

SOLUCIÓN AL PROBLEMA BIOQUÍMICO
Producción de H₂S por cistationina β-sintasa

SOLUCIÓN AL PROBLEMA BIOQUÍMICO CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE H₂S POR LA CISTATIONINA β-SINTASA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Solución del problema

La mayoría de las enzimas siguen una cinética hiperbólica que puede ser descrita por la ecuación de Henri-Michaelis-Menten (HMM) (Fig. 4A). Una forma de estimar las constantes cinéticas de las enzimas (V_m , K_m , V_m/K_m) es utilizar un método para linearizar la ecuación de HMM y utilizar los valores de la ordenada al origen, la pendiente y/o la abscisa para obtener dichas constantes. Uno de los métodos más comunes de linearización de la ecuación de HMM es el método de Lineweaver-Burk o de doble recíproco; en este método se grafica $1/v$ vs $1/[S]$ y con la ordenada al origen se obtiene $1/V_m$ y a partir de la abscisa $-1/K_m$.

El problema con la linearización por el método de doble recíproco es que los valores no se distribuyen equitativamente a lo largo de la línea (Fig. 4B), de tal forma que a concentraciones altas de sustrato los puntos se acumulan cerca del eje “Y”, lo que ocasiona que los puntos de baja concentración de sustrato tengan un mayor peso a la hora de realizar la regresión lineal. Una forma más precisa de estimar los parámetros cinéticos es a través del ajuste no lineal (9), el cual se puede lograr mediante software especializado (Ej. OriginLab®).

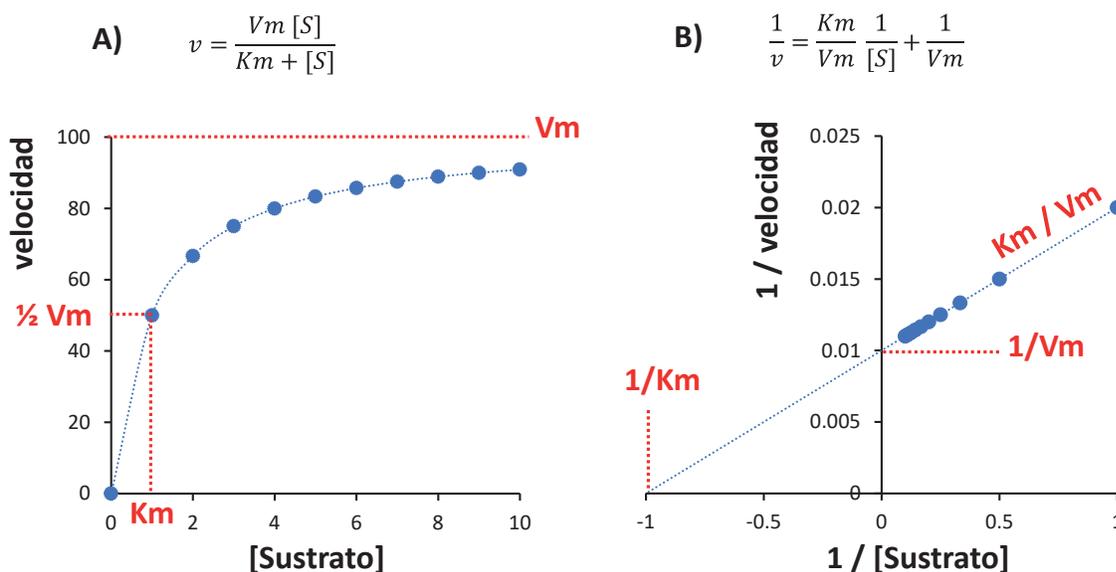


Figura 4. Cinética enzimática. A) La mayoría de las enzimas siguen un comportamiento cinético de tipo hiperbólico que es descrito por la ecuación de Henry-Michaelis-Menten. **B)** El método de Lineweaver-Burk o de doble recíproco sirve para linearizar la ecuación de Henry-Michaelis-Menten y facilitar el cálculo de las constantes cinéticas de velocidad máxima (V_m) y la constante de Michaelis-Menten (K_m).

