

CONSUMO DE FRUCTOSA 1-6 DIFOSFATO EN MUSCULO DE
CONCHOLEPAS CONCHOLEPAS
Y ALGUNAS PROPIEDADES DE LA PIRUVATO QUINASA

A. Moran D., R. González R., S. Muñoz H. *

RESUMEN

Se estudia el consumo de fructosa difosfato por cortes, homogeneizado y líquidos sobrenadantes de músculo de *Concholepas concholepas*. Como productos de glicolisis aparecen α glicerol fosfato y piruvato. El fluoruro inhibe la aparición de piruvato sin modificar la liberación de α glicerol fosfato ni el consumo de fructosa difosfato. El arseniato estimula el consumo de fructosa difosfato y la producción de α glicerol fosfato y piruvato. Cuando están presentes en forma simultánea arseniato y fluoruro la acción inhibitoria del último aumenta.

La Piruvato quinasa (ATP piruvato fosfotransferasa, E.C. 2.7.1.40) de este músculo es una enzima alostérica con un pH óptimo entre 7,2 y 7,7. El sustrato fosfoenol piruvato tiene un efecto cooperativo positivo.

Es inhibida por fenilalanina, modificándose los valores de $K_{0,5}$ y n de Hill de 0,12 mM y 1,64 a 0,4 mM y 2,6 respectivamente.

La fructosa difosfato tiene un efecto activante de la enzima y anula el efecto inhibitorio de la fenilalanina.-

FRUCTOSE 1,6 – DIPHOSPHATE UTILIZATION AND
SOME PROPERTIES OF PYRUVATE KINASE FROM THE MUSCLE OF
CONCHOLEPAS CONCHOLEPAS

ABSTRACT

The fructose 1-6 diphosphate consumption in slices homogenized and supernatants (23.000 xg and 105.000 xg) of muscle of *Concholepas concholepas* is studied. The final products of glycolysis are phosphoglycerol and pyruvate. The fluoride inhibits the appearance of Pyruvate and does not modify the fructose diphosphate consumption and the phosphoglycerol production. The arsenate stimulate fructose diphosphate consumption and increases the production of phosphoglycerol and pyruvate. When the arsenate and fluoride are simultaneously present, the inhibitory action of fluoride increase.

The enzyme Pyruvate kinase (ATP Pyruvate phosphotransferase, E.C. 2.7.1.40) separated from *Concholepas concholepas* muscle, shows homotropic cooperativity towards the substrate phosphoenol pyruvate with an optimal pH between 7,2 and 7,7.

The enzyme is markedly inhibited by L phenyl alanine with modification of the value of $K_{0,5}$ and n (Hill number) from 0,12 mM with and 1,64 to 0,4 mM and 2,6 respectively. The fructose diphosphate has an activating effect on the enzyme and abolish the inhibitory effect of the Phenylalanine.

Nota: Este trabajo fue realizado con ayuda de la Vicerrectoría de Investigación Científica (Proyecto Nº 2.09.16)

(*) Departamento de Bioquímica Instituto de Ciencias Médico-Biológicas. Universidad de Concepción. Casilla 367.

INTRODUCCION

Una característica importante de la mayoría de los moluscos es el alto contenido de glicógeno en el tejido muscular comparado con el glicógeno en el músculo de los vertebrados (De Zwaan y Wijsman, 1976). Debido a que la degradación metabólica de esta reserva energética está muy controlada, su utilización es lenta; por ejemplo en *Mytilus edulis* se encuentra una concentración importante luego de un período de ayuno de 72 horas (De Zwaan y Zandee, 1972). Estas características son aplicables a la especie *Concholepas concholepas* en la cual hemos encontrado una concentración de glicógeno muscular cercana al 20% del peso seco (Hassid y Abraham, 1957), concentración que se mantiene prácticamente invariable, luego de un período de incubación de 6 horas de cortes de tejido en medio de Krebs (Umbreit *et al.*, 1957).

