



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO CINÉTICO
DE LA PIRUVATO CINASA NATIVA Y DE LA
MUTANTE E117K EN AUSENCIA DE K⁺

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A
JESÚS ANTONIO ORIA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. LETICIA HAYDEÉ RAMÍREZ SILVA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Leticia Haydeé Ramírez Silva en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante el desarrollo del trabajo conté con becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. Este proyecto fue apoyado además por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la UNAM.

"I do not know what I may appear to the world; but to myself I seem to have been only like a boy playing on the sea-shore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me."

*Sir Isaac Newton
Científico inglés (1642-1727)*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por convertirme en la persona que soy.

A los miembros del comité tutorial y del jurado: Dra. Leticia Haydeé Ramirez Silva, Dr. José de Jesús García Trejo, Dr. Armando Gómez-Puyou, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dr. Diego González Halphen, Dra. Rosario Muñoz Clares, Dr. Arturo Rojo Domínguez, Dr. Héctor Riveros Rosas y Dr. Alejandro Fernández, gracias por todas sus observaciones, recomendaciones y correcciones a este trabajo, con las cuales mejoró enormemente.

Agradezco principalmente a Leticia por haberme aceptado como su alumno, por permitir que me convirtiera en su colaborador y por todas las cosas que hemos compartido durante todos estos años.

Agradezco especialmente a los Drs. Armando Gómez-Puyou y Marietta Tuena por haber abierto y por mantener abiertas las puertas de sus laboratorios, por sus enseñanzas y consejos y por ser un continuo ejemplo de profesionalismo y sencillez.

Gracias a todas las personas que con su trabajo, colaboración y recomendaciones ayudaron a la realización de este proyecto: Nallely Cabrera, Gabriel Mercado, Claudia Avitia, Dr. Ruy Pérez Montfort, Dr. Juan Pablo Pardo, Dr. Guillermo Mendoza, Dr. Juan Luis Rendón, Dr. Mario Calcagno y Dra. Georgina Garza-Ramos.

A todos los amigos que me acompañaron en este proyecto: Horacio Reyes, Alfredo Téllez, Viviana Zomosa, Lenin Domínguez, Claudia Almazán, Beatriz Aguirre, Vanesa Olivares, Conie Nuñez, Gerardo Pérez, Gabriel Mercado, Gloria Hernández, Gabriel López, Paulina Cortés, José Sampedro, Carlos Guerrero, Oscar Flores, Oscar Juárez, Cuauhtémoc Gómez, Sofía Olvera y Aída Uribe, gracias por su ayuda y por todo lo que de ustedes he aprendido, pero sobre todo muchas gracias por los incontables buenos momentos.

*L'art c'est moi, la science c'est nous.
(El arte es yo, la ciencia nosotros)
Claude Bernard
Fisiólogo francés (1813 - 1878)*

Esta Tesis está dedicada a Nancy: muchas gracias por todo tu amor, apoyo y paciencia. Gracias por todo lo que hemos vivido y por lo que me has enseñado, por que con tus ejemplos espero llegar a ser una mejor persona. Ojalá la vida nos reserve muchas aventuras más.

*Tus manos son mi caricia
mis acordes cotidianos
te quiero porque tus manos
trabajan por la justicia*

*si te quiero es porque sos
mi amor mi cómplice y todo
y en la calle codo a codo
somos mucho más que dos*

*tus ojos son mi conjuro
contra la mala jornada
te quiero por tu mirada
que mira y siembra futuro*

*tu boca que es tuya y mía
tu boca no se equivoca
te quiero porque tu boca
sabe gritar rebeldía*

*si te quiero es porque sos
mi amor mi cómplice y todo
y en la calle codo a codo
somos mucho más que dos*

*y por tu rostro sincero
y tu paso vagabundo
y tu llanto por el mundo
porque sos pueblo te quiero*

*y porque amor no es aureola
ni cándida moraleja
y porque somos pareja
que sabe que no está sola*

*te quiero en mi paraíso
es decir que en mi país
la gente viva feliz
aunque no tenga permiso*

*si te quiero es porque sos
mi amor mi cómplice y todo
y en la calle codo a codo
somos mucho más que dos.*

TE QUIERO
Mario Benedetti

Dedico este trabajo a mis padres Leticia y Jesús y a mis hermanos Mauro y Getse, por que gracias a ellos soy lo que soy. De igual manera a toda mi familia, a mis abuelos María, Nazario, Dionisia y Martín; especialmente a mis tíos Graciela y Pepe, Juan y Guadalupe, Víctor y Marisela, Raúl y Guadalupe, Pepe y Anita, Mario, Agustín, Guadalupe, Rafael y Carmela, Salvador y Teresa, a mis primos y sobrinos que espero sepan comprender que mencionarlos a todos era poco menos que imposible y a la familia Olivos Medina, en especial a Ismaela. Muchas gracias por todo el cariño y el apoyo que siempre he recibido de ustedes y por recordarme cada día que la familia es lo más importante que tenemos.

Por ultimo, quiero dedicar esto a mis amigos, Manolo, Eugenio, Rubén, Charly y Dany (y por supuesto a Libertad, Carmen y Aiko), gracias por acompañarme durante todo este tiempo, por permitirme crecer a su lado y por hacerme parte de sus vidas; espero me permitan seguir disfrutando de su compañía durante muchos años más.

ÍNDICE

Abreviaturas_ _ _ _ _	1
Resumen_ _ _ _ _	2
Abstract_ _ _ _ _	5

INTRODUCCION

Enzimas activadas por cationes monovalentes_ _ _ _ _	7
Piruvato cinasa_ _ _ _ _	10
Efecto del K ⁺ sobre la piruvato cinasa _ _ _ _ _	14
Actividad independiente de K ⁺ en la piruvato cinasa_ _ _ _ _	17
Mecanismo cinético de la piruvato cinasa _ _ _ _ _	18

OBJETIVOS

Objetivo general_ _ _ _ _	22
Objetivos particulares_ _ _ _ _	22

MATERIALES Y METODOS

Procedimientos generales_ _ _ _ _	24
Ensayos de la actividad de la PK_ _ _ _ _	25
Estudios cinéticos_ _ _ _ _	26
Síntesis y purificación de cromo-ADP_ _ _ _ _	27
Preparación de bicarbonato de tetrametilamonio _ _ _ _ _	28
Sub-clonación de la mutante E117K_ _ _ _ _	28
Sobreexpresión y purificación de la mutante E117K_ _ _ _ _	29
Experimentos de fluorescencia _ _ _ _ _	30
Análisis filogenético y estructural de la mutación E117K _ _ _ _ _	31

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sección 1

Estudios de velocidad inicial de la PK silvestre en presencia y en ausencia de K ⁺ en medio acuoso_ _ _ _ _	32
---	----

Estudios de velocidad inicial de la PK silvestre en 40% de DMSO y de la PK-E117K en medio acuoso_	36
Estudios de inhibición sin salida_	38
El Efecto del K ⁺ y los ligandos sobre la estructura de la piruvato cinasa _	44
El papel del K ⁺ sobre la estructura y la cinética de la piruvato cinasa_	48

Sección 2

Análisis filogenético de la dependencia de K ⁺ en la piruvato cinasa_	51
CONCLUSIONES_	67
REFERENCIAS_	68
APENDICE_	78

Abreviaturas

PEP	Fosfoenolpiruvato
RMN	Resonancia magnética nuclear
PK	Piruvato cinasa
PK-E117K	Mutante E117K de piruvato cinasa de músculo de conejo.
DMSO	Dimetil sulfóxido
DHL	Deshidrogenasa láctica
IPTG	Isopropil-tio- β D-galactopiranosido
EDTA	Acido etileno diamino tetracético
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio
CEM	Centro espectral de masa
DynDom	Programa de análisis de dominios dinamicos

Resumen

La piruvato cinasa de músculo de conejo fue la primera enzima en la que se describió el requerimiento absoluto de K^+ para la catálisis. [Kachmar, J.F. & Boyer, P. D. (1953) *J Biol Chem.* 200, 669-683]. Sin embargo, aun cuando se han realizado extensos estudios cinéticos y estructurales de los efectos de los cationes monovalentes sobre la piruvato cinasa, el papel del K^+ en la función de la piruvato cinasa no ha sido totalmente comprendido. Aparentemente, la dependencia absoluta de K^+ se consideraba una característica común de todas las piruvato cinasas hasta que se reportó la presencia de algunas enzimas independientes de K^+ . Estas enzimas independientes de K^+ coinciden en que presentan una lisina en lugar del glutámico que se encuentra cerca al sitio de unión del K^+ en la piruvato cinasa de músculo de conejo. Laughlin y Reed concluyeron que la presencia de una carga positiva interna en las enzimas independientes de K^+ substituye el requerimiento por K^+ (Laughlin, L.T. & Reed, G. H. (1997) *Arch Biochem Biophys.* 348, 262-267). Sin embargo, no se sabe si la lisina 117 es el único residuo que determina la actividad independiente de K^+ en la piruvato cinasa.

El objetivo de este trabajo es entender el papel del K^+ en la catálisis de la enzima e identificar que tan frecuente es la actividad independiente de K^+ en la piruvato cinasa y que residuos además del 117 se encuentran involucrados en ella.

En la primera parte de este trabajo exploramos la cinética de la enzima con y sin K^+ . Resultados preliminares de nuestro laboratorio en ausencia de K^+ mostraron que la afinidad del $ADP-Mg^{2+}$ dependía de la concentración del fosfoenolpiruvato, aún cuando la cinética de la enzima a concentraciones saturantes de K^+ había mostrado que los sustratos se unen independientemente. [Reynard, A. M; Hass, L.F; Jacobsen, D. D. & Boyer, P.D. (1961) *J Biol Chem.* 236, 2277-2283]. En este estudio, los resultados de los ensayos cinéticos mostraron que el K^+ incrementa la V_{max} y la afinidad de la enzima por los sustratos e inhibidores. Además, en ausencia de K^+ el mecanismo cinético de la

piruvato cinasa cambia de al azar a ordenado con el fosfoenolpiruvato como primer sustrato. Por otro lado, estudios de fluorescencia intrínseca y anisotropía sugieren que el K^+ induce la conformación cerrada de la enzima. En su conjunto, los datos cinéticos y estructurales indican que el K^+ está involucrado en la adquisición de la conformación activa de la enzima permitiendo que el fosfoenolpiruvato o el ADP se unan independientemente (mecanismo al azar). En ausencia de K^+ , el ADP no puede unirse a la enzima hasta que el fosfoenolpiruvato forma un sitio activo competente (mecanismo ordenado). Nosotros proponemos que el K^+ induce el cierre del sitio del sitio activo y el rearrreglo de los residuos involucrados en la unión del nucleótido.

Con el fin de dilucidar la distribución de la actividad independiente de K^+ en la naturaleza, se realizó una búsqueda extensiva de las secuencias de piruvato cinasa disponibles. El análisis de las secuencias reveló que la independencia de K^+ está extensivamente representada: alrededor de la mitad de las secuencias reportadas presentan lisina 117. Análisis filogenéticos anteriores de la piruvato cinasa mostraron que el árbol presenta una topología dicotómica que se ha sugerido esta determinada por la naturaleza del activador alostérico [Schramm, A; Siebers, B; Tjaden, B; Brinkmann, H; y Hensel R. (2000) *J Bacteriol.* 182, 2001-2009]. Nuestros resultados claramente demuestran que la dependencia de K^+ explica la topología dicotómica del árbol filogenético de la piruvato cinasa; las enzimas dependientes e independientes de K^+ pertenecen a cada una de las ramas del árbol filogenético. Las enzimas independientes de K^+ , además de K117, poseen L113/Q114/(I,V,L)120 que substituyen al E117 y a T113/K114/T120 de las enzimas dependientes de K^+ . El análisis basado en la estructura indica que estos residuos están en una región de bisagra implicada en la adquisición de la conformación catalíticamente activa de la enzima.

En su conjunto, los resultados de este trabajo indican que el K^+ no sólo coordina al grupo fosfato del PEP o del ATP como han mostrado claramente los estudios

cristalográficos, nuestros datos indican que el K^+ esta directamente involucrado en el movimiento del dominio B y en la adquisición de la conformación activa de la PK. Es posible que los cambios observados en la secuencias de aminoácidos de las enzimas dependientes (T113/K114/E117/T120) e independientes de K^+ (L113/Q114/K117/(LVI)120) puedan evitar la necesidad de un catión externo.

Abstract

Rabbit muscle pyruvate kinase was the first enzyme for which an absolute requirement of K^+ was described [Kachmar, J.F. & Boyer, P. D. (1953) *J Biol Chem.* 200, 669-683]. However, even when extensive structural and kinetic studies of the effects of monovalent cations on pyruvate kinase have been performed, the role of K^+ on the function of the enzyme has not been totally understood. Apparently, the absolute dependence of K^+ was considered a common feature to all pyruvate kinases, until a few K^+ -independent enzymes were characterized. These K^+ -independent enzymes coincide in that a Lys is present instead of a Glu in position 117, nearby the K^+ binding site of rabbit muscle pyruvate kinase. Laughlin and Reed concluded that the presence of an internal positive charge in the K^+ -independent enzymes substituted the requirement for K^+ (Laughlin, L.T. & Reed, G. H. (1997) *Arch Biochem Biophys.* 348, 262-267). However it is unknown if Lys117 is the only determinant of K^+ -independent activity on pyruvate kinase,

The aim of this work was to understand the role of K^+ on the catalysis of the enzyme and identify how frequent and what residues besides 117 are involved in the monovalent cation independent activity of pyruvate kinase.

In the first part of this work we explored the kinetics of the enzyme with and without K^+ . Preliminary results of our lab in the absence of K^+ , showed that the affinity of ADP-Mg²⁺ depended on the concentration of phosphoenolpyruvate, in contrast to the reported kinetic of the enzyme at saturating K^+ concentrations that showed that substrates bind independently [Reynard, A. M; Hass, L.F; Jacobsen, D. D. & Boyer, P.D. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2277-2283]. In this study, the results of the kinetic assays showed that K^+ increased the V_{max} and the affinity of the enzyme for substrates and inhibitors. Furthermore, in the absence of K^+ the kinetic mechanism of pyruvate kinase changed from random to ordered with phosphoenolpyruvate as the first substrate. Intrinsic fluorescence and anisotropy studies suggested that K^+ induces the closed conformation of the enzyme.

In sum, kinetic and structural studies indicate that K^+ is involved in the acquisition of the active conformation of the enzyme allowing either phosphoenolpyruvate or ADP to bind independently (random mechanism). In the absence of K^+ , ADP cannot bind to the enzyme until phosphoenolpyruvate forms a competent active site (ordered mechanism). We propose that K^+ induces the closure of the active site and the arrangement of the residues involved in the binding of the nucleotide.

To elucidate how frequent K^+ -independent pyruvate kinases are found in the nature, an extensive search for available pyruvate kinases sequences was performed. The analysis of the available sequences revealed that K^+ -independence is extensively present; about half of the reported sequences contain K117. Early phylogenetic analysis of pyruvate kinase showed that the tree presents a dicotomic topology that has been suggested to be determined by the nature of the allosteric activator [Schramm, A; Siebers, B; Tjaden, B; Brinkmann, H; y Hensel R. (2000) *J Bacteriol.* 182, 2001-2009]. The results of this study clearly demonstrated that K^+ dependence explains the dicotomic topology of the phylogenetic tree of pyruvate kinase; K^+ -dependent and independent enzymes belong to each one of the branches of the phylogenetic tree. K^+ -independent pyruvate kinases, besides K117, possess L113/Q114/(I,V,L)120 that have been substituted by E117 and T113/K114/T120 in K^+ -dependent enzymes. Structural based analysis indicated that these residues are in a bending hinge region implicated in the acquisition of the active catalytic conformation of the enzyme.

In sum, the results of this work indicates that K^+ not only coordinates the phosphate group of PEP or ATP as shown quite clearly by crystallographic studies, our data show that K^+ is directly involved in the movement of the B domain and the acquisition of the active conformation of PK. It is possible that the observed changes in the aminoacid sequence between K^+ -dependent (T113/K114/E117/T120) and independent enzymes (L113/Q114/K117/(LVI)120) can avoid the need for an external cation.

INTRODUCCION

Enzimas activadas por cationes monovalentes

Desde el descubrimiento del efecto activador del K^+ sobre la enzima piruvato cinasa hace más de 50 años (Kachmar y Boyer 1953) se han descrito una gran cantidad de enzimas que requieren cationes monovalentes (Suelter 1970, Di Cera 2004). El efecto de los cationes monovalentes sobre las enzimas es tanto a nivel estructural como funcional. Algunas lo necesitan para estabilizar su estructura cuaternaria (Ahmad y cols. 2001, Valenzuela-Soto y cols. 2003), otras lo requieren como activador de la catálisis (Andersson y Mowbray 2002, Zhang y cols. 1996) y en otros casos el catión monovalente es tanto estabilizador estructural como activador de la catálisis (Radfar y cols. 2000, Miyaoka y cols. 1996).

El efecto de los cationes monovalentes sobre la estabilidad de las proteínas ocurre a través del apantallamiento de cargas negativas en la superficie de las proteínas que pueden desestabilizar su estructura por repulsión de cargas (Ahmad y cols. 2001). Este mecanismo está claramente demostrado para la glucosa oxidasa de *Aspergillus Níger* (Ahmad y cols. 2001). Esta enzima es una proteína con una gran concentración de cargas negativas en su superficie y en la interfase del dímero. Estudios estructurales utilizando técnicas espectroscópicas, cristalográficas, de proteólisis limitada, de cromatografía de exclusión y de calorimetría diferencial de barrido han demostrado que los cationes monovalentes afectan la estructura terciaria y cuaternaria de la enzima promoviendo la formación del dímero y la estabilización global de la proteína (Ahmad y cols. 2001).

Con respecto al efecto activador de los cationes monovalentes sobre las enzimas se han descrito dos mecanismos. En uno de ellos el catión forma un complejo ternario con la enzima y el sustrato, mientras que en el otro la activación es alostérica. En el primer caso, la presencia del catión es esencial para la actividad catalítica mientras que en el

segundo caso el catión induce un cambio conformacional en la enzima que incrementa significativamente su actividad.

Clásicamente se ha descrito que la piruvato cinasa pertenece al primer grupo. En esta enzima el K^+ se coordina al grupo fosfato del sustrato o del producto, siendo parte integral de la reacción. En el segundo caso se encuentra la ribocinasa de *Escherichia coli*. En esta enzima el sitio de unión al catión monovalente se encuentra en un sitio cercano pero diferente al sitio activo. La activación alostérica de la enzima por el ión se da a través de la estabilización de la conformación cerrada de la tapa del sitio activo, lo que favorece la catálisis (Andersson y Mowbray 2002).

Con el advenimiento de estructuras cristalográficas de alta resolución que permitieron la visualización de cationes monovalentes unidos a diferentes enzimas, el interés por entender a nivel molecular el efecto de los cationes monovalentes tomó auge en los últimos años. Los sitios de unión de los cationes monovalentes han sido identificados estructuralmente en diversas proteínas como en la diacilglicina descarboxilasa (Toney y cols. 1993), en la piruvato cinasa (Larsen y cols. 1994), en la trombina (Di Cera y cols. 1995), en la chaperona molecular Hsc70 (Wilbanks y McKay 1995), en la fructosa 1,6-bifosfatasa (Villeret y cols. 1995), en la S-adenosilmetionina sintetasa (Takusagawa y Kamitori 1996), en la metilamina deshidrogenasa (Labesse y cols. 1998), en la aldolasa (Hall y cols. 1999), en la ribocinasa (Andersson y Mowbray 2002) y en el factor de coagulación Xa (Zhang y Tulinsky 1997), entre otras.

En algunos casos estas estructuras cristalográficas han ayudado a aclarar los mecanismos moleculares de selectividad o activación por cationes monovalentes. Por ejemplo, en el caso de la trombina los estudios estructurales, junto con una gran cantidad de estudios cinéticos, termodinámicos y de mutagénesis sitio-dirigida, han permitido entender qué residuos son responsables del reconocimiento del sodio y los cambios conformacionales que traducen la unión del Na^+ en un aumento de la actividad catalítica.

Se ha demostrado que el Na^+ se une cerca del sitio activo, coordinándose a dos átomos de oxígeno de la cadena principal de los residuos Glu221 y Lys224 y a cuatro moléculas de agua que forman parte de una importante red de aguas del sitio activo fundamentales en la catálisis de esta enzima. La unión del Na^+ a la trombina modifica la disposición de esta red de moléculas de agua, lo que a su vez se traduce en el ordenamiento de residuos del sitio activo que explican el aumento de la actividad catalítica (Di Cera 2004).

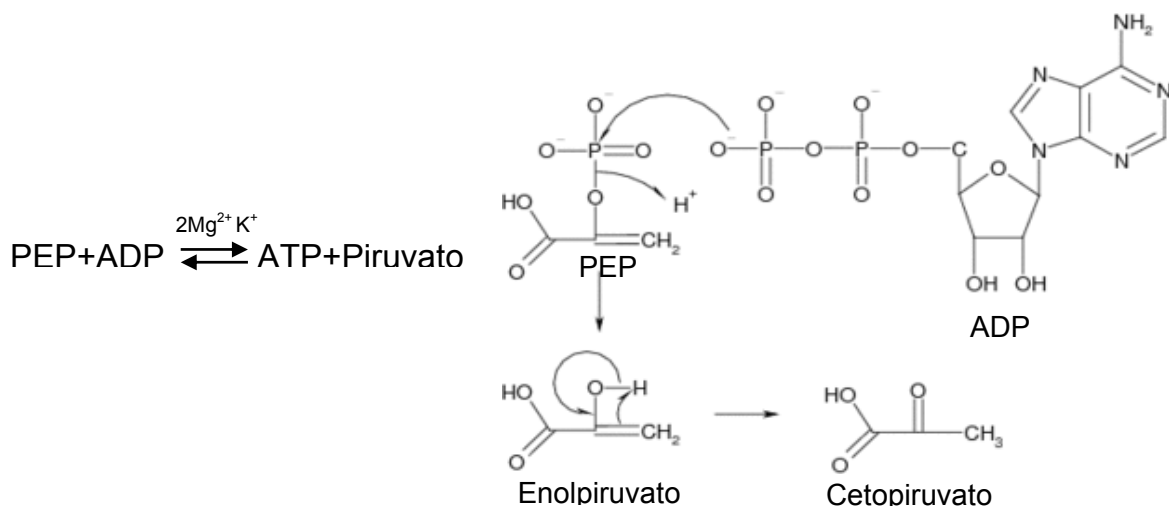
Las estructuras cristalográficas han ayudado también a entender los mecanismos moleculares de la selectividad iónica en algunas enzimas. Un claro ejemplo se ilustra en la diacilglicil descarboxilasa. Esta enzima es activada por K^+ y Rb^+ mientras que los iones Na^+ y Li^+ son inhibitorios. Las estructuras cristalográficas de la enzima en presencia de estos cuatro cationes monovalentes (Toney y cols. 1993, Hohenester y cols. 1994) muestran una estrecha correlación entre la estructura del sitio activo y la actividad enzimática. Los cationes activadores (Rb^+ y K^+) se unen a los oxígenos carbonilos de los residuos Lue78, Thr 303 y Val 305, además de al hidroxilo de la Ser80, al carboxilato del Asp307 y a una molécula de agua. La unión de estos cationes a la enzima provoca la reorientación de residuos del sitio activo promoviendo la unión del piridoxal fosfato y la organización de un sitio catalítico competente. Por otro lado, los iones inhibitorios Na^+ y Li^+ presentan se encuentran penta-coordinados con una segunda molécula de agua que reemplaza la unión a la Thr303 y a la Ser80; esta sustitución provoca la desorganización del sitio activo e impide la expresión de la catálisis.

El efecto activador de los cationes monovalentes sobre las enzimas es un fenómeno muy extendido; se han descrito más de un centenar de enzimas que utilizan algún catión monovalente para su función o estructura (Suelter 1970, Larsen y Reed 2001, Di Cera 2004, Di Cera 2006). Sin embargo, a pesar de los avances logrados en la comprensión del efecto activador de los cationes monovalentes en algunas enzimas, en general este efecto es poco entendido. La piruvato cinasa es un buen paradigma de la

activación de una enzima por un catión monovalente, no sólo fue la primera enzima en la que se demostró el requerimiento absoluto de un catión monovalente para la catálisis, sino que el efecto activador del K^+ sobre esta enzima es el de mayor magnitud reportado. La actividad en presencia o ausencia de K^+ es de $250 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína y $0.02 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína respectivamente; esto es, el K^+ aumenta alrededor de 12,500 veces la velocidad de esta enzima (Kayne 1971). Sin embargo, en este caso, a pesar de los amplios estudios realizados a lo largo de más de 50 años y aun cuando se cuenta con estructuras cristalográficas de alta resolución, las bases moleculares de la activación por catión monovalente o la selectividad iónica en esta enzima no han sido completamente descifradas. Por esto, la piruvato cinasa de músculo de conejo es un modelo interesante para tratar de entender el efecto de los cationes monovalentes sobre la estructura y función de las proteínas.

Piruvato cinasa

La piruvato cinasa (ATP-piruvato 2-O fosfotransferasa, EC 2.7.1.40) es la enzima que cataliza el último paso de la vía glucolítica. Esta enzima cataliza la transferencia del grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP para producir ATP y piruvato en presencia de dos iones Mg^{2+} y un ión K^+ .



La reacción se encuentra ampliamente favorecida hacia la formación de productos ($K_{eq} = 6.45 \times 10^3$ a pH 7.4) (Muirhead 1987). El piruvato producto de la reacción alimenta diversas vías metabólicas, por lo que en la mayoría de los organismos o tejidos, esta enzima es uno de los puntos de control de la vía y un importante punto de intersección metabólica.

Las propiedades regulatorias de la piruvato cinasa son particularmente importantes en tejidos que llevan a cabo gluconeogénesis, donde la inhibición de la reacción catalizada por la piruvato cinasa es necesaria para evitar ciclos fútiles. En tejidos y organismos donde la glucólisis y la gluconeogénesis ocurren simultáneamente, la regulación metabólica de la enzima está sujeta a un fino control por modificación covalente así como por diversos efectores alostéricos. En general, la gran mayoría de las piruvato cinasas reportadas a la fecha presentan propiedades alostéricas homotrópicas con respecto al PEP (Muñoz y Ponce 2003), aunque se han reportado algunos casos de cooperatividad con respecto al ADP, por ejemplo, en las enzimas de algunas bacterias y peces (Ng y Hamilton 1975, Fideu y cols. 1986). Las isoformas cooperativas presentan además activación heterotrópica por diversos metabolitos, entre los que se cuentan la fructosa 1,6-bifosfato, la fructosa 2,6-bifosfato, la ribosa 5-fosfato, el AMP, el ADP, etc. (Muñoz y Ponce 2003). Es relevante mencionar que la piruvato cinasa de músculo es la única isoforma conocida que no presenta cooperatividad de unión del sustrato ni activación alostérica. Sin embargo, se ha reportado que la fenilalanina es capaz de inducir cooperatividad y disminuir la afinidad de la enzima por el PEP (Rozengurt y cols. 1970), aunque el significado fisiológico de este efecto es desconocido.

La distribución de la piruvato cinasa difiere en distintos organismos y tejidos. En bacterias, protistas y hongos se encuentra una sola forma de la enzima, aunque algunas bacterias llegan a presentar dos isoformas. En plantas existe una forma citosólica y otra plastídica, mientras que en mamíferos existen cuatro diferentes isoformas, L, R, K y M. La

isoforma L se encuentra principalmente en hígado, mientras que la R se localiza en eritrocitos. La isoforma K se localiza en riñón y tejidos fetales mientras que la isoforma M se encuentra en músculo y cerebro.

Tradicionalmente se ha dividido a las piruvato cinasas en dos grupos principales, Tipos I y II, dependiendo de la naturaleza de su activador alostérico. En general, se clasifican como tipo I las enzimas activadas por azúcares fosforilados, mientras que las tipo II responden a nucleótidos fosforilados. Estudios filogenéticos basados en la secuencia de la piruvato cinasa de diversos organismos han mostrado la topología dicotómica del árbol filogenético (Schramm y cols. 2000, Johnsen y cols. 2003). La existencia de estos dos grupos de enzimas es casi coincidente con el activador alostérico. Sin embargo, esta división no parece totalmente adecuada. Por ejemplo, la piruvato cinasa de músculo pertenece al tipo I, aunque que no presenta regulación alostérica. Otras enzimas presentan otro tipo de activador alostérico que no son azúcares ni nucleótidos y en otras más incluso no se han encontrado activadores alostéricos. Por otro lado, la estructura dicotómica del árbol filogenético basado en la secuencia de la piruvato cinasa no coincide con la topología del árbol filogenético “modelo” obtenido por otros medios, por ejemplo por análisis de RNA ribosómico o por comparaciones morfológicas (Woese 2000). La presencia de ambos tipos de enzimas en una misma bacteria (e. g. *E. coli* presenta tanto PK tipo I como II) o de enzimas de bacterias cercanas filogenéticamente en ambos grupos (i.e. las γ -proteobacterias se encuentran representadas en ambas ramas del árbol), sugiere que la dicotomía es causada por una duplicación génica probablemente anterior a la diversificación de las bacterias, aunque no puede descartarse que la relación observada sea el resultado de eventos de transferencia lateral entre ambos grupos. En cualquier caso, el significado de la existencia de dos isoformas de la piruvato cinasa en algunas bacterias o el papel metabólico de estas diferentes isoformas en los diversos organismos no se conoce.

