

0308/
18
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES

*Características catalíticas y estructurales de la piruvato cinasa en micelas
invertidas y en presencia de cosolventes*

Leticia Haydeé Ramírez Silva

Tesis para obtener el grado de:

Doctora en Investigación Biomédica Básica
(Orientación: Bioquímica)

México, D.F.
(1995)

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi familia

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou y el Dr. Armando Gómez Puyou del Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular.

Los experimentos de fluorescencia se realizaron en el laboratorio del Dr. Sergio Ferreira de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil y los de resonancia magnética nuclear en el laboratorio del Dr. Thomas Nowak de la Universidad de Notre Dame, E. U. A.

La sustentante recibió becas de CONACYT y de DGAPA para los estudios y el trabajo de investigación correspondientes.

SUMMARY

One of the goals of modern enzymology is to obtain enzymes that carry out reactions that normally do not occur in nature. This problem has been studied by two different approaches: i) modification of the protein, ii) modification of the solvent. By the latter condition, it has been shown that the nature of the solvent can drastically affect substrate specificity, enantioselectivity and selectivity of the enzyme for a specific region of the substrate. Accordingly it was explored if the requirements for catalysis that pyruvate kinase exhibits in conventional aqueous systems could be modified when transferred to a low water environment (reverse micelles) or to a media of low water activity (mixtures of water-dimethyl sulfoxide).

In an aqueous media, the activity of pyruvate kinase has an absolute requirement for K^+ . Its activity without and with 100mM K^+ was 0.07 μ moles/min·mg and 250 μ moles/min·mg respectively. The activity of the enzyme as function of K^+ concentration exhibited Michaelis-Menten kinetics with a K_m of 48 mM.

Pyruvate kinase entrapped in reverse micelles formed with cetyltrimethylammonium bromide, n-octane and hexanol or in media with dimethyl sulfoxide showed a K^+ -independent activity. Maximal K^+ -independent activity was reached in micelles with 4% water and in 40% dimethyl sulfoxide (12-14 μ moles/min·mg). In reverse micelles with 3.6% water, 5 mM KCl increased pyruvate kinase activity 3 fold (35 μ moles/min·mg). In 40% dimethyl sulfoxide, 400 μ M KCl increased it 5 fold (54 μ moles/min·mg). In both systems, the kinetics of the effect of K^+ adjusted to a substrate inhibition. In reverse micelles with 3.6 % water, the K_m for K^+ was 1.6 mM with a K_i of 4 mM. In 40% dimethyl sulfoxide, K_m was 95 μ M and its K_i was 0.85 mM.

Determination of intrinsic fluorescence showed that in 40% dimethyl sulfoxide without K^+ , Mg^{2+} and PEP, pyruvate kinase was in its active conformation as the enzyme in 100% water with its ligands. Nuclear magnetic resonance studies of pyruvate kinase in dimethyl sulfoxide showed that PK-PEP- Mn^{2+} ternary complex in 40% DMSO was similar to PK- K^+ -PEP- Mn^{2+} in 100% water.

Vo. Bo.
M. Jurena

RESUMEN

Una de las metas de la enzimología moderna es obtener enzimas que sean capaces de llevar a cabo reacciones que normalmente no ocurren en la naturaleza. Este problema se ha abordado por medio de dos enfoques experimentales. En uno se producen modificaciones a la proteína *per se* mientras que en el otro, se intenta cambiar su comportamiento alterando las propiedades del solvente de su entorno. Utilizando este segundo enfoque se ha demostrado que el cambiar la naturaleza del solvente tiene un profundo efecto sobre la especificidad de los sustratos, la enantioselectividad y la selectividad de las enzimas por una región específica del sustrato. Con estos antecedentes, se consideró, en el presente trabajo, que los requerimientos para la catálisis que la piruvato cinasa muestra en agua podrían ser modificados al transferirla a un sistema de bajo contenido de agua (micelas invertidas) o de baja actividad de agua (mezclas binarias agua-dimetil sulfóxido).

Es un hecho conocido que en un medio totalmente acuoso, la actividad de la piruvato cinasa tiene un requerimiento absoluto de K^+ . La actividad de la piruvato cinasa sin y con 100 mM de K^+ fue de 0.07 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ y de 250 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ respectivamente. La cinética de saturación de K^+ fue Michaeliana y presentó una K_m de 48 mM.

La piruvato cinasa atrapada en micelas invertidas constituídas por bromuro de cetiltrimetilamonio, octano y hexanol o en un medio con dimetil sulfóxido presentó una actividad independiente de K^+ . Esta actividad alcanzó su valor máximo en micelas con 4% de agua y en dimetil sulfóxido al 40% (12-14 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$). En micelas invertidas con 3.6% de agua, 5 mM de KCl incrementó la actividad de PK 3 veces (35 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$). En dimetil sulfóxido al 40%, 400 μM de KCl incrementó la actividad cerca de 5 veces (54 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$). La cinética de saturación del K^+ se ajustó al modelo de inhibición por sustrato en ambos sistemas. En micelas invertidas con 3.6% de agua, la K_m del K^+ fue de 1.6 mM y la K_i de 4 mM. En dimetil sulfóxido al 40% su K_m fue de 95 μM y su K_i de 0.85 mM.

Los datos de fluorescencia intrínseca indicaron que la PK en DMSO al 40% en ausencia de K^+ , Mg^{2+} y PEP presentó una conformación activa, parecida a la que muestra la enzima en 100% de agua con sus ligandos. Asimismo, los estudios de resonancia magnética nuclear con Mn^{2+} sobre el ambiente del sitio activo indicaron que en DMSO al 40%, el complejo ternario PK-PEP- Mn^{2+} era equivalente al complejo cuaternario PK- K^+ -PEP- Mn^{2+} en 100% de agua.

V. Bo
M. Truena

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou y al Dr. Armando Gómez Puyou .

A Adrián Kornhauser Eisenberg.

A mis amigos.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
AOT	Sodio-bis [2-etilhexil] sulfosuccinato
ATP	Adenosín trifosfato
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
ESEEM	<i>Electron spin echo envelope modulation</i>
IR	Infrarrojo
NMR	Resonancia magnética nuclear
PEG	Poli(etilenglicol)
PEP	Fosfoenolpiruvato
PK	Piruvato cinasa
PRR	Velocidades de relajación longitudinal de los protones del agua
RNA	Acido ribonucleico
TMACl	Cloruro de tetrametil amonio

INDICE

Antecedentes	
Interacciones agua proteína	3
Modulación de la función enzimática por el agua	9
Micelas invertidas	13
Las proteínas en micelas invertidas	17
Sistemas con baja actividad de agua	18
Las proteínas en sistemas con baja actividad de agua	24
La piruvato cinasa	27
Efecto del K^+	28
Efecto del Mg^{2+}	30
Estructura y aminoácidos que participan en la catálisis	32
Objetivos	39
Resultados del sistema de micelas invertidas no publicados	40
Materiales y métodos	41
Resultados y discusión	
Actividad de la piruvato cinasa independiente de K^+	44
Cinética de la activación de la piruvato cinasa por K^+ en 100% de agua y mezclas binarias agua-DMSO	46
Perfiles de pH de la actividad de la piruvato cinasa en 100% de agua y en 40% DMSO	48
Velocidades de relajación de los protones del agua por pulsos de resonancia magnética nuclear en el sitio activo de la piruvato cinasa en 100% de agua y en 40% DMSO	50
Fluorescencia intrínseca de la piruvato cinasa en 100% de agua y 30% DMSO ..	52
Conclusiones	58
Referencias	59
Apéndice	69

ANTECEDENTES

Interacciones Agua-Proteína:

El agua juega un papel fundamental en los sistemas biológicos, ya que participa, directa o indirectamente, en todas las interacciones no covalentes que mantienen la conformación nativa y catalíticamente activa de las enzimas (Klibanov, 1986a). La presencia de moléculas de agua alrededor de la proteína contribuyen a estabilizar su conformación nativa así como las interacciones de van der Waals, los puentes salinos y los puentes de hidrógeno (Zaks, 1992). Es indudable que para comprender la función biológica de las enzimas es necesario el conocimiento de las interacciones del "agua unida" a ellas y cómo ésta afecta su conformación y su dinámica. El término "agua unida" se ha usado para describir la fracción de agua que está firmemente asociada a la superficie de una proteína y se refiere a la fracción de agua que no se congela cuando una proteína se enfría a temperaturas por abajo de -40°C . Se supone que dicha fracción de agua no adopta una estructura de hielo por la perturbación que ejerce sobre ella la superficie de la proteína (Kuntz y Kauzmann, 1974; Finney, 1978; Finney y cols, 1980). Se han utilizado diversas técnicas físicas para definir la naturaleza y la extensión de las interacciones específicas del agua con los grupos de la superficie de las proteínas: análisis de espectros de infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido, resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X y de neutrones, entre otras. En 1974, Kuntz y

Kauzmann sugirieron que la capa de hidratación que rodea a las proteínas está compuesta de varios tipos de agua. Suponen que unas cuantas moléculas de agua (de 10 a 20) por molécula de proteína, están fuertemente unidas a sitios específicos, es decir unidas al sitio activo, al interior de la proteína o bien unidas a iones metálicos; estas moléculas de agua fijadas a la proteína son fácilmente localizables por estudios estructurales. Sobre esta capa se encuentra otra (de cientos a miles de moléculas de agua), con una velocidad de rotación y de difusión mayor que la de la proteína, y que muestra un intercambio rápido con las moléculas de agua del solvente. Esta capa de hidratación contribuye de manera importante en las propiedades hidrodinámicas y en el espectro de infrarrojo de la proteína; se supone que ésta es el agua que no se congela. El agua que se encuentra fuera de estas capas muestra propiedades similares a las de agua libre.

Una pregunta que surge de todo lo anterior es la de tratar de explicar cómo la capa de hidratación participa en la función de la proteína. Para abordar este problema, varios grupos utilizaron muestras de enzimas liofilizadas que fueron hidratadas parcialmente en una atmósfera controlada. De esta manera, Careri y cols (1980) y Rupley y cols (1983) estudiaron el proceso de hidratación de la lisozima utilizando técnicas de espectroscopía de infrarrojo (IR), medidas de relajación de resonancia paramagnética del electrón (EPR), capacidad

calorífica y actividad enzimática. Estos autores observaron tres estados en la medida que aumentaba la hidratación de la proteína:

1. Entre 0 y 0.07 g de agua/g de proteína se observó una interacción del agua con sitios de unión fuerte, principalmente grupos cargados.
2. Entre 0.07 a 0.25 g/g se detectó saturación del resto de los sitios polares, probablemente asociados con la formación de agregados de moléculas de agua. A 0.2 g/g apareció actividad enzimática. La hidratación a 0.25 g/g produjo un aumento en la movilidad de un marcador de EPR unido a la proteína y un aumento en la actividad enzimática.
3. Entre 0.25 y 0.38 g/g, se hidrataron los sitios de unión débil formados por los grupos polares de la superficie. A 0.38 g/g, la proteína se encuentra completamente hidratada (300 moles de agua/mol de lisozima). Esto podría formar una monocapa de agua si se distribuyera por toda la superficie de la molécula proteica.

Del mismo modo, Yang y Rupley (1979) y Finney y Poole (1984) estudiaron el proceso de hidratación de la lisozima seca y observaron:

1. Entre 0.0 y 0.1 g de agua/g de proteína, el agua produce hidratación de los grupos cargados de la proteína seguida de la de los grupos polares. Hay formación de agregados de agua. En la proteína se redistribuyen los grupos polares, lo que restaura su pK normal. Entre 0.07 y 0.1

g/g, la proteína empieza a "relajarse", es decir, se presenta un incremento en el movimiento interno de la proteína.

2. Entre 0.1 y 0.2 g de agua/g de proteína, el agua satura los grupos ácidos y las cadenas laterales polares de la proteína, se inicia la movilización de los agregados de agua y se saturan las cadenas laterales polares de la proteína. En la proteína se observan cambios conformacionales de las cadenas laterales y del esqueleto polipeptídico. A 0.2 g/g se expresa la actividad enzimática.

3. Entre 0.2 y 0.3 g de agua/g de proteína, el agua satura los grupos -NH- del enlace peptídico (0.26 ± 0.02 g/g) y aparece la condensación y rearrreglo de su estructura. A 0.25 g/g, se observa un incremento en la movilidad proteica, que se acerca a la que se observa en solución. A este nivel de hidratación la actividad catalítica aumenta hasta que se forma una monocapa de moléculas de agua alrededor de la enzima.

4. Entre 0.3 a 0.4 g de agua/g de proteína, el agua produce saturación de los grupos -CO- del enlace peptídico (0.32 ± 0.02 g/g), se forma una monocapa de agua sobre los grupos polares y se inicia la cobertura de la superficie apolar.

5. De 0.4 a 0.5 g de agua/g de proteína se completa una monocapa de hidratación, que corresponde a 380 moléculas de agua/molécula de lisozima.

Finney y Poole señalaron que en la región de 0.07 a 0.10 g de agua/g de proteína ocurre un cambio en la dinámica de la proteína que resulta en un "aflojamiento" de la estructura. A este nivel de hidratación la ionización de los grupos ácidos y su hidratación es casi total. Esto sugiere que este nivel de hidratación es necesario para que la proteína pase de un estado relativamente rígido a una estructura relajada con una flexibilidad que permita la hidratación de los grupos amido y pequeños cambios conformacionales que se relacionan con la actividad catalítica o son necesarios para ella (Poole y Finney, 1983).

En otro estudio, Brooks y Karplus (1989) utilizaron el método estocástico de frontera (SBMD), para determinar la influencia del solvente sobre la dinámica y la estructura local de los átomos proteicos en el sitio activo de la lisozima. Los autores examinaron también los detalles de la estructura del solvente y su dinámica del solvente en la vecindad de los átomos de la proteína. Observaron que el agua cercana a los grupos apolares presenta características diferentes a las del agua libre o a las del agua cercana a los grupos polares o cargados. El agua que solvata los grupos apolares tiene una movilidad reducida debida a la formación de una estructura de red de solvatación que es significativamente diferente a la del agua libre.

Por medio de métodos de difracción de rayos X y de neutrones se puede obtener información estructural acerca de las interacciones proteína-agua. Estos resultados estructurales se pueden usar para entender la geometría de solvatación de los diferentes

grupos de las biomoléculas. Las características geométricas (restricciones estereoquímicas) de moléculas pequeñas se pueden usar para analizar el efecto del solvente en las proteínas y modelar las interacciones en la interfase (Teeter, 1991; Savage & Finney, 1992). Los cristales de crambina e insulina son algunos ejemplos de análisis de alta resolución en los que se han caracterizado bien las regiones del solvente. Ambos cristales presentan 30% de agua, que para la crambina representa cerca de 91 moléculas de agua y para la insulina 283 por molécula proteica. Prácticamente todas las moléculas de agua han sido localizadas tanto para la crambina (a 130°K y 0.83 Å de resolución) como para la insulina (a 300 °K y 1.5 Å de resolución) (Baker, y cols., 1988); a pesar de la gran movilidad de algunas de ellas, como lo muestran los factores vibracionales (valores B) de las 283 moléculas de agua de la insulina que variaron de 12 a 105 Å². Las moléculas de agua en los cristales de la crambina presentan factores vibracionales menores que para la insulina. Las moléculas de la primera capa (aquellas unidas a la proteína) y las de la segunda capa de hidratación tienen un valor promedio de B de 11 Å² y de 19 Å² respectivamente. Aproximadamente 2/3 de las moléculas de agua están en la primera capa, 1/3 en la segunda y una molécula de agua en la tercera capa.

Un buen ejemplo cómo las variaciones en la hidratación de una proteína producen perturbaciones estructurales, es un estudio realizado con cristales de lisozima en un ambiente reducido de agua (Kodanpani y cols., 1990). La humedad relativa de los cristales se mantuvo

en 88%. En estas condiciones se analizó la estructura de esta enzima por difracción de rayos X con el objeto de explorar las perturbaciones que la hidratación producía sobre la conformación de la proteína; se observó que esta hidratación producía perturbaciones estructurales de la enzima; las perturbaciones más pronunciadas involucraron las regiones de unión al sustrato. Asimismo, por medio de experimentos de resonancia magnética nuclear se han logrado localizar moléculas de agua del solvente en la superficie y en el interior de la proteína, así como conocer su dinámica de intercambio (Kubinec & Wemmer, 1992).

Modulación de la función enzimática por el agua.

Una de las metas de la enzimología moderna consiste en obtener enzimas capaces de llevar a cabo reacciones que normalmente no ocurren en la naturaleza; en otras palabras, se intenta obtener enzimas que hayan perdido la especificidad por su sustrato, o enzimas cuya especificidad o requerimientos para la catálisis sean diferentes. Este problema se ha abordado por medio de dos enfoques experimentales; en uno se producen modificaciones a la proteína *per se* mientras que en el otro se intenta cambiar su comportamiento, alterando las propiedades del solvente de su entorno.

A continuación se mencionan algunos ejemplos de la utilización de la ingeniería genética basados en la estructura cristalográfica de las enzimas. Se ha transformado la deshidrogenasa

láctica de *Bacillus stearothermophilus* en deshidrogenasa málica al sustituir la Gln 102 por Arg. Esta mutante se hace 8400 veces más eficiente por oxaloacetato que por piruvato (Wilks y cols, 1988). Asimismo, las propiedades de especificidad de dos proteasas de serina que son funcionalmente diferentes, la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y de *Bacillus licheniformis*, muestran propiedades similares cuando se sustituyen tres aminoácidos de la primera enzima que representan menos del 4% de las diferencias en secuencia entre las dos proteasas (Wells y cols, 1987). En otro estudio realizado con subtilisina, se reemplazó una Gly conservada, situada en la base del sitio de unión del sustrato, por 12 diferentes aminoácidos no iónicos. Las enzimas mutantes muestran grandes cambios en su especificidad por el sustrato; estos se deben a impedimentos estéricos, combinados con un incremento de interacciones hidrofóbicas (Estell y cols., 1986). Por último, la sustitución de una metionina del sitio activo de la proteasa α -lítica por alanina permite que se acomoden sustratos de diferente tamaño. El análisis de cristalografía de rayos-X de las proteasas mutantes sugiere que esta disminución en la especificidad es consecuencia de la plasticidad estructural de dichas mutantes (Bone y cols., 1989).

Por otro lado, algunos ejemplos de la utilización del segundo enfoque han demostrado que sin sustituir aminoácidos en la estructura de la proteína, el cambio de la naturaleza del solvente tiene un efecto profundo sobre la especificidad de los sustratos, la

enantioselectividad y la selectividad de las enzimas por una región específica de sus sustratos. Así, la α -quimotripsina, la subtilisina y la carboxiesterasa de hígado de porcino presentan diferencias en la utilización de los sustratos al reemplazar el agua por octano como medio de reacción. En éste, los sustratos específicos en sistemas totalmente acuosos se utilizan con baja eficiencia en el solvente orgánico (Zaks y Klivanov, 1986). En otro estudio se muestra cómo se invierte la especificidad de la subtilisina de Carlsberg (de Ser a Phe) inducida por el paso de *ter*-butil metil éter a *ter*-butilamina (Wescott y Klivanov, 1993). Asimismo, el solvente orgánico induce alteraciones en la especificidad por el sustrato de la peroxidasa de rábano. La partición de los sustratos fenólicos hidrofóbicos al sitio activo de la enzima es muy pobre en solventes orgánicos hidrofóbicos, lo que conduce a un valor de V_{max}/K_m bajo. Así pues, las eficiencias catalíticas de la enzima disminuyen conforme la hidrofobicidad del sustrato y del solvente se aumentan (Ryu y Dordick, 1989). La enantioselectividad de la subtilisina de Carlsberg, de la quimotripsina y de la proteasa α -lítica se pierde conforme la hidrofobicidad del solvente aumenta. Así pues, los D-aminoácidos son sustratos casi tan efectivos como los L-aminoácidos (Margolin y cols, 1987). La selectividad de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* y de la lipasa de la lipoproteína de *Pseudomonas* por una región específica de su sustrato se invierte al transferirlas de tolueno a acetonitrilo como medio de reacción (Rubio y cols, 1991). Más aún, cuando el medio acuoso de reacción se sustituye por un solvente orgánico apolar,

las enzimas son capaces de llevar a cabo transformaciones termodinámicas que son difíciles en soluciones acuosas. A este respecto el grupo de Klibanov observó la reacción de transesterificación entre el tributiril glicerol y varios alcoholes, catalizada por la lipasa pancreática, que en condiciones totalmente acuosas hidroliza al triacilglicerol, produciéndose un monoéster de ácido butírico y dibutirilglicerol (Zaks y Klibanov, 1984). En otro ejemplo, modificando el solvente del entorno de las proteínas fue posible conducir reacciones que en un medio totalmente acuoso no ocurren. De este modo, la quimotripsina pancreática de bovino suspendida en propanol y en presencia de N-acetil-D-triptofano es capaz de aceptar la forma D del aminoácido como sustrato para sintetizar N-acetil-D-triptofano etil ester en presencia de N-acetil-D-triptofano 20 mM, etanol 3.4 M y ciclohexano como medio de reacción. Los autores proponen que cuando la enzima se suspende en las condiciones antes mencionadas, la enzima adopta la conformación activa que acepta al derivado D del triptofano, y que esta conformación solo puede existir en el solvente orgánico donde el bajo contenido de agua reduce la movilidad de la cadena polipeptídica, previniendo así la restauración de la conformación nativa que la enzima adquiere normalmente en una solución acuosa (Ståhl y cols., 1990). Con estos antecedentes se consideró en el presente trabajo que los requerimientos para la catálisis que una enzima muestra en agua podrían ser modificados al transferirla a un ambiente de bajo contenido de agua o de baja actividad de agua. Para ello,

se estudió la piruvato cinasa siguiendo dos enfoques experimentales: transferir la enzima a micelas invertidas y sustituir agua del medio en que está la enzima por un solvente orgánico, utilizando principalmente el dimetil sulfóxido (DMSO).

Micelas invertidas

En una mezcla de tensoactivo, agua y un solvente orgánico apolar se pueden formar espontáneamente soluciones isotrópicas, transparentes y fluidas, llamadas micelas invertidas, que contienen en su interior una gota de agua de tamaño menor de $0.1\mu\text{m}$ (Friberg y Bendiksen, 1979).

Las características de las micelas formadas son producto de la interrelación determinada por la estructura molecular de los componentes de la solución y las interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido) presentes entre los diferentes componentes del sistema (Luisi y Magid, 1986)). Las propiedades del solvente en solución determinan el tipo de micela que se forma. Esto se debe a que la disposición espacial de los grupos químicos del solvente determina las interacciones solvofóbicas dominantes en la interfase formada por el solvente orgánico y el extremo apolar del tensoactivo (Luisi y cols (1988)) Las micelas se pueden formar a partir de solventes completamente diferentes, tales como hidrocarburos (octano, benceno, tolueno) alcoholes de cadena larga (hexanol, heptanol, octanol) y mezclas de solventes. Los tensoactivos, son

moléculas anfífilas que orientan sus grupos polares hacia el interior acuoso de la micela, mientras que la región apolar se encuentra en contacto con el solvente orgánico. De esta manera, los tensoactivos separan los compartimentos acuoso y orgánico del sistema. Es por esto, que la estructura y las propiedades químicas de estas moléculas modulan y determinan el equilibrio entre ambas fases (Visser y cols. (1988)). Tanto las identidades moleculares de las regiones polar y apolar de la molécula, así como las interacciones específicas de estas dos regiones con el agua y el solvente orgánico determinan el grado de hidratación del tensoactivo y la solubilidad del tensoactivo en el medio orgánico y por tanto, el número de agregación del tensoactivo (número de moléculas de tensoactivo que forman una micela). Se pueden usar tensoactivos aniónicos, como el AOT (sodio-bis [2-etilhexil] sulfosuccinato), catiónicos, como el CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), no iónicos, como el Tritón X-100 (octilfenoxipoli[etoxietanol]) o zwitteriónicos, como la fosfatidil etanolamina y la fosfatidil colina.