En un esfuerzo por tener algunos datos que nos permitan estudiar la regulación de la glicolisis de estos animales, exploramos algunas etapas relacionadas con la utilización de la fructosa difosfato en diversas condiciones experimentales. Encontramos consumo de fructosa difosfato sin producción de

lactato (Kluytmans *et al.*, 1975); sin embargo, hay liberación de fosfoglicerol y piruvato al medio de incubación. La producción de estos dos metabolitos puede modificarse por la presencia de fluoruro y arseniato, dos aniones de acción bien definida en glicolisis (Chance *et al.*, 1965; Kagawa y Kagawa, 1969).

En esta comunicación se analizan los resultados obtenidos al medir el consumo de fructosa difosfato y la aparición de fosfoglicerol y piruvato en cortes de tejido, homogeneizado al 33% y líquidos sobrenadantes de 23.000 xg y de 105.000 xg. Finalmente, presentamos algunas características cinéticas de la enzima Piruvato-quinasa que cataliza una etapa fisiológicamente irreversible de la glicolisis, ligada directamente a la producción de piruvato y ATP. Se trata de una enzima intensamente regulada en todos los organismos en que ha sido estudiada (De Zwaan y Holwerda, 1972; Holwerda y De Zwaan, 1973; Bannister y Anastasi, 1976). Es estimulada alostéricamente por fosfoenol piruvato y fructosa difosfato e inhibida por fenilalanina.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos: Nicotinamida. E. Merck, Darmstadt. Germany.

ATP, ADP, PEP, NAD, NADH + H⁺, FDP, TRIS, α glicerol fosfato deshidrogenasa, láctico deshidrogenasa, fenilalanina, Sigma Chemical Co. St. Louis Mo, U.S.A.

El resto de los reactivos es de grado analítico.

Los moluscos utilizados provenían de la bahía de San Vicente; los experimentos se realizaron inmediatamente de recibidos en el Laboratorio.

Se hicieron cortes de músculo de un espesor promedio de 0,5 mm en un micrótopo y se trabajó con 100 mg por experimento.

La preparación del homogeneizado se hacía al 33% en KCl 25 mM en un homogeneizador Bühler, por 2 min a 0°. Se centrifugaba este homogeneizado a 23.000 xg durante 20 min en una centrífuga Sorvall R.C.2B. Una alícuota del líquido sobrenadante obtenido se volvía a centrifugar a 105.000 xg durante 20 min en una centrífuga Spinco modelo L; ambas centrifugaciones se realizaban a 0°.

La composición del medio de incubación se fue variando hasta obtener el mejor consumo de fructosa difosfato, quedando las concentraciones finales de: nicotinamida 20 mM, fosfato de potasio 16 mM pH 7,2, tampón tris 33 mM pH 7,2, MgCl₂ 33

mM, NAD⁺ 0,33 mM, fructosa difosfato 6,6 mM, ADP 3 mM, arseniato de sodio 16 mM, fluoruro de sodio 60 mM, y 0,4 ml de homogeneizado o de uno de los líquidos sobrenadantes, o 100 mg de cortes de tejido, en un volumen final de 1,5 ml.

Las incubaciones se hicieron en un respirómetro de Warburg. La fase gaseosa del interior de los manómetros fue aire, con el medio de incubación previamente oxigenado durante 10 min. La fructosa difosfato se determinó con cisteína carbazol (Ashwell, 1957).

El α glicerol fosfato se determinó enzimáticamente (Hohorst, 1965). El piruvato se midió enzimáticamente (Bücher *et al.*, 1965) y químicamente con 2-4 dinitrofenil hidrazina (Umbreit y Burris, 1957).

ATP	- Adenosin trifosfato
ADP	- Adenosin difosfato
PEP	- Fosfoenol piruvato
NAD	- Nicotinamida adenin dinucleótido
NADH + H ⁺	- Nicotinamida adenin dinucleótido reducido
FDP	- Fructosa difosfato
TRIS	- (hidroximetil) amino metano

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados están expresados en μ moles por 100 mg de tejido húmedo incubado durante 30 min a 30°.

CONSUMO DE FDP Y ACUMULACION DE α GLICEROL FOSFATO Y PIRUVATO EN CORTES, HOMOGENEIZADO Y LIQUIDOS SOBRENATURALES DE 23.000 xg Y DE 105.000 xg.