La gran mayoría de las piruvato cinasas caracterizadas hasta la fecha son homotetrámeros con una masa molecular de 50-60 kDa, aunque mayores o menores estados de oligomerización han sido reportados (Muñoz y Ponce 2003). La estructura cristalográfica de la piruvato cinasa ha sido obtenida a partir de diversas fuentes (Stuart y cols. 1979, Larsen y cols. 1994, Mattev y cols. 1995, Larsen y cols. 1997, Larsen y cols. 1998, Jurica y cols. 1998, Rigden y cols. 1999, Valentín y cols. 2002). En todas ellas la estructura general es muy similar, con diferencias en la longitud de los extremos amino y carboxilo. La piruvato cinasa de músculo de conejo es una proteína α/β que presenta cuatro dominios estructurales: el dominio amino terminal es un motivo hélice-giro-hélice, el dominio A es un barril α/β , el dominio B es un barril β , y el dominio C está formado por 5 hélices y 5 hojas β ; el sitio activo se encuentra localizado entre los dominios A y B (Figura 1A). La estructura de la enzima ha sido resuelta en presencia de diferentes ligandos (sustratos, productos y análogos), lo que ha permitido observar distintos estados conformacionales. Cuando el sitio activo está parcialmente ocupado con Mg^{2+} , K^+ y piruvato o análogos del PEP, la enzima se encuentra en una conformación abierta o semi-cerrada; cuando el sitio activo se encuentra totalmente ocupado (Mg^{2+} , K^+ , oxalato y ATP- Mg^{2+}) la enzima pasa a una conformación cerrada (Figura 1B). En la conformación cerrada el dominio B rota 40° sobre el dominio A, posicionando de esta manera los residuos que ayudan a conformar la estructura del sitio activo (Larsen y cols. 1994, Larsen y cols. 1997, Larsen y cols. 1998).

El sitio de unión al K^+ está dado por los oxígenos del carbonilo de la T113, del O_γ de la S76, del $O_{\delta 1}$ de la N74 y del $O_{\delta 2}$ del D112. La esfera de coordinación del K^+ se completa con un oxígeno del fosfato del PEP o del fosfato γ del ATP y con el oxígeno de una molécula de agua del sitio activo (Figura 1C). Por esto, el papel otorgado al K^+ ha sido el de coordinar y posicionar correctamente al grupo fosfato del PEP para su transferencia al ADP. Sin embargo, esta coordinación con los sustratos o productos no parece ser

suficiente para explicar todos los efectos que el K^+ ejerce sobre la estructura y función de la enzima y que se detallan en la siguiente sección.

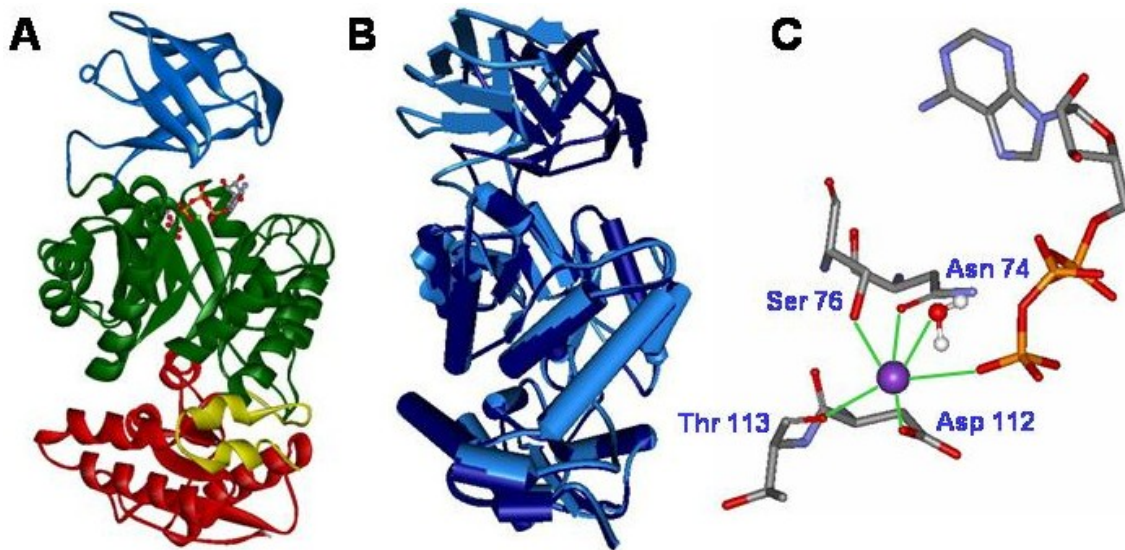


Figura 1. A) Representación en cintas de una subunidad de la piruvato cinasa de músculo de conejo, cada uno de los dominios se muestra en diferente color: N-terminal amarillo, A verde, B azul y C rojo; los ligandos del sitio activo (ATP, oxalato, K^+ y Mg^{2+}) se muestran como modelos de esferas y varas. B) Sobreposición de los conformeros abierto (azul claro) y cerrado (azul marino) de la piruvato cinasa, se observa el movimiento del dominio B sobre el dominio A. C) Sitio de unión del K^+ en la piruvato cinasa; se muestran los residuos de la proteína y la molécula de agua y el ATP que forman la esfera de hexa-coordinación del K^+ .

Efecto del K^+ sobre la piruvato cinasa.

La gran mayoría de las enzimas activadas por catión monovalente (incluida la piruvato cinasa) expresan su actividad óptima en presencia de K^+ . En general, este catión puede ser sustituido eficientemente por Rb^+ , NH_4^+ y Tl^+ , mientras que los cationes Li^+ , Na^+ y Cs^+ prácticamente no activan (Kayne 1971). Parece haber una correlación cercana entre el tamaño del catión y su capacidad de activación. Los cationes activadores (K^+ , Rb^+ , NH_4^+ y Tl^+) tienen radios iónicos similares, mientras que Li^+ y Na^+ son más pequeños y Cs^+ es más grande. En general, las enzimas activadas por Na^+ son menos activas en presencia de Li^+ o de K^+ . Asimismo, existe una correlación entre la preferencia por Na^+ o K^+ y la localización celular de las enzimas, las intracelulares presentan selectividad hacia el K^+

mientras que las extracelulares como las proteasas de la coagulación utilizan preferentemente al Na^+ . Esto sugiere que la selectividad por cationes monovalentes es el resultado de una adaptación evolutiva a las condiciones del ambiente celular (Di Cera 2004).

Los efectos del K^+ sobre la estructura y función de la piruvato cinasa han sido ampliamente estudiados. A continuación se presenta una pequeña reseña histórica de los trabajos más importantes.

En 1953, Kachamar y Boyer describieron el efecto activador de los cationes monovalentes sobre la piruvato cinasa. Con base en la correlación encontrada entre el radio iónico de los cationes y su eficiencia como activador, los autores sugirieron que la unión del catión monovalente a la enzima induce el desplazamiento de las estructuras cercanas y que la expresión de la catálisis estaba asociada con la magnitud de este desplazamiento. Así, diversos estudios físicos mostraron que la conformación de la proteína se modifica por la presencia de los cationes monovalentes. Los iones metálicos alcalinos cambian los espectros de absorción de la luz ultravioleta, de polarización de fluorescencia y de dicroísmo circular de la enzima (Kayne y Suelter 1965, Wilson y cols. 1967, Suelter 1967, Wildes y cols. 1971). También alteran el comportamiento electroforético (Sorger y cols. 1965) y la velocidad de sedimentación de la proteína (Kayne y Suelter 1968). Las modificaciones estructurales de la enzima se observaron también con cationes monovalentes no activadores, sugiriendo que los cambios conformacionales están involucrados en la catálisis, aunque no son suficientes para inducir el aumento de la actividad (Wildes y cols. 1971, Sorger y cols. 1965).

Posteriormente, estudios cinéticos, de espectroscopía diferencial y de resonancia paramagnética del electrón mostraron un efecto sinérgico en la unión del Mg^{2+} y el K^+ a la enzima (Suelter y cols. 1966, Reed y Cohn 1973). Simultáneamente, se reportó la interacción del K^+ con los sustratos, lo que proporcionó evidencia de la participación del

cación en los eventos catalíticos en el sitio activo de la PK (Nowak y Mildvan 1972). Experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN), en los que se tituló la velocidad de relajación de los protones del agua en las inmediaciones del ión paramagnético Mn^{2+} , mostraron que el K^+ incrementa la afinidad de la enzima por el PEP y sus análogos, de la misma manera que el PEP aumenta la afinidad de la enzima por el K^+ . En el mismo sentido, se describió que el K^+ disminuye la afinidad de la enzima por análogos de PEP que carecen del grupo carboxilo (Nowak y Mildvan 1972). Con base a estos resultados, Nowak propuso que los cationes monovalentes facilitan la interacción del PEP al complejo binario enzima- Mn^{2+} a través de su interacción con el grupo carboxilo (Nowak y Mildvan 1972). En concordancia con esta hipótesis, estudios de RMN mostraron que la distancia entre el Mn^{2+} y el $^{205}Tl^+$ en complejo con la PK se acortaba por la adición del PEP. De esta manera, se demostró que el catión monovalente se une en el sitio catalítico y participa directamente en la interacción del PEP con el complejo enzima- Mn^{2+} . De hecho, Suelter propuso que el K^+ asiste la estabilización de la forma enolato del piruvato (Suelter 1970).

La localización del sitio activo en la piruvato cinasa se sugirió en la primera estructura cristalográfica resuelta de esta enzima; sin embargo, el sitio de unión del catión monovalente no fue establecido (Stammers y cols. 1977). La interacción del K^+ con los sustratos y productos se demostró en las estructuras cristalográficas de la enzima en complejo con K^+ , Mg^{2+} y fosfolactato (Larsen y cols. 1997) o K^+ , Mg^{2+} , oxalato y ATP (Larsen y cols. 1998). Los datos mostraron que el K^+ interactúa con uno de los oxígenos del grupo fosforilo del PEP o el fosfato- γ del ATP. No obstante, hasta el momento, todas las estructuras cristalográficas de la piruvato cinasa han sido obtenidas en complejos con cationes monovalentes, de manera que los cambios conformacionales que acompañan la unión del K^+ y que se traducen en el aumento de la actividad no han podido ser descritos a nivel molecular.

Actividad independiente de K⁺ en la piruvato cinasa

La dependencia de catión monovalente para la catálisis es una característica común para la mayoría de las piruvato cinasas; sin embargo, las enzimas de *Phycomyces blakesleeanus* (Busto y cols. 1988), *Corinebacterium glutamicum* (Jetten y cols. 1994), *Zimomonas mobilis* (Steiner y cols. 1998), *Thermoproteus tenax* (Schramm y cols. 2000) y la tipo II de *Escherichia coli* (Malcovati y Valentini 1982) no requieren K⁺. A este respecto Laughlin y Reed (1997) compararon las secuencias de las piruvato cinasas de *E. coli* II y de *C. glutamicum* con la secuencia de la enzima de músculo de conejo. Encontraron que el único cambio significativo en la vecindad del sitio activo entre estas enzimas era la sustitución del glutámico 117 en la enzima de músculo por una lisina en las enzimas independientes de K⁺. El glutámico 117 se encuentra en la cercanía del sitio de unión del K⁺, a una distancia de 4.5 Å del catión monovalente. La proximidad de la cadena lateral del residuo 117 al sitio de unión del K⁺ sugirió que en las enzimas independientes de catión el grupo amino protonado de la lisina podría proveer un catión monovalente interno. Con el objeto de probar si la lisina podía sustituir al K⁺, construyeron la mutante E117K de la piruvato cinasa de músculo de conejo (PK-E117K). Encontraron que la mutante presenta una actividad independiente de K⁺ de alrededor de 30 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína y no es activable por catión monovalente. Los autores propusieron que la carga positiva de la lisina provee un catión monovalente interno que evita la necesidad del K⁺.

Por otro lado, además de la ingeniería genética, la ingeniería de disolventes ha permitido alterar las propiedades cinéticas de muchas enzimas (Ramírez-Silva y cols. 2004). A este respecto, se ha encontrado que cuando la piruvato cinasa se encuentra atrapada en micelas invertidas con 3.6% de agua o en 40% de DMSO (p/v) muestra una actividad independiente de K⁺ de hasta 20 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína (Ramírez Silva y cols. 1993, Ramírez-Silva y cols. 2001). En estos sistemas, las constantes de afinidad por los sustratos son similares a las obtenidas en presencia de K⁺, mientras que difieren de

las obtenidas en ausencia de este catión. Además, los perfiles de actividad vs. pH siguen el mismo patrón en los sistemas de bajo contenido de agua que en presencia de K^+ , mientras que en ausencia de K^+ los perfiles de pH simulan la imagen especular de los que se obtienen en presencia de K^+ . En concordancia con los datos cristalográficos que muestran que la enzima existe en por lo menos dos estados conformacionales, estudios espectroscópicos de fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular han mostrado que en presencia de PEP y Mg^{2+} , el K^+ induce la conformación activa de la enzima. En estos mismos experimentos, es relevante indicar que en los sistemas con bajo contenido de agua la enzima se encuentra en una conformación similar a la obtenida en 100% de agua en presencia de K^+ . Estos resultados se han explicado en términos de que en los sistemas de bajo contenido de agua, donde se restringe la movilidad de la proteína, se estabiliza la conformación activa de la enzima, lo que favorece que se posicionen los residuos del dominio B que forman parte del sitio activo dando lugar a la expresión de la catálisis en ausencia de K^+ .

Mecanismo cinético de la piruvato cinasa

La primera aproximación al estudio del mecanismo cinético de la piruvato cinasa de músculo de conejo fue realizada por el grupo de Boyer (Reynard y cols. 1961). Con base en la independencia en la unión de ambos sustratos, la inhibición competitiva del ATP con respecto a ambos sustratos y la concordancia entre los valores de K_m obtenidos cinéticamente y los valores de K_d obtenidos directamente por ultracentrifugación, los autores concluyeron que la enzima sigue un mecanismo secuencial al azar en equilibrio rápido. Más adelante, Plowman y Krall (1965) encontraron que la dependencia de la K_m del ADP con respecto al pH se asemeja a la dependencia de la K_d en función del pH de acuerdo a lo reportado por Mildvan y Cohn (1965). La similitud entre las constantes

cinéticas y las constantes de disociación sugirieron de nuevo, un mecanismo en equilibrio rápido.

Posteriormente Mildvan y Cohn (1966), investigaron el mecanismo cinético de la enzima por medio de ensayos cinéticos de velocidad inicial y de inhibición por producto así como de unión de ligandos al equilibrio y experimentos de resonancia magnética nuclear (velocidad de relajación de los protones del agua). La influencia de la unión del sustrato sobre la velocidad de la relajación de los protones del agua sobre el catión paramagnético Mn^{2+} unido al sitio activo permitió determinar las constantes de afinidad de la enzima por los ligandos. En este estudio, los autores encuentran una correspondencia cercana entre las constantes de disociación obtenidas en los experimentos de RMN con las obtenidas en los estudios de unión al equilibrio y las obtenidas cinéticamente. Asimismo, los patrones de inhibición no competitivos junto con la similitud en las constantes de unión obtenidas por los diferentes métodos confirman el esquema de cinética de equilibrio y la unión al azar de los sustratos a la enzima.

En 1973 Ainsworth y Macfarlane realizaron un estudio cinético detallado de velocidades iniciales e inhibición por producto. Los patrones de velocidad inicial muestran independencia en la unión de cada sustrato con respecto a la concentración del otro. Los estudios de inhibición por sustrato muestran que el $ATP-Mg^{2+}$ es un inhibidor competitivo tanto del $ADP-Mg^{2+}$ como del PEP, mientras que el piruvato es un inhibidor competitivo del PEP y no competitivo del $ADP-Mg^{2+}$. En su conjunto, estos datos confirmaron que la enzima sigue un mecanismo secuencial al azar en equilibrio rápido.

En contraste, en un estudio cinético del efecto de los cationes mono y divalentes sobre la velocidad de la piruvato cinasa, Melchior (1965) encontró una relación no lineal en un gráfico de dobles recíprocos de la velocidad de la reacción contra la concentración de $ADP-Mg^{2+}$ a diferentes concentraciones de Mg^{2+} libre. La ausencia de linealidad en este gráfico parece evidenciar que el paso de transfosforilación no es el único paso

limitante, indicando un mecanismo al azar pero no en equilibrio rápido. En este mismo sentido, el mecanismo de la enzima se investigó utilizando estudios cinéticos y de medición de flujo así como experimentos de unión al equilibrio y de captura isotópica (Dann y Britton 1978). El término flujo se utiliza para describir la velocidad de conversión de un sustrato a su producto. Si el producto está presente, se puede medir el flujo de las moléculas de productos a las moléculas de sustrato. La velocidad de acumulación del producto será la diferencia entre los flujos y se denomina flujo neto de sustrato a producto. Para medir los flujos es necesario usar sustratos marcados isotópicamente. La unión rápida al azar de los sustratos debe de dar un cociente de flujo igual a la unidad bajo cualquier condición. Los resultados obtenidos muestran que el cociente del flujo de la conversión de ATP a ADP entre el flujo de la conversión de ATP a PEP describe un incremento hiperbólico hasta un valor máximo de 2.1 con respecto al aumento en la concentración de ADP, pero que no se afecta con la concentración de PEP. Debido a que en el primer caso el cociente es mayor a la unidad, la adición de los sustratos debe involucrar un camino en el que el PEP se une a la enzima en un paso limitante. Sin embargo, los sustratos deben de unirse también al azar a la enzima como lo indica la falta de efecto del PEP sobre el cociente del flujo. Los experimentos realizados en presencia de sustratos marcados radiactivamente muestran captura isotópica con $[^{32}\text{P}]\text{PEP}$, confirmando que cuando el PEP se adiciona primero a la enzima lo hace en un paso limitante. La captura isotópica no se observó con $[8\text{-}^{14}\text{C}]\text{ADP}$, indicando que la adición de ADP a la enzima libre debe de ser rápida. Asimismo, los experimentos de inhibición con los productos piruvato y ATP muestran patrones competitivos con respecto al PEP. En su conjunto, los datos muestran que la enzima sigue un mecanismo al azar con una vía preferencial ordenada con PEP como primer sustrato a bajas concentraciones de ADP y que la liberación de los productos es rápida y aleatoria. Cabe mencionar que este es el

único estudio que indica que bajo ciertas condiciones la PK puede seguir un mecanismo cinético parcialmente ordenado.

A este respecto, es relevante mencionar que estudios cinéticos preliminares realizados en ausencia de K^+ en nuestro laboratorio mostraron que la afinidad de la enzima por el ADP depende de la concentración de PEP, indicando que en esta condición el comportamiento cinético de la enzima podría estar alterado. Con el fin de entender el papel del K^+ en el mecanismo cinético de la piruvato cinasa de músculo de conejo, realizamos un estudio cinético de la enzima en ausencia de K^+ . Es importante mencionar que prácticamente no existe información sobre las características cinéticas o estructurales de la enzima sin K^+ , por lo que el estudio de la estructura y función de la enzima en ausencia de K^+ puede proporcionar un punto de comparación para la comprensión del efecto activador del K^+ en la piruvato cinasa. Dado que la enzima silvestre en 40% de DMSO y la mutante PK-E117K muestran un comportamiento catalítico similar al de la enzima con K^+ en un medio acuoso, es interesante realizar los ensayos cinéticos en la enzima en presencia del cosolvente y en la mutante PK-E117K.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo de este trabajo es aportar conocimiento que ayude a explicar el efecto activador del K^+ en la piruvato cinasa de músculo de conejo e identificar que tan frecuentemente y que residuos se encuentran implicados en la actividad independiente de K^+ en la piruvato cinasa.

La primera sección de este trabajo se centra en los efectos cinéticos y estructurales del K^+ sobre la piruvato cinasa de músculo de conejo; en la segunda sección se detalla el análisis filogenético y estructural de las secuencias de piruvato cinasa reportadas.

Objetivos particulares

Estudios cinéticos

- Estudiar el efecto del K^+ en la cinética de la piruvato cinasa, realizar ensayos de velocidad inicial de la piruvato cinasa silvestre en presencia y en ausencia de K^+ en 100% de agua, en ausencia de K^+ en 40% de DMSO y en la mutante E117K en ausencia de K^+ en 100% de agua.
- Estudiar el efecto del K^+ en la cinética de la piruvato cinasa en presencia de inhibidores sin salida como el ADP-Cr²⁺ y el oxalato. Estos ensayos se realizarán en la piruvato cinasa silvestre en presencia y en ausencia de K^+ en 100% de agua, en ausencia de K^+ en 40% de DMSO y en la mutante E117K en ausencia de K^+ en 100% de agua.
- Estudiar el efecto del K^+ y los ligandos sobre la estructura de la piruvato cinasa. Para ello se realizarán experimentos de fluorescencia intrínseca y de anisotropía de fluorescencia en la piruvato cinasa silvestre en 100% de agua

Estudios filogenéticos

- Realizar el alineamiento y el análisis filogenético de las secuencias disponibles de la piruvato cinasa, determinar la distribución de las enzimas dependientes e independientes de K^+ , enfocándose en la naturaleza del residuo 117 o equivalente.
- Analizar la secuencia de aminoácidos en los alineamientos generados para identificar posibles residuos implicados en la actividad independiente de K^+ .
- Establecer la posible ruta de interconversión entre las dos familias de piruvato cinasas (dependientes e independientes de K^+). Para ello se analizará la secuencia de nucleótidos que codifican para los aminoácidos 113 al 120.
- Realizar el análisis estructural de la piruvato cinasa, para asignar un posible papel estructural a los residuos implicados en la actividad independiente de K^+ en la piruvato cinasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

La piruvato cinasa de músculo de conejo y la deshidrogenasa láctica de músculo de cerdo (DHL) se obtuvieron de Boehringer como suspensiones de sulfato de amonio. El plásmido PET-E117K que contiene el gen de la mutante E117K (PK-E117K) (Laughlin y Reed 1997) fue donado por el Dr. George H. Reed de la Universidad de Wisconsin. El plásmido pTrc99A y la cepa PB25 (Δ -PKI Δ -PKII) de *E. coli* (Ponce y cols. 1995) fueron obsequiados por el Dr. Guillermo Gosset y el Dr. Bolívar Zapata el Instituto de Biotecnología de la UNAM. El Dowex, MES, Trizma, oxalato, ADP y PEP sales de ciclohexilamonio fueron adquiridos de Sigma. La sal de sodio del NADH de Sigma se transformó en sal de ciclohexilamonio por cromatografía de intercambio iónico siguiendo las instrucciones del fabricante. Las resinas DEAE y carboximetil sefarosa fueron de Pharmacia. El ácido perclórico, el ácido clorhídrico y el DMSO grado analítico fueron de Merck. El cloruro de tetrametilamonio y el cloruro de cromo fueron sales de grado analítico de Baker. La mezcla de los inhibidores de proteasas fue de Roche.

Procedimientos generales

La concentración de proteína se determinó midiendo la absorbencia a 280 nm usando los coeficientes de extinción de $0.54 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la piruvato cinasa (Cottam y cols. 1969) y $1.45 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para la DHL (Jeanicke y Konf 1968). Las enzimas libres de sulfato de amonio se obtuvieron por columnas de centrifugación en Sephadex G-25 equilibradas previamente en Tris-HCl 50 mM (pH 7.6) como se detalla en (Ramírez-Silva y cols. 1993). Las concentraciones residuales de cationes monovalentes se determinaron para el NH_4^+ en un ensayo enzimático con glutamato deshidrogenasa, mientras que para Na^+ y K^+ se determinaron por flamometría. En todos los casos la contaminación por NH_4^+ , Na^+ y K^+ en las mezclas de reacción se encontró por debajo del límite de detección ($10 \mu\text{M}$).

Ensayos de la actividad de la PK

La actividad de la enzima se determinó por dos métodos diferentes. En el primero, la formación de piruvato se midió en un sistema acoplado a DHL siguiendo espectrofotométricamente la oxidación del NADH a 340 nm (Buchner y Pleiderer 1995) en una mezcla de reacción que contenía MES-Tris 50 mM (pH 6.0) y las concentraciones de cationes (Mg^{2+} y K^+), de sustratos (PEP y ADP) e inhibidores (oxalato y ADP- Cr^{2+}) indicados en cada experimento. Debido a la inhibición que el oxalato y el DMSO ejercen sobre la DHL, en los experimentos de inhibición con oxalato en presencia de DMSO se determinó de manera indirecta la formación de piruvato. La enzima se incubó durante 5 minutos en una mezcla de reacción que contenía MES-Tris 50 mM (pH 6.0) y las concentraciones de cationes (Mg^{2+} y K^+), de sustratos (PEP y ADP) e inhibidores (oxalato y ADP- Cr^{2+}) indicados en cada experimento. La reacción se detuvo con $HClO_4$ y se neutralizó con K_2HPO_4 . Se centrifugó la mezcla para precipitar las sales y la enzima desnaturizada y se determinó espectrofotométricamente el piruvato formado con DHL y NADH. Las concentraciones del complejo ADP- Mg^{2+} y del Mg^{2+} libre se calcularon con el programa CHELATOR (Schoenmakers y cols. 1992), considerando el pH, la fuerza iónica y la temperatura. Debido al efecto inhibitor del exceso de Mg^{2+} libre sobre la piruvato cinasa (Ramírez Silva y cols. 2003), en todos los ensayos la concentración de Mg^{2+} libre se mantuvo fija a 3 mM. Todos los ensayos se realizaron en condiciones de velocidad inicial. En ambos métodos la velocidad fue lineal durante los 5 minutos que duraron los ensayos. Para compensar las diferentes concentraciones de ligandos usados en cada experimento, se adicionó cloruro de tetrametilamonio para mantener la fuerza iónica constante en 0.88 M. La determinación de la actividad enzimática se inició con la adición de piruvato cinasa. Las concentraciones de DHL utilizadas se establecen en cada experimento. La actividad específica de la piruvato cinasa no se modificó por un aumento de 5 veces en la concentración de la DHL. Todos los ensayos se realizaron a 25°C.

Estudios cinéticos

Los patrones de velocidad inicial se determinaron variando las concentraciones de PEP a diferentes concentraciones fijas de ADP-Mg²⁺. Los datos de velocidad inicial se graficaron como dobles recíprocos y cada curva se ajustó individualmente (Origin 6.0) a la forma lineal de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$1/v = (K_m / V) (1/[S]) + (1/V) \quad [1]$$

donde v es la velocidad inicial, V es la velocidad máxima, S es el sustrato cuya concentración es variable y K_m es la constante de Michaelis-Menten.

Con base en el patrón de intersección obtenido en el gráfico de dobles recíprocos los datos se ajustaron globalmente por regresión no lineal (Origin 6.0) a las ecuaciones de un mecanismo secuencial al azar en equilibrio rápido:

$$v = V [A] [B] / (K_a K_b + K_a [B] + K_b [A] + [A] [B]) \quad [2]$$

o secuencial ordenado en equilibrio rápido:

$$v = V [A] [B] / (K_a K_b + K_b [A] + [A] [B]) \quad [3]$$

donde v es la velocidad inicial, V es la velocidad máxima, A es PEP, B es ADP-Mg²⁺ y K_a y K_b son las constantes de Michaelis-Menten para el PEP y el ADP, respectivamente.

Los patrones de inhibición se obtuvieron variando la concentración de un sustrato y manteniendo la concentración del segundo sustrato fijo a diferentes concentraciones fijas de uno de los inhibidores. El oxalato se utilizó como análogo sin salida del PEP y el ADP-Cr²⁺ como análogo sin salida del ADP-Mg²⁺. Los datos obtenidos se analizaron por regresión lineal (gráficos de dobles recíprocos y regráficos de las pendientes o interceptos contra la concentración de inhibidor) y regresión no lineal ajustando globalmente los datos a las ecuaciones correspondientes a una inhibición competitiva lineal [4], mixta lineal [5] o acompetitiva lineal [6]:

$$v = V [S] / \{ K_m (1 + [I] / K_i) + [S] \} \quad [4]$$

$$v = V [S] / \{ K_m (1 + [I] / K_i) + [S] (1 + [I] / K_i) \} \quad [5]$$

$$v = V[S] / \{ K_m + [S] (1 + [I] / K_i) \} \quad [6]$$

donde v , V , S y K_m se definieron en las ecuaciones anteriores y K_i es la constante de inhibición.