Una característica importante de las micelas invertidas es que sus dimensiones varían al cambiar la concentración del agua o del tensoactivo en el solvente orgánico. Mientras mayor sea la cantidad de agua en el sistema, mayor será el radio de la partícula micelar. Por el contrario, si la concentración del tensoactivo se aumenta, las micelas se hacen más pequeñas, y si el cociente de las concentraciones de ambos componentes permanece constante, las

micelas tienen el mismo tamaño, pero varía su número (Martinek y cols, 1989b). Un parámetro importante, denominado W_o o R que da idea del tamaño de las micelas es la relación entre el número de moléculas de agua y las del tensoactivo.

El agua contenida en el interior de la micela difiere del agua libre en muchas de sus propiedades fisicoquímicas. Menger y cols (1973) determinaron la polaridad del agua micelar del sistema -agua-octano-di-2-etilhexil sulfosuccinato de sodio y obtuvieron valores que fueron intermedios entre los del metanol y los del agua. Los mismos autores encontraron constantes dieléctricas de 2.33, 2.47, 2.7 y 4.9 para micelas que contenían 1.0, 2.9, 5.8 y 16.7% de agua, respectivamente; estos valores son significativamente menores de los del agua libre ($\epsilon=78.5$). Tsuji y cols (1983) encontraron que la viscosidad aparente del agua corresponde a la de una solución de glicerol al 78%. Estas propiedades cambian con el W_o y con la distancia entre las cabezas polares del tensoactivo y el centro de la micela invertida (Waks, 1986).

En el sistema micelar, las cabezas polares de los tenso activos están fuertemente unidas a moléculas de agua. Se ha estimado que el grosor de esta capa de agua unida es de aproximadamente 4 Å (Maitra, 1984). Una vez terminada la solvatación del tensoactivo empieza a aparecer el agua libre formando una microfase independiente. Las determinaciones de la actividad de esta agua *versus* W_o muestra una curva hiperbólica, que alcanza un valor

mayor a 0.98 a un $Wo=10$ para el sistema de AOT (Higuchi y Misra, 1962). De esta manera, a medida que aumenta el grado de hidratación, las diferencias entre las propiedades del agua micelar y las del agua libre disminuyen (Martinek y cols, 1986; Martinek, 1989a). Utilizando resonancia magnética nuclear (NMR) se ha determinado la movilidad de los protones del agua micelar. El desplazamiento químico (δ) del 1H del agua y el tiempo de relajación del spin dependen del Wo . A Wo menores de 6 el agua está fundamentalmente unida; por arriba de este Wo el valor de δ tiende hacia el del agua libre (Wong y cols., 1977; Thompson y Gierasch, 1984).

Las micelas invertidas son entidades dinámicas que intercambian el contenido de sus pozas de agua (si es el caso, enzima y/o sustrato), así como las moléculas de tensoactivo de la interfase con las del solvente orgánico libre. Varios estudios indican que el intercambio de moléculas pequeñas solubilizadas, por ejemplo, iones de diferente tamaño y carga, entre las micelas invertidas suelen ser mucho más rápido que cualquier reacción química en la que participen las mismas moléculas (Fletcher y cols, 1985). Luisi y cols, (1988) observaron que las colisiones y el intercambio de moléculas entre las micelas ocurre en el orden de microseg por lo que las reacciones que tienen lugar en tiempos más largos del orden de mseg como la catálisis enzimática por ejemplo, no están limitadas por la transferencia de los reactivos.

No obstante que las micelas son entidades dinámicas, tienen una estructura relativamente ordenada, que se caracteriza por un diámetro de 10-200 Å, un peso molecular o número de agregación y una densidad de empaquetamiento definidos (Maitra, 1984; Luisi y Magid, 1986).

Las proteínas en micelas invertidas

Se han propuesto distintos modelos para representar una proteína en el interior de la micela, sin considerar sus dimensiones. Hay un acuerdo general que coloca a las proteínas solubles en agua, en la poza de agua de la micela invertida y a las proteínas lipofílicas asociadas con las cadenas hidrofóbicas de los tensoactivos o incluso capaces de ser transferidas al solvente orgánico (Luisi y cols., 1988).

Actualmente son numerosas las enzimas que se han solubilizado y estudiado en soluciones de micelas invertidas; se ha observado que muchas mantienen su actividad catalítica y su especificidad por el sustrato. Asimismo, los parámetros cinéticos (K_m y k_{cat}) de algunas de estas enzimas atrapadas en micelas invertidas son comparables con los obtenidos en soluciones acuosas (Luisi y cols., 1988; Martinek y cols., 1981). Otras en cambio, muestran bajas velocidades catalíticas que aumentan con la cantidad de agua en el sistema, tanto en las micelas con tensoactivos artificiales (Luisi y Magid, 1986; Martinek y cols., 1986; Fernández-Velasco y cols., 1992), como con fosfolípidos solos o con co-tensoactivo (Garza-Ramos y

cols, 1989, 1990, 1992; Escamilla y cols., 1989). Algunas cambian su especificidad por el sustrato, como la alcohol deshidrogenasa (Martinek y cols., 1982) y la lipasa pancreática (Malakhova y cols., 1983), o invierten la dirección de la reacción, como algunas hidrolasas (Lüthi y Luisi, 1984). De igual manera, se han descrito enzimas que rebasan la actividad que tienen en el agua mostrando una superactividad como la fosfatasa ácida, la peroxidasa y la α -quimotripsina (Martinek y cols, 1989b).

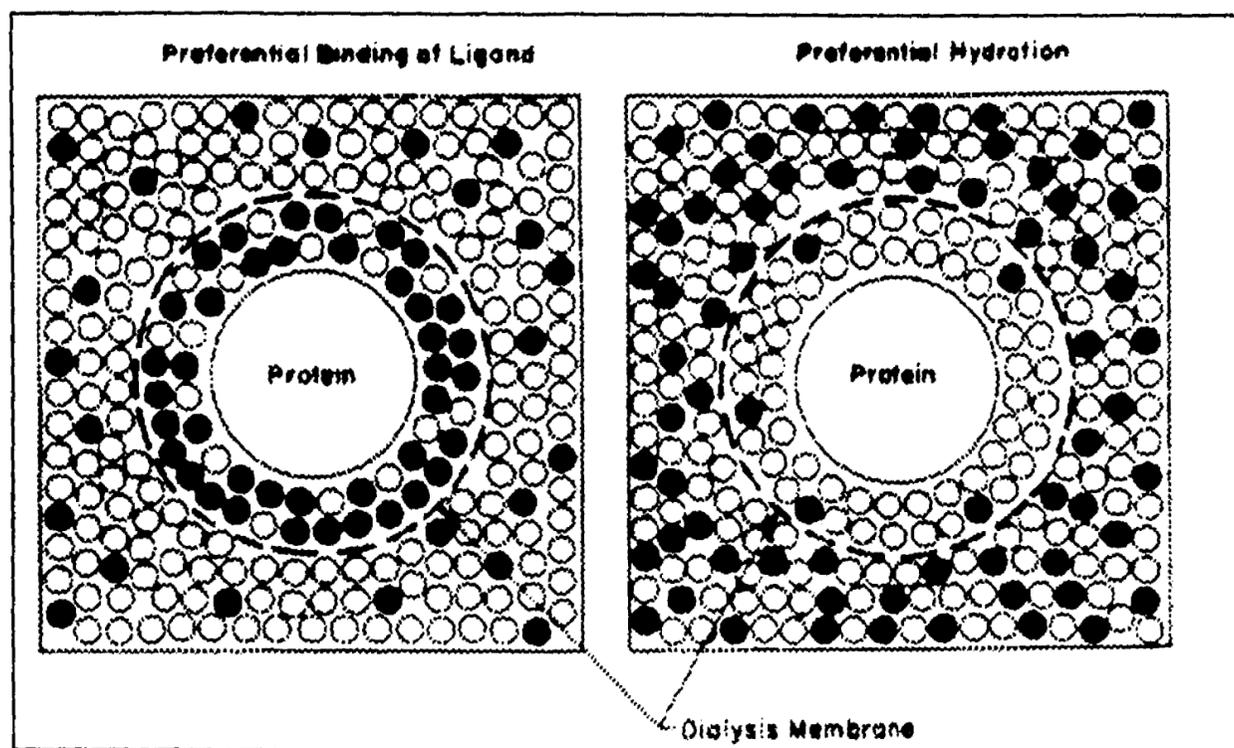
Sistemas con baja actividad de agua

El uso de diferentes mezclas de solventes orgánicos y agua ha conducido a una variedad de interesantes posibilidades en la conducta de las enzimas dependiendo de la miscibilidad del solvente con el agua y de la proporción relativa del solvente y del agua en el medio. Gupta (1992) ha clasificado los diversos sistemas que se han utilizado para estudiar a las enzimas en solventes orgánicos, de acuerdo con su contenido de agua de la siguiente manera:

Sistemas con bajo contenido de agua	Sistemas con alto contenido de agua
1. Enzimas en solventes casi anhidros	1. Sistemas de cosolventes (solventes orgánicos miscibles en agua)
2. Micelas Invertidas	2. Sistemas bifásicos orgánico-acuoso

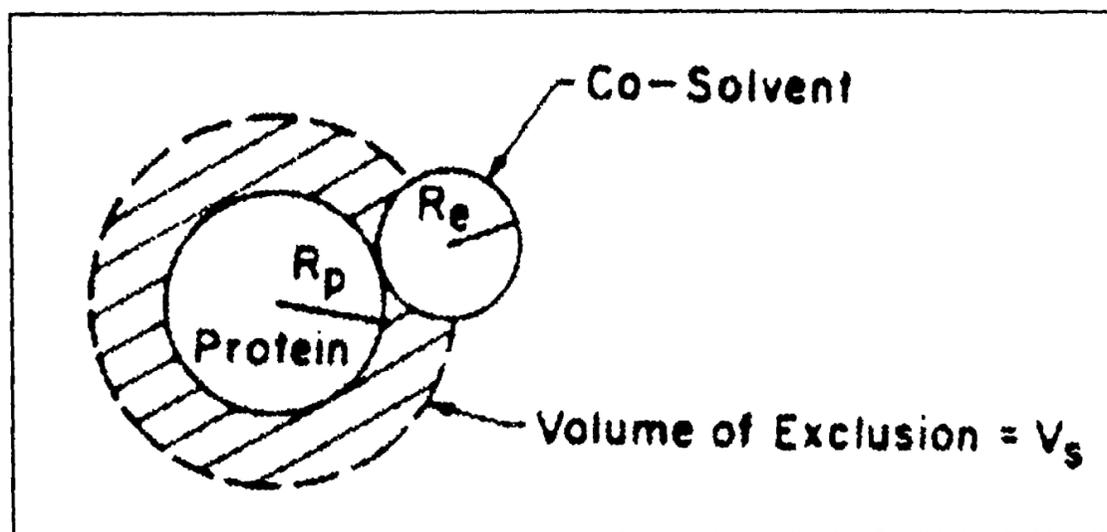
No obstante, Halling (1987) considera que en la descripción de los sistemas de bajo contenido de agua debe incluirse a todos aquellos donde, independientemente del contenido de agua, la actividad del agua (a_w) es significativamente menor de 1. Como en los sistemas a los que se les adicionan agentes que fijan agua, tales como DMSO, polioles o azúcares. Estos sistemas ofrecen una alternativa más para estudiar a las enzimas en ambientes con baja actividad de agua.

Estos sistemas con baja actividad de agua tienen en común que el agente adicionado está preferentemente excluido de la superficie de la proteína y actúa como estabilizador de la estructura (ver Esquema 1 ; Timasheff y Arakawa, 1989).



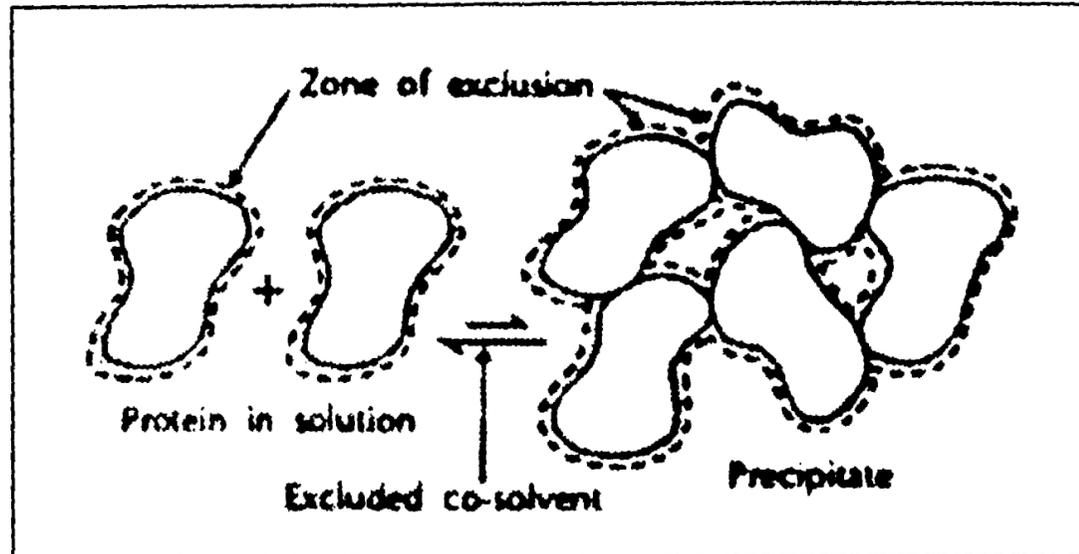
Esquema 1 Representación de la distribución del cosolvente en dialisis al equilibrio. A la izquierda del esquema se representa la unión preferencial del cosolvente a la superficie de la proteína; y a la derecha la hidratación preferencial de la proteína (Tomado de Timasheff y Arakawa, 1989)

Esta preferencia depende del balance entre las afinidades de la proteína por el agua y por el agente particular. Cuando el agente adicionado al agua tiene una exclusión preferencial de la superficie de la proteína puede deberse a que: a) su naturaleza química es inerte a la presencia de la proteína y el papel de ésta es únicamente presentar una superficie, o b) el agente reconoce algunas características químicas particulares de la superficie de la proteína con las que interactúa, ya sea por atracción o por repulsión. Para explicar la primera categoría (a), se aducen dos mecanismos principales: exclusión estérica y perturbación de la energía libre del agua superficial por el agente. La exclusión estérica es simplemente reflejo de la diferencia en tamaño entre las moléculas del agente y las moléculas del agua (Schachman y cols., 1949); dado que las moléculas del agente son más grandes que las del agua no pueden ponerse en contacto con la estructura de la proteína, así pues, se forma una capa de agua alrededor de la proteína que es impermeable al agente. Su grosor está determinado por la proximidad entre la proteína y el agente. Por el contrario, el tamaño menor de las moléculas de agua les permite penetrar dentro de esta capa, dando como resultado la formación de una zona enriquecida en agua alrededor de la proteína, que se traduce en una hidratación preferencial. Un ejemplo de este mecanismo se observa en los sistemas de agua- polietilenglicol (PEG) (Arakawa y Timasheff, 1985) ver Esquema 2.



Esquema 2. Representación del mecanismo de hidratación preferencial por exclusión estérica del cosolvente de la superficie de la proteína; R_e es el radio de exclusión del cosolvente; V_s es el volumen en el que hay un exceso de agua. (Tomado de Arakawa y Timasheff, 1985).

El efecto del PEG y de otros polímeros inertes en el auto ensamblaje de las proteínas se ha descrito en términos termodinámicos como una consecuencia del volumen de exclusión en la interacción proteína-PEG (Nichol y cols., 1981; Knoll y Hermans, 1983; Arakawa y Timasheff, 1985). Por otro lado, si un agente aumenta la tensión superficial del agua, su concentración en la capa superficial será menor que en el solvente libre. Este es el mecanismo que causa la exclusión preferencial de azúcares, aminoácidos y sales que estabilizan la estructura de las proteínas. De hecho, parece ser la causa más común de hidratación preferencial y por lo tanto de estabilización de proteínas por estos agentes (Timasheff, 1993) ver Esquema 3.



Esquema 3. Representación de una reacción de "salting-out"; la superficie de exclusión preferencial del cosolvente por molécula de proteína se reduce en el estado precipitado. (Tomado de Timasheff, 1993).

Otra característica que comparten estos agentes es que se requieren altas concentraciones (1-8 M). Por lo tanto, cualquiera que sea su interacción no puede ser ni fuerte ni específica (Timasheff, 1993). Estudios recientes de las interacciones de proteínas globulares solubles con agentes que estabilizan su estructura, inducen precipitación y aumentan los procesos de autoensamble, han mostrado que los tres procesos están gobernados por la misma serie de interacciones débiles (Arakawa y cols., 1990a y 1990b).

Por otro lado, las propiedades del agua en mezclas con solventes orgánicos son similares a las del agua unida a las proteínas, es decir, presión de vapor menor, menor movilidad y punto de congelación muy reducido. Las determinaciones de la viscosidad en mezclas de agua-solvente orgánico en un margen de temperaturas de 20-60°C han revelado que los polímeros de etilenglicol son más efectivos que el etilenglicol y el DMSO para "romper" la estructura

del agua, es decir en modificar el equilibrio entre el agua unida y el agua libre. Estos polímeros que rompen la estructura del agua parecen forzar la formación de una nueva estructura del agua que puede ser parecida a la del agua de solvatación (Ueberreiter, 1982). A continuación se muestran algunas otras de las modificaciones que sufre el agua por la adición de diferentes agentes, si se comparan con los valores de la actividad (A_w) (1) y la constante dieléctrica (ϵ) del agua (80.4).

Actividades del agua (A_w) y constantes dieléctricas (ϵ) en diferentes mezclas de agua y agentes que modifican sus propiedades.

Agente	A_w	ϵ
DMSO	¹ 0.74 (50% P/V; 25°C)	⁴ 78.5 (40% V/V; 25°C)
PEG	² 0.97 (50% P/V; 65°C)	
Glicerol	³ 0.81 (50% P/V; 30°C)	⁴ 68.5 (40% V/V; 25°C)
Sorbitol	³ 0.87 (50% P/V; 30°C)	
Sacarosa	³ 0.91 (50% P/V; 30°C)	
Etilenglicol		⁵ 61.1 (60% V/V; 25°C)

¹ Chan Van Hook (1976)

² Malcolm y Rowlinson (1957) PEG 3000-5000

³ Larreta-Garde y cols (1988)

⁴ Maurel (1978)

⁵ De Meis (1989)

⁶ Ueberreiter (1982)

Las proteínas en sistemas de baja actividad de agua

En los sistemas en que se han adicionado agentes que modifican la actividad del agua, las enzimas pueden mostrar cambios en su actividad y estabilidad. Un estudio realizado con la alcohol deshidrogenasa en sistemas de agua-sorbitol muestra que la selectividad catalítica de la enzima hacia diferentes sustratos se modifica. El sorbitol tiene dos efectos contrarios en la enzima: uno positivo que conduce a que la enzima adopte una conformación que es más afín por sus sustratos naturales, mientras que el efecto negativo es que la reacción enzimática se hace más lenta (Xu y cols., 1989). En otro estudio realizado en el mismo sistema con la piruvato cinasa (PK) de músculo de conejo, encontraron que 2M de sorbitol modifica su coeficiente de Hill (n_{Hill}) de 2.4 a 1.9 en ausencia de su activador monovalente NH_4^+ , por lo que suponen que el sorbitol induce un cambio conformacional en la enzima durante la catálisis (Xu y cols., 1990).

Utilizando los sistemas agua-PEG se han realizado diversos estudios; la adición de 10% de PEG-6000 al medio de la determinación de la PK de hígado conduce a una forma más activa

de la enzima que muestra mayor afinidad por el fosfoenolpiruvato (PEP) y menor sensibilidad a la inhibición por ATP, además de modificar su coeficiente de Hill. Los autores suponen que el cambio es mediado por agregación de la enzima inducido por el PEG. Cabe mencionar que la piruvato cinasa de músculo no se modificó por PEG (Medina y cols., 1985). En otro estudio realizado en presencia de 10% de PEG, la fosfofructocinasa de músculo muestra un gran incremento en su afinidad por la fructosa-6-P en ausencia de sus efectores alostéricos positivos. Al estudiar la fosfofructocinasa en presencia de altas concentraciones de la enzima se obtuvieron resultados similares del comportamiento enzimático. Con estos resultados, los autores proponen que el PEG favorece la agregación de la proteína (Boscá y cols., 1985). Asimismo, se usaron diferentes concentraciones de PEG-3350 para perturbar las interacciones entre la Rubisco y su activasa; los resultados muestran que el PEG causa reasociación de la activasa de Rubisco, estimulando las actividades de la ATPasa y de la activasa y aumenta la interacción entre la activasa y Rubisco (Salvucci, 1992). De igual manera, diversos agentes (PEG-8000, glicerol, etilenglicol y albúmina de bovino) activan a la piruvato cinasa del endospermo de semillas de *Ricinus communis*; alcanzando la mayor activación con PEG. La adición de 5% de PEG aumenta su V_{max} y disminuye su K_m por el PEP significativamente. Además, la adición del PEG en el amortiguador de elución durante la purificación de la

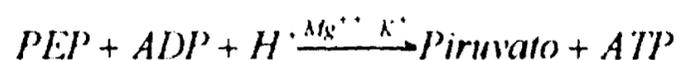
proteína ayuda a estabilizar la estructura tetramérica activa de la enzima (Podestá y Plaxton, 1993).

Se realizó un estudio del ciclo hidrolítico de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico en agua-DMSO. La velocidad de hidrólisis aumenta casi 4 veces con 15% DMSO en ausencia de Ca^{2+} , lo que se debe a un decremento en la $K_{m \text{ app}}$ por el ATP. Las concentraciones mayores de solvente inhiben la actividad de ATPasa dependiente de Mg^{2+} a la vez que producen una acumulación de la fosfoenzima. Los datos sugieren que la inhibición es congruente con un efecto del DMSO en el que se disminuye la velocidad de ruptura de la fosfoenzima (Carvalho-Alves y Scofano, 1987). Por otro lado, se ha encontrado que la adición de solventes orgánicos como el DMSO, el PEG, el etilenglicol y el glicerol a enzimas involucradas en procesos de transducción de energía decrece la $K_{m \text{ app}}$ por P_i varios órdenes de magnitud. Los datos obtenidos con la Ca^{2+} -ATPasa, Na^+/K^+ -ATPasa, F_1 y pirofosfatasa inorgánica sugieren que la estructura del agua en el sitio catalítico está involucrada en el proceso de transducción de energía (De Meis, 1989). En un medio de baja actividad de agua, como en el sitio catalítico, el producto fosforilado que se forma (ATP o pirofosfato) puede ser de baja energía y formarse espontáneamente; en tanto que en un medio de alta actividad de agua, como en un medio totalmente acuoso, la molécula formada adquirirá características de alta energía. La

energía de solvatación puede ser usada por la enzima para cambiar su conformación (De Meis, 1989).

La piruvato cinasa

La piruvato cinasa (ATP:piruvato fosfotransferasa, EC 2.7.1.40) (PK) es un homotetrámero de 237 kd; es la responsable de la segunda fosforilación a nivel de sustrato durante la glucólisis. La reacción que cataliza es esencialmente irreversible hacia la formación de ATP y piruvato (McQuate y Utter, 1959).