TABLA 1

	Consumo	Producción	
	FDP μ mol/100 mg tejido	α glicerol fosfato μ mol/100 mg tejido	piruvato μ mol/100 mg tejido
Cortes	5,03 \pm 0,25	1,98 \pm 0,17	1,89 \pm 0,45
Homogeneizado	4,53 \pm 0,49	3,84 \pm 0,31	2,86 \pm 0,67
Líquido sobrenadante 23.000 xg	2,08 \pm 0,37	2,75 \pm 0,13	1,31 \pm 0,13
Líquido sobrenadante 105.000 xg	2,50 \pm 0,15	2,10 \pm 0,18	0,84 \pm 0,06

EFECTO DEL FLUORURO

TABLA 2

	Consumo	Producción	
	FDP μ mol/100 mg tejido	α glicerol fosfato μ mol/100 mg tejido	piruvato μ mol/100 mg tejido
Cortes	5,26 \pm 0,49	1,93 \pm 0,26	0,17 \pm 0,11
Homogeneizado	4,30 \pm 0,25	3,85 \pm 0,04	0,17 \pm 0,06
Líquido sobrenadante 23.000 xg	3,30 \pm 0,25	2,64 \pm 0,26	0,74 \pm 0,16
Líquido sobrenadante 105.000 xg	2,37 \pm 0,13	2,04 \pm 0,10	0,90 \pm 0,05

Los resultados corresponden al término medio \pm el error standard.

En estas condiciones el consumo de fructosa difosfato por cortes y homogeneizado es práctica-

mente total. En el caso de los cortes de tejido este consumo se hace con una baja acumulación de α glicerol fosfato y piruvato. Esto se debería a que hay buena utilización de estos productos por el

tejido relativamente intacto, cosa que no ocurre con el homogeneizado en que hay buen consumo de fructosa difosfato, pero una utilización menor de α glicerol fosfato y piruvato. En el caso de los líquidos sobrenadantes, suponemos que el piruvato no se acumula porque en anaerobiosis la carboxilación del fosfoenol piruvato estaría favorecida desviándose a oxaloacetato y malato (Hochachka y Mustafa, 1972); no aparece lactato como producto de glicolisis.

La concentración de fluoruro fue 60 mM final. Este ión no modifica el consumo de fructosa difosfato en las diferentes condiciones experimentales; tampoco afecta la producción de α glicerol fosfato. En cambio, la acumulación de piruvato está notablemente disminuida en cortes y homogeneizados (Bücher, 1955), pero en los líquidos sobrenadantes el efecto es menor.

ACCION DEL ARSENIATO

TABLA 3

	Consumo	Producción	
	FDP μ mol/100 mg tejido	α glicerol fosfato μ mol/100 mg tejido	piruvato μ mol/100 mg tejido
Cortes	4,27 \pm 0,27	1,60 \pm 0,23	2,25 \pm 0,18
Homogeneizado	5,28 \pm 0,34	4,35 \pm 0,08	2,29 \pm 0,9
Líquido sobrenadante 23.000 xg	3,82 \pm 0,32	4,42 \pm 0,006	5,19 \pm 0,34
Líquido sobrenadante 105.000 xg	4,99 \pm 0,26	3,47 \pm 0,13	5,07 \pm 0,25

EFEECTO DEL ARSENIATO Y FLUORURO

Las concentraciones de los aniones son las descritas en las tablas 2 y 3.

TABLA 4

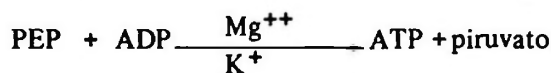
	Consumo	Producción	
	FDP μ mol/100 mg tejido	α glicerol fosfato μ mol/100 mg tejido	piruvato μ mol/100 mg tejido
Cortes	5,25 \pm 0,15	2,54 \pm 0,26	0,06 \pm 0,008
Homogeneizado	5,32 \pm 0,14	5,20 \pm 0,19	0,07 \pm 0,003
Líquido sobrenadante 23.000 xg	4,38 \pm 0,31	5,49 \pm 0,18	0,06 \pm 0,01
Líquido sobrenadante 105,000 xg	4,64 \pm 0,23	4,72 \pm 0,14	0,09 \pm 0,001