Síntesis y purificación de Cromo-ADP

El Cromo-ADP (ADP-Cr²⁺) se preparó de acuerdo a DePamphilis y Cleland (1973), con algunas modificaciones. Una solución de 40 mL de ADP 20 mM se mezcló con 40 mL de CrCl₃ 20 mM para obtener un volumen final de 80 mL. La mezcla se colocó en un baño de temperatura controlada a 80°C durante 12 minutos. El producto de la reacción se enfrió en hielo durante 20 minutos y se procedió a su purificación. La solución se cargó en una columna de Dowex 50WX2-100 (15 x 1.5 cm), se lavó con 10 volúmenes de columna y se eluyó con un gradiente lineal de 0.0 a 2.0 M de HClO₄. Las fracciones que contenían al ADP-Cr²⁺ se mezclaron, se diluyeron 1:20 y se pasaron por una nueva columna de Dowex 50WX2-100 (5 x 1.5 cm) que se lavó con 10 volúmenes de agua. La porción superior de la resina que presentaba la mayor adsorción de ADP-Cr²⁺ se transfirió a una columna vacía, el ADP-Cr²⁺ se eluyó con un pulso de 2.0 M de HClO₄. Las fracciones que contenían la mayor concentración de Cr-ADP²⁺ se combinaron y neutralizaron a pH de 3.0 con bicarbonato de tetrametilamonio. La suspensión formada se colocó a 4°C durante 12 horas y se centrifugó para separar el perclorato de tetrametilamonio formado. El ADP-Cr²⁺ purificado se analizó por espectrofotometría de UV/Vis y cromatografía de capa fina en placas de sílica y celulosa usando 1-propanol/hidróxido de amonio/agua 6:3:1 y 1-propanol/ácido acético/agua 4:2:4 como solventes, respectivamente. El rendimiento de la reacción fue de alrededor de un 40%, el análisis de la muestra confirmó la identidad del compuesto e indicó una pureza de alrededor del 90%.

Preparación de bicarbonato de tetrametilamonio

El bicarbonato de tetrametilamonio se preparó por cromatografía de intercambio iónico. Una columna de Dowex 50WX4-100 (15 x 2.5 cm) se cargó con 5 volúmenes de columna de cloruro de tetrametilamonio 1.0 M y se lavó exhaustivamente con agua. A continuación, 120 mL de NaHCO₃ 100 mM se pasaron por la columna; el eluyente se fraccionó y colectó. Las fracciones que tenían un pH mayor a 9.5 se liofilizaron y resuspendieron en un volumen mínimo.

Sub-clonación de la mutante E117K

La mutante E117K de la piruvato cinasa de músculo de conejo (PK-E117K) fue clonada originalmente en el plásmido pET22B y sobreexpresada en la cepa BL21-D3Plys de *E. coli* (Laughlin y Reed 1997). Sin embargo, con el objeto de evitar la posible contaminación de la proteína sobreexpresada con las piruvato cinasas de *E. coli* se utilizó la cepa PB25 en la que los genes de la piruvato cinasa tipo I y II han sido sustituidos por cassettes de cloranfenicol y kanamicina, respectivamente. Dado que la cepa PB25 no es compatible con el plasmido pET22B, se procedió a la subclonación del gen de la PK-E117K en el plasmido ptrc99A. La replicación se realizó en presencia del oligonucleótido 5'CATGGAATTCTAATAAGGAGCTCCATATGTCAAAG 3' que contiene un sitio de restricción Eco RI y el sitio Nde I del gen de la PK-E117K. El producto amplificado se cortó con la enzima Eco RI, se clonó en el plasmido ptrc99A verificando la direccionalidad y se utilizó para transformar células competentes PB25. Esta parte del trabajo la realizaron Nallely Cabrera y Claudia Avitia en el laboratorio del Dr. Ruy Pérez Montfort del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM siguiendo una estrategia diseñada por Gabriel Mercado.

Sobreexpresión y purificación de la mutante E117K

Las células PB25 transformadas con el plásmido ptrc99A-PK-E117K se cultivaron en placa en medio LB y 5 g/L de agar suplementado con 50 µg/mL de kanamicina y 30 µg/mL de cloramfenicol. Se selecciono una colonia individual y se inocularon 250 mL de medio LB líquido que contenía 100 µg/mL de ampicilina, 50 µg/mL de kamamicina y 30 µg/mL de cloramfenicol. El cultivo crecido toda la noche a 37°C, se centrifugó y se resuspendió en un volumen mínimo de medio LB fresco. Estas células se usaron para inocular 4L de medio LB que contenían 100 µg/mL de ampicilina, 50 µg/mL de kamamicina y 30 µg/mL de cloramfenicol hasta una D.O. inicial de ~0.1. Los cultivos se incubaron a 37°C hasta que alcanzaron una D.O. de ~0.8 y se inició la inducción con 1 mM de IPTG y 20 gr/L de lactosa. Los cultivos crecidos durante toda la noche se cosecharon centrifugando 10 minutos a 20,000 g. Con el objeto de lavar las células, la pastilla se resuspendió en 100 mL de agua bidestilada y se cosecharon por centrifugación como se indicó.

Las células se resuspendieron en 200 mL de Tris-HCl 200 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM. La suspensión se diluyó 1:1 con Tris-HCl 200 mM (pH 8.0), sacarosa 1 M y lisozima (0.6 mg/gr de células) y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se produjo un choque osmótico con un volumen igual de agua bidestilada y se agitó a 4°C durante 20 minutos. Los esferoplastos se centrifugaron 20 minutos a 10,500 g, el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 20 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8.0. Se adicionó media pastilla de la mezcla de inhibidores de proteasas y MgCl₂ a una concentración final de 40 mM y se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los esferoplastos se rompieron por 5 minutos de sonicación en 20 ciclos de 15 segundos de sonicación por 45 segundos de enfriamiento a una potencia de 30 Watts.

La suspensión obtenida de la sonicación se centrifugó 20 minutos a 20,000 g colectando el sobrenadante. Esta solución se precipitó diferencialmente en 37% de sulfato

de amonio manteniendo el pH constante en 7.0 con la adición de hidróxido de amonio. Al cabo de una hora de agitación suave a 4°C, la suspensión se centrifugó durante 20 minutos a 20,000 g. Se colectó el sobrenadante y se adicionó sulfato de amonio para obtener una concentración de 65%, el pH se mantuvo constante en 8.0 adicionando hidróxido de amonio. La muestra se mantuvo en agitación suave a 4°C durante una hora y se centrifugó 20 minutos a 20,000 g. El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 4 mL de Tris-fosfato 10 mM (pH 7.0). La solución se dializó contra Tris-fosfato 10 mM (pH 7.0) con dos cambios, el primero después de una hora y el segundo durante toda la noche.

La proteína desalada se pasó a través de una columna de DEAE-sefarosa (1.6 x 10 cm) equilibrada previamente con Tris-fosfato 10 mM (pH 7.0). La columna se eluyó con 60 mL del mismo amortiguador y en el eluido se obtuvo la piruvato cinasa mutante. Finalmente las fracciones con la mayor actividad específica se cargaron en una columna de carboximetil-sefarosa (2.6 x 5 cm) previamente equilibrada con Tris-fosfato 10 mM (pH 7.0). La columna se lavó con 5 volúmenes de columna del mismo amortiguador y la proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0.0 a 1.0 M de KCl. La mutante eluyó a una concentración de 400 mM de KCl. Las fracciones con mayor actividad específica se mezclaron, concentraron y precipitaron en 80% de sulfato de amonio para su almacenamiento. El rendimiento de la purificación fue de alrededor de 12 mg de proteína por litro de cultivo y la pureza de la proteína fue mayor de 95%, a juzgar por el patrón electroforético obtenido por SDS-PAGE.

Experimentos de fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca y la anisotropía de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro de conteo de fotones ISS PC1 (ISS, Urbana, IL, USA). Todos los estudios se realizaron a una concentración de proteína de 100 µg/mL. La

muestra se excitó a una longitud de onda de 295 nm y la emisión se colectó de 300 a 450 nm con aperturas de la banda de excitación y emisión de 4 y 8 nm respectivamente. Los espectros del medio sin proteína se restaron de aquellos que contenían a la proteína. Los centros espectrales de masa (CEM), o longitud de onda de emisión promedio se calcularon como $\lambda_{av} = \sum \lambda I(\lambda) / \sum I(\lambda)$ donde λ y $I(\lambda)$ es la longitud de onda (en nm) y la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda determinada, respectivamente. La determinación de la anisotropía (r) se realizó a la longitud de onda de máxima emisión de cada muestra, calculándose como $r = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2F_{\perp})$, donde F_{\parallel} es la intensidad de fluorescencia paralela al plano de excitación y F_{\perp} es la intensidad de fluorescencia perpendicular al plano de excitación.

Análisis filogenético y estructural de la mutación E117K

Se realizó una búsqueda iterativa de secuencias relacionadas con la piruvato cinasa de músculo de conejo. Las secuencias se buscaron y descargaron desde el sitio del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando la herramienta BLASTp (Protein-Protein Basic Local Search Alignment Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

El alineamiento de las secuencias proteicas se realizó con el programa ClustalX (Thompson 1997). Los alineamientos se editaron con el programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Los dendrogramas se visualizaron con Treeview (Page 1996). El análisis filogenético se efectuó con el programa Mega ver 2.1 (Kumar 2001). El análisis estructural se realizó con el programa DynDom - Protein Domain Motion Analysis (<http://www.sys.uea.ac.uk/dyndom/dyndomMain.do>).

RESULTADOS Y DISCUSION

Sección 1

Estudios de velocidad inicial de la PK silvestre en presencia y en ausencia de K^+ en medio acuoso.

El trabajo pionero de la caracterización cinética de la piruvato cinasa de músculo de conejo por el grupo de Boyer (Reynard y cols. 1961) mostró que, a concentraciones saturantes de K^+ , la piruvato cinasa sigue un mecanismo cinético al azar en equilibrio rápido. En nuestro laboratorio observamos que en ausencia de K^+ la afinidad del complejo ADP-Mg²⁺ depende de la concentración del PEP, indicando que sin catión monovalente la unión del PEP afecta la unión del ADP-Mg²⁺; por lo que en este trabajo decidimos explorar el comportamiento cinético de la enzima en esta condición.

Se realizaron estudios de velocidad inicial de la reacción catalizada por la piruvato cinasa en presencia y en ausencia de K^+ a concentraciones variables de uno de los sustratos y a diferentes concentraciones fijas del otro (Figura 2). En ausencia de K^+ , la familia de líneas del gráfico de dobles recíprocos de la velocidad inicial contra la concentración de PEP intersectaron sobre el eje $1/S$ y a la izquierda del eje $1/v$ (Figura 2A). Con ADP-Mg²⁺ como el sustrato variable, la familia de líneas intersectaron en el eje $1/v$ y sobre el eje $1/S$ (Figura 2B). Estos datos indicaron un mecanismo secuencial ordenado en equilibrio rápido con PEP como primer sustrato. En presencia de K^+ (Figura 2C y 2D) las familias de líneas intersectaron en el eje $1/S$ y a la izquierda del eje $1/v$ con ambos sustratos, lo que es compatible con un mecanismo cinético ya sea al azar como ordenado en equilibrio rápido o en estado estacionario. Los datos en ausencia de K^+ se ajustaron globalmente a la ecuación que describe un mecanismo ordenado en equilibrio rápido. En consonancia con el reporte del grupo de Boyer, los datos a concentraciones saturantes de K^+ se ajustaron a la ecuación de un mecanismo al azar en equilibrio rápido. El ajuste a las ecuaciones seleccionadas fue el óptimo como lo muestra el error estándar

y la correspondencia entre los puntos experimentales y las líneas teóricas que se derivan del ajuste. Estos resultados se resumen en la Tabla I. La representación de ambos mecanismos cinéticos se muestra en el Esquema 1.

En 100% de agua sin K^+ , la V_{max} de la piruvato cinasa silvestre fue notablemente menor que con K^+ (400 veces). Es de hacer notar que esta diferencia es notablemente menor que a pH 7.6 (12,500 veces) debido principalmente al importante aumento de la V_{max} sin K^+ a pH 6.0. En ausencia de K^+ , la afinidad de la enzima por el PEP y el ADP- Mg^{2+} fue 5 y 6 veces menor, respectivamente, que en la presencia de K^+ (Tabla I). Estos resultados concuerdan con reportes anteriores que han mostrado que el K^+ incrementa la actividad y la afinidad de la enzima por ambos sustratos y por el Mg^{2+} (Nowak y Mildvan 1972, Ramírez-Silva y cols. 1993).

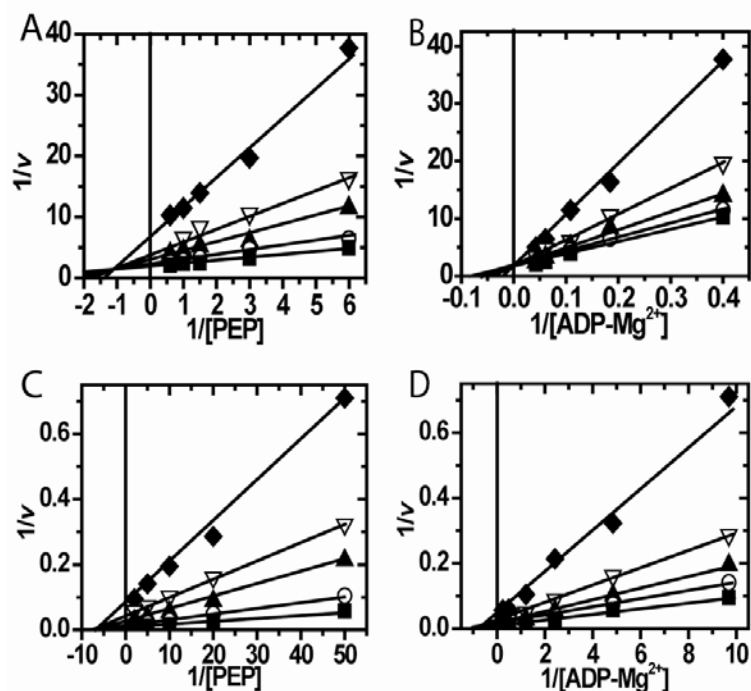
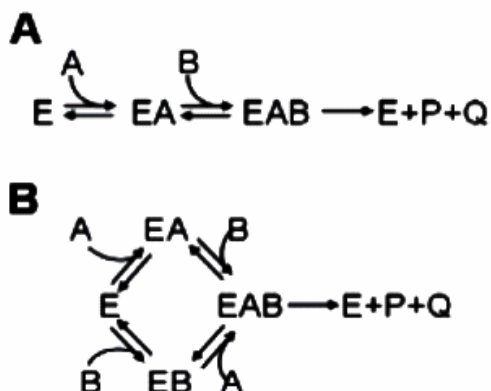


Figura 2. Gráficos de dobles recíprocos de los datos de velocidad inicial de la PK silvestre en ausencia (A y B) y en presencia de 90 mM de K^+ (C y D) en 100% de agua. El medio de reacción contenía MES-Tris 50 mM (pH 6.0), NADH 0.2 mM, Mg^{2+} 3 mM y 8 μ g/mL de LDH. Los valores recíprocos de las concentraciones de PEP ionizado y de los complejos ADP- Mg^{2+} se muestran en las abscisas de cada figura. Las concentraciones fijas variables de ADP- Mg^{2+} de las gráficas (A y C) son 2.5 (\blacklozenge), 5.43 (∇), 9.22 (\blacktriangle), 16.96 (\circ), 23.46 mM (\blacksquare) y 0.1 (\blacklozenge), 0.2 (∇), 0.41 (\blacktriangle), 0.83 (\circ), 2.1

mM (■), respectivamente. Las concentraciones fijas variables de PEP de los gráficos (B y D) fueron 0.17 (◆), 0.33 (▽), 0.67 (▲), 1.0 (○), 1.67 mM (■) y 0.02 (◆), 0.05 (▽), 0.1 (▲), 0.2 (○), 0.5 mM (■), respectivamente. La concentración de Mg^{2+} libre se mantuvo constante en 3 mM. Para mantener la fuerza iónica constante en 0.88 M, se adicionó $(CH_3)_4NCl$ en las concentraciones requeridas. La reacción se inició con la adición de la PK. Las concentraciones de PK utilizadas variaron entre 5 y 13 $\mu g/mL$ en los experimentos realizados en ausencia de K^+ y entre 0.15 y 1.2 $\mu g/mL$ cuando el K^+ estuvo presente.



Esquema 1. Representación de los mecanismos cinéticos en equilibrio rápido ordenado (A) y al azar (B).

Tabla I. Patrones intersectantes, mecanismos cinéticos y constantes cinéticas de la PK silvestre y de la E117K-PK. Los patrones de intersección se tomaron de los gráficos de doble recíprocos de los datos de velocidad inicial. Los datos se ajustaron globalmente a las ecuaciones que describen un mecanismo ordenado en equilibrio rápido $v = V[A][B] / (K_a K_b + K_b[A] + [A][B])$ o a la ecuación de un mecanismo al azar en equilibrio rápido $v = V[A][B] / (K_a K_b + K_a[B] + K_b[A] + [A][B])$, donde v es la velocidad inicial, A es PEP, B es ADP-Mg²⁺ y K_a y K_b son las constantes de Michaelis para el PEP y el ADP-Mg²⁺, respectivamente. Se muestran los errores estándar. Los valores de eficiencia catalítica k_{cat}/K_m (M⁻¹ s⁻¹), se expresan en forma logarítmica.

Condición	Patrones de intersección de los datos de velocidad inicial 1/v vs. 1/v vs. 1/PEP 1/ADP-Mg ²⁺		Mecanismo Cinético	V_{max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	K_m PEP (mM)	K_m ADP-Mg ²⁺ (mM)	k_{cat} s ⁻¹	log k_{cat}/K_m PEP	log k_{cat}/K_m ADP-Mg ²⁺
WT-PK 100% H ₂ O sin K ⁺	Intersecta a la izquierda del eje 1/v y por arriba del eje 1/S	Intersecta sobre el eje 1/v y por arriba del eje 1/S	Ordenado Equilibrio Rápido	0.8 ±0.04	0.61 ±0.07	14.1 ±1.7	3.2	3.71	2.35
WT-PK 100% H ₂ O con K ⁺	Intersecta a la izquierda del eje 1/v y sobre el eje 1/S	Intersecta a la izquierda del eje 1/v y sobre el eje 1/S	Al Azar Equilibrio Rápido	299 ±11	0.13 ±0.007	2.3 ±0.1	1182	6.96	5.70
WT-PK 40% DMSO sin K ⁺	Intersecta a la izquierda del eje 1/v y sobre el eje 1/S	Intersecta a la izquierda del eje 1/v y sobre el eje 1/S	Al Azar Equilibrio Rápido	25 ±1	0.06 ±0.006	1.4 ±0.1	98	6.21	4.85
E117K-PK 100% H ₂ O sin K ⁺	Intersecta a la izquierda del eje 1/v y sobre el eje 1/S	Intersecta a la izquierda del eje 1/v y sobre el eje 1/S	Al Azar Equilibrio Rápido	41 ±2	0.24 ±0.016	2.0 ±0.1	161	5.83	4.90

Estudios de velocidad inicial de la PK silvestre en 40% de DMSO y de la PK-E117K en medio acuoso.

La dependencia de K^+ de la piruvato cinasa silvestre puede ser modificada al cambiar las propiedades del solvente que rodea a la enzima o al alterar algunos residuos de la proteína (Ramírez-Silva y cols. 1991, Laughlin y Reed 1997). En mezclas binarias agua-DMSO sin K^+ , la actividad de la piruvato cinasa silvestre es 1000 veces mayor que en medio acuoso sin K^+ , 20 vs. $0.02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente (Ramírez-Silva y cols. 1991). Estudios cinéticos y espectroscópicos han mostrado que la conformación de la piruvato cinasa sin K^+ en 40% de DMSO es similar a la que presenta la enzima en medio acuoso con K^+ (Ramírez-Silva y cols. 1993).

De igual manera, se ha demostrado que la piruvato cinasa de varios microorganismos no requiere K^+ para la catálisis (Busto y cols. 1988, Jetten y cols. 1994, Steiner y cols. 1998, Johnsen y cols. 2003, Malcovati y Valentín. 1982). A este respecto, Laughlin y Reed (1997) compararon la secuencia de la piruvato cinasa silvestre con las secuencias de dos piruvato cinasas bacterianas independientes de K^+ . Los autores encontraron que en la posición del Glu117 de la enzima de músculo hay una Lys en las enzimas bacterianas. Con estos antecedentes, ellos cambiaron el Glu117 de la piruvato cinasa de músculo de conejo por una Lys y encontraron que la mutante E117K exhibe una actividad independiente de K^+ de $30 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína y que no es activable por K^+ . Los autores sugieren que la lisina provee una carga interna positiva que sustituye al catión monovalente exógeno.

Así pues, se decidió realizar los experimentos de velocidad inicial en ausencia de K^+ en la piruvato cinasa silvestre en 40% de DMSO y en la mutante E117K en 100% de agua (Figura 3). En ambos casos, los gráficos de doble recíprocos fueron idénticos a los obtenidos en la enzima silvestre en 100% de agua con K^+ , por lo que los datos fueron ajustados globalmente a la ecuación que describe un mecanismo cinético al azar en

equilibrio rápido. Las constantes cinéticas que se derivaron del ajuste se muestran en la Tabla I. En ausencia de K^+ , las V_{max} de la piruvato cinasa silvestre en 40% de DMSO y de la E117K en 100% de agua fueron 30 (25 vs. $0.8 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína) y 50 veces (41 vs. $0.8 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ de proteína) más altas que la V_{max} de la piruvato cinasa silvestre en 100% de agua sin K^+ . En los datos de la Tabla I es relevante notar que los valores de K_m y de eficiencia catalítica para la piruvato cinasa silvestre con K^+ en 100% de agua, en 40 % de DMSO sin K^+ y los de la PK-E117K en 100% de agua sin K^+ son similares, y drásticamente diferentes de los de la piruvato cinasa silvestre en 100% de agua sin K^+ ; es decir, la K_m para el ADP-Mg^{2+} en la piruvato cinasa silvestre sin K^+ es 14.1 mM, mientras que en las otras tres condiciones es de alrededor de 2 mM. Asimismo, la k_{cat}/K_m es más de dos órdenes de magnitud menor para la enzima sin K^+ comparada con cualquiera de las otras tres condiciones experimentales. En su conjunto, estos datos indican que las características del sitio activo en DMSO o en la mutante presentan semejanzas con el de la enzima en presencia de K^+ . De hecho, se ha demostrado que sin K^+ , un medio con 40% de DMSO induce la conformación activa de la piruvato cinasa (Ramírez-Silva y cols. 2001).

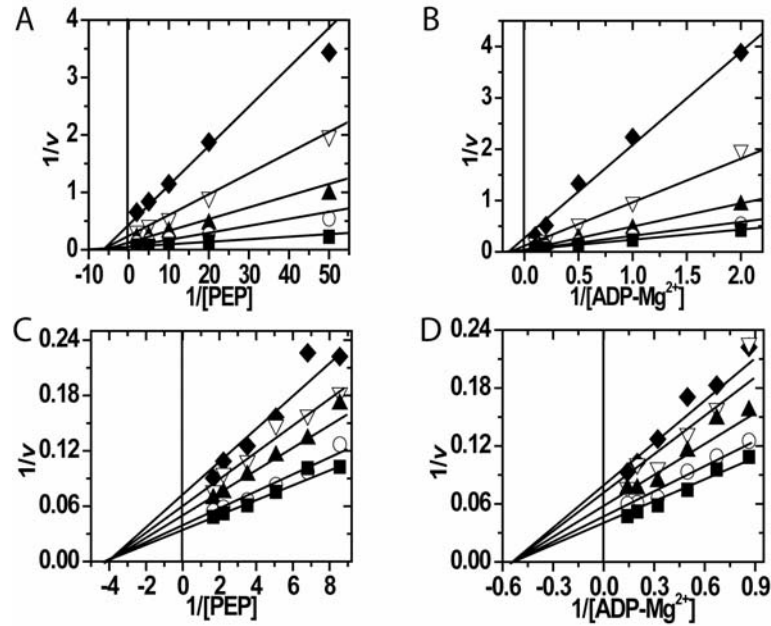


Figura 3. Gráficos de dobles recíprocos de los datos de velocidad inicial en ausencia de K^+ de la PK silvestre en 40% de DMSO (A y B) y de la PK-E117K en 100% de agua (C y D). Las condiciones experimentales fueron iguales a las de la Figura 1, excepto que en A y B la concentración de DHL se elevó hasta 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para sobrepasar el efecto inhibitorio del DMSO. Las concentraciones fijas variables del ADP-Mg^{2+} de los gráficos A y C fueron 0.5 (\blacklozenge), 1.0 (∇), 2.0 (\blacktriangle), 5.0 (\circ), 10 mM (\blacksquare) y 1.16 (\blacklozenge), 1.49 (∇), 2.0 (\blacktriangle), 3.11 (\circ), 5.01 mM (\blacksquare), respectivamente. Las concentraciones fijas variables de PEP de las gráficas B y D fueron 0.02 (\blacklozenge), 0.05 (∇), 0.1 (\blacktriangle), 0.2 (\circ), 0.5 mM (\blacksquare) y 0.12 (\blacklozenge), 0.15 (∇), 0.2 (\blacktriangle), 0.28 (\circ), 0.45 mM (\blacksquare), respectivamente. La reacción se inició con la adición de la PK. Las concentraciones de PK utilizadas variaron entre 2.4 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en DMSO y entre 1.1 y 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los ensayos con la mutante, respectivamente.

Estudios de inhibición sin salida

Los estudios de inhibición sin salida son herramientas poderosas para determinar el mecanismo cinético de las enzimas (Cleland 1970). En el presente estudio utilizamos oxalato y ADP-Cr^{2+} como análogos sin salida del PEP (Reed y Morgan 1974) y del ADP-Mg^{2+} (Gupta y Benovic 1978) respectivamente (Figura 4). En ausencia de K^+ los patrones de inhibición del oxalato *versus* PEP o ADP fueron competitivos y no competitivos, respectivamente. Con ADP-Cr^{2+} la inhibición fue acompetitiva y competitiva con PEP y ADP-Mg^{2+} , respectivamente. Con K^+ los patrones de inhibición por oxalato fueron competitivo y no competitivo respectivamente, mientras que con ADP-Cr^{2+} la inhibición fue

no competitiva y competitiva con respecto al PEP y al ADP-Mg²⁺. En todos los casos, los regráficos de las pendientes e interceptos *versus* la concentración de inhibidor fueron lineales, indicando inhibiciones simples (no se muestra). Los datos fueron ajustados globalmente a las ecuaciones que describen la inhibición competitiva lineal, inhibición no-competitiva lineal, inhibición mixta lineal o inhibición acompetitiva lineal. Los patrones de inhibición obtenidos y las constantes de inhibición calculadas se muestran en la Tabla II.

En su conjunto, los datos muestran que independientemente del K⁺, el oxalato es un inhibidor competitivo del PEP, al igual que el ADP-Cr²⁺ es un inhibidor competitivo del ADP-Mg²⁺. Esto indica que los análogos y los sustratos comparten el mismo sitio de unión. Con o sin K⁺ el oxalato es un inhibidor no competitivo del ADP-Mg²⁺, por lo que puede concluirse que el oxalato forma un complejo ternario no-productivo, disminuyendo la V_{max} sin alterar la unión del ADP-Mg²⁺. El mismo argumento aplica para el ADP-Cr²⁺ con respecto al PEP en presencia de K⁺. Mientras que en ausencia de K⁺, el patrón de inhibición por el ADP-Cr²⁺ con respecto al PEP fue acompetitivo, indicando que el ADP-Cr²⁺ se une exclusivamente al complejo binario enzima-PEP. El patrón acompetitivo confirma los datos de la Figura 1 y la Tabla I que muestran que en ausencia de K⁺, la piruvato cinasa silvestre sigue un mecanismo secuencial ordenado en equilibrio rápido. En contraste, los datos en presencia de K⁺ confirman reportes previos (Reynard y cols. 1961, Mildvan y Cohn 1966, Aisnworth y Macfarlane 1973) que muestran que el mecanismo cinético de la piruvato cinasa silvestre involucra un mecanismo al azar en equilibrio rápido.