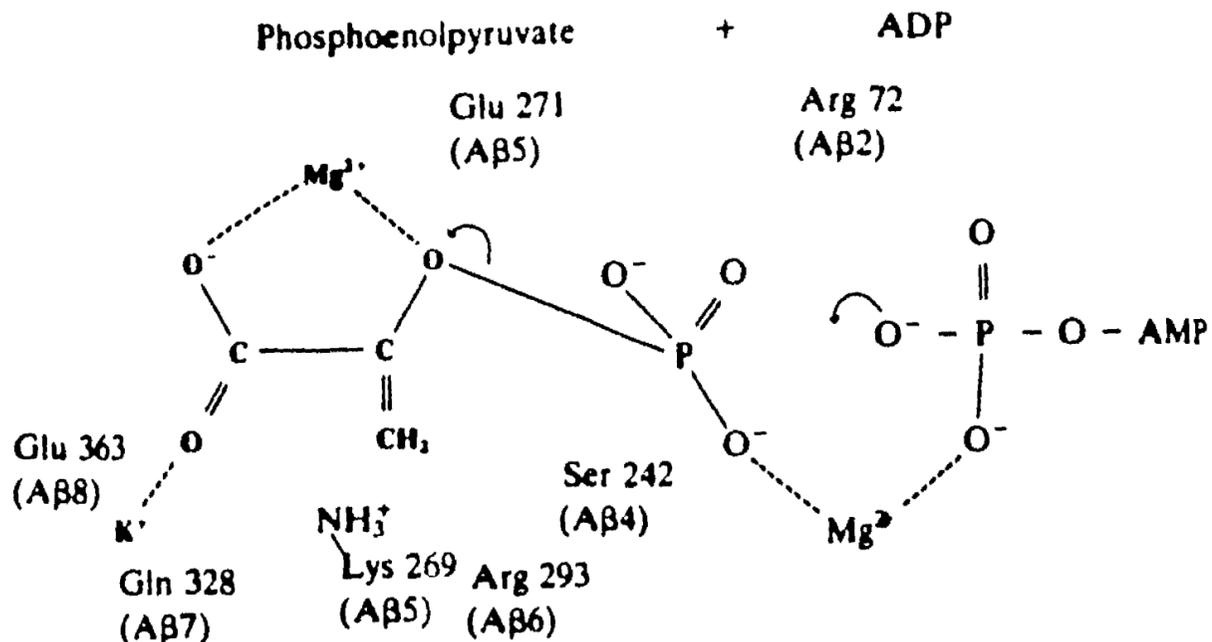


$$(K_{eq} = 6.45 \times 10^3, \text{ pH } 7.4)$$

Actualmente hay evidencia de que la reacción de la PK ocurre en dos pasos. El primer paso es la transferencia del fosfato del PEP al ADP para dar el enolpiruvato y el ATP (Seeholzer y cols., 1991). En el segundo paso, se añade un protón al enolato para producir la forma ceto del piruvato (Rose, 1970; Kuo y Rose, 1978; Kuo y cols., 1979).

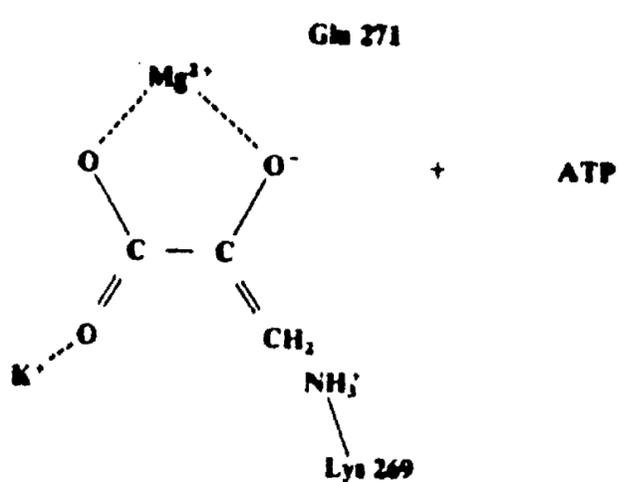
La PK fue la primera enzima en la que se demostró un requerimiento absoluto de un catión monovalente para la catálisis, (Boyer y cols., 1942). El catión con el que se obtiene la máxima activación es el K^+ , que puede ser parcialmente substituido por Rb^+ , NH_4^+ y Tl^+ (Kayne, 1971). Posteriormente se demostró el requerimiento de 2 equivalentes de catión divalente por

Mecanismo catalítico de la piruvato cinasa (Tomado de Muirhead, 1987)



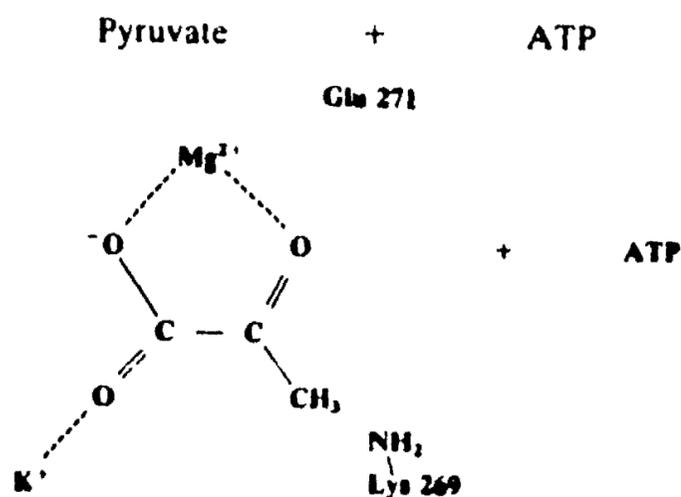
Paso 1 El PEP y el ADP se unen a la PK

- (a) El Pi es esencial para la unión correcta del piruvato
- (b) El K⁺ se une al Glu 363 y a la Gln 328
- (c) El Pi se une cerca de la Ser 242, la Arg 72, y la Arg 293
- (d) El PEP puede desplazar a una molécula de agua de la esfera de coordinación interna del Mg²⁺
- (e) El grupo fosfato se transfiere al ADP



Paso 2. Se forma el intermediario ATP-enolato

- (a) El enolato se estabiliza por Mg²⁺
- (b) Se forma el enolato de piruvato y ATP



Paso 3 La lisina aporta el protón que conduce a la formación del piruvato y ATP.

FALLA DE ORIGEN

sitio activo de la enzima (Gupta y cols., 1976; Gupta y Mildvan, 1977; Baek y Nowak, 1982); siendo máxima la actividad con Mg^{2+} (Mildvan y Cohn, 1965) y de la mitad con Mn^{2+} (Boyer, 1962).

Efecto del K^+

Actualmente se desconoce el mecanismo mediante el cual el K^+ activa a la enzima. Hay dos propuestas basadas en evidencias experimentales. La primera sugiere que el catión monovalente induce un cambio conformacional en la enzima que pasa de un estado inactivo a uno activo. Los datos que apoyan esta hipótesis son:

-La correlación entre la actividad enzimática y el radio iónico de los cationes, además de las altas concentraciones de los cationes monovalentes requeridas para obtener su máximo efecto (3-100 mM) (Kayne, 1971).

-La observación de que los cationes monovalentes activadores pueden modificar las propiedades espectroscópicas (Suelter y cols., 1966) e inmunolectrofóreticas de la enzima (Sorger y cols., 1965), así como las propiedades de resonancia magnética nuclear del complejo enzima- Mn^{2+} -sustrato (Mildvan y Cohn, 1964).

- Xu y cols. (1990) observaron que la PK de músculo del conejo tiene un coeficiente de Hill de 2.4 y 1.1 en ausencia y en presencia de 50 mM NH_4^+ . Con estos resultados suponen que el catión monovalente induce la forma catalíticamente activa del complejo enzima- Mg^{2+} -sustrato

y que esto se refleja en un incremento en la actividad y un decremento en el coeficiente de Hill.

La segunda propuesta atribuye un papel directo de los cationes monovalentes en la catálisis.

La evidencia experimental es la siguiente:

- Lowenstein (1960) sugirió un papel directo del K^+ en las reacciones de transfosforilación, sobre la base de que el K^+ estimula la fosforilación del ortofosfato por MnATP, mediante la formación de un complejo ternario con MnATP, que induce cambios conformacionales de la cadena del polifosfato del ATP, facilitando el ataque nucleofílico del ortofosfato.

- Suelter (1970) propone que el K^+ estabiliza el intermediario enolato formado durante la catálisis.

Además, existe evidencia experimental que puede interpretarse tanto a favor del papel catalítico directo del K^+ como del conformacional. Esta evidencia se basa en estudios de resonancia magnética nuclear. Reuben y Kayne (1971) observaron que la distancia promedio entre el $^{205}Tl^+$ y el complejo PK-Mn²⁺ es de 8.2 Å, y se reduce en presencia de PEP, a 4.9 Å. Los resultados de este trabajo claramente indican un cambio en la distancia internuclear del sitio del catión monovalente y del divalente al unirse el PEP. Esta diferencia en distancias representa un cambio conformacional en el sitio activo y ubica en o muy cerca del sitio activo al catión monovalente. En un segundo estudio se muestra que el K^+ aumenta 14 veces la

afinidad de PK-Mn²⁺ por el PEP, en tanto que el PEP a su vez también aumenta uno o dos órdenes de magnitud la afinidad de la PK por el K⁺ por uno o dos órdenes de magnitud, indicando una interdependencia en la unión de PEP y K⁺. Por otro lado, el K⁺ disminuye la afinidad de la unión de análogos o sustratos que no tienen grupo carboxilo. Los resultados parecen indicar que es el grupo carboxilo del PEP el que está coordinado con el K⁺ unido a la enzima y que esta coordinación cambia la conformación del complejo enzima-Mn²⁺-PEP a su forma catalíticamente activa (Nowak y Mildvan, 1972). Además, hay otros trabajos utilizando NMR (Raushel y Villafranco, 1980), acoplamiento superhiperfino de EPR de Tl⁺ (Lord y Reed, 1987) y determinaciones de ESEEM (Tipton y cols., 1989), que muestran que existe proximidad física entre el catión monovalente y el sitio de unión del Mn²⁺ a la enzima.

Efecto del Mg²⁺

Mildvan y cols. (1976) han estudiado las conformaciones de varios sustratos que se fijan a la PK utilizando marcadores paramagnéticos unidos a dos sitios de la enzima de músculo de conejo; Mn²⁺ ó Co²⁺ en el sitio del catión divalente y Cr³⁺ unido al ATP. A pesar de que el Cr³⁺-ATP tridentado no es sustrato para la reacción de transferencia del fosfato, promueve la enolización catalizada por la enzima en presencia de K⁺ y Mg²⁺. Estos resultados demuestran que la PK de músculo de conejo requiere dos cationes divalentes por sitio activo para la catálisis de la enolización del piruvato en presencia de ATP. Un catión divalente (sitio 1) está

fuertemente unido a la enzima; en tanto que el segundo catión (sitio 2) está directamente coordinado con los grupos fosfato del ATP y no interactúa directamente con la enzima. El papel esencial del catión bivalente en el sitio 1 se muestra en el requerimiento del Mg^{2+} o del Mn^{2+} en la reacción de enolización del piruvato en presencia del complejo inerte Cr^{3+} -ATP. El del catión en el sitio 2 se hace evidente por la dependencia sigmoide de la velocidad de detritiación del piruvato *versus* la concentración de Mn^{2+} en presencia de altas concentraciones de enzima y de ATP. La electrofilicidad del metal unido al nucleótido determina la velocidad de enolización del piruvato. Ambos cationes divalentes son necesarios para la enolización del piruvato así como para la reacción de transferencia (Gupta y cols., 1976; Dunaway-Mariano y col., 1979). Otros estudios proponen que el catión divalente en el sitio 2 puede inducir una distorsión electrónica del sustrato al estar coordinado con el metal. El catión puede servir como poza de electrones al remover y retornar alternadamente electrones de los sustratos para estabilizar el estado de transición, o bien puede neutralizar la carga neta de aniones tales como el ADP y el ATP, reduciendo las repulsiones electrostáticas y aumentando consecuentemente la velocidad del ataque nucleófilico sobre el fosfato electrofilico. Otra posibilidad es que estabilice los grupos salientes piruvato y ATP (Muirhead, 1987).

Estructura y aminoácidos que participan en la catálisis.

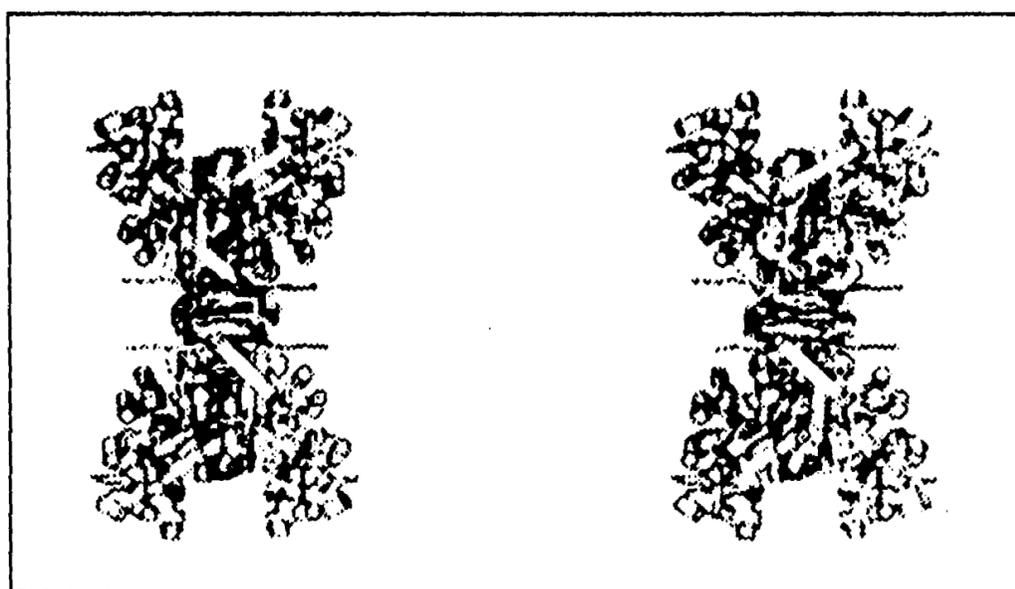
En los mamíferos existen cuatro isoenzimas de la piruvato cinasa con propiedades cinéticas distintas, dependiendo del tejido del que procedan, y que refleja los diferentes requerimientos metabólicos de los tejidos. La isoenzima M1 se encuentra en el músculo esquelético, y muestra una cinética predominantemente hiperbólica. Las otras isoenzimas; M2 en el riñón, el tejido adiposo y el pulmón; L en el hígado y R en los eritrocitos, se regulan alostéricamente y muestran una cinética sigmoide con respecto al PEP (revisado por Hall y Cottam, 1978). Además de una variedad de efectores alostéricos como la fructosa 1,6-difosfato, PEP, ATP, fenilalanina., la isoenzima de hígado puede ser regulada por fosforilación. En ésta, la fosforilación de una serina cercana al NH₂-terminal conduce a una disminución de la actividad que se revierte por defosforilación. Los otros tipos de piruvato cinasas tienen diferentes secuencias NH₂-terminales y no se regulan por fosforilación.

La expresión de las cuatro isoenzimas de PK de tejidos de mamíferos es de particular interés; hay un gene único para codificar las isoenzimas M1 y M2 (Peters y cols., 1981) pero dos RNA_m (Noguchi y Tanaka, 1982). De igual manera, las isoenzimas L y R están codificadas en un sólo gene que da lugar a dos RNA_m (Marie y col., 1981).

Se conoce la secuencia de aminoácidos (cerca de 500 residuos por subunidad) de las cuatro isoenzimas de mamífero (Lonberg y Gilbert, 1983; Muirhead y cols., 1986; Inoue y

cols., 1986; Lone y cols., 1986; Noguchi y cols., 1986) así como las de otros organismos representantes de un amplio margen filogenético (Fothergill-Gilmore y Michels, 1993).

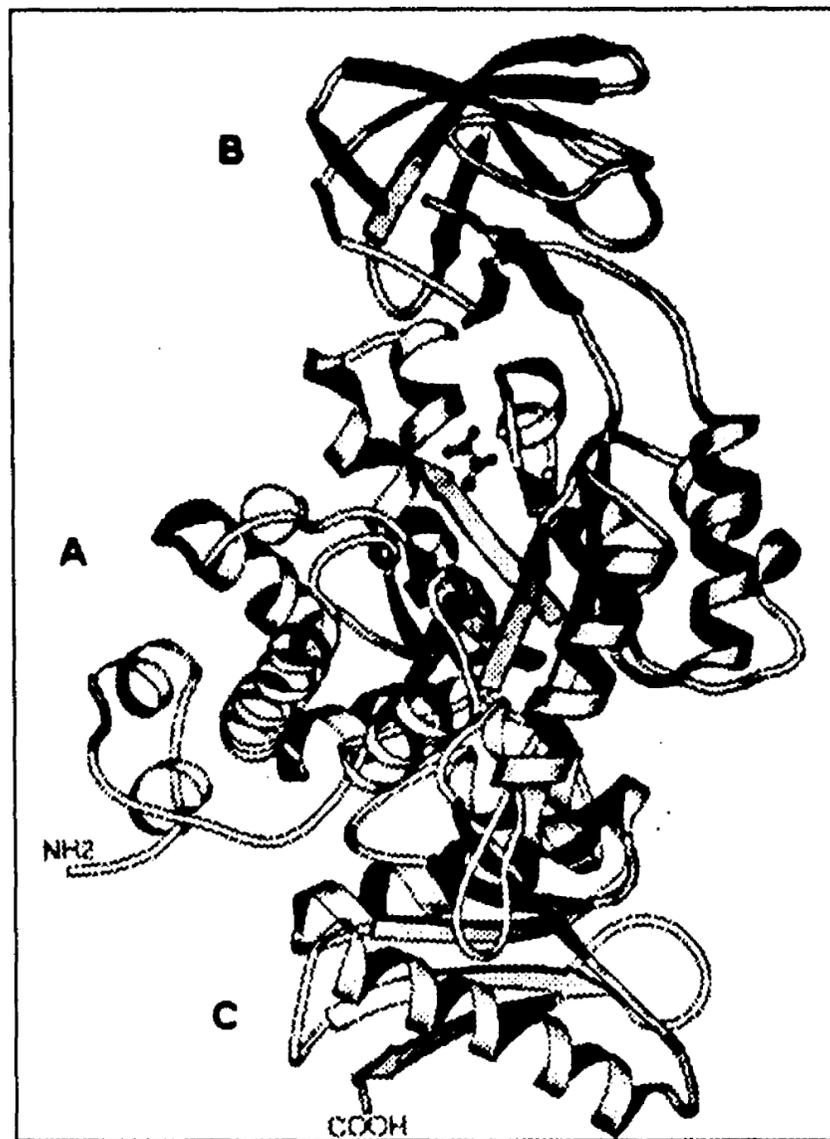
Se han obtenido cristales de piruvato cinasas de hígado, de levadura y de músculo de humano, pero hasta el momento, los únicos cristales que se han encontrado adecuados para estudios de difracción de rayos X han sido los de las isoenzimas de músculo de gato y de conejo. La estructura tridimensional de la apoenzima de músculo esquelético de gato se resolvió a 2.6 Å por el grupo de Muirhead hace varios años (Stuart y cols., 1979; Muirhead y cols., 1987). Las dimensiones globales de la molécula tetramérica son 75 Å, 95 Å y 125 Å. Las subunidades se empacan cerca del centro del tetrámero y existen grandes áreas de cada subunidad que quedan expuestas al solvente (ver Esquema 4).



Esquema 4. Representación estereoscópica del tetrámero de la enzima cristalina de la piruvato cinasa de músculo de gato. Los dominios C están en el centro del tetrámero. los A forman el centro de cada subunidad, y los dominios B flexibles son los mas alejados del centro. El dominio N-Terminal está entre los dominios A y C y el sitio activo entre los A y B. (Tomado de Muirhead, 1987)

La forma global de la subunidad es casi una elipse, con una sección circular cruzada de 45 Å de diámetro y una longitud perpendicular a ésta de 75 Å. La densidad electrónica en la región más alejada del centro del tetrámero (dominio B) es más débil que en el resto de la subunidad y muestra desorden. Cada subunidad comprende cuatro dominios: un dominio NH₂-terminal (residuos 1-42), y dominios A (43-115, 224-387), B (116-223) y C (338-530). Hay una unión covalente entre el dominio NH₂-terminal y el dominio A, dos entre los dominios A y B y una entre los dominios A y C. El dominio A es un barril simétrico formado por ocho unidades α/β . El dominio B se forma entre la tercera hoja β y la tercera hélice α . La parte central de este dominio consta de dos hojas β antiparalelas. El dominio C consta de dos largas α hélices antiparalelas seguidas por una hoja β torcida y rodeada por tres hélices. El sitio activo se encuentra en una hendidura entre el dominio A y el B y el segundo sitio de unión al nucleótido entre el dominio A y el C (ver Esquema 5). Se utilizó el átomo pesado Gd³⁺ para ubicar la posición de uno de los cationes divalentes esenciales. Muirhead (1986) infirió los sitios potenciales de unión de sustratos y cofactores con base en los datos obtenidos de rayos X de cristales embebidos en soluciones de los respectivos ligandos (Stammers y Muirhead 1975; Muirhead y cols., 1981). No obstante, la asignación específica de los residuos del sitio catalítico continúan siendo tentativos debido a la baja resolución de estos datos

cristalográficos (6 Å) y las altas concentraciones de sulfato de amonio en las aguas madres de los cristales que aparentemente interfirieron en la unión de los sustratos y activadores.



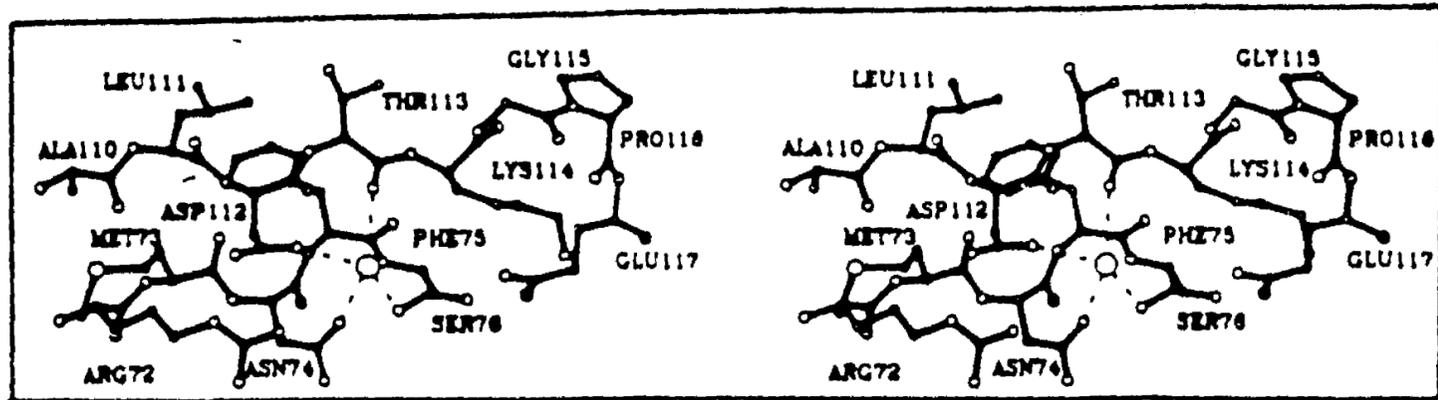
Esquema 5. Representación en listones del monómero de la piruvato cinasa. La subunidad se pliega en cuatro dominios estructurales: el dominio N-terminal, que se localiza del lado izquierdo de la figura, el dominio A, que está en el centro de la figura, el dominio B, que sobresale del cuerpo de la molécula, y su posición está en la parte superior de la figura, y el dominio C o C-terminal, que está situado en la parte inferior de la figura. El piruvato, el Mn^{2+} y el K^+ se ilustran con los modelos de esferas. La figura se hizo con el paquete de computo MOLSCRIPT (Tomado de Kraulis, 1991)

La piruvato cinasa de músculo de conejo, se cristalizó como el complejo con Mn^{2+} , K^+ y piruvato y su estructura se determinó a 2.9 Å de resolución en una solución de 7.9-8.4% PEG 8000 (Schmidt y cols., 1991; Larsen y cols., 1994). Se encontró un 94% de similitud entre las secuencias de las enzimas de músculo de conejo y de gato. Los patrones de plegamiento son casi idénticos, a excepción de tres regiones donde se aprecian diferencias entre ambos: Primero, la hélice α del NH_2 -terminal del músculo de conejo no aparece como en el gato; segundo, la topología global del dominio B difiere en los modelos de las dos proteínas; finalmente, el curso de la cadena polipeptídica entre la Lys 504 y el C-terminal difiere en que las dos hojas β en el modelo de la proteína de gato corren en dirección opuesta a la observada en la estructura del conejo.