En estos experimentos se reemplaza al fósforo inorgánico del medio de incubación por arseniato al mismo pH (7,2) y concentración (16 mM final). Se puede observar cómo la acción del arseniato estimula el consumo de fructosa difosfato en los líquidos sobrenadantes (Tabla 1) y también la producción de α glicerol fosfato y piruvato. El aumento de α glicerol fosfato se debería a que por acción del arseniato a nivel de la triosa fosfato deshidrogenasa (D: gliceraldehido-3-fosfato, óxido reductasa) se dispone de NADH + H⁺ que reacciona con el dihidroxiacetón fosfato y de esta manera favorece la liberación de piruvato (Allison, 1966). En homogeneizados y cortes no se observa mayor alteración en la concentración de estos metabolitos, porque están presentes todos los componentes del tejido que utilizan normalmente la posible mayor producción de ellos.

Aquí de nuevo el arseniato reemplaza al fosfato en el medio de incubación, al cual se le agrega además, fluoruro en la concentración indicada anteriormente.

Persiste la acción del arseniato en relación con el consumo de fructosa difosfato y la aparición de fosfoglicerol; sin embargo, la liberación de piruvato está notablemente disminuida cuando los aniones se encuentran presentes simultáneamente. Esto sería importante en caso de contaminación de aguas por estos compuestos que producirían una inhibición de la glicolisis mucho más efectiva que cuando se encuentran separados.

Estas experiencias nos hicieron pensar que sería interesante conocer algunas propiedades de la enzima piruvato quinasa de estos animales, que cataliza la reacción:



que en las especies estudiadas está finamente regulada (Koshland, 1968) ya que su sustrato PEP participa no solamente en glicolisis sino también en gluconeogénesis.

OBTENCION DE LA ENZIMA

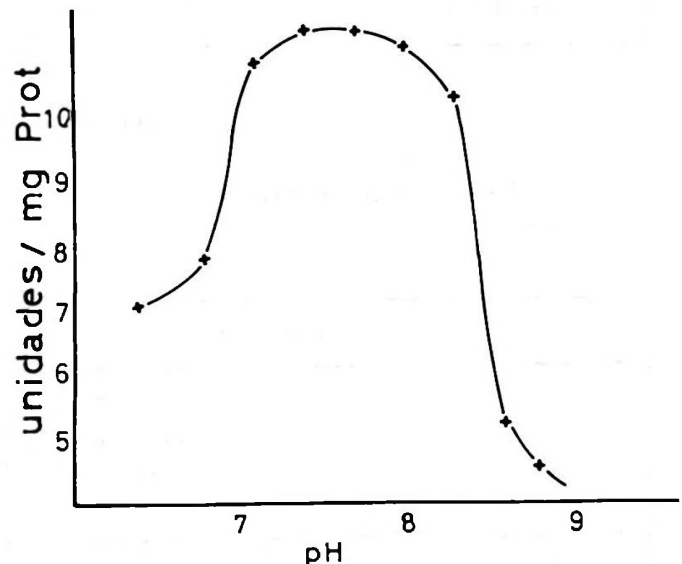
El tejido muscular se homogeneizó con 2 volúmenes de KCl 150 mM, MgSO₄ 5 mM, EDTA 1 mM, mercaptoetanol 1 mM. Se centrifugaba a 23.000 xg y en el líquido sobrenadante se precipitaba la enzima entre 35 y 55% de saturación con sulfato de amonio sólido. El precipitado resultante se disolvía en un volumen mínimo de tampón tris 10 mM pH 7,4 y se hacía pasar por una columna de Sephadex G 100 y luego por una de DEAE celulosa. Esta última se eluía con una gradiente de concentración lineal de KCl en el mismo tampón tris 10 mM. Las fracciones eluidas de la columna

que tenían actividad enzimática se mezclaban y precipitaban al 60% de saturación con sulfato de amonio. El precipitado se suspendía en una pequeña cantidad del tampón anterior y se usaba como fuente de enzima. Es estable por un mes guardada en cámara fría a 4°.