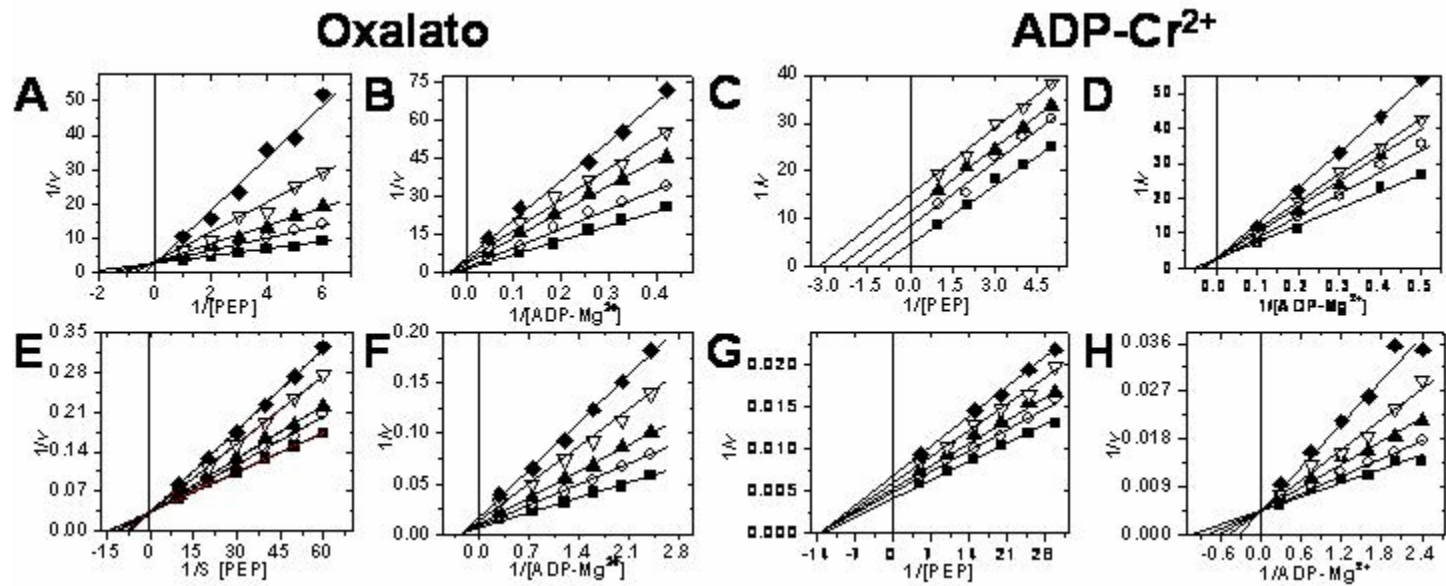


Figura 4. Patrones de inhibición sin salida de la PK silvestre en la ausencia (A-D) o en la presencia de 90 mM de K⁺ (E-H) con oxalato y ADP-Cr²⁺ en 100 % de agua. Las condiciones experimentales fueron como en la Figura 1, excepto que los experimentos con oxalato se realizaron con 120 µg/mL de LDH para compensar el efecto inhibitorio del oxalato sobre la LDH. Las concentraciones de oxalato fueron (A) ■, sin oxalato; ○, 50 µM; ▲, 100 µM; ▽, 200 µM; y ◆, 360 µM. (B) ■, sin oxalato; ○, 60 µM; ▲, 120 µM; ▽, 160 µM; y ◆, 240 µM. (E) ■, sin oxalato; ○, 5 µM; ▲, 10 µM; ▽, 20 µM; y ◆, 30 µM. (F) ■, sin oxalato; ○, 10 µM; ▲, 20 µM; ▽, 40 µM; y ◆, 60 µM. Las concentraciones de ADP-Cr²⁺ fueron (C) ■, sin ADP-Cr²⁺; ○, 0.75 mM, ▲, 1.25 mM; y ▽, 2.0 mM. (D) ■, sin ADP-Cr²⁺; ○, 0.75 mM; ▲, 1.25 mM; ▽, 2.0 mM; y ◆, 2.5 mM. (G) ■, sin ADP-Cr²⁺; ○, 0.75 mM; ▲, 1.25 mM; ▽, 2.0 mM; y ◆, 3.0 mM. (H) ■, sin ADP-Cr²⁺; ○, 0.5 mM; ▲, 1.0 mM; ▽, 2.0 mM; y ◆, 3.0 mM. La reacción se inició con la adición de PK. Las concentraciones de PK utilizadas variaron entre 10 y 110 µg/mL en los experimentos sin K⁺ y entre 0.1 y 0.5 µg/mL cuando los ensayos incluyeron K⁺, respectivamente.

Los patrones de inhibición en ausencia de K^+ de la piruvato cinasa silvestre en 40% de DMSO y de la mutante E117K en 100% de agua siguen los mismos patrones de la piruvato cinasa silvestre con K^+ , excepto por el patrón mixto con $\alpha < 1$ que se observó en la inhibición de oxalato *versus* ADP-Mg²⁺ (Figura 5). Esta diferencia indica que el complejo binario enzima-oxalato tiene una mayor afinidad por el ADP-Mg²⁺ que la enzima libre. De esta manera, los datos con los inhibidores sin salida indican que en ausencia de K^+ , la piruvato cinasa silvestre en 40% de DMSO o la PK-E117K en 100% de agua siguen un mecanismo cinético secuencial al azar en equilibrio rápido. Las constantes cinéticas derivadas de los ajustes globales de estos datos se muestran en la Tabla II.

Los datos de las Tablas I y II muestran que el K^+ incrementa la afinidad de la enzima por los inhibidores y los sustratos. Cabe mencionar que en la mutante E117K o en la enzima silvestre en 40% de DMSO la afinidad de los inhibidores es mayor que en la piruvato cinasa silvestre en 100% de agua con K^+ (Tabla II). A este respecto, es relevante mencionar que Reed y Morgan (1974) reportaron que el oxalato es un análogo del estado de transición. Nuestros datos muestran que el sitio activo de la enzima en 40% de DMSO o en la mutante E117K está en una conformación que permite alcanzar el estado de transición más fácilmente. De hecho, en nuestro laboratorio se ha descrito que la inclusión de 40% de DMSO induce rearrreglos estructurales en la piruvato cinasa silvestre que favorecen la partición de los sustratos y los cationes al sitio activo (Ramírez-Silva y cols. 2001, Ramírez-Silva y Oria-Hernández 2003). En suma, la disminución de las constantes de inhibición de los inhibidores sin salida, la mayor afinidad por los sustratos y la elevada eficiencia catalítica en ausencia de K^+ de la piruvato cinasa silvestre en 40% de DMSO y de la PK-E117K indican que en estas condiciones la enzima está en una conformación propensa para unir a los sustratos y realizar catálisis.

Tabla II. Patrones de inhibición sin salida y constantes de inhibición para el oxalato y el ADP-Cr²⁺ en la PK silvestre y en la E117K. Los patrones de inhibición se tomaron de los gráficos de dobles recíprocos mostrados en las figuras 4 y 5. Los patrones de inhibición simple se confirmaron de los regráficos lineales de las pendientes o interceptos *versus* las concentraciones de inhibidor (no se muestra). Las constantes de inhibición se calcularon a partir del ajuste global de los datos a las ecuaciones correspondientes de la inhibición competitiva lineal (C) $v = V[S] / (K_m(1 + [I] / K_i) + [S])$, inhibición acompetitiva lineal (U) $v = V[S] / (K_m + [S](1 + [I] / K_i))$, inhibición no competitiva lineal (NC) o inhibición mixta lineal (MT) $v = V[S] / (K_m(1 + [I] / K_i) + [S](1 + [I] / \alpha K_i))$ donde $\alpha=1$ y $\alpha \neq 1$ para NC y MT, respectivamente. K_i es la constante de inhibición.

	Análogo sin salida PEP Oxalato		Análogo sin salida ADP-Mg ²⁺ ADP-Cr ²⁺		K_i (μM)	K_i (mM)
	1/v vs. 1/PEP ADP-Mg ²⁺ Fijo	1/v vs. 1/ADP-Mg ²⁺ PEP Fijo	1/v vs. 1/PEP ADP-Mg ²⁺ Fijo	1/v vs. 1/ADP-Mg ²⁺ PEP Fijo	Oxalato	ADP-Cr ²⁺
WT-PK 100% H ₂ O con K ⁺	C	NC	NC	C	28.67	1.25
WT-PK 100% H ₂ O sin K ⁺	C	NC	U	C	77.14	2.76
E117K-PK 100% H ₂ O sin K ⁺	C	MT	NC	C	4.80	1.93
WT-PK 40% DMSO sin K ⁺	C	NC	NC	C	2.41	0.45

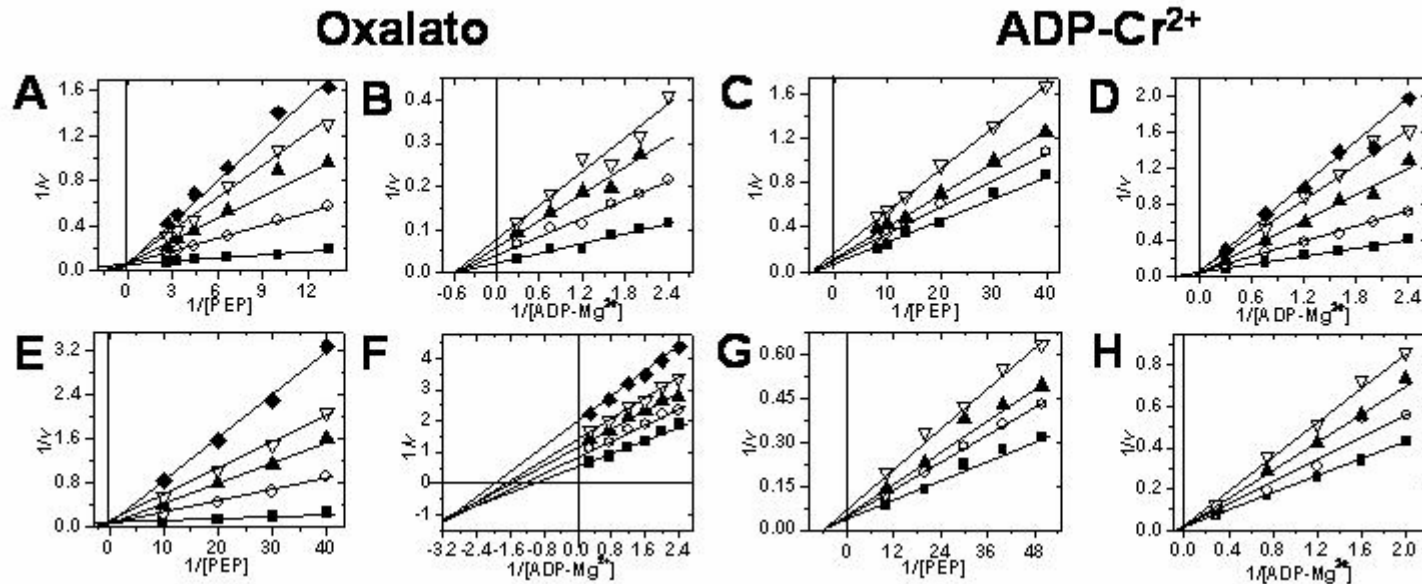


Figura 5. Patrones de inhibición sin salida en ausencia de K^+ en 40% de DMSO (A-D) y en la PK-E117K en 100% de agua (E-H) con oxalato o ADP-Cr²⁺. Las condiciones experimentales fueron como en la Figura 2, excepto que la concentración de piruvato formado en la presencia de oxalato y DMSO se determinó como se describió en Material y Métodos. Las concentraciones de oxalato fueron (A) ■, sin oxalato; ○, 5 μ M; ▲, 10 μ M; ▽, 15 μ M; y ◆, 20 μ M. (B) ■, sin oxalato; ○, 5 μ M; ▲, 10 μ M; y ▽, 15 μ M. (E) ■, sin oxalato; ○, 10 μ M; ▲, 20 μ M; ▽, 30 μ M; y ◆, 50 μ M. (F) ■, sin oxalato; ○, 5 μ M; ▲, 10 μ M; ▽, 20 μ M; y ◆, 30 μ M. Las concentraciones de ADP-Cr²⁺ fueron (C) ■, sin ADP-Cr²⁺; ○, 0.5 mM; ▲, 1.0 mM; y ▽, 1.5 mM. (D) ■, sin ADP-Cr²⁺; ○, 0.5 mM; ▲, 1.0 mM; ▽, 1.5 mM; y ◆, 2.0 mM. (G) ■, sin ADP-Cr²⁺; ○, 1.0 mM; ▲, 1.5 mM; y ▽, 2.0 mM. (H) ■, sin ADP-Cr²⁺; ○, 1.0 mM; ▲, 1.5 μ M; y ▽, 2.0 mM. La reacción se inició con la adición de PK. Las concentraciones de PK utilizadas variaron entre 0.13 y 15 μ g/mL en los experimentos en DMSO y entre 0.1 y 11.3 μ g/mL en los ensayos con la PK-E117K, respectivamente.

En relación al mecanismo a través del que la PK-E117K realiza la catálisis independiente de K^+ , se ha propuesto que la carga positiva de la lisina provee un catión monovalente interno (Laughlin y Reed 1997). Este mecanismo no puede explicar la actividad independiente de K^+ observada en DMSO, ni la actividad independiente de K^+ de las enzimas que presentan una serina en la posición 117, donde no existe el donador de la carga positiva. Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos observado que en 40% de DMSO, la piruvato cinasa silvestre exhibe una conformación similar a la observada en medio acuoso con K^+ (Ramírez-Silva y cols. 2001), lo que sugiere que la conformación global de la enzima contribuye a la expresión de la catálisis.

El Efecto del K^+ y los ligandos sobre la estructura de la piruvato cinasa.

La mayor relevancia de nuestros datos es que el K^+ cambia el mecanismo cinético de la piruvato cinasa de ordenado a aleatorio; es probable que el cambio cinético esté relacionado con diferentes rearrreglos estructurales de la enzima. En este sentido, estudios cristalográficos de la piruvato cinasa silvestre muestran que la enzima adquiere diferentes conformaciones dependiendo de la ocupación del sitio activo por distintos ligandos. Con piruvato o análogos del PEP la tapa del sitio activo se encuentra abierta o parcialmente cerrada. Mientras que en presencia de análogos del PEP y ATP- Mg^{2+} la tapa se encuentra totalmente cerrada (Figura 6).

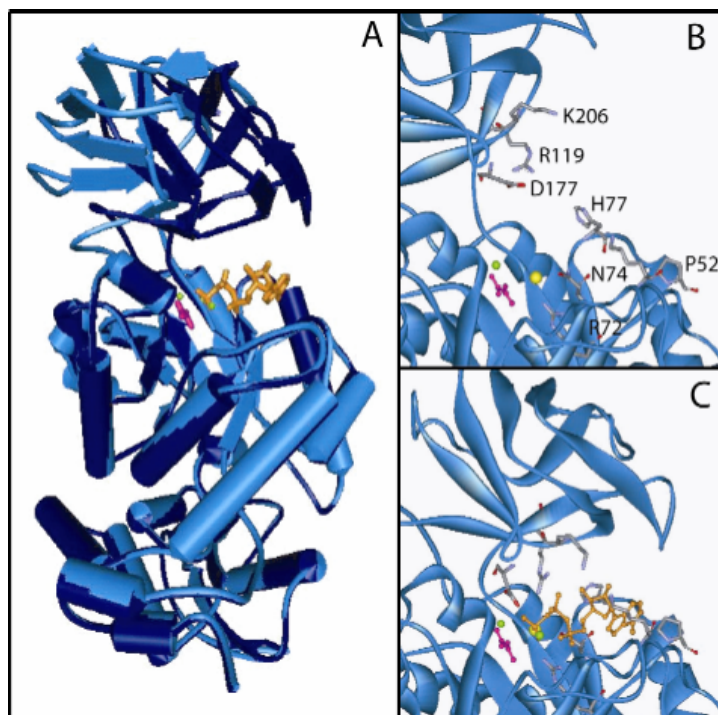


Figura 6. Representación en listones de las conformaciones abierta y cerrada de la piruvato cinasa. El panel A muestra la sobreposición de los conformeros abierto (azul claro) y cerrado (azul oscuro), que ilustra el movimiento del dominio B sobre el dominio A. Los ligandos del sitio activo se muestran en modelos de varas y esferas. Los paneles de la derecha muestran el sitio activo en la conformación abierta (B) y cerrada (C). En (B) los residuos implicados en la unión del ATP se indican e ilustran como modelos de varas. El Panel (C) muestra el posicionamiento de los residuos del dominio B que coordinan al ATP-Mg²⁺. En todos los casos los sustratos se muestran como modelos de varas y esferas, el oxalato se muestra en violeta, el Mg²⁺ en verde, el K⁺ en amarillo y el ATP en naranja.

Con el fin de correlacionar la unión de ligandos al sitio activo con cambios estructurales en la piruvato cinasa determinamos el centro espectral de masa (CEM) y la anisotropía de la fluorescencia intrínseca de la piruvato cinasa silvestre en presencia y en ausencia de K⁺ y con los ligandos indicados en la Tabla III. La piruvato cinasa tiene tres residuos de triptofano por monómero, dos en el dominio C y uno en el dominio B (Figura 7). (Larsen y cols. 1994). En todas las estructuras resueltas hasta el momento, el esqueleto de los dominios A y C permanece inalterable en las conformaciones abierta, cerrada o semi-cerrada, mientras que el dominio B es altamente móvil con una diferencia de 40° entre las conformaciones abierta y cerrada (Figura 6C). Es muy probable que el triptofano 157 del

dominio B actúe como sonda de la anisotropía de la fluorescencia como respuesta a la adición de ligandos y reporte el movimiento del dominio B.



Figura 7. Sobreposición de los conformeros abierto (azul claro) y cerrado (azul oscuro) que muestra la posición de los residuos de triptofano en los dominios B y C. Los triptofanos del conformero abierto se muestran en color magenta mientras que los de la subunidad cerrada se muestran en verde.

Los resultados muestran que el oxalato, el K^+ , el Mg^{2+} y el $ATP-Mg^{2+}$ inducen el corrimiento al azul tanto del λ_{max} como del CEM de la piruvato cinasa. La transición de la conformación abierta a la cerrada se indujo gradualmente con la adición secuencial de los diferentes ligandos, (Tabla III). En correspondencia con los datos cristalográficos, la adición de oxalato y Mg^{2+} induce una primera transición, la adición subsecuente de K^+ induce un corrimiento adicional que corresponde a la estructura del sitio activo parcialmente cerrado (Larsen y cols. 1997, Larsen y cols. 1998). Un corrimiento adicional

se indujo por la adición del ATP-Mg²⁺, que corresponde a la conformación totalmente cerrada de la enzima (Larsen y cols. 1998).

La anisotropía de la fluorescencia intrínseca de las mismas muestras se registraron al λ_{\max} de cada muestra (Tabla III). En concordancia con los datos de λ_{\max} y CEM, los ligandos inducen cambios graduales en los valores de anisotropía. Este resultado indica que los ligandos inducen gradualmente una menor movilidad de los residuos de triptofano en la piruvato cinasa hasta que se alcanza la conformación compacta, completamente cerrada del sitio activo (con ATP-Mg²⁺). Los datos globales de fluorescencia indican que la ocupación del sitio activo y el movimiento del dominio B están íntimamente relacionados.

Tabla III. λ_{\max} , centro espectral de masa y anisotropía de fluorescencia intrínseca de la piruvato cinasa silvestre. Los estudios de fluorescencia se realizaron a 25°C en mezclas que contenían 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de piruvato cinasa en Tris-HCl 25 mM pH 7.6. Según se indica en la tabla, el medio contenía Tris-HCl 25 mM pH 7.6 y (CH₃)NCl 100 mM, en ausencia o presencia de oxalato 1 mM, ATP 3 mM y MgCl₂ 3 mM. Donde se indica la presencia de K⁺, 90 mM del catión sustituían al (CH₃)NCl. Los centros espectrales de masa (CEM), o longitud de onda de emisión promedio se calcularon como $\lambda_{\text{av}} = \sum \lambda I(\lambda) / \sum I(\lambda)$ donde λ y $I(\lambda)$ son la longitud de onda (en nm) y la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda determinada, respectivamente. La determinación de la anisotropía (r) se realizó a la longitud de onda de máxima emisión de cada muestra, calculándose como $r = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2F_{\perp})$, donde F_{\parallel} es la intensidad de fluorescencia paralela al plano de excitación y F_{\perp} es la intensidad de fluorescencia perpendicular al plano de excitación.

	λ_{\max} nm	CEM (nm)	r
PK	334.4	348.1 ±23.6	0.1087 ±0.0023
PK-Mg ²⁺ -oxalato	331.6	346.5 ±25.5	0.1468 ±0.0024
PK-Mg ²⁺ -oxalato- K ⁺	330.8	346.5 ±25.6	0.1489 ±0.0023
PK-Mg ²⁺ -oxalato- ATP	330.9	345.8 ±24.6	0.1591 ±0.0025
PK-Mg ²⁺ -oxalato- ATP-K ⁺	330.5	345.0 ±23.2	0.1682 ±0.0028

El papel del K⁺ sobre la estructura y la cinética de la piruvato cinasa.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que el K⁺ induce un cambio en el mecanismo cinético de la piruvato cinasa de ordenado a aleatorio. Con el fin de definir la dependencia del K⁺ en la cinética y la estructura de la piruvato cinasa, examinamos la estructura cristalográfica de la enzima. Cada subunidad del tetrámero de la piruvato cinasa está formada por cuatro dominios estructurales: el dominio N-terminal, y los dominios A, B y C, (Figura 1A). El sitio activo se encuentra en una hendidura formada por los dominios A y B; la rotación del dominio B sobre el dominio A cierra la hendidura del sitio activo (Figura 6A) (Larsen y cols. 1994, Larsen y cols. 1997, Larsen y cols. 1998). El movimiento entre los dominios depende de la ocupación del sitio activo. En la ausencia de ligandos, el dominio B está en la conformación abierta y es muy móvil. La unión de K⁺, Mg²⁺ y análogos del PEP al sitio activo resulta en una conformación abierta o parcialmente cerrada (Larsen y cols. 1994, Larsen y cols. 1997). La adición subsecuente de ATP-Mg²⁺ lleva a la enzima a la conformación totalmente cerrada (Larsen y cols. 1998). Estos datos concuerdan con los resultados de fluorescencia obtenidos en este trabajo que muestran que la adición sucesiva de ligandos cierra gradualmente el sitio activo. Estos datos coinciden con los de la estructura cristalográfica obtenida en presencia de oxalato, Mg²⁺, K⁺ y ATP-Mg²⁺ (Larsen y cols. 1998). Los cristales obtenidos pertenecen al grupo espacial P212121; las dimensiones de la celda unitaria son de a) 95.3 Å, b) 216.5 Å, y c) 258.6 Å. La unidad asimétrica de este cristal contiene dos tetrámeros, dos de las ocho subunidades contienen oxalato, Mg²⁺ y K⁺, mientras que las otras seis contienen también ATP-Mg²⁺. Las subunidades sin nucleótido tienen el sitio activo abierto, mientras que cinco de las subunidades con ATP-Mg²⁺ se encuentran en la conformación cerrada con un ángulo de rotación de 41° con respecto a las subunidades abiertas. Cuando el nucleótido está presente, los residuos R119, K206 y D177 se mueven 6.8, 10.4 y 6.8 Å respectivamente desde su posición en la conformación abierta para

establecer contacto con el ATP-Mg²⁺ en la conformación cerrada (Figura 6 B y C). Esto indica que el sitio de unión del ATP-Mg²⁺ se encuentra estructurado sólo después de que el sitio activo se ha cerrado.

Los estudios estructurales que hemos realizado no han dado información mecanística concluyente sobre la influencia del K⁺ sobre el arreglo estructural de la piruvato cinasa. Sin embargo, nuestros datos cinéticos muestran que el K⁺ aumenta las constantes de afinidad del ADP-Mg²⁺, oxalato y el ADP-Cr²⁺, aun cuando estos ligandos no establecen una coordinación directa con el K⁺ (Larsen y cols. 1997, Larsen y cols. 1998). Esto implica que el K⁺ no sólo aumenta la unión de los sustratos a través de la coordinación con el oxígeno del fosforilo del PEP o del ATP, sino que rearregla la totalidad de la cavidad del sitio activo. Nuestros datos indican que el K⁺ induce el rearreglo geométrico correcto de los residuos del sitio activo. Además, el efecto del K⁺ sobre la conformación del sitio activo está ilustrado por la influencia del catión sobre la unión del ADP-Mg²⁺. Con K⁺ el ADP-Mg²⁺ se une a la enzima independientemente de la presencia de PEP, mientras que en ausencia de K⁺ el ADP-Mg²⁺ sólo se une a la enzima después de que el PEP se ha unido. Dado que el sitio de unión del ADP-Mg²⁺ se forma después de que el dominio B ha rotado sobre el dominio A (Figura 6), nuestros datos sugieren que el K⁺, el PEP o ambos contribuyen al descenso del dominio B. Respecto a este punto, es relevante mencionar que dos de los residuos de unión al K⁺, los residuos D112 y T113 se encuentran localizados al principio de la región de la bisagra que une los dominios A y B.

Con respecto al efecto del K⁺ sobre el mecanismo cinético de la PK es relevante mencionar otro caso reportado anteriormente. La enzima inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa de *Aerobacter aerogenes* es una enzima activada por K⁺. En ausencia de K⁺ la enzima sigue un mecanismo ordenado con la inosina monofosfato y el NAD⁺ como el primer y segundo sustrato, respectivamente, mientras que en presencia de K⁺ el mecanismo es al azar (Heyde y cols. 1976, Heyde y Morrison 1976). Los autores de este

trabajo sugieren que el K^+ induce un cambio conformacional que permite la unión del NAD^+ . Estudios cinéticos y estructurales posteriores apoyan la idea de que el K^+ induce cambios conformacionales que permiten la unión del NAD^+ (Markham y cols. 1999, Kerr y cols. 2000, Prosser y cols. 2002).

En conclusión, los datos cinéticos obtenidos muestran que el papel del K^+ como un activador esencial de la piruvato cinasa no se encuentra limitado a la coordinación del grupo fosfato del PEP o del ATP como se ha sugerido a partir de los datos cristalográficos. Nuestros datos muestran que en ausencia de K^+ , el $ADP-Mg^{2+}$ no puede unirse a la enzima hasta que el PEP rearregla su sitio de unión (mecanismo ordenado con PEP como el primer sustrato). Por otro lado, en presencia de K^+ se induce la conformación cerrada de la enzima permitiendo que el PEP o el $ADP-Mg^{2+}$ se unan independientemente (mecanismo al azar). En suma, es posible que el K^+ se encuentre directamente involucrado en el movimiento del dominio B y en la adquisición de la conformación activa de la PK.

Sección 2

Análisis filogenético de la dependencia de K⁺ en la piruvato cinasa

Históricamente, el requerimiento de K⁺ de la piruvato cinasa se consideró una característica universal de la enzima, dado que las primeras preparaciones caracterizadas poseían esta particularidad. Sin embargo, con el paso del tiempo fueron caracterizadas nueve piruvato cinasas que no requieren catión monovalente para la catálisis, como las enzimas presentes en *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Zymomonas mobilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Azotobacter vinelandi*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix*, y *Pyrobaculum aerophilum*. Una característica común que comparten estas enzimas que tienen actividad independiente de K⁺ es el hecho de que poseen lisina (6), arginina (2) o serina (1) en la posición 117, en lugar del glutámico presente en las enzimas dependientes de K⁺. Esta observación fue hecha por el grupo de Reed (Laughlin y Reed 1997) quienes demostraron que la sustitución del glutámico 117 por lisina en la enzima de músculo de conejo fue suficiente para convertir esta enzima en independiente de K⁺.

Así pues, con el objeto de descifrar que tan extendida es la sustitución del Glu por Lys en las secuencias reportadas hasta el momento y comprender si el papel activador del K⁺ está relacionado con la historia evolutiva, procedimos a realizar un análisis filogenético exhaustivo de la piruvato cinasa. El residuo 117 se encuentra a 4.5 Å de distancia del sitio de unión del K⁺ y es vecino de la Pro 116, aminoácido central de la región bisagra que abre o cierra la tapa formada por el dominio B que cae sobre el dominio A durante el ciclo catalítico de la enzima. Es importante señalar que hasta el momento el análisis filogenético más completo que se ha realizado con la piruvato cinasa fue utilizando de 50 secuencias de proteínas (Schramm y cols. 2000).

Con este fin, realizamos una búsqueda iterativa y exhaustiva de las secuencias reportadas de piruvato cinasa hasta agosto del 2004 en el National Center for

Biotechnology Information (NCBI) utilizando la herramienta BLASTp: (Protein-Protein BLAST, Basic Local Alignment Search Tool). La búsqueda arrojó 234 secuencias agrupadas de la siguiente manera:

- 68 Eucariontes
 - 27 Animales
 - 10 Protistas
 - 18 Hongos
 - 13 Plantas
- 150 Bacterias
- 16 Arqueas

Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa Clustal X. De las 234 secuencias reportadas 126 presentan Glu en la posición 117, 103 presentan Lys, 2 presentan Ser, 1 Arg y 2 de las secuencias obtenidas de animales no están secuenciadas hasta las regiones mencionadas. Sin embargo dado que todas las enzimas conocidas de animales son dependientes de K^+ , es de suponer que éstas presenten el residuo Glu117. Como se mencionó, el residuo en la posición 117 parece determinar la dependencia de K^+ de la PK. Las enzimas caracterizadas hasta la fecha que presentan Glu en esta posición utilizan K^+ para la catálisis, mientras que las que presentan Lys, Arg y Ser no lo utilizan. Este resultado muestra que de las secuencias identificadas en la base de datos, el 54% de las piruvato cinasas utilizan K^+ mientras que el 46% deben ser independientes del catión. Esto indica que la independencia de K^+ es casi tan frecuente como la dependencia de K^+ , lo que discrepa con lo comúnmente aceptado hasta la fecha.