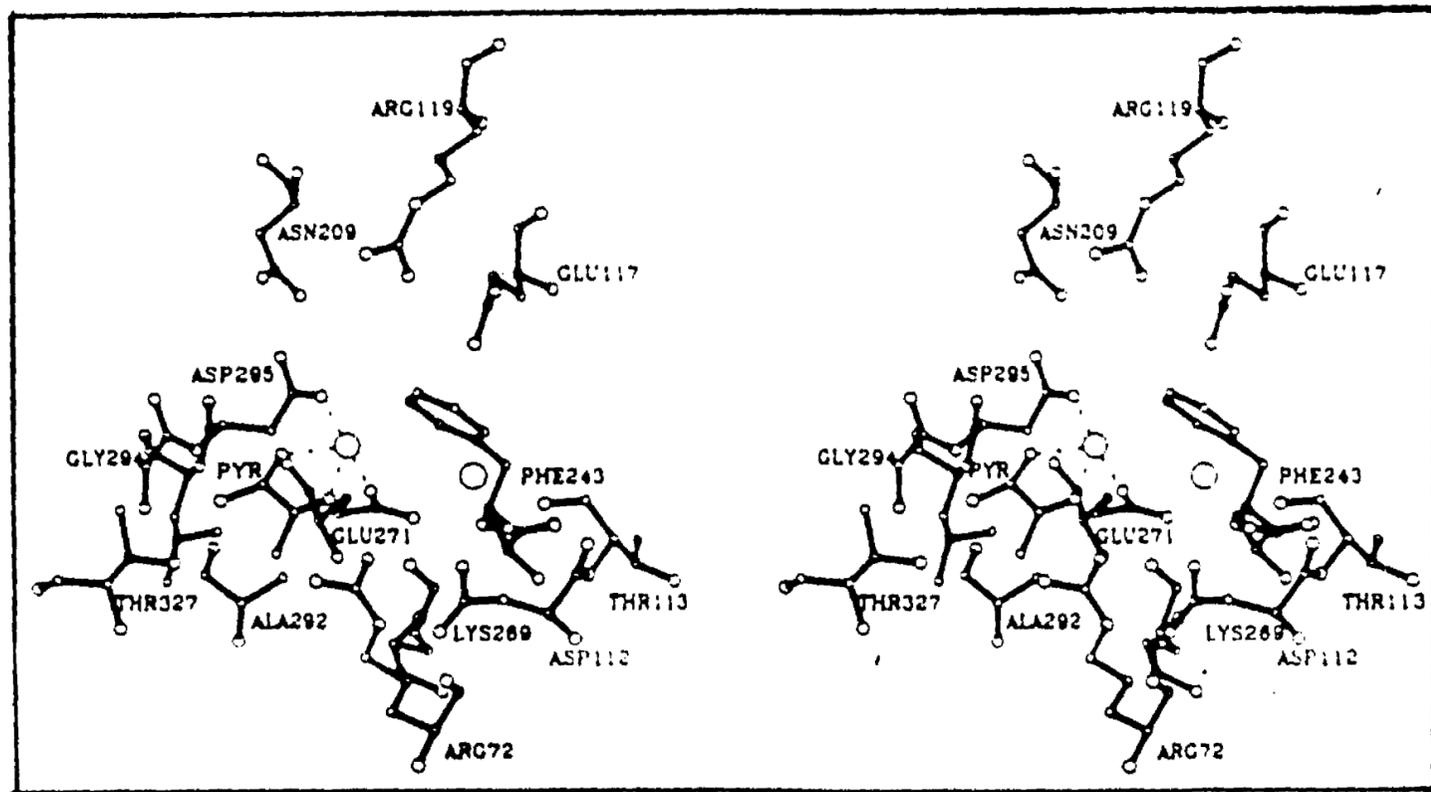
El sitio activo contiene tres cadenas laterales con carga positiva (Arg 72, Arg 119 y Lys 269) y cuatro residuos con carga negativa (Asp 112, Glu 117, Glu 271 y Asp 295). El Mn^{2+} se coordina con la proteína a través de las cadenas laterales de los carboxilos de Glu 271 y Asp 295. La densidad electrónica correspondiente al piruvato está contigua a la del Mn^{2+} . Los datos espectroscópicos de EPR indican que el piruvato está unido al Mn^{2+} a través de sus grupos carboxilo y carbonilo en complejos de enzima-piruvato- Mn^{2+} -ATP- Mg^{2+} (Buchbinder, 1991). A los lados opuestos del piruvato unido al Mn^{2+} quedan el amino en posición ϵ (NH_2 -

ε) de la Lys 269 y el OH de la Thr 327. Como no hay otras cadenas laterales en la vecindad que puedan funcionar como catalizadores ácido-base, el piruvato tentativamente se orientó con su grupo metilo entre la Thr 327 y la Lys 269. Rose y cols. (1991) han sugerido que el donador del protón en la piruvato cinasa es un ácido monoprótico con un alto pK que rápidamente intercambia protones con el solvente en la enzima no unida al sustrato. El OH de la Thr 327 satisface estos requerimientos, así como la estereoquímica. Por otro lado, los perfiles de velocidad de catálisis a diferentes pHs revelan una ionización con un pK de 8.3, y esta ionización ha sido interpretada como el pK del catalizador ácido-base (Dougherty y Cleland, 1985). Por otro lado, este pK no es incongruente con el pK del NH₂-ε de la Lys 269. Se sabe que la enolización del piruvato unido requiere de un cofactor fosfato dianiónico (Rose, 1960). Es posible que las posiciones relativas de los participantes cambien cuando el cofactor fosfato esté unido. La estricta conservación de la Thr 327 y la Lys 269, así como sus posiciones dentro del sitio activo, implican que las cadenas laterales asociadas con ambos residuos participan en la catálisis. Investigaciones estereoquímicas recientes sugieren que el tercer oxígeno periférico del fosfato y del ATP interactúa con un grupo del sitio activo cargado positivamente (Buchbinder y cols., 1993). Se propone que la cadena lateral de la Arg 72 participa en la unión de la molécula de fosfato. En el mapa de densidad electrónica de la piruvato cinasa, la densidad del K⁺ aparece en un sitio bien definido entre el oxígeno del

carbonilo de Thr 113, O^γ de Ser 76, O^{δ1} de Asn 74 y O^{δ2} de Asp 112 (ver esquema 6). Como se muestra en el Esquema 7, el K⁺ no interactúa con el piruvato unido a la enzima. Se puede establecer un enlace indirecto entre el K⁺ y un grupo catalítico del piruvato a través de puentes de hidrogeno entre el carboxilato del Asp 112, el NH₂-ε de la Lys 269 y el guanidinio de la Arg 72. Por comparación, Toney y cols. (1993) han observado cambios estructurales en el sitio de unión del K⁺ en la dialquilglicina descarboxilasa cuando el Na⁺ es sustituido por K⁺. Estos cambios son propagados a la vecindad de los grupos catalíticos propuestos y probablemente responsables de la especificidad del catión monovalente para activar la enzima. En la piruvato cinasa, el enlace indirecto antes mencionado puede ser suficiente para ejercer el efecto activador del K⁺ en la actividad catalítica de la enzima, aunque se requieren experimentos adicionales para explorar esta conjetura. Lord y Reed (1987) encontraron que hay dos sitios para la unión de Tl⁺ en los complejos de VO²⁺-PK. No se sabe si los sitios múltiples para los cationes monovalentes son únicos para los complejos VO²⁺-Tl⁺, no obstante la existencia de sitios adicionales para el K⁺ no pueden ser descartados.



Esquema 6. Vista estereoscópica del sitio de unión del K^+ . Las líneas punteadas indican las interacciones potenciales entre el K^+ y la proteína. Las distancias entre el K^+ y los oxígenos son las siguientes: 2.8 Å al O del carbonilo de la Thr 113; 2.9 Å al O^- de la ser 76; 3.2 Å al O^{N1} de la Asn 74; y 2.8 Å al O^{O2} del Asp 112. El O del carboxilato del Glu 117 es el más cercano y está a 4.7 Å del K^+ . (Tomado de Larsen y cols. (1994)).



Esquema 7. Vista estereoscópica del sitio activo de la piruvato cinasa de músculo de conejo. Los residuos de los aminoácidos Glu 117, Arg 119 y Asn 209 se localizan en el dominio B; el resto de los residuos son del dominio A. Las líneas punteadas indican los enlaces de coordinación entre los oxígenos de los ligandos y el Mn^{2+} . Los iones Mn^{2+} y K^+ se ilustran como círculos abiertos. (Tomado de Larsen y cols. (1994)).

OBJETIVOS

El presente trabajo es un estudio del comportamiento cinético y estructural de la piruvato cinasa de músculo de conejo transferida a micelas invertidas constituidas por octano, cetiltrimetilamonio y hexanol (CHO) [(Ramírez-Silva y cols. (1993) *Biochemistry* **32**, 5332)], así como en presencia de cosolventes miscibles en agua, como dimetil sulfóxido (DMSO) (datos no publicados). Este estudio se realizó con el objetivo general de profundizar sobre el papel del agua en la función y la estructura de la piruvato cinasa. Los resultados más relevantes muestran que en condiciones de bajo contenido de agua, los requerimientos para la catálisis se ven dramáticamente alterados mostrando una actividad independiente del K^+ . De manera particular estamos interesados en entender el efecto activador del K^+ en el agua y como éste puede ser parcialmente sustituido al alterar el solvente en contacto con la enzima.

A continuación se anexa el estudio realizado en micelas invertidas y posteriormente se describen los resultados obtenidos en cosolventes.

Water-Induced Transitions in the K^+ Requirements for the Activity of Pyruvate Kinase Entrapped in Reverse Micelles[†]

Leticia Ramírez-Silva, Marietta Tuena de Gómez-Puyou, and Armando Gómez-Puyou*

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F., México*

Received December 9, 1992; Revised Manuscript Received February 25, 1993

ABSTRACT: The activity of pyruvate kinase was studied in reverse micelles formed with cetyltrimethylammonium bromide, *n*-octane, hexanol, and various amounts of water. In systems with 100% water, K^+ is an essential activator of pyruvate kinase [Kachmar, J. F., & Boyer, P. D. (1953) *J. Biol. Chem.* 200, 669–683]; i.e., without and with K^+ , the activities observed were 0.07 and 300 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, respectively. In the micellar system with 3.6% water (v/v), pyruvate kinase exhibited an activity of about 45 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$, in the absence of K^+ . The k_{cat} was about 450 times larger than that in 100% water without K^+ . K_m values for ADP and phosphoenolpyruvate differed, but not markedly from those in 100% water with or without K^+ . The kinetics of pyruvate kinase in reverse micelles were not affected by K^+ . The activity curve of pyruvate kinase in reverse micelles without K^+ in a pH range of 6.0–8.5 was almost superimposable to that of the enzyme in 100% water with K^+ , and it differed drastically from that in 100% water without K^+ . The fluorescence emission spectra of pyruvate kinase in 100% water exhibited a blue shift of 3 nm upon the addition of ligands (Mg^{2+} , phosphoenolpyruvate, and K^+) that cause a transition of the enzyme to its active state. Without ligands, the entrapment of pyruvate kinase in reverse micelles with 3.0% water produced a blue shift of nearly 2 nm with respect to that of the enzyme in 100% water without ligands. As water was raised to 7.0% (v/v), the maximal emission shifted to longer wavelengths; these changes paralleled the appearance of the K^+ -dependent activity. The plot of the K^+ -independent activity versus water concentration in the micellar system was bell-shaped with a maximum at 4% water (v/v). Apparently variations in the amount of water in contact with the enzyme induce structural transitions that reflect the K^+ requirements of the enzyme for carrying out catalysis.

The properties and the catalytic activity of enzymes have been extensively studied in systems that contain low amounts of water and in which the principal component is either an organic solvent (Luisi et al., 1988; Martinek et al., 1986; Klibanov, 1989) or a supercritical fluid (Hammond et al., 1985; Randolph, et al., 1988; Barzana et al., 1989). Enzymes placed in the former conditions acquire properties distinct from those that prevail in conditions with water in excess. For instance, under low water conditions, enzymes acquire a high thermostability (Wheeler & Croteau, 1986; Zaks & Klibanov, 1988; Ayala et al., 1986; Garza-Ramos et al., 1989) and carry out catalysis at temperatures that cause rapid inactivation in 100% water (Zaks & Klibanov, 1984; Garza-Ramos et al., 1990). In addition, in systems formed with organic solvents, enzymes may catalyze reactions that in totally aqueous mixtures are not easily observed; moreover, enzymes in such conditions also exhibit different substrate specificity (Zaks & Klibanov, 1986; Ryu & Dordick, 1989).

As the properties of enzymes are drastically modified when placed under conditions of limiting water, it was considered that the requirements for catalysis that an enzyme exhibits in conventional aqueous systems could be modified when it is transferred to a low water environment. This possibility was explored with pyruvate kinase, since in addition to substrates, catalysis by this enzyme depends on the presence of divalent cations and, of particular importance to this work, on K^+ , which is an essential activator of the enzyme (Kachmar & Boyer, 1953).

Pyruvate kinase catalyzes the transfer of the phosphoryl group of phosphoenolpyruvate to ADP, the reaction being largely favored toward the formation of pyruvate and ATP (McQuate & Utter, 1959). Pyruvate kinase requires Mg^{2+} for activity (Mildvan & Cohn, 1965), but Mn^{2+} will also activate the enzyme (Boyer, 1962). Pyruvate kinase also requires K^+ for maximal activity (Boyer, 1962); Rb^+ , NH_4^+ , and Tl^+ (Kayne, 1971) may partially substitute for K^+ . In the presence of Na^+ , the enzyme exhibits about 8% of the maximal activity and hardly any activity (0.02%) with tris-(hydroxymethyl)aminomethane (Kayne, 1971) or substituted amines (Nowak, 1976).

From NMR data, Mildvan and Cohn (1965) concluded that K^+ affects the conformation of pyruvate kinase only in the presence of PEP¹ and Mn^{2+} . The detailed analysis of the events at the catalytic site studied by NMR techniques indicate that K^+ coordinates the carboxyl group of PEP aligning the phosphoryl group for nucleophilic attack by ADP (Nowak & Mildvan, 1972). Kinetic data with analogs of PEP (Dougherty & Cleland, 1985b) and alternate substrates (Cottam et al., 1968; Dougherty & Cleland, 1985a), as well as the ³H-trapping experiments of Rose and Kuo (1989), substantiate this model. Although the position of K^+ at the catalytic site of pyruvate kinase has not been directly documented, the available crystallographic data (Stuart et al., 1979; Muirhead et al., 1986, 1987) support the conclusions derived from NMR and kinetic data. Moreover, numerous studies with a wide variety of methodologies (Kayne & Suelter, 1965; Suelter, 1967; Consler & Lee, 1988; Consler et al., 1988) have established

[†] This work was supported by a grant from Dirección General de Apoyo a Personal Académico, U.N.A.M.

* Corresponding author.

¹ Abbreviations: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PEP, phosphoenolpyruvate; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane.

that K^+ in conjunction with catalytic site ligands, Mg^{2+} or Mn^{2+} , and PEP induce the formation of the active conformer.

The results of this work show that in the absence of K^+ pyruvate kinase entrapped in reverse micelles exhibits a catalytic activity that is nearly 20% that expressed under optimal conditions in 100% water with K^+ . Also as evidenced by its fluorescence spectra, pyruvate kinase in a low water environment without K^+ acquires an active conformation. Thus, fluorescence and activity data suggest that in the absence of K^+ the equilibrium between active and inactive conformations can be controlled by the amount of water in contact with the enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Pyruvate kinase from rabbit muscle and heart lactate dehydrogenase were obtained as ammonium sulfate suspensions from Boehringer. The sodium or cyclohexylammonium salts of ADP and PEP, NADH, *n*-octane, hexanol, and cetyltrimethylammonium bromide were from Sigma.

In the assays of pyruvate kinase activity in 100% water, the formation of pyruvate was measured in a coupled system with lactate dehydrogenase and NADH (Büchner et al., 1955). The volume of the reaction was 1 mL. It contained the concentrations of ADP, PEP, $MgCl_2$, and KCl indicated in the Results and Discussion section. Unless otherwise indicated, the buffer was 80 mM Tris-HCl, pH 7.6. In all experiments, the mixture contained 0.24 mM NADH and an amount of lactate dehydrogenase that exhibited an activity at least 10 times higher than that of the measured pyruvate kinase activity. Activity was initiated by introducing pyruvate kinase, and the decreases in absorbance at 340 nm in 1–3 min of reaction time were used for the calculation. Over this period of time, activity was linear.

Reverse micelles were formed in a mixture of 200 mM cetyltrimethylammonium bromide in *n*-octane and hexanol (9:1 v/v) and different amounts of water. The phase diagrams of this system have been described (Laane et al., 1987; Garza-Ramos et al., 1992a). This system has been used for the measurement of several enzyme activities (Hilhorst et al., 1983, 1984; Tyrakowska et al., 1990; Fernández-Velasco et al., 1992), including those that require a trapping enzyme (Laane & Verhaert, 1988; Garza-Ramos et al., 1992b). For assays of enzyme activity in reverse micelles, the reaction mixtures containing the substrates and activators were introduced into the system as water solutions. Micelles were formed by vigorous stirring in vortex. After formation of the micelles, lactate dehydrogenase was introduced followed by the addition of pyruvate kinase to start the reaction. After being vigorously stirred, the mixture was transferred to a spectrophotometer cuvette and the absorbance changes at 340 nm in 1–3 min of reaction time were recorded and used to calculate the activity of pyruvate kinase. The concentrations of ADP, PEP, $MgCl_2$, and KCl are described in the Results and Discussion section. The concentrations indicated refer to those in the water phase of the system. In all experiments, 1 mL of the reverse micelle system contained around 3 μ g of lactate dehydrogenase with a specific activity of about 320 μ mol/(min·mg) in all water media and 240 nmol of NADH. The activity of lactate dehydrogenase was at least in 10-fold excess over that of pyruvate kinase. With the amount of lactate dehydrogenase used, activity of pyruvate kinase was proportional to concentration in the range of 0.1–0.7 μ g of pyruvate kinase/mL of reverse micelle system. Moreover, doubling the concentration of lactate dehydrogenase did not change the activity of pyruvate kinase. In all experiments, pyruvate

kinase activity was linear with time until substrate or NADH became limiting.

The formation and the transfer of substrates to the reverse micelles system were carried out at room temperature. The activities in 100% water and in reverse micelles were made at 25 °C.

For the experiments, aliquots of commercial ammonium sulfate suspensions of lactate dehydrogenase and pyruvate kinase were centrifuged. The sediment was dissolved in 100 μ L of 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, and applied to Sephadex G-50 (fine) filtration-centrifuge columns (Kasahara & Penefsky, 1978). The filtrates were filtered for a second time through similar centrifuge columns. The columns were equilibrated with 10 mM Tris-HCl, pH 7.6. The filtrates obtained after the second filtration were used for measurements of enzyme activity.

The contents of K^+ and NH_4^+ in the chemicals and solvents used in this work were determined by atomic absorption spectroscopy and by the method of Chaney (1962), respectively. The limit of detection for K^+ and NH_4^+ was 10 μ M. The procedure for measuring the content of K^+ and NH_4^+ in the organic solvents was as follows: the solvents were vigorously stirred for 60 min with an equal volume of 1 M HCl. After phase separation, the contents of K^+ and NH_4^+ in the water phase were determined. NH_4^+ was also determined in the enzymes after the aforementioned second filtration.

The fluorescence emission spectra of pyruvate kinase in 100% water and in reverse micelles were obtained on an ISS Inc. (Champaign, IL) GREG 200 spectrofluorometer with excitation and emission slits set at 4 nm. Excitation was at 295 nm. The composition of the mixtures is detailed under Results and Discussion, but in all cases the samples contained 75 μ g of pyruvate kinase/mL of water mixtures or reverse micelle system. The fluorescence spectra of blanks (no protein) were subtracted from those that contained the enzyme. From the latter difference, the spectral center of mass, or average emission wavelength was calculated according to Bismuto et al. (1987) as

$$\lambda_{av} = \frac{\int \lambda I(\lambda) d\lambda}{\int I(\lambda) d\lambda}$$

where λ and $I(\lambda)$ are wavelength (in nanometers) and fluorescence intensity at a given wavelength, respectively. The standard deviation (SD) was given by

$$SD = \frac{\int \lambda^2 I(\lambda) d\lambda}{\int I(\lambda) d\lambda}$$

Protein concentrations were determined by measuring the absorbance at 280 nm and using the absorptivity of 0.54 and 1.5 mL mg⁻¹ cm⁻¹ for pyruvate kinase (Cottam et al., 1969) and lactate dehydrogenase (Pesce & Mc Kay, 1964), respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

In confirmation of previous reports (Kayne, 1971), it was observed that in 100% water the inclusion of K^+ in the reaction mixture increased the activity of pyruvate kinase from less than 0.1 to 300 \pm 20 μ mol/(min·mg). However, pyruvate kinase transferred to reverse micelles formed with 3.6% (v/v) water in the absence of K^+ expressed an activity of approximately 45 μ mol/(min·mg). This activity was absolutely dependent on the presence of PEP, ADP, and Mg^{2+} and was

Table I. Kinetics of Pyruvate Kinase in Mixtures with 100% Water and in Reverse Micelles with and without K^+ ^a

sub- strate	KCl			+KCl		
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	log (k_{cat}/K_m)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	log (k_{cat}/K_m)
100% Water						
ADP	0.42 ± 0.03	3.84 ± 0.43	2.0	1457 ± 33	0.53 ± 0.04	6.4
PEP	0.38 ± 0.02	0.28 ± 0.04	3.1	1354 ± 22	0.12 ± 0.01	7.0
Reverse Micelles (3.6% H ₂ O)						
ADP	211 ± 18	1.05 ± 0.2	5.3	268 ± 27	1.21 ± 0.26	5.4
PEP	153 ± 7	1.39 ± 0.18	5.0	208 ± 19	2.42 ± 0.28	4.9

^a In mixtures with 100% water, 1 mL of the reaction media contained 80 mM Tris-HCl, pH 7.6, 7.5 mM MgCl₂, 240 nmol of NADH, 3 μg of lactate dehydrogenase, and concentrations of ADP and PEP (cyclohexylammonium salts) that varied between 0.5 mM and 7.5 mM, respectively. Where indicated, KCl was introduced at a concn. of 75 mM. The reaction was started by the addition of pyruvate kinase, either 0.1 μg or 40 μg for the assays with and without K^+ , respectively. Where shown, activity was also measured in reverse micelles (see Materials and Methods section) that contained 3.6% water (v/v). One milliliter of reverse micelles contained 80 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3 mM MgCl₂, ADP and PEP concentrations that varied from 0.5 mM to 4 mM, and 30 mM KCl were shown. These concentrations refer to those in the water phase of the system. In addition, 1 mL of the reverse micelles system contained 240 nmol of NADH and 3 μg of lactate dehydrogenase. The reaction was started by the addition of 0.3 μg of pyruvate kinase. The temperature was 25 °C. Catalytic efficiency is expressed as k_{cat}/K_m . The log values of the ratio are shown. The standard errors from two or three different experiments are shown.

not increased by the inclusion of K^+ up to a concentration of 75 mM, or by NH_4^+ or Tl^+ . This K^+ -independent activity was proportional to the amount of enzyme in the range of 0.1–0.7 μg/mL of reverse micelle system. Activity was linear up to the time in which substrate concentration for pyruvate kinase, or NADH concentration for lactate dehydrogenase (the trapping enzyme), became limiting.

The contents of K^+ and ammonium in every reagent used for the assay of activity, as well as in cetyltrimethylammonium bromide and the solvents used for the formation of reverse micelles, were below the limits of detection (10 μM). The amount of NH_4^+ in the enzymes recovered after two filtrations (see Materials and Methods) was also below the limits of detection. It was also considered that cetyltrimethylammonium bromide could affect the response of pyruvate kinase to K^+ . In experiments in 100% water, it was found that the surfactant in concentrations below and above its critical micellar concentration (0.1–2 mM) did not affect the requirements of the enzyme for K^+ . However, it is noted that increasing concentrations of cetyltrimethylammonium inhibited the activity; i.e., 2 mM produced an inhibition of 40%. Of relevance is that, in previous work, Nowak (1976) showed that dimethylammonium, trimethylammonium, and tetramethylammonium chlorides did not activate pyruvate kinase. Additional controls for the experiments of Table I were (a) use of sodium salts instead of cyclohexylammonium salts of ADP and PEP and (b) assay of activity in Tris-HCl, Tris-phosphate, and Tris-acetate buffers. In all conditions, the K^+ -independent activity of pyruvate kinase in reverse micelles was essentially the same.

