema experimental al modelo teórico propuesto requiere, tal como se mostró en 3.2.2, comprobar los siguientes aspectos:

- A. Establecimiento del estado estacionario.
- B. Cinética michaeliana de las enzimas del sistema.

A. Establecimiento del estado estacionario.

Un sistema metabólico está en estado estacionario cuando alcanza un valor constante del flujo manteniendo simultáneamente un valor constante de las concentraciones de los sustratos y productos intermedios y finales.

A fin de verificar que nuestro sistema se encontraba en estado estacionario se midieron las concentraciones de ATP y G3P a diferentes tiempos, siempre a partir del momento en el que se registraba un valor constante del flujo en el espectrofotómetro.

Tiempo de incubación con flujo constante

<u>2 min.</u>	<u>4 min.</u>	<u>6 min.</u>
1 ± 0.05	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.06

TABLA 3.2.- Concentraciones de ATP (mM) a diferentes tiempos a partir del establecimiento de un flujo constante. La mezcla de reacción no contenía otras enzimas que las del extracto más las auxiliares. Los valores son medias ± S.D. de tres experimentos separados.

reacciones catalizadas por la transcetolasa $S7P + GAP \longrightarrow X5P + R5P$ y $F6P + GAP \longrightarrow X5P + E4P$, que son las que nos podrían afectar son 0.82 y 0.1 respectivamente (Kaufman, et al, 1969; Racker, 1962) y para la --transglucosilasa en la reacción $S7P + GAP \longrightarrow F6P + E4P$ es 1.05 (Bassham y Krause, 1969; Venkatarman y Racker, 1961). Si tenemos en cuenta estos valores junto con el hecho de que la concentración de GAP ha de ser necesariamente pequeña es fácil concluir que la concentración de las pentosas fosfato en equilibrio con GAP y F6P habrán de ser aproximadamente del mismo orden y por lo tanto despreciable el posible escape de intermediarios en ese sentido.

Finalmente y por el mismo tipo de argumentos, al ser la K_{eq} -- aparente de la transformación de G6P en Glucógeno, en la que están implicadas la fosfoglucomutasa y la fosforilasa-a de 0.17 (Mahler y Cordes 1969; Newsholme y Start, 1973), ésta tampoco es significativa, obviando igualmente la necesidad de llevar a cabo nuevas valoraciones.

Concluimos por lo tanto en la linealidad de la ruta que estudiamos. Cumplido este requisito es preciso examinar la aplicabilidad a nuestro sistema experimental del modelo teórico que se va a usar.

3.4.1.2. Adecuación del sistema experimental.

El estudio de la adecuación del sistema experimental al modelo teórico propuesto requiere, tal como se mostró en 3.2.2, comprobar los siguientes aspectos:

- A. Establecimiento del estado estacionario.
- B. Cinética michaeliana de las enzimas del sistema.

A. Establecimiento del estado estacionario.

Un sistema metabólico está en estado estacionario cuando alcanza un valor constante del flujo manteniendo simultáneamente un valor constante de las concentraciones de los sustratos y productos intermedios y finales.

A fin de verificar que nuestro sistema se encontraba en estado estacionario se midieron las concentraciones de ATP y G3P a diferentes tiempos, siempre a partir del momento en el que se registraba un valor constante del flujo en el espectrofotómetro.

<u>Tiempo de incubación con flujo constante</u>		
<u>2 min.</u>	<u>4 min.</u>	<u>6 min.</u>
1 ± 0.05	0.98 ± 0.04	0.98 ± 0.06

TABLA 3.2.- Concentraciones de ATP (mM) a diferentes tiempos a partir del establecimiento de un flujo constante. La mezcla de reacción no contenía otras enzimas que las del extracto más las auxiliares. Los valores son medias ± S.D. de tres experimentos separados.

En la tabla 3.2 se muestran los valores de la concentración de ATP durante el tiempo de flujo constante. Dicha concentración se mantuvo constante en 1 mM, concluyéndose de ello que el tamponamiento de ATP era eficaz.

Tiempo de incubación con flujo constante

<u>2 min.</u>	<u>4 min.</u>	<u>6 min.</u>
0.07 ± 0.03	0.9 ± 5.10 ⁻³	0.11 ± 6.10 ⁻³

TABLA 3.3.- Concentraciones de G3P (mM) a diferentes --
tiempos con flujo constante. Los valores son medias ± S.D. -
de tres experimentos.

En la tabla 3.3 se muestran los valores obtenidos en las mismas valoraciones de G3P.

Del exámen de la tabla 3.3. se aprecia una ligera acumulación de G3P, siempre por debajo de los niveles que corresponderían a una -- transformación cuantitativa de glucosa en G3P. Este hecho tiene una - explicación en la transformación espontánea, no catalizada, del G3P en glicerol más Pi. Dicho proceso, al transformar en parte el G3P, contri- buye a la adecuación del sistema experimental al modelo teórico, al ha- cer despreciable la concentración de un producto final durante los ex- perimentos.

Un estado estacionario queda totalmente descrito, cuando se es- pecifican los valores fijos del flujo que atraviesa el sistema y de las concentraciones de sustratos, productos finales e intermediarios. Has- ta aquí hemos verificado la constancia de los valores del flujo y de - las concentraciones de sustratos y productos finales. Con ello tene- mos evidencia suficiente de que nuestro sistema alcanza un estado esta- cionario aunque al no conocer los valores de las concentraciones de -- los intermediarios dicho estado estacionario no está completamente des- crito. No obstante, esta especificación completa no es imprescindible para nuestros fines. Aquí nos basta con establecer un estado estacio- nario en cada experimento (cualesquiera que sea éste) durante el tiempo requerido para las mediciones del flujo. Fenómenos de oscilaciones, -- descritas en sistemas glicolíticos (Hess; B. y Boiteux, A., 1971) sólo - se dan bajo condiciones muy particulares que no son las de nuestros ex- perimentos. Concretamente el tamponamiento de la concentración de ATP elimina cualquier posibilidad en este aspecto.

B. Cinética Michaeliana de las enzimas del sistema.

Otra de las premisas del modelo teórico que hemos desarrolla- do consiste en que las enzimas que participan en la ruta deben tener -- cinética Michaeliana respecto a su único sustrato. Al mantener cons- -- tante la concentración de ATP, como ya se ha visto, se consigue trans- formar la cinética de las hexoquinasas y fosfofructoquinasas en cinéti- cas monosustratos: glucosa y F6P respectivamente. A partir de aquí se determinaron, primeramente las constantes aparentes de Michaelis para-

la F6P de las hexoquinetas y fosfofructoquinetas presentes en el extracto. Después se hizo lo mismo con las enzimas comerciales usadas en los experimentos de titulación. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 3.4. Las figuras 3.3 y 3.4 muestran las representaciones de Eadie-Hoftee para cada una de las enzimas.

E N Z I M A S				
	Hexoquinetas		Fosfofructoquinetas	
Extracto	10	\pm 0.8	0.1	\pm 0.009
Comerciales	0.25	\pm 0.02	0.25	\pm 0.022

TABLA 3.4.- Valores de las constantes de Michaelis (K_M) - expresadas en unidades mM para la Glucosa y F6P de las hexoquinetas y fosfofructoquinetas, respectivamente. Se obtuvieron a 1 mM de ATP en las condiciones descritas en el apartado 3.3.2.6. Los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos separados.

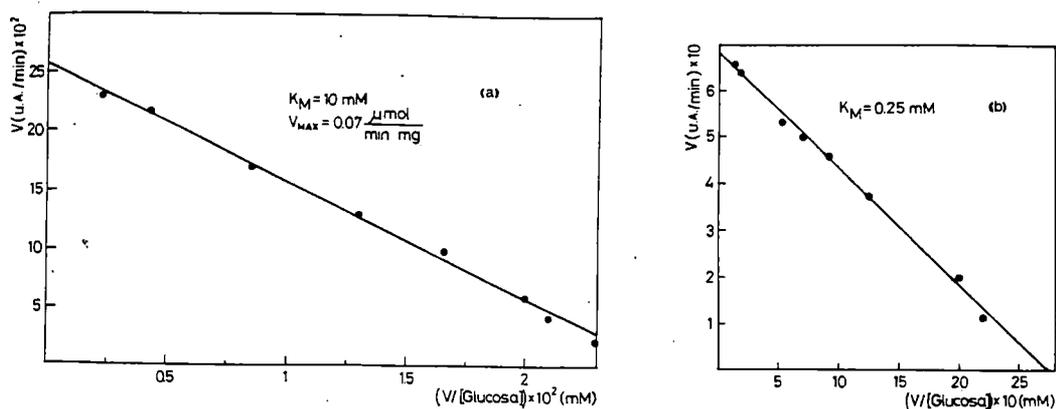


Fig. 3.3.- Constantes de Michaelis y V_{MAX} de la hexoquinasa- usando glucosa como sustrato variable.

La enzima sé ensayó tal como se describe en el apartado- 3.3.2.6. (a) Hexoquinasa hepática. (b) Hexoquinasa comercial.

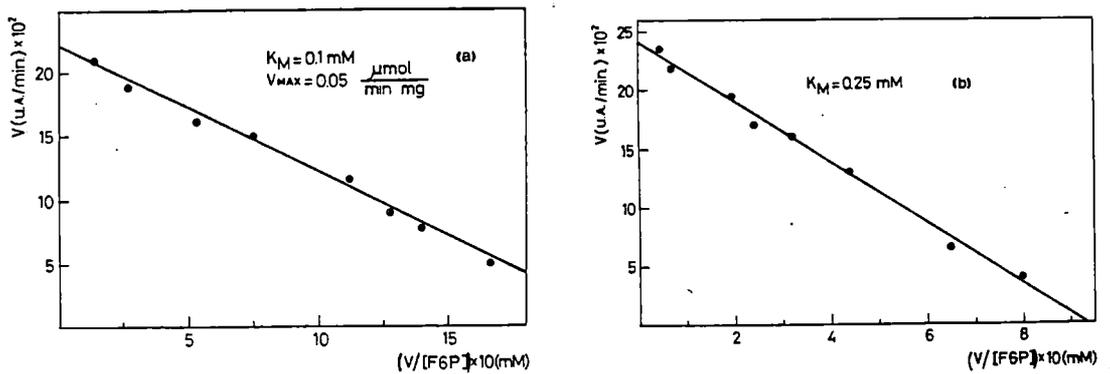


Fig.3.4.- Constantes de Michaelis y V_{MAX} de la fosfofructoquinasa ensayada en las condiciones descritas en 3.3.2.6 y usando la fructosa-6-fosfato como sustrato variable (a) Fosfofructoquinasa hepática. (b) Fosfofructoquinasa comercial.

Como ya se comentó anteriormente, la K_M de la PGI para la G6P no se determinó experimentalmente. El valor utilizado, tanto para la comercial como para la hepática, fue 0.2 mM (F.J. Reithel, 1966).

Los resultados evidencian el carácter michaeliano del comportamiento cinético de las enzimas del hígado y de las comerciales empleadas en los experimentos de titulación. Estos datos de K_M aparente nos permitirán además situar correctamente las parejas de valores actividad-flujo en las representaciones flujo versus actividad enzimática y en las de F frente a F/g_i . A partir de estas representaciones obtendremos finalmente los Coeficientes de control del flujo.

3.4.1.3. Conclusión previa.

Los resultados expuestos permiten concluir que el sistema experimental descrito es susceptible de ser utilizado para examinar en él la aplicabilidad de la teoría desarrollada previamente y determinar los Coeficientes de control del Flujo de cada uno de los pasos de reacción.

3.4.2. Coeficientes de control del flujo para la enzima.

Los resultados de la titulación del sistema con hexoquinasas, fosfoglucosaisomerasa y fosfofructoquinasa se muestran en la figura 3.5, obteniéndose curvas como las esperadas de la teoría (Fig. 1.1, Apartado 3.1.2, pág. 22).

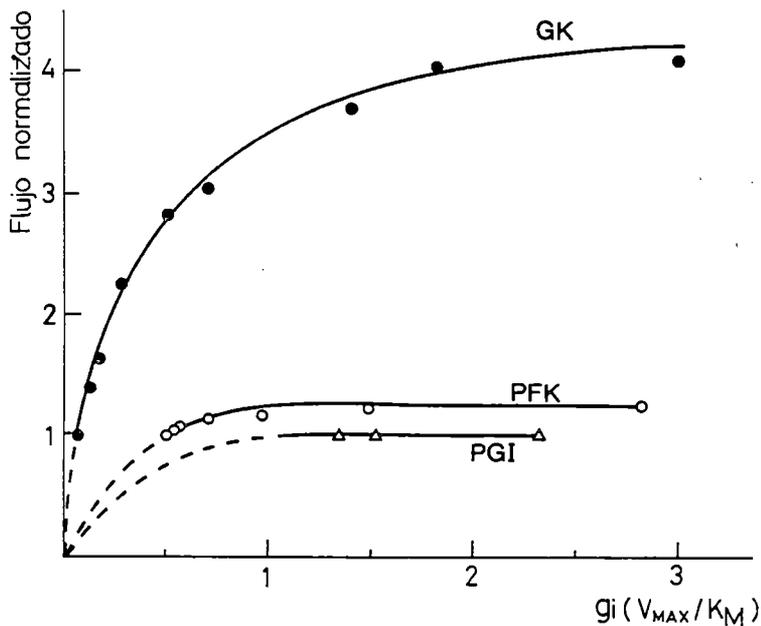


Fig. 3.5.- Resultados de la titulación con hexoquinasa (●), fosfofructoquinasa (○) y fosfoglucoisomerasa (△).

El flujo de la ruta sin ninguna enzima añadida se expresa como 1 en el eje de ordenadas, normalizándose el resto de los flujos con respecto a éste. El primer punto de cada curva corresponde al flujo medido con sólo las enzimas presentes en el extracto más las enzimas auxiliares. La adición de --- hexoquinasa y fosfofructoquinasa al sistema aumenta el valor del flujo basal dando valores significativos de sus Coeficientes de control del flujo. Sin embargo, la adición de fosfoglucoisomerasa no modifica el valor del flujo demostrando que su Coeficiente de control del flujo es nulo. La adición de --- cualquiera de las otras tres enzimas (estos resultados no se muestran en la figura) no modifican el flujo. Las líneas discontinuas muestran la zona de las curvas sin datos experimentales, las cuales corresponden a valores de actividad enzimática inferiores a los que contiene el extracto. Por esta razón han sido trazadas arbitrariamente. La actividad (V_{MX}/K_M) hexoquinásica está multiplicada por 10 con objeto de ampliar la curva.

Los valores de F se representan frente a F/g_i en la figura 3.6, dando una buena linealidad (coeficientes de regresión de 0.99), lo cual confirma la relación hiperbólica descrita en la ecuación (3.7) propuesta por Kacser y Burns. La intersección con la ordenada da los valores de C'_1 con los cuales se calculan los Coeficientes de control del flujo.

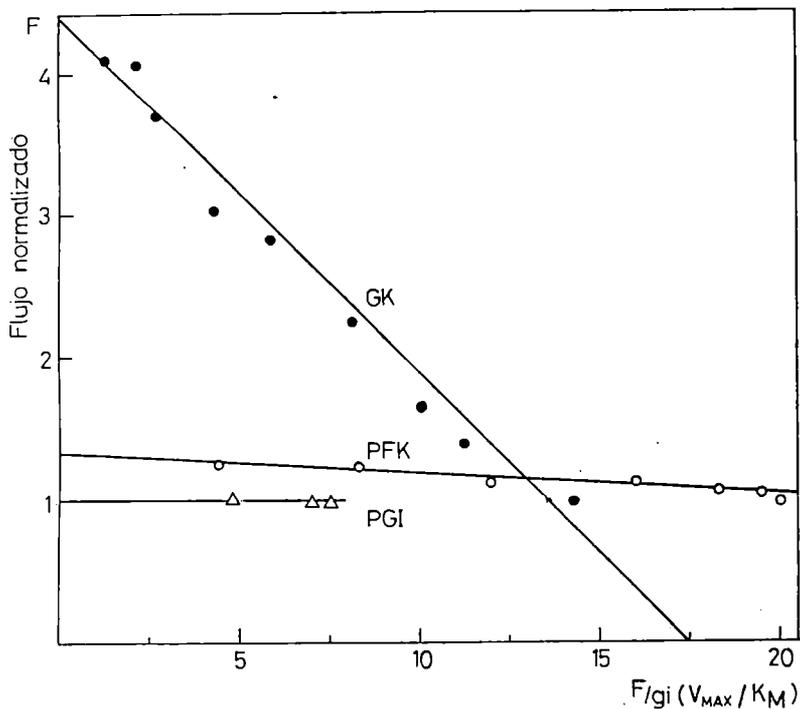


Fig. 3.6.- Representación de F frente a F/g_i .

Los valores de C'_1 y C'_2 se obtienen de la intersección con la ordenada y pendiente respectivamente. Los Coeficientes de control del flujo se han calculado a partir de estos datos de acuerdo con la ecuación (3.10). Los valores de F/g_i han sido divididos por 10 en el caso de la glucoquinasa y multiplicados por 10 en el caso de la fosfofructoquinasa con objeto de reducir y ampliar las rectas respectivamente.

En la tabla 3.5 aparecen los Coeficientes de control del flujo-obtenidos.

Enzima	Actividad basal	C_1^f	C_2^f	C_E^F
Glucocuinasa	0.07 ± 2.10^{-3}	4.36 ± 0.13	0.025 ± 7.10^{-4}	0.77 ± 0.025
Fosfoglucosaisomerasa	0.27 ± 8.10^{-3}	1.00	—	0.00
Fosfofructoquinasa	$0.05 \pm 1.5.10^{-3}$	1.33 ± 0.03	0.15 ± 4.10^{-4}	0.24 ± 0.01
Aldolasa ⁺	1.33 ± 0.025	1.00	—	0.00
Triosafosfatoisomerasa ⁺	6.66 ± 0.15	1.00	—	0.00
Glicerolfosfato deshidrog. ⁺	4.00 ± 0.17	1.00	—	0.00
Suma de los Coeficientes de control del flujo: $\sum C_E^F$				1.01 ± 0.015

TABLA 3.5.- Parámetros del sistema experimental y Coeficientes de control del flujo a 5 mM de Glucosa. La concentración de proteínas en los ensayos fue de 1.5 ± 0.02 mg /ml . La actividad enzimática se expresa como micromoles de producto de reacción producido por minuto y - por miligramo de proteína. C_1^f y C_2^f se obtuvieron de los resultados -- mostrados en la Figura 3.6. El valor del flujo basal fue $0.020 \pm 2.46.10^{-3}$ μ moles de glicerol fosfato producidos por minuto y por miligramo de proteína, siendo el resto de los flujos normalizados con respecto a este valor. Los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos.

(+) Las actividades de la Aldolasa, Triosafosfatoisomerasa y Glicerol fosfato deshidrogenasa que se indican corresponden a las presentes en el sistema experimental después de añadir enzimas comerciales. Sus actividades antes de esta adición fueron 0.66, 3.33 y 2 respectivamente, valorados según Bergmeyer (1974).

Puede observarse en esta tabla que la suma de todos estos Coeficientes está próxima a la unidad tal como se espera de la teoría.

Los resultados confirman la aplicación de varios aspectos de la teoría de Kacser y Burns así como las aportaciones a la misma que presentamos en este trabajo: primero, la ecuación A.6 (Apéndice A) (Kacser y Burns, 1973) donde se describe la relación hiperbólica entre el flujo y la actividad enzimática, y la ecuación 3.7 que se deriva de la extensión que hemos hecho aquí de esta teoría para sistema con una saturación significativa de todas las enzimas; segundo, la propiedad de la suma entre todos los Coeficientes de control del flujo de una ruta metabólica:

$$\sum_{i=A,1..i}^n C_E^F = 1$$

(Kacser y Burns, 1973); tercero, el método descrito aquí para determinar los Coeficientes de control del flujo para la enzima (ecuación (3,9) pág. 23), el cual podrá ser aplicado eventualmente a cualquier ruta metabólica. Asimismo estos resultados demuestran que nuestro sistema experi-

mental se ajusta a las hipótesis del modelo teórico.

Según los resultados expuestos, las ATP-fosfotransferasas y fosfofructoquinasas dan cuenta ellas solas del control del flujo del sistema en las condiciones definidas, siendo éste insensible a cambios en la actividad de la fosfoglucoisomerasa y enzimas auxiliares.

4. PARTE II. Extensión de la propiedad de la suma a sistemas metabólicos in vitro con rutas convergentes en un punto.

4.1. Comentario y objetivos.

Anteriormente (apartado 3.1.2, páq. 22) ya nos hemos referido al carácter general del método de determinación de los Coeficientes de control del flujo C_E^F . Decíamos entonces que bastaba con comprobar experimentalmente que el flujo a través del sistema guarda una relación hipérbolica con la actividad de una enzima dada, para poder hacer uso de la expresión :

$$C_E^F = \frac{C_1' - 1}{C_1'}$$

y determinar así el Coeficiente de control asociado a dicha enzima. Esta característica hace posible estudiar la distribución de estos Coeficientes de control en sistemas metabólicos in vitro de complejidad superior al examinado en la parte primera, siempre que se pueda seguir la evolución del flujo del sistema frente a las adiciones de las enzimas que los componen.

En principio, se nos presentan dos situaciones susceptibles de ser abordadas. Nos podemos preguntar cómo se distribuyen los Coeficientes de control del flujo en sistemas en los cuales dos o más rutas convergen en un mismo punto y cómo se extiende a éste caso la Propiedad de la suma. También podría analizarse la distribución del control en aquellas situaciones en las que una o más enzimas "desvían" parte del flujo en otra dirección. Este último planteamiento nos enfrentaría -- con sistemas metabólicos con Coeficientes de control del flujo negativos para alguno de sus componentes. Estos han sido contemplados en la teoría desarrollada por Kacser y Burns, señalando que en estos casos -- la Propiedad de la suma se sigue cumpliendo pudiéndose dar situaciones en las que algunos de los pasos de reacción tengan un Coeficiente de control del flujo superior a la unidad (enzimas supercontroladoras).

De las dos posibilidades, la segunda presenta ciertas dificultades desde el punto de vista experimental. Recordemos que algunos de los controles que se realizaron en el sistema experimental de la Parte I estaban dirigidos hacia la comprobación de que no existían fugas significativas de intermediarios en direcciones diferentes a la del glicérol-3-fosfato. Un sistema experimental adecuado para el estudio de situaciones de divergencia debería contemplar dos productos finales al menos y flujos significativos en ambos casos. Por lo tanto nos veríamos en la necesidad de definir un nuevo sistema experimental donde, efectivamente, en un punto de la ruta se produjera una bifurcación del flujo de intermediarios. Tendríamos consecuentemente que comprobar que son dos los productos finales y analizar después la distribución de los Coeficientes de control midiendo flujos en uno sólo de los extremos de la ruta.

Resulta mucho más sencillo utilizar el sistema metabólico ya di

señado para estudiar la primera posibilidad. Si el medio de reacción contiene glucógeno en concentración suficientemente alta, es posible--inducir un flujo significativo desde el glucógeno a glucosa-6-fosfato a través de la fosforilasa-a y la fosfoglucomutasa principalmente. Sería suficiente, pues, garantizar un nivel alto de este nuevo sustrato en el medio para estar en condiciones de aplicar el método descrito y determinar los Coeficientes de control del flujo C_E en nuevas situaciones metabólicas.