El análisis filogenético se realizó con el software Mega. De acuerdo con los resultados previamente descritos (Schramm y cols. 2000), el árbol obtenido presenta una topología dicotómica, con dos ramas claramente separadas (Figura 8). Es relevante

señalar que en algunos casos una misma especie presenta tanto la piruvato cinasa que posee Glu 117 como la que presenta Lys 117, por ejemplo en *Vibrio cholerae* o *E. coli*; o bien el mismo grupo de bacterias se encuentra representada en ambas ramas, por ejemplo las gama-proteobacterias. La naturaleza dicotómica del árbol probablemente indica una duplicación génica ancestral, aunque la posibilidad de eventos de transferencia lateral entre los grupos no puede ser descartada.

El resultado más interesante obtenido en este estudio fue que las dos ramas principales que se observan en el árbol correlacionan justamente con la dependencia de K^+ . La rama superior representa a las enzimas dependientes de K^+ mientras que la rama inferior representa a las enzimas que no requieren K^+ para la catálisis. Esto se muestra claramente en la Figura 9: las enzimas dependientes de K^+ , con Glu en la posición 117, se muestran en rojo; mientras que las que presentan Lys y por lo tanto no requieren K^+ se indican en azul. Las enzimas que presentan Ser o Arg se muestran en negro. Este árbol indica que la dependencia de K^+ determina la naturaleza dicotómica del árbol filogenético y que esta característica es determinante en la subdivisión de los dos tipos de enzima. De esta manera, la dependencia de K^+ o el residuo presente en la posición 117 o equivalente permite clasificar a las piruvato cinasa en dos grupos: grupo I o dependientes de K^+ , y grupo II o independientes de K^+ . Esta clasificación parece ser más exacta que la basada en el uso y tipo de activadores alostéricos.

Con el fin de encontrar si otros cambios en las cercanías del sitio activo acompañaban a la mutación en la posición 117, se revisó la secuencia primaria de las proteínas en la vecindad de este residuo (Figura 10). Encontramos una alta correlación entre el residuo que se localiza en la posición 117 y el encontrado en la posición 113. Cuando en la posición 117 se encuentra Glu, en la posición 113 casi siempre existe Thr (en 112 de 125 secuencias); mientras que, cuando en la posición 117 se encuentra Lys, encontramos casi invariablemente Leu en la posición 113 (en 101 de 104 secuencias).

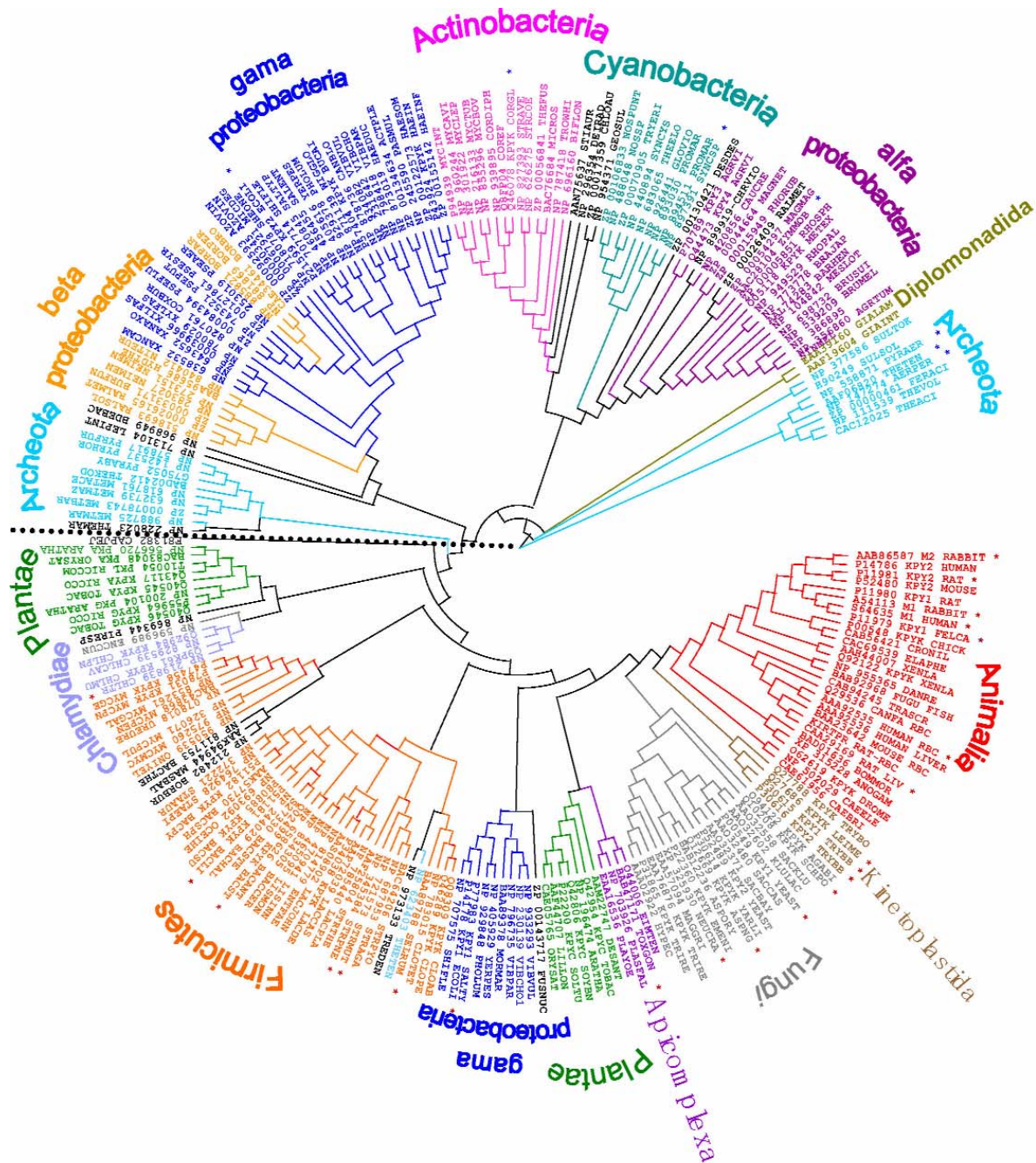


Figura 8. Árbol filogenético de la piruvato cinasa. Cada una de las secuencias utilizadas en el análisis filogenético se identifica por el número de acceso de la secuencia en el NCBI y por el nombre común o una breve descripción del organismo (primeras letras de la especie y la subespecie; ej. CRONIL, *Crocodylus niloticus*). Los nombres indicados en negro corresponden a grupos taxonómicos menores pertenecientes a bacterias. El análisis filogenético se realizó utilizando los métodos de máxima parsimonia, mínima evolución, vecino más próximo y UPGMA. Resultados cualitativamente similares se obtuvieron con los cuatro métodos, pero solo se muestra el árbol generado por máxima parsimonia. Se observa la topología dicotómica del árbol filogenético, la división entre ambos grupos es indicada por la línea punteada. La lista completa de los organismos y los números de acceso de las secuencias utilizadas se muestran en el Apéndice I. Las enzimas caracterizadas bioquímicamente, dependientes e independientes de K⁺, se indican con una estrella roja y azul respectivamente.

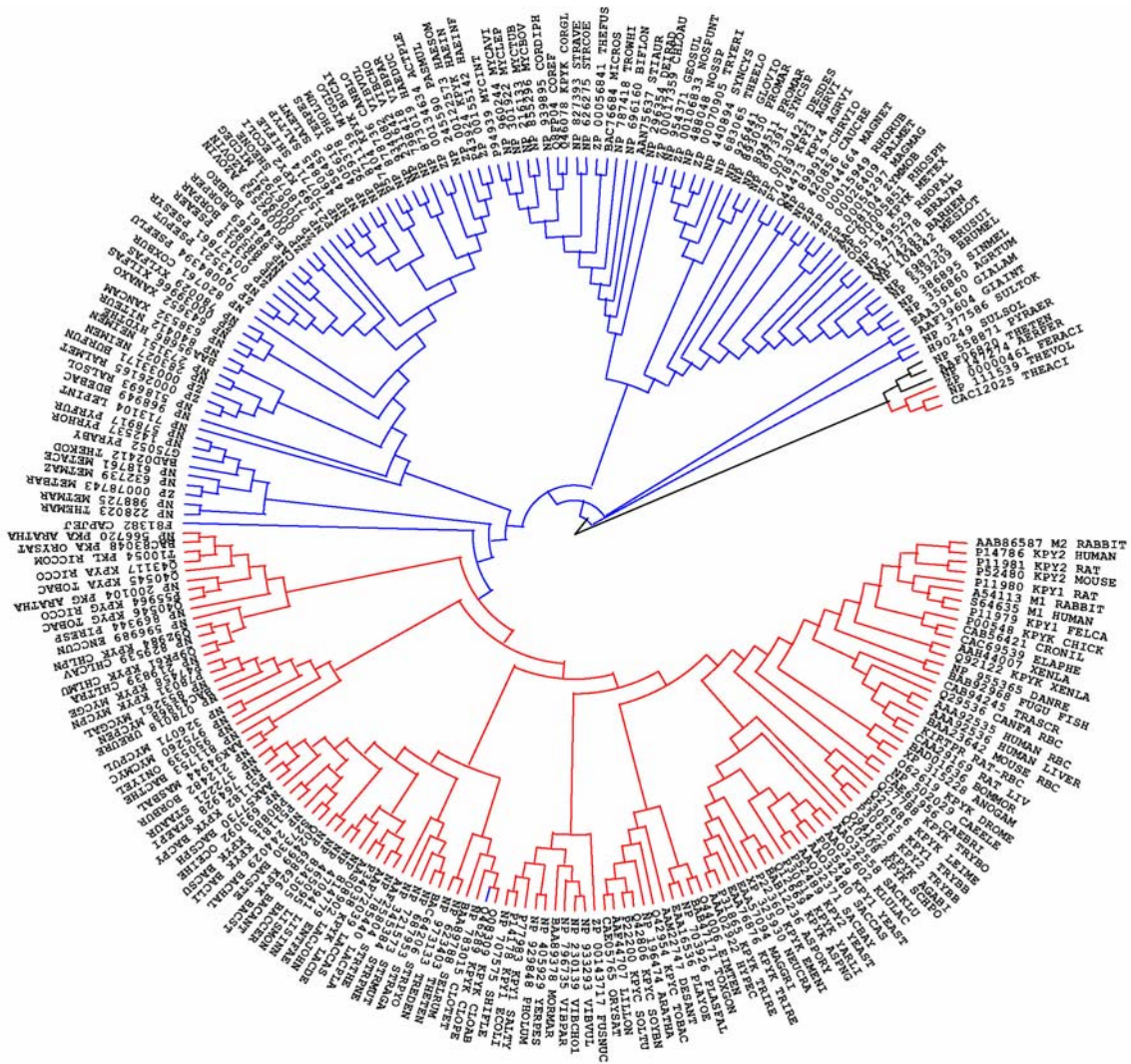


Figura 9. Árbol filogenético de la piruvato cinasa. Análisis de la dependencia de K⁺. Las secuencias que presentan Glu en la posición 117 se muestran en rojo, las que presentan Lys se muestran en azul y las que presentan Ser o Arg se muestran en negro. Se observa la concordancia entre la dependencia o independencia de K⁺ y la división topológica del árbol filogenético.

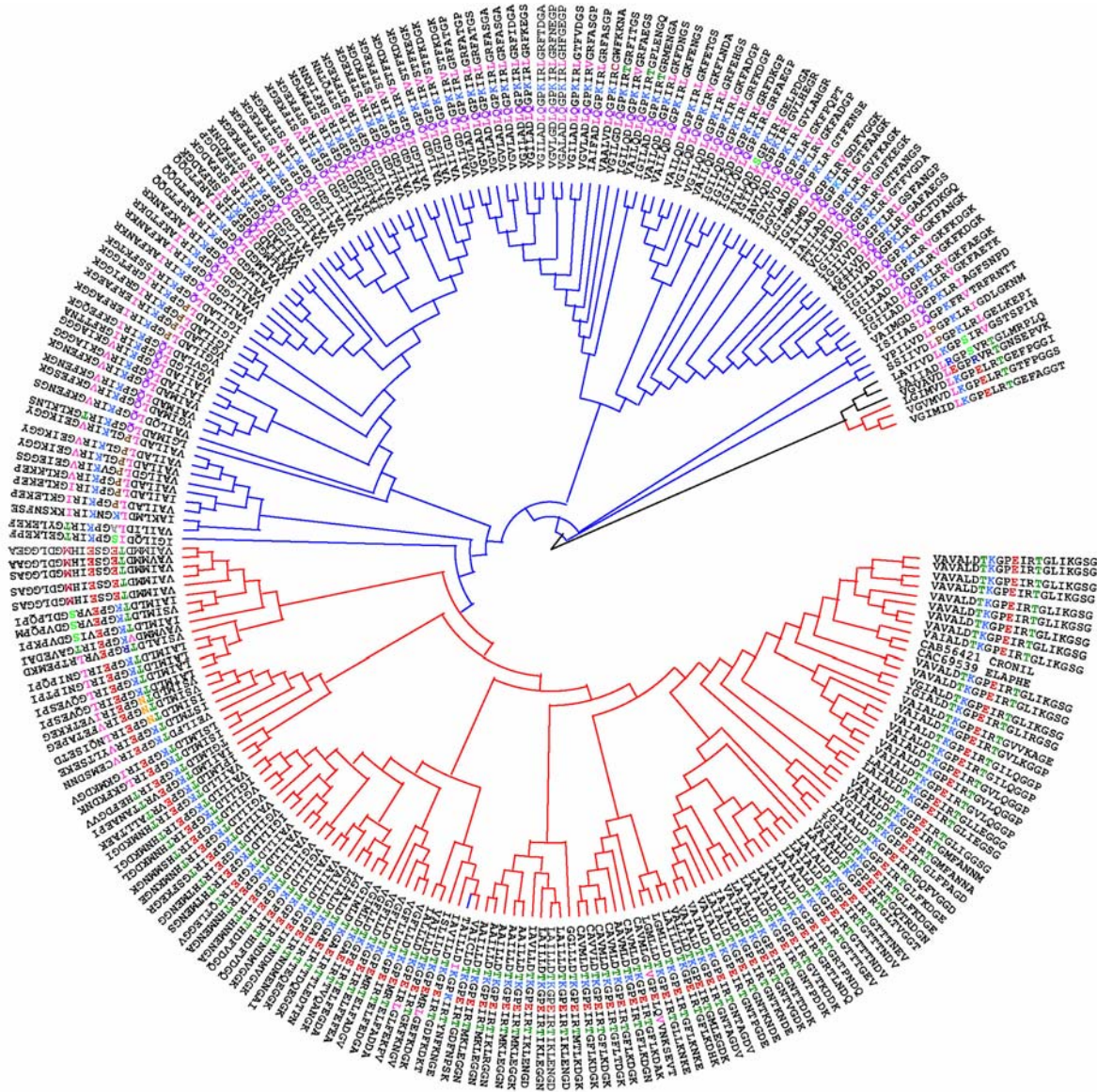


Figura 10. Árbol Filogenético de la piruvato cinasa. Análisis de las covariaciones que acompañan al residuo 117. Se muestra la secuencia de aminoácidos entre los residuos 107 y 127. Los residuos 113, 114, 117 y 120 se resaltan en colores.

Este resultado sugiere que el residuo en la posición 113 debe de estar relacionado con el efecto activador del K^+ o bien, con la independencia de catión monovalente que el otro grupo de enzimas presentan. En este sentido, es importante mencionar que en las enzimas dependientes de K^+ , la Thr 113 es uno de los residuos implicados en la coordinación de unión del catión. Por otro lado, es interesante señalar que en las enzimas independientes de K^+ existe una conservación prácticamente estricta del residuo 113, a pesar de no existir una presión de selección evidente para conservar este residuo invariable. Esto indica que probablemente la Leu 113 contribuya a la expresión de la catálisis en ausencia de K^+ . En apoyo al posible papel de la Leu 113, se ha reportado que las dos piruvato cinasas de arqueas que presentan Ser en la posición 117 y son independientes de K^+ , a pesar de no presentar una carga interna positiva, si presentan Leu en la posición 113. A este respecto, Laughlin y Reed (1997) ya habían evidenciado que una Leu sustituía a la Thr 113 de la enzima de conejo en dos enzimas independientes de K^+ (*E. coli* Tipo II y *C. glutamicum*). Sin embargo, dado que el átomo que coordina al K^+ es el oxígeno del carbonilo de la cadena principal de la Thr, esta sustitución fue ignorada por los autores.

Un patrón de covariación similar al encontrado para las posiciones 113 y 117 se encontró entre los residuos 114 y 117. Cuando Glu está en la posición 117, Lys se encuentra casi siempre en la 114 (en 114 de 125 secuencias), mientras que cuando en la posición 117 existe Lys, en gran parte se encuentra Gln en la posición 114 (en 87 de 104 secuencias); este resultado indica que la covariación entre Lys114 y Glu117 es más fuerte que la encontrada entre Gln114 y Lys117. En relación al residuo 114, Laughlin y Reed (1997) encontraron que en la mutante E117K la presencia de Lys o Gln en esta posición no modificaron las constantes cinéticas de la enzima. Sin embargo, es posible que la influencia de la Gln 114 sobre la actividad independiente de K^+ pueda estar relacionada a

la presencia de Leu113. De hecho, en la naturaleza no se encuentra el par Thr113/Lys117.

Por otro lado, un patrón similar aunque menos estricto al encontrado para las posiciones 113 y 117 se encontró entre el par 117 y 120. Cuando Glu se encuentra en 117 en la posición 120 encontramos Thr (103 de 125 secuencias); con Lys 117 un residuo hidrofóbico se encuentra en la posición 120 (Leu, Val o Ile en 96 de 104 secuencias). Con respecto al residuo 120, ningún papel funcional ha sido asignado a este aminoácido, sin embargo el patrón de conservación encontrado lo hace un atractivo objeto de estudio. En su conjunto, estos datos indican que las secuencias altamente conservadas encontradas, T113/K114/E117/T120 (en 97 de 125 secuencias, 78%) o L113/Q114/K117/(LVI)120 (82 de 104 secuencias, 78%) sugieren que estos residuos pueden estar involucrados en la dependencia o independencia de K^+ , respectivamente.

Finalmente, es relevante hacer notar que además de los dos tipos de secuencias consenso encontradas en los residuos 113, 114, 117 y 120 en las enzimas dependientes (T113/K114/E117/T120) e independientes de K^+ (L113/Q114/K117/(LVI)120), algunas enzimas muestran secuencias intermedias o de transición que interesantemente se encuentren localizadas en gran parte en la zona de transición localizada entre los grupos I y II. Por ejemplo, algunas enzimas presentan la secuencia T113/K114/E117/(LVI)120 (10 casos), mientras que en la isoforma cloroplástica de plantas, se encuentra la secuencia T113/E114/E117/M120 (6 casos); además en algunas bacterias del grupo II se encuentra la secuencia L113/P114/K117/(LVI)120 (14 casos). Es interesante mencionar que los cambios en estas secuencias intermedias casi siempre existen en los residuos 114 y/o 120, indicando que estas posiciones son menos críticas en la dependencia de catión monovalente.

Con el fin de determinar los posibles efectos de las variaciones de los residuos 113, 114, 117 y 120 sobre la piruvato cinasa, la estructura de la enzima se analizó con el

programa DynDom (Lee y cols. 2003). Este programa analiza estructuras proteicas donde existen por lo menos dos conformaciones disponibles y determina dominios móviles, regiones de bisagras, ejes de bisagra y los residuos que forman estas regiones. El análisis de las estructuras cristalográficas disponibles subdivide a la piruvato cinasa en dos dominios móviles, un dominio formado por los dominios estructurales amino, A y C y otro dominio móvil formado por el dominio B (Figura 11). Además, el programa designa como las regiones de bisagra a las secuencias comprendidas entre los residuos 114 a 118 (bisagra 1) y 209 a 224 (bisagra 2). Los residuos 114 y 117 se encuentran en la primera de estas regiones bisagra que unen los dominios móviles. Además, los residuos 113 y 120 se encuentran flanqueando esta región, es decir al inicio y al final de la bisagra, respectivamente. Asimismo, es importante recordar que el residuo 113 es uno de los residuos que une al K^+ en la piruvato cinasa.

Como se discutió en la sección anterior, la evidencia cinética indica que el K^+ está involucrado en el movimiento del dominio B sobre el A; además, el análisis de las secuencias proteicas muestran que los residuos que covarían en las enzimas dependientes e independientes de K^+ se encuentran en o cerca de la región de bisagra. En su conjunto, los análisis filogenéticos y estructurales apoyan la idea de que el K^+ está involucrado en los cambios conformacionales que ocurren en la enzima y que dirigen a la adquisición de la conformación activa. A pesar de no conocer la estructura cristalográfica de las enzimas independientes de K^+ , es posible suponer que el arreglo de los residuos L113/Q114/K117/(LVI)120 sea el responsable de inducir la conformación activa de la enzima, aún en ausencia de catión monovalente.

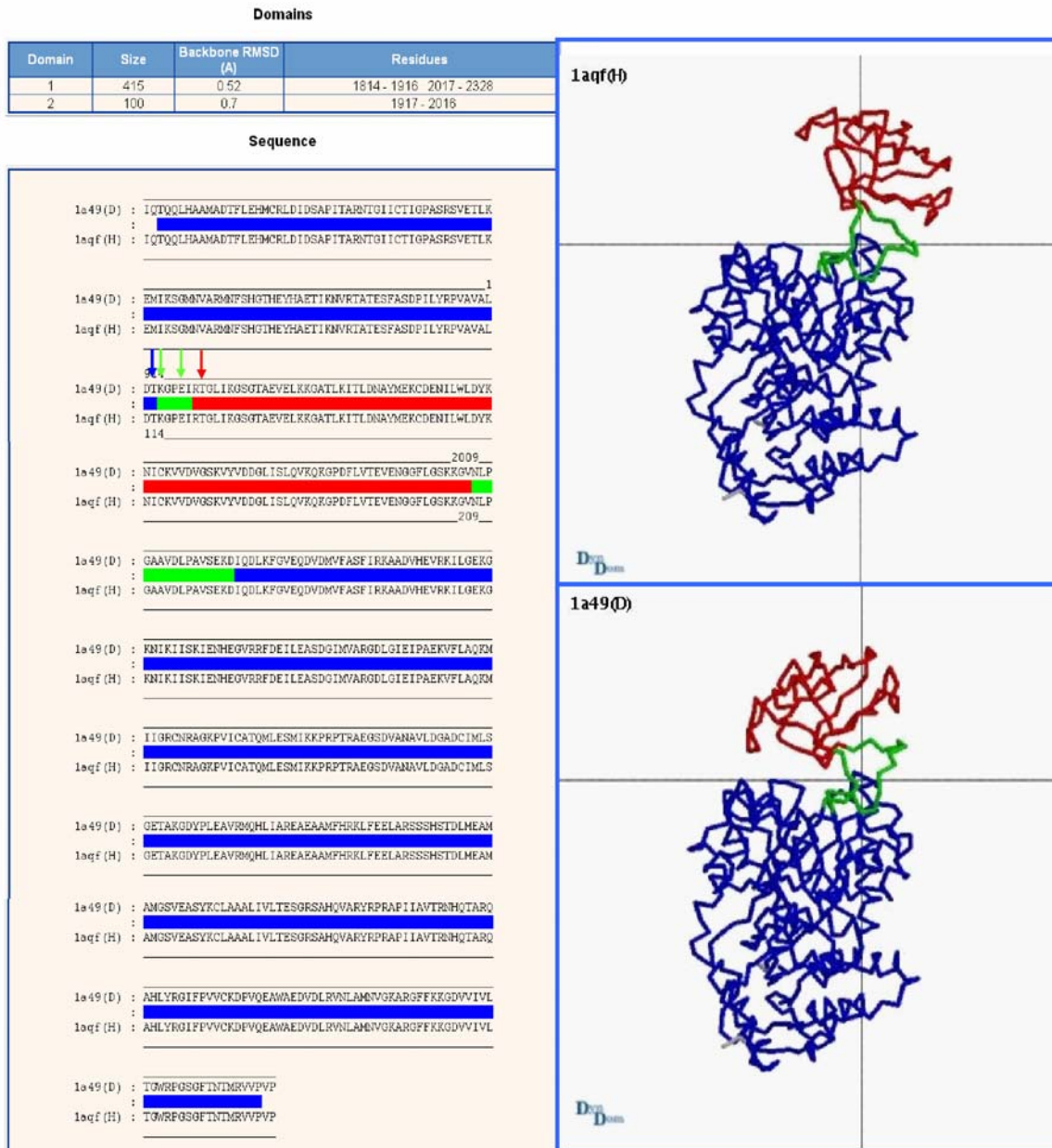


Figura 11. Análisis de DynDom de la piruvato cinasa. El programa define un dominio fijo (azul), un dominio móvil (rojo) y dos regiones de bisagra (verde). El dominio fijo corresponde a los dominios estructurales A, C y amino terminal mientras que el dominio móvil corresponde al dominio B. La posición de los residuos 113, 114, 117 y 120 dentro de la secuencia se indica con flechas azul, verde y roja, respectivamente.

Con el objetivo de determinar las mutaciones que tuvieron que ocurrir en la evolución para dar origen a las dos isoformas de la piruvato cinasa, se analizaron los codones que codifican para los residuos 113, 114, 117 y 120 en las proteínas estudiadas y se compararon los codones usados entre las tres familias, es decir las que presentan K117 con las que presentan E117 y aquellas que se encuentran en la transición (Figura 12). A partir de este análisis se estableció la probable ruta de evolución entre las piruvato cinasas dependientes e independientes de K^+ .

Los resultados muestran que en todos los casos, los residuos encontrados en estas posiciones pueden obtenerse por cambios de una sola base como se muestra en la Figura 13. Por ejemplo, en el caso de la posición 117, sólo es necesario el cambio de la tercera base para pasar de Ser a Arg, de la segunda base para pasar de Arg a Lys o de la primera base para pasar de Lys a Glu. Sin embargo, dado que las mutaciones más frecuentes ocurren en la tercera base, menos frecuentemente en la segunda base y con mucha menor frecuencia en la primera base, es posible proponer la secuencia de eventos mostrada en la Figura 13 A, suponiendo que los cambios ocurrieron a partir del cambio más probable al más improbable.

Debido a que las enzimas independientes de K^+ sólo se encuentran entre las bacterias y las arqueas, es posible suponer que la actividad independiente de K^+ antecedió a la aparición de la dependencia de catión monovalente en la piruvato cinasa que está presente en plantas, hongos y animales. Con respecto a los residuos 113, 114 y 120, se encontró una correlación similar. A partir de cambios en una sola base se pueden describir los diferentes aminoácidos encontrados en esas posiciones. La secuencia de eventos propuesta para los cambios en estos últimos dos residuos se muestra en la Figura 13 B-D.

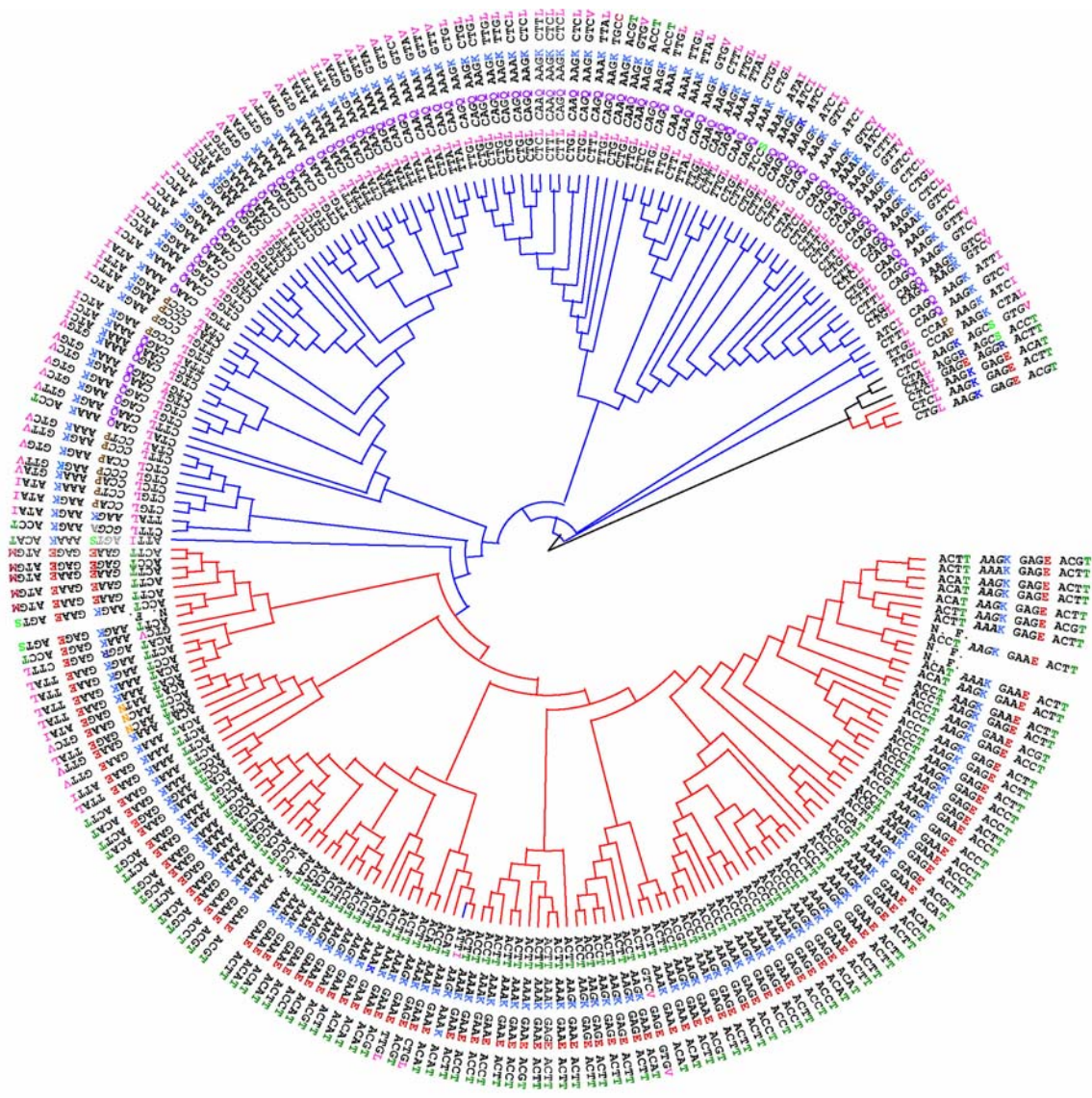


Figura 12. Árbol filogenético de la piruvato cinasa. Codones que codifican para los residuos encontrados en las posiciones 113, 114, 117 y 120. Se muestran los residuos mencionados y el codón que codifica para cada uno de estos.