Kinetics of the K^+ -Independent Pyruvate Kinase Activity. In 100% water, the kinetics of pyruvate kinase in the presence of K^+ have been extensively studied (McQuate & Utter, 1959). Although the requirements for K^+ on the partial reactions catalyzed by pyruvate kinase have been thoroughly investigated (Tietz & Ochoa, 1958; Cottam et al., 1968; Robinson & Rose, 1972; Kayne, 1974), there are only a few results on the kinetics of the enzyme without K^+ . Here, we compared the kinetics

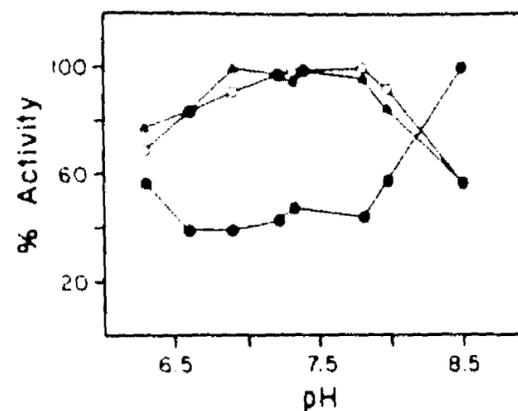


FIGURE 1: Activity of pyruvate kinase in 100% water and in reverse micelles at various pHs. In all water media, activity was measured as in Table I with 7.5 mM ADP and 7.5 mM PEP; (○) indicates percent of activity in mixtures with 100% water that contained 75 mM KCl, whereas (●) illustrates activity without KCl. Activity without K^+ in reverse micelles with 3.6% water (v/v) was measured with 7.5 mM MgCl₂, 7.5 mM ADP, and 7.5 mM PEP (▲). The buffer in all experiments was 80 mM Tris-phosphate; the rest of the conditions were as in Table I. The pH indicated refers to that of the reaction mixture of the solution injected to form the micelles. The data were normalized considering the maximal activity detected as 100%; these were 270 μmol/(min·mg) (○), 0.07 μmol/(min·mg) (●) and 44 μmol/(min·mg) (▲).

of pyruvate kinase entrapped in reverse micelles with 3.6% water (v/v) to those in 100% water with and without K^+ .

In agreement with the early experiments of Kachmar and Boyer (1953), it was found that in 100% water k_{cat} was several orders of magnitude higher with K^+ than without K^+ . This was the most obvious effect of K^+ on the kinetics of the enzyme, albeit, as shown in Table I, K^+ also modified the K_m values for ADP and PEP (Table I). Mostly as a result of the effect of K^+ on k_{cat} values, the catalytic efficiency of the enzyme (log k_{cat}/K_m ; in Table I) was about 10⁴ times higher in the presence of K^+ .

A notable characteristic of the kinetics of pyruvate kinase in reverse micelles (Table I) was that in the absence of K^+ k_{cat} was about 450 times higher than in 100% water without K^+ . Pyruvate kinase in reverse micelles exhibited K_m values for ADP three times lower and K_m values for PEP five to six times higher than in 100% water without K^+ . The catalytic efficiency of the enzyme was 2–3 orders of magnitude higher in reverse micelles than in 100% water without K^+ . It is also of relevance that the addition of K^+ to the reverse micelle system hardly affected the kinetics of the enzyme (Table I).

As noted, the results with pyruvate kinase entrapped in reverse micelles described in Table I were obtained from experiments carried out with the cyclohexylammonium salts of ADP and PEP, but similar results were obtained with the sodium salts (not shown).

pH Activity Profiles of Pyruvate Kinase in 100% Water Mixtures and in Reverse Micelles. The data described on the characteristics of the activity of pyruvate kinase in the interior of reverse micelles without K^+ appeared to indicate that in a low water environment the enzyme acquired a catalytically competent conformation that could resemble that attained in 100% water with K^+ . In fact, data on the activity of pyruvate kinase as a function of pH in 100% water and in reverse micelles with 3.6% water (v/v) (Figure 1) supported this idea. In 100% water with K^+ , the activity curve was bell-shaped with a plateau between pH 7.0 and 7.8, which agrees with the profile reported by Gregory and Ainsworth (1981). In the absence of K^+ , the pH activity profile was drastically different; i.e., maximal activity was at pH 8.5. In reverse micelles that did not contain K^+ , the pH activity curve was almost superimposable with that in 100% water with K^+ .

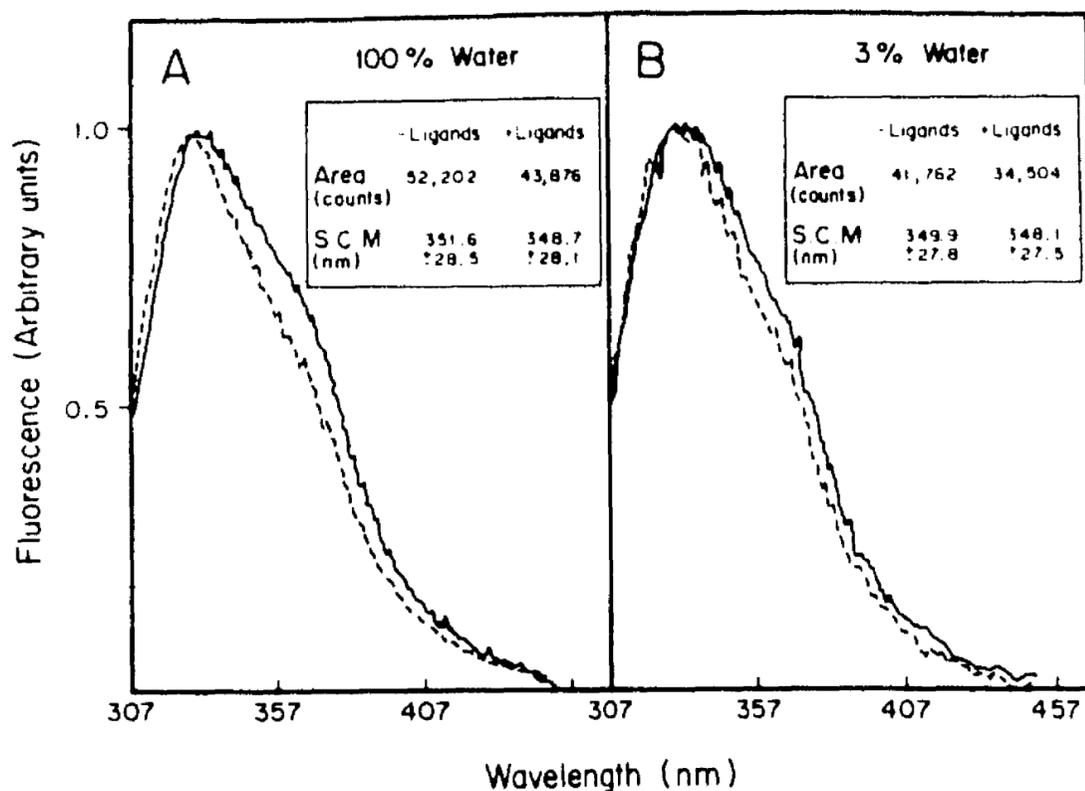


FIGURE 2: Fluorescence emission spectra of pyruvate kinase in all water media and in reverse micelles with and without ligands. The spectra were recorded at an excitation wavelength of 295 nm. The spectra in 100% aqueous media (A) were obtained from mixtures that contained pyruvate kinase at a concentration of 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 80 mM Tris-HCl, pH 7.6 (continuous line); the trace illustrated by the dashed line also contained 7.5 mM PEP, 3 mM MgCl_2 , and 30 mM KCl. Panel B shows the spectra in reverse micelles with 3.0% water (v/v) that contained 75 μg of pyruvate kinase/mL of reverse micelles. The continuous and the dashed lines correspond to spectra of micelles that contained 80 mM Tris-HCl, pH 7.6, without and with ligands, respectively. The inset shows the area of the curve throughout the whole emission spectra in counts, and the spectral center of mass (SCM) was calculated as described under Materials and Methods. The spectra shown were obtained after subtracting the spectra of the blanks which had identical compositions from the experimental, except for the enzyme. The spectra were normalized to maximal emission = 1.

Fluorescence of Pyruvate Kinase in Reverse Micelles and in All Aqueous Media. The NMR studies by Nowak and Mildvan (1972) indicate that in the presence of Mn^{2+} there is an interdependence in the binding of PEP and K^+ at the catalytic site. These observations together with kinetic (Reuben & Kayne, 1971) and crystallographic (Muirhead et al., 1986, 1987) data indicate that in the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} , K^+ coordinates to the carboxyl group of PEP. The ligand-induced arrangements of the catalytic site produce the catalytically active conformation.

The active and inactive conformations of pyruvate kinase can be visualized by differences in ultraviolet and fluorescence spectra. These have been attributed to perturbations of tryptophan residues (Suelter & Melander, 1963; Kayne & Suelter, 1965; Suelter, 1967). In pyruvate kinase there is a tryptophan in a region identified as domain B. In the inactive conformation, this region is partially exposed to the solvent (Muirhead, 1986; Consler et al., 1988). The other two tryptophan residues lie within domain C of the protein (Muirhead, 1986). Regarding fluorescence of pyruvate kinase in 100% water, Suelter (1967) showed that the binding of Mn^{2+} and K^+ to the enzyme produces a blue shift of 2–3 nm of its polarization spectra. By using small-angle neutron scattering, Consler et al. (1988) found that the binding of PEP produces an additional conformational change of the enzyme-metal complex.

We recorded the emission fluorescence spectra of pyruvate kinase in reverse micelles and compared them to those obtained in 100% water with and without the ligands (K^+ , Mg^{2+} , and PEP) that produce the active conformation. In accordance with reported data (Suelter, 1967), the emission spectrum of pyruvate kinase in mixtures in 100% water that contained ligands was 3 nm lower than in their absence (Figure 2A). The fluorescence spectra of pyruvate kinase entrapped in reverse micelles (Figure 2B) with 3.0% water (v/v) differed

from those in 100% water in several respects. The area of the emission spectra of pyruvate kinase was 20% smaller than in 100% aqueous media; (see insets in Figure 2), and its spectral center of mass (see Materials and Methods section) was about 1 nm lower than in 100% water without ligands. Also, it was observed that in reverse micelles the ligand-induced shift in the peak of maximal fluorescence was less marked than in 100% water (Figure 2B). On the other hand, in the presence of ligands, in both, reverse micelles and 100% water, the spectral centers of mass were strikingly similar. Thus, in the overall data of Figure 2 it is apparent that in the absence of ligands pyruvate kinase in reverse micelles exhibited a fluorescence emission that approached that observed in 100% water with ligands.

Effect of Water on the Fluorescence and Activity of Pyruvate Kinase Entrapped in Reverse Micelles. The spectral center of mass of pyruvate kinase entrapped in reverse micelles without K^+ was determined at various water concentrations. As the amount of water was increased, the spectral center of mass progressively shifted to longer wavelengths (Figure 3). These shifts could be due to structural arrangements of the protein or to changes in the environment of tryptophan residues on placement in reverse micelles with different water contents. Therefore, it was explored if the fluorescence of free tryptophan transferred to reverse micelles was affected by the amount of water. The intensity of tryptophan fluorescence in reverse micelles was 20% less than that observed in 100% aqueous media (not shown). A similar decrease in fluorescence intensity of pyruvate kinase entrapped in reverse micelles was observed (Figure 2). In addition, there was a blue shift in the spectral center of mass of tryptophan, i.e., 365 nm in 100% water and 359 nm in reverse micelles. This probably indicates a relatively less polar environment of the interior of the reverse micelles. However, in contrast to pyruvate kinase, the spectral center of mass of tryptophan was not affected by the amount

FALLA DE ORIGEN

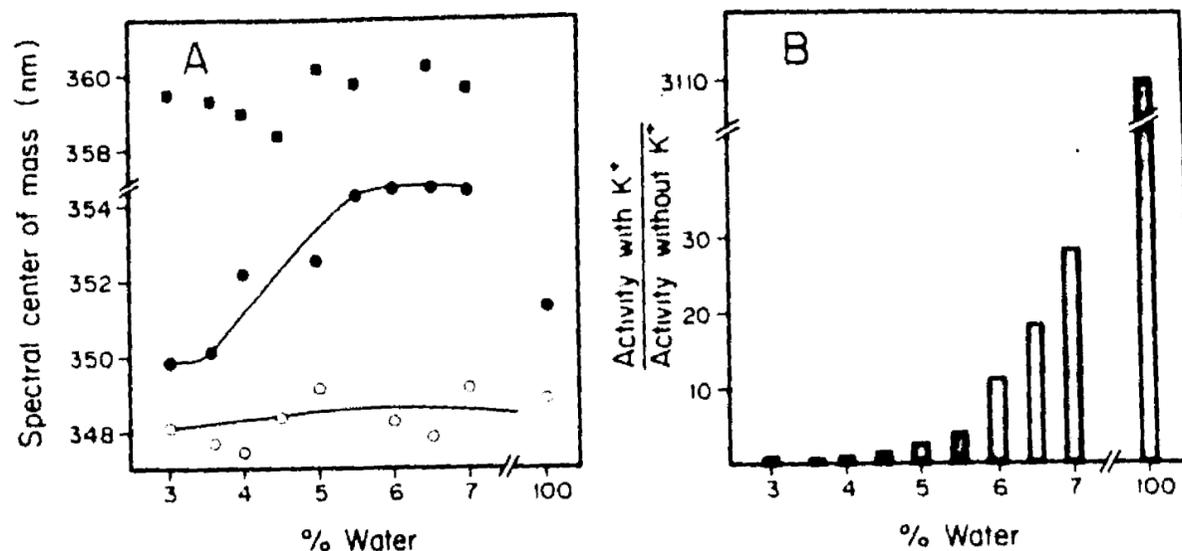


FIGURE 3: Spectral center of mass (A) of pyruvate kinase and tryptophan in reverse micelles with different water concentrations and (B) activity ratios of pyruvate kinase in reverse micelles with and without K⁺. In (A), the experimental conditions were as in Figure 2 except that the amount of water in the reverse micelle system was as indicated. (●) and (○) show the spectral center of mass obtained from emission spectra obtained from reverse micelles without and with ligands, respectively. (■) shows the spectral center of mass of 10 μ M tryptophan transferred to reverse micelles with the indicated water concentrations. (B) shows the ratio of activities with and without 75 mM KCl in reverse micelles that had the indicated water concentration. Activities were measured as in Table I with 7.5 mM ADP and 7.5 mM PEP.

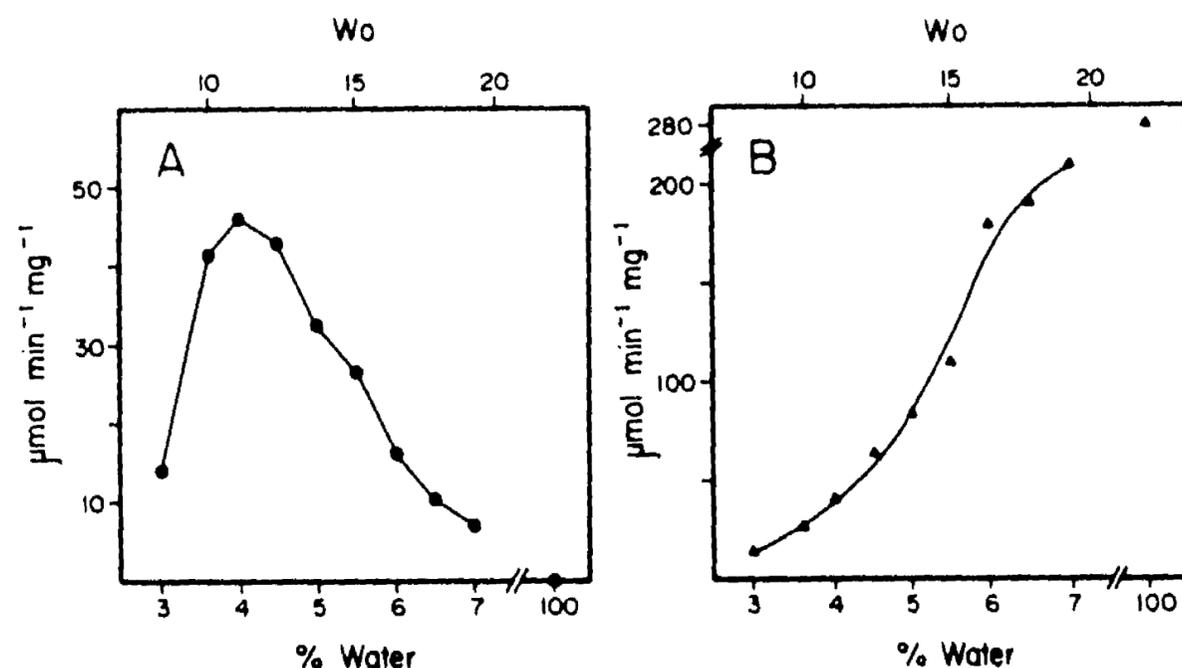


FIGURE 4: Activity of pyruvate kinase in reverse micelles without (A) and with (B) 75 mM KCl at various water concentrations. The experimental conditions were as in Table I with 7.5 mM ADP, 7.5 mM PEP, and the indicated water concentrations.

of water (Figure 3). Therefore, it is very likely that the distinct fluorescence pattern of pyruvate kinase at various water concentrations reflects different conformations of the protein that affect the environment of one, or all, of the tryptophan residues.

Fluorescence data were also collected with pyruvate kinase entrapped in reverse micelles that contained the ligands (Mg^{2+} , PEP, and K^+) that produce the active conformation. Under these conditions, the differences in the spectral center of mass at various water concentrations were rather small (Figure 3A). Thus, the overall data of Figure 3A indicate that in reverse micelles, the conformation that pyruvate kinase acquires depends on two factors: the presence of ligands and the amount of water in contact with the enzyme. In addition, it would appear that without ligands the enzyme has a structure that is susceptible to modulation by water, whereas in the presence of ligands, the enzyme is locked in a conformation that is unaffected by water concentration.

The characteristic patterns of fluorescence emission of the enzyme with water concentration in the absence of ligands suggested that the amount of water in contact with pyruvate kinase could be central in the equilibrium between the

catalytically active and inactive conformers. Hence, it was explored if the fluorescence characteristics of pyruvate kinase at various water concentrations were accompanied by distinct K^+ requirements in catalysis. It was found that as the water content of the micellar system was gradually increased, there was a progressive rise in the ratio of activities with and without K^+ (Figure 3B). In fact, the ratio of activities with and without K^+ probably indicates an equilibrium between active and inactive conformations.

Effect of Water on the Rate of Catalysis by Pyruvate Kinase.

It has been described that the activity of numerous enzymes entrapped in reverse micelles, including the type of micelles employed here (Laane et al., 1987), depends on the amount of water (Hilhorst et al., 1983, 1984; Laane et al., 1987; Martinek et al., 1986; Luisi et al., 1988; Tyrakowska et al., 1990; Fernández-Velasco et al., 1992; Garza-Ramos et al., 1992b). The data of Figure 4 show how the amount of water in contact with pyruvate kinase affects its activity in the presence and absence of K^+ . The plot of the K^+ -independent activity versus the amount of water (Figure 4A) was bell-shaped with a maximum at about 4% water (ratio of water to surfactant molecules, $W_0 = 11$). In contrast, the activity

with K^+ increased with the amount of water (Figure 4B). This pattern most likely reflected the water requirements for catalysis that have been documented for many enzymes.

At low amounts of water, conformational mobility of enzymes is severely restricted due to hindrances in solvent-protein interactions. As water is progressively raised, enzyme flexibility increases and activity becomes higher (Careri et al., 1980; Finney & Poole, 1984; Garza-Ramos et al., 1992a). Thus, regarding the data of Figure 4, it would appear that below 4% water, activity is independent of K^+ but restricted due to impairments in solvent-protein interactions [for review, see Garza-Ramos et al. (1992c)]. As water is raised above 4%, and the enzyme acquires a higher flexibility, the K^+ -independent activity decreases simultaneously with the appearance of the K^+ -dependent activity (Figures 3B and 4). Therefore, it would appear that the amount of water in contact with pyruvate kinase is central in the prevalence of enzyme conformations with distinct catalytic and fluorescence properties.

At the moment, the intimate molecular mechanisms that induce in pyruvate kinase the ability to function in the absence of K^+ are not known. Indeed, due to the nature of the experimental system employed, it is possible that the amount of water, as well as interactions of the protein with the micellar wall, accounts for the described behavior and structural features of pyruvate kinase. In this respect, it is relevant that Desfosses et al. (1991) suggested that the blue shift of 17 nm in fluorescence emission produced by entrapping human serum albumin in reverse micelles could be due to alterations of protein structure induced by its attachment to the micellar interphase. Strambini and Gonelli (1988) reached similar conclusions from phosphorescence data on tryptophan of liver alcohol dehydrogenase entrapped in reverse micelles. Regarding this possibility, the data of this work show that at different amounts of water distinct fluorescence patterns of pyruvate kinase occur in parallel to the expression of the K^+ -independent activity (Figures 3 and 4). If under identical conditions ligands of the enzyme are included, these changes do not take place. Therefore, unless water only affects the interaction of the protein with the micellar wall when ligands are absent, the results would suggest that the amount of water in contact with the enzyme controls the structural and catalytic characteristics of pyruvate kinase.

ACKNOWLEDGMENT

We are very much indebted to Dr. Sergio Ferreira for many helpful discussions and for collaboration in obtaining the fluorescence spectra. These were obtained at the Departamento de Bioquímica, Universidad Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

REFERENCES

Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., & Darszon, A. (1986) *FEBS Lett.* 203, 41-43.
 Barzana, E., Karel, M., & Klibanov, A. M. (1989) *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1178-1185.
 Bismuto, E., Jameson, D. M., & Gratton, E. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2354-2357.
 Boyer, P. D. (1962) in *The Enzymes*, Boyer, P. D., Lardy, H. & Myrback, K., Eds.) 2nd ed., Vol. 6, pp 95-113, Academic Press, New York.
 Büchner, T., & Pleiderer, G. (1955) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P., & Kaplan, N. O., Eds.) Vol. 1, pp 435-440, Academic Press, New York.

Careri, G., Gratton, E., Yang, P. H., & Rupley, J. A. (1980) *Nature* 284, 572-573.
 Chaney, A. L. (1962) *Clin. Chem.* 8, 130-132.
 Consler, T. G., & Lee, J. C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 2787-2793.
 Consler, T. G., Uberbacher, E. C., Bunick, G. J., Liebman, M. N., & Lee, J. C. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 2794-2801.
 Cottam, G. L., Kupiecki, F. P., & Coon, M. J. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1630-1637.
 Cottam, G. L., Hollenberg, P. F., & Coon, M. J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 1481-1486.
 Desfosses, B., Cittanova, N., Urbach, W., & Waks, M. (1991) *Eur. J. Biochem.* 199, 79-87.
 Dougherty, T. M., & Cleland, W. W. (1985a) *Biochemistry* 24, 5870-5875.
 Dougherty, T. M., & Cleland, W. W. (1985b) *Biochemistry* 24, 5875-5880.
 Fernández-Velasco, D. A., Garza-Ramos, G., Ramírez, L., Shoshani, L., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205, 501-508.
 Finney, J. L., & Poole, P. L. (1984) *Comments Mol. Cell. Biophys.* J. 2, 129-151.
 Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1989) *Biochemistry* 28, 3177-3182.
 Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1990) *Biochemistry* 29, 751-757.
 Garza-Ramos, G., Fernández-Velasco, D. A., Ramírez, L., Darszon, A., Shoshani, L., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1992a) *Eur. J. Biochem.* 205, 509-517.
 Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, T., Gómez-Puyou, A., & Gracy, R. W. (1992b) *Eur. J. Biochem.* 208, 389-395.
 Garza-Ramos, G., Fernández-Velasco, D. A., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1992c) in *Biomolecules in Organic Solvents* (Gómez-Puyou, A., Darszon, A., & Tuena de Gómez-Puyou, M., Eds.) pp 113-131, CRC Press, Boca Raton, FL.
 Gregory, R. B., & Ainsworth, S. (1981) *Biochem. J.* 195, 745-751.
 Hammond, D. A., Karel, M., & Klibanov, A. M. (1985) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 11, 393-400.
 Hilhorst, R., Laane, C., & Veeger, C. (1983) *FEBS Lett.* 159, 225-228.
 Hilhorst, R., Spruijt, R., Laane, C., & Veeger, C. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 459-466.
 Kachmar, J. F., & Boyer, P. D. (1953) *J. Biol. Chem.* 200, 669-683.
 Kasahara, M., & Penefsky, H. S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4180-4187.
 Kayne, F. J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 143, 232-239.
 Kayne, F. J. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1, 8-13.
 Kayne, F. J., & Suelter, C. H. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 897-900.
 Klibanov, A. M. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 141-144.
 Laane, C., & Verhaert, R. (1988) *Isr. J. Chem.* 28, 17-22.
 Laane, C., Hilhorst, R., & Veeger, C. (1987) in *Methods in Enzymology* (Mosbach, K., Ed.) Vol. 136, pp 216-230, Academic Press, New York.
 Luisi, P. L., Giomini, M., Pileni, M. P., & Robinson, B. H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 947, 209-246.
 Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N., Khnelnitski, Y. L., & Berezin, I. V. (1986) *Eur. J. Biochem.* 155, 453-468.
 McQuate, J. T., & Utter, M. F. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 2151-2157.
 Mildvan, A. S., & Cohn, M. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 238-246.
 Muirhead, H., Clayden, D. A., Barford, D., Lorimer, C. G., Fothergill-Gilmore, L. A., Schiltz, E., & Schmitt, W. (1986) *EMBO J.* 5, 475-481.
 Muirhead, H., Clayden, D. A., Cuffe, S. P., & Davies, C. (1967) *Biochem. Soc. Trans.* 15, 996-999.