Nuestro objetivo en esta parte será, por lo tanto comprobar la Propiedad de la Suma en sistemas metabólicos con rutas convergentes en un punto, en un sistema experimental semejante al descrito en la Parte I.

4.2. Sistema experimental.

El sistema experimental es el mismo que se describió en la parte I. Únicamente le hemos incorporado un flujo de G6P a partir de glucógeno añadiendo este nuevo sustrato a la mezcla de reacción. La concentración de glucógeno empleada fue 50 mM (expresada en unidades de --glicosilo) con una concentración de glucosa de 5 mM. Esta concentración corresponde aproximadamente a la que existe en el hepatocito normal (Start, C. y Newsholme, C.A., 1968; Kalkhoff, R.K., et al., 1966). La constante de Michaelis de la fosforilasa-a de hígado de rata es del orden de 0.04 mM (E. Helmreich, 1969). Por lo tanto con esta concentración de glucógeno la fosforilasa-a está saturada por su sustrato y en condiciones termodinámicamente favorables para la transformación del glucógeno en glucosa-6-fosfato. El resto de las condiciones, así como los métodos empleados para la obtención y preparación de las muestras y valoración de actividades enzimáticas fueron los mismos que se describieron en la Parte I.

Hay que resaltar que los estudios que se llevaron a cabo en estas nuevas condiciones constituyen en realidad una continuación y complemento de los que se realizaron anteriormente, de tal manera que la visión sobre la regulación del sistema que alcancemos como resultado de estos trabajos será más amplia y general que la que se tenía hasta aquí. El sistema experimental de la Parte I se muestra ahora como una ruta inserta en una red metabólica más compleja, de la que forma parte y de la que como se podría sospechar no será independiente en cuanto a su regulación.

4.3. Materiales y métodos.

Para la obtención y preparación de las muestras se siguieron-- los mismos procedimientos descritos en 3.3.2.1 (pág.30) Las valoraciones de proteínas se hicieron por el método de Lowry tal como se indica en 3.3.2.4 (pág.43). Los experimentos de titulación y el cálculo de los Coeficientes de control del flujo se realizaron según se indica en -- 3.3.2.6 y 3.3.2.7.

4.3.1. Determinación de actividades enzimáticas.

En los experimentos de esta parte se determinaron además de los Coeficientes de control del flujo C_E^F de la hexoquinasa, fosfoglucoisomerasa y fosfofructoquinasa hepáticas los de la fosfoglucomutasa y fosforilasa-a. Esto último requiere, tal como se ha indicado, la valoración de las actividades enzimáticas presentes en el extracto y de las comerciales usadas en los ensayos de titulación.

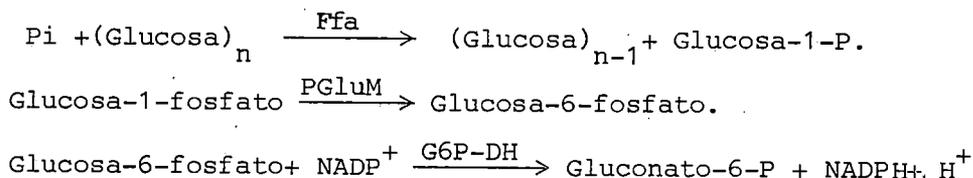
Describimos a continuación los métodos para la valoración de las actividades de la fosforilasa-a y fosfoglucomutasa. En estas medidas se procuró respetar al máximo el "medium" molecular en el cual funciona el sistema. pH, tampón, temperatura, y concentraciones de iones y cofactores fueron siempre los mismos que se emplearon en los ensayos de titulación.

A. Fosforilasa-a.

A.1. Determinación de la actividad de la fosforilasa-a hepática.

A.1.1. Principio.

El método empleado para el ensayo de la actividad de esta enzima es una modificación del descrito por Bergmeyer(1974). Se basa en la medida de la velocidad de formación del NADPH en un sistema acoplado que contiene glucógeno, fosfato inorgánico, G-1,6P₂, fosfoglucomutasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.



A.1.2. Reactivos.

I. Tampón hepes 50 mM. pH: 7.4 conteniendo además:

KCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Pi	10 mM

El tampón se obtuvo a partir de agua bidestilada y desionizada recién preparada.

II. Disolución de glucógeno 1 M(en unidades de glicosilo).

III. Disolución de NADP⁺ 20 mM.

IV. Disolución de PGLuM y G6P-DH de 40 y 120 unidades/ml respectivamente.

V. Disolución de G1,6P₂ 0.08 mM.

Todos los reactivos se prepararon en el tampón Hepes I y se mantuvieron mientras duraron los experimentos en un baño de agua a 35°C.

A.1.3. Procedimiento.

A 1.5 ml del tampón hepes I se añadieron 100 μ l del extracto y el mismo volumen de los reactivos III, IV y V. Se dejó estar durante unos minutos iniciándose entonces la reacción con 100 μ l de la disolución de glucógeno. En el volumen final de 2 ml las concentraciones de los reactivos en la mezcla de reacción y en el blanco fueron:

<u>REACTIVOS</u>	<u>ENSAYO</u>	<u>BLANCO</u>
Hepes	50 mM	50 mM
KCl	100 mM	100 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
Pi	10 mM	10 mM
Glucógeno	50 mM	--
G 1 , 6 P ₂	4 μ M	--
NADP ⁺	1 mM	1 mM
PGLuM	1 unidad/ml	--
G6P-DH	3 unidades/ml	--

Las medidas se realizaron por triplicado en cubetas de 1 cm de paso de luz.

A.1.4. Unidad de actividad enzimática.

La unidad de actividad enzimática de la fosforilasa-a se define como la cantidad de enzimas que cataliza la producción de 1 μ mol de G1P por minuto a partir de glucógeno, en las condiciones descritas, basado en un coeficiente de extinción para el NADPH a 340 nm de $6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A.2. Determinación de la actividad de fosforilasa-a comercial.

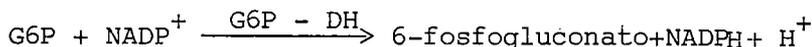
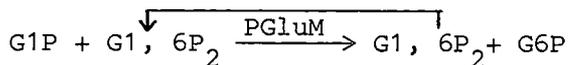
Se llevaron a cabo estas determinaciones por los mismos métodos y usando los mismos reactivos que se describen en A.1. La unidad de actividad enzimática se define de la misma forma que anteriormente.

B. Fosfoglucomutasa.

B.1. Determinación de la actividad de fosfoglucomutasa hepática.

B.1.1. Principio.

El método empleado para medir la actividad de la fosfoglucomutasa (PGLuM) es una modificación del descrito por John King (1974). Se basa en la utilización de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa como enzima indicadora.



Hasta hace pocos años, la dificultad de este ensayo radicaba en la no disponibilidad de la G-1,6P₂, necesaria para el ensayo. Hoy la G1P normalmente utilizada y disponible comercialmente contiene dicho cofactor en cantidades suficientes para valorar PGLuM.

El equilibrio de la reacción está desplazado un 95% hacia la formación del 6-fosfogluconato. La actividad se determina por el cambio de absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADPH.

B.1.2. Reactivos.

I. Tampón hepes 50 mM pH 7.4 conteniendo:

KCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM
Pi	10 mM

Se preparó con agua bidestilada y desionizada.

II. Disolución de G1P. 100 mM, conteniendo un 1% de G1,6P₂.

III. Disolución de G6P-DH 40 unidades/ml.

IV. Disolución de NADP⁺ 20 mM.

Los reactivos se prepararon con el tampón hepes I y se mantuvieron mientras duraron los experimentos en un baño de agua a 35°C.

B.1.3. Procedimiento.

A un volumen de 1.6 ml del tampón hepes se le añadieron 100 μl del extracto y 100 μl de las disoluciones III y IV. Se mezcló y se incubó durante 5 minutos añadiendo a continuación 100 μl de la disolución del sustrato II. Se registró el incremento de absorbancia espectrofotométricamente a 340 nm. Las medidas se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, con 2 ml de volumen final de mezcla de reacción. La concentración en la mezcla de reacción y en el blanco fueron:

<u>REACTIVOS</u>	<u>ENSAYO</u>	<u>BLANCO</u>
Hepes	50 mM	50 mM
KCl	10 mM	10 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
Pi	10 mM	10 mM
G1P	5 mM	--
G 1,6 P ₂	0.5 mM	--
NADP ⁺	1 mM	1 mM
G6P-DH	1 unidad/ml	--

Las medidas se realizaron por triplicado a 35°C

B.1.4. Unidad de actividad enzimática.

La unidad de actividad enzimática de la fosfoglucomutasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de $1 \mu\text{mol}$ por minuto de G1P en G6P, en las condiciones de reacción descritas, basado en un coeficiente de extinción molar para el NADPH a 340 nm de $6.22 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

B.2. Determinación de la actividad de la fosfoglucomutasa comercial.

B.2.1. Métodos y reactivos.

Los métodos, reactivos y condiciones experimentales fueron idénticas a las descritas en B.1. La unidad de actividad enzimática se define también de la misma manera que se indicó en B.1.4.

C. Cálculos.

La actividad enzimática se expresa como μ moles de producto producido por minuto y por mg de proteína en la cubeta de reacción según la expresión (ap.3.3.2.3):

$$\text{Actividad específica en cubeta} = \frac{\Delta A \times V}{\Delta t \times \epsilon_{\text{exp}} \times l} \quad \text{unidades/mg}$$

Expresión que se reduce a:

$$\text{Actividad específica en cubeta} = \frac{0.32}{\Delta t \times p} \cdot \Delta A \quad \text{unidades/mg}$$

donde p = miligramos de proteínas totales en cubeta.

Δt = incremento de tiempo.

y ΔA = incremento de absorbancia.

4.3.2. Constantes de Michaelis de las fosforilasas-a y de las fosfoglucomutasas.

Los experimentos de titulación requieren, tal como se vió arriba, conocer el valor de las constantes de Michaelis en las condiciones de reacción tanto de la enzima hepática como de la comercial. Sin embargo, los resultados en este aspecto de la Parte I, mostraron que no había diferencias significativas entre los valores medidos experimentalmente y los descritos en la bibliografía. De la misma forma las actividades coincidían con las indicadas por el fabricante.

A la vista de esto, en los ensayos de esta parte se emplearon los datos disponibles en la literatura especializada. En el caso de las

fosforilasas dichas referencias bibliográficas (E.Helmreich, 1969) indican que la constante de Michaelis para el glucógeno en hígado son del mismo orden que la del músculo. Empleamos entonces el valor de K_M para el glucógeno de 0.04 mM descritos por E.Helmreich, C.Michaelides y C.Cori(1967) para la fosforilasa de músculo de conejo. La K_M de la --fosfoglucomutasa para la glucosa-1-fosfato fue 0.008 mM(Lowry y Passonneau, 1969). En este caso se dió, además una situación semejante a la que se dió con la fosfoglucoisomerasa en el sistema metabólico de la Parte I: la adición de esta enzima en ningún caso afectó sensiblemente al flujo. Con estos valores y las actividades enzimáticas basales se determinaron los valores del parámetro g_i en cada caso tal como se describió en 3.3.2.7(pág.47)construyendo de este modo las curvas de F versus g_i .

4.3.3. Productos.

Además de los productos empleados en estas valoraciones y cuyas referencias aparecen en 3.3.3, se utilizaron:

Fosforilasa-a y fosfoglucomutasa, ambas de músculo de conejo, de Sigma Chemical,Co., St.Louis, Missouri(U.S.A.).

Glucosa-1-fosfato conteniendo un 1% de glucosa 1,6 bifosfato-glucosa-1,6 difosfato y glucógeno, también de Sigma Chemical, Co.

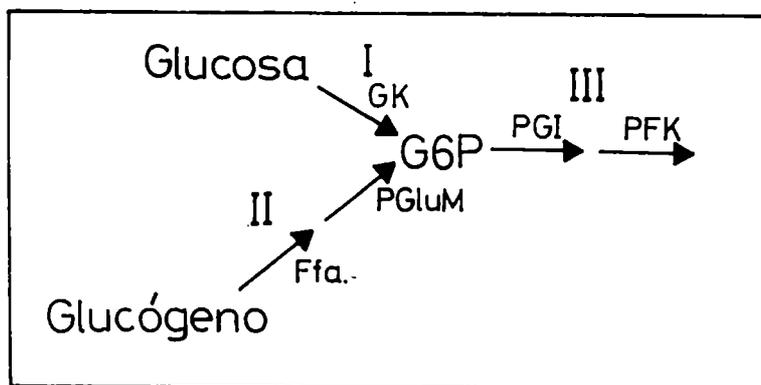


Fig. 4.1.- Representación esquemática del sistema experimental estudiado en esta parte.

La Ruta convergente I transforma glucosa en G6P por medio de la reacción catalizada por la glucoquinasa. La Ruta convergente II produce igualmente G6P a partir de glucógeno por la acción de la fosforilasa-a y de la fosfoglucomutasa --principalmente. III representa el tramo común a partir de G6P reacciones catalizadas por la fosfoglucoisomerasa y por la --fosfofructoquinasa.

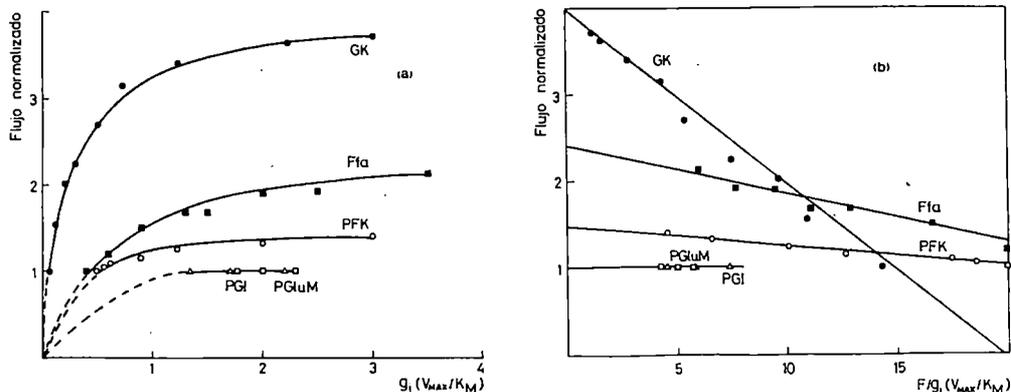


Fig. 4.2.- Resultados de los experimentos de titulación en las condiciones descritas en la Figura 4.1.

a) Curvas de flujo frente al parámetro g_i obtenidas al titular con las diferentes enzimas del sistema. El flujo muestra una relación hiperbólica respecto a g_i en el caso de la glucoquinasa (●), fosforilasa-a (■) y fosfofructoquinasa (○); mientras que la adición de fosfoglucomutasa (□) y fosfoglucoisomerasa (△) no altera el valor del flujo basal indicando -- con esto que sus Coeficientes de control del flujo para la enzima son nulos. El flujo sin ninguna enzima añadida se expresa como 1 en el eje de ordenadas, estando el resto de los valores de F normalizados con respecto a éste. Las líneas discontinuas han sido trazadas arbitrariamente y corresponden a la zona de la curva para las cuales no se obtuvieron datos experimentales ya que corresponden a valores de actividades enzimáticas inferiores a las que contiene el extracto. Los valores de g_i para la hexoquinasa están multiplicados por 10 con objeto de ampliar la gráfica, mientras que los valores de g_i para la fosfoglucomutasa han sido divididos por 10.

b) Se representan los valores de F frente a F/g_i . De estas gráficas se obtienen los parámetros C_1' y C_2' que nos permiten determinar los valores de $C_{E_i}^F$. Los valores de F/g_i en el caso de la fosfoglucomutasa se han multiplicado por 10^2 ; por 10 en el caso de la fosfofructoquinasa, fosfoglucoisomerasa y fosforilasa-a, y por 10^{-1} en el caso de la glucoquinasa.

4.4. Resultados y discusión.

4.4.1. Resultados.

Los primeros experimentos tenían como objetivo determinar la distribución de los Coeficientes de control $C_{E_i}^F$ en el nuevo sistema metabólico que partiendo de glucosa y glucógeno converge en glucosa-6-fosfato para producir finalmente un flujo de glicerol-3-fosfato. Este sistema aparece esquematizado en la figura 4.1(pág.65).

A concentraciones 5 mM de glucosa y 50 mM de glucógeno se realizaron titulaciones con hexoquinasa, fosfoglucoisomerasa, fosfofructoquinasa y además fosforilasa-a y fosfoglucomutasa. El medio contenía una concentración 10 μ M de glucosa-1,6-bifosfato. Los resultados obtenidos aparecen en la figura 4.2

En la tabla 4.1 se muestran los Coeficientes de control del flujo para la enzima obtenidos a partir de los datos experimentales mostrados en la figura anterior.

Tramo de reacción	Enzima	Actividad basal	C_1^F	C_2^F	$C_{E_i}^F$
I	Glucoquinasa	0.07 ± 2.10^{-3}	3.94 ± 0.19	$0.02 \pm 1.2.10^{-3}$	0.74 ± 0.04
Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F) I$					0.74 ± 0.04
II	Fosforilasa - a	$0.016 \pm 3.2.10^{-3}$	2.4 ± 0.12	0.57 ± 0.034	0.59 ± 3.10^{-3}
	Fosfoglucomutasa	$0.14 \pm 9.8.10^{-3}$	1.00	—	0.00
Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F) II$					0.59 ± 3.10^{-3}
III	Fosfoglucoisomerasa	0.27 ± 8.10^{-3}	1.00	—	0.00
	Fosfofructoquinasa	$0.05 \pm 1.5.10^{-3}$	1.48 ± 0.08	0.23 ± 0.02	0.32 ± 5.10^{-3}
Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F) III$					0.32 ± 5.10^{-3}
Ruta metabólica A (Glucosa \longrightarrow G3P) : $(\sum C_{E_i}^F) I + (\sum C_{E_i}^F) III = 1.06 \pm 0.053$					
Ruta metabólica B (Glucógeno \longrightarrow G3P) : $(\sum C_{E_i}^F) II + (\sum C_{E_i}^F) III = 0.91 \pm 2.27.10^{-3}$					

TABLA 4.1.- Parámetros del sistema experimental y Coeficientes de control de flujos a 5 mM de glucosa y 50 mM de glucógeno. La concentración de proteínas en los ensayos fue de 1.5 ± 0.02 mg /ml. La actividad enzimática se expresa como micromoles de producto de reacción producidos por minuto y por miligramo de proteína. C_1^F y C_2^F se obtuvieron a partir de los datos mostrados en la figura 4.2. El valor del flujo basal fue $0.020 \pm 2.46.10^{-3}$ μ mol/min.mg proteína siendo el resto de los flujos normalizados con respecto a este valor. Los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos distintos.

La tabla 4.1 muestra cómo se verifica que la suma de los Coeficientes de control del flujo para la enzima de las dos rutas metabólicas A y B está próxima a la unidad. En el caso de la ruta Glucógeno \rightarrow G3P(B) la diferencia respecto de 1 corresponderá a otras enzimas-- que intervienen en la ruta y que no han sido tituladas, fundamentalmente la glucosa amilo-1,6-glicosidasa (o enzima desramificante) y que -- participan en el control del flujo del sistema.

Destacamos también el hecho de que $(\sum C_{E_i}^F)_I$ sea aproximadamente igual a $(\sum C_{E_i}^F)_{II}$. A cada ruta convergente le corresponde la misma parte proporcional del control del flujo de G3P producido, aunque al ser distinto el número de pasos en cada uno de ellos, la distribución dentro de cada ruta convergente particular es diferente.

Una vez conocida la distribución de los Coeficientes de control de flujos para las enzimas en el sistema completo puede plantearse la modificación del sistema con objeto de observar la influencia de su estructura cinética sobre la distribución de los Coeficientes de control que analizamos. Para ello se llevaron a cabo, primeramente, dos series de experimentos complementarios entre sí. Lo primero que nos preguntamos fue: ¿Cómo se verá afectada la distribución de los Coeficientes de

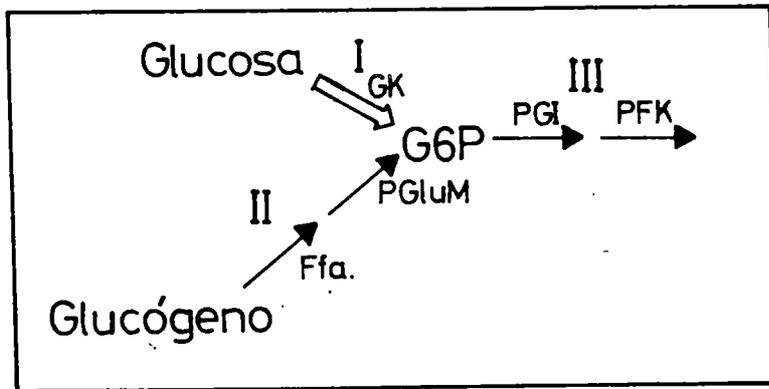


Fig. 4.3.- Representación esquemática del sistema metabólico empleado en los experimentos con $C_{GK}^F = 0$.

Se impuso el valor cero al Coeficiente de control de la glucoquinasa añadiendo a la mezcla de reacción un exceso de hexoquinasa comercial (flecha en trazo grueso) de 2 unidades/ml y manteniendo la misma concentración de los sustratos de cada rama y las actividades enzimáticas presentes en el extracto. En estas condiciones se procedió a titular con las otras dos enzimas a fin de determinar los nuevos valores de $C_{E_i}^F$.

control examinada, cuando todos los Coeficientes de una de las rutas convergentes se anulan? O, dicho de otra manera, si hacemos cero los Coeficientes de la fosforilasa-a y la fosfoglucomutasa simultáneamente ¿cómo se verán afectados el resto de los Coeficientes del sistema? También nos propusimos responder la misma cuestión modificando en el mismo sentido el Coeficiente de control del flujo de la glucoquinasa.

La anulación de un Coeficiente de control del flujo para la enzima se puede realizar añadiendo suficiente cantidad de la enzima en cuestión de tal manera que posteriores adiciones no afecten el valor del nuevo flujo basal. Se empezó por anular el coeficiente de la glucoquinasa (Fig. 4.3, pág. 68) determinando entonces los coeficientes del resto de los componentes del sistema.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en la Figura 4.4. (pág. 70).

En la tabla siguiente, Tabla 4.2, aparecen los coeficientes de control en esta nueva situación metabólica.

Tramo de reacción	Enzima	C_1^F	C_2^F	$C_{E_i}^F$
I	Glucoquinasa	1.00	—	0.00
	Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F)_I$			0.00
II	Fosforilasa -a	1.00	—	0.00
	Fosfoglucomutasa	1.00	—	0.00
	Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F)_{II}$			0.00
III	Fosfoglucoisomerasa	1.15 ± 0.092	$0.217 \pm 8.6 \cdot 10^{-3}$	0.14 ± 0.012
	Fosfofructoquinasa	5.33 ± 0.26	2.1 ± 0.105	0.81 ± 0.065
	Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F)_{III}$			0.95 ± 0.076

TABLA 4.2.- Parámetros del sistema experimental y Coeficientes de control del flujo a 5 mM de glucosa y 50 mM de glucógeno cuando se anuló el coeficiente de control del flujo para la glucoquinasa. El flujo basal fue en este caso $0.066 \pm 2.6 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína, superior al caso anterior como era de esperar. El resto de los flujos se normalizaron con respecto a este valor. Los datos son medias \pm S.D. de tres experimentos distintos. Las actividades enzimáticas basales (que no se indican) fueron las mismas que aparecen en la tabla 4.1, excepto en el caso de la glucoquinasa que en este caso fue de 2.05 unid./ml.mg proteína.