La actividad se valoraba por el método de Bücher y Pfeleiderer (Bücher y Pfeleiderer, 1957). La formación de piruvato se medía en presencia de láctico deshidrogenasa y NADH + H⁺ a 340 nm. La mezcla de incubación estaba formada por tris pH 7,4 100 mM, MgSO₄ 5 mM, KCl 100 mM, PEP 1 mM, ADP 1 mM, NADH + H⁺ 0,15 mM y exceso de láctico deshidrogenasa en un volumen final de 1 ml. La reacción se hacía partir por adición de piruvato quinasa diluida.

DETERMINACION DE pH OPTIMO

Como se muestra en la figura 1, esta enzima tiene un pH óptimo que fluctúa entre 7,4 y 7,65; a pH mayores o menores hay un descenso rápido de la actividad.



DETERMINACION DE pH OPTIMO.

Fig. 1 Determinación de pH óptimo. Tampón tris 100 mM. PEP 1 mM, ADP 1 mM. Otras condiciones de ensayo descritas en valoración de actividad.

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS APARENTE PARA ADP.

La figura 2 se refiere a la determinación de K_m aparente por el diagrama de los dobles recíprocos para ADP, dando un valor de $3,03 \times 10^{-4}$ M.

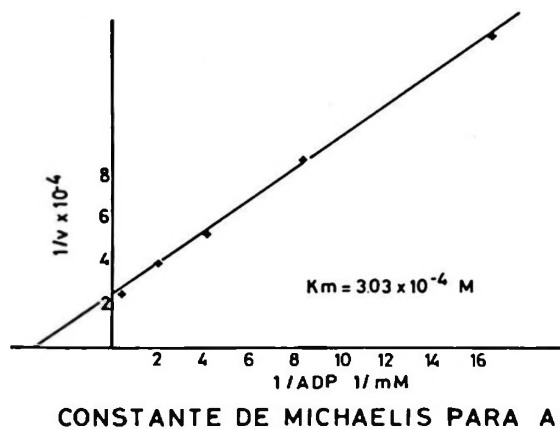


Fig. 2 Un diagrama de dobles recíprocos para determinar K_m aparente para ADP. Condiciones de ensayo descritas en determinación de actividad.

DETERMINACION DE $K_{0,5}$ PARA FOSFOENOL PIRUVATO. INHIBICION POR FENILALANINA Y ACTIVACION POR PEQUEÑAS CONCENTRACIONES DE FRUCTOSA DIFOSFATO

La figura 3 muestra las curvas de velocidad ver-

sus concentraciones crecientes de fosfoenol piruvato a pH 7,4. Para el control la curva es de tipo sigmooidal, mostrando un efecto cooperativo positivo ($n = 1,64$) y un valor de $K_{0,5}$ de 0,12 mM. No se observa inhibición por exceso de sustrato. Cuando la determinación se hace en presencia de fenilalanina 1 mM, el valor de $K_{0,5}$ sube a 0,40 mM con una modificación en el valor de n igual a 2,6. Repitiendo esta determinación con fenilalanina, pero en presencia de fructosa difosfato 0,1 mM se obtiene una curva hiperbólica en la que desaparece el efecto inhibitorio de la fenilalanina y el efecto cooperativo del sustrato, modificándose el valor de $K_{0,5}$ a 0,07 mM y el número de Hill a 1,0.

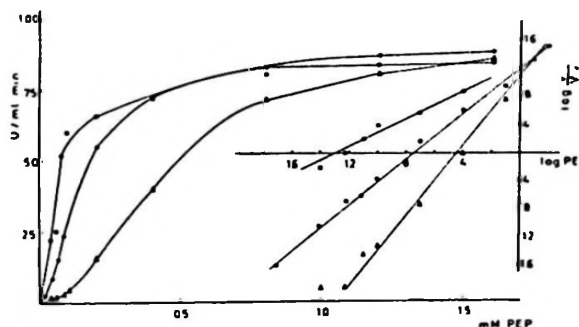


Fig. 3 Relación entre la actividad de la piruvato quinasa y la concentración de fosfoenol-piruvato a pH 7,4 ●—● Control; ▲—▲ en presencia de fenilalanina 1 mM; ○—○ y fructosa difosfato 0,1 mM. Condiciones del ensayo descritas en valoración de actividad. Se incluye un diagrama con los valores del número de Hill.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALLISON S.W. 1966. Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Crystalline. En: Methods in Enzymology. 9 : 210 - 215. S.P. Colowick and O. N. Kaplan (ed.) Academic Press.