- Nowak, T. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 73-78.
- Nowak, T., & Mildvan, A. S. (1972) *Biochemistry* 11, 2819-2828.
- Pesce, A., & Mc Kay, N. O. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 1753-1761.
- Randolph, T. W., Clark, D. S., Blanch, H. W., & Prausnitz, J. M. (1988) *Science* 238, 387-390.
- Reuben, J., & Kayne, F. J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 6227-6234.
- Robinson, J. L., & Rose, I. A. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1096-1105.
- Rose, I. A., & Kuo, D. J. (1989) *Biochemistry* 28, 9579-9585.
- Ryu, K., & Dordick, J. S. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8026-8027.
- Strambini, G. B., & Gonnelli, M. (1988) *J. Phys. Chem.* 92, 2850-2853.
- Stuart, D. I., Levine, M., Muirhead, H., & Stammers, D. K. (1979) *J. Mol. Biol.* 134, 109-142.
- Suelter, C. H. (1967) *Biochemistry* 6, 418-423.
- Suelter, C. H., & Melander, W. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, PC4108-PC4109.
- Tietz, A., & Ochoa, S. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 78, 477-493.
- Tyrakowska, B., Verhaert, R. M. D., Hilhorst, R., & Veeger, C. (1990) *Eur. J. Biochem.* 187, 81-88.
- Wheeler, C. J., & Croteau, R. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248, 429-434.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1984) *Science* 224, 1249-1251.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 2767-2768.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3194-3201.

Resultados del sistema de micelas invertidas no publicados.

En el trabajo con micelas invertidas de CHO encontramos la expresión de una actividad independiente de K^+ . Como se muestra en la Figura 4 del trabajo publicado, la máxima actividad se encuentra a 4% de agua y es de 45 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$. La mezcla de reacción contenía Tris-HCl 80 mM pH 7.6, PEP 7.5 mM, ADP 3mM (sales de ciclohexilamonio) y MgCl_2 3mM en la poza de agua del interior de las micelas, así como NADH 0.24 mM (sal de Na) en el volumen final de 1ml.

Como se mostrará en la sección de resultados del trabajo realizado en cosolventes, encontramos que la afinidad de la piruvato cinasa por el catión monovalente aumenta significativamente en presencia de dimetil sulfóxido, y que también puede mostrar un efecto inhibitorio. Por ello decidimos explorar la afinidad por el K^+ en micelas invertidas. Así pues, los experimentos se repitieron en las mismas condiciones antes mencionadas, excepto por el NADH que se utilizó como la sal de ciclohexilamonio. En CHO a 3.6% de agua, la actividad independiente de K^+ de la PK es de 12 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ y en presencia de K^+ 5mM aumenta 3 veces (35 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$). La $K_{m_{app}}$ del K^+ es de 1.6 mM y la K_i de 4mM.

MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos utilizados procedieron de Sigma Chemical Co. (USA), a excepción del DMSO, etilenglicol y glicerol, que fueron de MERCK (Alemania). Para los estudios de NMR se utilizó DMSO - d^6 DeuverAR Mallinckrodt. El PEP, el ADP y el NADH se obtuvieron como sales de ciclohexilamonio; la piruvato cinasa y la lactato deshidrogenasa se obtuvieron de Boehringer como suspensión en sulfato de amonio. Para los ensayos todos los reactivos que se utilizaron eran libres de K^+ y de NH_4^+ según se verificó y se indica en la sección de Materiales y Métodos del trabajo realizado en micelas invertidas (Ramírez-Silva y cols. (1993) *Biochemistry* **32**, 5332).

Los ensayos en los sistemas de baja actividad de agua, se hicieron a las concentraciones de cosolvente que se indica en una relación v/v. La obtención de enzimas libres de sulfato de amonio y la determinación de la concentración de proteína así como los ensayos de actividad y los de fluorescencia se detallan en el trabajo realizado en micelas invertidas, que se adjunta.

La actividad de la lactato deshidrogenasa se determinó en presencia de 10, 20, 30 y 40% de DMSO. Se observó que la actividad se inhibe 20, 60, 75 y 90% respectivamente (los datos no se muestran). Por lo tanto, para determinar la actividad de la piruvato cinasa acoplada a la lactato deshidrogenasa hubo que compensar esta inhibición para tener por lo menos 10 veces más actividad de lactato deshidrogenasa que de piruvato cinasa.

Los estudios de unión de la enzima con los cofactores Mn^{2+} y K^+ y con PEP, en 100% de agua y en 40% DMSO se realizaron por el método de velocidad de relajación del protón (PRR) por pulsos de resonancia magnética nuclear en un espectrómetro Varian operado a 24.3 MHz y temperatura ambiente, tal como fue descrito por Mildvan y Cohn (1963). El efecto paramagnético del Mn^{2+} sobre las velocidades de relajación longitudinal ($1/T_1$) de los protones del agua ha mostrado ser un indicador útil de las interacciones PK- Mn^{2+} y PK- Mn^{2+} -PEP. Los detalles de la técnica se describen en el Apéndice.

Los experimentos de PRR se llevaron a cabo en soluciones de 50 μ l que contenían 50 μ M de $MnCl_2$, 50mM de Tris-HCl pH 7.6, en presencia de 0.1 M de KCl o de 0.1 M TMA en 100% de agua o en presencia de 10% a 40% (v/v) de DMSO deuterado, se titularon con soluciones idénticas que además contenían 152 μ M de sitios de PK. En otros casos se incluyó la PK a la primera solución y se tituló en presencia de una solución idéntica que además contenía 5 mM de PEP. A partir de los datos obtenidos de T_1 , se calcularon los ϵ^* y se construyó la gráfica de dobles recíprocas $1/\epsilon^*$ versus $1/PK$; de la ordenada se obtuvo ϵ_b (*enhancement* del complejo binario; es decir del manganeso unido a la enzima, ver Apéndice) a concentración infinita de enzima. La constante de disociación del complejo PK- Mn^{2+} es igual a la concentración de sitios de unión a la piruvato cinasa libres cuando la mitad del manganeso está unido, es decir a un ϵ^* a la mitad entre 1.00 y ϵ_b . Asimismo, de la ordenada

de la gráfica de dobles recíprocas de $1/\epsilon^*$ versus $1/PEP$ se obtiene el ϵ_1 (*enhancement* del complejo ternario) a concentración infinita de PEP. La constante de disociación del complejo $PK-Mn^{2+}-PEP \rightarrow PK-Mn^{2+} + PEP$ es igual a la mitad entre el ϵ_1 ; complejo $PK-Mn^{2+}$ libre de PEP (que corresponde al valor de ϵ^* antes de titular con la solución que incluye al PEP) y el ϵ_1 (Mildvan y Cohn, 1965; 1966).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el primer trabajo (Ramírez-Silva y cols. (1993) *Biochemistry*, **32**, 5332) observamos que la piruvato cinasa transferida a micelas invertidas presenta una actividad independiente de K^+ que depende de la cantidad de agua presente. Además observamos patrones distintos de fluorescencia dependiendo de la cantidad de agua, que cambiaron en paralelo con la expresión de la actividad independiente de K^+ . En ese trabajo propusimos que la cantidad de agua en contacto con la enzima controla las características estructurales y catalíticas de la piruvato cinasa. Sin embargo, debido a la naturaleza del sistema experimental (micelas invertidas), no se descartaba la posibilidad de que además de la cantidad de agua, alguna interacción de la proteína con la pared micelar fuera la responsable de las características estructurales y cinéticas que observamos en la PK.

Los sistemas de cosolventes ofrecieron una alternativa más simple para estudiar las características cinéticas y estructurales de la PK en un medio con baja actividad de agua.

Actividad de la Piruvato Cinasa independiente de K^+ .

La Figura 1 ilustra la actividad de la PK independiente del K^+ en presencia de diferentes concentraciones (v/v) de cosolventes. En orden creciente, la actividad máxima independiente de K^+ en 30% de etilenglicol, 40% de glicerol, 50% de PEG 4000, 50% de PEG 8000 y 40% de DMSO es 0.213, 0.23, 5.27, 5.72 y 16.0 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ respectivamente, comparadas con

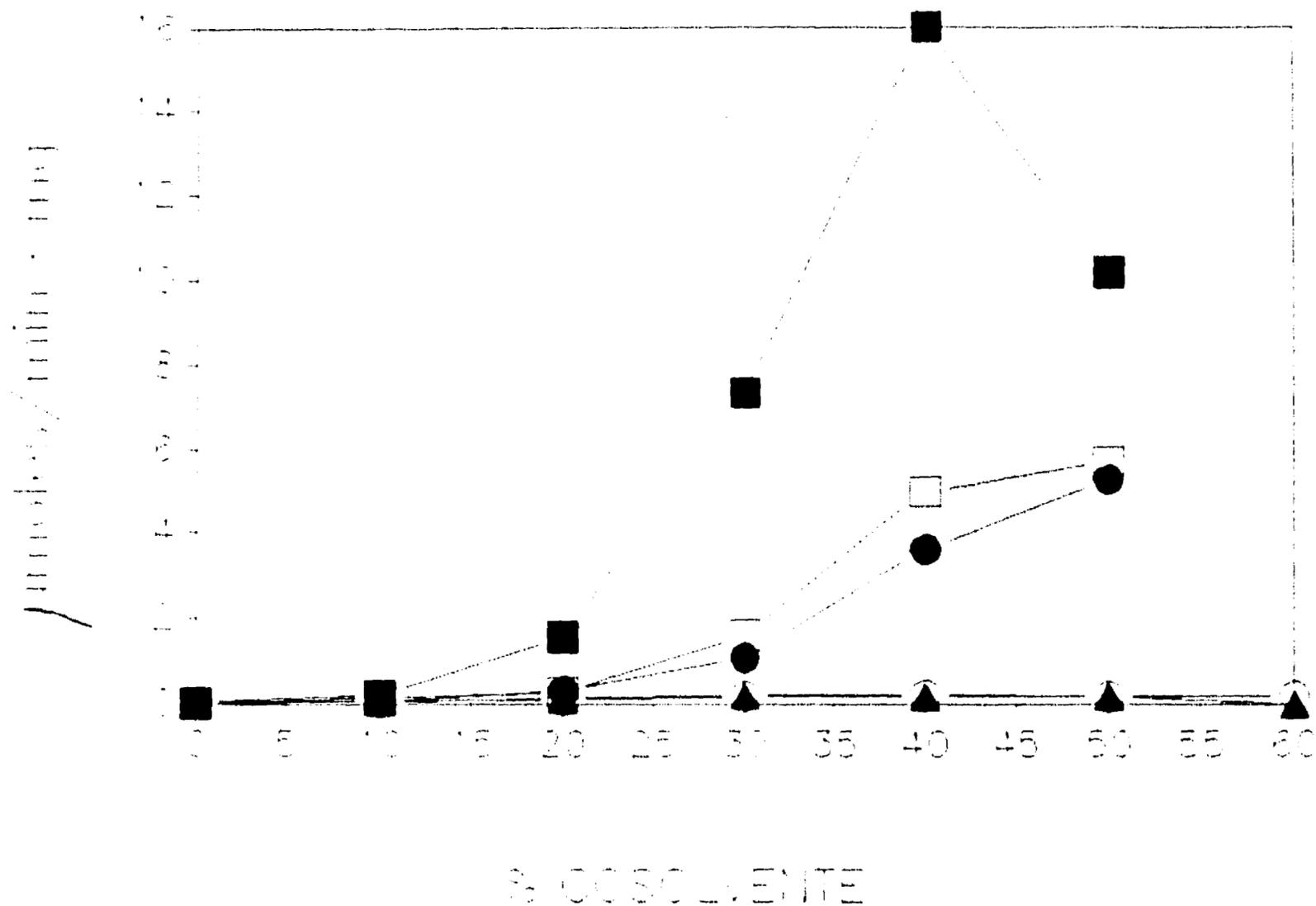


Figura 1. Actividad de la Piruvato Cinasa independiente de K^+ en presencia de diferentes cosolventes. (▲) Etilenglicol, (○) Glicerol, (●) PEG 4000, (□) PEG 8000 o (■) DMSO. Las mezclas binarias agua-cosolvente (v/v) fueron llevadas a 1 ml con la mezcla de reacción. Esta mezcla contenía Tris-HCl 125mM pH 7.6, PEP 1mM, ADP 3mM, NADH 0.24 mM (sales de ciclohexilamonio) y $MgCl_2$ 3mM. La reacción se inició con 30 mg de lactato deshidrogenasa y la adición de 1 a 50 mg de piruvato cinasa. El ensayo se llevó a cabo a 25°C.

FALLA DE ORIGEN

0.039 $\mu\text{moles}/\text{min}\cdot\text{mg}$ que es la actividad sin K^+ en 100% de agua. A excepción del PEG, concentraciones mayores a las señaladas para cada cosolvente causaron inhibición de esta actividad.

Todos los cosolventes utilizados tienen en común ser excluidos preferentemente de la superficie de la proteína y actuar como estabilizadores de la estructura (Timasheff, 1989). No obstante, la eficiencia con la que inducen la expresión de la actividad independiente de K^+ de la PK varía entre ellos cerca de dos órdenes de magnitud (de 5 veces con 30% de etilenglicol a 410 veces con 40% de DMSO). Esta eficiencia no tiene correlación con la capacidad del cosolvente para deprimir la actividad del agua, ni con la constante dieléctrica, ni con la capacidad de "romper" la estructura del agua. (ver sección **Sistemas de de baja actividad del agua** en los Antecedentes).

Además de sus propiedades como cosolvente, el DMSO podría tener un efecto directo sobre la proteína. El DMSO es parcialmente hidrofóbico y podría formar puentes de hidrógeno o unirse a la superficie de la proteína mediante interacciones hidrofóbicas (Lehmann y Stansfield, 1989; Pérez-Ramírez y Timasheff, 1994). El estudio de difracción de neutrones realizado por Lehmann y Stasfield en cristales de lisozima inmersos en 15% (v/v) de DMSO, muestra que el DMSO se une a esta proteína, ya sea formando puentes de hidrógeno a partir del grupo S-O o uniendo los grupos $-\text{CH}_3$ a las partes hidrofóbicas de la

superficie o del interior de la proteína. Sin embargo, las coordenadas atómicas obtenidas de los cristales de la lisozima inmersos en 15% de DMSO y de aquéllos de la estructura nativa no mostraron diferencias significativas. Así pues, el efecto del DMSO en la actividad de la PK podría ser a través de su acción como cosolvente así como unido directamente a la enzima.

La Figura 2 muestra la actividad independiente de K^+ en 40% DMSO, la condición experimental en la que se encontró la mayor activación. La actividad es lineal con respecto a la concentración de proteína en el margen de 0.1 a 1 $\mu\text{g/ml}$. La actividad específica es de ≈ 11 $\mu\text{moles/min}\cdot\text{mg}$ para todas las concentraciones de proteína y no aumentó al incrementar 10 veces la concentración de la enzima acoplante (lactato deshidrogenasa).

Cinética de la activación de la Piruvato Cinasa por K^+ en 100% de agua y mezclas binarias agua-DMSO.

De acuerdo a lo encontrado por Kayne (1971), la actividad de la PK en 100% de agua y 75 mM de K^+ es de 250-300 $\mu\text{moles/min}\cdot\text{mg}$, y esta actividad se inhibe por DMSO. Datos preliminares muestran que conforme la concentración de DMSO aumenta, la actividad de la enzima se abate hasta 0.2 $\mu\text{moles/min}\cdot\text{mg}$ en presencia de 50% del cosolvente. Cabe mencionar que esta inhibición no se debe a desnaturalización irreversible, ya que el 100% de la actividad inicial se recupera con la dilución del DMSO. Estos resultados parecen indicar

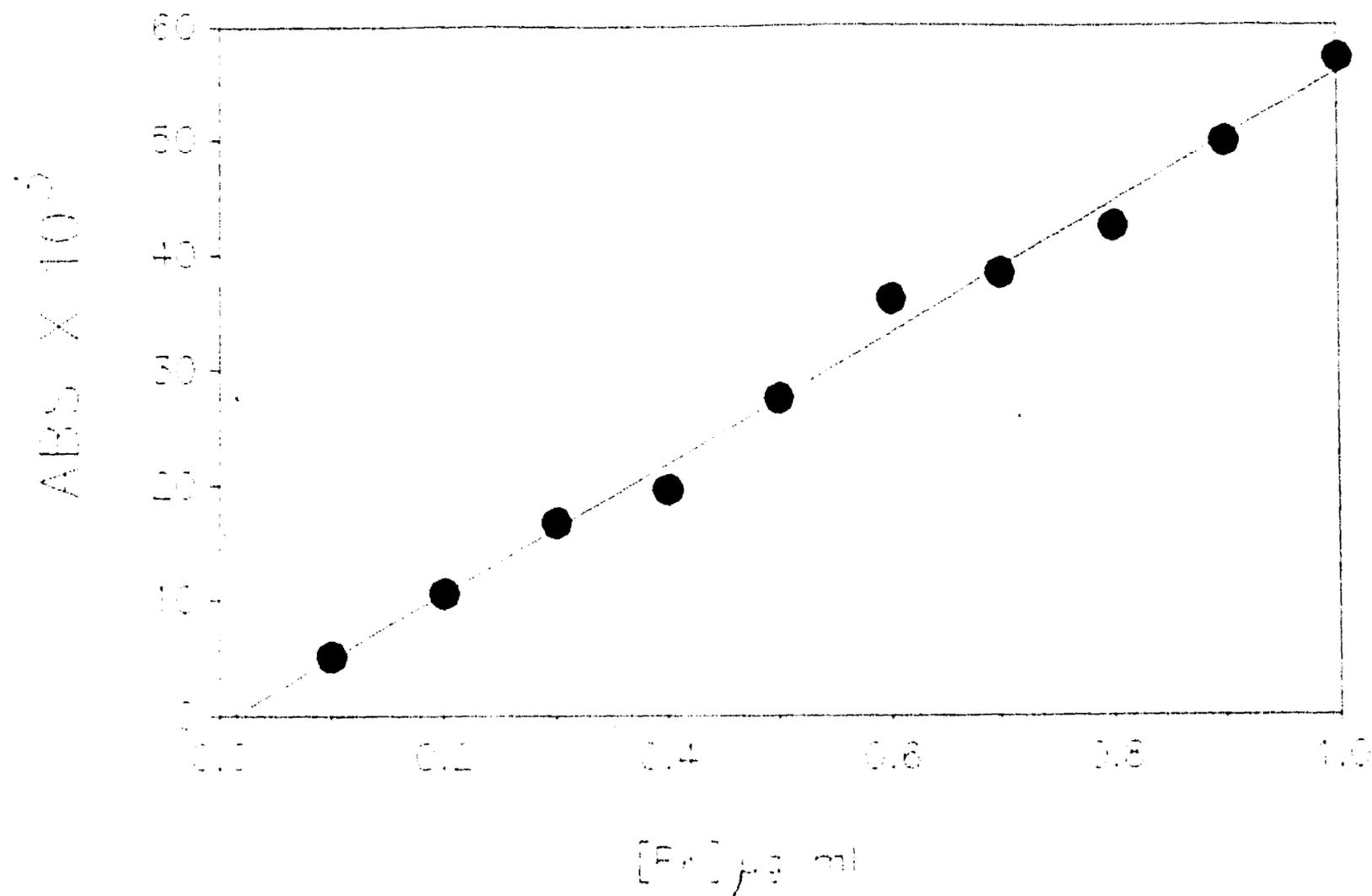


Figura 2. Curva de concentración de Piruvato Cinasa en 40% DMSO. La actividad independiente de K^+ fue proporcional a la concentración de proteína entre de 0.1 y 1.0 mg/ml. Las condiciones del ensayo fueron iguales a las de la figura 1. Las actividades específicas para todas las concentraciones de proteína fueron ≈ 11 μ moles \cdot min $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$. Esta actividad no cambió aún en presencia de 300 mg de lactato deshidrogenasa.

FALLA DE ORIGEN

TABLA I**Constantes cinéticas de la unión del K⁺ a la PK en mezclas binarias agua-DMSO**

	K _m (mM)	K _I (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	log k _{cat} (s ⁻¹)/K _m (M ⁻¹)
0	48.07 ± 6.82	-	1628	4.53
10	10.32 ± 1.35	-	1251	5.08
20	2.18 ± 0.23	28.02 ± 5.69	988	5.66
30	0.54 ± 0.07	10.37 ± 2.01	714	6.13
40	0.09 ± 0.01	0.85 ± 0.18	219	6.36

Constantes cinéticas de la unión del K⁺ en 100% de agua y mezclas binarias agua-DMSO. Las condiciones del ensayo fueron iguales a las de la figura 1, excepto por la adición de K⁺ que varió desde 0.01 mM hasta 100 mM, dependiendo de la concentración de DMSO. La fuerza iónica se mantuvo constante con Tris-HCl para las diferentes concentraciones de DMSO.

que el DMSO afecta la expresión de la actividad de la PK que depende de la presencia o no de 75 mM de K^+ .

Para explorar este efecto, se hicieron curvas de actividad a diferentes concentraciones de K^+ en 100% de agua y concentraciones variables de DMSO. La curva de saturación de K^+ en 100% de agua y 10% DMSO es Michaeliana; mientras que en 20, 30 y 40% DMSO aparece inhibición por el catión monovalente. En la Tabla I se muestra que la afinidad aparente de la PK por el K^+ aumenta gradualmente al aumentarse la concentración de DMSO hasta alcanzar una afinidad por K^+ cerca de 500 veces mayor a la que la enzima muestra en ausencia del cosolvente; en forma paralela aparece un efecto inhibitorio del K^+ . Así pues, al aumentar la concentración del cosolvente disminuye la estimulación de la actividad por el K^+ , por lo que la k_{cat} disminuye a 1/7 cuando la enzima está en 40% DMSO. El resultado de estos dos efectos contrarios es que la eficiencia catalítica de la enzima aumenta 1.4 órdenes de magnitud en DMSO al 40%. Por el momento, el efecto inhibitorio del K^+ no ha sido explorado y requiere de más experimentos para ser explicado.

Cabe mencionar que el aumento de la afinidad por el K^+ en 40% de DMSO no va acompañado de ningún efecto sobre la afinidad del PEP. La $K_{m,app}$ de PEP en 40% DMSO sin y con 400 μM de K^+ es de $30 \mu M \pm 3.2$ y $28 \mu M \pm 3.0$ respectivamente.

En suma, los datos de la Tabla I indican que la PK en 100% de agua es una enzima que se encuentra en una conformación en la que difícilmente se une K^+ , pero que éste al unirse induce un cambio en la enzima hacia la conformación catalíticamente activa que permite que la enzima exprese una actividad varios órdenes de magnitud mayor. Por otro lado, en DMSO al 40% se estabiliza la conformación catalíticamente activa de la enzima, conformación de muy alta afinidad por K^+ , en la que la adición del K^+ prácticamente no tiene efecto activador (activa sólo 5 veces). La diferencia entre la k_{cat} en 100% de agua y 40% DMSO se puede deber a restricciones impuestas por el cosolvente sobre algún paso del ciclo catalítico.