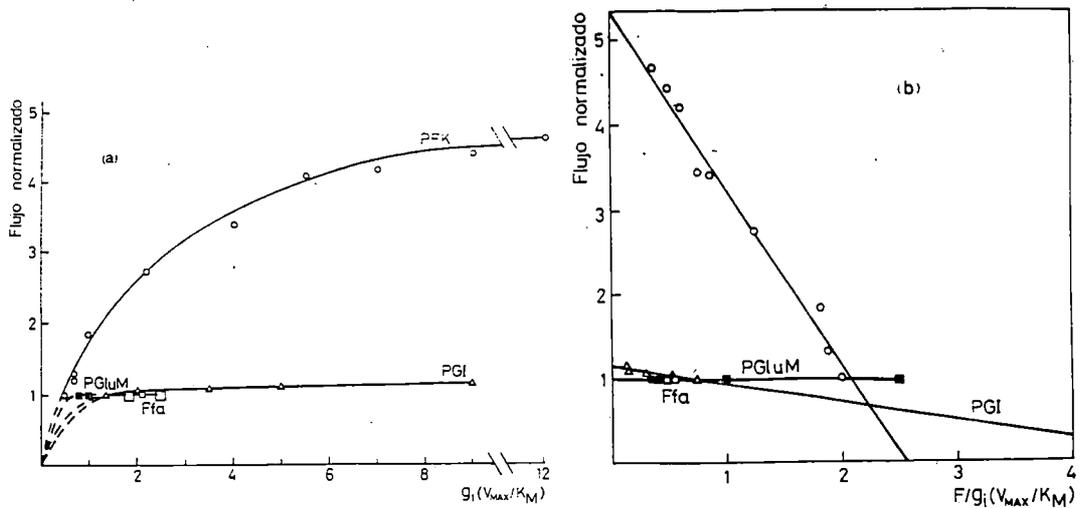


Fig. 4.4.- Resultados de los experimentos de titulación en las condiciones descritas en el esquema de la Figura 4.3.

a) Titulación con las diferentes enzimas del sistema. El flujo manifiesta ser sensible únicamente a la adición de fosfoglucoisomerasa (Δ) y fosfofructoquinasa (O). Las enzimas de la ruta convergente II pasan a comportarse de la misma forma que la hexoquinasa hepática: la titulación con las mismas no afecta al flujo final. (Fosforilasa-a (\blacksquare); fosfoglucomutasa (\square)). La glucoquinasa no se representa en esta figura. Las líneas discontinuas tienen el mismo significado que en la figura anterior. El flujo basal se expresa como 1 y el resto de los valores de F se normalizan con respecto a éste último. Los valores de g_i en el caso de la fosfoglucomutasa se han dividido por 10.

b) Representación de F frente a F/g_i para la fosfoglucoisomerasa (Δ) y para la fosfofructoquinasa (O). Como es ya habitual de estas representaciones se obtienen los valores de C_1^F y C_2^F a partir de los cuales se calculan los Coeficientes $C_{E_i}^F$. F/g_i se ha multiplicado por 10 en esta representación para el caso de la fosfoglucomutasa (\square). Fosforilasa - a (\blacksquare).

La imposición del valor cero al Coeficiente de la glucoquinasa acarrea, tal como puede verse, una redistribución dramática del resto de los Coeficientes. Llama la atención en primer lugar que las enzimas del tramo II dejan de tener responsabilidad alguna sobre el control del flujo comportándose en este sentido de la misma forma que la otra ruta convergente: $(\sum C_{E_i}^F)_I = (\sum C_{E_i}^F)_{II} = 0$.

Por otra parte las enzimas de la sección III pasan a asumir - ellas solas la totalidad del control del flujo: la suma de sus Coeficientes de control del flujo es, ahora, casi la unidad, tal como prevé la propiedad de la suma, y en este caso, por primera vez en nuestros experimentos, el Coeficiente de control de la PGI es significativo.

La segunda parte de esta serie de experimentos consistió en - anular los coeficientes de control del flujo para las enzimas de la Ruta convergente II. Esto se puede conseguir añadiendo al medio excesos suficientes de cada una de las enzimas, manteniendo constante la concentración saturante del sustrato de la ruta. Pero también es posible -- llegar al mismo resultado de manera más cómoda y segura, añadiendo un exceso de fosfoglucomutasa con una concentración saturante de un sustrato G1P y de su cofactor G1, 6P₂. Este último procedimiento fue el que se siguió (Fig. 4.5).

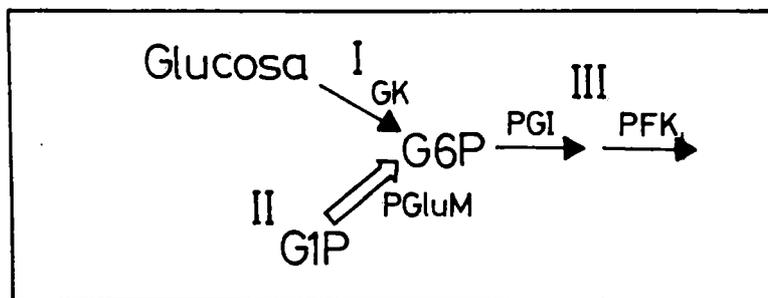


Fig.4.5.- Representación esquemática del sistema experimental usando en estos experimentos: $C_{Ffa}^F = C_{PGLuM}^F = 0$.

Esto último se consiguió añadiendo un exceso de fosfoglucomutasa (1.3 unidades/ml) al medio (flecha en trazo grueso), en presencia de concentraciones saturantes del sustrato G1P (5 mM) y del cofactor G1,6P₂ (0.5 mM). La concentración de glucosa empleada fue 5 mM.

Los experimentos de titulación rindieron los resultados expuestos en la Fig. 4.6 y en la Tabla 4.3.

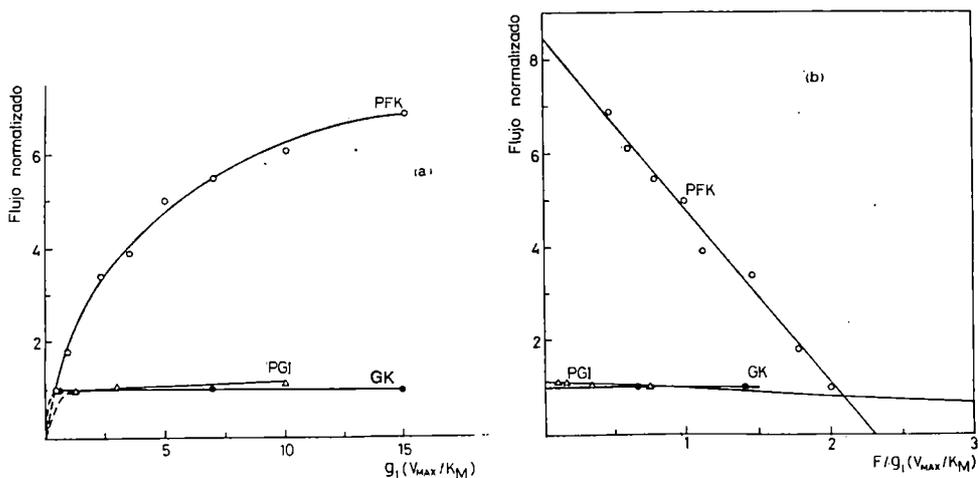


Fig. 4.6.- Resultados de los experimentos de titulación en las condiciones descritas en el esquema de la Fig 4.5.

a) Resultados de la titulación con hexoquinasa(●), fosfoglucoisomerasa(Δ) y fosfofructoquinasa(O) sobre el sistema metabólico mostrado en la Figura 4.5. El flujo es insensible a nuevas adiciones de hexoquinasa, pero responde hiperbólicamente a la titulación con cantidades crecientes de fosfoglucoisomerasa y fosfofructoquinasa. Los valores del flujo están normalizados y las líneas discontinuas tienen el mismo significado que en experimentos anteriores. Los valores de g_1 se han multiplicado por 10 en el caso de la glucoquinasa con objeto de ampliar la curva.

b) La representación de F frente a F/g_1 rinde lo mismo - que en casos anteriores los valores de C_1^F y C_2^F de donde se obtienen los distintos Coeficientes $C_{E_i}^F$.

La redistribución de los coeficientes de control del flujo adopta la misma forma que en el caso de la Tabla 4.3: Por una parte,

$$C_{GK}^F = (\sum C_{E_i}^F)_{II} = 0$$

Por la otra:

$$(\sum C_{E_i}^F)_{III} = 1$$

de tal forma que los valores particulares de C_{PGI}^F y C_{PFK}^F coinciden con los medidos en los anteriores experimentos.

Tramo de reacción	Enzima	C_1^I	C_2^I	$C_{E_i}^F$
I	Glucoquinasa	1.00	—	0.00
	Suma de $C_{E_i}^F$: $(\sum C_{E_i}^F)_I$			0.00
II	Fosforilasa - a	1.00	—	0.00
	Fosfoglucomutasa	1.00	—	0.00
	Suma de $C_{E_i}^F$: $(\sum C_{E_i}^F)_{II}$			0.00
III	Fosfoglucoisomerasa	1.11 ± 0.066	$0.165 \pm 1.83 \cdot 10^{-4}$	$0.1 \pm 1.4 \cdot 10^{-4}$
	Fosfofructoquinasa	8.45 ± 0.42	3.69 ± 0.25	$0.88 \pm 1.25 \cdot 10^{-3}$
	Suma de $C_{E_i}^F$: $(\sum C_{E_i}^F)_{III} = (C_{E_i}^F)_T$			0.98 ± 0.07

TABLA 4.3.- Parámetros del sistema experimental y Coeficientes de control del flujo a 5 mM de glucosa y 5 mM de GIP (0.5 mM de $G1,6P_2$). El flujo basal en estos experimentos fue $0.066 \pm 2.6 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, igual al caso anterior. Los valores del flujo se normalizaron con respecto a este valor. Las actividades enzimáticas basales fueron las mismas que en anteriores experimentos, excepto en el caso de la fosfoglucomutasa, en cuyo caso se añadió de la enzima comercial hasta 1.44 unidades/ml mg proteína. Los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos.

Estas dos últimas series de experimentos indican pues, que al añadir un exceso de hexoquinasa o fosfoglucomutasa estando ambas significativamente saturadas, el sistema, en lo que al control del flujo se refiere se ha simplificado pasando a residir todo el control en los pasos del tramo III.

Ciertamente, cuando ponemos un exceso de hexoquinasa o fosfoglucomutasa, estando ambas enzimas saturadas, no hacemos otra cosa que liberar la producción de glucosa-6-fosfato de cualquier limitación o impedimento cinético. Al quedar así liberada la formación de este producto el flujo final (medido como producción de glicerol-3-fosfato por unidad de tiempo) depende únicamente de lo que ocurra entre dicho intermediario y el glicerol-3-fosfato. Esto es equivalente a la reducción del sistema metabólico a los dos pasos finales.

Para comprobar este punto se realizó una serie de experimentos complementarios: Se incubó el sistema experimental como en ocasiones anteriores, pero añadiendo en este caso, en lugar de un exceso de cualquier enzima, una elevada concentración de glucosa-6-fosfato: 7 mM. Si

efectivamente es la liberalización de la producción de glucosa-6-fosfato, la responsable de la redistribución de los Coeficientes de control en las actuales condiciones el sistema debe mostrar el mismo comportamiento. Estos experimentos aparecen esquematizados en la figura siguiente.

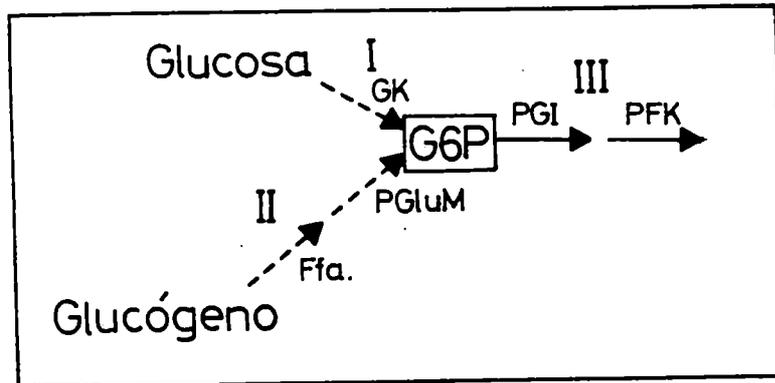


Fig. 4.7.- Representación esquemática del sistema metabólico empleado en los experimentos siguientes.

Se añadió al medio de reacción, que contenía una concentración 5 mM de glucosa y 50 mM de glucógeno, una concentración 7 mM de glucosa-6-fosfato (Recuadro en trazo grueso), - procediendo a continuación a titular con todas las enzimas -- del sistema incluyendo las que figuran en líneas discontinuas.

Los resultados de esta serie de experimentos se muestran en la Figura. 4.8. y en la tabla 4.4.

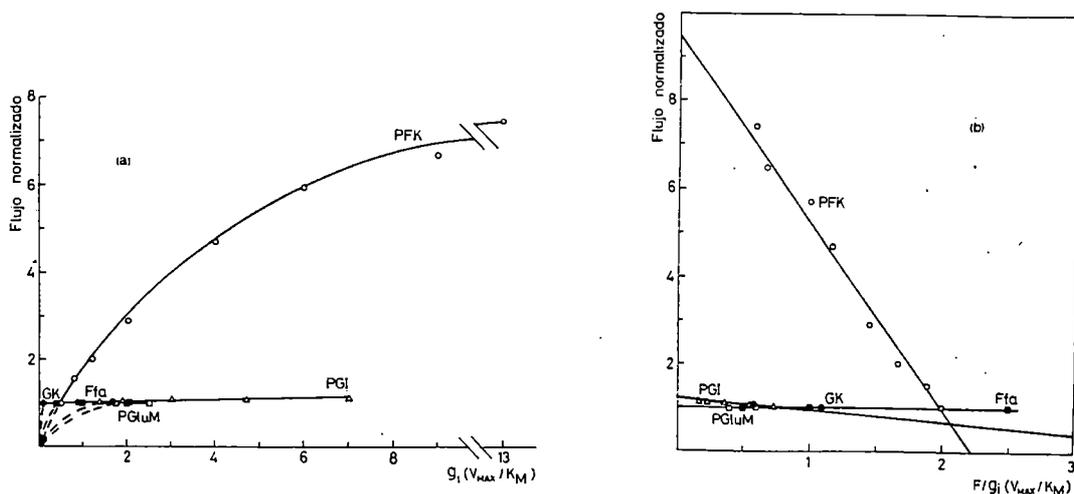


Fig. 4.8.- Resultados de los experimentos de titulación en -- condiciones descritas en la Figura 4.7.

a) La titulación con fosfofructoquinasa(O) y fosfoglucoisomerasa(Δ) afectan al flujo del sistema dando Coeficientes de control del flujo significativos. El resto de las enzimas no influyen sobre el valor del flujo basal. Glucoquinasa(\bullet) fosforilasa-a (\blacksquare) y fosfoglucomutasa(\square). El valor 1 representa el flujo basal y respecto a él se normalizaron el resto de los valores del flujo. Las líneas discontinuas, al igual que en ocasiones anteriores se han trazado arbitrariamente y tienen el mismo significado. Los valores de g_i de la fosfoglucomutasa han sido divididos por 10 y los de la fosfofructoquinasa multiplicados por el mismo factor.

b) La representación de los datos de la Figura 4.8(a) -- nos permite calcular los valores de C_1' y C_2' y a partir de ellos determinar los Coeficientes de control del flujo para las diferentes enzimas. En el caso de la fosfoglucomutasa F/g_i se ha multiplicado por 10.

Tramo de reacción	Enzima	C_1^F	C_2^F	$C_{E_i}^F$
I	Glucoquinasa	1.00	—	0.00
	Suma de $C_{E_i}^F$: $(\sum C_{E_i}^F)_I$			0.00
II	Fosforilasa - a	1.00	—	0.00
	Fosfoglucomutasa	1.00	—	0.00
	Suma de $C_{E_i}^F$: $(\sum C_{E_i}^F)_{II}$			0.00
III	Fosfoglucoisomerasa	1.16 ± 0.058	0.2 ± 0.02	0.13 ± 5.10^{-3}
	Fosfofructoquinasa	9.47 ± 0.47	4.31 ± 0.3	0.89 ± 0.07
	Suma de $C_{E_i}^F$: $(\sum C_{E_i}^F)_{III} = (\sum C_{E_i}^F)_T$			1.02 ± 0.08

TABLA 4.4.- Parámetros del sistema y Coeficientes de control del flujo a 5 mM de glucosa, 50 mM de glucógeno y 7 mM de G6P. El flujo basal en este caso coincidió con el de las dos últimas series de experimentos, siendo $0.066 \pm 2.6 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína. Los otros valores del flujo se normalizaron con respecto a este valor. Las actividades enzimáticas basales fueron las mismas que en experimentos anteriores, así como las enzimas auxiliares añadidas. Los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos separados.

Como puede verse, el sistema se comporta de la misma forma que en los dos casos anteriores. Podemos afirmar por tanto, que al liberar se la formación de glucosa-6-fosfato de cualquier restricción, bien sea adicionando un exceso de hexoquinasa, bien sea añadiendo un exceso de fosfoglucomutasa, se proporciona una concentración tal de glucosa-6-fosfato, que el efecto global es reducir prácticamente el sistema metabólico a dos únicos pasos: los catalizados por la fosfoglucoisomerasa y fosfofructoquinasa.

Finalmente, se procedió a anular, por el procedimiento ya indicado, los coeficientes de las enzimas del tramo III. En estas condiciones titulamos con hexoquinasa, fosforilasa-a y fosfoglucomutasa:

Fig. 4.9 y 4.10 y tabla 4.5.

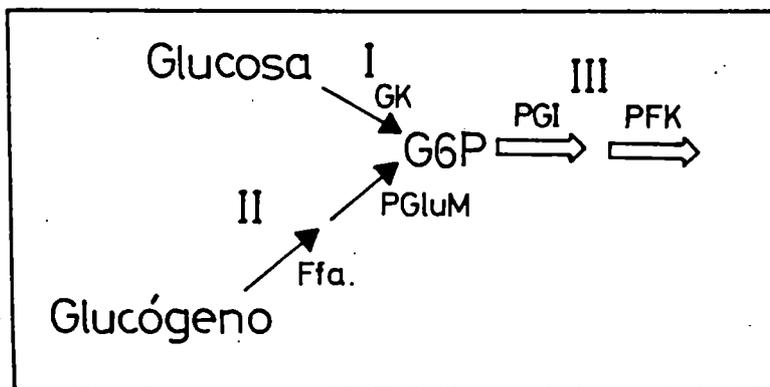


Fig. 4.9.- Representación esquemática del sistema metabólico empleado en los siguientes experimentos.

Los Coeficientes de control del flujo por la fosfoglucoisomerasa y fosfofructoquinasa se hicieron cero por adición de 1.5 unidades/ml y 2.4 unidades/ml respectivamente (Flechas en trazo grueso). Se llevaron a cabo experimentos de titulación, a 5 mM de glucosa y 50 mM de glucógeno en el medio como sustratos, con las enzimas fosforilasa-a, fosfoglucomutasa y hexoquinasa.

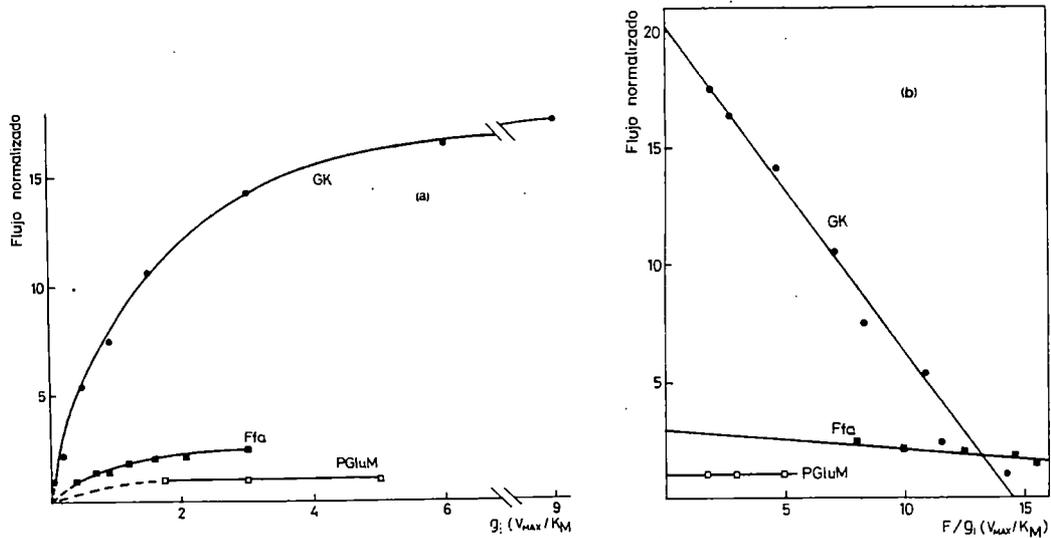


Fig. 4.10.- Resultados de los experimentos de titulación en las condiciones descritas en el esquema de la Figura 4.9.

a) La titulación con hexoquinasa (●) y fosforilasa-a (■) provoca una variación hiperbólica significativa en el flujo del sistema, mientras que la fosfoglucomutasa (□) no lo afecta apreciablemente. Como en otras ocasiones los flujos se normalizaron respecto al flujo basal (1 en el eje de ordenadas) y se trazaron arbitrariamente las líneas discontinuas. Los valores de g_i han sido multiplicados por 10 en el caso de la glucoquinasa y por 10^{-1} en el de la fosfoglucomutasa.

b) La representación de los datos experimentales de la Figura 4.10 (a) rinden en ésta los valores de C_1' y C_2' a partir de los cuales se obtienen los correspondientes Coeficientes de control. Los valores de F/g_i aparecen divididos por 10 en el caso de la glucoquinasa y multiplicados por el mismo factor en el caso de la fosforilasa-a y la fosfoglucomutasa.