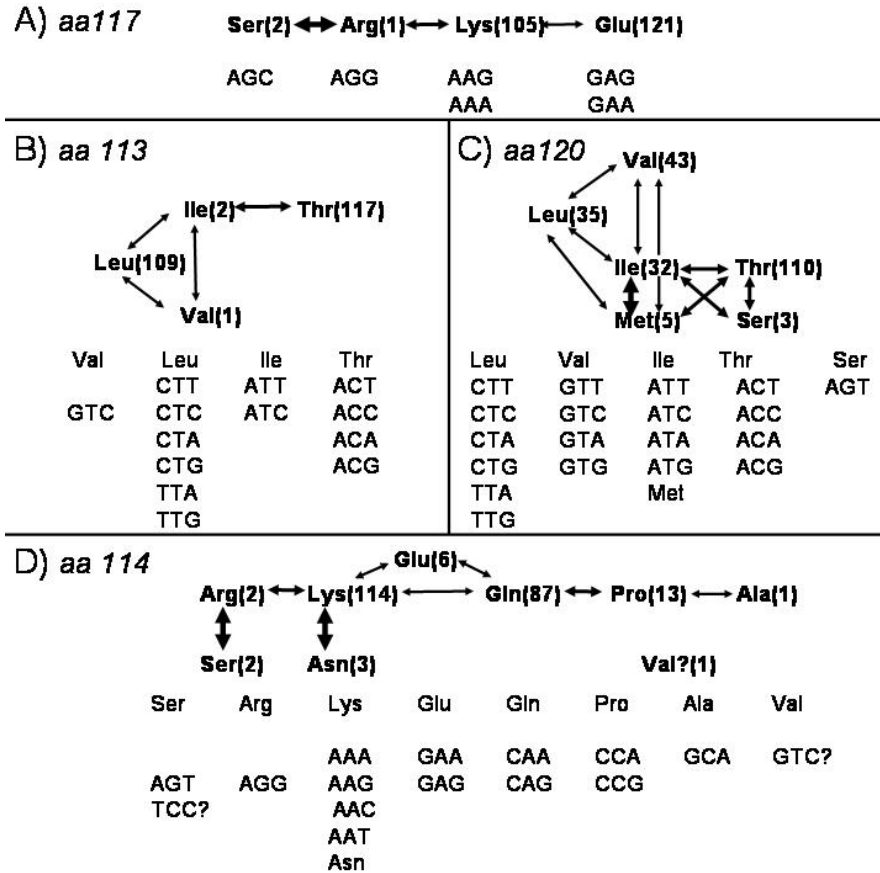


Figura 13. Análisis de los codones utilizados en las posiciones 113, 114, 117 y 120 en la piruvato cinasa. Se enlistan los codones que codifican para cada uno de los aminoácidos encontrados en cada posición. La probabilidad de que un cambio suceda se indica por flechas de diferente espesor, desde el más probable (flecha más gruesa) hasta el más improbable (flecha más delgada). Los números en paréntesis indican el número de secuencias que presentan el aminoácido.

Debido a que suponemos que las enzimas que presentan Lys 117 no utilizan K^+ para su actividad, decidimos investigar la conservación del sitio de unión al K^+ buscando variaciones entre el grupo dependiente e independiente de K^+ . En las piruvato cinasas cristalizadas a la fecha, el K^+ se encuentra coordinado por los oxígenos $O^{\delta 1}$ de la Asn 74, el O^{γ} de la Ser 76, el $O^{\delta 2}$ del Asp 112 y el oxígeno del carbonilo de la cadena principal de la Thr 113. Los residuos 74 y 112 se encuentran casi totalmente conservados, a excepción de dos casos, *Giardia intestinalis* (Val 74 y Ser 112) y *Deschampsia antarctica* (Asp 74 y Gly 112). Por otro lado, la Ser 76 parece estar menos conservada, dado que existen dos sustituciones más frecuentes, Ala 76 en 12 casos y Cys 76 en 5 casos. Es

relevante señalar que estas variaciones se encuentran tanto en enzimas dependientes como independientes de K^+ , lo que hace muy interesante entender cómo se afecta la actividad y cómo es la activación por K^+ en estas enzimas cuando no está presente uno de los oxígenos a los que se une. Hasta el momento, ninguna de las piruvato cinasas que presentan estos cambios ha sido estudiada. La casi estricta conservación de los residuos de unión al K^+ en las 232 secuencias de piruvato cinasa, inclusive en las enzimas que no requieren al catión para su actividad, indica que estos residuos estaban presentes en las piruvato cinasas que no presentaban dependencia de K^+ . Probablemente la presencia de las altas concentraciones intracelulares de K^+ permitió adaptar este sitio como ligante del catión; sin embargo es probable que estos residuos sean necesarios para la función de la enzima, más allá de su papel como ligantes del catión monovalente.

Es interesante hacer notar que la dicotomía determinada por la dependencia por K^+ en la piruvato cinasa no constituye el único caso reportado. Esta característica parece definir también la topología del árbol filogenético de las pirofosfatasa translocadoras de protones, H^+ -PPasas (Belogurov y Lahtí, 2002). La familia de estas enzimas está compuesta de dos tipos filogenéticos distintos de enzimas, K^+ -dependientes y K^+ -independientes, cada una agrupada en una rama del árbol filogenético. El estudio de las secuencias disponibles de las H^+ -PPasas muestra que en las enzimas independientes de K^+ se encuentran conservados los residuos Lys 460 y Thr 463, mientras que en las enzimas dependientes de K^+ estos residuos son Ala 460 y Gly o Ala 463. Los resultados experimentales muestran que en la enzima dependiente de K^+ de *C. hydrogenoformans* la sustitución de Ala 460 por Lys es suficiente para conferirle independencia de K^+ , además, el cambio de Ala 463 por Thr disminuye la afinidad de la enzima por el K^+ , indicando que este residuo está implicado en la unión del catión monovalente. De igual manera que en la piruvato cinasa, los residuos encontrados en las posiciones 460 y 463 determinan la dependencia de K^+ y definen la naturaleza dicotómica del árbol filogenético.

Por último, con respecto a la aparición de la dependencia por cationes monovalentes de las enzimas en la evolución, DiCera (2004) ha propuesto un escenario ancestral imaginario donde las concentraciones intracelulares de los cationes monovalentes estarían sujetas a variaciones, de manera que diferentes niveles de actividad enzimática pudieran alcanzarse en respuesta a estas variaciones. Este escenario parece poco probable, ya que el mantenimiento de los gradientes de concentración iónicos debió de ser fundamental para la aparición y sobrevivencia de los primeros organismos vivos. En este mismo sentido, muchas proteínas utilizan a los cationes monovalentes como estabilizadores de la estructura más que como activadores (Ahmad y cols. 2001, Valenzuela-Soto y cols. 2003); en este caso, la variación en las concentraciones de los cationes monovalentes pondría en riesgo la estabilidad de las proteínas y la viabilidad de los organismos.

Un escenario alternativo que podría explicar la gran cantidad de proteínas que requieren cationes monovalentes podría implicar la existencia de un “rescate químico natural”. El concepto de rescate químico implica la existencia de proteínas mutantes inactivas en las que la actividad biológica se puede restablecer por la adición de un compuesto exógeno apropiado. Se han reportado varios ejemplos en que la sustitución de una His por Ala o Gly puede ser compensada funcionalmente por la adición de imidazol en enzimas, canales iónicos y centros de reacción fotosintéticos (Venkataraman y cols. 2005, McCartney y cols. 2005, Adelroth y cols. 2001).

En la naturaleza, el rescate químico por cationes monovalentes permitiría explicar cómo las elevadas concentraciones de cationes monovalentes disponibles podrían compensar la sustitución de un aminoácido positivo por otro sin carga o de carga opuesta. La unión del catión monovalente podría suplir la pérdida de la carga positiva del aminoácido, con mutaciones posteriores que se ajustarían a la presencia del nuevo ligando.

Este escenario permite entender también la preferencia de las proteínas intra y extracelulares por el K^+ y el Na^+ respectivamente. En los mamíferos por ejemplo, las concentraciones intracelulares de K^+ y de Na^+ son de alrededor de 100 a 140 y de 5 a 10 mM respectivamente, mientras que en el medio extracelular estas concentraciones se invierten. La pérdida de la carga positiva sería compensada por el catión más ampliamente representado en el medio, con mutaciones asociadas que se ajustan a las propiedades específicas del ligando. De esta manera, es posible explicar la observación de que las proteínas intracelulares son preferentemente activadas por K^+ , mientras que las extracelulares lo son por Na^+ . En este mismo sentido, la correlación entre la aparición de mutaciones y la aparición de un sitio de unión para cationes monovalentes, podría ser el resultado de los ajustes internos que sufre la proteína y que son necesarios para la correcta función del catión.

CONCLUSIONES

Estudio cinético

- El K^+ induce un cambio en el mecanismo cinético de la piruvato cinasa de ordenado a aleatorio.
- El K^+ aumenta la velocidad de la enzima y la unión de los sustratos no sólo a través de la coordinación con el oxígeno del fosforilo del PEP o del fosfato γ del ATP, sino que induce el rearrreglo geométrico correcto de los residuos del sitio activo, principalmente en la porción correspondiente al ADP.
- Es posible que el K^+ se encuentre directamente involucrado en el movimiento del dominio B y en la adquisición de la conformación activa de la PK.

Estudio filogenético

- La independencia de K^+ esta extensivamente representada, alrededor de la mitad de las secuencias reportadas presentan lisina 117.
- La dependencia de K^+ explica la topología dicotómica del árbol filogenético de la piruvato cinasa, las enzimas dependientes o independientes de K^+ pertenecen a cada una de las ramas del árbol filogenético.
- La covariación de los residuos L113/Q114/(I,V,L)120, que acompañan a la K117, junto con la posición estratégica de estos residuos en la región de la bisagra indican que estos residuos probablemente estén implicados en la adquisición de la conformación activa en ausencia de K^+ .

REFERENCIAS

1. Adelroth, P; Paddock, M. L; Tehrani, A; Beatty, J. T; Feher, G. y Okamura, M. Y. (2001) Identification of the proton pathway in bacterial reaction centers: decrease of proton transfer rate by mutation of surface histidines at H126 and H128 and chemical rescue by imidazole identifies the initial proton donors. *Biochemistry*. **40**, 14538-14546.
2. Ahmad, A; Akhtar, M.S. y Bhakuni, V. (2001) Monovalent cation-induced conformational change in glucose oxidase leading to stabilization of the enzyme. *Biochemistry*. **20**, 1945-1955.
3. Ainsworth, S. y MacFarlane, N. (1973) A kinetic study of rabbit muscle pyruvate kinase. *Biochem J*. **131**, 223-236.
4. Andersson, C.E. y Mowbray, S.L. (2002) Activation of ribokinase by monovalent cations. *J Mol Biol*. **315**, 409-419.
5. Belogurov, G.A. y Lahti, R. (2002) A lysine substitute for K⁺. A460K mutation eliminates K⁺ dependence in H⁺-pyrophosphatase of *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *J Biol Chem*. **277**, 49651-49654.
6. Büchner, T. & Pfeleiderer, G. (1955) Pyruvate kinase from muscle. In *Methods in Enzymology* (Colowick, S. & Kaplan, N. Eds) Vol. 1, pp 435-440, Academic Press, New York.
7. Busto, F., Del Valle, P. Y Soler, J. (1988) Properties of pyruvate kinase from *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochem Cell Biol*. **66**, 148-157.
8. Cleland, W. W. (1970) Steady state kinetics. In *The Enzymes*, Ed., Boyer, P. D., 3rd edn., Academic Press, NY, Vol. 2; pp. 1-65.
9. Cottam, G. L., Hollenberg, P. F. & Coon, M. J. (1969) Subunit structure of rabbit muscle pyruvate kinase. *J Biol Chem*. **244**, 1481-1486.

10. Dann, L.G. y Britton, H.G. (1978) Kinetics and mechanism of action of muscle pyruvate kinase. *Biochem J.* **169**, 39-54.
11. DePamphilis, M.L. & Cleland, W.W. (1973) Preparation and properties of chromium (3)-nucleotide complexes for use in the study of enzyme mechanisms. *Biochemistry.* **12**, 3714-3724.
12. Di Cera E. (2004) Thrombin: a paradigm for enzymes allosterically activated by monovalent cations. *C R Biol.* **327**, 1065-1076.
13. Di Cera, E. (2006) A structural perspective on enzymes activated by monovalent cations. *J Biol Chem.* **281**, 1305-1308.
14. Di Cera, E; Guinto, E.R; Vindigni A; Dang, Q.D; Ayala, Y.M; Wuyi, M. y Tulinsky, A. (1995) The Na⁺ binding site of thrombin. *J Biol Chem.* **270**, 22089–22092.
15. Fideu-Alonso, M.D; Perez-Perez, M. L; Ruiz-Amil, M. y Herrauz-Santos M.J. (1985) Regulation of liver sea bass pyruvate kinase by temperature, substrates and some metabolic effectors. *Comp Biochem Physiol B.* **82**, 841-8.
16. Gupta, R.K. & Benovic, J.L. (1978) Magnetic resonance and kinetic studies of the spatial arrangement of phosphoenolpyruvate and chromium (III)-adenosine diphosphate at the catalytic site of pyruvate kinase. *J Biol Chem.* **253**, 8878-8896.
17. Hall, D.R; Leonard, G.A; Reed, C.D; Watt, C.I; Berry, A. y Hunter, W.N. (1999) The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex with phosphoglycolohydroxamate reveals details of mechanism and specificity. *J Mol Biol.* **287**, 383–394.
18. Heyde, E. & Morrison, J.F. (1976) Studies on inosine monophosphate dehydrogenase. Isotope exchange at equilibrium. *Biochim Biophys Acta.* **429**, 661-671.

19. Heyde, E; Nagabhushanam, A; Vonarx, M. & Morrison, J.F. (1976) Studies on inosine monophosphate dehydrogenase. Steady state kinetics. *Biochim Biophys Acta*. **429**, 645-660.
20. Hohenester, E; Séller, J.W. y Jansonius, J.N. (1994) An alkali metal ion size-dependent switch in the active site structure of dialkylglycine decarboxylase. *Biochemistry*. **33**, 13561-13570.
21. Jaenicke, R. y Knof, S. (1968) Molecular weight and quaternary structure of lactic dehydrogenase. 3. Comparative determination by sedimentation analysis, light scattering and osmosis. *Eur J Biochem*. **4**, 157-163.
22. Jetten, M. S. M., Gubler, M. E., Lee, S. H. y Sinskey, A. J. (1994) Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2501-2507.
23. Johnsen, U; Hansen, T. & Schönheit, P. (2003) Comparative analysis of pyruvate kinases from the hyperthermophilic archaea *Archaeoglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix*, and *Pyrobaculum aerophilum* and the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: unusual regulatory properties in hyperthermophilic archaea. *J Biol Chem*. **278**, 25417-25427.
24. Jurica, M; Mesecar, A; Heath, P; Wuxian, S; Nowak, T, Stoddard, B. (1998) The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure*. **6**, 195-210.
25. Kachmar, J.F. y Boyer, P.D. (1953) Kinetic analysis of enzyme reactions. II. The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferase. *J Biol Chem*. **200**, 669-682.
26. Kayne, F.J. y Suelter, C. H. (1965) Effects of temperature, substrate, and activating cations on the conformations of pyruvate kinase in aqueous solutions. *J Am Chem Soc*. **87**, 897-900

27. Kayne, F.J. y Suelter, C.H. (1968) The temperature-dependent conformational transitions of pyruvate kinase. *Biochemistry*. **7**, 1678-1684.
28. Kayne, F.J. (1971) Thallium (I) activation of pyruvate kinase. *Arch Biochem Biophys*. **143**, 232-239.
29. Kerr, K.M; Cahoon, M; Bosco, D.A. & Hedstrom, L. (2000) Monovalent cation activation in Escherichia coli inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*. **375**, 131-137.
30. Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. **17**, 1244–1245.
31. Labesse, G; Ferrari, D; Chen, Z.W ; Rossi, G.L; Kuusk, V ; McIntire, W.S. y Mathews, F.S. (1998) Crystallographic and spectroscopic studies of native, aminoquinol, and monovalent cation-bound forms of methylamine dehydrogenase from Methylobacterium extorquens AM1. *J Biol Chem*. **273**, 25703–25712.
32. Larsen, T.M; Laughlin, L.T; Holden, H.M; Rayment, I. y Reed, G.H. (1994) Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn^{2+} , K^+ , and pyruvate. *Biochemistry*. **33**, 6301–6309.
33. Larsen, T. M; Benning, M. M; Wesenberg, G. E; Rayment, I. & Reed, G. H. (1997) Ligand-induced domain movement in pyruvate kinase: structure of the enzyme from rabbit muscle with Mg^{2+} , K^+ , and L-phospholactate at 2.7 Å resolution. *Arch Biochem Biophys*. **345**, 199-206.
34. Larsen, T. M; Benning, M. M; Rayment, I. & Reed, G. H. (1998) Structure of the bis(Mg^{2+})-ATP-oxalate complex of the rabbit muscle pyruvate kinase at 2.1 Å resolution: ATP binding over a barrel. *Biochemistry*. **37**, 6247-6255.
35. Larsen, T. M. & Reed, G.H. (2001) *Handbook of Metalloproteins* (Bertini, L; Siegel, A. & Siegel, H. eds) pp.9-37, Dekker, New York.

36. Laughlin, L.T. y Reed, G.H. (1997) The monovalent cation requirement of rabbit muscle pyruvate kinase is eliminated by substitution of lysine for glutamate 117. *Arch Biochem Biophys.* **348**, 262-267.
37. Lee, R.A; Razaz, M. y Hayward, S. (2003) The DynDom database of protein domain motions. *Bioinformatics.* **19**, 1290-1291.
38. Malcovati, M. y Valentini, G. (1982) AMP- and fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinases from *Escherichia coli*. *Method Enzymol.* **90**, 170-179.
39. Markham, G.D; Bock, C.L. & Schalk-Hihi, C. (1999) Acid-base catalysis in the chemical mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry.* **38**, 4433-4440.
40. Mattevi, A; Valentini, G; Rizzi, M; Speranza, M.L; Bolognesi, M. y Coda, A. (1995) Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. *Structure.* **3**, 729-741.
41. Melchior, J.B. (1965) The role of metal ions in the pyruvic kinase reaction. *Biochemistry.* **4**, 1518-1525.
42. McCartney, S. A; Brignole, E. J; Kolegraff, K. N; Loveland, A. N; Ussin, L. M. y Gibson, W. (2005) Chemical rescue of I-site cleavage in living cells and in vitro discriminates between the cytomegalovirus protease, assemblin, and its precursor, pUL80a. *J Biol Chem.* **280**, 33206-12
43. Mildvan, A.S. y Cohn M. (1965) Kinetic and magnetic resonance studies of the pyruvate kinase reaction. I. Divalent metal complexes of pyruvate kinase. *J Biol Chem.* **240**, 238-46.
44. Mildvan, A.S. y Cohn M. (1966) Kinetic and magnetic resonance studies of the pyruvate kinase reaction. II. Complexes of enzyme, metal, and substrates. *J Biol Chem.* **241**, 1178-1193

45. Miyaoka, T; Tsuchiya, M; Hara, N; Ishino, H. y Shimoyama, M. (1996) Activation of Clostridium botulinum C3 exoenzyme-catalyzed ADP-ribosylation of RhoA by K⁺ in a Mg²⁺ -dependent manner. *J Biochem* (Tokyo). **119**, 200-207.
46. Muirhead, H. (1987). Pyruvate Kinase, in *Biological Macromolecules and Assemblies*, edited by F. A. Jornak and A.
47. Muñoz, M. E. y Ponce, E. (2003) Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. **135**, 197-218.
48. Ng, S.K. y Hamilton, I. R. (1975) Purification and regulatory properties of pyruvate kinase from *Veillonella parvula*. *J Bacteriol*. **122**, 1274-1282.
49. Nowak, T. y Mildvan, A.S. (1972) Nuclear magnetic resonance studies of the function of potassium in the mechanism of pyruvate kinase. *Biochemistry*. **11**, 2819-2828.
50. Plowman, K.M. y Krall, A.R. (1965) A kinetic study of nucleotide interactions with pyruvate kinase. *Biochemistry*. **4**, 2809-2814.
51. Ponce, E., Flores, N., Martínez, A., Valle, F. y Bolivar, F. (1995) Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli*: the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J Bacteriol*. **177**, 5719-5722.
52. Prosise, G.L; Wu, J.Z. & Luecke, H. (2002) Crystal structure of *Tritrichomonas foetus* inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the inhibitor ribavirin monophosphate reveals a catalysis-dependent ion-binding site. *J Biol Chem*. **277**, 50654-50659
53. Radfar, R; Leaphart, A; Brewer, J.M; Minor, W; Odom, J.D; Dunlap, R.B; Novell, C.R. y Lebioda, L. (2000) Cation binding and thermostability of FTHFS monovalent cation binding sites and thermostability of N10-formyltetrahydrofolate synthetase from *Moorella thermoacetica*. *Biochemistry*. **39**, 14481-14486.

54. Ramírez-Silva, L., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Gómez-Puyou, A. (1993) Water-induced transitions in the K^+ requirements for the activity of pyruvate kinase entrapped in reverse micelles. *Biochemistry*. **32**, 5332-5338.
55. Ramírez-Silva, L., Ferreira, S., Nowak, T., Tuena de Gómez-Puyou, M., y Gómez-Puyou, A. (2001) Dimethylsulfoxide promotes K^+ -independent activity of pyruvate kinase and the acquisition of the active catalytic conformation. *Eur J Biochem*. **268**, 3267-3274.
56. Ramirez-Silva L, Oria-Hernandez J. (2003) Selectivity of pyruvate kinase for Na^+ and K^+ in water/dimethylsulfoxide mixtures. *Eur J Biochem*. **270**, 2377-2385.
57. Ramírez-Silva, L; Oria-Hernández, J. Y Uribe, S. (2004) "Function and structure of proteins in water-cosolvent binary systems" in *Encyclopedia of surface and colloid science* p. 1-15. Ponisseril Somasundaran (Ed). Marcel Dekker, Inc. New York, USA.
58. Reed, G.H. y Cohn, M. (1973) Electron paramagnetic resonance studies of manganese (II)-pyruvate kinase-substrate complexes. *J Biol Chem*. **248**, 6436-6442.
59. Reed, G.H. & Morgan, S.D. (1974) Kinetic and magnetic resonance studies of the interaction of oxalate with pyruvate kinase. *Biochemistry*. **13**, 3537-3541
60. Reynard, A.M; Hass, L.F; Jacobsen, D.D. & Boyer, P.D. (1961) The correlation of reaction kinetics and substrate binding with the mechanism of pyruvate kinase. *J Biol Chem*. **236**, 2277-2283.
61. Rigden, D.J ; Phillips, S.E ; Michels, P.A. y Fothergill-Gilmore, L. A. (1999) The structure of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. *J Mol Biol*. **291**, 615-635.
62. Rozengurt, E; de Asua, L.J. y Carminatti, H. (1970) Allosteric inhibition of muscle pyruvate kinase by phenylalanine. *FEBS Lett*. **11**, 284-286

63. Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882.
64. Schramm, A; Siebers, B; Tjaden, B; Brinkmann, H; y Hensel R. (2000) Pyruvate kinase of the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax*: physiological role and phylogenetic aspects. *J Bacteriol.* **182**, 2001-2009.
65. Schoenmakers, T. J. M., Visser, G. J., Flik, G. & Theuvenet, P. R. (1992) CHELATOR: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotechniques.* **12**, 870-879.
66. Sorger, G.J; Ford, R.E. & Evans, H.J. (1965) Effects of univalent cations on the immunoelectrophoretic behavior of pyruvic kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **54**, 1614-1621.
67. Stammers, D. K; Levine, M; Stuart, D.I. y Muirhead, H. (1977) Structure of cat muscle pyruvate kinase at 0.26 nm resolution. *Biochem Soc Trans.* **5**, 654-657.
68. Steiner, P; Fussenegger, M; Bailey, J. E. y Sauer, U. (1998) Cloning and expression of the *Zymomonas mobilis* pyruvate kinase gene in *Escherichia coli*. *Gene.* **220**, 31-38.
69. Stuart, D.I; Levine, M; Muirhead, H. y Stammers, D.K. (1979) Crystal structure of cat muscle pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å. *J Mol Biol.* **134**, 109-42
70. Suelter, C.H. (1967) Effects of temperature and activating cations on the fluorescence of pyruvate kinase. *Biochemistry.* **6**, 418-423.
71. Suelter, C. H. (1970) Enzymes activated by monovalent cations. *Science.* **168**, 789-795.
72. Suelter, C.H; Singleton, R. Jr; Kayne, F.J; Arrington, S; Glass, J. & Mildvan, A.S. (1966) Studies on the interaction of substrate and monovalent and divalent cations with pyruvate kinase. *Biochemistry.* **5**, 131-139.

73. Takusagawa, F; Kamitori, S. y Markham, G.D. (1996) Structure and function of S-adenosylmethionine synthetase: crystal structures of S-adenosylmethionine synthetase with ADP, BrADP, and PPI at 28 angstroms resolution. *Biochemistry*. **35**, 2586–2596.
74. Toney, M.D; Hohenester, E; Cowan, S.W; y Jansonius, J.N. (1993) Dialkylglycine decarboxylase structure: bifunctional active site and alkali metal sites. *Science*. **261**, 756–759.
75. Valentini, G; Chiarelli, L.R; Fortin, R; Dolzan, M; Galizzi, A; Abraham, D.J; Wang, C; Bianchi, P; Zanella, A. y Mattevi, A. (2002) Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. *J Biol Chem*. **277**, 23807-23814.
76. Valenzuela-Soto, E.M; Velasco-Garcia, R; Mujica-Jimenez, C; Gaviria-Gonzalez, L.L. y Muñoz-Clares, R.A. (2003) Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chem Biol Interact*. **143-144**,139-148.
77. Venkataraman, P; Lamb, R.A. y Pinto, L.H. (2005) Chemical rescue of histidine selectivity filter mutants of the M2 ion channel of influenza A virus. *J Biol Chem*. **280**, 21463-21472
78. Villeret, V; Huang, S; Fromm, H.J. y Lipscomb, W.N. (1995) Crystallographic evidence for the action of potassium, thallium, and lithium ions on fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**, 8916–8920.
79. Wilbanks, S.M. y McKay, D.B. (1995) How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. II. Potassium binds specifically in the ATPase active site. *J Biol Chem*. **270**, 2251–2257.
80. Wildes, R.A; Evans, H.J. & Becker, R.R. (1971) The effect of univalent cations on the circular dichroism of pyruvate kinase. *Biochim Biophys Acta*. **229**, 850-854.

81. Wilson, R.H; Evans, H.J. & Becker, R.R. (1967) The effect of univalent cation salts on the stability and on certain physical properties of pyruvate kinase. *J Biol Chem.* **242**, 3825-3832.
82. Woese CR. (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**, 8392-8396.
83. Zhang, R; Villeret, V; Lipscomb, W.N. y Fromm, H.J. (1996) Kinetics and mechanisms of activation and inhibition of porcine liver fructose-1,6-bisphosphatase by monovalent cations. *Biochemistry.* **35**, 3038-3043.
84. Zhang, E. y Tulinsky, A. (1997) The molecular environment of the Na⁺ binding site of thrombin. *Biophys Chem.* **63**, 185–200.