Perfiles de pH de la actividad de la Piruvato Cinasa en 100% de agua y 40% DMSO.

Como se mencionó, el DMSO a 40% parece inducir la conformación catalíticamente competente de la enzima. Esto parece confirmarse cuando se determina la actividad de la enzima en función del pH. El perfil de pH de la PK en 100% de agua en presencia de 75 mM de K^+ se sobrepone con el de la enzima en 40% DMSO sin K^+ . Esta curva muestra una meseta entre 7.3 y 7.8 que corresponde al perfil observado por Gregory y Ainsworth (1981). Esta curva es diferente de la que muestra la enzima en 100% de agua sin K^+ , en la que se observa un máximo a pH 8.5 (Figura 3).

Se ha estudiado la interacción de los cationes divalentes y monovalentes con la piruvato cinasa de músculo de conejo, utilizando una gran variedad de técnicas. Los resultados indican

que el complejo enzima-metal divalente tiene una conformación diferente a la de la enzima libre. Suelter y Melander (1963) observaron que la interacción del cloruro de manganeso o de magnesio con la PK en presencia de 0.1 M de KCl cambia el espectro diferencial de la proteína. Asimismo, Kayne y Suelter (1965) observaron la aparición de un espectro diferencial correspondiente a las tirosinas al añadir PEP al complejo enzima-Mn²⁺-K⁺. El espectro de polarización de fluorescencia de la PK en presencia de sus cationes activadores, MnCl₂ y KCl mostró un corrimiento hacia el azul de 2-3 nm en la enzima activada. También se observó que la polarización es mayor a todas las longitudes de onda de excitación que la observada en TMACl, un catión no activador. Estos resultados indican que la piruvato cinasa de músculo presenta una transición conformacional como resultado de la interacción con los cationes activadores o con el PEP (Suelter, 1967).

Sorger y cols. (1965) encontraron que el comportamiento inmunolectroforético de la piruvato cinasa depende del catión monovalente que se encuentre en el medio; es decir, la movilidad de la enzima en un campo eléctrico con K⁺ es mayor que con Tris⁺ o Li⁺. Además, la enzima difunde más rápido en el agar con K⁺ que con Tris⁺ o Li⁺. En suma, los autores encontraron que el comportamiento inmunolectroforético es similar si está presente K⁺, Rb⁺ o Na⁺ y diferente si es Tris o Li⁺. Estos resultados correlacionan con que la enzima es activa

con K^+ , Rb^+ , menos activa con Na^+ y completamente inactiva con Tris o Li^+ . Esto podría reflejar diferencias en la organización de la estructura de la enzima.

El estudio del complejo binario enzima- Mn^{2+} (Mildvan y Cohn, 1965) y ternario enzima- Mn^{2+} -PEP (Mildvan y Cohn, 1966) en presencia de K^+ por métodos de resonancia magnética nuclear han mostrado evidencia de que ocurren cambios conformacionales en la enzima o en el sitio activo cuando ésta se combina con manganeso o cuando el PEP se une al complejo binario enzima- Mn^{2+} .

Con estos antecedentes y para determinar si el cosolvente en contacto con la enzima cambiaba su estructura, y si estas alteraciones correlacionaban con la modificación de las sus propiedades catalíticas observadas se realizaron estudios de resonancia magnética nuclear y fluorescencia intrínseca.

Velocidad de la Relajación de los Protones del agua por pulsos de Resonancia Magnética Nuclear en el sitio activo de la piruvato cinasa en 100% de agua y en 40% de DMSO.

Una manera de monitorear las modificaciones del sitio activo de una enzima, que une como activador natural a un ión paramagnético, consiste en estudiar el efecto de éste sobre la velocidad de relajación de los protones del agua siguiendo el método que se describe en el Apéndice. Este método permite determinar las constantes de disociación del ión paramagnético y/o sustrato(s) así como los factores de *enhancement* que dan información

TABLA II

Constantes de disociación de los complejos PK-Mn²⁺, PK-Mn²⁺-PEP en mezclas binarias agua-DMSO

DMSO (%)	K _d Mn ²⁺ (μM)	ε _b	K _d PEP (μM)	ε _t
0 + K ⁺	70.73	25.28	18.23	1.16
0 + TMA ⁺	80.26	17.86	75.12	4.31
10 + TMA ⁺	---	---	29.95	3.30
20 + TMA ⁺	---	---	41.18	2.59
30 + TMA ⁺	---	---	16.04	1.52
40 + TMA ⁺	61.14	16.76	12.36	1.80

Constantes de disociación de los complejos PK-Mn²⁺, PK-Mn²⁺-PEP en 100% de agua y mezclas binarias agua-DMSO. Las condiciones del ensayo fueron Tris-HCl 50 mM pH 7.6, 152 μM de sitios de PK, 50 μM de MnCl₂, sin o con PEP 5 mM. Los ensayos se llevaron a cabo en TMACl o en KCl 100 mM. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Los detalles de como se llevaron a cabo los experimentos de PRR así como los cálculos, se encuentran en la sección correspondiente de Materiales y Métodos.

sobre los cambios en la conformación del sitio en el que se forma el complejo con la enzima (Cohn, 1963; Mildvan y Cohn, 1963).

En la Tabla II se muestran las constantes de disociación y los factores de *enhancement* (ϵ_b) del complejo binario (PK-Mn²⁺) y (ϵ_t) ternario (PK-Mn²⁺-PEP) en diferentes mezclas de agua-DMSO con 0.1M de tetrametilamonio (TMA⁺) o 0.1 M de KCl. La Kd del complejo binario enzima-Mn²⁺ en 100% de agua es independiente de la presencia de K⁺ y coincide con la informada por Mildvan y Cohn (1965) de $68 \pm 20 \mu\text{M}$. El valor de ϵ_b que obtuvimos con K⁺ es igual al obtenido por Nowak y Mildvan (1972) de 25.0 ± 2.6 y éste no es significativamente diferente al ϵ_b que obtuvimos con TMA⁺ (sólo 1.4 veces menor). La Kd del PEP del complejo ternario enzima-Mn²⁺-PEP en 100% de agua con KCl coincide con la informada por Mildvan y Cohn (1966) de $15 \mu\text{M}$ así como el ϵ_t con el encontrado por Nowak y Mildvan (1972) de 1.85. La Kd del PEP y el ϵ_t del complejo ternario enzima-Mn²⁺-PEP que obtuvimos en 100% de agua son cerca de la cuarta parte con K⁺ que con TMA⁺. En suma, los resultados en agua indican que la unión del Mn²⁺ a la enzima es independiente del K⁺ a pesar de que la rotación relativa de la capa de hidratación alrededor del manganeso con K⁺ parece estar más restringida que con TMA⁺ (de acuerdo a las diferencias de los ϵ_b encontradas). Por otro lado, ya se había observado que el *enhancement* disminuye dramáticamente al unir el PEP al complejo binario enzima-Mn²⁺ en presencia de K⁺ (de ≈ 30 a

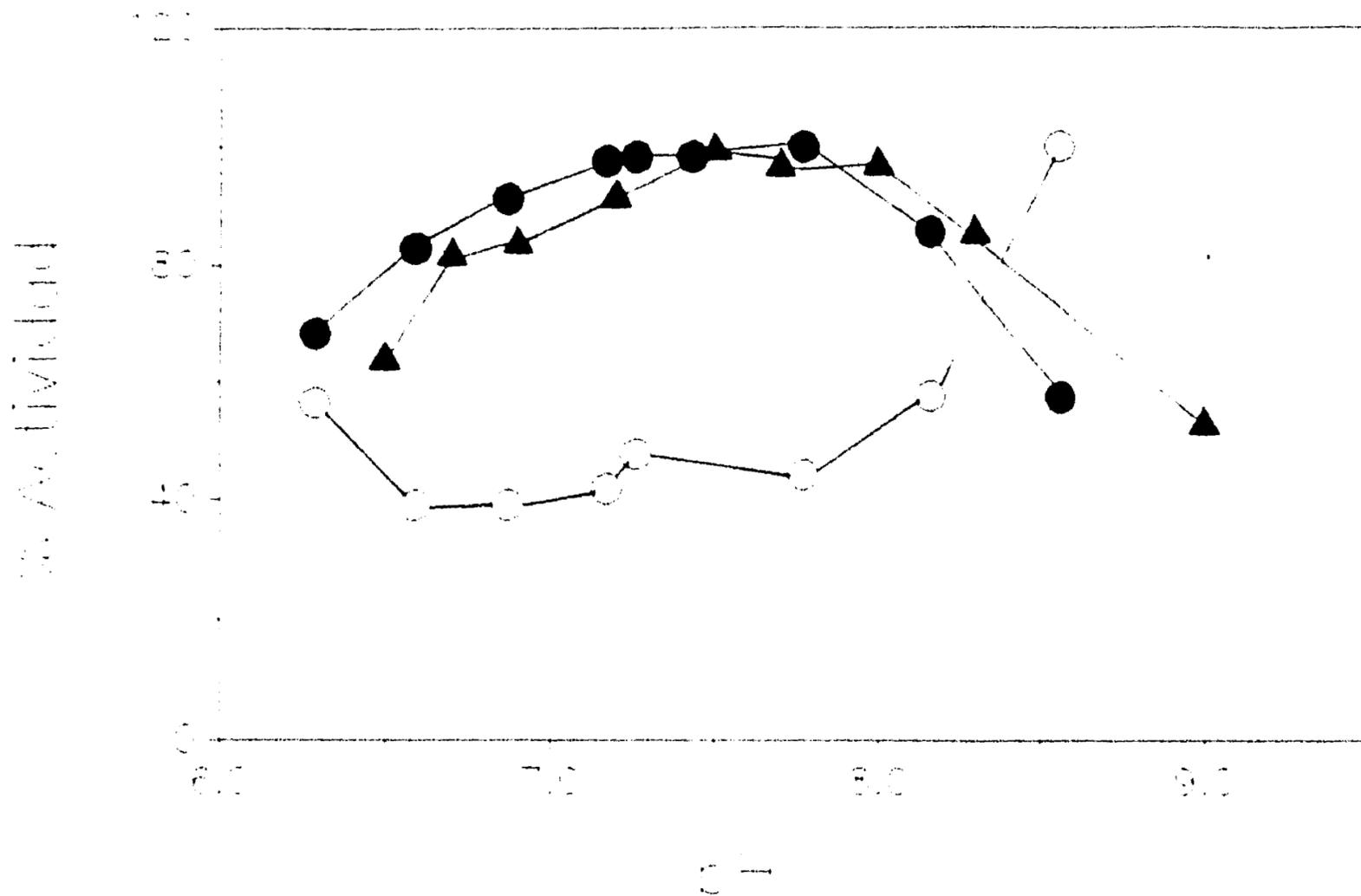


Figura 3. Efecto del pH sobre la actividad de la Piruvato Cinasa en 100% de H₂O y 40% DMSO a diferentes pHs. (●) indica el % de la actividad en 100% H₂O y 75 mM de KCl. (○) muestra la actividad en 100% H₂O sin K⁺. (▲) ilustra la actividad de la piruvato cinasa en 40% de DMSO sin K⁺. Se usaron los amortiguadores MOPS-Tris para el rango de 6.5 a 7.7 y Tris-HCl para el rango de pH 8.0 a 9.0; el resto de las condiciones experimentales fueron iguales a los de la figura 1 a excepción del NADH que se usó la sal de Na. Los datos fueron normalizados considerando la actividad máxima detectada como 100%; estas fueron 270 μ moles min⁻¹mg⁻¹ (●), 0.07 μ moles min⁻¹mg⁻¹ (○) y 45 μ moles min⁻¹mg⁻¹ (▲).

FALLA DE ORIGEN

2) (Cohn, 1963; Nowak y Mildvan, 1972). Los autores han mencionado que este efecto es demasiado grande para atribuirse únicamente a la disminución en el número de protones del agua en la esfera de hidratación del Mn^{2+} y pudiera ser causado por un cambio en la conformación que produzca un cambio en el tiempo de correlación rotacional de los protones; es decir que la capa de hidratación alrededor del manganeso esté menos restringida en su rotación. En contraste, en TMA^+ , el factor de *enhancement* pasa de ≈ 18 a 4.3, además de que el PEP se une más débilmente. Por otro lado, la K_d y el ϵ_b del complejo binario en TMA^+ no se afectaron por la presencia del cosolvente (40% DMSO) en tanto que la K_d y ϵ_1 del complejo ternario en TMA^+ y en 10, 20, 30 y 40% DMSO muestran valores intermedios entre los encontrados en 100% de agua con TMA^+ y K^+ . Estos resultados, en concordancia con todos los anteriores, indican que la enzima en presencia del DMSO sufre una transición estructural, en la que pasa de la conformación inactiva a la conformación catalíticamente competente, en ausencia de su activador K^+ .

Fluorescencia Intrínseca de la Piruvato Cinasa en 100% de agua y 30% DMSO.

Se ha postulado que, los activadores esenciales de la enzima, K^+ y Mg^{2+} o Mn^{2+} , y su sustrato PEP inducen la conformación catalíticamente activa, mientras que la enzima en

ausencia de sus activadores estabiliza la conformación inactiva de la enzima. Estas dos conformaciones dan una señal diferencial en el espectro de emisión de fluorescencia .

La Figura 4 ilustra en líneas continuas el espectro de emisión de fluorescencia en 100% de agua de la PK sin ligandos y, con un corrimiento hacia el azul de 2-3 nm, el espectro de la PK con ligandos (K^+ , Mg^{2+} y PEP). Cuando la enzima está en presencia de 30% de DMSO sin ligandos se obtiene el espectro de la línea punteada, que coincide con el espectro de la enzima con ligandos en 100% de agua. Es decir, el espectro obtenido en 30% de DMSO sugiere que la PK se encuentra en este medio en la conformación activa, independientemente de la presencia de PEP, Mg^{2+} y K^+ .

Como ya se mencionó, la PK sin K^+ en DMSO estabiliza la conformación catalíticamente activa de la enzima, comparable a la que presenta la enzima en agua con K^+ . Estas observaciones y las de otros autores, indican que el papel del K^+ en agua parece ser el de estabilizar la conformación activa de la enzima; probablemente a través de estabilizar su estructura cuaternaria. Existen datos en la literatura que podrían apoyar esta idea, por ejemplo: la dialquilglicina descarboxilasa es una enzima tetramérica que tiene un sitio selectivo para el K^+ ; la ocupación de este sitio por el catión K^+ produce la conformación activa. El K^+ se encuentra localizado a 11 Å del sitio activo lo que hace improbable que pueda participar directamente en la catálisis. El ión K^+ está inmerso en una cavidad ubicada cerca de

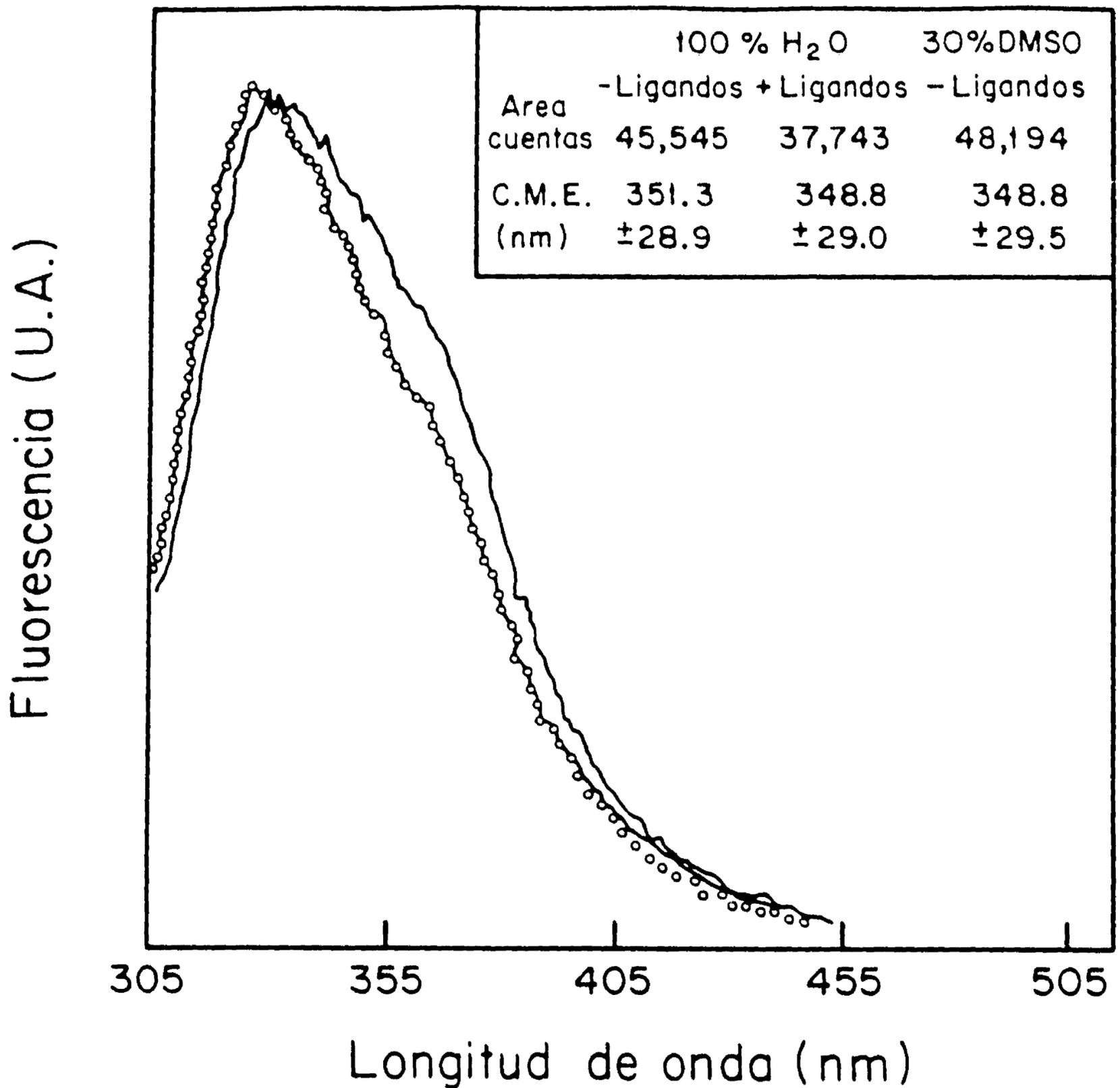


Figura 4 Espectros de emisión de fluorescencia de la piruvato cinasa en 100% de H₂O y en DMSO al 30%. Los espectros se registraron a una longitud de onda de excitación de 295 nm. Los espectros en 100% de agua se obtuvieron de mezclas que contenían piruvato cinasa a una concentración de 75 µg/ml en 80 mM de Tris-HCl pH 7.6 sin y con PEP 1mM, MgCl₂ 3mM y KCl 30mM ambos ilustrados con líneas continuas, mostrando un corrimiento hacia el azul en presencia de los ligandos. El trazo sobrepuesto ilustrado por la línea punteada muestra el espectro obtenido en DMSO al 30% (v/v) que contenía 75 µg de piruvato cinasa sin ligandos.

la interfase entre monómeros y está coordinado a 6 oxígenos en una geometría octahédrica. La selectividad por K^+ parece depender de esta geometría espacial. Se considera que la unión de Na^+ a este sitio altera la orientación de los grupos que participan directamente en la catálisis. Aparentemente este es el mecanismo por el que el Na^+ desestabiliza a la enzima (Toney, 1993). En el caso de la PK, en trabajos previos a los datos cristalográficos, estudios con NMR sugieren que el K^+ está coordinado al grupo carboxilo del PEP en el sitio activo de la enzima (Nowak y Mildvan, 1972) y que la distancia a la que se encuentra del Mn^{2+} unido a la enzima disminuye de 8.2 a 4.9 Å en presencia del PEP, distancia tan corta que difícilmente podría suponerse fuera del sitio activo (Kayne, 1971). Recientemente Larsen y cols. (1994) publicaron datos cristalográficos de la PK de músculo de conejo, en complejo con Mn^{2+} , K^+ y piruvato a 2.9 Å de resolución. Encontraron que la densidad electrónica correspondiente al piruvato está contigua a la del Mn^{2+} , mientras que la densidad electrónica del K^+ aparece en un sitio bien definido y no interactúa con el piruvato unido (ver Esquema 7). Se ubicó entre el O_2 del carbonilo de Thr 113, O^γ de Ser 76, O^δ de Asn 74 y O^δ de Asp 112 y que puede establecer enlace indirecto a través de un puente de hidrogeno entre el carbonilato del Asp 112, el $NH_2-\epsilon$ de la Lys 269 y el guanidinio de la Arg 72. Los autores proponen que este enlace indirecto puede ser suficiente para ejercer el efecto activador del K^+ en la actividad catalítica de la enzima.

Otros ejemplos del efecto del K^+ sobre la estabilización de la estructura cuaternaria de la PK, son las piruvato cinasas de dos especies cuya catálisis es independiente del K^+ . Una de ellas, es la PK de *Zimomonas mobilis* que no requiere K^+ para catalizar y que es la única PK dimérica (Pawluk y col., 1986). La PK de *Mycobacterium smegmatis* no es activada por cationes monovalentes (NH_4^+ , K^+ y Na^+) pero requiere la adición de 100 mM de KCl para estabilizar la forma tetramérica en soluciones diluídas (Kapoor y col., 1983).

Es importante señalar que la adición del PEG en nuestro sistema, tiene un efecto semejante al DMSO, permite observar la actividad de PK independiente de K^+ . El PEG estabiliza la estructura cuaternaria de diversas enzimas, entre las que se encuentran la PK de hígado (Medina y col., 1985), la fosfofructocinasa de músculo (Boscá y col., 1985), la Rubisco y su activasa (Salvucci, 1992) y la PK del endospermo de semillas de *Ricinus communis* (Podestá y Plaxton, 1993). El efecto del PEG en el autoensamblaje de proteínas es bien conocido y ha sido descrito por Nichol y col. (1981); Knoll y Hermans, (1983) y Arakawa y Timasheff, (1985).

Por todo lo anterior, pensamos explorar el efecto del DMSO en el estado de asociación de la enzima. Para ello se va a determinar la actividad de la enzima en diferentes soluciones diluídas y se va a variar el DMSO en contacto con la enzima. Además pensamos estudiar otro ligando de la PK que ha sido útil para diferenciar los estados conformacionales de la

enzima. Se sabe que el inhibidor alostérico Phe, estabiliza la conformación inactiva de la enzima dando una señal característica en el espectro de emisión de fluorescencia, equivalente al de la enzima en ausencia de sus ligandos activadores K^+ , Mg^{2+} y PEP (Kayne y Price (1972)). Asimismo, la unión de una molécula de Phe es suficiente para inhibir la actividad del tetrámero, por lo que se ha supuesto que alteraciones en los contactos entre subunidades puedan ser la causa de la inhibición (Oberfelder y col. (1984)).

Cabe mencionar que en el trabajo realizado con cosolventes únicamente se exploró el efecto positivo sobre la expresión de la actividad de la piruvato cinasa, pero aún están por explicarse los dos efectos inhibitorios que encontramos; el del DMSO sobre la V_{max} de la PK y el del K^+ en presencia de 20 a 40% de DMSO (valores de K_i de la Tabla I).

El efecto inhibitor del DMSO sobre la actividad de la PK se hace más evidente con el cosolvente al 50% sin K^+ (Figura 1), no obstante aún en la condición experimental en que se encontró la mayor actividad, DMSO al 40% con 400 μM de K^+ , la k_{cat} es 1/7 de la que muestra la enzima en 100% de agua con 100 mM de K^+ . Es probable que el DMSO imponga alguna restricción en algún paso del ciclo catalítico de la enzima y de esta manera inhiba su actividad. Una manera de abordar este problema podría ser a través de estudiar, en presencia de DMSO, las reacciones parciales que cataliza la PK. Se sabe que la PK además de su reacción fisiológica es capaz de fosforilar al fluoruro (en presencia de bicarbonato) (Tietz y

Ochoa (1958)), a la hidroxilamina (en presencia de bicarbonato) (Kupiecki y Coon (1959)) y al glicolato (Kayne (1974)); también puede transferir un protón del medio al piruvato (Robinson y Rose (1972)). Las reacciones de fosforilación son análogas a la inversa de la reacción fisiológica, en tanto que la transferencia del protón al piruvato es análoga a la formación del intermediario enolpiruvato.