Tramo de reacción	Enzima	C_1^I	C_2^I	$C_{E_i}^F$
I	Glucoquinasa	20.22 ± 1.41	1.41 ± 0.11	0.95 ± 0.085
	Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F)_I$			0.95 ± 0.085
II	Fosforilasa - a	2.93 ± 0.23	0.8 ± 0.056	0.66 ± 0.031
	Fosfoglucomitasa	1.00	—	0.00
	Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F)_{II}$			0.66 ± 0.031
III	Fosfoglucoisomerasa	1.00	—	0.00
	Fosfofructoquinasa	1.00	—	0.00
	Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F)_{III}$			0.00

TABLA 4.5.- Parámetros del sistema y Coeficientes de control del flujo a 5 mM de glucosa y 50 mM de glucógeno después de hacer nulos los Coeficientes de control de la fosfoglucoisomerasa y fosfofructoquinasa. En este caso el flujo basal fue $0.032 \pm 2.24 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína. Las actividades enzimáticas basales fueron las mismas que en anteriores experimentos salvo en el caso de la fosfoglucoisomerasa, 1.77 unidades / ml.mg proteína, y de la fosfofructoquinasa, 2.45 unidades/ml.mg proteína. Los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos.

Al anular los Coeficientes de las enzimas del tramo III estamos transformándolas en enzimas auxiliares (véase Parte III). El sistema que da entonces como dos rutas metabólicas con un mismo producto final, la G6P. En cada ruta, considerada individualmente, los Coeficientes para las enzimas habrán de sumar uno. Esto es lo que efectivamente ocurre con la ruta convergente I ($C_{GK}^F = 1$). En el caso de la ruta convergente II, $\sum C_{E_i}^F = 0.66$. Como ya hemos señalado lo que resta hasta uno corresponderá a la amilo 1-6 glucosidasa que actúa sobre el glucógeno y que tiene un Coeficiente de control distinto de cero.

4.2.2. Discusión.

4.2.2.1. Enunciado de la Convergencia del control.

Los resultados de esta Parte II, anteriormente mostrados, se han obtenido empleando el método experimental para determinar Coeficientes de control del flujo para la enzima C_E^F descrito en la Parte I. Estos resultados prueban la aplicabilidad de la Teoría del control de flujos a sistemas metabólicos como los descritos.

Por otra parte, la serie de datos experimentales mostrados nos

permiten enunciar el siguiente corolario de la Convergencia del control:

"En un sistema metabólico con varias rutas convergentes en un punto se cumple la Propiedad de la suma para cada ruta lineal que se pueda considerar en el mismo, verificándose también que la suma de los Coeficientes de control del flujo para la enzima ($C_{E_i}^F$) de todas las enzimas de cada una de las rutas convergentes hasta el punto de convergencia es igual para todas ellas en cualquier situación metabólica."

Este corolario aparece ilustrado en la Fig.4.11.

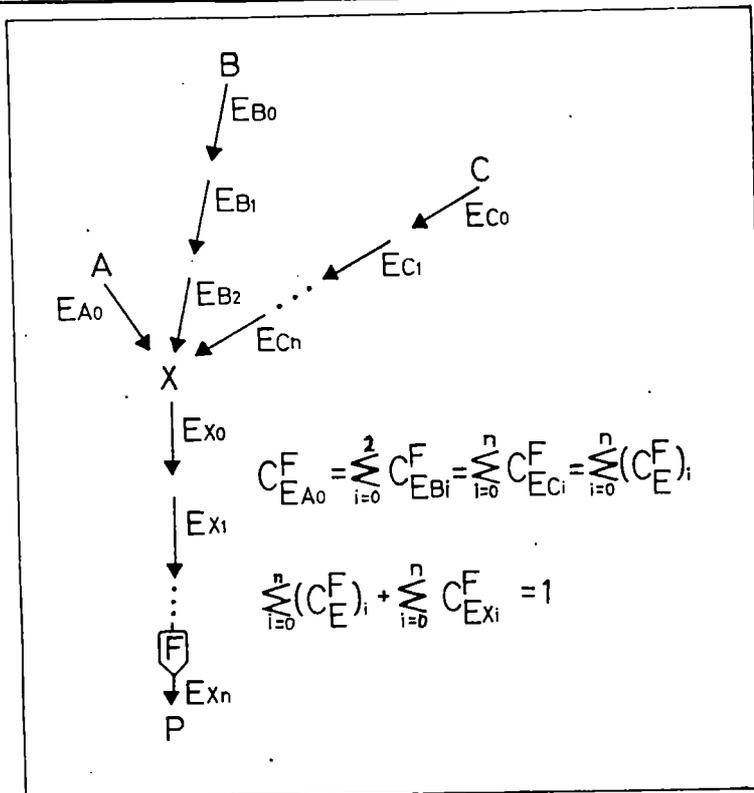


Fig. 4.11.- La suma de los Coeficientes de control del flujo $C_{E_i}^F$ de todas las enzimas de cada una de las distintas rutas metabólicas que convergen en X, hasta el punto de convergencia es igual para todas ellas.

$$C_{EA_0}^F = \sum_{i=0}^2 C_{EB_i}^F = \sum_{i=0}^n C_{EC_i}^F$$

Además para cada ruta individual A → P, B → P ó C → P se cumple la propiedad de la suma

$$C_{EA_0}^F + \sum_{i=0}^n C_{EX_i}^F = 1$$

$$\sum_{i=0}^2 C_{EB_i}^F + \sum_{i=0}^n C_{EX_i}^F = 1$$

$$\sum_{i=0}^n C_{EC_i}^F + \sum_{i=0}^n C_{EX_i}^F = 1$$

En la Figura 4.12 se muestran juntos y esquemáticamente los resultados obtenidos en las diferentes series de experimentos realizados en esta parte.

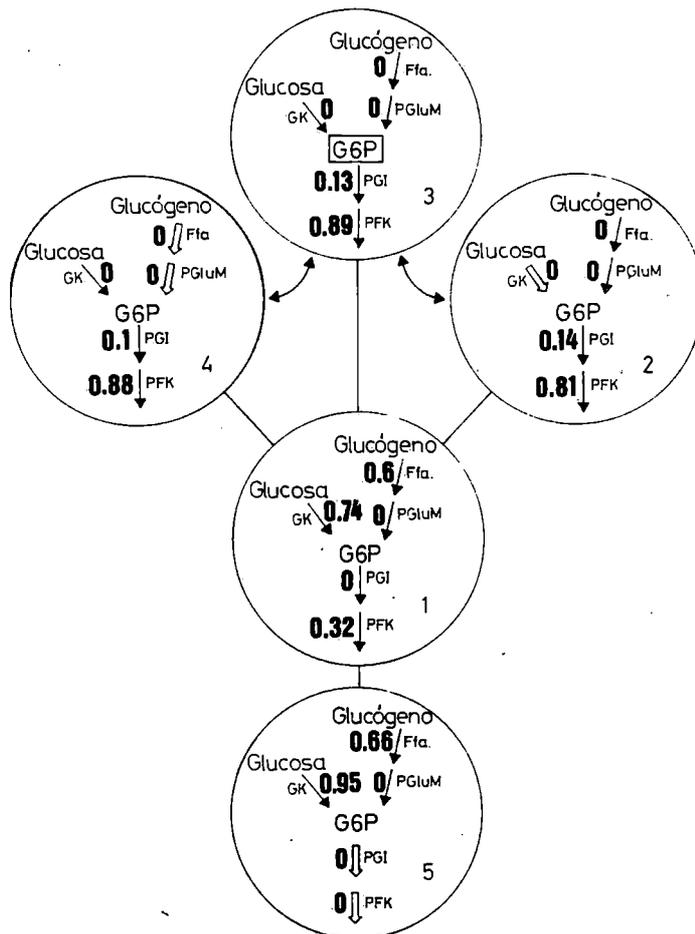


Fig. 4.12.- Representación esquemática de las cinco series de experimentos realizados a partir del sistema experimental descrito en la Parte II.

En cada esquema aparece representado esquemáticamente el sistema metabólico empleado en cada caso, con indicación de las enzimas que participan y de los Coeficientes de control del flujo de cada uno de ellos. En el esquema central 1 se puede observar cómo se cumple con buena aproximación el corolario antes enunciado, con la salvedad del Coeficiente de control no nulo de las amilo-1,6-glucosidasa (enzima desramificante). A partir de esta descripción de la regulación del sistema metabólico se procedió a realizar dos series de experimentos complementarios entre sí, 2 y 3. Observamos entonces que el corolario se sigue cumpliendo sin restricción alguna. Estos resultados nos sugirieron los experimentos mostrados en 4. Efectivamente la distribución de los Coeficientes de control del flujo es análoga a la de los dos experimentos anteriores. Además estos resultados apoyan la hipótesis de que la liberación de la producción de glucosa-6-fosfato simplifica el sistema metabólico, en lo que a la distribución de los Coeficientes de control se refiere, a dos únicos pasos: los catalizados por la fosfoglucoisomerasa y por la fosfofructoquinasa. Los resultados mostrados en el esquema 5 también ilustran el corolario: la redistribución de los Coeficientes de control que se produce se ajusta también a lo predicho por el corolario, sumando 1 cada una de las rutas convergentes (la enzima amilo-1,6-glucosidasa tendría en este caso un Coeficiente de control para el flujo de 0.3 aproximadamente).

4.2.2.2. Demostración de la Convergencia del control.

El corolario de la Convergencia del control, que en el apartado anterior se enunció empíricamente, sobre la base de una serie de resultados experimentales obtenidos en un sistema experimental en varias situaciones metabólicas es, no obstante, susceptible de ser demostrado teóricamente. Este hecho le confiere un carácter general al mismo nivel que el de la Propiedad de la Suma.

Así, consideremos un sistema metabólico como el mostrado en la Fig.4.13, donde una serie de cadenas enzimáticas lineales convergen en un intermediario metabólico común X, el cual es posteriormente transformado.

mado en P por otra secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente.

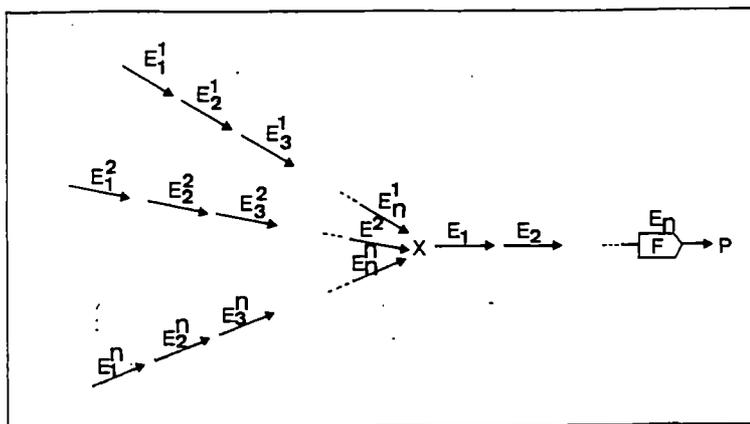


Fig. 4.13.- Sistema metabólico con n rutas convergentes en X.

Cada serie de enzimas $E_1^i, E_2^i, \dots, E_1, E_2, \dots, E_n$ constituye una ruta lineal cuyo flujo es F.

Haciendo uso de la definición del Coeficiente de control del flujo para la enzima podemos escribir:

$$\frac{dF}{F} = C_{E_1^1}^F \frac{de_1^1}{e_1^1} + C_{E_2^1}^F \frac{de_2^1}{e_2^1} + \dots + C_{E_1^2}^F \frac{de_1^2}{e_1^2} + C_{E_2^2}^F \frac{de_2^2}{e_2^2} + \dots + C_{E_1^n}^F \frac{de_1^n}{e_1^n} + C_{E_2^n}^F \frac{de_2^n}{e_2^n} + \dots + C_{E_1}^F \frac{de_1}{e_1} + C_{E_2}^F \frac{de_2}{e_2} + \dots + C_{E_n}^F \frac{de_n}{e_n} \quad (4.1)$$

Esta ecuación expresa que el cambio fraccional total en el valor del flujo final (dF/F) es igual a la suma de las contribuciones de cada uno de los pasos enzimáticos al cambio fraccional total. Dichas contribuciones parciales son el producto del Coeficiente de control del flujo para la enzima (C_E^F) por el cambio fraccional que se pueda producir en el parámetro enzimático e correspondiente a cada enzima particular (de/e).

En un sistema como el mostrado en la figura 4.13 podemos provocar un cambio fraccional, α , en los parámetros e de todas las enzimas E_1^1 y E_1 , correspondientes a la primera de las ramas convergentes y al -

tramo final común a todas:

$$\frac{de_i^1}{e_i^1} = \frac{de_i}{e_i} = \alpha$$

dejando inalterados los parámetros e del resto de las enzimas ($E_i^2, E_i^3, \dots, E_i^n$). En estas condiciones se habrá producido un cambio fraccional de e_i^1 igual magnitud en el valor del flujo: $dF/F = \alpha$.

La ecuación (4.1) se simplificará entonces, al ser:

$$\frac{de_i^2}{e_i^2} = \frac{de_i^3}{e_i^3} = \dots = \frac{de_i^n}{e_i^n} = 0$$

quedando:

$$\frac{dF}{F} = \alpha = C_{E_1^1}^F \frac{de_1^1}{e_1^1} + C_{E_2^1}^F \frac{de_2^1}{e_2^1} + \dots + C_{E_1}^F \frac{de_1}{e_1} + C_{E_2}^F \frac{de_2}{e_2} + \dots$$

De donde:

$$\sum_{i=1}^n C_{E_1^i}^F + \sum_{i=1}^n C_{E_i}^F = 1 \quad (4.2)$$

La ecuación (4.3) es una expresión de la Propiedad de la suma: "En cualquier ruta lineal que podamos considerar en el sistema metabólico - que estudiamos se cumplirá que la suma de todos los Coeficientes de control es la unidad".

Si hacemos a continuación los mismos cambios en las enzimas E_i^2 y E_i (segunda ruta convergente y tramo común correspondiente) llegamos por los mismos razonamientos a una expresión análoga a la (4.2).

$$\sum_{i=1}^n C_{E_1^2}^F + \sum_{i=1}^n C_{E_i}^F = 1$$

Para una serie de cambios de este tipo en cada ruta convergentes obtendremos la serie de ecuaciones (4.3).

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^n C_{E_1^1}^F + \sum_{i=1}^n C_{E_i}^F &= 1 \\ \sum_{i=1}^n C_{E_2^1}^F + \sum_{i=1}^n C_{E_i}^F &= 1 \\ \sum_{i=1}^n C_{E_3^1}^F + \sum_{i=1}^n C_{E_i}^F &= 1 \\ \vdots & \\ \sum_{i=1}^n C_{E_i^n}^F + \sum_{i=1}^n C_{E_i}^F &= 1 \end{aligned} \quad (4.3)$$

De este conjunto de ecuaciones se sigue que:

$$\sum_{i=1}^n C_{E_1}^F = \sum_{i=1}^n C_{E_2}^F = \sum_{i=1}^n C_{E_3}^F = \dots = \sum_{i=1}^n C_{E_n}^F \quad (4.4)$$

que expresa la segunda parte del corolario de la Convergencia del control: "la suma de los Coeficientes de control del flujo para la enzima (C_E^F) de todas las enzimas de cada una de las rutas convergentes hasta el punto de convergencia es igual para el conjunto de todas ellas en cualquier situación metabólica".

4.2.2.3. Consecuencias metabólicas de la Convergencia del control.

El corolario de la Convergencia del control, que como se ha visto ha sido confirmado experimentalmente en un sistema metabólico in vitro, nos permite aproximarnos al mapa metabólico provistos de nuevos recursos para interpretar y entender cuantitativamente las relaciones entre los diversos subsistemas metabólicos que podamos definir en él. A la luz de estos principios conceptuales y en los métodos experimentales de la misma naturaleza que el descrito anteriormente es posible cuantificar, al menos in vitro, el peso relativo que sobre la regulación de un flujo metabólico determinado tienen las distintas rutas que converjan hacia un intermediario común.

La aplicación del corolario de la Convergencia del control al mapa metabólico conocido nos lleva a algunas conclusiones inmediatas.

Una inspección incluso superficial del mapa nos revela la existencia de varios intermediarios metabólicos que constituyen puntos de cruce de numerosas vías metabólicas, tanto sintéticas como degradativas. Quizás el más destacado sea el acetil-CoA, el cual ocupa una posición central entre numerosos procesos de principal importancia (glucólisis, β -oxidación, ciclo de los ácidos tricarbóxicos, síntesis y degradación de aminoácidos, etc.). Otros destacados podrían ser el ácido glutámico (degradación de Arginina, Prolina y Glutamina, o el succinil-CoA piruvato, lucosa-6-fosfato, α -cetoglutarato, etc.).

Pues bien, el corolario de la Convergencia del control nos dice que podemos elegir una ruta lineal cualquiera que pase por uno de esos puntos de encrucijada metabólica de tal manera que se cumplirá que la suma de los Coeficientes de control del flujo de las enzimas de dicha ruta sumarán la unidad. Pero además la suma de esos Coeficientes de control de cualquier rama convergente hasta el intermediario común será lo mismo que la de cualquier otra rama. Y así ocurrirá, que si en una situación metabólica dada, una de las múltiples rutas convergentes funciona de tal manera que su control sobre el flujo total es mínimo, esto supondrá que también será mínimo el control que cualquiera de las otras rutas convergentes tenga sobre el mismo flujo del sistema, residiendo la mayor parte del control del flujo en los pasos comunes. (Esquemas metabólicos 2 y 3 en la figura 4.12). Análogamente, si la situación es la inversa (el control residiendo principalmente en los tramos convergentes) los pasos comunes apenas tendrán entonces responsabilidad

sobre el control del flujo (Esquema 5 en la figura 4.12). La aplicación del corolario de la Convergencia del control y sistemas metabólicos complejos se ilustra en la figura 4.14.

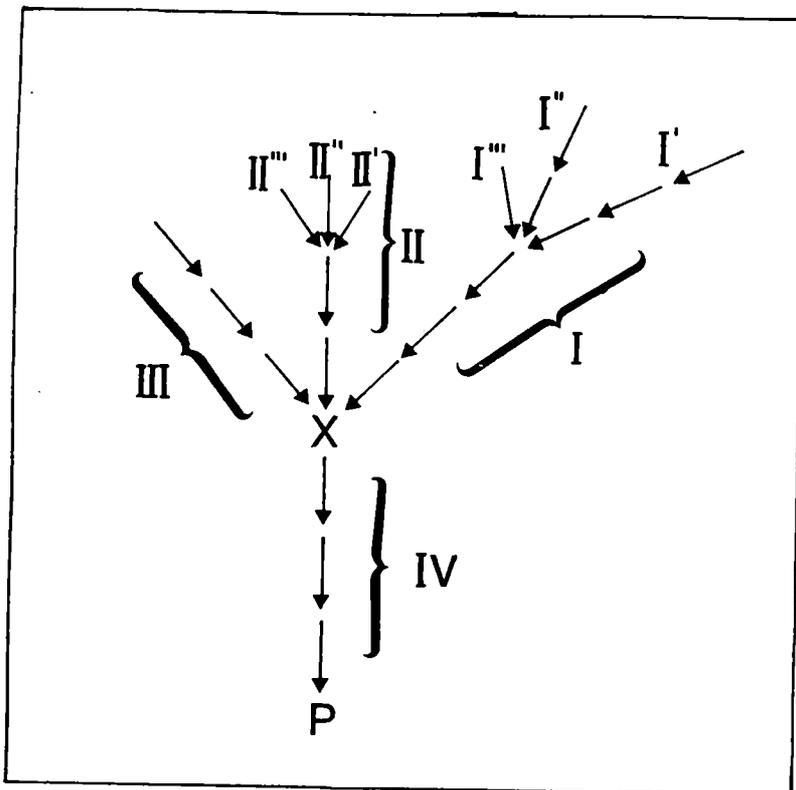


Fig. 4.14.- Aplicación del corolario de la Convergencia del Control a un sistema metabólico complejo.

El valor de la suma de los Coeficientes de control de la rama I es igual al de la rama II y al de la rama III, y suman con los Coeficientes de control de la rama IV la unidad.- En cada rama metabólica por su parte podrá aplicarse a su vez el corolario. Así, en la rama I la suma de los Coeficientes de control del flujo de las ramificaciones I', II'' y I''' serán iguales entre sí y suman con los del resto del tramo I y los del tramo IV la unidad. Lo mismo se aplica al tramo II.

Ya no es posible, pues, (nunca lo ha sido, pero ahora menos que nunca) ignorar que en los sistemas vivos la regulación de una ruta metabólica cualquiera, depende de lo que ocurra en cualquiera otra que tenga un intermediario común con ella (situación por lo demás muy generalizada), así como de lo que pueda ocurrir en la propia ruta metabólica.

Isoenzimas.

Otra consecuencia metabólica de interés se refiere al control sobre el flujo que tienen los sistemas de isoenzimas. Estos pueden ser entendidos como un caso particular de rutas convergentes en un punto, de tal manera que distintas enzimas (isoenzimas) catalizan una misma transformación para rendir un producto (intermediario metabólico) común (Figura 4.15).

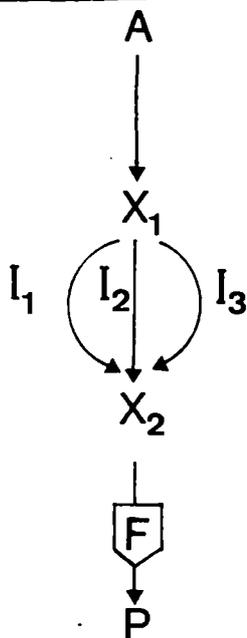


Fig. 4.15.- Aplicación del corolario de la Convergencia del Control a los sistemas isoenzimáticos.

Las reacciones catalizadas por las isoenzimas I_1 , I_2 e I_3 que transforman en X_2 sus sustratos (el mismo para los tres) son rutas convergentes en X_2 .

La aplicación de la Convergencia del control a esta situación nos lleva a la conclusión de que todas las isoenzimas tienen el mismo Coeficiente de control sobre el flujo del sistema. Se trata de rutas convergentes en un punto, aunque se dé la circunstancia de que el sustrato de todas ellas sea el mismo:

$$C_{I_1}^F = C_{I_2}^F = C_{I_3}^F$$

Contemplado desde otro punto de vista llegamos a la misma conclusión. El Coeficiente de control del flujo para la enzima, en el caso de una ruta lineal viene dado, según se ha visto en la Parte I, por la expresión:

$$C_E^F = \frac{C_1^F - F}{F}$$

cuando:

$$F = \frac{C_1' e}{C_2' + e}$$

donde C_1' representa el flujo máximo que se obtiene al liberar la transformación que se estudia de toda limitación cinética. Puesto que en este caso la transformación es común a todas las isoenzimas, C_1' será el mismo para todas ellas y por lo tanto todas tendrán el mismo Coeficiente de control. Prácticamente ya hicimos uso de esto cuando en los experimentos de titulación empleábamos enzimas de cualquier fuente biológica (es decir, isoenzimas en sentido amplio).

No obstante, a pesar de tener el mismo Coeficiente de control, puesto que las isoenzimas tienen distintas K_M (en general valores diferentes de las constantes individuales de velocidad y afinidad para distintos ligandos) la síntesis de una determinada cantidad de una de las isoenzimas produce distintos efectos sobre la redistribución del control que la síntesis de la misma cantidad de otra. No debemos, tampoco, olvidar que el Coeficiente de control del flujo para la enzima es uno de los Coeficientes que es preciso conocer para alcanzar una imagen completa de la regulación de cualquier sistema. Junto a los citados Coeficientes de control, los Coeficientes de elasticidad son imprescindibles para escribir la regulación de una ruta metabólica. Las distintas formas isoenzimáticas, al tener valores de K_M diferentes tendrán en general Coeficientes de elasticidad para sus sustratos y productos. Lo mismo ocurrirá con sus elasticidades para otros ligandos. Elasticidades y Coeficientes de Control están, por otra parte, relacionados entre sí por la Propiedad de la suma y la Distribución de la respuesta. Diferentes proporciones de isoenzimas en una ruta metabólica tienen, por lo tanto regulaciones diferentes.