En la figura 5A se muestra el ajuste no lineal de los datos cinéticos correspondientes a la reacción canónica ($\text{Ser} + \text{HCys} \rightleftharpoons \text{Cth}$) y a la reacción de producción de H_2S ($\text{Cys} + \text{Cys} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{S} + \text{Lth}$) de la CBS de *T. cruzi*. El ajuste no lineal de los datos experimentales se llevó a cabo utilizando el software OriginLab® (Fig. 5A). En la figura 5B se muestra el gráfico de doble recíproco y tanto el ajuste no lineal como el de doble recíproco se utilizaron para estimar las constantes cinéticas. En la tabla 2 se encuentran los datos de doble recíproco que fueron utilizados para realizar el gráfico de tipo Lineweaver-Burk. En la tabla 3 se muestran las constantes cinéticas utilizando el ajuste no lineal y en la tabla 4 las constantes cinéticas estimadas por el gráfico de doble recíproco.

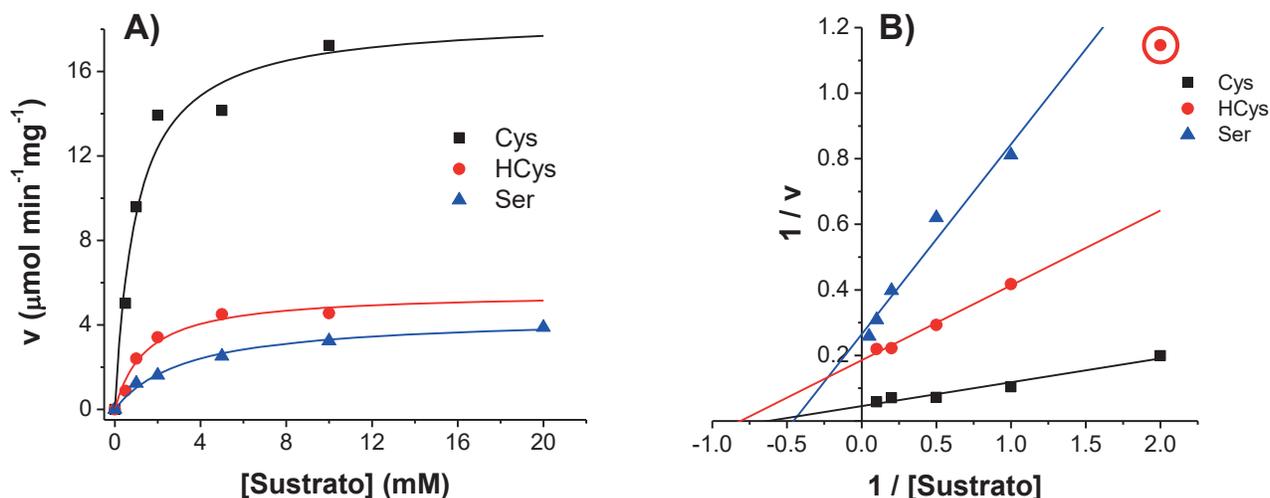


Figura 5. Cinética de la reacción canónica y de la reacción no canónica de producción de H_2S a partir de cisteína. **A)** La cinética de ambas reacciones presentan un comportamiento hiperbólico. Los círculos rojos son la cinética variando la concentración de homocisteína (HCys) y dejando constante la concentración de serina ($\text{Ser} = 20\text{mM}$); los triángulos azules son los datos cinéticos que corresponden a la variación de Ser y dejando constante la concentración de HCys = 10mM . Los cuadrados negros corresponden a la cinética de formación de sulfuro (H_2S) a partir de cisteína (Cys). Los datos experimentales fueron ajustados a la ecuación de Henri-Michaelis-Menten usando el software OriginLab 8®. **B)** Linearización de los datos cinéticos por el método de dobles recíprocos, el dato encerrado en un círculo rojo **no** fue considerado para el ajuste lineal.

Un punto de los datos del doble recíproco (2, 1.147) no fue tomado en cuenta en la regresión lineal (Tabla 2). Este punto al ser la concentración más baja de sustrato es uno de los más importantes en la tendencia del gráfico, cuando es considerado en la regresión lineal, las constantes cinéticas son mucho más elevadas de lo esperado según el ajuste no lineal, obteniendo valores de $V_m=11$ y $K_{m_{\text{HCys}}}=5$.