Con respecto a la inhibición del K en presencia de DMSO, creemos que la enzima se comporta de manera similar a la PK de *Phycomyces blakesleeianus*. Esta enzima no se activa por cationes monovalentes sino que se inhibe. Mas aún, la enzima tiene una constante de asociación mayor entre sus subunidades (Busto y cols (1987)). Se requiere 6 M de urea para disociarla mientras que la PK de músculo se disocia en 2.1 M (Doster y Hess (1981)). Este ejemplo puede apoyar la idea de que el K⁺ se requiere para estabilizar la estructura cuaternaria de la PK.

Con base a estos datos, estamos interesados en explorar la eficiencia y la especificidad del catión monovalente en la activación y en la inhibición de la enzima en presencia de un cosolvente. Por otro lado, pensamos realizar estudios de unión del catión monovalente con la enzima y calcular sus constantes de disociación y número de sitios de unión a la enzima.

CONCLUSIONES

Las observaciones de este trabajo indican que la dependencia del activador K^+ se modifica al alterar el solvente en contacto con la piruvato cinasa. El ambiente que rodea a la piruvato cinasa en micelas invertidas de CTAB, octano y hexanol con 3-4% de agua, o bien en presencia de 30-40% DMSO parece sustituir parcialmente el efecto activador del K^+ . En este ambiente, de baja actividad de agua, los estudios sobre la cinética y la estructura de la PK muestran que la enzima tiene una conformación catalíticamente activa comparable a la que muestra la enzima con 100mM de K^+ en 100% de agua. En micelas invertidas o DMSO la enzima adopta una conformación que es mucho más accesible al K^+ , pero en la que su efecto activador es muchas veces menor que el que se observa en 100% de agua. Esto sin afectar el sitio de unión del PEP. Por otro lado, la adición del PEG, mostró un efecto activador semejante al del DMSO, permitiendo observar la actividad de la PK independiente de K^+ . El efecto del PEG en el autoensamblaje de las proteínas ha sido descrito en varias proteínas.

Así pues, las observaciones indican que el papel del K^+ en agua parece ser el de estabilizar la conformación activa de la PK. Pensamos que el mecanismo podría ser a través de estabilizar su estructura cuaternaria.

Referencias

- Arakawa, T. y Timasheff, S. N. *Biochemistry* **24**, 6756-6762 (1985).
- Arakawa, T., Bhat, R., Timasheff, S. N. *Biochemistry* **29**, 1914-1923 (1990a).
- Arakawa, T., Bhat, R., Timasheff, S. N. *Biochemistry* **29**, 1924-1931 (1990b).
- Baek, Y. H. y Nowak, T. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 491-497 (1982).
- Baker, E. N., Blundell, T. L., Cutfield, J. F., Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Dodson, G. G.,
Crowfoot Hodgkin, D. M., Hubbard, R. E., Isaacs, N. W., Reynolds, C. D., Sakabe, K.,
Sakebe, N., y Vijayan, N. M. *Philos. Trans. R. Soc. London.* **B319**, 369-456 (1988).
- Bloembergen, N., Purcell, E. M. y Pound, R. V. *Phys. Rev.* **73**, 679-(1948).
- Bone, R., Silen, J. L. y Agard, D. A. *Nature* **339**, 191-195 (1989).
- Boscá, L., Aragón, J. J. y Sols, A. *J. Biol. Chem.* **260**, 2100- 2107 (1985).
- Boyer, P. D., Lardy, H. A. y Phillips, P. H. *J. Biol. Chem.* **146**, 673-682 (1942).
- Boyer, P. D. en *The Enzymes* **vol. 6** (Boyer, P. D., Lardy, H. y Myrback, K., eds.) 2nd ed.
Academic Press, Inc. pp. 95-113 (1962).
- Brooks, C. L. III y Karplus, M. en *Methods in Enzymol.* **127**, 369-400 (1986).
- Buchbinder, J. L., Baraniak, J., Frey, P. A. y Reed, G. H. *Biochemistry* **32**, 14111-14116
(1993).

- Buchbinder, J. L. Ph.D. Dissertation, University of Wisconsin- Madison, Madison, WI (1991). c. f. Larsen, T. M., Laughlin, T., Holden, H. M., Rayment, I. y Reed, G. H. *Biochemistry* **33**, 6301-6309 (1994).
- Busto, F., Del Valle P. y Soler J. *Biochem. Cell Biol.* **66**, 148-157 (1988).
- Careri, G., Gratton, E., Yang, P. H. y Rupley, J. A. *Nature* **248**, 572-773 (1980).
- Carvalho-Alves, P.C. y Scofano H. M. *J. Biol. Chem.* **262**, 6610-6614 (1987).
- Chan, T. C. y Van Hook, W. A. *J. Solution Chem.* **5**, 107-123 (1976).
- Cohn, M. y Leigh, J. S. *Nature* **193**, 1037-1040 (1962).
- Cohn, M. *Biochemistry* **2**, 623-629 (1963).
- De Meis, L. *Biochim. Biophys. Acta* **973**, 333-349 (1989).
- Dougherty, T. M. y Cleland, W. W. *Biochemistry* **24**, 5875-5880 (1985).
- Doster, W. y Hess, B. *Biochemistry* **20**, 772-780 (1981).
- Dunaway-Mariano, D., Benovic, J. L., Cleland, W. W., Gupta, R. K. y Mildvan, A. S. *Biochemistry* **18**, 4347-4354 (1979).
- Eisinger, J., Shulman, R. G., Blumberg, W. E. *Nature* **192**, 963- 964 (1961).
- Eisinger, J., Shulman, R. G. y Szymanski, B. M. *J. Chem. Phys.* **36**, 1721-1729 (1962).
- Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez- Puyou, A., Millán, L. y Darszon, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 332-343 (1989).

- Estell, D. A., Graycar, T.P., Miller, J. V., Powers, D. B., Burnier, Ng. P. G. y Wells, J. A.
Science **233**, 659-663 (1986).
- Fernández-Velasco, D. A., Garza-Ramos, G., Ramírez, L., Shoshani, L., Darszon, A. Tuena de
Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. *Eur. J. Biochem.* **205**, 501-508 (1992).
- Finney, J. L. *J. Mol. Biol.* **119**, 415-441 (1978).
- Finney, J. L., Gellaly, B. J., Golton, I. C. y Goodfellow, J. *Biophys. J.* **32**, 17-33 (1980).
- Finney, J. L. y Poole, P. L. *Comments Mol Cell Biophys.* **2**, 129-151 (1984).
- Fletcher, P. D. I., Rees, G. D., Robinson, B. H. y Freedman, R. B. *Biochim. Biophys. Acta*
832, 204-214 (1985).
- Fothergill-Gilmore, L. A. y Michels, P. A. M. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **59**, 105-235
(1993).
- Friberg, S. E. y Bendiksen, B. *J. Chem. Education* **56**, 533-555 (1979).
- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A.
Biochemistry **28**, 3177-3182 (1989).
- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A.
Biochemistry **29**, 751-757 (1990).
- Garza-Ramos, G., Fernández-Velasco, D. A., Ramírez, L., Darszon, A., Shoshani, L., Tuena
de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. *Eur. J. Biochem.* **205**, 509-517 (1992).

- Gregory, R. B. y Ainsworth, S. *Biochem. J.* **195**, 745-751 (1981).
- Gupta, R. K., Oesterling, R. M. y Mildvan, A. S. *Biochemistry* **15**, 2881-2887 (1976).
- Gupta, R. K. y Mildvan, A. S. *J. Biol. Chem.* **252**, 5967-5976 (1977).
- Hall, E. R. y Cottam, G. L. *Int. J. Biochem.* **9**, 785-793 (1978).
- Halling, P. J. *Biocatalysis* **1**, 109-115 (1987).
- Higuchi, W. I. y Misra, J. *J. Pharm. Sci.* **51**, 459-466 (1962).
- Inoue, H. Noguchi, T. y Tanaka, T. *Eur. J. Biochem.* **154**, 465- 469 (1986).
- Kayne, F. J. y Suelter, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 897-900 (1965).
- Kayne, F. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**, 232-239 (1971).
- Kayne, F. J. y Price, N. C. *Biochemistry* **11**, 4415-4420 (1972).
- Kayne, F. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59**, 8-13 (1974).
- Klibanov, A. M., en *Protein Engineering Applications in Science, Medicine and Industry* (M. Inouye & R. Sarma, eds. pp 341-349 (Academic Press Inc, New York, (1986).
- Knoll, D. y Hermans, J. *J. Biol. Chem.* **258**, 5710-5715 (1983).
- Kodanpani, R., Suresh, C. G. y Vijayan, M. *J. Biol. Chem.* **265**, 16126-16131 (1990).
- Kraulis, P. J., *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946-950 (1991).
- Kubinec, M. G. y Wemmer, D. E. *Curr. Opinion St. Biol.* **2**, 828-831 (1992).
- Kuntz, I. D. y Kauzmann, W. *Adv. Protein Chem.* **28**, 239-345 (1974).

- Kuo, D. J. y Rose, I. A. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 6288-6289 (1978).
- Kuo, D. J., O'Connell, E. L. y Rose, I. A. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 5025-5030 (1979).
- Kupiecki, F. P. y Coon, M. J. *J. Biol. Chem.* **23**, 2428-2432 (1959).
- Larreta-Garde, V., Xu, Z. F., Lamy, L., Mathlouthi, M. y Thomas, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 816-822 (1988).
- Larsen, T. M., Laughlin, T., Holden, H. M. Rayment, I. y Reed, G. H. *Biochemistry* **33**, 6301-6309 (1994).
- Lehmann, M. S. y Stansfield, R. F. D. *Biochemistry* **28**, 7028-7033 (1989).
- Lone, Y. C., Simon, M.-P., Kahn, H. y Marie, J. *FEBS Lett.* **195**, 97-100 (1986).
- Longberg, N y Gilbert, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 3661-3665 (1983).
- Lord, K. A. y Reed, G. H. *Inorg. Chem.* **26**, 1464-1466 (1987).
- Lowenstein, J. M. *Biochem. J.* **75**, 269-274 (1960).
- Luisi, P. L. y Magid, L. J. *Crit. Rev. Biochem.* **20**, 409-474 (1986).
- Luisi, P. L., Giomni, M., Pileni, M. P. y Robinson, B. H. *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 209-246 (1988).
- Maitra, A. *J. Phys. Chem.* **88**, 5122-5125 (1984).
- Malcolm, G. N. y Rowlinson, J. S. *Trans. Faraday Soc.* **53**, 921-931 (1957).
- Margolin, A. L., Tai, D. -F, Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 7885-7887 (1987).

- Marie, J., Simon, M.-P., Dreyfus, J. C. y Kahn, A. *Nature* **292**, 70-72 (1981).
- Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N. L., Pantin, V.I. y Berezin, I. V. *Biochim. Biophys. Acta* **657**, 277-294(1981).
- Martinek, K., Levashov, A. V., Klyachko, N. L., Khmel'nitski, Y. L. y Berezin, I. V. *Eur. J. Biochem.* **155**, 453-468 (1986).
- Martinek, K., *Biochem. Int.* **18**, 871-893 (1989a).
- Martinek, K., Klyachko, N. L., Kabanov, A. V., Khmel'nitski, Y. L. y Levashov, A. V. *Biochim. Biophys. Acta* **981**, 161-172(1989b).
- Maurel, P. *J. Biol. Chem.* **253**, 1677-1683 (1978).
- McQuate, J. T. y Utter, M. F. *J. Biol. Chem.* **234**, 2151-2157(1959).
- Medina, R., Aragón, J. J. y Sols, A. *FEBS Lett.* **180**, 77-80 (1985).
- Menger, F. M., Donohue, J. A., Williams, R. F. *J. Am. Chem.Soc.* **95**, 286-288 (1973).
- Mildvan, A. S. y Cohn, M. *Biochemistry* **2**, 910-919 (1963).
- Mildvan, A. S. y Cohn, M. *Abstr. VI Int. Congr. Biochem. IV*, 111 (1964). c. f. Nowak, T. y Mildvan, A. S. *Biochemistry* **11**, 2819-2828 (1972).
- Mildvan, A. S. y Cohn, M. *J. Biol. Chem.* **240**, 238-246 (1965).
- Mildvan, A. S. y Cohn, M. *J. Biol. Chem.* **241**, 1178-1193 (1966).

- Mildvan, A. S., Sloan, D. L., Fung, C. H., Gupta, R. K. y Melamud, E. *J. Biol. Chem.* **251**, 2431-2434 (1976).
- Muirhead, H., Grant, J. P., Lawton, M. A., Midwinter, C. A., Nocton, J. C. y Stuart, D. I. *Biochem. Soc. Trans.* **9**, 212-213 (1981).
- Muirhead, H., Clayden, D. A., Barford, D. Lorimer, C. G. Fothergill-Gilmore, L. A., Schiltz, E. y Schmitt, W. *EMBO J.* **5**, 475-481 (1986).
- Muirhead, H. en *Biological Macromolecules and Assemblies* **vol. 3** (Jurnak, F. A. & McPherson, A., eds.) John Wiley & Sons, Inc., London New York pp. 144-186 (1987).
- Noguchi, I. y Tanaka, T. *J. Biol. Chem.* **257**, 1110-1113 (1982).
- Noguchi, T., Inour, H. y Tanaka, T. *J. Biol. Chem.* **261**, 13807-13812 (1986).
- Nowak, T. y Mildvan, A. S. *Biochemistry* **11**, 2819-2828 (1972).
- Nowak, T. en *Spectroscopy in Biochemistry* **vol. II**, pp. 109-135 (Ed. J. Ellis Bell) CRC Press Boca Raton, Florida (1981).
- Oberfelder, R. W., Lee, L.-Y. y Lee, J. C. *Biochemistry* **23**, 3813-3821 (1984).
- Pérez-Ramírez, B. y Timasheff, S. N. *Biochemistry* **33**, 6262-6267 (1994).
- Peters, J., Nash, H. R., Eicher, E. M. y Bulfield, G. *Biochem. Genet.* **19**, 759-769 (1981).
- Podestá, F. E. y Plaxton, W. *Plant Physiol.* **103**, 285-288 (1993).
- Poole, P. L. y Finney, J. L. *Biopolimers* **22**, 255-260 (1983).

- Raushel, F. M. y Villafranca, J. J. *Biochemistry* **19**, 5481- 5485 (1980).
- Reuben J. y Kayne, F. J. *J. Biol. Chem.* **246**, 6227-6234 (1971).
- Robinson, J. y Rose, I. A. *J. Biol. Chem.* **247**, 1096-1105 (1972).
- Rose, I. A. *J. Biol. Chem.* **235**, 1170-1177 (1960).
- Rose, I. A. *J. Biol. Chem.* **245**, 6052-6056 (1970).
- Rose, I. A., Kuo, D. J. y Warms, J. V. B. *Biochemistry* **30**, 722- 726 (1991).
- Rubio, E., Fernández-Mayorales, A. y Klibanov, A. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 695-696 (1991).
- Rupley, J. A., E. Gratton y Careri G. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 18-22 (1983).
- Salvucci, M. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 688-696 (1992).
- Savage, H. F. J. y Finney, J. L. en *Biomolecules in Organic Solvents* (Gómez Puyou, A., Ed.)
pp. 1-33, CRC Press, Boca Raton, FL., 1992).
- Schachman, H. K. y Lauffer, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 536-541 (1949).
- Schmidt-Bäse, K. Buchbinder, J. L., Reed, G. H. y Rayment, I. *Proteins: Struct., Funct.,
Genet.* **11**, 153-157 (1991).
- Seeholzer, S. H., Jaworowski, A. y Rose, I. A. *Biochemistry* **30**, 727-732 (1991).
- Sorger, G. J., Ford, R. E. y Evans, H. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* **54**, 1614-1621 (1965).
- Ståhl, M., Månsson, M. y Mosbach, K. *Biotech. Letters* **12**, 161-166 (1990).
- Stammers, D. H. K. y Muirhead, H. *J. Mol. Biol.* **95**, 213-225(1975).

- Suelter, C. H. y Melander, W. *J. Biol. Chem.* **238**, PC4108-PC4109 (1963).
- Suelter, C. H., Singleton, R., Jr., Kayen, F. J., Arrington, S., Glass, J. y Mildvan, A. S. *Biochemistry* **5**, 131-138 (1966).
- Suelter, C. H. *Biochemistry* **6**, 418-423 (1967).
- Suelter, C. H. *Science* **168**, 789-795 (1970).
- Teeter, M. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 577-600 (1991).
- Thompson, K. F. y Gierasch, L. M. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 3648-3652 (1984).
- Tietz, A. y Ochoa, S. *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 477-493 (1958).
- Timasheff, S. N. y Arakawa, T. en *Protein Structure: a practical approach*. T. E. Creighton (Ed) IRL Press, New York p. 332 y 336 (1989).
- Tipton, P. A., McCracken, J., Cornelius, J. B. y Peisach, J. *Biochemistry* **28**, 5720-5728 (1989).
- Toney, M. D., Hohenester, E., Cowan, S. W. y Jansonius, J. N. *Science* **261**, 756-759 (1993).
- Tsuji, K., Sunamoto, J., Fendler, J. H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56**, 2889-2893 (1983) c.f. Waks, M. *Proteins* **1**, 4-15 (1986).
- Ueberreiter, K. *Colloid & Polymer Sci.* **260**, 37-45 (1982).
- Waks, M. *Proteins* **1**, 4-15 (1986).

- Wells, J. A., Cunningham, B.C., Graycar T. P. y Estell, D. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 5167-5171 (1987).
- Wescott, C. R. y Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 1629-1631 (1993).
- Ryu, K. y Dordick, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8026-8027 (1989).
- Wilks, H. M., Hart, K. W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A. R. y Holbrook, J. J. *Science* **242**, 1541-1544 (1988).
- Wong, M., Thomas, J. K. y Nowak, T. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4730-4736 (1977).
- Xu, Z. F., Larreta-Garde, V. y Thomas, D. *Biochim. Biophys. Acta* **998**, 251-257 (1989).
- Nichol, L. W., Ogston, A. G. y Wills, P. R. *FEBS Lett.* **126**, 18-20 (1981).
- Visser, A. J. W. G., Vos, K., Van Hoek, A. y Santema, J. S. *J. Phys. Chem.* **92**, 759-762 (1988).
- Xu, Z. F., Thomas, D. y Larreta-Garde, V. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 506-510 (1990).
- Yang, P. H. y Rupley, J. A. *Biochem.* **18**, 2654-2661 (1979).
- Zaks, A. y Klibanov, A. M. *Science* **224**, 1249-1251 (1984).
- Zaks, A. y Klibanov, A. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2767-2768 (1986).
- Zaks, A. en *Stability of Protein Pharmaceuticals. Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation.* ed. Tim J. Ahern y Mark C. Manning. Plenum Press, New York pp. 249-271 (1992).

Apéndice

Velocidad de relajación de los protones del agua por NMR

Con el objeto de definir el fenómeno de resonancia magnética nuclear, supongamos que tenemos una población de núcleos (por ejemplo (^1H) que exhiben la propiedad de presentar un momento magnético, M_0 . Cuando un núcleo que exhibe un momento magnético es colocado en un campo magnético estático, H_0 , la magnitud de M_0 está dada por:

$$M_0 = \chi_0 H_0$$

donde χ_0 es la susceptibilidad magnética. De la interacción del campo electromagnético con el componente magnético, el núcleo también exhibe la propiedad de spin a lo largo del componente H_0 . El número de niveles de energía de un núcleo de spin I en un campo magnético es $2I + 1$ y los niveles de energía (ΔE) están separados por:

$$\Delta E = \frac{\mu H_0}{I}$$

donde μ es el momento magnético nuclear.

En el equilibrio, una población de núcleos presenta una distribución de estados de energía dada por:

$$\frac{N_{\text{superior}}}{N_{\text{inferior}}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}$$

En donde $N_{superior}$ y $N_{inferior}$ se refieren a la población de núcleos en los estados de mayor y menor energía respectivamente. Si se aplica un campo magnético o campo de radio frecuencia (rf) a esta población, se perturbará el equilibrio. El regreso al equilibrio en su ambiente (*lattice*) es un proceso de relajación exponencial caracterizado por una constante de tiempo T_1 . Este tiempo de relajación es llamado *spin-lattice* o *tiempo de relajación longitudinal*. Esta relajación ocurre por la interacción de dipolos nucleares con otros dipolos dentro de las inmediaciones del *lattice* en presencia de un campo magnético con frecuencia en condición resonante. La velocidad de relajación longitudinal ($1/T_1$) de los protones del agua se aumenta por la presencia del ión paramagnético Mn^{2+} . El momento magnético de un electrón es aproximadamente 657 veces mayor que el momento magnético de un protón. Por esto un electrón desapareado es mucho más eficiente que un protón para provocar relajación y puede ser responsable del mecanismo de relajación predominante (Nowak, 1981). El efecto de los iones paramagnéticos sobre los protones del agua es predominantemente un efecto de corto alcance, inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre el ión paramagnético y los protones (Bloembergen y cols., 1948). El intercambio rápido de los protones de la esfera de hidratación del ión paramagnético con aquéllos del bulto de la solución resulta en una velocidad de relajación observada, que es debida al promedio de los diferentes ambientes locales de los protones. La contribución predominante ocurre cuando el

protón está dentro de la esfera de hidratación del ión. El efecto de *enhancement* de ciertos iones paramagnéticos sobre la velocidad de relajación de los protones del agua, cuando los iones paramagnéticos están unidos a macromoléculas, se observó por primera vez con DNA (Eisinger y cols., 1961) y después con proteínas (Cohn y Leigh., 1962). Este *enhancement* se adjudica a una restricción en el movimiento rotacional de la capa de hidratación y del ión paramagnético cuando el ión está unido a un sitio externo de la macromolécula, con un incremento consecuente en el tiempo de correlación rotacional de la interacción magnética entre el spin nuclear de los protones de la capa de hidratación y el spin electrónico del ión paramagnético (Eisinger y cols., 1961; 1962). Esto, en el caso de metales de transición tales como Mn^{2+} , que posee un tiempo de relajación de spin suficientemente largo para que su efecto sobre la velocidad de relajación longitudinal nuclear magnética ($1/T_1$) del agua esté determinada principalmente por el tiempo de correlación rotacional (Mildvan y Cohn, 1963). Además, la magnitud del *enhancement* en enzimas que unen al metal en el sitio activo, como la PK, es característico de la estructura de los ligandos y de la conformación de la proteína en el sitio de unión del ión (Mildvan y Cohn, 1963; Cohn, 1963).

El *enhancement* observado ϵ^* se designa por:

$$\epsilon^* = \frac{\frac{1}{T_1^*} - \frac{1}{T_{1(0)}^*}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_{1(0)}}}$$

donde T_1 y $T_{1(0)}$ son los tiempos de relajación del agua observados en soluciones amortiguadoras con y sin manganeso respectivamente. Los símbolos con asterisco representan los mismos parámetros en presencia de PK. El *enhancement* observado (ϵ^*) en una mezcla de manganeso libre, $(Mn)_f$ y manganeso unido, $(Mn)_b$ es un promedio del *enhancement* debido a las dos formas.

$$\epsilon^* = \frac{(Mn)_f}{(Mn)_t} \epsilon_f + \frac{(Mn)_b}{(Mn)_t} \epsilon_b$$

donde ϵ_f , el *enhancement* del manganeso libre, es igual a 1 por definición y ϵ_b es el *enhancement* característico del manganeso unido al complejo. El *enhancement* del metal unido (ϵ_b) es una propiedad característica del sitio de unión que no necesariamente está relacionada con la constante de unión del sitio. Diferencias en ϵ_b se interpretan principalmente debido a las diferencias en sus tiempos de correlación rotacional. Por ejemplo, en algunos casos la capa de hidratación alrededor del manganeso tiene una rotación más restringida que en otra condición. La restricción en la rotación relativa del manganeso y de su capa de hidratación así como el *enhancement* resultante pueden deberse a diversas

propiedades químicas del complejo metal-proteína. Algunas de éstas son que el metal esté unido por ligandos de la proteína, efectos estéricos de la superficie de la proteína sobre la capa de hidratación del metal, puentes de hidrógeno de la capa de hidratación con la proteína o bien puentes de hidrógeno de la capa de hidratación con moléculas de agua inmovilizadas por la proteína.