4.4.2.4. Generalización de la Propiedad de la suma.

La Propiedad de la suma, descrita por Kacser y Burns, junto con el corolario de la Convergencia del control que hemos descrito antes, nos permiten aproximarnos al mapa metabólico con los recursos conceptuales precisos para estudiar el control de cualquier ruta metabólica que en él podamos considerar y comprender el alcance exacto de la información que se derive de dicho estudio.

El estudio de la regulación de cualquier ruta metabólica exige, primeramente, definir la ruta en cuyo control estamos interesados. Esta definición implica la elección de un punto de partida (uno sólo) aunque dicho punto inicial pueda ser cualquier intermediario metabólico, intra o extracelular, y de un flujo final de dicha ruta. No hay ninguna limitación respecto a la existencia de ramas divergentes que desvíen parte de los intermediarios hacia un producto final diferente de aquel cuya velocidad de formación constituye nuestro flujo de referencia. Así definido el sistema metabólico, la Propiedad de la suma nos dice que la suma de todos los Coeficientes de control del flujo para la enzima es la unidad, pudiendo existir enzimas cuyos Coeficientes de control tengan valores negativos (enzimas que desvíen algún intermediario de la ruta hacia productos finales distintos del final conside-

rado). Si elegimos cualquier otro punto de partida de forma que el nuevo sistema metabólico, tenga el mismo flujo dp/dt de referencia, encontraremos que de nuevo se cumple la Propiedad de la suma, cumpliéndose además, que si el nuevo sistema metabólico coincide con el primero en el tramo final, la primera parte del mismo constituye una ruta convergente y por tanto la suma de sus Coeficientes de control es la misma - que la de los correspondientes del primer tramo de la ruta inicialmente considerada (Convergencia del control). Esto queda ilustrado en la figura 4.16.

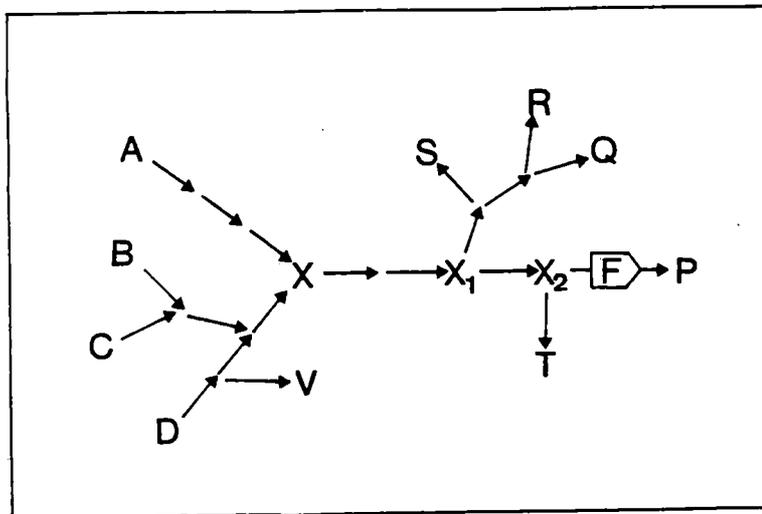


Fig. 4.16 - Aplicación de la Propiedad de la suma y del Corolario de la Convergencia del control al mapa metabólico.

En un mapa metabólico se define una ruta metabólica eligiendo un punto de partida y un flujo final de referencia. Así, en el sistema representado en la figura es posible definir varias rutas metabólicas. Una de ellas podría ser la que empieza en A y termina en P incluyendo a las ramificaciones -- que conducen a los productos Q, R, S y T. Para dicha ruta, la suma de todos los Coeficientes de control es la unidad. Las enzimas que catalizan la transformación de X_1 en Q, R y S y las que transforman X_2 en T tendrán Coeficientes de control negativos. A partir de D y hasta P se puede definir otra ruta metabólica. En este caso los Coeficientes de control de las enzimas que van desde D hasta X (incluyendo la que produce V) suman lo mismo que los Coeficientes de control de las enzimas que conducen de A a X. Otra ruta metabólica que podríamos -- considerar es la que va de A a Q. Para este caso los razonamientos anteriores se aplican igualmente.

Al aproximarnos de esta forma al mapa metabólico se hace evidente que para responder a la pregunta sobre la importancia reguladora de una determinada enzima, es preciso dejar bien establecido de qué ruta se trata, señalando el producto final de la misma y las posibles ramificaciones divergentes que pueda presentar, ya que definido un producto final al que se llega mediante varios sustratos alternativos, el Coeficiente de control de una enzima determinada es el mismo para todas las rutas que pasen por ella. Una enzima dada, pues, tendrá un control mayor o menor sobre el flujo según el sistema metabólico del que forme parte. Pero además, dicho control será diferente según el estado metabólico que consideremos, según el órgano o tejido en el que dicha transformación global esté ocurriendo y finalmente según el organismo de que se trate. Así la fosfofructoquinasa, por ejemplo, tiene un control importante en la regulación de la glicolisis desde glucosa a lactato en eritrocito de mamífero (Heinrich y Rapoport, 1974, a, b y c), pero esa misma enzima probablemente tendrá distinta relevancia en el control del flujo de urea en la ruta que va desde la glucosa a dicho producto final en el hígado normal de mamíferos.

Los Coeficientes de control del flujo para la enzima son, pues, Coeficientes relativos y ocasionales que dependen del sistema metabólico, que se considere; de la situación metabólica en la que dicho sistema se encuentre, así como del órgano o tejido y de la especie de que se trate.

5. PARTE III. Consecuencias teóricas y prácticas de la Cinética - de rutas metabólicas.

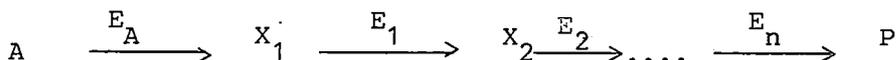
5.1. Concepto de constante de Michaelis de una ruta metabólica:
 ϕ_M .

Los estudios cinéticos de enzimas individuales han conseguido - aportar un conjunto de valiosa información sobre el comportamiento de cada enzima con respecto a múltiples variables. Ahora bien, el siguiente paso, la integración de todos estos datos en un sistema complejo para obtener una función explícita del flujo de la ruta metabólica, supone el planteamiento de ecuaciones cinéticas complejas de difícil o imposible solución explícita. Sin embargo, una forma de resolver esta - cuestión es el estudio cinético global del proceso con métodos similares a los de la cinética enzimática clásica, con la diferencia de que donde antes se estudiaban transformaciones individuales ahora se estudian transformaciones globales. Este planteamiento se denomina Cinética de rutas metabólicas.

La cinética de rutas completas suministra información global de la ruta, de tal manera que cuando se perturba un paso en concreto el - dato que se obtiene está referido al sistema completo, pues indica el efecto global sobre el flujo, no sobre la velocidad de un paso.

5.1.1. Teoría.

Para desarrollar nuestro modelo, consideraremos una ruta metabólica lineal semejante a la descrita anteriormente:



Cuando dicho sistema metabólico alcance el estado estacionario, la ecuación de velocidad de cada paso vendrá dada, como ya se ha visto, por la ecuación:

$$v_i = \frac{\frac{v_i}{K_i} (x_i - \frac{x_{i+1}}{K_{eq}^i})}{1 + \frac{x_i}{K_i} + \frac{x_{i+1}}{K_{i+1}}} \quad (5.1)$$

En el caso particular de que sea la primera enzima de la ruta, - la ecuación anterior tomará la forma:

$$v_a = \frac{\frac{v_A}{K_A} (a - \frac{x_1}{K_{eq}^A})}{1 + \frac{a}{K_A} + \frac{x_1}{K_1}} \quad (5.2)$$

Hasta este momento no hemos hecho otra suposición que la de admitir un comportamiento michaeliano de las enzimas de la ruta y de la primera en particular. Damos entrada ahora a una segunda y más trascendental premisa. Supondremos que la ruta metabólica en conjunto se comporta como una enzima michaeliana; es decir, el flujo que la atraviesa guarda con relación a la concentración del sustrato del sistema una relación hiperbólica de tal manera que el valor del flujo para cada concentración dada del sustrato X_0 viene dado por la ecuación siguiente:

$$F = \frac{\frac{F_{MX}}{\phi_A} \left(a - \frac{p}{K_{eq, A, n}} \right)}{1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P}} \quad (5.3)$$

Obsérvese que para el caso de flujo inicial ($p=0$) esta expresión queda reducida a una ecuación semejante a la de Michaelis.

$$F = \frac{F_{MX} \cdot a}{\phi_A + a}$$

En la ecuación (5.3) F_{MX} representa el flujo máximo del sistema, en el mismo sentido que la V_{MX} de cualquier enzima: el flujo que atraviesa el sistema cuando éste se encuentra saturado por su sustrato A. ϕ_A simboliza la "constante de Michaelis" del sistema para el sustrato A. Representa la concentración del sustrato que produce un flujo inicial, la mitad del flujo máximo F_{MX} . De la misma manera ϕ_P representa la constante de Michaelis del sistema para el producto P.

Al plantear esta segunda hipótesis, estamos ahondando en la analogía entre el comportamiento de una enzima aislada y el que manifiesta un sistema metabólico completo. Ciertamente, lo que distingue a -- una analogía posiblemente justificada de otra fortuita es la naturaleza relativamente profunda o superficial de las relaciones que sugiere. Al hacer esta suposición sospechamos que una profundización en las consecuencias de este planteamiento podrá revelar la existencia de un isomorfismo entre los conceptos que se manejan al describir la cinética de una enzima individual y los que se puedan definir al tratar con rutas metabólicas completas. Por otra parte, la idea de un comportamiento michaeliano en una ruta metabólica tiene algunos antecedentes.

A.K.Groën(1982) parte de la misma premisa para determinar el -- Coeficiente de control del flujo de la PEP-Carboxikinasa en la ruta -- gluconeogénica en hepatocito de rata, por medio del uso de inhibidores a partir de los datos experimentales aportados por Rognstad(1979) y Akerboom (1979) para la inhibición por 3-mercaptopicolinato.

J.A. Burns(1968,1969) describe un sistema consistente en una cadena de 5 enzimas cuyo flujo se computó en un rango de concentraciones del sustrato inicial A. El flujo mostró crecer a medida que aumentaba a hasta alcanzar un valor máximo que permanecía constante al aumentar de nuevo a.

Para los sistemas que se comporten así, dispondremos, pues, de una expresión para el flujo que podemos utilizar junto con las características individuales de sus enzimas para indagar sobre los parámetros-locales y sistémicos.

En la Teoría del Control se definen, además de los Coeficientes de control, C_E^F y C_Q^F , los coeficientes de elasticidad ϵ_Q^v tal como se ha descrito. Una relación importante entre éstos es:

$$C_Q^F = C_E^F \cdot \epsilon_Q^v$$

Esta relación expresa que para predecir la variación que experimenta el flujo de un sistema metabólico al variar la concentración de un efector de una enzima particular, q , (sustratos, productos, inhibidores, etc.) no basta con conocer el efecto que dicho efector provoca sobre la velocidad del paso en cuestión, la elasticidad ϵ_Q^v (coeficiente local) sino que es preciso conocer al mismo tiempo el valor del Coeficiente de control del flujo C_E^F (coeficiente global).

En nuestro caso, el efector bajo consideración será el propio sustrato de la ruta A y la elasticidad que habrá que examinar será la de la primera enzima respecto de su sustrato: ϵ_A^{vA} . De la misma forma que se ha demostrado la Propiedad de la Distribución de la respuesta, referida a un efector (pág. 14) puede demostrarse:

$$C_A^F = C_{E_A}^F \cdot \epsilon_A^{vA} \quad (5.4)$$

Puesto que disponemos de una ecuación del flujo F en función de a y de otra para la velocidad del primer paso también en función de a podremos hacer uso de la ecuación (5.4) para obtener el Coeficiente de control del flujo para la primera enzima.

$$C_{E_A}^F = \frac{C_A^F}{\epsilon_A^{vA}}$$

De la ecuación (5.3) tenemos (Véase para lo que sigue el Apéndice C):

$$\frac{\partial F}{\partial a} = \frac{F_{MX} - F}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right)}$$

y puesto que:

$$C_A^F = \frac{\partial F}{\partial a} \cdot \frac{a}{F}$$

$$C_A^F = \frac{F_{MX} - F}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right)} \cdot \frac{a}{F} \quad (5.5)$$

Expresión del Coeficiente de control C_A^F de nuestra ruta metabólica para el sustrato A.

Por otra parte, aplicando la definición de $\epsilon_A^{v_A}$

$$\epsilon_A^{v_A} = \frac{\partial v_A}{\partial a} \cdot \frac{a}{v_A}$$

tenemos:

$$\epsilon_A^{v_A} = \frac{V_A - v_A}{K_A \left(1 + \frac{a}{K_A} + \frac{x_i}{K_{X_i}}\right)} \cdot \frac{a}{v_A} \quad (5.6)$$

La expresión del Coeficiente de control del flujo se obtiene entonces fácilmente.

$$C_{E_A}^F = \frac{\frac{F_{MX} - F}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P}\right)} \cdot \frac{a}{F}}{\frac{V_A - v_A}{K_A \left(1 + \frac{a}{K_A} + \frac{x_1}{K_{X_1}}\right)} \cdot \frac{a}{v_A}} \quad (5.7)$$

y puesto que en el estado estacionario la velocidad de cada paso coincide con el valor del flujo a través del sistema ($v_A = F$) la ecuación (5.7) se simplifica:

$$C_{E_A}^F = \frac{(F_{MX} - F) K_A \left(1 + \frac{a}{K_A} + \frac{x_1}{K_{X_1}}\right)}{(V_A - F) \phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P}\right)} \quad (5.8)$$

Si suponemos ahora que ni el producto de la ruta P ni el de la primera enzima X_1 saturan significativamente ($p/\phi_P \approx 0$ y $x_1/K_{X_1} \approx 0$) la ecuación (5.8) se reduce a:

$$C_{E_A}^F = \frac{(F_{MX} - F)(K_A + a)}{(V_A - v_A)(\phi_A + a)} \quad (5.9)$$

La ecuación (5.9) rinde finalmente una expresión para el Coeficiente de control del flujo de la primera enzima de la ruta E_A en función de parámetros sistémicos tales como F_{MX} y ϕ_A y de parámetros locales: V_A y K_A . Esta ecuación muestra también la dependencia que tiene $C_{E_A}^F$ de la concentración del sustrato a , permitiéndonos, una vez verifi

cada la aplicabilidad del desarrollo teórico, la determinación del Coeficiente de control del flujo por otro método diferente al ya descrito, implicando premisas distintas y sobre la base, únicamente, de medidas de flujos y actividades enzimáticas.

El desarrollo expuesto nos capacita además para determinar el valor del otro Coeficiente de control C_A^F y el de Elasticidad ξ_A^{VA} . (Ecuaciones (5.5) y (5.6)).

Nos proponemos, pues, comprobar la aplicabilidad del modelo - descrito a un sistema experimental in vitro, de forma que a partir del conocimiento de las constantes cinéticas particulares y globales y de las medidas de flujos y actividades enzimáticas obtengamos los Coeficientes de control y Elasticidad anteriormente citados, en especial el Coeficiente de control del flujo C_{E_A} , a diferentes concentraciones del sustrato. Compararemos entonces los valores de los Coeficientes de control del flujo así obtenidos con los que se obtengan por el método de titulación.

5.1.2. Sistema Experimental.

El sistema experimental elegido para estos experimentos fue - el mismo empleado anteriormente y descrito en la Parte I (apartado 3.2) (pág. 27). La linealidad de la ruta y el carácter michaeliano de las enzimas ya han quedado por lo tanto establecidos.

Conviene, no obstante, resaltar un hecho que hace a este sistema especialmente idóneo para los fines que nos ocupan. Además de las razones expuestas en 3.2 (pág. 27), el hecho de que la hexoquinasa hepática tenga una constante de Michaelis para la glucosa, sustrato de la ruta, de 10 mM en nuestras condiciones resulta particularmente conveniente al permitir la realización de medidas experimentales a distintos grados de saturación para la primera enzima y por ende para la ruta. - Un sistema con una constante de Michaelis de la primera enzima del rango 1 mM, situación muy frecuente, únicamente nos permitiría, por razones experimentales, estudiar el funcionamiento del sistema a niveles saturantes obligándonos a dejar inexplorados rangos de saturación inferiores, e imposibilitándonos así el estudio de los Coeficientes de control y Elasticidad en esas condiciones.

5.1.3. Materiales y métodos.

Al ser el sistema experimental el mismo que se usó anteriormente, los métodos empleados fueron idénticos a los descritos en la Parte I. Las muestras se obtuvieron y prepararon a partir de la misma fuente y por los mismos procedimientos. Las actividades enzimáticas y la concentración de proteínas se analizaron en cada extracto de la misma forma que se describió en 3.3.2. Instrumentos y reactivos fueron también los mismos.

Los Coeficientes de control del flujo se obtuvieron, a las distintas concentraciones de sustrato ensayadas (5, 20 y 100 mM de glucosa), tanto a partir de experimentos de titulación como de las expresiones obtenidas en el apartado de Teoría (4.1.1), empleando en este caso los valores experimentales de flujos y actividades enzimáticas.

5.1.3.1. Determinación de los Parámetros cinéticos de la ruta: ϕ_A y F_{MX} .

Para determinar la constante de Michaelis de la ruta y el F_{MX} se siguió el mismo criterio que en las determinaciones de las constantes de Michaelis y V_{MX} de las enzimas individuales: los experimentos de titulación con glucosa se llevaron a cabo en el mismo "medium" del sistema en los experimentos de titulación ya descritos (Apart. 3.3.2.6, B pág. 45). Únicamente diferían de aquellos en la concentración de glucosa, la cual varió entre 1 y 100 mM.

La constante de Michaelis y el F_{MX} se obtuvieron a partir de representación de Eadie-Hofstee. Las medidas se repitieron cuatro veces y los puntos obtenidos experimentalmente se ajustaron por mínimos cuadrados.

5.1.4. Resultados y discusión.

5.1.4.1. Parámetros de la ruta, Coeficientes de control y Elasticidad.

La Fig. 5.1. muestra los valores de F frente a la concentración de glucosa. La respuesta del flujo a la variación en la concentración de glucosa hace buena en principio, la hipótesis sobre el carácter michaeliano de la ruta.

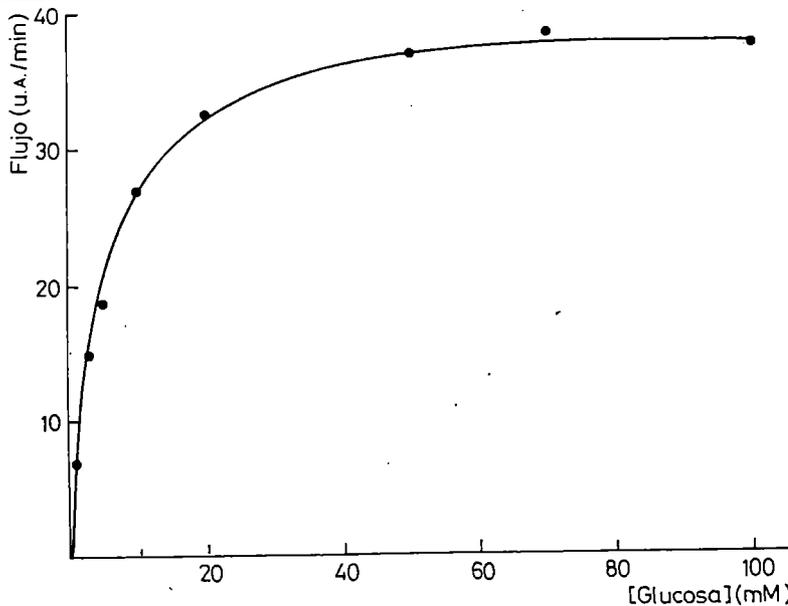


Fig. 5.1.- Titulación del sistema Glucosa \rightarrow glicerol fosfato con glucosa como sustrato variable.

El flujo muestra una relación hiperbólica respecto al sustrato. La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 2 ml, 100 μ l del extracto, 1 mM de ATP y la concentración de glucosa correspondiente al experimento de que se trataba. Las otras condiciones de los ensayos se describen en el apartado

En la Fig.5.2 se representan los valores de F frente a $F/[glucosa]$. Se obtiene una recta con una buena linealidad (coeficiente de regresión de 0.99) lo cual confirma la relación hiperbólica mostrada en la figura 5.1. De esta representación se obtienen los valores de F_{MX} y ϕ_A que aparecen en la Tabla 5.1

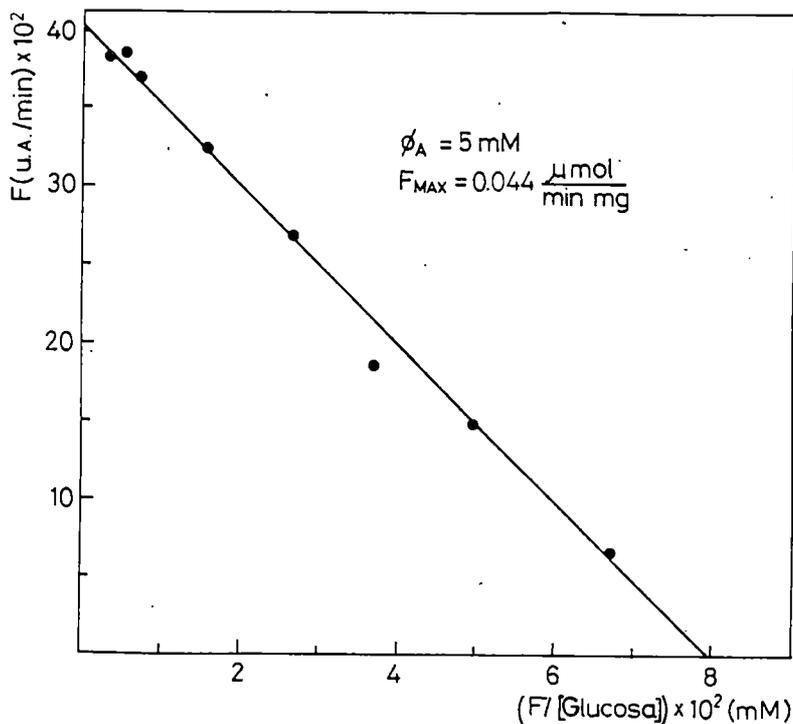


Fig. 5.2.- Representación de F frente a $F/[glucosa]$.

Los datos de la figura 5.1 se llevan a esta representación, obteniéndose de ella los valores de F_{MAX} y ϕ_A . F_{MAX} es la intersección con la ordenada; ϕ_A es la pendiente de la recta.