Tabla 2. Datos de doble recíproco

Reacción: $\text{Cys} + \text{Cys} \rightleftharpoons \text{Lth} + \text{H}_2\text{S}$		Reacción: $\text{Ser} + \text{HCys} \rightleftharpoons \text{Cth} + \text{H}_2\text{O}$			
$1/[\text{Cys}]$	$1/v$	$1/[\text{HCys}]$	$1/v$	$1/[\text{Ser}]$	$1/v$
2	0.199	2	1.147*	1	0.811
1	0.104	1	0.418	0.5	0.620
0.5	0.072	0.5	0.293	0.2	0.398
0.2	0.071	0.2	0.222	0.1	0.308
0.1	0.058	0.1	0.220	0.05	0.258

*Dato no considerado para el ajuste lineal

Tabla 3. Constantes cinéticas estimadas con ajuste no lineal (Software Origin Lab®)

Sustrato	V _m (U mg ⁻¹)	K _m (mM)	V _m /K _m
Cys	18.6	1	18.6
HCys	5.5	1.5	3.7
Ser	4.4	3.5	1.3

Tabla 4. Constantes cinéticas estimadas con el método de doble recíproco

Sustrato	K _m /V _m	1/V _m	V _m (U mg ⁻¹)	K _m (mM)	V _m /K _m
Cys	0.07	0.045	22	1.54	14.28
HCys	0.23	0.185	5.4	1.24	4.35
Ser	0.58	0.263	3.8	2.2	1.72

Discusión

Es importante notar que algunas enzimas pueden unir a sustratos diferentes a los canónicos, en un fenómeno que se conoce como promiscuidad de sustratos (10). La importancia de las reacciones adicionales a la canónica dependerá de la concentración de sustratos intracelular y de las constantes cinéticas de la enzima por sus diferentes sustratos.

En el caso de las reacciones que estamos estudiando, hay que notar que las constantes cinéticas de CBS son más favorables para la reacción no canónica de producción de H₂S, teniendo una V_m alrededor de 4 veces mayor y una eficiencia catalítica (V_m/K_m) 3 veces mayor con respecto a la HCys y casi 8 veces mayor con respecto a la Ser.

Conclusión

La CBS de *T. cruzi* es un mejor catalizador para la reacción de producción de H₂S que para su reacción canónica y la importancia de las reacciones en el parásito dependerá de la abundancia intracelular de cada uno de los sustratos.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez con el apoyo de CONAHCyT del Fondo de Ciencia de Frontera, Paradigmas y Controversias con el proyecto número 320870 y con el Proyecto de Ciencia Básica número 282663

Referencias

- Miles EW, Kraus JP. Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J Biol Chem.* 2004 Jul 16;279(29):29871-4.
- Sanderson SM, Gao X, Dai Z, Locasale JW. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nat Rev Cancer.* 2019 Nov;19(11):625-637.
- Sacharow SJ, Picker JD, Levy HL. Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. 2004 Jan 15 [updated 2017 May 18]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW,

- Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. PMID: 20301697.
4. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1999;19:217-46.
5. Conter C, Fruncillo S, Fernández-Rodríguez C, Martínez-Cruz LA, Dominici P, Astegno A. Cystathionine β -synthase is involved in cysteine biosynthesis and H₂S generation in *Toxoplasma gondii*. *Sci Rep.* 2020 Sep 4;10(1):14657.
6. Myszkowska J, Derevenkov I, Makarov SV, Spiekerkoetter U, Hannibal L. Biosynthesis, Quantification and Genetic Diseases of the Smallest Signaling Thiol Metabolite: Hydrogen Sulfide. *Antioxidants* (Basel). 2021 Jul 1;10(7):1065.
7. Vázquez C, Encalada R, Belmont-Díaz J, Rivera M, Alvarez S, Nogueda-Torres B, Saavedra E. Metabolic control analysis of the transsulfuration pathway and the compensatory role of the cysteine transport in *Trypanosoma cruzi*. *Biosystems.* 2023 Dec;234:105066.
8. Marciano D, Santana M, Nowicki C. Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H₂S production in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2012 Oct;185(2):114-20.
9. Motulsky H. and Christopoulos A, Chapter 2- Preparing data for nonlinear regression. In *Fitting models to biological data using linear and non-linear regression: a practical guide to curve fitting* (New York, NY, 2004; online edn, Oxford Academic, 31 Oct. 2023), <https://doi.org/10.1093/oso/9780195171792.001.0001>
10. Munishwar Nath Gupta, Vladimir N. Uversky, Chapter 9 - The various facets of protein promiscuity: not just broad specificity of proteins, editor(s): Munishwar Nath Gupta, Vladimir N. Uversky, In *Foundations and Frontiers in Enzymology, Structure and Intrinsic Disorder in Enzymology*, Academic Press; 2023. p. 241-277.