ASWELL G. 1957. Colorimetric Analysis of Sugars. En: Methods in Enzymology. 3 : 77 - 105. S.P. Colowick and N.O. Kaplan (ed.). Academic Press.

BANNISTER V.J. y A. ANASTASI. 1976. The effect of fructose 1-6 diphosphate on Pyruvate kinase from white muscle of three species of Mediterranean Fish. Comp. Biochem. Physiol. 55B : 449 - 451.

BUCHER T. 1955. Enolase from Brewer's yeast. En: Methods in Enzymology. 1 : 427 - 440. S.P. Colowick and N.O. Kaplan (ed.). Academic Press.

BUCHER, T. y G. PFLEIDERER. 1957. En: Methods in Enzymology. 1 : 435 pp. S.P. Colowick and N.O. Kaplan (ed.). Academic Press.

BUCHER, T.; R. CZOK; W. LARMPRECHT; E. LATZKO 1965. Pyruvate. En: Methods of Enzymatic analysis: 253 - 259. H.U. Bergmeyer (ed.). Academic Press.

CHANCE, B.; B. SCHOENER; S. ELSAESSE. 1965. Metabolic control phenomena involved in damped sinusoidal oscillations of Reduced Diphosphopyridine Nucleotide in a cell-free extract of Saccharomyces Carlsbergensis. J. Biol. Chem. 240 : 3170.

DE ZWAAN, A y D.A. HOLWERDA. 1972. The effect of Phosphoenolpyruvate, fructose 1-6 diphosphate and pH on Allosteric pyruvate kinase in muscle tissue of the Bivalve *Mytilus edulis* L. Biochim. Biophys. Acta 276 : 430 - 433.

DE ZWAAN, A. y D.I. ZANDEE. 1972b. The utilization of glycogen and accumulation of some intermediates during anaerobiosis in *Mytilus edulis* L. Comp. Bio-

- chem. Physiol. 43 B : 47 - 54.
- DE ZWAAN, A. y T.C.M. WIJSMAN, 1976. Anaerobic metabolism in Bivalvia (mollusca). Characteristics of Anaerobic Metabolism. Comp. Biochem. Physiol. 54 B : 313 - 324.
- HASSID, Z.W. y S. ABRAHAM, 1957. Chemical Procedures for Analysis of Polysaccharides. En: Methods in Enzymology 3 : 34 - 54. S.P. Colowick and N.O. Kaplan (ed.). Academic Press.
- HOCHACHKA, P.W. y MUSTAFA, 1972. Invertebrate Facultative Anaerobiosis. Science 178 : 1056 - 1060.
- HOLWERDA, A.D. y A. DE ZWAAN, 1973. Kinetic and molecular characteristics of allosteric Pyruvate kinase from muscle tissue of the sea mussel *Mytilus edulis* L. Biochim. Biophys. Acta. 309 : 296 - 306.
- HOHORST, H.J. 1965. L - (-) Glycerol-1-Phosphate. Determination with Glycerol-1-Phosphate Dehydrogenase. En: Methods of Enzymatic Analysis: 215-219. Ed. H.V. Bergmeyer (ed.). Academic Press.
- KAGAWA, Y. y AIKO KAGAWA. 1969. Accumulation of arsenate-76 by mitochondria. J. Biochem. 65 : 105.
- KOSHLAND, E.D.; K.E. NET. 1968. The catalytic and Regulatory Properties of Enzymes. Ann. Rev. Biochem. 37 : 359 - 410.
- KLUYTMANS, J.H., F.M. VEENHOF., P.R. DE ZWAAN A. 1975. Anaerobic production of volatile fatty acids in the sea mussel *Mytilus edulis* L.J. Comp. Physiol. 104 : 71 - 78.
- UMBREIT, W.W., R.H. BURRIS., J.F. STAUFFER, 1957. Manometric Techniques 150 pp. Burgess Publishing Co
- UMBREIT, W.W. y R.H. BURRIS, 1957. Methods for Pyruvic acid Ketoglutaric Acid: 239 - 240. Manometric Techniques. Burgess Publishing Co.