APENDICE

A54113_ M1_ RABBIT	Músculo de conejo M1
S64635_ M1_ HUMAN	Músculo Humano M1
P11979_ KPY1_ FELCA	Musculo gato M1
O18919_ KPY2_ RABBIT	Riñón y tejidos fetales conejo M2
P11980_ KPY1_ RAT	Músculo de rata M1
AAB86587_ M2_ RABBIT	Músculo de conejo M2
P14786_ KPY2_ HUMAN	Riñón y tejidos fetales de de humano M2
P11981_ KPY2_ RAT	Riñón y tejidos fetales de rata M2
P52480_ KPY2_ MOUSE	Riñón y tejidos fetales de ratón M2
P00548_ KPYK_ CHICK	Músculo de pollo M1
AAH44007_ XENLA	<i>Xenopus lavéis</i> PKM2
Q92122_ KPYK_ XENLA	<i>Xenopus lavéis</i>
NP_955365_ DANRE	<i>Danio rerio</i>
BAB92968_ FUGU_ FISH	<i>Takifugu rubripes</i> (Pez fugu)
AAA92535_ HUMAN_ RBC	Eritrocito de humano R
AAA92536_ HUMAN_ LIVER	Hígado de Humano L
KIRTPR_ RAT-RBC	Eritrocito de rata R
BAA23642_ MOUSE_ RBC	Eritrocito de ratón R
CAA29169_ RAT_ LIV	Hígado de rata L
Q29536_ CANFA_ RBC	Eritrocito <i>Canis familiaris</i> R
BAB12236_ ASPORY	<i>Aspergillus oryzae</i>
Q12669_ KPYK_ ASPNG	<i>Aspergillus Níger</i>
P22360_ KPYK_ EMENI	<i>Emericella nidulans (aspergillus)</i>
XP_325930_ NEUCRA	<i>Neurospora crassa</i>
EAA57094_ MAGGRI	<i>Magnaporthe grises</i>
P31865_ KPYK_ TRIRE	<i>Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)</i>
P30614_ KPYK_ YARLI	<i>Yarrowia lipolytica</i>
AAO32558_ SACKLU	<i>Saccharomyces kluyveri</i>
P00549_ KPY1_ YEAST	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AAO32602_ KLULAC	<i>Kluyveromyces lactis</i>
AAO32480_ SACCAS	<i>Saccharomyces castellii</i>
Q10208_ KPYK_ SCHPO	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

AAO32371_SACBAY	<i>Saccharomyces bayanus</i>
P52489_KPY2_YEAST	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> PKII
O94122_KPYK_AGABI	<i>Agaricus bisporus</i>
XP_315228_ANOGAM	<i>Anopheles gambiae</i>
P30615_KPY1_TRYBB	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
P30616_KPY2_TRYBB	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> PKII
Q27788_KPYK_TRYBO	<i>Trypanoplasma borreli</i>
O62619_KPYK_DROME	<i>Drosophila melanogaster</i>
Q27686_KPYK_LEIME	<i>Leishmania mexicana</i>
NP_502029_CAEELE	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Q02499_KPYK_BACST	<i>Bacillus stearothermophilus</i> , Isoforma 2
P51181_KPYK_BACLI	<i>Bacillus licheniformis</i>
NP_244029_BACHAL	<i>Bacillus halodurans</i>
P80885_KPYK_BACSU	<i>Bacillus subtilis</i>
NP_693092_OCEIHE	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>
NP_834305_BACCER	<i>Bacillus cereus</i>
NP_658626_BACANT	<i>Bacillus anthracis</i>
NP_470941_LISINN	<i>Listeria innocua</i>
NP_465095_LISMON	<i>Listeria monocytogenes</i>
NP_814779_ENTFAE	<i>Enterococcus faecalis</i>
NP_764928_STAEP1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
NP_372221_STAAUR	<i>Staphylococcus aureus</i>
NP_623403_THETEN	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
AAK57730_BACSPH	<i>Bacillus sphaericus</i>
NP_785440_LACPLA	<i>Lactobacillus plantarum</i>
P34038_KPYK_LACDE	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
AAS08902_LACJOHN	<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533
NP_783015_CLOTET	<i>Clostridium tetani</i>
NP_926441_GLOVIO	<i>Gloeobacter violaceus</i>
ZP_00106833_NOSPUNT	<i>Nostoc punctiforme</i>
ZP_00070905_TRYERI	<i>Trichodesmium erythraeum</i>
NP_894511_PROMAR	<i>Prochlorococcus marinus</i>
NP_897391_SYNCSP	<i>Synechococcus</i> sp
NP_683065_THEELO	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1

NP_440894_SYNCYS	<i>Synechocystis</i> sp
NP_488048_NOSSP	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120
ZP_00017359_CHLOAU	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
O08309_KPYK_CLOAB	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
Q46289_KPYK_CLOPE	<i>Clostridium perfringens</i>
AAN75637_STIAUR	<i>Stigmatella aurantiaca</i> . Precursor de la proteína que une indol, PK putativa
ZP_00056841_THEFUS	<i>Thermobifida fusca</i>
NP_827393_STRAVE	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680
NP_973133_TREDEN	<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405
P94939_MYCINT	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
NP_301922_MYCLEP	<i>Mycobacterium leprae</i>
NP_960244_MYCAVI	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. paratuberculosis str. k10
NP_626275_STRCOE	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)
NP_296354_DEIRAD	<i>Deinococcus radiodurans</i>
NP_216133-MYCTUB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv
NP_954371_GEOSUL	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA
NP_855296_MYCBOV	<i>Mycobacterium bovis</i> , subsp. Bovis
Q8FP04_COREF	<i>Corynebacterium efficiens</i>
Q46078_KPYK_CORGL	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
NP_939895_CORDIPH	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
BAC76684_MICROS	<i>Microbispora rosea</i> , subsp. Aerata
NP_787418_TROWHI	<i>Tropheryma whipplei</i> str. Twist
NP_696160_BIFLON	<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705
NP_713104_LEPINT	<i>Leptospira interrogans</i> serovar lai
ZP_00044664_MAGNET	<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1
ZP_00026409_RALMET	<i>Ralstonia metallidurans</i>
NP_104842_MESLOT	<i>Mesorhizobium loti</i>
P51182_KPYK_BACPY	<i>Sporosarcina psychrophila</i> (Bacillus)
BAA89788_SELRUM	<i>Selenomonas ruminantium</i>
NP_933293_VIBVUL	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016
NP_230139_VIBCHO1	<i>Vibrio cholerae</i> PK1, O1 biovar eltor
NP_796735_VIBPAR	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> PK1, RIMD 2210633

NP_405929_YERPES	<i>Yersinia pestis</i> PK1
P77983_KPY1_SALTY	<i>Salmonella typhimurium</i>
P14178_KPY1_ECOLI	<i>Escherichia coli</i> PK1
NP_707575_SHIFLE	<i>Shigella flexneri</i> PK1
NP_929848_PHOLUM	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. laumondii
BAA89378_MORMAR	<i>Moritella marina</i>
ZP_00143717_FUSNUC	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. Vincentii
O44006_EIMTEN	<i>Eimeria tenella</i>
Q42806_KPYC_SOYBN	<i>Glycine max</i> (soya)
P22200_KPYC_SOLTU	<i>Solanum tuberosum</i> (papa) citosólica
O65595_KPYC_ARATH	<i>Arabidopsis thaliana</i> Citosólica
NP_196474_ARATHA	<i>Arabidopsis thaliana</i> citosólica
CAE05765_ORYSAT	<i>Oryza sativa</i>
AAF44707_LILLON	<i>Lilium longiflorum</i> citosólica
Q42954_KPYC_TOBAC	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco común) citosólica
BAB47171_TOXGON	<i>Toxoplasma gondii</i>
NP_703926_PLASFAL	<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7
EAA16536_PLAYOE	<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>
Q43117_KPYA_RICCO	<i>Ricinus communis</i> PK isoenzima A, precursor cloroplástico.
Q40546_KPYG_TOBAC	<i>Nicotiana tabacum</i> , PK isoenzima G, precursor cloroplástico
Q40545_KPYA_TOBAC	<i>Nicotiana tabacum</i> , Piruvato cinasa isoenzima A, precursor cloroplástico
BAC83048_PKA_ORYSAT	<i>Oryza sativa</i> , PK isoenzima A, precursor cloroplástico
NP_566720_PKA_ARATHA	<i>Arabidopsis thaliana</i> , PK isoenzima A, precursor cloroplástico
T10054_PKL_RICCOM	<i>Ricinus communis</i> , PK isoenzima Beta, leucoplasto.
NP_200104_PKG_ARATHA	<i>Arabidopsis thaliana</i> , PK isoenzima G, precursor cloroplástico
P55964_KPYG_RICCO	<i>Ricinus communis</i> , Piruvato cinasa isoenzima G, cloroplasto
NP_869344_PIRESP	<i>Pirellula</i> sp. 1
S27330_BACSTE	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> , Isoform 1

CAB94245_TRASCR	<i>Trachemys scripta elegans</i>
CAB56421-CRONIL	<i>Crocodylus niloticus</i>
CAC69539_ELAPHE	<i>Elaphe sp</i>
BAD01636_BOMMOR	<i>Bombyx mori</i>
P21599_KPY2_ECOLI	<i>Escherichia coli</i> PKII strain K-12
NP_707714_SHIFLE	<i>Shigella flexneri</i> PKII 2a str. 301
NP_460845_SALTYP	<i>Salmonella typhimurium</i> PKII LT2
NP_456455_SALENT	<i>Salmonella enterica</i> PKII subsp. enterica serovar Typha
NP_405616_YERPES	<i>Yersinia pestis</i> PKII
NP_929378_PHOLUM	<i>Photorhabdus luminescens</i> PKII subsp. laumondii TTO1
NP_245590_PASMUL	<i>Pasteurella multocida</i>
ZP_00122573_HAESOM	<i>Haemophilus somnus</i> 129PT
P43924_KPYK_HAEIN	<i>Haemophilus influenzae</i> PKII
NP_873019_HAEDUC	<i>Haemophilus ducreyi</i> PKII 35000HP
NP_798418_VIBPAR	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> PKII RIMD 2210633
P57404_KPYK_BUCAI	<i>Buchnera aphidicola</i> (<i>Acyrtosiphon pisum</i>)
ZP_00134634_ACTPLE	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 1 str. 4074
NP_934082_VIBVUL	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016
NP_871139_WIGGLO	<i>Wigglesworthia glossinidia</i> endosymbiont of Glossina
NP_231642_VIBCHO	<i>Vibrio cholerae</i> PKII O1 biovar eltor str. N16961
NP_718078_SHEONE	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1
NP_878736_CANBLO	<i>Candidatus Blochmannia floridanus</i>
ZP_00067921_MICDEG	<i>Microbulbifer degradans</i> 2-40
ZP_00092593_AZOVIN	<i>Azotobacter vinelandii</i>
ZP_00090345_AZOVIN	<i>Azotobacter vinelandii</i>
NP_743521_PSEPUT	<i>Pseudomonas putida</i> PKII KT2440
ZP_00084394_PSEFLU	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1
NP_881869_BORPER	<i>Bordetella pertussis</i> Tohama I
ZP_00127861_PSESYR	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. syringae B728a
NP_885821_BORPAR	<i>Bordetella parapertussis</i> 12822
NP_820761_COXBUR	<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493
ZP_00033171_BURFUN	<i>Burkholderia fungorum</i>

NP_840412_NITEUR	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718
NP_638532_XANCAM	<i>Xanthomonas campestris</i> PKII pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913
NP_643652_XANAXO	<i>Xanthomonas axonopodis</i> PKII
ZP_00039966_XILFAS	<i>Xylella fastidiosa</i> Dixon
NP_780029_XYLFAS	<i>Xylella fastidiosa</i> PKII Temecula1
NP_283027_NEIMEN	<i>Neisseria meningitidis</i> Z2491
NP_273151_NEIMEN	<i>Neisseria meningitidis</i> PKII MC58
NP_518693_RALSOL	<i>Ralstonia solanacearum</i> PKII
ZP_00026165_RALMET	<i>Ralstonia metallidurans</i>
BAA95686_HYDTHE	<i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i>
ZP_00155142_HAEINF	<i>Haemophilus influenzae</i> R2846
NP_253019_PSEAER	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PKII PA01
NP_893030_PROMAR	<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> str. CCMP1986
ZP_00054297_MAGMAG	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>
ZP_00078743_METBAR	<i>Methanosarcina barkeri</i>
NP_968949_BDEBAC	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100
NP_618761_METACE	<i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A
NP_632739_METMAZ	<i>Methanosarcina mazei</i> Goe1
NP_228023_THEMAR	<i>Thermotoga maritima</i>
BAD02412_THEKOD	<i>Thermococcus kodakaraensis</i>
G75052_PYRABY	<i>Pyrococcus abyssi</i>
NP_949529_RHOPAL	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009
NP_142537_PYRHOR	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
NP_578917_PYRFUR	<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638
NP_773778_BRAJAP	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
AAL74283_BARHEN	<i>Bartonella henselae</i>
NP_698732_BRUSUI	<i>Brucella suis</i> 1330
NP_539209_BRUMEL	<i>Brucella melitensis</i>
AAP72039_LACCAS	<i>Lactobacillus casei</i>
NP_386895_SINMEL	<i>Sinorhizobium meliloti</i> PKII
AAC28104_ZYMMOB	<i>Zymomonas mobilis</i>
NP_356860_AGRUM	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

ZP_00005851_RHOSPH	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
NP_420856_CAUCRE	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15
O05118_KPYK_METEX	<i>Methylobacterium extorquens</i>
NP_899919_CHRVIO	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472
P70789_KPY3_AGRVI	<i>Agrobacterium vitis</i> (Rhizobium vitis)
Q44473_KPY4_AGRVI	<i>Agrobacterium vitis</i> (Rhizobium vitis)
ZP_00015949_RHORUB	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
EAA39160_GIALAM	<i>Giardia lamblia</i> ATCC 50803
F81382_CAPJEJ	<i>Campylobacter jejuni</i>
NP_219839_CHLTRA	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Q9PK61_KPYK_CHLMU	<i>Chlamydia muridarum</i>
NP_829539_CHLCAV	<i>Chlamydophila caviae</i> GPIC
Q9Z984_KPYK_CHLPN	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
NP_988725_METMAR	<i>Methanococcus maripaludis</i>
BAC64206_STRPYO	<i>Streptococcus pyogenes</i> SSI-1
BAC43868_MYCPEN	<i>Mycoplasma penetrans</i>
NP_975260_MYCMYC	<i>Mycoplasma mycoides</i>
EAA76876_KPYK_TRIRE	<i>Gibberella zeae</i> PH-1
NP_853261_MYCGAL	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> R
P78031_KPYK_MYCPN	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
P47458_KPYK_MYCGE	<i>Mycoplasma genitalium</i>
NP_326071_MYCPUL	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
NP_078018_UREURE	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
NP_950539_ONIYEL	<i>Onion yellows phytoplasma</i>
NP_345384_STRPNE	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4
NP_721573_STRMUT	<i>Streptococcus mutans</i> UA159
NP_687953_STRAGA	<i>Streptococcus agalactiae</i> 2603V/R
AAF25804_STRTHE	<i>Streptococcus thermophilus</i>
CAE61956_CAEBRI	<i>Caenorhabditis briggsae</i>
NP_811753_BACTHE	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482
NP_558871_PYRAER	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>
NP_212482_BORBUR	<i>Borrelia burgdorferi</i>
NP_377586_SULTOK	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
NP_147274_AERPER	<i>Aeropyrum pernix</i>

NP_111539_THEVOL	<i>Thermoplasma volcanium</i>
NP_596989_ENCCUN	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
ZP_00130421_DESDES	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20
ZP_00000461_FERACI	<i>Ferroplasma acidarmanus</i>
CAE34461_BORBRO	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
H90249_SULSOL	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
CAC12025_THEACI	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
AAM22747_DESANT	<i>Deschampsia antarctica</i>
AAK94944_MASBAL	<i>Mastigamoeba balamuthi</i>
AAF06820_THETEN	<i>Thermoproteus tenax</i>
AAF19604_GIAINT	<i>Giardia intestinales</i>
AAA02922_HYPEC	<i>Hypocrea jecorina</i>

Pyruvate Kinase Revisited

THE ACTIVATING EFFECT OF K^+ *

Received for publication, August 2, 2005, and in revised form, September 2, 2005. Published, JBC Papers in Press, September 7, 2005, DOI 10.1074/jbc.M508490200

Jesús Oria-Hernández^{†1}, Nallely Cabrera[§], Ruy Pérez-Montfort[§], and Leticia Ramírez-Silva^{‡2}

From the [†]Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and [§]Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Distrito Federal, México

For more than 50 years, it has been known that K^+ is an essential activator of pyruvate kinase (Kachmar, J. F., and Boyer, P. D. (1953) *J. Biol. Chem.* 200, 669–683). However, the role of K^+ in the catalysis by pyruvate kinase has not been totally understood. Previous studies without K^+ showed that the affinity of ADP-Mg²⁺ depends on the concentration of phosphoenolpyruvate, although the kinetics of the enzyme at saturating K^+ concentrations show independence in the binding of substrates (Reynard, A. M., Hass, L. F., Jacobsen, D. D. & Boyer, P. D. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 2277–2283). Here, we explored the kinetics of the enzyme with and without K^+ . The results show that without K^+ , the kinetic mechanism of pyruvate kinase changes from random to ordered with phosphoenolpyruvate as first substrate. V_{max} with K^+ was about 400 higher than without K^+ . In the presence of K^+ , the affinities for phosphoenolpyruvate, ADP-Mg²⁺, oxalate, and ADP-Cr²⁺ were 2–6-fold higher than in the absence of K^+ . This as well as fluorescence data also indicate that K^+ is involved in the acquisition of the active conformation of the enzyme, allowing either phosphoenolpyruvate or ADP to bind independently (random mechanism). In the absence of K^+ , ADP cannot bind to the enzyme until phosphoenolpyruvate forms a competent active site (ordered mechanism). We propose that K^+ induces the closure of the active site and the arrangement of the residues involved in the binding of the nucleotide.

In a now classic paper, Kachmar and Boyer (1) described the activating effect of K^+ on pyruvate kinase (PK).³ Since that time, many enzymes that are activated by monovalent cations have been described (2). More recently, high resolution crystallographic structures of Na⁺ and K^+ in proteins were reviewed (3). In some cases, the structures have been instrumental in the understanding of the mechanism of ion activation and selectivity (4, 5). However, the molecular basis of the selectivity of PK for K^+ and the mechanism through which K^+ activates the enzyme are not entirely known.

Nowak and Suelter (6) wrote a historical description of the effect of K^+ on PK. In 1953, Kachmar and Boyer (1) put forth that the binding of the monovalent cation induces displacement of adjoining structures

and that the expression of catalysis was associated with the magnitude of the displacement. Indeed, several physical studies showed that the conformation of the protein is modified by monovalent cations. Alkali metal ions change the UV, fluorescence polarization, and circular dichroism spectra of the enzyme (7–10). They also alter its immunoelectrophoretic behavior (11) and the sedimentation velocity of the protein (12). Structural modifications of PK have been observed with non-activating monovalent cations; this suggests that conformational changes are involved in catalysis, albeit they do not suffice to support high activities (10, 11).

Later, evidence for the interaction of K^+ with substrates was reported. This provided important evidence for a direct participation on the catalytic events at the active site. Along this time, kinetic, UV difference spectroscopy, and EPR studies showed a synergistic effect in the binding of Mn²⁺ and K^+ to the enzyme (13, 14). In NMR proton relaxation rate titration experiments, it was found that K^+ raised the affinity of the enzyme for PEP and its analogs and that PEP and its analogs raised the affinity of the enzyme for K^+ . It was also found that K^+ decreased the affinity of analogs of PEP that lack the free carboxyl function (15). Therefore, it was reasoned that monovalent cations facilitate the interaction of PEP to the binary enzyme-Mn²⁺ complex by interacting with the carboxylate group (15). In consonance with this hypothesis, NMR studies showed that the distance between Mn²⁺ and ²⁰⁵Tl⁺ complexed to PK was shortened by the addition of PEP. Thus, it was rather evident that the monovalent cation binds at the catalytic site and participates directly in the interaction of PEP with the enzyme-Mn²⁺ complex (16, 17). In fact, Suelter (2) proposed that K^+ assists in the stabilization of the enolate form of pyruvate.

The localization of the active site was suggested by the first crystallographic structure of pyruvate kinase; however, the binding site for the monovalent cation was not ascertained (18). The interaction of K^+ with the substrates and products was definitely demonstrated by the crystallographic structures of PK complexed with K^+ , Mg²⁺, and phospholactate (19) or ATP (20). The data showed that K^+ interacts with the phosphoryl oxygen of either PEP or that of γ -phosphate of ATP. All of the crystal structures of PK up to date are in complex with monovalent cations; thus, the effects that K^+ exerts on the overall structure and function of PK are not well understood. Likewise, it is not clear what residues are involved in the transduction of K^+ binding to the enhancement of catalytic activity. In this regard, it is relevant that the binding site for monovalent cation is identical in all of the structures reported, regardless of whether they are in an active (closed) or inactive (open) conformation (19) or in complex with K^+ or the nonactivator cation Na⁺ (20).

Since catalysis is more amenable to kinetic than to structural studies, in this work, we investigated the kinetic features of the enzyme in the absence of K^+ . It should be mentioned that hardly any attention has been given to the characteristics of PK in the absence of monovalent cation. Therefore, we hypothesized that the understanding of the struc-

* This work was supported by Dirección General de Apoyo al Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México, Grant IN227202 (to L. R. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by Ph.D. fellowships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Dirección General de Estudios de Posgrado and the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

² To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Apartado Postal 70-159, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal 04510, México. Tel.: 525-6232510; Fax: 525-6162419; E-mail: lramirez@bq.unam.mx.

³ The abbreviations used are: PK, pyruvate kinase; WT-PK, rabbit muscle pyruvate kinase wild type; E117K-PK, rabbit muscle pyruvate kinase E117K mutant; LDH, lactate dehydrogenase; PEP, phosphoenolpyruvate; Mes, 4-morpholineethanesulfonic acid.

ture and function of the enzyme without K^+ can provide a powerful background for the understanding of the action of K^+ on PK. We also studied PK under conditions in which the enzyme displays a considerable K^+ -independent activity: in water/Me₂SO mixtures (21) and in the PK mutant E117K (E117K-PK) (22).

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Chromium-ADP—Chromium-ADP (ADP-Cr²⁺) was prepared according to DePamphilis (23), except that tetramethylammonium bicarbonate was used instead of KHCO₃ in the neutralization step. The purity of ADP-Cr²⁺ was ascertained from its visible spectral characteristics and by thin layer chromatography. Tetramethylammonium bicarbonate was prepared by ion exchange chromatography in a Dowex 50WX4-100 (15 × 2.5-cm) column.

Subcloning of E117K—Plasmid pET22b containing the E117K-PK gene, plasmid pTrc99A, and *Escherichia coli* PB25Δ-PK1Δ-PKII were kindly provided by Dr. George H. Reed from the University of Wisconsin (Madison, WI) (22) and by Dr. Francisco Bolívar Zapata (National University of Mexico) (24), respectively. E117K-PK originally cloned in pET22b was subcloned in pTrc99A. PCR was performed with the 5'-CATGGAATTCTAATAAGGAGCTCCATATGTCAAAG-3' primer containing an EcoRI restriction site and the upstream NdeI site of E117K-PK and T7 terminator primer. The PCR-amplified DNA product was cut with EcoRI, inserted to pTrc99A, and transformed to competent *E. coli* PB25Δ-PK1Δ-PKII (PB25-E117K) that contained antibiotic resistance cassettes to chloramphenicol and kanamycin. Subsequently, sequence analysis was carried out.

Cell Growth and Purification of the E117K Mutant—LB medium containing 100 μg/ml ampicillin, 50 μg/ml kanamycin, and 30 μg/ml chloramphenicol was inoculated with PB25-E117K. Expression was induced with 1 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside and 20 g/liter of lactose at an A₆₀₀ of about 0.8. The enzyme was purified as in Ref. 22 with some modifications. Cells were treated with lysozyme and an osmotic shock. DNase and a protease inhibitor mixture were added to the spheroplasts, which were then broken by sonication. The suspension was centrifuged 20 min at 20,000 × g. The supernatant was precipitated with ammonium sulfate at 37%, and the resultant supernatant was collected. A second precipitation with ammonium sulfate at 65% saturation was prepared. The pellet was collected, suspended, and desalted by dialysis. The final steps involved ion exchange chromatography in DEAE and carboxymethyl-Sepharose. The E117K mutant was 95% pure as indicated by SDS-PAGE.

Assays of Pyruvate Kinase Activity—WT-PK and hog muscle lactate dehydrogenase (LDH) were obtained as ammonium sulfate suspensions from Roche Applied Science. Ammonium sulfate-free enzymes were obtained as described (25). Contaminating NH₄⁺, Na⁺, and K⁺ in reaction mixtures were below the detection limit (10 μM) as indicated (25). The formation of pyruvate was measured at 25 °C either in a coupled system with LDH and NADH (26) or by arresting a 5-min reaction with 1 M HClO₄ and subsequently neutralizing it. In the latter case, the amount of pyruvate formed was determined with LDH and NADH.

The reaction mixtures contained 50 mM Mes-Tris, pH 6.0, and the concentrations of cations (Mg²⁺ and K⁺), substrates (PEP and ADP), and inhibitors (oxalate and ADP-Cr²⁺) indicated under "Results." The ADP-Mg²⁺ complexes and free Mg²⁺ concentrations were calculated using the software CHELATOR (27). Ionized PEP concentrations were calculated considering a pK value of 6.3. (CH₃)₄NCl was added to a final salt concentration of 0.88 M to compensate for different ligand concentrations. In all coupling assays, the concentration of LDH added to the reaction mixture was enough to overcome the inhibition of oxalate and

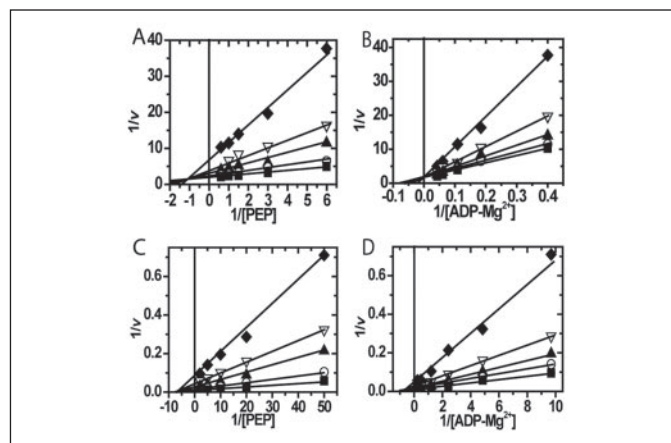


FIGURE 1. Double reciprocal plots from initial velocity data of the WT-PK reaction in the absence (A and B) and in the presence of 90 mM K⁺ (C and D) in 100% water. The reaction medium contained 50 mM Mes-Tris, pH 6.0, 0.2 mM NADH, 3 mM Mg²⁺_{free}, and 8 μg/ml LDH. The reciprocals of the concentrations of ionized PEP and ADP-Mg²⁺ complexes are shown in the abscissas of each graph. The variable fixed concentrations of ADP-Mg²⁺ of plots A and C are 2.5 (◆), 5.43 (▽), 9.22 (▲), 16.96 (○), and 23.46 mM (■) and 0.1 (◆), 0.2 (▽), 0.41 (▲), 0.83 (○), and 2.1 mM (■), respectively. The variable fixed concentrations of PEP of plots B and D are 0.17 (◆), 0.33 (▽), 0.67 (▲), 1.0 (○), and 1.67 mM (■) and 0.02 (◆), 0.05 (▽), 0.1 (▲), 0.2 (○), and 0.5 mM (■), respectively. Mg²⁺_{free} concentration was kept constant at 3 mM. In order to maintain ionic strength, (CH₃)₄NCl was added to a final salt concentration of 0.88 M. The reaction was started by the addition of PK. Amounts of PK that ranged from 5 to 13 μg/ml without K⁺ and from 0.15 to 1.2 μg/ml when mixtures contained 90 mM K⁺ were used.

Me₂SO. The specific activity was not increased by the 5-fold inclusion of LDH. Activity was initiated with PK. The temperature was 25 °C.

Kinetic Studies—Initial velocities of PK were determined with and without dead end inhibitors (oxalate or ADP-Cr²⁺). In the former condition, the patterns were obtained at varying concentrations of PEP at several fixed levels of ADP-Mg²⁺. In the latter condition, the inhibition patterns were obtained by varying one substrate with the second fixed and at different fixed levels of the inhibitor.

Fluorescence Experiments—Intrinsic fluorescence emission spectra and anisotropy measurements of PK in water medium were made in an ISS PC1 Photon Counting Spectrofluorometer (ISS, Urbana, IL) as described before (21). Blanks without PK were subtracted from the experimental.

RESULTS AND DISCUSSION

Initial Velocity Studies of WT-PK with and without K⁺ in Aqueous Medium—PK catalyzes the transfer of phosphoryl group of PEP to ADP in the presence of two ions of Mg²⁺ and one of K⁺. WT-PK has an absolute requirement for K⁺ (1); its activity with and without K⁺ is 250 and 0.02 μmol min⁻¹ mg⁻¹, respectively (28, 29). The pioneer work of Boyer's group (30) showed that at saturating concentration of K⁺, WT-PK follows a random order rapid equilibrium kinetic mechanism. This was later confirmed by other authors (31, 32). In our initial kinetic studies carried out in the absence of K⁺, we observed that the affinity of ADP-Mg²⁺ depended on the concentration of PEP, indicating that in the absence of K⁺, the binding of PEP affects that of ADP-Mg²⁺. Thus, we explored the kinetic behavior of the enzyme without K⁺.

