

El Análisis de Control de Flujo como Herramienta en la Manipulación de Vías Metabólicas

Rafael Moreno Sánchez, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología

El análisis de control de una vía metabólica permite determinar cuantitativamente el grado de control que una enzima (E_i) ejerce sobre el flujo J (coeficiente de control de flujo, $C_{E_i}^J$) y sobre la concentración de intermediarios M (coeficiente de control de concentración, $C_{E_i}^M$). Asimismo, ayuda a entender las razones por las cuales una enzima ejerce un control alto o bajo, y porque el control de la vía no reside en una sola enzima, sino que se reparte entre varias de ella [1]. Se han desarrollado diversas estrategias experimentales para determinar los $C_{E_i}^J$. Por ejemplo, se han utilizado inhibidores específicos en el análisis de control de la fosforilación oxidativa tanto de mitocondrias aisladas [2-5] como de células intactas [6,7]. El análisis de elasticidades es tal vez el enfoque experimental más profusamente empleado en muchas vías metabólicas [8] pero principalmente en el análisis de control de la glicólisis [1]. Este consiste en determinar la sensibilidad de una enzima (o bloque de enzimas) a la variación en la concentración de su sustrato o su producto, durante el funcionamiento de la vía metabólica en estado estacionario. Si la actividad no cambia significativamente con la variación en alguno de sus ligandos (baja elasticidad, $\varepsilon_{E_i}^J$), entonces la enzima (o bloque de enzimas) está cercana a la saturación y, por tanto, limita el flujo (alto $C_{E_i}^J$); en otras palabras, existe una relación inversamente proporcional entre la elasticidad de una enzima el grado de control que ejerce sobre el flujo.

Un tercer enfoque, mucho menos utilizado debido a su complejidad metodológica, se podría llamar genético y consiste en determinar el efecto sobre el flujo al variar selectivamente la expresión de una enzima *in vivo*, sin alterar el contenido y actividad del resto de las enzimas de la vía metabólica estudiada [9]. Otro enfoque de desarrollo reciente es la construcción de modelos matemáticos de las vías metabólicas ("*in silico* Biology") basada en el análisis de las propiedades cinéticas de las enzimas, tanto purificadas como contenidas en homogenados y extractos celulares. Un último enfoque experimental consiste en la reconstrucción de la vía metabólica con enzimas comerciales o con enzimas recombinantes, en condiciones cercanas a las fisiológicas.

Cualquiera que sea la estrategia experimental disponible, el objetivo inicial del análisis de control es el de establecer cuál o cuáles enzimas y transportadores ejercen control significativo del flujo (y de la concentración de los intermediarios metabólicos) y cuales no, cuando la vía está sujeta a una variedad de condiciones experimentales de interés tales como exposición a diferentes temperaturas, pH, estrés oxidativo, hormonas, plaguicidas, o bien en estados patológicos y enfermedades. Cabe resaltar que el establecer la distribución de control de una vía metabólica permite identificar cuales son los sitios potenciales que deberían de modificarse, para alterar el flujo o la concentración de algún metabolito de interés biotecnológico o clínico (aminoácidos y lípidos esenciales, vitaminas, antibióticos, glutatión). Una vez identificados los sitios controladores, es recomendable averiguar las razones bioquímicas, celulares y genéticas por las cuales esas proteínas ejercen control, y las restantes enzimas no. Para esto último se requiere determinar las elasticidades de las enzimas controladoras hacia sus sustratos y productos

y también hacia sus otros posibles ligandos (activadores e inhibidores fisiológicos), y determinar sus propiedades cinéticas (si es que estas no han sido estudiadas), su localización subcelular y su concentración.

Cuando se haya generado toda esta información, es altamente probable que se pueda manipular exitosamente el flujo o la concentración de algún intermediario metabólico. Tal vez por carecer de esta información, o de ignorarla, ha resultado que los intentos de manipulación de las vías metabólicas usando las herramientas de la biología molecular [10, 11] o fármacos específicos para la supuestamente principal enzima limitante [12] sean a la fecha poco alentadores. Existen pocos ejemplos de la modificación del flujo o de la concentración de algún metabolito mediante la manipulación genética o química sustentada en el análisis de control (la modulación del metabolismo energético en células tumorales o en levaduras para disminuir su elevada proliferación o para aumentar la producción de etanol, respectivamente). Sin embargo, hay reportes donde el análisis de control ha permitido identificar las enzimas que se alteran en algunos estados patológicos, y las razones por las cuales esto ocurre [13].

Referencias

- [1] Fell D (1997) Understanding the control of metabolism. Portland press, London.
- [2] Groen AK, Wanders RJA, Westerhoff HV, et al. (1982) Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* 257, 2754-2757.
- [3] Moreno-Sánchez R (1985) Regulation of oxidative phosphorylation in mitochondria by external free Ca²⁺ concentrations. *J. Biol. Chem.* 260, 4028-4034
- [4] Moreno-Sánchez R (1985) Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 260, 12554-12560.
- [5] Moreno-Sánchez R, Devars S, et al. (1991) Distribution of control of oxidative phosphorylation in mitochondria oxidizing NAD-linked substrates. *BBA-Bioenergetics* 1060, 284-292.
- [6] Brown GC, Lakin-Thomas PL, Brand MD (1990) Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells. *Eur. J. Biochem.* 192, 355-362.
- [7] Rodríguez-Enríquez S, Torres-Márquez ME, Moreno-Sánchez R (2000) Substrate oxidation and ATP supply in AS-30D hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 21-30.
- [8] Moreno-Sánchez R, Bravo C, Westerhoff HV (1999) Determining and understanding the control of flux. An illustration in submitochondrial particles of how to validate schemes of metabolic control. *Eur. J. Biochem.* 264, 427-433.
- [9] Flint HJ, Tateson RW, et al. (1981) Control of the flux in the arginine pathway of *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 200, 231-246.
- [10] Hauf J, Zimmermann FK, Müller S (2000) Simultaneous overexpression of seven glycolytic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbial Technol.* 26, 688-698.
- [11] Hoffman M, Gora M, Rytka J (2003) Identification of rate limiting steps in yeast heme biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 1247-1253.
- [12] Ghosh S, Chan JMW, et al. (2004) Effects of bisphosphonates on the growth of *Entamoeba histolytica* and *Plasmodium* species in vitro and in vivo. *J. Med. Chem.* 47, 175-187.
- [13] Kuznetsov AV, Winkler K, et al. (1997) Application of inhibitor titrations for the detection of oxidative phosphorylation defects in saponin-skinned muscle fibers of patients with mitochondrial diseases. *BBA-Bioenergetics* 1360, 142-150.