ϕ_A	F_{MX}
5 ± 0.31	$0.044 \pm 2.2 \cdot 10^{-3}$

TABLA 5.1.- Parámetros cinéticos globales de la ruta metabólica: ϕ_A (mM) y F_{MX} ($\mu\text{moles}/\text{min} \cdot \text{mg}$ proteína). Los datos son medias \pm S.D. de cuatro experimentos.

Antes de continuar con el procesamiento de estos datos junto con los otros necesarios merece la pena que hagamos un breve comentario sobre la magnitud del valor observado de la "constante de Michaelis" de la ruta ϕ_A . Como se ve, ϕ_A es justamente la mitad del valor de la constante de Michaelis de la glucoquinasa. Esto significa que la afinidad de la ruta metabólica considerada por la glucosa ha aumentado respecto a la que se observa cuando se estudia a la glucoquinasa aisladamente.

No obstante, ambos valores no son inmediatamente comparables. La K_M de la glucoquinasa en las condiciones en las que se desarrolla la ruta metabólica no es la misma que la que se midió estudiando a la enzima individualmente. La K_M de la glucoquinasa se valora en condiciones de velocidad inicial, esto es, sin acumulación significativa del producto, G6P. En el sistema metabólico completo la G6P normalmente alcanzará una concentración significativa y por ello su K_M (aparente, por supuesto) tendrá un valor diferente.

Sin embargo, estos hechos nos llevan a revisar, a la luz de este nuevo enfoque, ciertos análisis metabólicos. Cuando se estudia el papel regulador que desempeña el hígado sobre la concentración de glucosa sanguínea, no será más acertado considerar el valor de la constante de Michaelis de la ruta glicolítica completa para la glucosa antes que el de la glucoquinasa aisladamente? Es evidente que el valor que adopta la primera no es independiente del de la segunda, pero quedarse en la inspección de la K_M de la enzima aislada puede llevar a errores. En nuestro caso, frente al valor 10 mM para la enzima aislada se presenta 5 mM. Las conclusiones que se deriven a partir de uno y otro pueden ser marcadamente diferentes. Recordemos que la concentración de la glucosa sanguínea es normalmente 5 mM, es decir, similar a la ϕ_A de la ruta metabólica que hemos analizado y justo en el rango de concentraciones en las que la sensibilidad del flujo a pequeños cambios en los valores de la concentración de glucosa es máximo.

Con los datos de ϕ_A y F_{MX} se está por lo tanto en condiciones de determinar, por medio de las ecuaciones (5.5) (5.6) y (5.9) (considerando despreciable la saturación por el producto tanto de la ruta como de la primera enzima) los Coeficientes de control y de elasticidad de E_A , a cualquier concentración del sustrato. Se eligieron 5, 20 y 100 mM correspondientes al 50%, 80% y 95% de saturación de la ruta respectivamente. Los resultados así obtenidos se muestran en la tabla 5.3. Estos son el resultado de procesar los datos que se muestran en la Tabla 5.2.

Los resultados indican que el Coeficiente de control del flujo de la hexoquinasa hepática decrece a medida que aumenta el grado de saturación de la ruta. Simultáneamente se produce un descenso en el valor del Coeficiente de elasticidad de la enzima en cuestión. La caída en el valor del Coeficiente de control del flujo para la hexoquinasa hepática deberá ir acompañado de un aumento de ese mismo Coeficiente en las otras enzimas del sistema, tal como impone la Propiedad de la suma.

	Concentración de glucosa			
	5 mM	20 mM	100 mM	
Flujo basal	$0.020 \pm 2.46 \cdot 10^{-3}$	$0.035 \pm 2.8 \cdot 10^{-3}$	0.040 ± 4.10^{-3}	
Otros parámetros				
	F_{MX}	ϕ_A	K_A	V_A
	$0.044 \pm 2.2 \cdot 10^{-3}$	5 ± 0.31	10 ± 0.8	0.07 ± 2.10^{-3}

TABLA 5.2.- Datos procesados de acuerdo con las ecuaciones -- (5.5), (5.6) y (5.9) considerando despreciables la saturación por el -- producto tanto de la ruta como de la primera enzima. Los flujos (basal y máximo) y V_A se expresan como $\mu\text{moles/min.mg}$ proteína. ϕ_A y K_A vienen dados en unidades mM. Todos los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos.

Glucosa	% Saturación	C_A^F	$\epsilon_A^{V_A}$	C_{EA}^F
5 mM	50%	0.60 ± 0.042	0.83 ± 0.037	0.72 ± 0.05
20 mM	80%	0.20 ± 0.012	0.66 ± 0.02	0.30 ± 0.024
100 mM	95%	0.095 ± 6.10^{-3}	$0.67 \pm 6.8 \cdot 10^{-3}$	0.14 ± 7.10^{-3}

TABLA 5.3.- Coeficientes de control y elasticidad a distintos grados de saturación por glucosa. Los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos.

Al variar la concentración de glucosa, cambian los niveles de los intermediarios en cada estado estacionario. Esto provoca que las interacciones con los sustratos y productos de cada enzima varíen, lo cual se refleja cuantitativamente en la redistribución de los valores de los Coeficientes de control y Elasticidad.

5.1.4.2. Comparación de los Coeficientes de control del flujo.

Se determinaron, mediante el método de titulación con enzimas, el Coeficiente de control C_{EA}^F a 20 y 100 mM (los Coeficientes de Control con glucosa 5 mM ya se habían determinado en la Parte I). La figura - 5.3 muestra los resultados obtenidos a 20 mM.

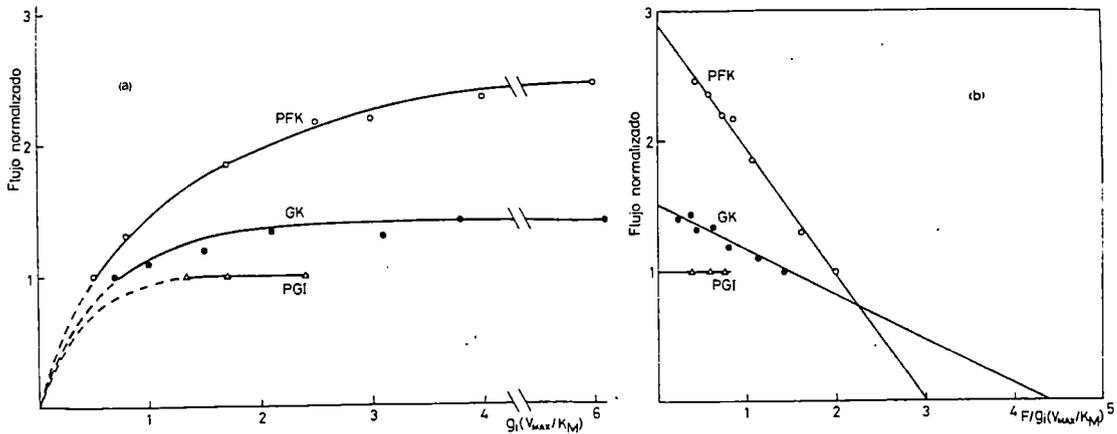


Fig. 5.3.- Resultados de la titulación con hexoquinasa (●), fosfofructoquinasa (O) y fosfoglucoisomerasa (Δ) a 20 mM de glucosa.

a) Representación de flujos frente a g_i . El primer punto de cada curva representa el valor normalizado del flujo, medido sin ninguna enzima añadida (salvo las auxiliares), con sólo las enzimas del extracto presentes. La fosfoglucoisomerasa sigue sin mostrar responsabilidad en el control del flujo; distribuyéndose la totalidad de dicho control entre la glucoquinasa y la fosfofructoquinasa. Pero a diferencia de lo que ocurría a 5 mM ahora recae la mayor parte del control sobre la fosfofructoquinasa. La actividad de las hexoquinasas está multiplicada por 10^2 para ampliar la curva. Lo mismo que en casos anteriores, los tramos discontinuos han sido trazados arbitrariamente.

b) Representación de F frente a F/g_i . De la intersección con el eje de ordenadas se obtiene C_1' . C_2' es la pendiente de la recta. Los Coeficientes de control del flujo se obtienen de acuerdo con la expresión $C_E^F = \frac{C_1' - 1}{C_1'}$. Los valores de la actividad enzimática de la hexoquinasa se han multiplicado por 10^2 en esta representación.

En la tabla 5.4 se muestran los Coeficientes de control del flujo obtenidos a 20 mM de glucosa.

Enzima	C_1^F	C_2^F	$C_{E_1}^F$
Glucocuinasa	1.49 ± 0.09	$0.034 \pm 3.06 \cdot 10^{-3}$	0.33 ± 0.021
Fosfoglucoquinasa	1.00	—	0.00
Fosfofructoquinasa	2.89 ± 0.175	$0.95 \pm 3.5 \cdot 10^{-3}$	0.65 ± 0.05
Sumas de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F)$			0.98 ± 0.07

TABLA 5.4.- Coeficientes de control del flujo para la enzima - obtenidos a 20 mM de glucosa en experimentos de titulación con enzima.- Las actividades enzimáticas basales fueron las mismas que se describen en la tabla 3.6. Los valores de C_1^F se normalizaron haciendo 1 el flujo del sistema sin enzimas añadidas. El flujo basal fue $0.035 \pm 2.8 \cdot 10^{-3}$ μ moles/min.mg proteína. Todos los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos. Tal como se espera de la teoría, la suma de todos los -- Coeficientes de control del flujo para la enzima está próxima a la unidad.

Los resultados obtenidos al titular con enzimas a 100 mM de glucosa se muestran en la Figura 5.4 (pág. 102 y en la tabla 5.5.

Enzimas	C_1^F	C_2^F	$C_{E_1}^F$
Glucocuinasa	1.39 ± 0.09	0.028 ± 2.10^{-3}	0.28 ± 0.015
Fosfoglucoisomerasa	1.00	—	0.00
Fosfofructoquinasa	3.06 ± 0.21	1.01 ± 0.08	0.67 ± 0.05
Suma de $C_{E_i}^F : (\sum C_{E_i}^F)$			0.95 ± 0.038

TABLA 5.5.- Coeficientes de control del flujo para la enzima obtenidos al titular con enzima a 100 mM de glucosa. Las actividades enzimáticas basales fueron las mismas que se describen en la tabla 3.6. - Los valores C_1^F y C_2^F se normalizaron respecto al valor del flujo basal, que fue 0.040 ± 4.10^{-3} μ moles/min.mg proteína. Los Coeficientes de control del flujo para la enzima suman también en este caso aproximadamente la unidad. Los valores son medias \pm S.D. de tres experimentos se parados.

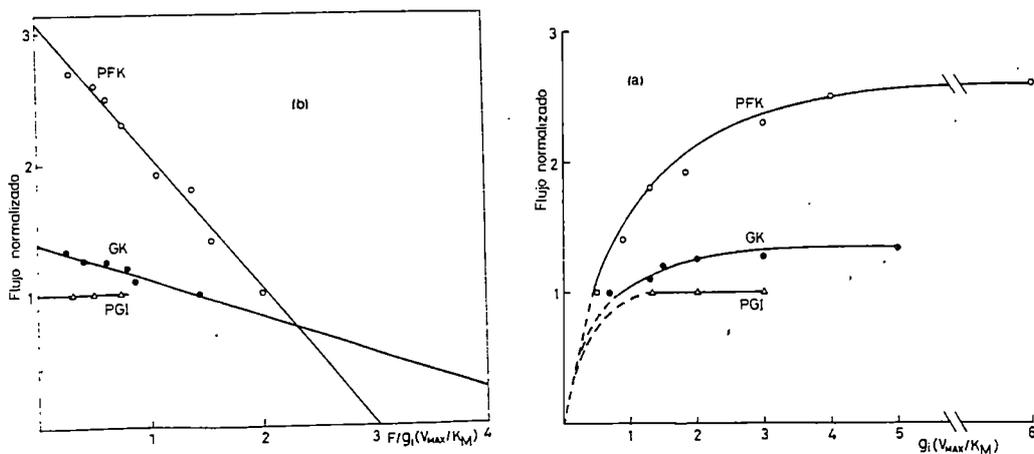


Fig. 5.4.- Resultados de los experimentos de titulación con hexoquinasa(●), fosfofructoquinasa(O) y fosfoglucoisomerasa(Δ) a 100 mM de glucosa.

a) Representación de F frente a g_i . El valor 1 del flujo corresponde al flujo basal normalizado, con únicamente las enzimas del extracto más las auxiliares presentes en el medio. La tendencia observada a 20 mM se ve confirmada en estos nuevos experimentos. La fosfofructoquinasa continúa siendo la máxima responsable del flujo a través del sistema, residiendo el resto del control en la glucoquinasa. Las líneas discontinuas se han trazado arbitrariamente correspondiendo al rango de actividades enzimáticas de valores inferiores a los contenidos en el extracto. La actividad de la glucoquinasa está multiplicada por 10^2 .

b) Representación de F frente a F/g_i . Esta representación nos rinde los nuevos valores de C_1' y C_2' , a partir de los cuales se pueden calcular los Coeficientes de control del flujo para la enzima. Los valores de la actividad enzimática de la glucoquinasa se han multiplicado por 10^2 .

Finalmente, la tabla 5.6 muestra a efectos comparativos, los Coeficientes de control del flujo para la glucoquinasa en las distintas condiciones ensayadas, obtenidos por el método de titulación y a partir del modelo desarrollado en esta segunda parte. $(C_{EA}^F)_\emptyset$ representa los valores obtenidos por este último procedimiento y $(C_{EA}^F)_C$ a los obtenidos a partir de las medidas de C_1' .

Glucosa	$(C_{E_A}^F)_C$	$(C_{E_A}^F)_\emptyset$
5 mM	0.77	0.72
20 mM	0.33	0.30
100 mM	0.28	0.14

TABLA 5.6.- Comparación de los valores de $C_{E_A}^F$ para la glucoquinasa obtenidos al titular con hexoquinasa y a partir del modelo desarrollado anteriormente. $(C_{E_A}^F)_C$: Coeficientes de control del flujo para la glucoquinasa obtenidos por el procedimiento de titulación. $(C_{E_A}^F)_\emptyset$: Valores de esos mismos Coeficientes por el procedimiento alternativo.

Los resultados indican que existe una buena concordancia entre ambas series de valores, lo cual constituye una evidencia de la validez del método de titulación por una parte y de la aplicabilidad de los modelos teóricos desarrollados en las partes I y III por otra. Sugieren además que el sistema experimental puede ser empleado para indagar sobre la relación entre las diferentes distribuciones de los Coeficientes de control y los diferentes grados de saturación del sistema a través del análisis detallado de los niveles de intermediarios, constantes cinéticas de las enzimas individuales y de las interacciones entre unos y otros. Ello permitiría, de un lado profundizar en el conocimiento de los mecanismos que protagonizan la regulación de este sistema metabólico particular y de otro en la relación entre los factores ambientales del sistema y los Coeficientes de control y Elasticidad.

Este planteamiento cuantitativo del problema de la regulación de los sistemas metabólicos contribuye poderosamente a establecer teórica y experimentalmente la visión dinámica de la regulación del metabolismo frente a la imagen congelada que generalmente impera de estos procesos.

5.2. Nueva definición de enzima auxiliar(*).

El concepto de enzima auxiliar es, para el bioquímico dedicado al estudio de la regulación metabólica (y para los demás también), un concepto elemental del que hace uso rutinario en el laboratorio, desde el momento en que las enzimas comerciales purificadas se utilizan como reactivos específicos para análisis. Una enzima auxiliar se define ha

(*) Empleamos el adjetivo auxiliar entendiendo que también nos referimos con él a las denominadas enzimas indicadoras. Se refiere este último término a aquellas auxiliares que transforman sustancias que experimentan cambios en sus propiedades ópticas al sufrir la transformación, permitiendo dichos cambios seguir ópticamente la cinética de la reacción.

bitualmente como aquella que cataliza una reacción acoplada a otra en cuya cinética estamos interesados y que se encuentra en suficiente exceso como para garantizar que siendo mínimo el tiempo preciso para alcanzar el estado estacionario la velocidad de la reacción completa sea razonablemente próxima a la de la reacción principal o dicho de otra manera que la cinética de la reacción acoplada sea de primer orden respecto del producto de la primera reacción.

Liberar a esta definición de los términos cualitativos y ambiguos (¿cuánta enzima es suficiente exceso? ¿cuánto es un tiempo razonablemente pequeño?) exige un análisis cuantitativo de cada caso particular de que se trate, comparando los cocientes:

$$\left(\frac{V_{MX}}{K_M}\right)_{\text{principal}} \quad \text{y} \quad \left(\frac{V_{MX}}{K_M}\right)_{\text{auxiliar}}$$

de tal modo que cuando:

$$\left(\frac{V_{MX}}{K_M}\right)_{\text{auxiliar}} \gg \left(\frac{V_{MX}}{K_M}\right)_{\text{principal}}$$

tendremos descritas las condiciones exactas para realizar el ensayo.

Lo que nos proponemos es dar una nueva definición de enzima auxiliar a la luz del enfoque aportado por la Teoría del Control de Flujos desarrollada por Kacser y Burns. Esta definición requerirá, para cada caso particular, un análisis previo, lo mismo que en la definición anterior, pero desde otro punto de vista y en algunos aspectos más simplificada.

Nuestra definición se limita a dar un número cuantificando el carácter de paso limitante y a partir de ahí el suficiente exceso: Una enzima auxiliar es aquella que cataliza el último o el primer paso de una ruta, con un Coeficiente de control de flujo para la enzima igual a cero.

En una ruta metabólica pueden haber varias enzimas auxiliares. En este caso, serán enzimas auxiliares todas aquellas que con Coeficiente de control de flujo nulo, estén seguidas o precedidas en la secuencia únicamente por enzimas auxiliares.

Esta definición es una aplicación práctica de la Teoría del control de flujos. Kacser y Burns han definido el Coeficiente de control del flujo $C_{E_i}^F$, como ya hemos visto, según la expresión:

$$C_{E_i}^F = \frac{dF/F}{dg_i/g_i} = \frac{dF}{dg_i} \cdot \frac{g_i}{F}$$

Este coeficiente expresa el cambio fraccional que experimenta el flujo F , que recorre una ruta cuando se produce un cambio fraccional infinitesimal en la actividad enzimática, descrita por el parámetro g_i .

Una propiedad de dichos coeficientes es la Propiedad de la suma la cual nos dice, como ya sabemos, que la suma de los coeficientes de control del flujo $C_{E_i}^F$ de todos los pasos de una ruta es la unidad. Una enzima cuyo coeficiente de control $C_{E_i}^F$ sea nulo no tiene ninguna responsabilidad sobre el control del flujo que atraviesa el sistema. Así si en una serie de, por ejemplo, tres reacciones enzimáticas sucesivas, las dos últimas tienen un Coeficiente de control del flujo nulo; entonces, el de la primera será $C_{E_1}^F = 1$. La primera enzima tendrá, pues, todo el control sobre el flujo del sistema de modo que variaciones en la actividad de la enzima (o en la concentración de la misma) se reflejarán linealmente en el flujo total permitiéndonos estudiar la cinética de dicha enzima o valorar su actividad.

Por otra parte, como también se ha visto, la dependencia del flujo de una ruta metabólica lineal respecto de la actividad de una de las enzimas de dicha ruta tiene la forma de una hipérbola cuadrada (Fig. 5.5).

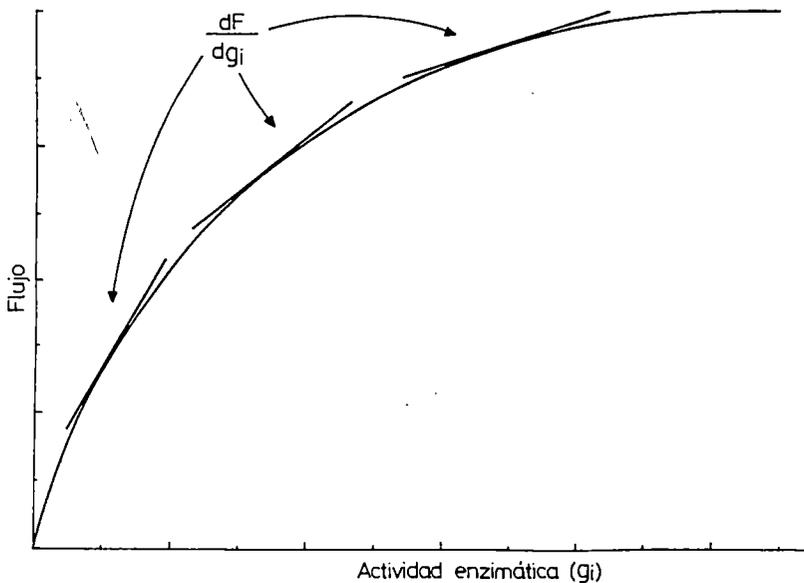


Fig. 5.5.- El flujo de la ruta metabólica responde de forma no lineal a cambios en el parámetro g_i de una de las enzimas. Los mismos cambios fraccionales en la enzima en diferentes puntos tienen efectos diferentes sobre el flujo.

La simple inspección de esta curva nos muestra que a medida que g_i aumenta, el coeficiente $C_{E_i}^F$ se va haciendo progresivamente menor -- hasta que a partir de cierto valor de g_i prácticamente no hay variación del flujo frente a posteriores adiciones de g_i . En otras palabras, a partir de cierto valor de g_i podemos decir que $C_{E_i}^F = 0$. Ese valor de

g_i , en unidades de actividad enzimática, depende de como éste construyó el sistema y puede ser determinado experimentalmente (Partes I y II).

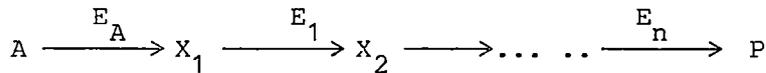
En los sistemas experimentales descritos en las Partes I y II - hemos hecho ya uso de este concepto y definición. Así ha sido cuando expresamente hemos añadido a la mezcla de reacción 0.66 unidad/ml de -aldolasa, 3.33 unidades/ml de triosafosfatoisomerasa y 2 unidades/ml de α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, con el fin de garantizar que los C_{F_i} de cada una de ellas se hicieran nulos. Esto nos permitía, entre otras cosas, centrar la discusión sobre la distribución de los Coeficientes de control del flujo en los pasos anteriores. Aldolasa, triosafosfatoisomerasa y α -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa fueron enzimas auxiliares porque no tenían ningún control sobre el flujo que atravesaba el sistema, y porque constituyen el tramo final de la ruta. No ocurre así, sin embargo con la PGI que aunque nuestros resultados muestran que su coeficiente de control es nulo, no es una enzima auxiliar al estar seguida en la secuencia por la PFK que tiene un Coeficiente de control significativo.

La Teoría del control de flujos metabólicos muestra de esta manera su capacidad en orden a cuantificar una importante parcela del lenguaje bioquímico, al permitirnos revisar y reformular uno de los conceptos prácticos de mayor uso en cualquier laboratorio dedicado al estudio de la regulación metabólica.