Initial velocities of the reaction of WT-PK were determined without and with K⁺ at variable concentrations of one of the substrates and at fixed variable concentrations of the other (Fig. 1). In the absence of K⁺, the double reciprocal plots of initial velocities versus PEP concentrations intersected above the 1/S axis and to the left of the 1/v axis, (Fig. 1A). With ADP-Mg²⁺ concentrations as variable substrate, the lines intersected on the 1/v axis and above the 1/S axis (Fig. 1B). Hence, the data indicate a rapid equilibrium sequential ordered mechanism with

The Activating Effect of K^+ on Pyruvate Kinase

TABLE ONE

Intersecting patterns, kinetic mechanisms, and kinetic constants of WT-PK and of E117K-PK

Intersecting patterns were taken from the double reciprocal plots of initial velocity data. The data were globally fitted (nonlinear regression, Origin version 6.0) to the equation describing a rapid equilibrium ordered mechanism, $v = V[A][B]/(K_a K_b + K_b[A] + [A][B])$ or to the equation that describes a rapid equilibrium random order mechanism $v = V[A][B]/(K_a K_b + K_a[B] + K_b[A] + [A][B])$, where v represents the initial velocity, A is PEP, B is $ADP-Mg^{2+}$, and K_a and K_b are the Michaelis-Menten constants for PEP and $ADP-Mg^{2+}$, respectively. S.E. values are shown. Catalytic efficiency values, k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$), are expressed in log form.

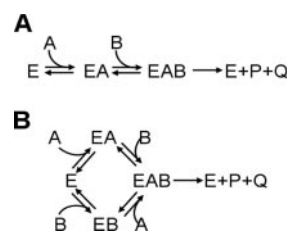
Condition	Initial velocity intersecting patterns		Kinetic mechanism	V_{max}	K_m PEP	K_m ADP- Mg^{2+}	k_{cat}	Log k_{cat}/K_m PEP	Log k_{cat}/K_m ADP- Mg^{2+}
	1/v versus 1/PEP	1/v versus 1/ADP- Mg^{2+}							
				$\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$	mM	mM	s^{-1}		
WT-PK 100% H_2O without K^+	Intersects to the left of the 1/v axis and above the 1/S axis	Intersects on the 1/v axis and above the 1/S axis	Ordered rapid equilibrium	0.8 ± 0.04	0.61 ± 0.07	14.1 ± 1.7	3.2	3.71	2.35
WT-PK 100% H_2O with K^+	Intersects to the left of the 1/v axis and on the 1/S axis	Intersects to the left of the 1/v axis and on the 1/S axis	Random rapid equilibrium	299 ± 11	0.13 ± 0.007	2.3 ± 0.1	1182	6.96	5.70
WT-PK 40% Me_2SO without K^+	Intersects to the left of the 1/v axis and on the 1/S axis	Intersects to the left of the 1/v axis and on the 1/S axis	Random rapid equilibrium	25 ± 1	0.06 ± 0.006	1.4 ± 0.1	98	6.21	4.85
E117K-PK 100% H_2O without K^+	Intersects to the left of the 1/v axis and on the 1/S axis	Intersects to the left of the 1/v axis and on the 1/S axis	Random rapid equilibrium	41 ± 2	0.24 ± 0.016	2.0 ± 0.1	161	5.83	4.90

PEP as the first substrate. In the presence of K^+ (Fig. 1, C and D), the families of lines intersect on the 1/S axis and to the left of the 1/v axis with either substrate; this indicates an ordered or random kinetic mechanism that is in rapid equilibrium or steady state. The data of WT-PK in the absence of K^+ in 100% water were globally fitted to the equation that describes a rapid equilibrium ordered mechanism. In consonance with Boyer's report (30), the data at saturating concentrations of K^+ in aqueous medium were fitted to a rapid equilibrium random order mechanism. The fit to the selected equations was the best as shown by the S.E. value and by the correspondence between the experimental data and the theoretical lines derived from the fit. These results are summarized in TABLE ONE, and a representation of both kinetic mechanisms is shown in Scheme 1.

As expected, in 100% water without K^+ , the V_{max} of WT-PK is notably lower than with K^+ (~400-fold), whereas the respective affinity in the absence of K^+ for PEP and $ADP-Mg^{2+}$ is about 5- and 6-fold lower than in the presence of K^+ (TABLE ONE). These results are in consonance with reports that show that K^+ increases the activity and affinity of the enzyme for substrates and Mg^{2+} (15, 25).

Initial Velocity Studies without K^+ of WT-PK in 40% Me_2SO and of E117K-PK in Aqueous Medium—The dependence of WT-PK catalysis on K^+ is mimicked by modification of the solvent and by mutation of the enzyme (21, 22). In water- Me_2SO binary systems without K^+ (21), the activity of WT-PK is 1000-fold higher than in aqueous medium without K^+ (0.02 versus $20\ \mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$). Kinetic and spectroscopic studies show that the conformation of PK without K^+ in 40% Me_2SO resembles the conformation of the enzyme in aqueous medium with K^+ .

By the same token, it has been shown that PK from various sources does not require K^+ for catalysis (33–38). Laughlin and Reed (22) compared the sequences of WT-PK with K^+ -independent PK from two bacteria. These authors found that Glu¹¹⁷ in the rabbit enzyme is a Lys in the bacterial enzymes. Thus, they changed Glu¹¹⁷ of rabbit PK for Lys and found that the E117K mutant (E117K-PK) exhibits a K^+ -independent activity of $30\ \mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$; it is not activated by K^+ . The authors indicated that Lys provides an internal positive charge that obviates the need for an exogenous monovalent cation.



SCHEME 1. Ordered (A) and random (B) rapid equilibrium kinetic mechanisms.

Initial velocity experiments were carried out without K^+ in 40% Me_2SO (w/v) with WT-PK and in 100% water with E117K-PK (experiments not shown). In both cases, the double reciprocal plots were identical to those obtained in the wild type enzyme in 100% water with K^+ . The data were globally fitted to the equation that describes a random order kinetic mechanism (TABLE ONE). In the absence of K^+ , the V_{max} of WT-PK in 40% Me_2SO and of E117K-PK were 30-fold (25 versus $0.8\ \mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$) and 50-fold (41 versus $0.8\ \mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$) higher than the V_{max} of WT-PK in 100% water without K^+ . In the data of TABLE ONE, it is relevant that the K_m values and catalytic efficiencies for the WT-PK with K^+ in 100% water, 40% Me_2SO without K^+ , and the E117K-PK in 100% water without K^+ are similar. However, the values are drastically different from those of WT-PK in 100% water without K^+ . For example, the K_m for $ADP-Mg^{2+}$ in WT-PK without K^+ is 14.1 mM, whereas in the other conditions, it is around 2 mM. Likewise, $\log k_{cat}/K_m$ is more than 2 orders of magnitude higher for the enzyme in the first three experimental conditions than for the enzyme without K^+ in aqueous medium. In summary, these data indicate that the characteristics of the active site in Me_2SO or the mutant resemble those of the enzyme in the presence of K^+ . It has been shown that in the absence of K^+ , 40% Me_2SO induces the acquisition of the active conformation of WT-PK (21).

Dead End Inhibition Studies—Dead end inhibitors are powerful tools to probe the kinetic mechanisms of enzymes (39). Here we used oxalate and $ADP-Cr^{2+}$ as dead end analogues of PEP (40) and of $ADP-Mg^{2+}$ (41), respectively (experiments not shown). In the absence of K^+ , the

TABLE TWO

Dead end inhibition patterns and inhibition constants for oxalate and ADP-Cr²⁺ in WT-PK and in E117K-PK

Inhibition patterns were taken from the double reciprocal plots of inhibition experiments. Simple inhibition patterns were confirmed from linear replots of slopes or intercepts *versus* inhibitor concentrations (not shown). Inhibition constants were calculated from the fitness of the complete data set to the corresponding equations of linear competitive inhibition (C) $v = V[S]/(K_m(1 + [I]/K_i) + [S])$, linear uncompetitive inhibition (U) $v = V[S]/(K_m + [S](1 + [I]/K_i))$, linear noncompetitive (NC), or linear mixed inhibition (MT) $v = V[S]/(K_m(1 + [I]/K_i) + [S](1 + [I]/\alpha K_i))$, where $\alpha = 1$ and $\alpha \neq 1$ for NC and MT, respectively; K_i is the inhibition constant.

	Dead end analog of PEP:oxalate		Dead end analog of ADP-Mg ²⁺ :ADP-Cr ²⁺		K_i (oxalate)	K_i (ADP-Cr ²⁺)
	1/v <i>versus</i> 1/PEP, fixed ADP-Mg ²⁺	1/v <i>versus</i> 1/ADP-Mg ²⁺ , fixed PEP	1/v <i>versus</i> 1/PEP, fixed ADP-Mg ²⁺	1/v <i>versus</i> 1/ADP-Mg ²⁺ , fixed PEP		
					μM	mM
WT-PK, 100% H ₂ O with K ⁺	C	NC	NC	C	29 ± 1.8	1.3 ± 0.06
WT-PK, 100% H ₂ O without K ⁺	C	NC	U	C	77 ± 3.2	2.8 ± 0.06
E117K-PK, 100% H ₂ O without K ⁺	C	MT	NC	C	4.8 ± 0.2	.9 ± 0.08
WT-PK, 40% Me ₂ SO without K ⁺	C	NC	NC	C	2.4 ± 0.1	0.5 ± 0.02

patterns of oxalate inhibition *versus* PEP and ADP-Mg²⁺ were competitive and noncompetitive, respectively. With ADP-Cr²⁺ the inhibition was uncompetitive and competitive with PEP and ADP-Mg²⁺, respectively. With K⁺, the patterns of oxalate inhibition *versus* PEP and ADP-Mg²⁺ were competitive and noncompetitive, respectively, whereas with ADP-Cr²⁺, the inhibition was noncompetitive and competitive with respect to PEP and ADP-Mg²⁺. In all cases, replots of the slopes or intercepts of double reciprocal plots against inhibitor concentration were linear (not shown). The data were globally fitted to the equations that describe linear competitive inhibition, linear noncompetitive inhibition, linear mixed inhibition, or linear uncompetitive inhibition. The inhibition patterns and calculated inhibition constants are shown in TABLE TWO.

Collectively, the data show that with or without K⁺, oxalate is a competitive inhibitor with respect to PEP, whereas ADP-Cr²⁺ is a competitive inhibitor of ADP-Mg²⁺. This indicates that analogues and substrates bind to the same site. Because with or without K⁺, oxalate is a noncompetitive inhibitor of ADP-Mg²⁺, it may be concluded that oxalate forms a nonproductive ternary complex and thereby diminishes V_{max} without altering the binding of ADP-Mg²⁺. The same argument holds for ADP-Cr²⁺ with respect to PEP in the presence of K⁺. On the other hand, with PEP in the absence of K⁺, the inhibition pattern by ADP-Cr²⁺ was uncompetitive, illustrating that ADP-Cr²⁺ binds exclusively to the enzyme-PEP binary complex. The uncompetitive pattern confirms the data of Fig. 1 and TABLE ONE that show that in the absence of K⁺, WT-PK followed a sequential rapid equilibrium ordered mechanism. In contrast, the overall kinetics in the presence of K⁺ (substrates binding independently) confirm previous reports (30–32) that show that the kinetic mechanism of WT-PK involves a rapid equilibrium random order.

The inhibition patterns in the absence of K⁺ of WT-PK in 40% Me₂SO medium and of E117K-PK in 100% water followed the same patterns as those of WT-PK with K⁺, except that a mixed type pattern with $\alpha < 1$ for oxalate inhibition *versus* ADP-Mg²⁺ was observed (TABLE TWO). This difference indicated that the enzyme-oxalate binary complex has a higher affinity for ADP-Mg²⁺ than the free enzyme. Therefore, the data with dead end inhibitors indicate that in the absence of K⁺, WT-PK in medium 40% Me₂SO or E117K-PK in 100% water follow a rapid equilibrium random order kinetic mechanism.

The data of TABLES ONE and TWO show that K⁺ increases the affinity of the enzyme for the inhibitors and the substrates. Thus, it is noteworthy that WT-PK in medium with 40% Me₂SO or in the mutation E117K in 100% water, the affinity for the inhibitors is higher than that of PK in water plus K⁺ (TABLE TWO). Along this line, it is relevant that Reed *et al.* (40) reported that oxalate is an analogue of the transition state. Our data show that the active site of the enzyme in 40% Me₂SO or

that of E117K-PK is in a conformation near to the transition state. In fact, it has been described that the inclusion of 40% Me₂SO induces structural arrangements of WT-PK that favor the partition of substrates and cations to the active site (21, 42). Therefore, the low inhibition constants of dead end inhibitors, the high affinity for the substrates, and the high catalytic efficiency of WT-PK in 40% Me₂SO or of PK-E117 indicate that the enzyme is in a conformation prone to bind substrates and carry out catalysis in these conditions.

In regard to the mechanism through which E117K-PK carries out K⁺-independent catalysis, it has been proposed that the positive charge of Lys provides an internal monovalent cation (22). This mechanism cannot explain the K⁺-independent activity observed in Me₂SO. It is noted, however, that in 40% Me₂SO, WT-PK exhibits a conformation similar to that observed in aqueous medium with K⁺ (21); this suggests that the overall conformation of the enzyme contributes to the expression of catalysis.

The Effect of K⁺ and Ligands on the Structure of Pyruvate Kinase—A salient feature of our data is that K⁺ changes the kinetic mechanism from ordered to random. This indicates that the change is related to structural arrangements of the enzyme. Indeed, crystallographic studies of WT-PK show that the enzyme acquires different conformations that depend on the ligands that are at the active site. With PEP analogs, it is open or partially closed, and with PEP analogs and ATP-Mg²⁺, the active site is tightly closed (19, 20) (Fig. 2A).

We determined the spectral center of mass and intrinsic fluorescence anisotropy of free WT-PK and in complex with K⁺ and the ligands shown in TABLE THREE. PK has three Trp residues per monomer, two in the C and one in the B domain (18–20, 43). The C domain remains in the same position in the open and closed conformations, whereas that of the B domain is highly mobile and differs in 40° in the two conformers (see Fig. 2A) (20). It is likely that Trp¹⁵⁷, which is in the B domain, accounts for the differences in intrinsic anisotropy with and without ligands and reports the movement of this domain.

Oxalate, K⁺, Mg²⁺, and ATP-Mg²⁺ induced a blue shift of the λ_{max} or spectral center of mass of PK. The transition from the open to the closed conformation was gradually induced by the sequential addition of various active site ligands (TABLE THREE). In consonance with crystallographic data, a first transition was observed as a result of the addition of oxalate and Mg²⁺ to PK; the subsequent addition of K⁺ induced a further shift that corresponds to the partially closed active site (19). A still larger shift was brought about by the addition of ATP-Mg²⁺; this corresponds to the totally closed conformation (20).

The intrinsic fluorescence anisotropies of the same samples were recorded at the λ_{max} (TABLE THREE). In agreement with the data of the spectral center of mass, the ligands induced stepwise changes in anisotropy values. This indicates that ligands induce a lower mobility of the

The Activating Effect of K^+ on Pyruvate Kinase

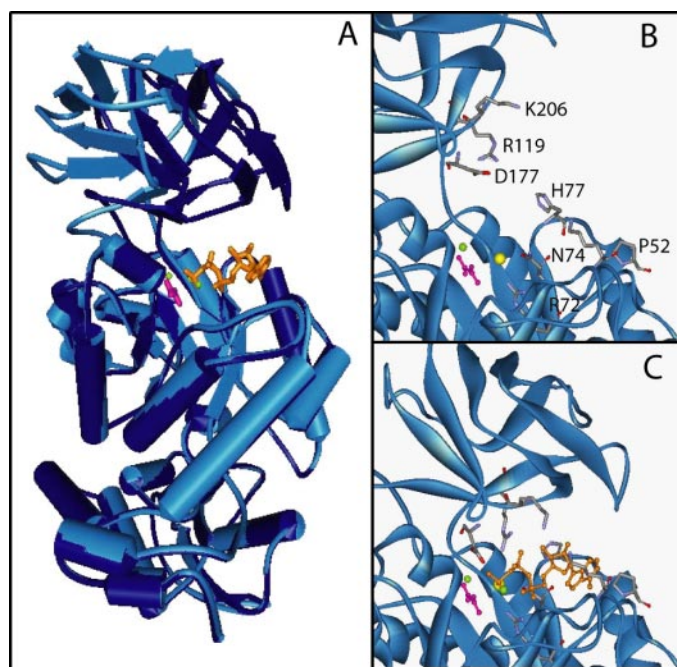


FIGURE 2. Ribbon representation of open and closed structures of WT-PK. Panel A shows the superposition of open (light blue) and closed (dark blue) conformers, illustrating the movement of the upper domain B over the central domain A. The lower portion is domain C; the N-terminal domain is not observed in the perspective. The active site is located between domains A and B. The right panels show the active site in the open (B) and closed (C) conformations. In panel B, the residues implicated in the binding of ATP are indicated and illustrated as stick models. Panel C shows the positioning of the residues of domain B that coordinate ATP-Mg²⁺. In all cases, the substrates are shown as ball and stick models and the color code is as follows: oxalate (violet), Mg²⁺ (green), K⁺ (yellow), and ATP (orange).

TABLE THREE

λ_{\max} spectral center of mass (SCM), and anisotropy of the intrinsic fluorescence of WT-PK

Fluorescence studies were performed at 25 °C in mixtures that contained 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of WT-PK in 25 mM Tris-HCl, pH 7.6. Where shown, the media contained 90 mM KCl, 10 mM (CH₃)NCl, 1 mM oxalate, 3 mM ATP, and 3 mM MgCl₂, with ligands and no K⁺, 100 mM of (CH₃)NCl was included; the mixture without ligands contained only 100 mM (CH₃)NCl. Fluorescence spectral centers of mass, or average emission wavelength (λ_{av}), were calculated as follows: $\lambda_{\text{av}} = \sum \lambda I(\lambda) / \sum I(\lambda)$, where λ and $I(\lambda)$ represent wavelength (in nm) and fluorescence intensity at a given wavelength, respectively. Anisotropy values (r) were calculated at their maximal emission.

	λ_{\max}	SCM	r
	nm	nm	
PK	334.4	348.1 ± 23.6	0.1087 ± 0.0023
PK-Mg ²⁺ -oxalate	331.6	346.5 ± 25.5	0.1468 ± 0.0024
PK-Mg ²⁺ -oxalate-K ⁺	330.8	346.5 ± 25.6	0.1489 ± 0.0023
PK-Mg ²⁺ -oxalate-ATP	330.9	345.8 ± 24.6	0.1591 ± 0.0025
PK-Mg ²⁺ -oxalate-ATP-K ⁺	330.5	345.0 ± 23.2	0.1682 ± 0.0028

Trp residues of WT-PK until the compact closed conformation of the active site (with ATP-Mg²⁺) is attained. The overall fluorescence data indicate that the occupancy of the active site and the movement of domain B are intimately related.

The Role of K^+ in the Structure and Kinetics of Pyruvate Kinase—The results outlined show that the inclusion of K⁺ induces a change in the kinetic mechanism of WT-PK from ordered to random. In order to define the dependence of the kinetics on K⁺ on the structure of PK, the crystallographic structure of the enzyme was examined. Each subunit of tetrameric WT-PK is formed by four structural domains: the N-terminal, A, B, and C domains. The active site is in a cleft formed by A and B domains. Rotation of the B domain over the A domain closes the active site cleft (19, 20) (Fig. 2A). The interdomain movement depends on the

occupancy of the active site. In the absence of ligands, the B domain is in the open conformation and highly mobile. The binding of K⁺, Mg²⁺, and PEP analogs to the active site results in either an open or partially closed (19, 43) conformation. The subsequent binding of ATP-Mg²⁺ brings the enzyme to the totally closed or active conformation (20). These data agree with our fluorescence results that show that the successive addition of ligands gradually closes the active site. These data fit well with the structure of PK in crystals grown with oxalate, Mg²⁺, K⁺, and ATP-Mg²⁺ (20). The unit cell of this crystal contains two tetramers. Two of the eight subunits contain oxalate, Mg²⁺, and K⁺; the other six also contain ATP-Mg²⁺. Subunits without nucleotide exhibit an open active site cleft, whereas five of the subunits with ATP-Mg²⁺ exhibit an angle of rotation of 41° in reference to the open subunits and are completely closed. When the nucleotide is present, residues Arg¹¹⁹, Lys²⁰⁶, and Asp¹⁷⁷ move 6.8, 10.4, and 6.8 Å, respectively, from their position in the open conformation and establish contacts with ATP-Mg²⁺ in the closed conformation (Fig. 2, B and C). This indicates that the binding site for the nucleotide is structured only after the cleft has been closed.

Structural studies have not yielded conclusive mechanistic information on the influence of K⁺ on the structural arrangements of WT-PK. However, our kinetic data show that K⁺ enhances the affinity constants for ADP-Mg²⁺, oxalate, and ADP-Cr²⁺, although they do not establish direct coordination with K⁺ (19, 20). This indicates that K⁺ induces the correct geometrical arrangement of the active site residues. This implies that K⁺ not only enhances the binding of substrates through the coordination with the phosphoryl oxygen of PEP or ATP but also arranges the active site pocket. Moreover, the effect of K⁺ on the conformation of the active site is also illustrated by the influence of the cation on the binding of ADP-Mg²⁺. With K⁺, ADP binds independently of the presence of PEP to the enzyme, whereas without K⁺, ADP binds to the enzyme only after PEP is bound. Since the ADP binding site is formed after the B domain has rotated over the A domain (Fig. 2), our data suggest that K⁺, PEP, or both contribute to the descent of the B domain. It is relevant to mention that two of the residues that coordinate K⁺, Asp¹¹² and Thr¹¹³, are positioned at the beginning of the hinge region that links the A and B domains.

In addition to its effect on PK, K⁺ is an activator of various other enzymes. In this context, it is particularly relevant that K⁺ activates inosine 5'-monophosphate dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by changing its kinetic mechanism from random order to ordered with inosine monophosphate and NAD⁺ as the first and second substrate, respectively (44, 45). The authors suggest that K⁺ induces a conformational change that permits the binding of NAD⁺ (44, 45). Crystallographic and kinetic studies of this enzyme suggest that K⁺ controls the conformation of the active site loop by stabilizing the conformation that binds NAD⁺ (46–48).

In summary, our data show that the role of K⁺ as an essential activator of WT-PK is not limited to coordination of the phosphate group of PEP or ATP, as shown quite clearly by crystallographic studies (19, 20). Our data show that in the absence of K⁺, ADP cannot bind to the active site until PEP arranges the ADP binding site (ordered mechanism with PEP as the first substrate). On the other hand, K⁺ induces the active (closed) conformation of the enzyme, allowing either PEP or ADP to bind independently (random order mechanism). In all likelihood, K⁺ is directly involved in the movement of the B domain and the acquisition of the active conformation of PK.

Acknowledgments—We thank Gabriel Mercado and Claudia I. Avitia for the design and technical assistance in subcloning E117K-PK into pTrc99A, respectively. We also thank Dr. Juan Pablo Pardo and Dr. Marietta Tuena de Gómez-Puyou for valuable suggestions and Dr. Armando Gómez-Puyou for kind help, valuable discussion, and careful revision of the manuscript.

REFERENCES

1. Kachmar, J. F. & Boyer, P. D. (1953) *J. Biol. Chem.* **200**, 669–682
2. Suelter, C. H. (1970) *Science* **168**, 789–795
3. Larsen, T. M. & Reed, G. H. (2001) *Handbook of Metalloproteins* (Bertini, I., Sigel, A. & Sigel, H., eds) pp. 9–37, Dekker, New York
4. Di Cera, E. (2004) *C. R. Biol.* **327**, 1065–1076
5. Toney, M. D., Hohenester, E., Cowan, S. W. & Jansonius, J. N. (1993) *Science* **261**, 756–759
6. Nowak, T. & Suelter, C. H. (1981) *Mol. Cell Biochem.* **35**, 65–75
7. Kayne, F. J. & Suelter, C. H. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 897–900
8. Wilson, R. H., Evans, H. J. & Becker, R. R. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 3825–3832
9. Suelter, C. H. (1967) *Biochemistry* **6**, 418–423
10. Wildes, R. A., Evans, H. J. & Becker, R. R. (1971) *Biochim. Biophys. Acta.* **229**, 850–854
11. Sorger, G. J., Ford, R. E. & Evans, H. J. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **54**, 1614–1621
12. Kayne, F. J. & Suelter, C. H. (1968) *Biochemistry* **7**, 1678–1684
13. Suelter, C. H., Singleton, R., Jr., Kayne, F. J., Arrington, S., Glass, J. & Mildvan, A. S. (1966) *Biochemistry* **5**, 131–139
14. Reed, G. H. & Cohn, M. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 6436–6442
15. Nowak, T. & Mildvan, A. S. (1972) *Biochemistry* **11**, 2819–2828
16. Kayne, F. J. & Reuben, J. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 220–222
17. Reuben, J. & Kayne, F. J. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 6227–6234
18. Muirhead, H., Clayden, D. A., Barford, D., Lorimer, C. G., Fothjergill-Gilmore, L. A., Schiltz, E., and Schmitt, W. (1986) *EMBO J.* **5**, 475–481
19. Larsen, T. M., Benning, M. M., Wesenberg, G. E., Rayment, I. & Reed, G. H. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **345**, 199–206
20. Larsen, T. M., Benning, M. M., Rayment, I. & Reed, G. H. (1998) *Biochemistry* **37**, 6247–6255
21. Ramírez-Silva, L., Ferreira, S. T., Nowak, T., Tuena de Gómez-Puyou, M. & Gómez-Puyou, A. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 3267–3274
22. Laughlin, L. T. & Reed, G. H. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **348**, 262–267
23. DePamphilis, M. L. & Cleland, W. W. (1973) *Biochemistry* **12**, 3714–3724
24. Ponce, E., Flores, N., Martínez, A., Valle, F. & Bolívar, F. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 5719–5722
25. Ramírez-Silva, L., de Gómez-Puyou, M. T. & Gómez-Puyou, A. (1993) *Biochemistry* **32**, 5332–5338
26. Büchner, T. & Pleiderer, G. (1955) *Methods Enzymol.* **1**, 435–440
27. Schoenmakers, T. J. M., Visser, G. J., Flik, G. & Theuvenet, P. R. (1992) *BioTechniques* **12**, 870–879
28. Kayne, F. J. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **143**, 232–239
29. Ramírez-Silva, L., Oria, J., Gómez-Puyou, A. & Tuena de Gómez-Puyou, M. (1997) *Eur. J. Biochem.* **250**, 583–589
30. Reynard, A. M., Hass, L. F., Jacobsen, D. D. & Boyer, P. D. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 2277–2283
31. Mildvan, A. S. & Cohn, M. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 1178–1193
32. Ainsworth, S. & MacFarlane, N. (1973) *Biochem. J.* **131**, 223–236
33. Busto, F., Del Valle, P. & Soler, J. (1988) *Biochem. Cell Biol.* **66**, 148–157
34. Jetten, M. S. M., Gubler, M. E., Lee, S. H. & Sinskey, A. J. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2501–2507
35. Steiner, P., Fussenegger, M., Bailey, J. E. & Sauer, U. (1998) *Gene (Amst.)* **220**, 31–38
36. Schramm, A., Siebers, B., Tjaden, B., Brinkmann, H. & Hensel, R. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 2001–2009
37. Johnsen, U., Hansen, T. & Schonheit, P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 25417–25427
38. Malcovati, M. & Valentini, G. (1982) *Methods Enzymol.* **90**, 170–179
39. Cleland, W. W. (1970) in *The Enzymes*, Vol. 2, 3rd Ed. (Boyer, P. D., ed) pp. 1–65, Academic Press, Inc., New York
40. Reed, G. H. & Morgan, S. D. (1974) *Biochemistry* **13**, 3537–3541
41. Gupta, R. K. & Benovic, J. L. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8878–8896
42. Ramírez-Silva, L., & Oria-Hernandez, J. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 2377–2385
43. Larsen, T. M., Laughlin, L. T., Holden, H. M., Rayment, I. & Reed, G. H. (1994) *Biochemistry* **33**, 6301–6309
44. Heyde, E., Nagabhusanam, A., Vonarx, M. & Morrison, J. F. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* **429**, 645–660
45. Heyde, E. & Morrison, J. F. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* **429**, 661–671
46. Markham, G. D., Bock, C. L. & Schalk-Hihi, C. (1999) *Biochemistry* **38**, 4433–4440
47. Kerr, K. M., Cahoon, M., Bosco, D. A. & Hedstrom, L. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.* **375**, 131–137
48. Prosisie, G. L., Wu, J. Z. & Luecke, H. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 50654–50659

"Como todos los jóvenes, al principio yo también quería ser un genio, pero afortunadamente un día intervino la risa"

Lawrence Durrell

Novelista y poeta británico (1912-1990)