6. Apéndices.

6.1. Apéndice A.

En este apéndice consideraremos en detalle la aplicación de ciertos aspectos de la Teoría del control de flujos al caso particular de una cadena de enzimas (no saturadas primero; con saturación significativa después) $E_A, E_1, E_2, \dots, E_n$ que llevan a cabo la transformación de un sustrato A en un producto final P, a través de sucesivos productos intermedios: $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$. La estructura metabólica de este sistema se representa en el esquema siguiente:



Es posible resolver el sistema de ecuaciones diferenciales que describe el sistema metabólico, y así obtener una expresión explícita para el flujo en términos de los parámetros enzimáticos y ambientales. La ecuación (A.1) expresa la velocidad de una reacción reversible catalizada por una enzima (Alberty, 1959; véase también Cleland, 1963).

$$v_i = \frac{\frac{V_i}{K_i} \left(\bar{x}_i - \frac{x_{i+1}}{K_{eq}^i} \right)}{1 + \frac{x_i}{K_i} + \frac{x_{i+1}}{K_{i+1}}} \quad (A.1)$$

Modelo A.1: Enzimas sin saturación significativa (Kacser y Burns, 1973)

Cuando la enzima no está apreciablemente saturada por su sustrato y producto, (A.1) se reduce a:

$$v_i = \frac{V_i}{K_i} \left(x_i - \frac{x_{i+1}}{K_{eq}^i} \right) \quad (A.2)$$

Haciendo uso de esta última expresión, junto con el hecho de que en el estado estacionario todas las velocidades v_i deben ser iguales al flujo que atraviesa la ruta, F, podemos escribir el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} v_A = F &= \frac{V_A}{K_A} \left(a - \frac{x_1}{K_{eq}^A} \right) \\ v_1 = F &= \frac{V_1}{K_1} \left(x_1 - \frac{x_2}{K_{eq}^1} \right) \\ v_2 = F &= \frac{V_2}{K_2} \left(x_2 - \frac{x_3}{K_{eq}^2} \right) \\ v_n = F &= \frac{V_n}{K_n} \left(x_n - \frac{p}{K_{eq}^n} \right) \end{aligned} \quad (A.3)$$

donde V_i y K_i representan las velocidades máximas de la reacción directa y las constantes de Michaelis de las sucesivas enzimas y K_{eq} las constantes de equilibrio. Los niveles desconocidos de los intermediarios $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ pueden eliminarse de (A.3) dividiendo los términos de la izquierda por los apropiados V/K y dividiendo asimismo por K_A - la segunda ecuación, por $K_A \cdot K_{eq}$ la tercera y así sucesivamente. Al sumar todas las ecuaciones tal como quedan, se eliminan los términos que contienen las concentraciones de los intermediarios x_i obteniéndose:

$$F \left(\frac{K_A}{V_A} + \frac{K_1}{V_1 K_{eq}} + \frac{K_2}{V_2 K_{eq} K_{eq}'} + \dots \right) = a - \frac{p}{K_{eq}^{A,n}}$$

De aquí la expresión para F será:

$$F = \frac{a - \frac{p}{K_{eq}^{A,n}}}{\left(\frac{K_A}{V_A} + \frac{K_1}{V_1 K_{eq}} + \frac{K_2}{V_2 K_{eq} K_{eq}'} + \dots \right)} \quad (A.4)$$

Esta ecuación es de la forma:

$$F = \frac{C_0}{1/g_A + 1/g_1 + 1/g_2 + \dots + 1/g_n} \quad (A.5)$$

donde $C_0 = a - \frac{p}{K_{eq}^{A,n}}$ y g_i son variables del sistema ya que en su expresión está implicada la concentración de la enzima e_i .

$$g_i = \frac{V_i \cdot K_{eq}^{A,i-1}}{K_i} = e_i \frac{k_i \cdot K_{eq}^{A,i-1}}{K_i}$$

$$g_A = \frac{V_A}{K_A} = e_A \frac{k_A}{K_A}$$

considerando sólo una enzima E_i como variable la ecuación (A.5) puede ser escrita como:

$$F = \frac{C_1 \cdot g_i}{C_2 + g_i} \quad (A.6)$$

donde C_1 y C_2 son parámetros sistémicos que incluyen todos los parámetros cinéticos y termodinámicos del sistema, excepto los que se refieren a la enzima E_i y a la reacción que esta cataliza.

Obsérvese que para este modelo contamos con expresiones explícitas de C_1 y C_2 , lo que significa que la ecuación (A.6) es una función

explícita del flujo.

Modelo A.2. Enzimas con saturación significativa.

Si admitimos que las enzimas del sistema están significativamente saturadas por sus sustratos y/o productos, puesto que en el estado estacionario dicha saturación permanece constante, la ecuación (A.1) -- quedará:

$$v_i = \frac{V_i}{K_i C_i} \left(x_i - \frac{x_{i+1}}{K_{eq, A, i}} \right)$$

donde:

$$C_i = 1 + \frac{x_i}{K_i} + \frac{x_{i+1}}{K_{i+1}}$$

A partir de esta expresión se puede seguir el mismo procedimiento seguido en el caso de enzimas no saturadas.

$$\begin{aligned} v_A = F &= \frac{V_A}{K_A C_A} \left(a - \frac{x_1}{K_{eq, A}} \right) \\ v_1 = F &= \frac{V_1}{K_1 C_1} \left(x_1 - \frac{x_2}{K_{eq, 1}} \right) \\ v_2 = F &= \frac{V_2}{K_2 C_2} \left(x_2 - \frac{x_3}{K_{eq, 3}} \right) \\ v_n = F &= \frac{V_n}{K_n C_n} \left(x_n - \frac{p}{K_{eq, n}} \right) \end{aligned} \quad (A.7)$$

Llevando los términos C_A, C_1, C_2, \dots al primer miembro en cada caso, y dividiendo por los apropiados V/K y K_{eq}^A la segunda ecuación, etc., tal como se hizo antes llegamos a:

$$F \left(\frac{K_A \cdot C_A}{V_A} + \frac{K_1 C_1}{V_1 K_{eq, A}} + \dots + \frac{K_n C_n}{V_n K_{eq, A, n-1}} \right) = a - \frac{p}{K_{eq, A, n}}$$

De donde:

$$F = \frac{a - \frac{p}{K_{eq, A, n}}}{\frac{C_A K_A}{V_A} + \frac{C_1 K_1}{V_1 K_{eq, A}} + \dots + \frac{C_n K_n}{V_n K_{eq, A, n-1}}} \quad (A.8)$$

Esta ecuación también podemos expresarla como:

$$F = \frac{C_o}{1/g_A + 1/g_1 + 1/g_2 + \dots + 1/g_n} \quad (\text{A.9})$$

donde g_i viene dado por:

$$g_i = \frac{C_i K_i}{v_i \cdot K_{eq}^{A,i-1}} \quad \text{y} \quad g_A = \frac{C_A K_A}{V_A}$$

Análogamente considerando sólo una enzima como variante, la ecuación (A.9) tendrá la misma forma que (A.6).

$$F = \frac{C'_1 \cdot g_i}{C'_2 + g_i}$$

6.2. Apéndice B.

En el apartado 3.1.2(pág. 22) llegábamos a la expresión:

$$C_{E_1}^F = \frac{C_1' - F}{C_1'} \quad (\text{ecuación 3.9})$$

a partir de la ecuación para el flujo :

$$F = \frac{C_1' g_i}{C_2' + g_i} \quad (3.7)$$

Para ello hicimos primeramente la derivada parcial de F respecto a g_i

$$\frac{\partial F}{\partial g_i} = \frac{C_1' (C_2' + g_i) - C_1' g_i}{(C_2' + g_i)^2} = \frac{C_1' C_2'}{(C_2' + g_i)^2}$$

Ahora reemplazamos esta derivada en la definición de $C_{E_i}^F$.

$$C_{E_i}^F = \frac{\partial F}{\partial g_i} \cdot \frac{g_i}{F} = \frac{C_1' C_2'}{(C_2' + g_i)^2} \cdot \frac{g_i}{F} \quad (3.8)$$

De la expresión inicial del flujo(ecuación 3.7), podemos despejar C_2' y sustituirla en (3.8).

$$C_2' = \frac{(C_1' - F)g_i}{F}$$

$$C_{E_1}^F = \frac{C_1' g_i^2 (C_1' - F)}{(C_2'^2 + 2C_2' g_i + g_i) F}$$

Desarrollando y simplificando el denominador, tenemos:

$$C_{E_1}^F = \frac{C_1' g_i^2 (C_1' - F)}{\left(\frac{g_i^2 (C_1' - F)^2}{F^2} + \frac{2 g_i^2 (C_1' - F)}{F} + g_i^2 \right) \cdot F^2}$$

$$= \frac{C_1' (C_1' - F)}{\left(\frac{(C_1' - F)^2}{F^2} + \frac{2F(C_1' - F)}{F^2} + \frac{F^2}{F^2} \right) \cdot F^2}$$

$$= \frac{C_1' (C_1' - F)}{C_1'^2 - 2 C_1' F + F^2 + 2 F C_1' - 2F^2 + F^2}$$

$$= \frac{C_1' (C_1' - F)}{C_1'^2} = \frac{C_1' - F}{C_1'}$$

$$C_{E_i}^F = \frac{C_1' - F}{C_1'} \quad (3.9)$$

6.3. Apéndice C.

La ecuación (5.3) (pág. 92):

$$F = \frac{\frac{F_{MX}}{\phi_A} \left(a - \frac{p}{K_{eq}} \right)}{1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P}} \quad (5.3)$$

la derivamos respecto al sustrato variable a :

$$\begin{aligned} \frac{\partial F}{\partial a} &= \frac{\frac{F_{MX}}{\phi_A} \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right) - \frac{1}{\phi_A} \frac{F_{MX}}{\phi_A} \left(a - \frac{p}{K_{eq}} \right)}{\left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right)^2} \\ &= \frac{F_{MX}}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right)} - \frac{\frac{F_{MX}}{\phi_A} \left(a - \frac{p}{K_{eq}} \right)}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right)^2} \end{aligned}$$

El segundo término podemos expresarlo (empleando la 5.3) como:

$$- \frac{F}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right)}$$

Entonces:

$$\frac{\partial F}{\partial a} = \frac{F_{MX}}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right)} - \frac{F}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right)}$$

Sustituyendo esta expresión en la definición de C_A^F

$$C_A^F = \frac{\partial F}{\partial a} \cdot \frac{a}{F} = \frac{F_{MX} - F}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P} \right)} \cdot \frac{a}{F} \quad (5.5)$$

El mismo tratamiento se aplica a la expresión (5.2)

$$v_A = \frac{\frac{V_A}{K_A} \left(a - \frac{x_1}{K_{eq}} \right)}{1 + \frac{a}{K_A} + \frac{x_1}{K_1}} \quad (5.2)$$

para obtener $\epsilon_A^{v_A}$ (ecuación (5.6))

$$\epsilon_A^{v_A} = \frac{v_A - v_A}{K_A \left(1 + \frac{a}{K_A} + \frac{x_1}{K_A}\right)} \cdot \frac{a}{v_A} \quad (5.6)$$

Con estas dos expresiones (5.5) y (5.6) se llega a la de $C_{E_A}^F$ -- por medio de la relación (5.4).

$$C_A^F = C_{E_A}^F \cdot \epsilon_A^{v_A}$$

De aquí:

$$C_{E_A}^F = \frac{C_A^F}{\epsilon_A^{v_A}}$$

por lo que sustituyendo:

$$C_{E_A}^F = \frac{\frac{F_{MX} - F}{\phi_A \left(1 + \frac{a}{\phi_A} + \frac{p}{\phi_P}\right)} \cdot \frac{a}{F}}{\frac{v_A - v_A}{K_A \left(1 + \frac{a}{K_A} + \frac{x_1}{K_A}\right)} \cdot \frac{a}{v_A}} \quad (5.7)$$

Al ser $F = v_A$ en el estado estacionario y considerando que $p/\phi_P \approx 0$ y $x_1/K_A \approx 0$ nos queda:

$$C_{E_A}^F = \frac{(F_{MX} - F)(K_A + a)}{(v_A - v_A)(\phi_A + a)} \quad (5.9)$$

que es la mostrada en el apartado 5.1.1. (pág. 91)

7.- Resumen y conclusiones.

Este trabajo ha tenido por objeto explorar ciertos aspectos de la Teoría del control de flujos en sistemas experimentales in vitro. Se ha intentado también aplicar los métodos y técnicas de la Enzimología clásica a la Cinética de las rutas metabólicas. A continuación se resumen las principales conclusiones alcanzadas.

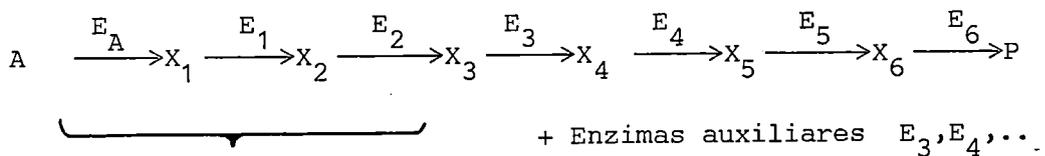
1. Se desarrolla la Teoría del control de flujos enunciada por Kacser y Burns, generalizándose algunos aspectos de la misma y verificando su aplicabilidad para sistemas experimentales in vitro en condiciones de saturación significativa para todas sus enzimas.
2. Se diseña un procedimiento experimental para la determinación de los Coeficientes de control del flujo para la enzima, de -- aplicación general a sistemas experimentales in vitro. Dicho método permite comprobar la Propiedad de la suma en diferentes -- condiciones de saturación por el sustrato de la primera enzima y examinar la redistribución de dichos Coeficientes de control en función de estos cambios.
3. La aplicación de este método a varios sistemas metabólicos de estructura topológica no lineal (sistemas con rutas convergentes en un punto) permite enunciar el siguiente corolario de la Convergencia del control: "En un sistema metabólico con varias rutas convergentes en un punto se cumple la Propiedad de la suma para cada ruta lineal que se pueda considerar en el mismo, verificándose también que la suma de los Coeficientes de control del flujo para la enzima (C_E^F) de todas las enzimas de cada una de las rutas convergentes hasta el punto de convergencia es -- igual para todas ellas en cualquier situación metabólica".

Para este corolario, enunciado inicialmente sobre la base de -- una serie de resultados experimentales, se plantea una demostración teórica que le confiere un carácter general al mismo -- nivel que el de la Propiedad de la suma. Dicho corolario tiene, además, interesantes consecuencias metabólicas.

4. Se trasladan conceptos y métodos de la Enzimología clásica a -- la cinética de las rutas metabólicas.
 - a) Se define la "constante de Michaelis" de una ruta metabólica ϕ_M para uno de sus sustratos y el Flujo máximo de la misma, F_{MX} .
 - b) Se determinan los valores de estos parámetros globales en -- una ruta metabólica lineal in vitro y se comparan con los parámetros particulares respectivos de la primera enzima de la ruta.
 - c) La analogía establecida nos permite determinar por otros -- procedimientos los Coeficientes de control del flujo para la -- enzima en el mismo sistema experimental empleado anteriormente comprobándose la coincidencia de los resultados en las distintas condiciones de saturación por el sustrato de la ruta. Se-

determinan también los Coeficientes de Elasticidad de la glucoquinasa para la glucosa en las diferentes condiciones, así como los correspondientes Coeficientes de control del flujo para el sustrato.

5. Se establece una nueva definición de enzimas auxiliar a la luz de la Teoría del control de flujos: "Una enzima auxiliar es -- aquella que cataliza el último o el primer paso de una ruta, -- con un Coeficiente de control del flujo para la enzima nulo" . "En una ruta metabólica pueden haber varias enzimas auxiliares-- En este caso serán enzimas auxiliares todas aquellas que tienen un Coeficiente de control para la enzima nulo, estén seguidas o precedidas únicamente por enzimas auxiliares".
6. Este concepto de enzima auxiliar junto con el método de determinación de los Coeficientes de control del flujo para la enzima mediante el empleo de enzimas purificadas de cualquier fuente permite diseñar un esquema de operaciones para el estudio del Control de Flujos en rutas metabólicas. Así, al añadir enzimas "auxiliares" conseguimos "acotar" una ruta metabólica dada haciendo nulos sus Coeficientes de control del flujo y, por la Propiedad de la suma, el resto de las enzimas de la ruta verán incrementados sus Coeficientes de control del flujo de tal manera que entre ellos sumen la unidad. No obstante, si el sistema está actuando en condiciones de baja saturación, la relación entre dichos coeficientes incrementados será la misma que el sistema completo inalterado (Kacser y Burns, 1.973). Puesto que los coeficientes grandes son más fáciles de determinar que los pequeños, en situaciones en las que todos los coeficientes sean pequeños (Flint, et al, 1981) este método presenta considerables ventajas. Por lo tanto, por medio de adiciones de enzimas auxiliares correspondientes a tramos sucesivos de una ruta dada, los Coeficientes de control del flujo para la enzima podrán ser determinados según el siguiente esquema:



$$(1) \quad \sum_{i=A}^3 C_{E_i}^F \approx 1$$

Titulación con enzimas

$$(2) \quad \text{Enzimas auxiliares.} + \underbrace{\hspace{10em}}_{\sum_{i=2}^4 C_{E_i}^F \approx 1} + \text{Enzimas auxiliares}$$

Titulación con enzimas

$$(3) \quad \text{Enzimas auxiliares, } E_A, E_1, E_2. + \underbrace{\hspace{10em}}_{\sum_{i=4}^6 C_{E_i}^F \approx 1}$$

Titulación con enzimas

Para rutas metabólicas más complicadas se podrá diseñar un método similar pero más complejo. Puesto que de esta manera se pueden determinar los cocientes entre todos los coeficientes, la estimación del valor absoluto de cualquiera de ellos por cualquier otro método, nos permitirá conocer inmediatamente los valores absolutos de todos los demás.

Summary and conclusions

The aim of this work has been to explore certain aspects of the Theory of control flux, in in vitro systems. In the same way, we have attempted to apply the methods and the experimental approaches of classic Enzymology to the Kinetics of metabolic pathways.

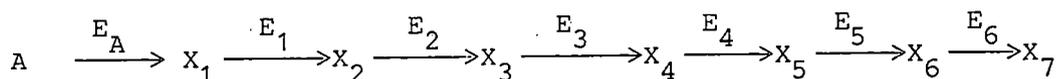
1. We have developed Kacser y Burns's Theory of flux control and - have generalized some aspects of this theory verifying its applicability to experimental systems in vitro in significant saturation conditions for all the enzymes.
2. A method has been designed to settle the Control flux coefficients (C_E^F) which is of general applicability to in vitro experimental systems. This method permit us to cheque the Summation-Property in different conditions of saturation by the substrate of the first enzyme and to examine the rearrangement of the Control flux coefficients (C_E^F).
3. The utilization of this method in different metabolic systems - with a non-linear topological framework (systems with some metabolic pathways whic converge in the same intermediate) enables us to state this corollary of the Control Convergence: "In a metabolic system with several pathways converging in the same point the Summation Property is fulfilled for each of the lineal pathways that can be considered. In the same way the summation of the Control flux Coefficients (C_E^F) of all the enzymes of each - converging pathway up to the convergence point is the same for - any pathway under any conditions".
 This corollary, has been stated first experimentally, and then theoretically. This corollary has interesting metabolic consequences.
4. The concepts and methods of classic Enzymology are transferred into the Kinetics of metabolic pathways:
 - a). The "Michaelis constant of a metabolic pathway", ϕ_M , is defined for one of the substrates and the maximun flux, F_{MX}^M .
 - b) The values of the global parameters of a lineal in vitro metabolic pathway are stated. These values are compared with the respective particular parameters of the first enzyme of the pathway.
 - c) The stated analogy enables us to determine by other means the Control flux Coefficients (C_E^F) in the same system. We can demonstrate that the results are the same under different saturation-conditions for the pathway substrate. We have determined the - Elasticity coefficients (ϵ_{Glc}^V).
5. A new definition of auxiliary enzyme is presented from the point of view of the Control flux theory: "The auxiliary enzyme is -- that which catalyzes the first or the last step in a pathway, -

having a Control flux coefficient (C_E^F) of zero".

In a given pathway there can be several auxiliary enzymes. In this case, the auxiliary enzymes will also be all those which - having a Control flux coefficient (C_E^F) zero are followed or preceded by enzymes whose Control flux coefficients are also zero.

6. This concept of auxiliary enzyme together with the method of determination of Control flux coefficients (C_E^F) enable us to design a general method for the study of control flux metabolic pathways. By "shortening" the pathway by the addition of "auxiliary" enzymes, the magnitudes of the remaining coefficients is increased. This follows directly from the flux summation property. The addition of large quantities (or activities) of the -- auxiliary enzymes makes their coefficients virtually zero and -- thereby puts all the control ($\sum C_{E_i}^F = 1$) on the remaining ones. -- Their relative values however, will be the same as in the whole system provided the low saturation condition is obeyed. Large -- coefficients are much easier to measure experimentally than -- small ones. In situations where all coefficients appear to be small (see e.g. Flint et al, 1.981) this is of considerable advantage.

By a series of overlapping shortened segments all the relative-values of the control coefficients can be estimated.



- (1) $\underbrace{\hspace{10em}} + \text{auxiliary enzymes } E_3, E_4, \dots$

$$\sum_{i=A}^2 C_{E_i}^F \approx 1$$

Enzyme titration

- (2) auxiliary $\underbrace{\hspace{10em}}$ auxiliary

$$\sum_{i=2}^4 C_{E_i}^F \approx 1$$

Enzyme titration

- (3) auxiliary + $\underbrace{\hspace{10em}}$ etc..

$$\sum_{i=4}^6 C_{E_i}^F \approx 1$$

Enzyme titration

For more complicated pathway structures a similar but more complex method can be devised.

Once the ratios of all the coefficients has been determined, the estimation of the absolute value of anyone (by whatever method) will -- yield the absolute value of all.

8. BIBLIOGRAFIA

- 8.1. Bibliografía citada en el texto.-
- ALBERTY, R.A.(1959), The Rate Equation for an Enzymic Reaction, in *The Enzymes*, Vol.I., Ed.by Boyer, Lardy y Myrbäck, New York. Academic Press
- AKERBOOM, T.P.M.(1979)Compartmentation of adenine nucleotides in rat hepatocytes. Ph.D.Thesis.University of Amsterdam. Krips. Repro.Meppel.
- BASSHAM, J.A. y KRAUSE,G.A.(1969), *Biochim.Biophys.Acta* 159,509-513.
- BERGMEYER, H.V., *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd Edition.
- BURNS, J.A.(1968), A digital computer system for the construccion and analysis of steady state models of enzyme catalyzed networks.In *Quantitative Biology of Metabolism*, 75-80. Ed. A.Locker, Proc.3rd.Int.Symp.Berlin:Springer-Verlag.
- BURNS, J.A.(1969). *FEBS Letters*, 2, Suppl. S₃₀-S₃₃.
- BURNS, J.A.,CORNISH-BOWDEN,A., GROEN,A.K.,HEINRICH,R.,KACSER,H.,PORTENS,J.W.,RAPOPORT,S.M.,RAPOPORT,T.A.,STUCKI,J.W.,TAGER,J.M.WANDERS,R.J.A.,WESTERHOFF,H.V.(1985).Letter to the editor, *TIBS* January.
- CASTAÑO, J.G,NIETO, A.y FELIU,J.E.(1979),*J.Biol.Vol.254*, 13,5576-5579.
- CLELAND,W.W.(1963), *Biochim.Biophys.Acta* 67, 104-133.
- COOPER,T.G.(1977) *The tools of biochemistry*, Wiley & Sons, p.22.
- EASTERBY,J.S.(1973), *Biochim.Biophys., Acta* 293, 552-558.
- EASTERBY,J.S.(1981)*Biochem.J.*, 199, 155-161.
- FELL, D.,(1984) *Trend Biochem.SCI.Diciembre*, pp.515-516.
- FLINT,H.J.,PORTENS,D.J. y KACKSER,H.(1980) Control of flux in the arginine path way of *Neurospora crassa*. *Biochem.J.* 190, 1-15.
- FLINT,H.J.,TATESON,R.W.,BARTHELMESS,I.B.,PORTENS,D.J.DONACHIE,W.D. y KACSER,H.-(1981) *Biochem,J.*, 200, 231-246.
- GARFINKEL,D.(1965), Computer-based analysis of Biochemical data.In *Control of Energy Metabolism*, 49-106.Ed.B.Chance,R.K., Estabrook and J.R.Williamson,New York, Academic Press.
- GARFINKEL,D.(1966) *Biochem. Soc.Symp.*, 26,81.
- GARFINKEL,D.(1971) Simulation of the Krebs Cycle and closely related metabolism in perfused rat liver.II.Properties of the model Computer and Biomedical Res.4, 18-42.
- GROEN,H.K.,VAN DER MEER,R.,WESTERHOFF,H.V., WANDERS,R.J.A.,ACKERBROOM,T.P.M. y TAGER,J.M.(1982). Control of metabolic fluces. pp.9-37.In *Metabolic Compartmentation*, Ed.by H. Fries. Academic Press, New York.
- GROEN,A.K., WANDERS,R.J.A., WESTERHOFF,H.V., VAN DER MEER, R., y TAGER,J.M.(1982 b), *J. Biol-Chem.*, 257, 2754-2757.
- GUTMANN,I. y WAHLEFELD, W. in *Methods of Enzymatic Analysis*.Ed.Hans V.Bergmeyer Academic Press., New York, pp.1464-1470.
- HEINRICH,R. y RAPOPORT,T.A.(1974 a), *Enz.J.Biochem.*, 42, 89-95.
- HEINRICH, R.y RAPOPORT, T.A.(1974 b) *Enz.J.Biochem.*, 42, 107-120.
- HEINRICH,R. y RAPOPORT, T.A., *Enz.J.Biochem.*, 42, 107-120.

- HEINRICH, R. y RAPOPORT, T.A. (1975). *Biosystems*, 7, 130-136.
- HELMREICH, E., MICHAELIDES, M.C. y CORI, C.F. (1967), *Biochemistry*, 6, 3695.
- HELMREICH, E. (1969), *Control of Synthesis and Breakdown of Glycogen, - Starch and Cellulose in Carbohydrate Metabolism*. Vol.17, p.17-92.
- HERS, H., VAN SCHAFTINGEN, E. (1982), *Biochem., J.*, 206, 1-12.
- HESS, B. y BOITEUX, A. (1971) *Oscillatory phenomena in Biochemistry*. -- *Annual Review of Biochem.*, 40, 237-257.
- HIGGINS, J. (1963), *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 108, 305-321.
- HIGGINS, J. (1965) *In Control of Energy Metabolism*, 13-46. Ed. B.Chance, R.K. Eastbrook and J.R. Williamson, New York, Academic Press.
- HOFSTEE, B.H.J. (1959), *Nature(London)* 184, 1296.
- HORECKER, B.L. y KORBERG, A. (1948), *J. Biol.Chem.*, 175, 385-390.
- KACSER, H. y BURNS, J.A. (1973 a) *The control of Flux. Symp.Soc.Exp.Biol.*, 27, 65-104.
- KACSER, H. BLUFIELD, G., y WRIGHT, A. (1979 a) *In Models for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, pp.33-42. Ed. by F.A.Hommes, Elsevier, Amsterdam.
- KACSER, H. y BURNS, J.A. (1979) *Biochem.Soc.Trans*, 7, 1149-1160.
- KACSER, H. y BURNS, J.A. (1981). *Genetics*, 97, 639-666.
- KACSER, H. (1982), *Biochem. Soc. Trans.*, 11, 35-40.
- KAHANA, S.E., LOWRY, O.H., SCHULZ, D.N.S.-. PASSONNEAU, J.V. y CRAWFORD, E.J. (1960), *J.Biol.Chem.*, 235, 2178.
- KAUFMANN, F.C., BROWN, J.G., PASSONEAU, J.V. y LOWRY, O.H. (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 3647-3653.
- KAULKHOFF, R.K., HORN BROOK, K.R., BURCH, H.B. y KIPNIS, D.M. (1966), *Diabetes* 15, 451.
- KING, J. (1974), *Phosphoglucumutase in Methods of Enzymatic Analysis*. -- Vol.2, pp.798-801.
- KOHN, M.C., WHITLEY, L.M. y GARFINKEL, D. (1979), *J. Theor.Biol.*, 76, 437 - 452.
- KOHN, M.C. y CHIANG, E., (1983), *J. Theor.Biol.*, 100, 551-565.
- LAMPRECHT, W., y TRANTSCHOLD, I. (1974). *Methods in Enzymatic Analysis*. -- Ed. Hans V. Bergmeyer, Academic Press, New York, pp.2101-2110.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J., (1951). *J.Biol. Chem.* 193, 265-275.
- LOWRY, O.H. y PASSONNEAU, J.V. (1969) *J.Biol.Chem.*, 244, 910.
- MAHLER, H.R. y CORDES, E.H. (1969) "Biological Chemistry", 1st.edn. Harper, N.Y.
- MELLENDEZ HEVIA, E., SIVERIO, J.M. y PEREZ, J.A. (1984), *Int.J.Biochem.*, 16, - 469-476.

- MICHAL,G. y LANG,G.(1974). In Methods of Enzimatic Analysis, Ed.Hans V. Bergmeyer, Academic Press, New York, pp.1415-1418.
- NEWHOLME,E.A. y START,C.(1973). Regulation in metabolism, Chapter 2. - John Wiley & Sons. London.
- NOLTMANN,E.A.(1966) In Methods in Enzymology, Vol.9,pp.557-565.
- PILKIS,S.J.(1975) In Methods in Enzymology. Vol.XLII, Part C.pp.31-39.
- RACKER,E.(1962) In Enzymes(Boyer,P.P.,Lardy,H.A. y Myrbaeck,K., eds.)- 2nd edn.Vol.5, pp.397-412. Academic Press, N.Y.
- RAPOPORT,T.A.,HEINRICH, R. y RAPOPORT,S.M.(1976),Biochem.,J.154,449-469.
- REITHEL,F.J.(1966) In Methods in Enzymology, Vol.9, pp.565-568.
- RONGSTAD,R., (1979), J. Biol.Chem., 254, 1875-1878.
- SAVAGEAU,M.A.(1969), J. Theor.Biol. 25,370-379.
- SAVAGEAU,M.A.(1971 a), Nature(London), 229,542-544.
- SAVAGEAU, M.A.(1971 b) Arch.Biochem.Biophys., 145, 612-621.
- SAVAGEAU, M.A.(1972). Curr.Top.Cell.Regul.,6 , 63-130.
- SCOPES,R.K.(1971) Biochem.J., 122, 89-92
- SCOPES,R.K.(1973), Biochem., J.134, 197-208.
- SCOPES,R.K.(1974), Biochem.J., 138, 119-123.
- START,C. y NEWSHOLME,E.A. (1968). Biochem., J.,107, 514.
- VENKATARAMAN, R., y RACKER,E.(1961), J. Biol.Chem., 236, 1876-1882.
- WALEY,S.G.(1964), Biochem.J., 91, 514-517.
- WALKER,D.G. y PARRY,M.J.(1966) In Methods in Enzymology, Vol.9, p.381-388.
- WILLIAMSON,D.H., LUND, P. y KREBS,H.S.(1967), Biochem.J., 103,514-527.
- WRIGHT,B.E. y KELLY,P.J.(1981) Curr.Top.Cell,Reg., 19, 103-157.

6.2. Otra bibliografía utilizada.-

- ATKINSON, E.D.(1959) Enzymes as Control Elements in Metabolic Regulation in The Enzymes, Vol.I, Paul Boyer, Academic Press. New York.
- BAÑUELOS, M. y GANCEDO, C.(1978) Arch.Microbiol., 117, 197-201.
- BARTHELMESS, I.B., CURTIS, C.P. y KACSER, H.(1974), J.Mol.Biol. 87, 303-316
- BERTALANFY, L. VON (1950), Science III, 23.
- BERTALANFY, L. VON (1976) Teoría General de los Sistemas, Fondo de Cultura Económica, México.
- BETZ, A. (1965). A reconstituted enzyme system in Control of Energy Metabolism., 139-146. Ed. B.Chance, R.K. Estabrook and J.R. Williamson, New York, Academic Press.
- BOITEUX, A., HESS, B., SEL'KOV, E.E. (1980) Curr.Top.Cellular, Regulat. 17, 171-203.
- BOITEUX, A. y HESS, B.(1981), Phil.Trans.R.Soc., Lond. B. 293, 5-22.
- BULFIELD, G. y KACSER, H.(1974) Histidinaemias in mouse and man. Arch.-- Disc.Child. 49, 545-552.
- BURNS, J.A. y KACSER, H.(1977), J.Theor.Biol., 68, 199-213.
- CHANCE, B., HOLMES, W., HIGGINS, J. y CONNELLY, C.M.(1958). Localisation of interactions sites in multicomponent transfer systems: Theorems derived from analogues. Nature, Lond. 182, 1190-1193.
- CHANCE, B.(1965) In Control of Energy Metabolism. Academic Press, New York -London, pag.9-12.
- CLELAND, W.W.(1979 a) Anal.Biochem. 99, 142-145.
- CLELAND, W.W.(1979 b) Methods Enzymol. 63 A, 501-513.
- CRABTREE, B. y NEWSHOLME, E.A.(1978), Eur.J. Biochem., 89, 19-22.
- CRAWFORD, J.M. y BLUM, J.J. (1983) Biochem., J., 212. 595-598.
- CRICK, F. (1979) ¿Ha muerto el vitalismo? Bosch, Casa Editorial, S.A., - Barcelona (España).
- EISENTHAL, R., y CORNISH-BOWDEN, A., (1974), Biochem., J. 139, 715-720.
- FERDINAND, W.(1976). The enzyme molecule, John Wiley & Sons.
- GALVEZ, J. VARON, R., GARCIA CANOVAS, F. y GARCIA-CARMONA, F.(1982), J.Theor. Biol. 94.
- GEDDES, R. y RAPSON, K.B. (1973), FEBS. Lett., 31, N.3, pp.324-326.
- HARVEY, R.J.(1978). J.Theor.Biol., 74, 411-437.
- HERS, H. y HUE, L.(1983) Ann.Rev.Biochem., 52, 617-653.
- HESS, B. y BRAND, K.(1965) Enzymes and Metabolite profiles. In Control of Energy Metabolism, III, Ed. B.Chance, R.K. Eastbrook y J.R. Williamson, N. York. Academic Press.
- HILL, C.M., WRIGHT, R.D. y BARDSLEY, W.G.(1977). Mol. Cell.Biochem., 15 173-178.

- HULME, E.C. (1971). *J. Theor. Biol.*, 31, 131-137.
- KACSER, H.(1963) The Kinetic Structure of Organisms. In *Biological Organization at the Cellular and Supercellular level*, 25-41. Ed.R.J.C. Harris. New York, Academic Press.
- KACSER, H.y BURNS, J.A.(1968) Causality, Complexity and Computers. In *Quantitative Biology of Metabolism*, 11-23. Ed. A.Locker. Proc.3rd.Int.-Symp. Berlin, Springer-Verlag.
- KACSER, H. BULFIELD, G. y WALLACE, M.F.(1973), *Nature(London)*, 244, 77-79.
- KREBS, H.A.(1969). The role of equilibria in the regulation of metabolism. *Curr. Top.Cell. Regul.*I, 45-58.
- KREBS, H.A.(1979) Conferencia Inaugural del XVIII Congreso Nacional de la S.C.E.F. Valencia.
- KUHN, T.S.(1977). La estructura de las revoluciones científicas.México.
- LA PORTE,D.C., WALSH, K., y KOSHLAND, D.E.,Jr.(1984), *J. Biol.Chem.*,- - 14068-14075.
- MARKUS, M., HESS, B. OTTAWAY, J.H. y CORNISH-BOWDEN, A.(1976) *FEBS Lett.* 63, number 2,pp. 225-230.
- McMINN,C.L. y OTTAWAY, J.H.(1976). *J. Theor.Biol.*56, 57-73.
- MELENDEZ-HEVIA, E.(1985) Cinética de Rutas metabólicas. Servicio de Publicaciones de la Universidad de La Laguna (en prensa).
- MITCHELL, P.(1978). *Trends in Biochemical Sciences*, 3, 58.
- MOWBRAY, J. y OTTAWAY, J.(1973) *Enz.J.Biochem.*36, 369-379.
- MUNICIO, A.M.(1980) Discurso Inaugural del Año Académico(1980-1981, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Ciencia y Aristobiología. Madrid.
- NEWSHOLME, E.A. y CRABTREE, B.(1981) *TRENDS Biochem.Sci.*, 6, 53-56.
- NUÑEZ DE CASTRO, I.(1980). Pnesamiento, 36, 425-435.
- NUÑEZ DE CASTRO, I.(1983) Categorías del discurso biológico del libro - Evolucionismo y Cultura. Ed.A.Dou. Editorial Mensajero.Bilbao, p.17-53.
- OTTAWAY, J.H. y MOWBRAY, J.(1977) *Curr.Top.Cell.Regul.*, 12, 107-208.
- OTTAWAY, J.H.(1979 a): Sequestration of Metabolites,In sights into Metabolic Control. *Biochem.Soc.Trans*, 7, 1161-1167.
- OTTAWAY, J.H.(1979 b). Compartmentation: Model and reality. *Biochem.Soc. Trans.* 7, 398-402.
- OTTAWAY, J.H. y McMINN, C.L.(1979 c) *Biochem.Soc.Trans.*, 7, 411-412.
- OTTAWAY, J.H. y McMINN, C.L.(1980 a) *Proc.FEBS Meet.* 60, 69-82.
- OTTAWAY, J.H. y McMINN, C.L.(1980 b) in *Enzyme Regulation and Mechanism of Action.*(Mildner,P. and Rics,B., Eds.), pp.69-82,Pergamon Press. Oxford.

- PALMER, T.(1981) Understanding Enzymes, John Wiley & Sons. Ellis Horwood Limited. Chichester. London.
- PORTEUS, J.W.(1985) Letter to the Editor.TIBS January, pp.14-15.
- PORTEUS, J.W.(1983). Letter to the Editor. TIBS, June, pp.200-202.
- REAL ACADEMIA DE CIENCIAS EXACTAS ,FISICAS Y NATURALES(1983). Vocabulario Científico y Técnico, Madrid.
- REICH, J.G.
- REICH, J.G. y SEL'KOV, E.E.(1974) FEBS Lett.40, S119.
- REICH, J.G. y SEL'KOV, E.E.(1981) Energy metabolism of the Cell(A Theoretical Treatise). Academic Press. London.
- RONGSTAD, R. y KATZ, J. (1973), Biochem., J.132,349 -352.
- ROLLESTON,F.S.(1972) A theoretical background to the use of measured -- concentrations of intermediates in study of the control of intermediate metabolism. Curr.Top.Cell.Regul., 5, 47-75.
- RUDOLPH, F.B., BAUGHER, B.W. y BEISSNER, R.S.(1979) Methods in Enzymology, 63, 22-41.
- SCHMIDT, N.D., PESCHON, J.J. y SEGEL,I.H.(1983), J. Theor.Biol., 100,-- 597-611.
- SOLS, A. y MARCO, R.(1970) Concentrations of Metabolites and Binding Sites. Implications in Metabolic Regulation. Curr.Top.Cell.Regul.2,227-273.
- SOLS, A.(1977)Congreso de la SEB, Pamplona.
- SCRUTTON, M.C. y UTTER,M.F.(1968). The regularion of glycolysis and gluconogenesis in animal tissues. A.Rev.Biochem. 37, 249-302.
- STTEBING, N.(1972). Amino acid pool components as regulators of proteins synthesis in the fission yeast. Schizosaccharomyces pombe, Expl.Céll. - Res., 70, 381-389.
- STUCKI, J.W. y WALTER, P.(1972). Eur.J. Biochem.30, 60-72.
- STUCKI, J.W.(1982) Biochem. Soc.Trans, 11, 45-47.
- WALSH, K. y KOSHLAND, D.E.,Jr(1984), 259, 9646.9654.
- WANDERS, R.J.,GROEN, A.K., VAN ROERMUND, C.W. y TAGER,J.M.(1984), Eur.J. Biochem., 142 (2), 417-424.
- WANDERS, R.J.? VAN ROERMUND, C.W. y MEIJER, A.J.(1984), Eur.J.Biochem., 142 (2), 247-254.
- WESTERHOFF, H.V. y YI-DER CHEN (1984). Eur.J.Biochem.142 (2) 425-430.
- WESTERHOFF, H.V.,GROEN, A.K. y WANDERS, R.J.A.(1984) Biosc.Rep.4,1-22.
- WIAME, J.M., STALON, V., PIERARD, A. y MESSENGUY, F. (1973) Symp.Soc.Exp. Biol.32, 333-369.

INDICE

	Página
O. Nomenclatura	1
0.1. Sustratos y productos del sistema.....	1
0.2. Enzimas del sistema.....	1
0.3. Parámetros sistémicos y Coeficientes	2
0.4. Enzimas, sustratos y efectores usados en la experimentación.....	3
1. Introducción.	5
1.1. Regulación del metabolismo: Situación actual.....	5
1.2. Teoría del Control de Flujos.....	8
A. Coeficientes de Control del flujo para la enzima C_E^F	9
A.1. La Propiedad de la Suma.....	11
A.2. Otros Coeficientes de Control.....	12
B. Coeficientes de Elasticidad.....	13
B.1. La Propiedad Conectiva.....	14
C. La Distribución de la Respuesta.....	16
1.3. Epílogo.....	17
2. Plan de Trabajo.....	18
3. PARTE I. Estudio del Control de flujos en un Sistema Experimental <u>in vitro</u> : Coeficientes de control del flujo para la enzima.....	19
3.1. Teoría.....	19
3.1.1. Saturación enzimática de un sistema metabólico en estado estacionario.....	19
3.1.2. Determinación de los Coeficientes de control del flujo para la enzima.....	22
3.2. Sistema Experimental.....	27
3.2.1. Delimitación de la ruta metabólica.....	28
3.2.2. Adecuación del modelo experimental al modelo teórico.....	28
A. Establecimiento del estado estacionario.....	28
B. Cinética de las enzimas individuales	29
3.3. Materiales y Métodos.....	30
3.3.1. Material biológico.....	30
3.3.2. Métodos.....	30
3.3.2.1. Obtención y preparación de las muestras..	30
3.3.2.2. Determinación de las concentraciones de ATP y producto final en el estado estacionario.....	31
A. Determinación de la concentración de ATP.....	31
B. Determinación de las concentraciones de glicérol-3-fosfato y L(+)-lactato.....	34
3.3.2.3. Determinación de actividades enzimáticas.	36

	<u>Página</u>
A.Fosforilación de la glucosa	37
B.Fosfoglucoisomerasa.....	38
C.Fosforilación de la fructosa-6-fosfato.....	40
D.Cálculos.....	42
3.3.2.4. Valoraciones de proteínas.....	43
3.3.2.5. Determinación de las constantes aparentes de- Michaelis(K_M).....	43
3.3.2.6. Titulaciones con enzimas.....	45
3.3.2.7. Cálculo de los Coeficientes de control del flu- jo para la enzima.....	47
3.3.3.Productos.....	48
3.3.3.1.Para la obtención y preparación de las muestras	48
3.3.3.2.Para las valoraciones de ATP y productos fina- les.....	48
3.3.3.3.Para la determinación de las actividades enzi- máticas.....	49
3.3.3.4.Para las valoraciones de proteínas.....	49
3.3.3.5.Para las titulaciones con enzimas.....	49
3.3.4.Instrumentación.....	49
3.4. Resultados y discusión.....	50
3.4.1.Resultados previos.....	50
3.4.1.1.Lineabilidad de la ruta.....	50
3.4.1.2.Adecuación del Sistema Experimental.....	51
A.Establecimiento del estado estacionario.....	51
B.Cinética michaeliana de las enzimas del sistema.	52
3.4.1.3.Conclusion previa	54
3.4.2.Coefficientes de control del flujo para la enzima.	54
4.PARTE II. Extensión de la Propiedad de la Suma a sistemas metabólicos <u>in vitro</u> con rutas convergentes en un punto...	59
4.1.Comentario y objetivos.....	59
4.2. Sistema Experimental.....	60
4.3. Materiales y Métodos.....	60
4.3.1. Determinación de actividades enzimáticas.....	61
A.Fosforilasa-a.....	61
B.Fosfoglucomutasa.....	62
C.Cálculos.....	64
4.3.2.Constantes de Michaelis de las fosforilasas-a y - fosfoglucomutasas.....	64
4.3.3.Productos.....	65
4.4.Resultados y discusión.....	67
4.4.1. Resultados.....	67
4.4.2. Discusión.....	79
4.4.2.1.Enunciado de la Convergencia del control.....	79
4.4.2.2.Demostración de la Convergencia del control...	82
4.4.2.3.Consecuencias metabólicas de la Convergencia - del control.....	85
4.4.2.4.Generalización de la Propiedad de la Suma.....	88

	<u>Página</u>
5. PARTE III. Consecuencias teóricas y prácticas de la cinética de rutas metabólicas.....	91
5.1. Concepto de constante de Michaelis de una ruta metabólica: ϕ_M	91
5.1.1. Teoría.....	91
5.1.2. Sistema Experimental.....	95
5.1.3. Materiales y Métodos.....	95
5.1.3.1. Determinación de los parámetros cinéticos de la ruta.....	96
5.1.4. Resultados y Discusión.....	96
5.1.4.1. Parámetros de la ruta, Coeficientes de control y elasticidad.....	96
5.1.4.2. Comparación de los Coeficientes de control del flujo.....	99
5.2. Nueva Definición de enzima auxiliar.....	103
6. Apéndices.....	107
6.1. Apéndice A.....	107
6.2. Apéndice B.....	111
6.3. Apéndice C.....	113
7. Resumen y Conclusiones.....	115
8. Bibliografía.....	121
8.1. Bibliografía citada en el texto.....	121
8.2. Otra Bibliografía utilizada.....	124
9. Índice.....	127

La presente Tesis fué leída en La Laguna ante el Tribunal formado por Presidente: Dr. Federico Mayor Zaragoza, Vocales: Dr. Agustín Arevalo Medina, Dr. Angel M. Hunicis; Dr. J.A. Kozano Trucel; Secretario, Dr. Angel M. Gutiérrez Navarro

mereciendo la calificación de Apto "cum laude"

La Laguna, 18 de mayo de 1985.



Alcalde

Agustín Arevalo Medina

